



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PROPPG
INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO RURAL – IDR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E
TECNOLOGIAS SUSTENTÁVEIS – PPGSTS

ANTONIA FRANCIANY ARAUJO COELHO

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E
CITOTÓXICO DE EXTRATOS DO PERICARPO DA ROMÃ

REDENÇÃO, CEARÁ, BRASIL

2025

ANTONIA FRANCIANY ARAUJO COELHO

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E
CITOTÓXICO DE EXTRATOS DO PERICARPO DA ROMÃ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis (PPGSTS), da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB).

Linha de Pesquisa: Sociobiodiversidade e Sustentabilidade.

Orientador: Prof. Dra. Maria do Socorro Moura Rufino

Co-orientador: Prof. Dra Luanne Eugênia Nunes

REDENÇÃO, CEARÁ, BRASIL

2025

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Coelho, Antonia Franciany Araujo.

C672a

Avaliação preliminar do potencial antimicrobiano e citotóxico de extratos do pericarpo da romã / Antonia Franciany Araujo Coelho. - Redenção, 2025.
61f: il.

Dissertação - Curso de Sociobiodiversidade E Tecnologias Sustentáveis, Programa De Pós-graduação Sociobiodiversidade E Tecnologias Sustentáveis, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2025.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro Moura Rufino.
Coorientador: Profa. Dra. Luanne Eugênia Nunes.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Compostos bioativos. 3. Extratos vegetais. 4. Punica granatum L. I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 615.792

ANTONIA FRANCIANY ARAUJO COELHO

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E
CITOTÓXICO DE EXTRATOS DO PERICARPO DA ROMÃ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis (PPGSTS), da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB). Linha de pesquisa Sociobiodiversidade e Sustentabilidade.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Maria do Socorro Moura Rufino (Presidente – Orientadora)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira – UNILAB

Professora Doutora Luanne Eugênia Nunes (Externa ao Programa – Co-orientadora)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira – UNILAB

Professor Doutor Joaquim Torres Filho (Externo ao Programa)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira – UNILAB

Professor Doutor Marcelo Vítor de Paiva Amorim (Externo ao Programa)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira – UNILAB

"Don't panic"

- Douglas Adams

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela força e sabedoria concedidas ao longo de toda esta jornada, sustentando-me nos momentos mais desafiadores.

Meu profundo agradecimento à minha orientadora, Maria do Socorro, e à minha co-orientadora, Luanne Eugênia, pela colaboração, paciência, valiosos ensinamentos e pelo incentivo fundamental durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento muito especial à minha família, que é meu alicerce. À minha mãe, Francisca Araújo, ao meu pai, Vanedir Coelho, e à minha irmã, Vânia Coelho, pelo constante apoio em todos os momentos desta caminhada.

Estendo meus agradecimentos também aos meus fiéis companheiros de quatro patas, Amora e Bruce, pela lealdade, companhia e pelos momentos de descontração e afeto que tantas alegrias me proporcionaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço de coração a todos os meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, compreendendo minhas ausências e me oferecendo apoio e incentivo constantes ao longo de todo este percurso.

RESUMO

A romã (*Punica granatum* L.), fruta de regiões tropicais e subtropicais, tem despertado interesse científico por seu potencial terapêutico. Usada na medicina popular para tratar doenças, por ser rica em compostos que conferem atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, podendo agir sozinhos ou em conjunto, gerando efeitos variados, apresentando ação citotóxica desejada ou não. Objetivou-se avaliar características físico-químicas, fitoquímicas, antimicrobianas e citotóxicas de extratos do pericarpo da romã obtidos com os solventes etanol e água em diferentes proporções. Para a produção dos extratos, os frutos de romã foram coletados no município de Baturité/CE. Os pericarpos dos frutos foram higienizados, expostos a secagem e posteriormente fragmentados. Em seguida, 20 g do material vegetal foram acondicionados em frascos contendo 100 mL de solvente, sendo preparados cinco extratos com diferentes proporções de etanol e água (v/v): R1: 100%, R2: 70%, R3: 50% e R4: 20% de etanol. O extrato R5 foi obtido por decocção, utilizando-se 6 g do pericarpo em 150 mL de água destilada. Foram analisados rendimento e densidade por meio de relações entre massas e volume. A caracterização fitoquímica verificou a presença dos seguintes compostos: alcaloides, cumarinas, flavonoides, saponinas, taninos e esteroides / triterpenos, por meio de ensaios qualitativos, baseados em reações colorimétricas e de precipitação. A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo método de microdiluição em caldo, as seguintes cepas bacterianas foram utilizadas neste estudo: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* NCTC 12923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A citotoxicidade dos extratos foi investigada preliminarmente por meio de um ensaio de hemólise, utilizando hemácias de carneiro (Laborclin®) como modelo. As amostras foram analisadas nas concentrações de 64 a 512 µg/mL, sendo quantificada por meio da leitura da absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro a 541 nm. Os resultados demonstraram que solventes com maior proporção de água produziram extratos mais densos, se que houvesse padronização nos rendimentos. Na análise fitoquímica foi possível verificar a presença de todos os grupos de metabólitos secundários que foram analisados em todos os extratos, com pequena variação para o extrato R5, onde extrato aquoso pode ter concentrado maiores teores de flavonoides glicosilados e taninos hidrolisáveis. Os extratos do pericarpo da romã tiveram efeito antimicrobiano promissor na cepa bacteriana gram-positiva, *S. aureus* ATCC 29213, com CIM variando de 128 a 256 µg/mL entre os extratos. Em comparação, as Gram-negativas, *E. coli* NCTC 12923 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, foram menos sensíveis, com CIM de 512 µg/mL e 1024 µg/mL, respectivamente. Para a atividade hemolítica o extrato R4, na concentração de 512 µg/mL, apresentou a maior atividade hemolítica, com diferença de 68,29% em relação à menor concentração (64 µg/mL), sendo o único classificado como de toxicidade moderada, apresentando aproximadamente 69% de hemólise. Os demais variaram entre 0 e 40%, os quais foram considerados de baixa toxicidade. Todos os extratos apresentaram perfis fitoquímicos similares e foram mais eficazes contra bactérias Gram-positivas. Além disso, demonstraram baixa citotoxicidade, indicando segurança para uso medicinal.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Compostos bioativos. Extratos vegetais. *Punica granatum* L.

ABSTRACT

Pomegranate (*Punica granatum* L.), a fruit from tropical and subtropical regions, has aroused scientific interest due to its therapeutic potential. Used in folk medicine to treat diseases, it is rich in compounds that confer antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities, which can act alone or in combination, generating varied effects, presenting desired or undesired cytotoxic action. The objective was to evaluate the physicochemical, phytochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of pomegranate pericarp extracts obtained with ethanol and water in different proportions. For the production of the extracts, pomegranate fruits were collected in the municipality of Baturité/CE. The pericarps of the fruits were sanitized, exposed to drying, and subsequently fragmented. Next, 20 g of plant material were placed in flasks containing 100 mL of solvent, and five extracts were prepared with different proportions of ethanol and water (v/v): R1: 100%, R2: 70%, R3: 50%, and R4: 20% ethanol. Extract R5 was obtained by decoction, using 6 g of pericarp in 150 mL of distilled water. Yield and density were analyzed using mass-to-volume ratios. Phytochemical characterization verified the presence of the following compounds: alkaloids, coumarins, flavonoids, saponins, tannins, and steroids/triterpenes, through qualitative assays based on colorimetric and precipitation reactions. Antimicrobial activity was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using the broth microdilution method. The following bacterial strains were used in this study: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* NCTC 12923, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The cytotoxicity of the extracts was preliminarily investigated using a hemolysis assay with sheep red blood cells (Laborclin®) as a model. Samples were analyzed at concentrations of 64 to 512 µg/mL, and quantified by measuring the absorbance of the supernatant in a spectrophotometer at 541 nm. The results showed that solvents with a higher proportion of water produced denser extracts, without standardization of yields. Phytochemical analysis revealed the presence of all analyzed secondary metabolite groups in all extracts, with slight variation for extract R5, where the aqueous extract may have concentrated higher levels of glycosylated flavonoids and hydrolyzable tannins. Pomegranate pericarp extracts showed promising antimicrobial effects against the Gram-positive bacterial strain, *S. aureus* ATCC 29213, with MICs ranging from 128 to 256 µg/mL among the extracts. In comparison, the Gram-negative bacteria, *E. coli* NCTC 12923 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, were less sensitive, with MICs of 512 µg/mL and 1024 µg/mL, respectively. For hemolytic activity, extract R4, at a concentration of 512 µg/mL, showed the highest hemolytic activity, with a difference of 68.29% compared to the lowest concentration (64 µg/mL), being the only one classified as moderately toxic, showing approximately 69% hemolysis. The others varied between 0 and 40%, which were considered low toxicity. All extracts presented similar phytochemical profiles and were more effective against Gram-positive bacteria. Furthermore, they demonstrated low cytotoxicity, indicating safety for medicinal use.

Keywords: Antimicrobial activity. Bioactive compounds. Plant extracts. *Punica granatum* L.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 Romã (<i>Punica granatum</i> L.,)	13
3.1.1 Usos e aplicações.....	15
3.1.1.1 Alimentos e nutrição	16
3.1.1.2 Medicinais e terapêuticos	17
3.2 Extração de compostos bioativos de plantas para fitoterapia	19
3.3 Compostos bioativos	21
3.4 Atividade antimicrobiana	25
3.5 Perfil citotóxico de extratos vegetais	27
4 METODOLOGIA:.....	31
4.1 Obtenção do material vegetal.....	31
4.2 Obtenção dos extratos vegetais	31
4.3 Caracterização da densidade dos derivados vegetais	33
4.4 Caracterização fitoquímica dos derivados vegetais	33
4.5 Atividade antimicrobiana	35
4.6 Avaliação da atividade hemolítica	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Rendimento e caracterização do físico-química dos derivados vegetais	38
5.2 Caracterização fitoquímica dos derivados vegetais	39
5.3 Atividade antimicrobiana	44
5.4 Avaliação da atividade hemolítica dos extratos vegetais.....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS:	51
REFERÊNCIAS:	52

1 INTRODUÇÃO

A romã (*Punica granatum* L.) é uma fruta originária das regiões do Oriente Médio e da Ásia Central, atualmente cultivada em diversas partes do mundo, especialmente em áreas de clima tropical e subtropical (Shaygannia *et al.*, 2016). O crescente interesse por essa espécie no contexto agroindustrial e científico se deve ao seu elevado valor nutricional e ao seu expressivo potencial funcional e terapêutico. Seu uso empírico na medicina tradicional, é agora respaldado por estudos que comprovam a ação de seus compostos bioativos (Chaves e Santos, 2024; Mohan *et al.*, 2024).

Esses bioativos auxiliam na mitigação do avanço de bactérias multirresistentes, cuja proliferação tem sido impulsionada pelo uso inadequado de antibióticos, resultando na ineficácia de tratamentos convencionais. Torna-se mais evidente a necessidade da busca por alternativas terapêuticas eficazes. Nesse contexto, os polifenóis de origem botânica têm se destacado por suas propriedades biológicas e potenciais benefícios (Scaglione *et al.*, 2024).

A romã é uma fruta que apresenta compostos fenólicos, vitaminas e ácidos graxos, cuja concentração e perfil químico variam de acordo com a parte da fruta analisada, estágio de maturação e cultivar (Silva *et al.*, 2021; Syahputra *et al.*, 2025). Estudos demonstram que a casca da romã apresenta uma concentração significativamente maior de compostos fenólicos em comparação às sementes e ao suco, sendo considerada a principal fonte desses metabólitos (Yan *et al.*, 2017). Esses compostos bioativos lhe confere uma ampla gama de propriedades biológicas, entre as quais se destacam as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (Mohan *et al.*, 2024; Pirzadeh *et al.*, 2021; Shaygannia *et al.*, 2016).

Dentre eles a atividade antimicrobiana da romã tem sido amplamente investigada, com resultados promissores contra diversos micro-organismos patogênicos de interesse clínico. Extratos obtidos, principalmente das cascas, sementes e flores, demonstram eficácia contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* spp.) (Hamrita *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021).

A produção caseira de extratos se mostra como uma alternativa acessível para o aproveitamento dos compostos bioativos da romã. Métodos simples como a maceração em etanol ou infusão em água quente permitem a obtenção de extratos ricos em substâncias com propriedades terapêuticas. Contudo, é importante destacar que a falta de padronização, controle microbiológico e estabilidade desses extratos limita sua aplicação como substitutos de produtos industrializados.

É necessário que o extrato botânico seja considerado uma alternativa terapêutica segura, pois os produtos naturais contêm diversos fitonutrientes que podem afetar diferentes funções do organismo. Esses compostos podem agir sozinhos ou em conjunto, gerando efeitos variados. Alguns apresentam ação citotóxica seletiva ou não, enquanto outros protegem as células, o que mostra a dualidade de suas funções biológicas (Stepanic *et al.*, 2015).

Dessa forma, a romã se destaca não apenas por seu valor nutricional e terapêutico, mas também como uma matéria-prima estratégica para o desenvolvimento de produtos naturais com potencial aplicabilidade farmacêutica. Seu pericarpo, em especial, reúne compostos bioativos de interesse para programas de fitoterapia do Sistema Único de Saúde (SUS), que incentivam o uso de plantas medicinais. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar as características físico-químicas, fitoquímicas e a atividade antimicrobiana de extratos obtidos da pericarpo da romã, bem como analisar sua segurança por meio de testes de hemólise, a fim de determinar seu potencial como alternativa terapêutica natural para uso farmacêutico.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características físico-químicas, fitoquímicas, antimicrobianas e atividade hemolítica de extratos do pericarpo da romã (*Punica granatum* L.) obtidos com solventes hidroetanólicos.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos do pericarpo da romã utilizando solventes em diferentes proporções.
- Caracterizar físico-quimicamente os extratos obtidos a partir do pericarpo da romã, conforme os solventes hidroetanólicos.
- Caracterizar fitoquimicamente os extratos obtidos, identificando qualitativamente os metabólitos secundários presentes.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos frente a micro-organismos de interesse médico.
- Investigar o perfil citotóxico dos extratos de romã por meio da determinação da atividade hemolítica.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Romã (*Punica granatum* L.,)

A romãzeira tem como nome científico *Punica granatum* L.. Trata-se de uma planta frutífera anteriormente classificada na família Punicaceae, o gênero *Punica* passou a ser incluído na família Lythraceae, com base em evidências morfológicas e moleculares (Yuan *et al.*, 2018).

Considerado como um arbusto que pode crescer até 3 metros de altura. Suas folhas caem durante certas épocas do ano (são chamadas de caducifólias), medem entre 4 e 8 centímetros e aparecem em pequenos grupos, produz dois tipos de flores – masculinas e hermafroditas –, ambas vermelhas-alaranjadas, bem vistosas (Concenço *et al.*, 2023; Erkan e Dogan, 2018) (Figura 1). Os frutos são redondos, com uma casca resistente e brilhante de cor acastanhada, representando aproximadamente 50% do peso da romã (Ciccone *et al.*, 2023; Mininel e Mininel, 2024).

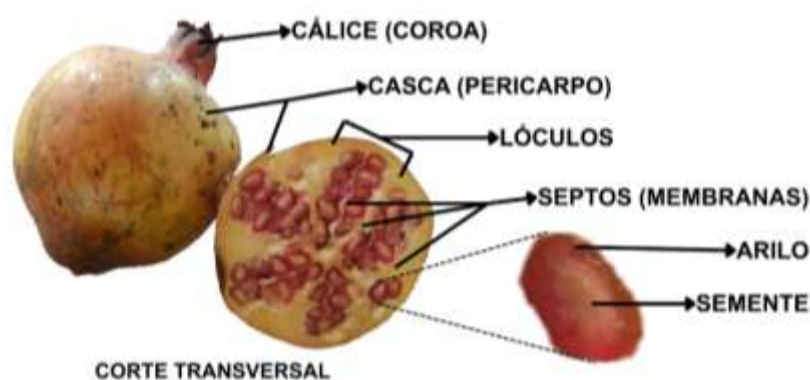
Figura 1 - Romãzeira



Fonte. Autora, 2025

A romã é classificada como um fruto do tipo baga, em algumas variedades pode apresentar leves saliências em sua superfície que dão à fruta uma aparência levemente angulosa, cujo diâmetro pode chegar a 12 cm. Internamente, abriga numerosas sementes envoltas por uma polpa rósea, suculenta, comestível e rica em um líquido de sabor adocicado (Mininel e Mininel, 2024) (Figura 2). Embora seja considerada uma fruta não climatérica, com baixa atividade respiratória após a colheita, apresenta elevada perecibilidade, devido à sua sensibilidade à perda de água, suscetibilidade a danos mecânicos e predisposição a infecções fúngicas na pós-colheita, fatores que podem acelerar sua deterioração mesmo sem um pico de respiração (Meighani *et al.*, 2015). Além disso, condições inadequadas de armazenamento, especialmente temperaturas acima das recomendadas, reduzem significativamente sua vida útil.

Figura 2 - Morfologia da romã.



Fonte. Autora, 2025

Estima-se que existam mais de 500 variedades de romã em todo o mundo. A fruta em questão possui uma vasta história de uso medicinal que remonta a civilizações antigas, onde era utilizada no tratamento de diversas enfermidades (Silva *et al.*, 2013). Na medicina tradicional, suas propriedades terapêuticas eram reconhecidas, o que evidenciava a presença de compostos bioativos com potencial terapêutico. Estudos recentes validam os efeitos benéficos dessa fruta à saúde (Chaves e Santos, 2024).

Embora os frutos sejam reconhecidos como a principal parte da romãzeira, outras estruturas como folhas, caules e flores também têm atraído crescente atenção da comunidade científica. Isso se deve à presença expressiva de metabólitos secundários, que conferem a essas partes um relevante potencial bioativo. Estudos recentes têm demonstrado que esses componentes não aproveitados tradicionalmente apresentam uma diversidade significativa de compostos com propriedades funcionais e terapêuticas (Maphetu *et al.*, 2022).

Melgarejo-Sánchez *et al.* (2021), analisaram a bioatividade de diferentes partes da planta e entre diversas cultivares. Os autores apresentaram uma comparação entre essas variedades, evidenciando como cada uma se destaca em determinados aspectos bioativos. Esses resultados indicam que as diferenças genéticas e morfológicas entre as cultivares influenciam diretamente a composição e a concentração de compostos bioativos presentes nos frutos.

A romã é reconhecida como uma espécie tolerante à seca, e seu cultivo é favorecido mesmo em climas semiáridos (Zarfeshany, Shaghayegh, Javanmard, 2014). Seus frutos necessitam de períodos quentes para sua maturação, entretanto podendo tolerar por um tempo em baixas temperaturas (Erkan e Dogan, 2018).

Além disso, diferentes variedades apresentam notável adaptabilidade a ambientes com limitação hídrica sendo uma das árvores frutíferas mais tolerantes à salinidade é uma excelente candidata para a região semiárida tornando-se uma ótima alternativa para essas regiões, como é o caso do Nordeste brasileiro (Santana *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018).

A introdução de novas espécies e cultivares no setor agrícola cearense, como é o caso da romã, impulsiona novas oportunidades de negócios, ao mesmo tempo em que estimula a demanda por frutas exóticas de qualidade no mercado consumidor. Essa diversificação agrícola representa uma alternativa viável de cultivo e uma importante fonte de geração de renda para o produtor rural, configurando um cenário promissor de expansão, especialmente em função das condições climáticas favoráveis do Estado (Sarmento, 2020).

3.1.1 Usos e aplicações

A romã tem sido usada pela humanidade desde o início da civilização (Silva *et al.*, 2013), e atualmente crescem as possibilidades de uso, como finalidades terapêuticas, cosméticas, nutricionais, inclusive por meio da utilização das toneladas de resíduos gerados pela indústria. O processamento industrial da romã ocorre predominantemente por meio da extração de suco via prensagem da polpa, etapa que resulta na geração de elevados volumes de resíduos sólidos, estimados entre 500 e 550 kg por tonelada de frutos frescos processados, correspondentes principalmente ao bagaço (Maggiore e Setti, 2025).

A exemplo os extratos secos da romã podem ser consumidos de diversas formas, como em cápsulas, tabletes ou em pó, incorporados em suplementos nutricionais. A dosagem recomendada varia conforme a concentração do extrato e o objetivo terapêutico, e é fundamental seguir as orientações de um profissional de saúde. Além disso, esses extratos

podem ser empregados como matéria-prima estratégica na formulação de medicamentos fitoterápicos.

3.1.1.1 Alimentos e nutrição

A romã apresenta elevado potencial nutricional, com destaque para seus teores de vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos (Albuquerque *et al.*, 2024). Além disso, seu consumo contribui para a promoção da saúde e para a segurança alimentar e nutricional, devido ao potencial funcional de seus bioativos e à sua capacidade de auxiliar na prevenção de doenças crônicas. Sua polpa pode ser amplamente consumida *in natura* ou na forma de sucos e derivados. Entretanto, há um crescente interesse pelo aproveitamento de outras partes da fruta, como a casca e as sementes, devido ao seu valor nutricional (Nogueira *et al.*, 2020).

O suco e produtos da romã são usados há muito tempo na medicina tradicional ou como suplementos nutricionais que alegam efeitos benéficos (Les *et al.*, 2015). Esse interesse crescente pelo papel dos antioxidantes dietéticos na saúde humana impulsionou a valorização de frutas como fontes de componentes bioativos (Essa *et al.*, 2015). Atualmente existem muitas bebidas comerciais (como sucos prontos ou funcionais) que usam a romã ou outros ingredientes ricos em polifenóis.

Diversos estudos apontam que diferentes partes da romã contêm compostos de interesse comercial, com ampla aplicabilidade. As sementes são ricas em ácidos graxos especialmente ácido linoleico, gálico e elágico, além de vitaminas, açúcares, polissacarídeos, polifenóis e minerais (Lydia *et al.*, 2020). A casca, por sua vez, é um importante reservatório de polifenóis, sobretudo elagitaninos mono e oligoméricos sem açúcar, sendo usada como antioxidante natural em suplementos alimentares (Akhtar *et al.*, 2015).

Ao avaliar os teores de macro e micronutrientes na casca e na polpa da romã cultivar Comum, Santos *et al.*, (2022) observaram que, entre os macronutrientes, o potássio (K) e o nitrogênio (N) foram os mais abundantes. Quanto aos micronutrientes, destacaram-se o manganês (Mn) e o ferro (Fe) na casca, enquanto na polpa predominaram o ferro (Fe) e o cobre (Cu). Todos esses nutrientes apresentaram concentrações superiores na casca em comparação à polpa, assim como os teores de proteínas e fibras. Ressalta-se que o boro (B) foi detectado exclusivamente na casca.

Nogueira *et al.* (2020) ao produzir farinha de semente da romã orgânica e analisar as suas características físico-químicas e centesimais, verificaram que a farinha é nutritiva, rica em proteínas, lipídeos e carboidratos. Devido aos baixos teores de umidade, atividade de água e

pH, mostram-se estáveis microbiologicamente, sendo uma alternativa saudável para uso em alimentos como biscoitos e pães.

Tem ganhado destaque como alimento funcional e fonte nutracêutica, devido aos seus reconhecidos efeitos benéficos à saúde. Seu potencial de aplicação como aditivo natural em alimentos funcionais e em preparações fitoterápicas tem sido amplamente explorado por pesquisas recentes, reforçando seu valor tanto na alimentação quanto na promoção da saúde (Albuquerque *et al.*, 2024; Boussaa *et al.*, 2020; Fourati *et al.*, 2020)

3.1.1.2 Medicinais e terapêuticos

Devido à sua composição rica em antioxidantes, ácidos graxos, vitaminas e outros compostos fitoquímicos, a romã destaca-se como uma fruta de grande relevância, pois essa combinação de compostos bioativos confere à fruta uma ampla gama de aplicações terapêuticas, contribuindo para a prevenção e o tratamento de diversas doenças (Albuquerque *et al.*, 2024).

Nesse contexto, o estudo de Silva *et al.* (2024) destaca que algumas formulações de garrafadas comercializadas incluem a romã entre seus componentes. A incorporação da fruta nessas preparações evidencia seu reconhecimento popular como planta de valor terapêutico, especialmente em função do elevado teor de compostos fenólicos e do seu conhecido potencial antimicrobiano. Assim, o uso da romã em garrafadas reforça não apenas seu papel na medicina tradicional, mas também sua relevância como recurso natural com potencial para aplicações terapêuticas mais amplas.

Os fitoquímicos naturais presentes nos alimentos, como as antocianinas, podem contribuir para a atenuação da obesidade, promovendo a redução do peso corporal e do tecido adiposo (Azzini, Giacometti e Russo, 2017). Em uma revisão sistemática, Bahari *et al.* (2024) analisaram estudos clínicos sobre a suplementação com romã e observaram uma redução estatisticamente significativa no peso e no índice de massa corporal. No entanto, os autores ressaltam que a redução observada não foi clinicamente significativa.

Com base na revisão realizada por Guerrero-Solano *et al.* (2020), a romãzeira e suas diferentes partes apresentam atividade antinociceptiva em diversos tipos de dor, incluindo as de origem inflamatória, neuropática, aguda e crônica. Embora os compostos fenólicos sejam apontados como principais responsáveis por esse efeito, os mecanismos de ação ainda não estão totalmente esclarecidos. Os estudos disponíveis indicam que a romã tem potencial terapêutico no tratamento da dor, especialmente em casos inflamatórios, podendo contribuir para a melhora da qualidade de vida de pessoas com dor aguda ou crônica.

A casca, o óleo e o suco da romã também apresentam atividade anticancerígena, interferindo na proliferação celular, invasão tumoral e ciclo celular. Frutas ricas em compostos polifenólicos, como a romã, têm sido valorizadas pelo seu potencial quimiopreventivo e terapêutico. A romã, em especial, tem se destacado por sua elevada concentração de polifenóis. Evidências mais consistentes desse efeito foram observadas em estudos com câncer de próstata, reforçando seu potencial como agente auxiliar no combate ao câncer (Ranjha *et al.*, 2021).

Asgary *et al.* (2013) investigaram os efeitos agudos do consumo de suco de romã sobre a pressão arterial em indivíduos com diagnóstico de pré-hipertensão. Os resultados mostraram que o suco de romã exerce efeito hipotensor, contribuindo para a melhora da função vascular. A principal conclusão do estudo foi a capacidade do suco de romã de reduzir a pressão arterial, o que pode representar um benefício na prevenção de doenças cardíacas coronarianas.

Já El-Habibi (2013) avaliou as propriedades nefroprotetoras da romã em um modelo experimental de insuficiência renal crônica induzida por adenina em ratos, utilizando dois extratos: o suco natural e o extrato metanólico da casca. Ambos foram administrados separadamente e demonstraram efeito protetor. O estudo revelou que os extratos reduziram significativamente os sinais clínicos da insuficiência renal, bem como os danos renais causados pela adenina.

De acordo com Ranjha *et al.* (2021), frutas e vegetais ricos em antioxidantes e flavonoides têm sido associados à redução do risco de doenças coronarianas, acidente vascular cerebral, estresse oxidativo e níveis elevados de marcadores inflamatórios em adultos. A ação anti-inflamatória dessa fruta tem sido associada à sua capacidade de modular a resposta inflamatória, principalmente por meio da inibição de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas, e das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase (Dutta *et al.*, 2024).

Diversas pesquisas têm evidenciado que os polifenóis presentes na romã, notadamente a punicalagina e o ácido elágico, exibem expressiva atividade antioxidante, contribuindo significativamente para a proteção celular contra os danos induzidos pelo estresse oxidativo (Chaves e Santos, 2024).

Al-Jarallah *et al.* (2013) conduziram um experimento com camundongos, no qual o uso de extrato de romã demonstrou reduzir o acúmulo de placas de gordura e inflamação, em regiões importantes do sistema cardiovascular, como o seio aórtico e a artéria coronária. Os efeitos protetores observados sugerem que o extrato de romã pode atuar na atenuação da aterosclerose, possivelmente por meio da redução do estresse oxidativo e da inflamação na parede dos vasos sanguíneos.

Diversas pesquisas abordam outros benefícios, conforme Adams *et al.* (2010), a ingestão de suco de romã leva à produção de compostos metabólicos denominados urolitinas, que têm sido associados a efeitos anticarcinogênicos. Estudos apontam que essas substâncias podem atuar contra células do câncer de mama, sugerindo que o consumo regular de romã pode representar uma estratégia natural de quimioprevenção para esse tipo de câncer.

Colombo, Sangiovanni e Dell'Agli (2013) destacam que os extratos da casca da romã apresentam potencial para inibir significativamente o crescimento da bactéria *Helicobacter pylori*, que é o principal agente etiológico da gastrite humana. Em experimentos realizados com modelos animais, os autores também observaram efeito antiulceroso associado ao uso desses extratos.

Além disso, os mesmos autores ressaltam que o consumo de romã, especialmente no que diz respeito à produção de urolitinas, pode estar relacionado à prevenção ou ao tratamento de inflamações gastrointestinais. No entanto, enfatizam que esses efeitos dependem da composição da microbiota intestinal individual e do estado inflamatório pré-existente. Por isso, recomendam a realização de mais estudos clínicos para aprofundar o entendimento sobre a atividade anti-inflamatória da romã no trato gastrointestinal.

3.2 Extração de compostos bioativos de plantas para fitoterapia

O termo “extrato” deriva do latim *extractus*, cujo significado remete a “aquilo que é retirado de outra substância”, essa obtenção de extratos pode ser conduzida por distintos processos e metodologias, empregando diferentes solventes e tempos de extração, definidos conforme o objetivo do estudo e as propriedades específicas da matéria-prima utilizada (Franzen *et al.*, 2018).

O rendimento dos métodos de extração de compostos bioativos está diretamente relacionado a diversos fatores, entre eles o tipo de solvente utilizado, a polaridade deste, a composição química da matriz vegetal, as características físicas da amostra e a tecnologia empregada no processo. Sob as mesmas condições de extração (temperatura, tempo e técnicas), o solvente usado é o fator mais decisivo, porque ele determina quais compostos serão extraídos e em que quantidade (Baloch *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2018).

A polaridade dos solventes diz muito a respeito da solubilização dos extratos orgânicos, devido as ligações entre as moléculas, pois um solvente polar tende a solubilizar compostos polares, enquanto os solventes apolares conseguem solubilizar compostos apolares ou com

polaridade baixa. Com isso, a extração dos compostos fica intimamente relacionada com a força de atração entre as moléculas do soluto e do solvente (Martins, Lopes e Andrade, 2013),

O etanol, água e suas misturas são amplamente utilizados como solventes para a extração de compostos fenólicos de plantas devido à sua segurança alimentar e baixa toxicidade, o que os torna adequados para uso em produtos destinados ao consumo humano. Embora o metanol seja um solvente eficiente para extrair antioxidantes e outros compostos bioativos devido à sua alta capacidade de solubilização, ele é tóxico para humanos e, portanto, inadequado para aplicações comerciais alimentícias (Akhtar *et al.*, 2015).

Entre outros métodos de extração vegetal mais comuns estão a maceração, infusão e decocção. A maceração consiste em deixar o material vegetal em contato com um solvente por alguns dias. A infusão utiliza água quente por tempo curto, ideal para partes delicadas da planta. Já a decocção envolve a fervura de partes mais duras, como raízes e cascas, sendo indicada para compostos estáveis ao calor. Cada método possui particularidades que influenciam na extração e no tipo de substância obtida, devendo ser escolhido conforme as características da planta e dos compostos desejados (Azwanida, 2015).

A fitoterapia é uma forma de tratamento que utiliza plantas medicinais em diferentes preparações, sem usar substâncias ativas isoladas, mesmo que sejam de origem vegetal. O uso de plantas como recurso terapêutico é muito antigo e está ligado aos primeiros registros da medicina, baseado no conhecimento passado de geração em geração. Durante séculos, os produtos vegetais foram a principal base para o tratamento de diversas doenças, estando presentes nas tradições culturais e no saber popular (Brasil, 2006).

O uso de plantas na fitoterapia é bem reconhecida em muitos países, do qual estes estão desenvolvendo pesquisas para encontrar novos possíveis fármacos. A exploração de plantas medicinais ocorre tradicionalmente em todo o mundo, entretanto, o seu uso não é indicativo de sua eficiência e segurança, sendo necessários um conhecimento científico para validar que este apresente padrões de qualidade, segurança e eficácia (Argenta *et al.*, 2011).

Em virtude da crescente procura por uma vida mais natural, o Brasil no ano de 2006 lançou a Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), visando a inclusão de plantas medicinais com potencial fitoterápico, com intuito de fortalecer a fitoterapia no SUS, entretanto, desde da década de 80 já haviam documentos com esses objetivos (Argenta *et al.*, 2011; BRASIL, 2006).

Conforme a RDC nº 26/2014 da ANVISA, os medicamentos fitoterápicos são aqueles produzidos exclusivamente com matérias-primas vegetais, com eficácia e segurança

comprovadas por evidências clínicas. Já os produtos tradicionais fitoterápicos também são produzidos com matérias-primas vegetais, seu uso seguro baseia-se em dados descritos na literatura, podendo ser utilizados sem prescrição médica (BRASIL, 2014).

A RDC nº 26/2014 estabelece um marco regulatório claro e rigoroso para os medicamentos fitoterápicos, promovendo o uso racional e seguro de produtos naturais à base de plantas. Para o registro, são exigidos dados sobre a origem e identificação da planta, a parte utilizada (como folhas, raízes, cascas, entre outras), a forma de preparo (extrato, infusão, etc.), além da garantia de qualidade, pureza, segurança e estabilidade do produto. Ressalta-se ainda que a rotulagem deve conter o nome comum e científico da planta, a parte utilizada, a indicação terapêutica, a forma de uso e as contraindicações. É estritamente proibido o uso de substâncias sintéticas ou semissintéticas (BRASIL, 2014).

Além da comprovação da eficácia terapêutica, a ANVISA determina que os medicamentos fitoterápicos devem passar por rigorosos testes de qualidade, incluindo análises microbiológicas, determinação de metais pesados e avaliação de resíduos de agrotóxicos. Esses controles são fundamentais para assegurar a segurança do consumidor e a estabilidade do produto durante sua validade (BRASIL, 2014).

Com isso, diante do uso crescente de fitoterápicos na saúde, é fundamental investigar seus efeitos antimicrobianos em correlação com a citotoxicidade, visando a uma aplicação terapêutica segura e ampliada desses produtos naturais (Oliveira, 2011).

3.3 Compostos bioativos

Compostos bioativos, também conhecidos como fitoquímicos, são encontrados principalmente em alimentos de origem vegetal, embora também possam estar presentes em fontes animais. Esses compostos têm a capacidade de modular processos metabólicos no organismo, contribuindo para a promoção da saúde (Ranjha *et al.*, 2021)

Os fitoquímicos podem ser classificados em metabólitos primários, como carboidratos, proteínas e ácidos graxos, essenciais para a estrutura e funções básicas da planta, e metabólitos secundários, que não são vitais, mas atuam na defesa contra agentes externos. A classificação dos fitoquímicos pode ser feita com base em sua estrutura química (Maheshwaran, 2024).

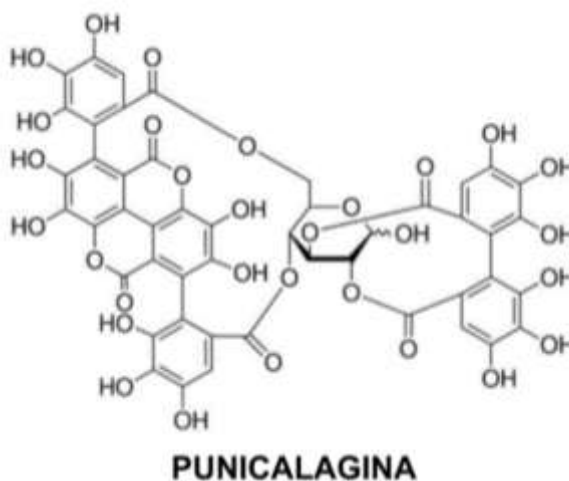
A *Punica granatum* L. apresenta ampla variedade de fitoquímicos, com destaque para os polifenóis. Entre os principais compostos identificados estão o ácido ascórbico, antocianinas, ácidos fenólicos (gálico, elágico e cafeico), flavonoides (quercetina, catequina, rutina), taninos

(punicalagina e punicalina), além de minerais, aminoácidos e ácidos graxos (Mahmood *et al.*, 2021).

Esses compostos distribuem-se de forma específica pelas estruturas da planta, do qual foram isolados e identificados: as folhas contêm taninos e flavonas, as sementes apresentam taninos e flavonas (como o ácido púnico), a casca do fruto possui taninos, flavonóis e alcaloides, as raízes concentram piperidina, as flores exibem ácido gálico e triterpenóides, e os frutos destacam-se pelas altas concentrações de vitaminas C e B (Dahham *et al.*, 2010; Rodrigues e Alencar, 2023).

Dentre todos os compostos, a punicalagina (Figura 3) merece destaque por ser o principal polifenol característico da romã, pertencente à classe dos elagitaninos. Estudos indicam que ela se concentra principalmente no pericarpo (Fischer, Carle e Kammerer, 2011). A punicalagina representa uma das principais responsáveis pela elevada atividade antioxidante da fruta, embora outros fenólicos, como antocianinas e ácidos fenólicos, também contribuam para seus efeitos bioativos (Cheng, Guo e Zhou, 2023).

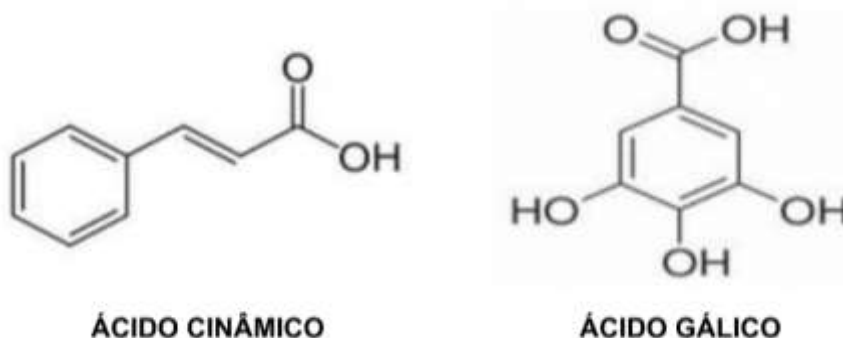
Figura 3 - Estrutura química punicalagina.



Fonte. Santiago *et al.* 2014.

Outros compostos polifenólicos que tem grande relevância na romã são o ácido cinâmico e o ácido gálico (Figura 4). Sendo o ácido cinâmico o principal composto encontrado por Yassin *et al.* (2021) no extrato metanólico de romã. Tal ácido tem potencial como agentes antitumorais e antioxidantes (Almeer *et al.*, 2019). Já o ácido gálico apresenta potencial antibacteriano e antibiofilme contra MRSA (Sang *et al.*, 2024).

Figura 4 - Estrutura química ácido cinâmico e ácido gálico.



Fonte. Yassin *et al.* 2021.

Akhtar *et al.* (2015) relatam que a romã apresenta uma ampla variedade de flavonoides, os quais correspondem a aproximadamente 0,2% a 1,0% do peso total da fruta. Os autores destacam ainda que, segundo dados da literatura, até 124 fitoquímicos distintos já foram identificados em suas diferentes partes anatômicas, o que evidencia a complexa composição química da romã e seu elevado potencial funcional.

As partes da romã, como casca, folhas e sementes, têm sido estudadas por conterem compostos com potencial terapêutico. Kumari *et al.* (2024), analisaram os extratos das folhas de *Punica granatum* e identificaram a presença de alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos, esteroides, glicosídeos e carboidratos. Esses resultados mostram que a planta possui uma grande variedade de compostos bioativos que podem ser utilizados na fitoterapia.

Conforme Akhtar *et al.* (2015), aproximadamente 48 compostos fenólicos foram identificados na romã, incluindo antocianinas, galotaninos, ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos e taninos hidrolisáveis. Dentre as diferentes partes da fruta, o pericarpo destaca-se por conter o conjunto mais rico e promissor desses compostos, especialmente os taninos hidrolisáveis, apresentando concentrações superiores às encontradas nas sementes, no arilo e no suco.

Em estudo experimental, Santos *et al.* (2022) observaram que os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante foram significativamente superior na casca da romã cultivar Comum em relação à polpa, apresentando diferenças estatísticas significativas. A diferença percentual da casca em relação à polpa para os compostos fenólicos totais foram de 96,9%, enquanto para a atividade antioxidante foi de 96,0%. Esses resultados podem ser atribuídos ao papel fisiológico da casca como tecido de proteção do fruto, no qual há maior acúmulo de metabólitos secundários e consequentemente apresenta maior função antioxidante.

A casca da romã apresenta maior concentração de compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis em comparação às demais partes da fruta (Mendes *et al.*, 2023). Além das diferentes partes da fruta, o perfil fitoquímico da romã também observa variações de acordo com a variedade cultivada.

Ao avaliar cultivares de romã na Tunísia, Zaouay *et al.* (2012) observaram diversas características morfológicas e químicas da fruta, incluindo o teor total de antocianinas e a atividade antioxidante. Ambas as características apresentaram diferenças significativas, sendo que as cultivares de sabor ácido mostraram valores superiores em comparação às cultivares doces.

Shimizu *et al.* (2023) avaliaram os teores de compostos fenólicos, flavonoides e a atividade antioxidante em diferentes partes das cultivares de romã ‘Valenciana’ e ‘Wonderful’. A cultivar ‘Wonderful’ apresentou o maior teor de fenólicos na membrana, enquanto na ‘Valenciana’ os maiores teores foram encontrados nas cascas. Quanto aos flavonoides, a ‘Valenciana’ apresentou maior concentração nas cascas, enquanto na ‘Wonderful’ os teores mais elevados foram observados nas sementes. Em relação à atividade antioxidante, a ‘Valenciana’ destacou-se pelas sementes, e a ‘Wonderful’ pelas cascas.

Esses compostos encontrados em vegetais desempenham papéis fundamentais nas funções vitais das plantas. Os metabólitos primários estão diretamente relacionados às atividades essenciais, como a formação e manutenção das células, apresentando ligações mais estáveis e indispensáveis à sobrevivência. Já os metabólitos secundários exercem funções fisiológicas e bioquímicas, atuando principalmente na defesa contra estresses bióticos e abióticos (Kessler e Kalske, 2018).

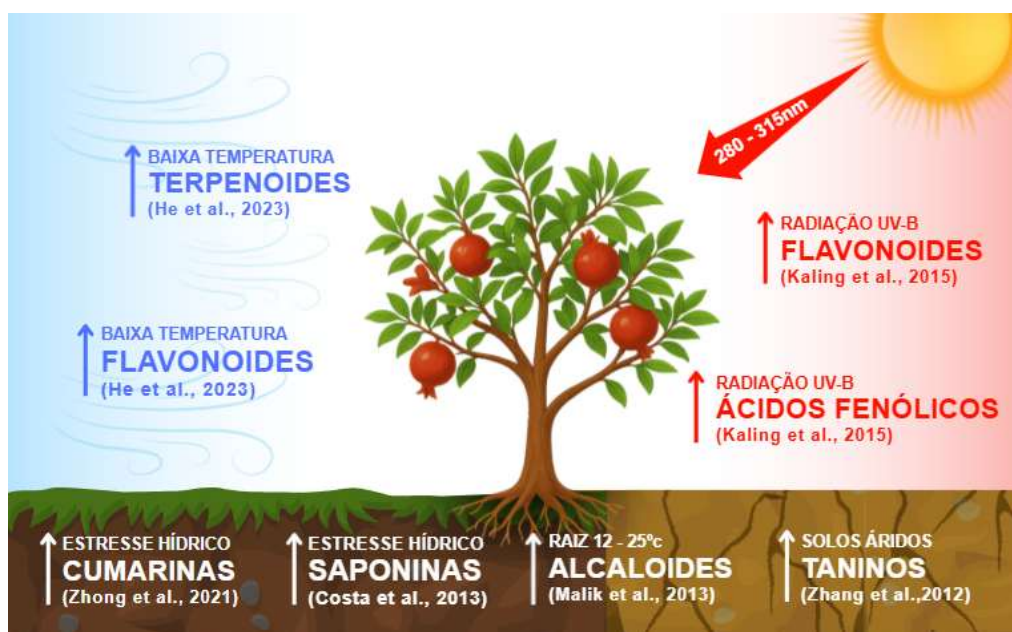
Fatores ambientais podem modificar a composição química da planta, estimulando a produção de compostos bioativos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Essas análises podem ampliar o conhecimento sobre o potencial funcional e terapêutico de espécies vegetais, incluindo a romã (Wu e Tian, 2017).

Diante da ampla diversidade fitoquímica da romã, torna-se essencial que futuros estudos aprofundem a investigação dos metabólitos presentes em diferentes cultivares, sobretudo quando submetidos a condições ambientais adversas. Nessas circunstâncias, é possível induzir a síntese de compostos específicos de interesse comercial, ampliando o potencial de aproveitamento (Yeshi *et al.*, 2022). Já se tem estudos que apontam que perturbações abióticas em plantas induzem a produção de metabólitos secundários.

Para os flavonoides e terpenoides, a baixa temperatura tem a maior influência na síntese desses compostos, promovendo um aumento significativo em sua produção (He *et al.*, 2023).

A radiação UV-B (280–315 nm) induz a folhagem das árvores a produzir mais ácidos fenólicos e flavonoides como pigmentos protetores (Kaling *et al.*, 2015). Temperaturas de 12 a 25°C na zona radicular são favoráveis para o acúmulo de alcaloides nos tecidos vegetais (Malik *et al.*, 2013). Condições de solo infértil e ambientes áridos induzem o aumento na síntese e acúmulo de taninos (Zhang *et al.*, 2012). E o estresse hídrico induz acúmulo acentuado de cumarinas e saponinas em plantas (Costa *et al.*, 2013; Zhong *et al.*, 2021). Pode-se observar um resumo visual desses estresses abióticos sobre vegetais na Figura 5.

Figura 5 - Estresses abióticos na produção de bioativos.



Fonte. Autora, 2025.

3.4 Atividade antimicrobiana

A resistência microbiana é algo alarmante, pois é responsável por milhares de mortes anuais, com o agravante de que cada vez mais essa resistência reduz a eficiência dos medicamentos, tornando-se uma das principais ameaças do século XXI (Murray *et al.*, 2022). Se não for contida, projeções indicam que poderá causar até 10 milhões de mortes por ano até 2050 (Kraker *et al.*, 2016).

É imprescindível estudos sobre a atividade antimicrobiana, que consiste na capacidade de uma substância em inibir ou destruir micro-organismos patogênicos, geralmente por meio de mecanismos como ruptura da parede celular, interferência na síntese de proteínas ou nucleotídeos e alteração da permeabilidade da membrana (Di Martino, 2022; Reygaert, 2018).

Compostos naturais, particularmente fitoquímicos como flavonoides, taninos e óleos essenciais, têm sido alvo de estudos por suas propriedades antimicrobianas.

O uso inadequado e excessivo de medicamentos antimicrobianos ao longo do tempo tem contribuído significativamente para o aumento da resistência bacteriana, o que limita as opções terapêuticas disponíveis e representa um dos principais desafios para a saúde pública mundial (Cross, 2008). O crescente surgimento e disseminação de micro-organismos resistentes aos compostos antimicrobianos convencionais compromete a eficácia dos tratamentos atuais e exige o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas capazes de complementar ou substituir os antimicrobianos tradicionais (Reygaert, 2018).

Diante desse cenário, os esforços na busca por novas alternativas terapêuticas, especialmente aquelas provenientes de fontes naturais aumentaram. As plantas utilizadas na medicina tradicional têm se destacado como candidatas promissoras, por serem ricas em compostos bioativos com potencial antimicrobiano (Mendes *et al.*, 2011; Scaglione *et al.*, 2024).

Nesse contexto, espécies vegetais vêm sendo investigadas por apresentarem extratos com substâncias com potencial antimicrobiano que são capazes de inibir o crescimento de agentes patogênicos. Com isso, diversas espécies vegetais estão sendo estudadas para avaliar o potencial que essas plantas tem frente a micro-organismos resistentes que tenham relevância médica.

Mendes *et al.* (2011) demonstraram que o extrato de *Peperomia pilosa* exibiu atividade antibacteriana específica contra *Pseudomonas aeruginosa* (uma bactéria Gram-negativa). Em contraste, o extrato de *Peperomia pellucida* apresentou um espectro de ação mais amplo, mostrando eficácia tanto contra *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva) quanto contra *P. aeruginosa* (bactéria Gram-negativa). Já Eller *et al.* (2015) verificaram que os extratos brutos de cajueiro, barbatimão e aroeira se mostraram ativos frente à cepa de *S. aureus*, apresentando halos de inibição de crescimento.

Machado *et al.* (2003) avaliaram 14 extratos de plantas medicinais brasileiras, comumente utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, quanto ao seu potencial antimicrobiano frente a micro-organismos resistentes de importância médica. Entre os extratos analisados o da romã foi um dos que mostrou-se eficiente contra *S. aureus* que é resistente à meticilina.

No entanto, vale destacar que a eficácia desses extratos pode variar de acordo com diversos fatores, como o frescor da planta, visto que, plantas frescas e secas apresentam diferenças na concentração de compostos ativos, as variações genéticas da espécie vegetal, a

região geográfica, a estação de crescimento, além dos métodos de extração, incluindo os solventes utilizados e a técnica aplicada (Mendes *et al.*, 2023; Pal *et al.*, 2018).

O potencial da atividade antimicrobiana é geralmente realizada pela técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB). Por meio desse método, identifica-se a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do micro-organismo em teste, conforme estabelecido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

A triagem de tal atividade é comumente realizada *in vitro*, através de métodos de diluição em ágar por poços ou discos, os quais permitem a avaliação do potencial inibitório a partir da mensuração do diâmetro dos halos de inibição formados. A atividade observada é avaliada de forma comparativa em relação a um padrão de referência. Esse método tem algumas vantagens, como baixo custo, simplicidade e flexibilidade, porém limita-se a micro-organismos de crescimento rápido, sejam aeróbios ou facultativos (Abdollahzadeh *et al.*, 2021; Ostrosky *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2003).

Outro método é a diluição em caldo, que consiste no crescimento do micro-organismo em um meio líquido adicionado da substância a ser testada. Os resultados são quantitativos e sua leitura é feita pela observação da turbidez (ou falta dela). A diluição em caldo pode ser por macro e por microdiluição (Ostrosky *et al.*, 2008 e Pinto *et al.*, 2003). A macrodiluição é realizada em tubos de ensaio, utilizando mais material, espaço no laboratório e tempo (Zgoda e Porter, 2001). Já a microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL, é mais econômico, sensível e utiliza pouca amostra (Ostrosky *et al.*, 2008).

3.5 Perfil citotóxico de extratos vegetais

É de conhecimento popular que o uso de espécies vegetais no tratamento de diversas doenças, vem sendo cada vez mais valorizadas por serem produtos naturais, de baixo custo e considerados eficazes. Muitas têm perfil de citotoxicidade, que podem ser capazes de inibir a sobrevivência de células cancerígenas (Bacanli *et al.*, 2017). Entretanto, algumas plantas podem apresentar toxicidade, seja pelo não reconhecimento da espécie ou pela quantidade ingerida, podendo provocar intoxicações (Campos *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2023).

Por isso, são necessários estudos para promover o desenvolvimento de fórmulas mais naturais que sejam capazes de agir de forma mais específica garantindo sua eficiência. Contudo, a eficiência não é o único parâmetro, é imprescindível que seu uso seja seguro para os seres

humanos, devido ao risco de efeitos adversos, como a citotoxicidade em células saudáveis (Mendonça *et al.*, 2009).

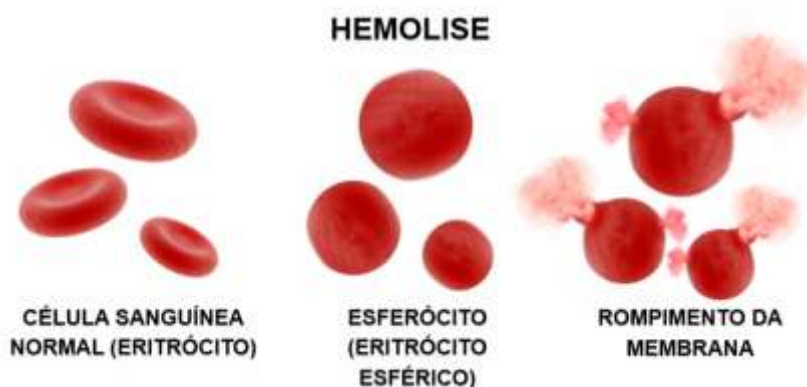
A citotoxicidade é definida como a capacidade de uma substância em causar danos às células, podendo levar à perda de sua viabilidade ou morte celular (Kus-Liśkiewicz *et al.*, 2021). No contexto dos extratos vegetais, a avaliação da citotoxicidade é particularmente relevante, uma vez que esses materiais contêm diversos metabólitos secundários cujos mecanismos de ação citotóxica podem ocorrer em níveis celular e molecular (Ungureanu *et al.*, 2023; Zasheva *et al.*, 2024).

Esta pode ocorrer por vários mecanismos, entre eles, a indução de apoptose, que leva a célula a se autodestruir de forma programada; a inibição da proliferação celular, impedindo a multiplicação de células; a redução da viabilidade celular, diminuindo o número de células funcionais; o efeito pró-oxidante, que aumenta o estresse oxidativo interno e favorece a morte celular; e a inibição da angiogênese, bloqueando a formação de novos vasos sanguíneos necessários para o crescimento de tumores (Ungureanu *et al.*, 2023).

Ungureanu *et al.* (2023) aborda que os extratos vegetais mostraram citotoxicidade dependente da dose, de modo que concentrações mais elevadas do extrato, ou de flavonoides nele presentes, resultam em maior efeito tóxico sobre as células. Esse efeito vem dos flavonoides, mas pode variar de acordo com outros compostos presentes e também com o tipo celular analisado, já que células diferentes podem responder de forma distinta ao mesmo composto.

Amini *et al.* (2014) descrevem que as saponinas interagem com os lipídios da membrana celular, promovendo a formação de poros, o aumento da permeabilidade e em consequência a hemólise dos eritrócitos, com liberação de hemoglobina no meio extracelular (Figura 6). Esse efeito hemolítico, resultante da ação sobre a membrana celular, pode representar uma limitação ao uso terapêutico dessas substâncias (Bissinger *et al.*, 2014). Ou seja, a atividade hemolítica é um bom indicador da citotoxicidade, podendo informar se o extrato pode ser usado com segurança.

Figura 6 – Processo de hemólise em eritrócito.



Fonte. Autora, 2025.

Na pesquisa, a avaliação inicial da citotoxicidade é primeiro testada em culturas de células (*in vitro*) para identificar se um composto é seguro antes de ser testado em animais ou humanos (*in vivo*) (Kus-Liśkiewicz *et al.*, 2021). Esses testes *in vitro* apresentam vantagens por serem mais rápidos, baratos e éticos, servindo como um filtro inicial.

No estudo de Mendonça *et al.* (2009), foi avaliada a citotoxicidade e a genotoxicidade da curcumina em células PC12. Os resultados indicam que, enquanto em baixas concentrações a curcumina pode exercer efeito protetor, em doses elevadas ela perde essa função e passa a provocar alterações celulares indesejadas sugerindo efeito citotóxico. Pozarowska *et al.* (2010) autores observaram que vários dos medicamentos utilizados para o tratamento de glaucoma apresentam efeitos citotóxicos, devido as concentrações e o tempo de uso.

Nos estudos toxicológicos *in vitro*, os ensaios de citotoxicidade representam ferramentas essenciais para avaliar a viabilidade celular e identificar possíveis efeitos adversos de substâncias tóxicas. Dentre os métodos mais empregados, destacam-se o ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH), o ensaio de quantificação de proteínas, o ensaio do vermelho neutro e o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Fotakis e Timbrell, 2006). Além desses, a atividade hemolítica é outro método utilizado para avaliar o potencial citotóxico de substâncias, pois indica a capacidade de compostos em danificar a membrana dos eritrócitos.

A perda de LDH intracelular e sua consequente liberação no meio de cultura é um indicador de morte celular ou de dano à membrana plasmática em células necróticas ou em estágios tardios de apoptose (Chan *et al.*, 2013; Fotakis & Timbrell, 2006). Esse ensaio baseia-se no uso de sais de tetrazólio e ocorre em duas etapas principais. Na primeira, a enzima LDH catalisa a conversão do lactato em piruvato, gerando nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH). Na segunda etapa, o NADH formado promove a redução do sal de tetrazólio

em um produto de formazano insolúvel (Korzeniewski & Callewaert, 1983). A detecção da quantidade de formazano produzido é realizada por espectrofotometria, permitindo quantificar a extensão do dano celular (Chan *et al.*, 2013).

Para o ensaio LDH é necessário o uso de compostos capazes de ocasionar na permeabilização total da membrana celular, para ser utilizado como controle positivo em testes. Dentre os utilizados, o Triton X-100, é o surfactante mais comumente utilizado para permeabilização em muitos estudos fluorescentes e toxicológicos (Koley e Bard, 2010; Lucarini *et al.*, 2018).

O ensaio MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo que mede a atividade metabólica celular, do qual baseia-se na utilização de um sal de tetrazólio solúvel em água, que é reduzido pela ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, resultando na formação de cristais insolúveis de formazano, de coloração púrpura, por meio de células vivas. Esse produto não atravessa as membranas celulares, acumulando-se no interior das células metabolicamente ativas e viáveis (Bacanli *et al.*, 2017; Bopp e Lettieri, 2008; Koley e Bard, 2010).

Já o ensaio de hemólise é um método simples, rápido e de baixo custo utilizado para avaliar o potencial citotóxico de substâncias sobre eritrócitos. Nesse teste, as hemácias, obtidas de sangue humano ou animal, são incubadas com o composto em estudo; caso ocorra ruptura da membrana celular, há liberação de hemoglobina no sobrenadante, cuja quantificação por espectrofotometria indica o grau de hemólise e o potencial tóxico do material (Sæbø *et al.*, 2023).

4 METODOLOGIA:

4.1 Obtenção do material vegetal

Para o presente estudo, as romãs foram adquiridas por meio de compra direta em um comércio localizado no município de Itapiúna, Ceará. Entretanto, conforme informado pelo comerciante, os frutos são provenientes do município de Baturité. Ambas as cidades pertencem à região do Maciço de Baturité, cujo clima, segundo a classificação de Köppen (1923), é do tipo Aw, tropical chuvoso, muito quente, com precipitações concentradas entre o verão e o outono.

As frutas foram, então, processadas, iniciando-se pela higienização da parte externa, correspondente ao pericarpo. Em seguida, foram cortadas ao meio para a completa remoção das sementes com arilo e das camadas membranosas internas. Os pericarpos foram dispostos para secagem ao sol, em ambiente aberto, até que estivessem completamente secos (aproximadamente três dias). Após esse período, foram fragmentados em pedaços menores com o auxílio de uma tesoura. O material obtido foi utilizado em todas as etapas do processamento laboratorial.

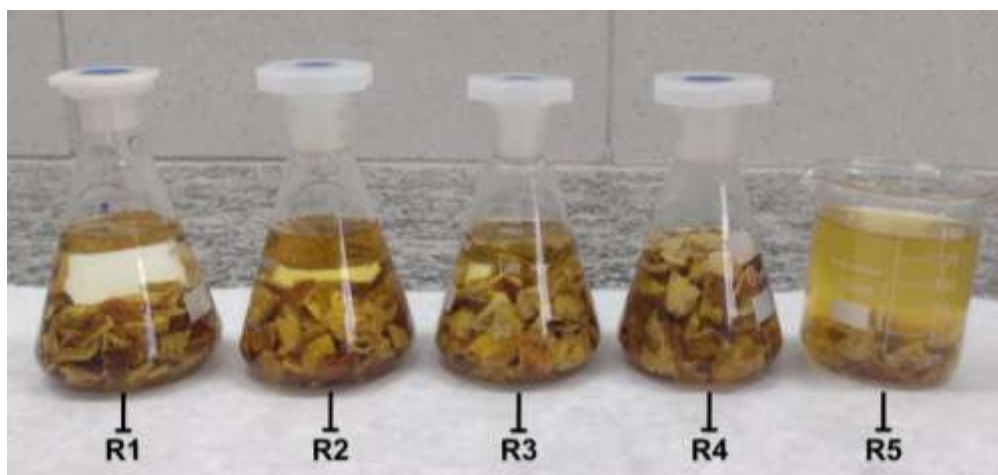
4.2 Obtenção dos extratos vegetais

Para o preparo dos extratos, foi empregado o método de extração por solvente sólido-líquido, no qual o material sólido é imerso em um solvente apropriado, permitindo que os compostos bioativos presentes sejam dissolvidos e transferidos para a fase líquida. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB). No presente estudo, foram utilizados cinco extratos, cada um preparado com diferentes proporções de diluição entre etanol e água destilada, conforme as condições específicas de extração adotadas.

Os extratos foram preparados com as seguintes proporções de solvente: 100% etanol (R1), 70% etanol (R2), 50% de etanol (R3), 20% de etanol (R4) e 100% água destilada (R5). Os extratos R1 e R2 foram obtidos a partir de soluções de etanol já prontas, enquanto os extratos R3 e R4 foram preparados por diluição manual do etanol com água destilada, em proporções volume/volume (v/v). Para os extratos R1 a R4, foi utilizado um volume total de 100 mL da fase líquida (solvente) e 20 gramas de cascas de pericarpo, correspondendo à fase sólida (Figura

7). O extrato R5 foi preparado de acordo com as especificações descritas no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB) (BRASI, 2021).

Figura 7 - Extratos de romã



Fonte: Autora, 2025.

As preparações dos extratos R1, R2, R3 e R4 foram realizadas ao longo de uma semana, durante a qual os pericarpos permaneceram submersas no solvente, em recipientes vedados, mantidos em temperatura ambiente e em ambiente escuro. Após esse período, os extratos foram filtrados e acondicionados conforme as condições previamente descritas. Já o extrato R5 foi preparado por meio do método de decocção, com tempo de fervura de 10 minutos, utilizando-se a proporção de 150 mL de água para 6 gramas de cascas de romã.

Em seguida, 10 mL dos extratos foram distribuídos em placas de Petri e submetidos à secagem à temperatura ambiente, em ambiente escuro, para posterior determinação do rendimento.

Para a análise do rendimento dos extratos, foi utilizado o método gravimétrico que consiste na determinação da massa de compostos sólidos presentes após a evaporação do solvente. Após a secagem, os extratos foram submetidos à pesagem em balança de precisão. A determinação do rendimento foi calculada com base na seguinte expressão matemática (Equação I):

$$(I) \text{ Rendimento}(\%) = \left(\frac{\text{massa do resíduo seco (g)}}{\text{massa inicial do pericarpo (g)}} \right) \times 100$$

Salienta-se que o extrato R5 teve sua secagem realizada em chapa aquecedora até a completa evaporação da água, restando apenas a fração sólida. Esse procedimento foi adotado

devido à elevada dificuldade de secagem do extrato, em virtude de sua suscetibilidade à proliferação de fungos. Considerando que esse método poderia alterar suas propriedades visto que, compostos bioativos são sensíveis a degradação térmica (Mphahlele *et al.*, 2016), o extrato R5 não foi submetido aos demais ensaios, sendo utilizado apenas nas caracterizações físico-químicas e fitoquímica que foi empregado em sua forma *in natura*.

4.3 Caracterização da densidade dos derivados vegetais

A densidade dos extratos foi determinada a partir da razão entre a massa e o volume. Para isso, foram mensurados 10 mL de cada extrato utilizando provetas, e as respectivas massas foram obtidas por meio de balança de precisão. A densidade relativa foi calculada pela relação entre a densidade do extrato e a densidade da água a 20 °C, utilizada como referência, permitindo a comparação direta entre as amostras. Para determinar a densidade utilizou-se as Equações II e III:

$$(II) \quad Densidade = \left(\frac{m}{V} \right)$$

$$(III) \quad Densidade\ relativa = \left(\frac{\rho_{extrato}}{\rho_{água}} \right)$$

Onde:

m = massa do extrato (g)

V = volume do extrato (mL)

$\rho_{extrato}$ = densidade do extrato (g/mL)

$\rho_{água}$ = densidade da água a 20 °C (aproximadamente 0,9982 g/mL)

4.4 Caracterização fitoquímica dos derivados vegetais

A caracterização fitoquímica foi conduzida por meio de ensaios qualitativos, baseados em reações colorimétricas e de precipitação, com o objetivo verificar a presença ou ausência de metabólitos secundários nas distintas composições dos extratos de romã. Foram investigados nos cinco extratos os seguintes grupos de compostos: alcaloides, cumarinas, flavonoides, saponinas, esteroides/ triterpenos e taninos.

A identificação de alcaloides foi realizada utilizando o reagente de Dragendorff, método que consiste na adição de 2 mL do extrato em tubos de ensaio, seguida da adição de 2 mL de solução de HCl 0,1 M (ou solução a 10%). A presença de alcaloides é evidenciada pela formação de um precipitado alaranjado característico.

A análise de cumarinas foi realizada por meio de reação com cloreto de sódio. Aproximadamente cinco gotas dos extratos foram aplicadas em papel de filtro, material com boa capacidade de retenção de líquidos. Sobre cada gota do extrato, adicionou-se uma gota de solução de cloreto de sódio. Em seguida, os papéis foram conduzidos à câmara escura com lâmpada UV, sendo observados sob dois comprimentos de onda: 254 nm e 365 nm. A presença de cumarinas foi indicada por meio da visualização de fluorescência sob luz ultravioleta.

Para a avaliação da presença de flavonoides, foram utilizados dois métodos, sendo um deles a reação de Shinoda. Esse teste consiste na adição de pequenos pedaços de magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado a tubos de ensaio contendo 2 mL do extrato. A formação de coloração vermelha, rosa ou alaranjada indica a presença de flavonoides. O segundo método baseou-se na reação com cloreto de alumínio (AlCl_3). Nesse procedimento, 2 mL dos extratos foram colocados em placas de Petri, seguidos da adição da solução de AlCl_3 . As amostras foram então expostas à luz em câmara UV, sendo analisadas nos comprimentos de onda de 234 a 300 nm. A presença de flavonoides é indicada pela emissão de fluorescência sob a luz ultravioleta.

O índice afrossimétrico foi utilizado para verificar a presença de saponinas nos extratos. Para isso, foram adicionados 5 mL de cada extrato em tubos de ensaio com tampa, seguidos da adição de aproximadamente 5 mL de água destilada aquecida a 100 °C. Os tubos foram imediatamente vedados e agitados vigorosamente por um período determinado. Após 30 minutos de repouso, avaliou-se a persistência da espuma, sendo a formação de uma coluna espumosa estável considerada indicativa da presença de saponinas.

A identificação de taninos foi realizada por meio de duas metodologias: a reação com gelatina e a reação com cloreto férrico. Para a reação com gelatina, adicionaram-se 2 mL dos extratos em tubos de ensaio, seguidos da adição de 2 a 3 gotas de solução de gelatina. A presença de taninos foi indicada pela formação de um precipitado. Na segunda metodologia, os extratos foram igualmente distribuídos em tubos de ensaio, sendo adicionadas gotas de solução de cloreto férrico. A presença de taninos é evidenciada por alterações na coloração da solução, sendo azul ou azul-preta (presença de taninos hidrolisáveis) ou verde ou verde-escura (presença de taninos condensados).

O método colorimétrico de Liebermann-Burchard foi empregado para a detecção de esteróis e triterpenos. Para isso, 2 mL dos extratos foram inicialmente secos e, em seguida, submetidos à reação, com a adição de algumas gotas de anidrido acético, homogeneização e posterior adição de ácido sulfúrico. A solução obtida deve apresentar coloração avermelhada característica, que gradualmente evolui para tons azulados e esverdeados, indicando a presença desses compostos.

O resumo metodológico referente aos ensaios qualitativos utilizados para a detecção dos grupos de compostos supracitados encontra-se apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Resumo das reações utilizadas para determinar o perfil fitoquímico dos extratos de romã.

Classe do metabólico	Reação	Resultado esperado
Alcaloides	Reagente de Dragendorff	Formação de precipitado laranja
Cumarinas	Cloreto de sódio	Fluorescência na luz UV
Flavonoides	Shinoda	Aparecimento da coloração vermelho, rosa ou amarelo
	Reação com $AlCl_3$	Fluorescência na luz UV
Saponinas	Índice afrosimétrico	Formação de espuma persistente
Esteróis/ triterpenos	Liebermann-Burchard	Aparecimento da coloração vermelha
Taninos	Solução de gelatina 2%	Formação do precipitado
	Cloreto férrico	Aparecimento da coloração verde ou azul

Fonte: adaptado de Cruz *et al.*, 2025

4.5 Atividade antimicrobiana

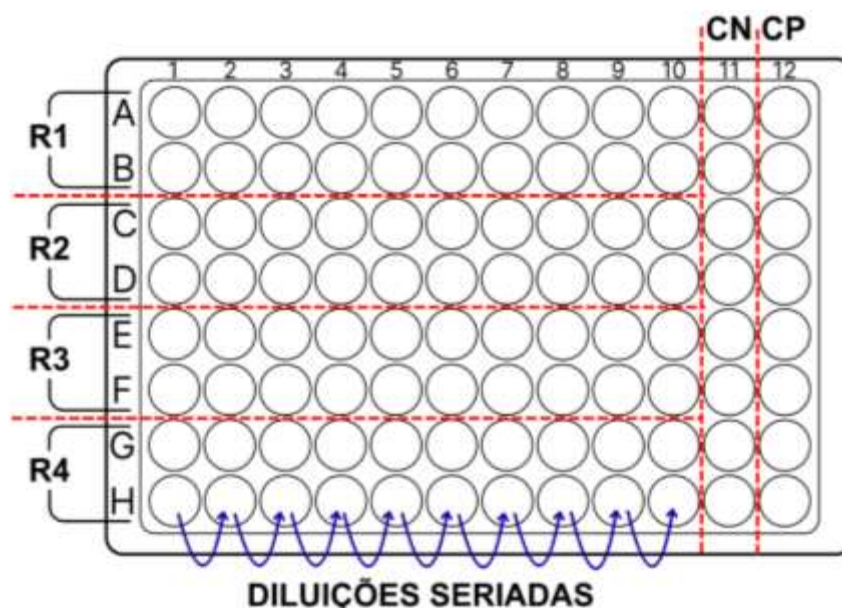
A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2024), com adaptações. As seguintes cepas bacterianas foram utilizadas neste estudo: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* NCTC 12923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Inicialmente, os extratos foram secos por meio da técnica de *drop-casting*, conforme descrito por Pavinato, Soares e Torres (2022). O resíduo seco obtido foi então solubilizado em solução hidroetanólica a 50%, com volume final ajustado para 10 mL, atingindo uma concentração previamente conhecida. A solução resultante foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μm e empregada nas etapas subsequentes. Diluições seriadas foram realizadas em solução salina estéril para obtenção das seguintes concentrações: 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 $\mu g/mL$, padronizadas para todos os ensaios.

Para o teste de microdiluição, utilizaram-se microplacas estéreis de 96 poços contendo caldo Mueller-Hinton. O inóculo bacteriano foi preparado a partir de culturas puras incubadas por 18 a 24 horas (overnight), ajustadas à turbidez correspondente ao padrão 0,5 da escala de

McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, realizou-se uma diluição para obtenção da concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL em cada poço. Em duplicata, os extratos nas diferentes concentrações foram adicionados às microplacas, seguidos do inóculo bacteriano. Foram incluídos controles positivos (caldo com inóculo, sem extrato) e negativos (caldo sem inóculo), organizados conforme demonstrado na Figura 8. Os ensaios foram realizados em duplicata. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 16 a 20 horas.

Figura 8 - Organização da titulação na microplaca.



Fonte: Autora, 2025

A leitura dos resultados foi realizada por inspeção visual, utilizando solução de 2,3,5-trifeniltetrazólio cloreto (TTC) a 1% como indicador de viabilidade microbiana, pois é reduzido pelas enzimas celulares a formazan, um composto de coloração rosada. Dessa forma, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do extrato que manteve a coloração inalterada, indicando ausência de crescimento microbiano.

4.6 Avaliação da atividade hemolítica

Para avaliar a atividade hemolítica dos extratos, foi utilizada a metodologia descrita no estudo de Sousa *et al.* (2022), com modificações. Este método utiliza hemácias para determinar o potencial de lise celular a partir de extratos vegetais, servindo assim como um modelo *in vitro* para prever um potencial citotóxico sistêmico. Para execução do estudo, adquiriu-se o sangue

total de carneiro da Laborclin®, o qual foi misturado com uma solução de NaCl 0,85% (1:30) e centrifugado a 3500 rpm, por 5 minutos, lavando-se o sedimentado por mais duas vezes com a solução de NaCl, na mesma concentração. Após a última lavagem, ressuspendeu-se o sedimentado em NaCl 0,85% para a produção de uma suspensão de hemácias a 2%.

Para analisar o efeito citotóxico, utilizou-se concentrações, para cada extrato, de 512, 256, 128 e 64µg/mL. 2mL da suspensão de hemácias foi distribuído em tubos de ensaio e adicionou-se 0,5mL de cada concentração. Posteriormente, incubou-se durante uma hora, em temperatura ambiente, sob agitação constante. Em seguida, centrifugou-se as amostras e a leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro a 541 nm. Utilizou-se Triton X como controle positivo no lugar do extrato, e como controle negativo utilizou-se NaCl 0,85%. A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a Equação IV:

$$(IV) \quad \textit{Atividade Hemolítica (\%)} = \left(\frac{ABS\ E - ABS\ B}{ABS\ CP - ABS\ B} \right) \times 100$$

Onde:

ABS E = Absorbância do extrato;

ABS B = Absorbância do branco;

ABS CP = Absorbância do controle positivo;

100 = fator de correção para %.

A toxicidade dos extratos foi classificada com base no percentual de hemólise observado. Considerou-se baixa toxicidade para percentuais de 0 a 40%, moderada de 41 a 80% e alta quando com percentual superior a 80% (Sousa *et al.*, 2022). A análise dos dados foi realizada por regressão linear simples, empregando o método dos mínimos quadrados, com auxílio do software Microsoft Excel®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento e caracterização do físico-química dos derivados vegetais

A densidade dos extratos variou conforme a concentração dos solventes (Tabela 1). Observa-se que, quanto maior a proporção de água na composição do solvente, maior é a densidade relativa. Ocasionalmente diferença percentual de 14,9% entre os extratos R1 e R3, e de 7,1% entre R3 e R5, evidenciando a influência da composição do solvente sobre a densidade final do extrato. O desvio padrão de 0,074 evidencia que os valores individuais se encontram próximos ao valor médio, indicando baixa dispersão entre as amostras.

Verifica-se, na Tabela 1, o rendimento dos extratos. O extrato com segundo maior teor alcoólico (R2) apresentou o maior rendimento, com diferença percentual de 28,17% em relação ao extrato etanólico (R1).

Tabela 1 - Características dos extratos do pericarpo de romã: densidade e rendimento.

Extrato	Densidade relativa	Rendimento (%)
R1	0,800	2,13
R2	0,899	2,73
R3	0,919	2,67
R4	0,973	2,70
R5	0,984	2,61

Legenda: R1:100% etanol, R2: 70% etanol e 30% de água destilada, R3: 50% de etanol e 50% de água destilada, R4: 20% de etanol com 80% de água destilada e R5: 100% água destilada.

Almeida *et al.* (2024) destacam que a densidade relativa constitui um parâmetro essencial na avaliação da qualidade de extratos vegetais, pois fornece informações relevantes sobre a concentração e a composição dos seus constituintes. Esse indicador é particularmente importante para assegurar a consistência entre os lotes e a padronização de produtos fitoterápicos. Já o rendimento diz muito a respeito à solubilidade, de modo que quanto maior for, maior será seu potencial de solubilização em um determinado solvente.

Os resultados obtidos por Rodrigues (2023), ao estudar a densidade relativa de três extratos de romã em diferentes formulações, corroboram com os do presente trabalho. O autor observou que os extratos obtidos com água (molho e decocção) apresentaram valores semelhantes entre si e superiores ao do extrato preparado com álcool a 70%, com uma diferença percentual de 11,7%.

O tipo de solvente utilizado no processo de extração influencia diretamente o rendimento, onde os solventes mais polares, como a água, tendem a extrair uma maior

quantidade de sólidos hidrossolúveis, resultando em maior rendimento (Franzen *et al.*, 2018). Por outro lado, Bustamante *et al.* (2017) verificaram que a adição de etanol aumenta o rendimento de extração em extratos de casca de romã, uma vez que a natureza apolar dos compostos fenólicos tende a dificultar sua extração.

O rendimento de uma extração vegetal é diretamente influenciado pela polaridade do solvente utilizado. Solventes mais polares, como a água, tendem a extrair maior quantidade de sólidos totais, resultando em rendimentos mais elevados em massa, principalmente devido à solubilização de compostos hidrossolúveis, como açúcares, sais e alguns metabólitos primários (Franzen *et al.*, 2018).

Por outro lado, para maximizar a recuperação de compostos-alvo específicos, como os fenólicos, solventes de polaridade otimizada são necessários. Bustamante *et al.* (2017) comprovaram esse ponto, mostrando que a adição de etanol elevou o rendimento de fenóis da casca de romã. Esse efeito é atribuído à capacidade do etanol, especialmente em misturas aquosas, de solubilizar melhor compostos de natureza anfifílica. Dessa forma, a otimização do solvente é fundamental para direcionar a extração ao composto de interesse.

O presente estudo, e o de Kiran *et al.* (2024), estão em acordo com o mencionado, onde os extratos com pericarpo de romã preparados com etanol a 70% também demonstrou maior rendimento. Salienta-se que no estudo supracitado, o extrato etanólico e o metanólico, ambos mostraram ter maiores rendimentos quando estão ligeiramente mais polares (etanol a 70% e metanol a 80%).

De maneira similar, Bui *et al.* (2021) reportaram que o metanol, o solvente mais polar de seu estudo, foi o que proporcionou o maior rendimento extrativo. Os estudos robustecem a premissa central de que a polaridade do solvente, gerenciada seja por sua natureza química pura ou por ajustes na proporção de água em solventes orgânicos, é um fator determinante e manejável para a eficiência do processo de extração.

5.2 Caracterização fitoquímica dos derivados vegetais

Por meio da triagem fitoquímica dos cinco extratos da casca de romã, preparados com solventes distintos, foi possível identificar preliminarmente diferentes grupos de metabólitos secundários, como apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Caracterização fitoquímica dos extratos do pericarpo de romã em sob métodos qualitativos.

Classe do metabólico	Reação	R1	R2	R3	R4	R5
Flavonoides	Shinoda	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
	Cloreto de alumínio	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Taninos	Gelatina 2%	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
	Cloreto férrico	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Cumarinas	Cloreto de sódio	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Alcaloides	Precipitação com Dragendorff	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Saponinas	Índice afrosimétrico	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Esteroides/ triterpenos	Liebermann-Burchard	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva

Legenda: R1: 100% etanol, R2: 70% etanol e 30% de água destilada, R3: 50% de etanol e 50% de água destilada, R4: 20% de etanol com 80% de água destilada e R5: 100% água destilada.

Para a análise de flavonoides bioativo que pode ser eficaz na prevenção de doenças como câncer e cardiovasculares (Khan *et al.*, 2021), utilizaram a reação de Shinoda, que evidenciou a presença desses metabólitos por meio da formação de coloração vermelha intensa no extrato com maior teor etanólico. Observou-se que a intensidade da coloração diminuiu progressivamente conforme a redução da proporção de etanol nos extratos. Já o extrato obtido por decocção com água apresentou coloração alaranjada. Na análise sob luz ultravioleta, todos os extratos apresentaram fluorescência visível nas duas faixas de comprimento de onda utilizadas (254 nm e 365 nm).

A presença de flavonoides nos extratos deste estudo encontra paralelo no trabalho de Silva *et al.* (2021) com casca de romã, reforçando que essa matriz é de fato uma fonte relevante desses metabólitos, ainda que com variações dependentes do método. Por outro lado, nossos dados contrastam em parte com as observações de Rodrigues (2023), que relatou maior evidência de flavonoides no extrato aquoso, enquanto nos extratos por decocção e com álcool 70% as reações foram menos visíveis, um achado distinto do padrão verificado aqui. É importante ponderar que Rodrigues (2023) utilizou um tempo de extração de apenas uma hora, significativamente inferior ao período de sete dias adotado no presente estudo. Esta diferença metodológica crucial pode ser um fator explicativo central para a divergência entre os resultados, sugerindo que o tempo de extração é uma variável tão importante quanto a natureza do solvente para a eficiência do processo.

No que diz respeito à diferença de coloração para os flavonoides, é possível inferir que os extratos com tonalidade mais avermelhada, que continham etanol em sua composição, apresentaram maior extração de flavonoides livres, devido à maior solubilidade desses compostos em etanol, por outro lado, o extrato aquoso pode ter concentrado maiores teores de flavonoides glicosilados, os quais são mais solúveis em água (Cruz *et al.*, 2025; Miao *et al.*,

2022). Tal argumento é reforçado pelos resultados obtidos na reação com cloreto de alumínio (AlCl_3), que indicaram positividade para flavonoides em todos os extratos, corroborando a presença desses metabólitos em diferentes formas estruturais.

A presença de taninos foi visualizada em todos os extratos (R1 à R5) por meio da formação do precipitado branco. Como todos apresentaram esse metabólito, a reação com cloreto férrico (FeCl_3) foi utilizada para caracterização desses taninos. Os extratos R1 e R5 apresentaram coloração azul, indicando maior concentração de taninos hidrolisáveis. Já os extratos R2, R3 e R4 apresentaram coloração verde, característica da presença de taninos condensados.

A identificação de taninos na amostra analisada é um achado relevante, uma vez que esse grupo de compostos fenólicos apresenta características químicas distinta. Segundo Cardoso et al. (2024), os taninos hidrolisáveis tendem a ser mais suscetíveis à degradação no trato digestivo, o que pode estar relacionado a diferenças em seu comportamento biológico quando comparados aos taninos condensados. No caso da romã, a presença de punicalagina, um tanino hidrolisável amplamente relatado na literatura, tem sido associada a elevado potencial antioxidante (Oudane et al., 2018)

Para os taninos o etanol (R1) foi capaz de extrair certos compostos hidrolisáveis, o que não é comum, considerando que esses compostos são altamente polares e, portanto, preferem solventes aquosos. No entanto, é possível que este solvente orgânico tenha solubilizado formas hidrolisáveis menos polares ou parcialmente solúveis nesse solvente, conforme discutido por Zuorro et al. (2019).

Por outro lado, o uso da temperatura no extrato aquoso (R5) promove a ruptura das paredes celulares da romã aumenta os coeficientes de difusão, facilitando a liberação de taninos hidrolisáveis (Ben-Ali *et al.*, 2018). Já a extração com a mistura hidroalcoólica favoreceu a obtenção de taninos condensados (R2, R3 e R4), possivelmente em função da capacidade dessa mistura em solubilizar compostos com diferentes polaridades.

Os taninos são compostos caracterizados por sua natureza anfipática, frequentemente com estrutura polimérica. Esse comportamento pode ser explicado pela arquitetura molecular desses compostos, que consiste em um centro hidrofóbico, formado por anéis aromáticos, envolto por uma periferia de grupos hidroxila, conferindo caráter hidrofílico (Dufourc, 2024). Dessa forma, solventes capazes de interagir com ambas as regiões da molécula tendem a apresentar maior eficiência extrativa, o que é consistente com os resultados observados neste estudo.

Achados semelhantes foram relatados por Duraisamy et al. (2020), que, ao avaliar diferentes solventes para a extração de taninos de *Acacia xanthophloea*, observaram maior eficiência quando utilizados solventes alcoólicos ou misturas álcool-água. Os autores destacam ainda que fatores como razão sólido-solvente e temperatura influenciam significativamente a eficiência do processo, reforçando que a otimização da extração depende tanto da compatibilidade química quanto das condições operacionais. Entretanto, para aplicações alimentares e farmacêuticas, o etanol se destaca como solvente preferencial devido à sua segurança e aceitação regulatória.

As romãs não apresentam significativo teor de cumarinas, sendo estas associadas ao efeito antioxidante e antiproliferativo (Bai *et al.*, 2016), e com potencial de síntese para atividade antitrombótica (Gao *et al.*, 2021). Entretanto, foi possível visualizar a presença de cumarinas pela interação dos extratos com luz ultravioleta, sendo evidenciada por meio da fluorescência esverdeada na faixa de 254 nm em todos os diferentes extratos analisados. Por outro lado, não foram observadas fluorescências na faixa de 365 nm.

A fluorescência em determinados comprimentos de onda pode indicar a presença de diferentes tipos de cumarinas, uma vez que a estrutura química desses compostos influencia diretamente seu comportamento sob luz UV. No presente estudo, foi observada fluorescência apenas na faixa de 254 nm. De acordo com Machyňáková e Hroboňová (2017), o comprimento de onda de 280 nm é considerado ideal para a detecção de algumas cumarinas, como 4-hidroxycumarina, cumarina simples e escoparona. Assim, considerando a proximidade entre os comprimentos de onda dos estudos, é possível sugerir que as amostras analisadas contenham tais cumarinas.

Os alcaloides estiveram presentes em todos os cinco extratos, independentemente do solvente utilizado. Esses compostos são conhecidos por apresentarem significativas atividades biológicas, incluindo ações antioxidantes e anti-inflamatórias (Peng *et al.*, 2019).

Freitas *et al.* (2021), ao avaliarem metabólitos secundários por meio das mesmas reações utilizadas no presente estudo, analisaram a composição de um gargarejo natural à base de romã, gengibre e tansagem, comparando-o com um produto industrializado de formulação semelhante. No gargarejo natural, foi observada a presença intensa de alcaloides, taninos e flavonoides. Já no industrializado, a reação foi fraca para taninos e alcaloides, e ausente para os flavonoides.

As saponinas foram detectadas em todos os cinco extratos. A formação de espuma mais intensa foi observada nos extratos R1 e R2, podendo indicar maior concentração ou o tipo de

saponinas que estão presentes nessas formulações. As saponinas possuem potencial citotóxico em células cancerígenas e atividade antimicrobiana (Zhang *et al.*, 2021).

A detecção de saponinas nos extratos analisados reforça a recorrência dessa classe de metabólitos em matrizes à base de romã. Os resultados obtidos neste estudo estão em concordância com os achados de Pinnamaneni (2018), que identificou saponinas em extratos de cascas de romã obtidos com acetato de etila, bem como com os de Silva *et al.* (2021), que relataram a presença desses compostos em extratos aquosos e etanólicos a 70%. De forma semelhante, Sweidan *et al.* (2023) também detectaram saponinas em todos os extratos avaliados, incluindo os obtidos com água e etanol, indicando que essa classe de metabólitos apresenta ampla solubilidade em solventes de diferentes polaridades, o que é consistente com o comportamento observado neste estudo.

Os extratos também foram submetidos ao teste para detecção de esteroides e triterpenos, onde pode observar que a reação positiva, sendo observada pela mudança de cor para vermelho, um indicativo clássico da presença de núcleos triterpenoides. A reação ocorreu de forma consistente e independente da concentração dos solventes de extração utilizados, indicando que a presença dessas classes de metabólitos não foi afetada pelas variações na concentração do solvente.

Resultados distintos foram relatados por Sweidan *et al.* (2023), que, ao avaliarem esteroides e triterpenoides em extratos de casca de romã obtidos com diferentes solventes (acetato de etila, metanol, metanol aquoso, butanol, etanol e água), detectaram esses metabólitos apenas no extrato etanólico. Com base nessa comparação, é possível que a detecção positiva observada no extrato aquoso do presente estudo esteja relacionada ao uso do processo de decocção, o qual pode ter favorecido a ruptura celular e a solubilização desses compostos, mesmo em meio aquoso.

Adicionalmente, a literatura indica que a extração de triterpenoides a partir da casca de romã ocorre em um número limitado de solventes, sendo relatado que as maiores concentrações desse metabólito são encontradas nas flores da planta (Rodrigues e Alencar, 2023). Esse aspecto pode explicar as diferenças observadas entre os estudos, reforçando a influência do método de extração, tanto do solvente escolhido quanto da parte vegetal utilizada na detecção desses compostos.

Em síntese, os resultados indicaram uma notável similaridade fitoquímica entre os extratos. Todos os extratos das cascas de romã apresentaram uma ampla diversidade de classes fitoquímicas, uma vez que os metabólicos se mostraram muito similares. Foram observadas variações significativas apenas na identificação de taninos e cumarinas. Tais discrepâncias são

atribuíveis ao método de extração empregado, sendo evidentes no extrato R5, produzido por decocção.

5.3 Atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antibacteriana dos extratos do pericarpo da romã estão expressos na Tabela 2. Dentre as bactérias utilizadas para a testagem dos extratos, a *S. aureus* foi a mais sensível, sendo os extratos R2 e R3 que mostraram melhor atividade antimicrobiana com CIM de 128 µg/mL, enquanto o R1 e R4 foram um pouco inferiores com CIM de 256 µg/mL.

Já para a *E. coli* e *P. aeruginosa* todos os extratos apresentaram atividade moderada a fraca com CIM de 512 µg/mL e 1024 µg/mL, sequencialmente. A bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* foi a menos sensível aos extratos testados necessitando de maior dose para controlar seu crescimento.

Tabela 2 - Determinação da concentração inibitória mínima dos extratos do pericarpo da romã

Extratos testados	Determinação da concentração inibitória mínima (µg mL ⁻¹)		
	Micro-organismos		
	<i>S. aureus</i> - ATCC 29213	<i>E. coli</i> - NCTC 12923	<i>P. aeruginosa</i> - ATCC 27853
R1	256	512	1024
R2	128	512	1024
R3	128	512	1024
R4	256	512	1024

Legenda: R1:100% etanol, R2: 70% etanol e 30% de água destilada, R3: 50% de etanol e 50% de água destilada e R4: 20% de etanol com 80% de água.

Observa-se que os extratos do pericarpo da romã tiveram efeito antimicrobiano mais forte na cepa bacteriana gram-positiva, em comparação com as Gram-negativas. Esse efeito foi mais evidente nos extratos hidroalcoólicos obtidos com 70% e 50% de etanol (R2 e R3), provavelmente devido à maior eficiência dessas proporções na extração de uma diversidade mais ampla de compostos bioativos, como os taninos que tem atividade antibacteriana devido ao seu alto peso molecular (Mphahlele *et al.*, 2016). Contudo, essa distinção mostrou-se seletiva, uma vez que o efeito observado ocorreu exclusivamente contra *S. aureus*, não sendo verificada frente aos demais microrganismos avaliados.

No estudo de Abu-Niaaj *et al.* (2024), os extratos com solventes depuros butanol e metanol puros, foram mais eficazes contra *E. coli* ATCC 2522 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, com CIM de 5 a 2,5 mg/mL. Os extratos aquosos apresentaram menor eficácia, exigindo

concentrações mais altas. Entretanto, ao ferver o extrato aquoso e o hidroetanólico, suas CIM foram reduzidas em 50% em ambas as cepas, passando a 5 e 2,5 mg/mL para o extrato hidroetanólico e de 10 e 5 mg/mL para o extrato aquoso, respectivamente para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 2522.

As bactérias Gram-negativas necessitaram de uma dosagem maior para inibição desses micro-organismos, pois estas possuem uma camada protetora a mais do que as Gram-positivas, uma membrana externa e uma camada de peptidoglicano mais delgada. Essa camada confere maior resistência à ação de agentes antimicrobianos, dificultando a ação dos compostos bioativos e, consequentemente, contribuindo para a menor suscetibilidade observada nesse grupo bacteriano (Breijyeh, Jubeh e Karaman, 2020).

Os taninos desempenham papel fundamental na atividade antimicrobiana, pois interagem com proteínas presentes na membrana bacteriana, causando alterações estruturais e funcionais que interferem no metabolismo celular e, consequentemente, nos processos essenciais ao crescimento e à reprodução das bactérias. Como consequência dessa interferência, os taninos podem gerar efeitos bacteriostáticos (impedindo o crescimento), em concentrações maiores ou dependendo da bactéria, efeitos bactericidas (levando a morte da célula), explicando os efeitos antimicrobianos aqui observados (Olchowik-Grabarek *et al.*, 2022).

Esse mesmo parâmetro pode ser observado em outros trabalhos como o de Scaglione *et al.* (2024) que avaliou a atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de casca de romã (etanol/ e água destilada a 50% (v/v)), pelo método de difusão em ágar, do qual o extrato mostrou-se eficaz contra todas as cepas de *S. aureus* avaliadas, incluindo a cepa de referência *S. aureus* ATCC 6538, e cepas as multirresistentes (MRSA). Já para *P. aeruginosa*, o extrato foi ineficaz contra as cepas MRSA, porém, eficaz contra a cepa de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Essa eficácia antibacteriana foi confirmada pelo ensaio de microdiluição, onde contra cepas de *P. aeruginosa* MDR, o extrato exibiu a CIM entre 20 e 30 µg/µL. Enquanto frente a cepas de *S. aureus*, as sensíveis quanto as MRSA, os valores de CIM ficaram situados entre 4 e 12 µg/µL. Esses resultados reforçam o potencial do extrato como um agente promissor, principalmente contra bactérias Gram-positivas (Scaglione *et al.*, 2024).

Resultados semelhantes foram observados por Peršurić *et al.* (2020), que avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos da casca de romã e obtiveram valores de CIM entre 800 e 6.400 µg/mL para *S. aureus* ATCC 25923, enquanto para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 os valores variaram entre 6.400 e 12.800 µg/mL.

De forma consistente, Yassin et al. (2021) relataram maior sensibilidade de *S. aureus* ATCC 29213 ao extrato metanólico da casca de romã (CIM = 125 µg/mL), ao passo que bactérias Gram-negativas, como *E. coli* ATCC25922, apresentaram CIM mais elevadas (500 µg/mL). Esses achados corroboram os resultados observados neste estudo e reforçam a maior suscetibilidade das bactérias Gram-positivas aos extratos de romã.

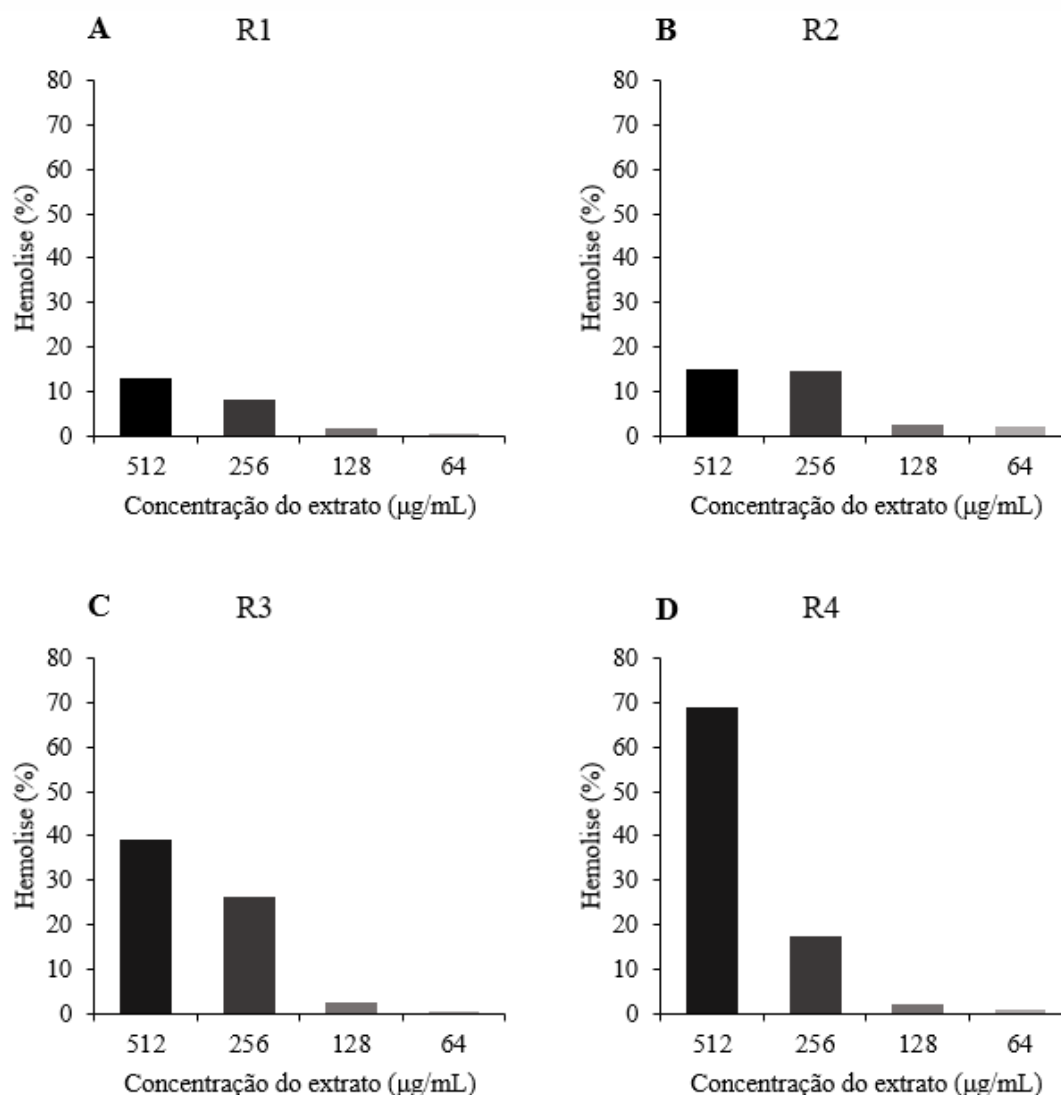
Observa-se uma convergência entre os dados relatados na literatura ao indicar que as bactérias Gram-positivas apresentam maior sensibilidade. Entretanto, as variações nas dosagens observadas entre os estudos podem estar relacionadas tanto a fatores agrônômicos, como condições de cultivo, clima e variedade da romã, que determinam a composição da casca, quanto a fatores de processamento, como o tipo de solvente, a proporção utilizada e o método de extração empregado, os quais influenciam diretamente a eficiência de transferência dos compostos para o extrato.

5.4 Avaliação da atividade hemolítica dos extratos vegetais

Para uma análise isolada do comportamento de cada extrato em diferentes concentrações, observa-se padrões distintos (Figura 9). O extrato R1 (Figura 9A) apresentou uma redução gradual da hemólise conforme a concentração diminui, indicando uma perda proporcional de atividade. Para o R2 (Figura 9B), nas concentrações mais altas (512 e 256 µg/mL) os valores são bem próximos de 14,78 e 14,69, sequencialmente, evidenciando estabilidade da atividade hemolítica, entretanto, ao atingir 128 µg/mL, ocorre uma queda acentuada, com leve redução em 64 µg/mL.

Na Figura 9C, o extrato R3, apresenta atividade hemolítica elevada, principalmente em 512 µg/mL, mas a redução é progressiva, sendo que entre 128 e 64 µg/mL, o extrato quase não apresenta lise (02,35% e 0,02%, respectivamente). Por fim, o R4 (Figura 9D) destacou-se como o mais hemolítico na maior concentração (69,11% a 512 µg/mL), mas sofreu uma redução extremamente abrupta nas concentrações subsequentes, equiparando-se aos demais extratos em 128 e 64 µg/mL.

Figura 9 – Atividade hemolítica dos extratos do pericarpo da romã dentro das concentrações



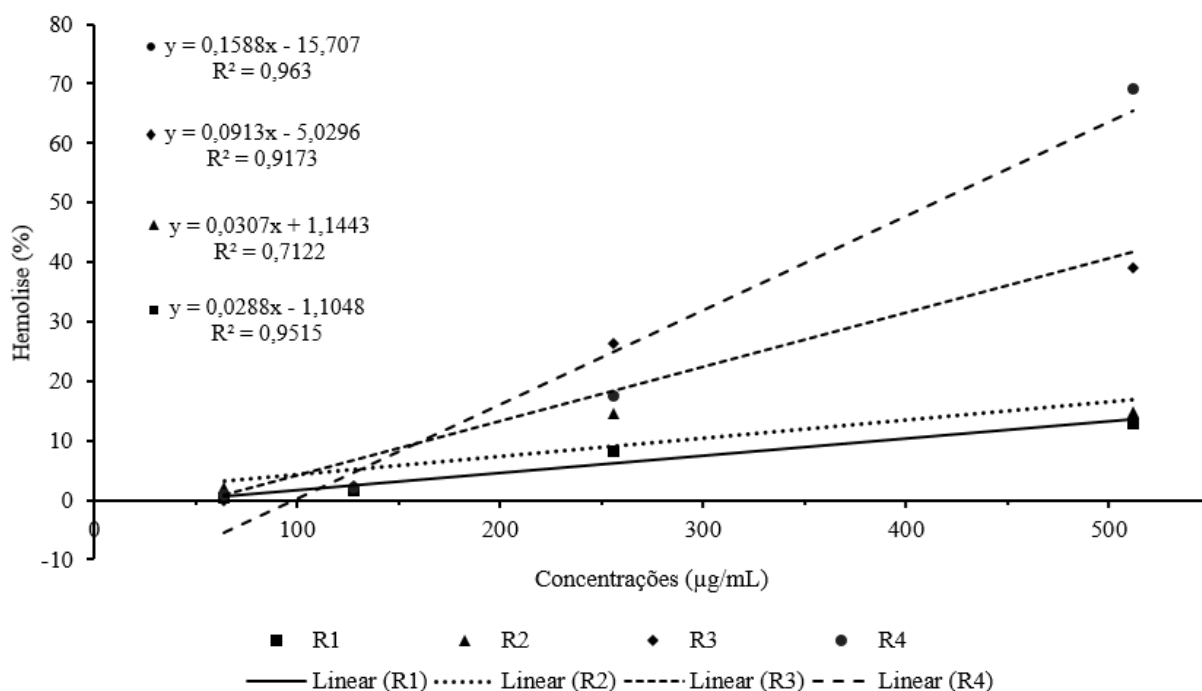
Legenda: R1:100% etanol, R2: 70% etano e 30% de água destilada, R3: 50% de etanol e 50% de água destilada e R4: 20% de etanol com 80% de água.

Para avaliar a relação dose-resposta, realizou-se uma análise de regressão linear (Figura 10). Observa-se um aumento progressivo da atividade hemolítica com a elevação das concentrações testadas, evidenciando um comportamento dose-dependente para os extratos avaliados, com maior intensidade no extrato R4. Os ajustes de regressão linear confirmam essa tendência, sendo que o extrato R4 apresentou a inclinação mais acentuada (coeficiente angular = 0,1588) e o melhor ajuste ao modelo linear ($R^2 = 0,963$). Os extratos R1 ($R^2 = 0,9173$), R2 ($R^2 = 0,9515$) e R3 ($R^2 = 0,7122$) também exibiram tendências lineares positivas, porém com coeficientes angulares menores (0,0913; 0,0288; e 0,0307, respectivamente).

Entre os tratamentos analisados, o extrato R4, na concentração de 512 µg/mL, apresentou a maior atividade hemolítica, com uma diferença de 68,29% em relação à menor

concentração avaliada (64 µg/mL). Esse extrato foi o único classificado como de toxicidade moderada, apresentando aproximadamente 69% de hemólise, enquanto os demais extratos foram considerados de baixa toxicidade, com percentuais variando entre 0 e 40%, conforme os critérios propostos por Sousa et al. (2022). Dentre esses, o extrato R1 apresentou os menores percentuais de lise celular, exibindo um aumento discreto e consistente da hemólise com o aumento da concentração, o que reforça a relação dose-resposta observada.

Figura 10 - Atividade hemolítica dos extratos do pericarpo da romã sob quatro concentrações



Legenda: R1:100% etanol, R2: 70% etanol e 30% de água destilada, R3: 50% de etanol e 50% de água destilada e R4: 20% de etanol com 80% de água. As linhas representam o ajuste por regressão linear.

A maior atividade hemolítica observada no extrato R4 pode ser atribuída à interação de metabólitos esteroidais, como as saponinas que foram detectadas nas amostras, com os componentes lipídicos da membrana das hemácias. Essa interação desestabiliza a bicamada lipídica, promovendo o extravasamento de hemoglobina (Souza et al., 2022). Esse efeito foi potencializado no extrato R4, provavelmente devido à elevada proporção de água em seu solvente de extração, que favorece a solubilização de saponinas hidrossolúveis de natureza anfipática (Timilsena et al., 2023). Conforme destacado por Chipkar et al. (2022), extratos aquosos tendem a concentrar saponinas de maior massa molecular, as quais são reconhecidamente citotóxicas e possuem elevado potencial hemolítico (Paarvanova et al., 2023).

Entretanto, vale destacar que nem todas as saponinas apresentam capacidade hemolítica, indicando a necessidade de estudos adicionais para caracterizar as espécies presentes no pericarpo da romã. Ainda assim, os resultados sugerem que os extratos podem ser considerados seguros dentro de determinadas faixas de concentração, preservando suas propriedades terapêuticas desejáveis (Cao *et al.*, 2024; Paarvanova *et al.*, 2023).

A atividade hemolítica depende tanto da composição quanto da concentração dos extratos, uma vez que a ruptura da bicamada lipídica é intensificada pela presença de compostos bioativos específicos (Rafique *et al.*, 2023). Estudos prévios mostram baixa hemólise induzida por extratos vegetais, como relatado para *Camellia sinensis*, *Thymus vulgaris* e *Zanthoxylum armatum* (Rafique *et al.*, 2023). Essa tendência também se observa em extratos da casca da romã, como no estudo de Yassin *et al.* (2021), que reportou maior hemólise no extrato metanólico a 10 mg/mL, enquanto o aquoso apresentou menor efeito, porém, no geral, os extratos não exibiram atividade hemolítica significativa.

Além da segurança, Scaglione *et al.* (2024) e Yassin *et al.* (2021) destacam que extratos do pericarpo de romã podem exercer efeito anti-hemolítico, o que pode ser correlacionado ao observado na Figura 9D, protegendo hemácias contra agentes oxidantes, ação atribuída à elevada concentração de polifenóis, conhecidos por sua capacidade antioxidante (Chaves e Santos, 2024). Os polifenóis atuam neutralizando espécies reativas de oxigênio geradas durante processos oxidativos, impedindo a peroxidação lipídica da membrana eritrocitária, um dos principais mecanismos que leva à hemólise (González-Horta, 2025). Contudo, reforça-se que a dose permanece um fator crítico para a segurança e eficácia.

Essa complexidade de efeitos hemolítico e anti-hemolítico observada na literatura e nos presentes resultados pode ser explicada pela composição química multifacetada do extrato e pela relação dose-resposta. Em baixas concentrações, a predominância de polifenóis com alta capacidade antioxidante pode exercer um efeito estabilizador sobre a membrana dos eritrócitos, protegendo-as contra a peroxidação lipídica induzida por agentes oxidantes.

À medida que a concentração do extrato aumenta, especialmente em condições que favorecem a extração e ação de saponinas (como no extrato aquoso R4), o efeito detergente destes metabólitos sobre a bicamada lipídica rica em colesterol se intensifica, levando à lise celular.

Para além da composição química e da concentração, fatores físico-químicos do extrato, particularmente o pH, emergem como uma variável crítica na modulação da atividade hemolítica. O pH é capaz de influenciar diretamente a estabilidade da membrana eritrocitária. Como demonstrado no estudo de Ghirmai *et al.* (2024), ao investigar o acúmulo

de hemácias em músculos de peixe, observou-se que em pH ácido (6,4) ocorre rápida perda da integridade das hemácias, resultando em hemólise total, enquanto em pH neutro a levemente alcalino (7,2–7,6) as células permanecem preservadas.

Dessa forma, valores de pH mais baixos podem acelerar o processo de hemólise e favorecer reações oxidativas, indicando que variações de pH entre os extratos podem ter influenciado a intensidade da hemólise observada. Esses resultados podem refletir tanto a composição química dos extratos quanto as condições do meio experimental, reforçando a importância da padronização e do registro do pH em estudos futuros.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Os resultados indicam que a composição do solvente influencia diretamente as características dos extratos, uma vez que o aumento da proporção de água elevou a densidade relativa, enquanto os extratos hidroalcoólicos apresentaram maiores rendimentos.

Os extratos do pericarpo de romã obtidos com diferentes solventes não apresentaram diferenças significativas em sua composição fitoquímica. Estes demonstraram eficiência na inibição do crescimento microbiano, com destaque para a ação sobre bactérias Gram-positivas, sugerindo que os compostos bioativos extraídos apresentam potencial antimicrobiano.

Além disso, a baixa citotoxicidade observada, dependente da concentração utilizada, indica que os extratos apresentam uma margem de segurança satisfatória em ensaios *in vitro*. Dessa forma, os resultados reforçam o uso tradicional da espécie e sugerem a possibilidade de aplicação dos extratos em preparações de uso tópico ou como agentes antimicrobianos naturais, desde que respeitadas as concentrações seguras observadas neste estudo. Ressalta-se, entretanto, que ensaios *in vivo* e avaliações toxicológicas adicionais são necessários para confirmar a segurança e a eficácia dessas aplicações.

REFERÊNCIAS:

- ABDOLLAHZADEH, E.; NEMATOLLAHI, A.; HOSSEINI, H. Composition of antimicrobial edible films and methods for assessing their antimicrobial activity: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 291-303, 2021.
- ABU-NIAAJ, L. F. et al. Pomegranate peel: Bioactivities as antimicrobial and cytotoxic agents. **Food Science & Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 2818-2832, 2024.
- ADAMS, L. S. et al. Pomegranate ellagitannin–derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. **Cancer Prevention Research**, Philadelphia, v. 3, n. 1, p. 108-113, 2010.
- AKHTAR, S. et al. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 174, p. 417-425, 2015.
- ALBUQUERQUE, T. N. et al. Utilização do óleo de romã para fins medicinais: uma revisão de literatura. **Revista de Gestão e Secretariado**, v. 15, n. 7, p. e3884-e3884, 2024.
- AL-JARALLAH, Aishah et al. The effect of pomegranate extract on coronary artery atherosclerosis in SR-BI/APOE double knockout mice. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 228, n. 1, p. 80-89, 2013.
- ALMEER, R. S. et al. Antitumor potential of berberine and cinnamic acid against solid Ehrlich carcinoma in mice. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 19, n. 3, p. 356-364, 2019.
- AMINI, E. et al. Hemolytic and cytotoxic effects of saponin like compounds isolated from Persian Gulf brittle star (*Ophiocoma erinaceus*). **J Coast Life Med**, v. 2, n. 10, p. 762-768, 2014.
- ARGENTA, S. C. et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.
- ASGARY, S. et al. Clinical investigation of the acute effects of pomegranate juice on blood pressure and endothelial function in hypertensive individuals. **ARYA Atherosclerosis**, v. 9, n. 6, p. 326-331, 2013.
- AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, p. 196, 2015.
- AZZINI, E. et al. Antiobesity Effects of Anthocyanins in Preclinical and Clinical Studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2017, n.1, p. 2740364, 2017.
- BAHARI, H. et al. The effects of pomegranate consumption on obesity indices in adults: a systematic review and meta-analysis. **Food Science & Nutrition, Hoboken**, v. 12, n. 2, p. 641-660, 2024.
- BACANLI, M. et al. Assessment of cytotoxicity profiles of different phytochemicals: comparison of neutral red and MTT assays in different cells in different time periods. **Turkish journal of pharmaceutical sciences**, v. 14, n. 2, p. 95, 2017.
- BAI, Y. et al. Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* with antioxidant and antiproliferative activities. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 453-462, 2016.
- BALOGH, M. et al. Phytochemical Analysis of *Psidium Guajava* Leaf Extracts. **Indus Journal of Bioscience Research**, v. 2, n. 2, p. 1607-1613, 2024.

BEN-ALI, S. et al. Optimization of extraction process and chemical characterization of pomegranate peel extract. **Chemical Papers**, v. 72, n. 8, p. 2087-2100, 2018.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020.

BISSINGER, Rosi et al. Effect of saponin on erythrocytes. **International journal of hematology**, v. 100, n. 1, p. 51-59, 2014.

BOPP, S. K.; LETTIERI, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. **BMC pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 8, 2008.

BOUSSAA, F. et al. Growing Location Affects Physical Properties, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activity of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L. var. Gabsi). **International Journal of Fruit Science**, v. 20, n. sup2, p. 508–523, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil: seção 1*, Brasília, DF, p. 20, 4 maio 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil: seção 1*, Brasília, DF, n. 91, p. 52, 14 maio 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira*. 2. ed. Brasília: ANVISA, 2021.

BUI, N. T. et al. Effect of extraction solvent on total phenolic, flavonoid content and antioxidant activity of *Avicennia officinalis*. **Research Journal of Applied Chemistry**, v. 12, p. 2678–2690, 2021.

BUSTAMANTE, A. et al. Extraction and microencapsulation of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* var. Wonderful) residues. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1452-1462, 2017.

CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 18, n. 1 suppl 1, p. 373-382, 2016.

CAO, S. et al. Effects of saponins on lipid metabolism: the gut–liver axis plays a key role. **Nutrients**, v. 16, n. 10, p. 1514, 2024.

CARDOSO, V. S. et al. Uso de tanino hidrolisado e condensado na alimentação de aves comerciais: revisão. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 22, n. 9, p. e6549, 2024.

CHAN, F. K.; MORIWAKI, K.; ROSA, M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. In: **Immune Homeostasis: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 65-70.

CHAVES, T. S.; SANTOS, J. S. Therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*): Functions and activity structure. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 12, p. e41131247617, 2024.

CHENG, J. et al. Bioactive compounds and health benefits of pomegranate: An updated narrative review. **Food Bioscience**, v. 53, p. 102629, 2023.

CHIPKAR, S. et al. Water-soluble saponins accumulate in drought-stressed switchgrass and may inhibit yeast growth during bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 15, n. 1, p. 116, 2022.

CICCONE, L. et al. Romã: uma fonte de compostos bioativos multifuncionais potencialmente benéficos na doença de Alzheimer. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 7, p. 1036, 2023.

COELHO, A. G. et al. Prospecção tecnológica: aplicação de *Punica granatum* (Punicaceae) em produtos medicamentosos e alimentícios. **Revista Geintec**, v. 7, n. 4, p. 4100-4111, 2017.

COLOMBO, E.; SANGIOVANNI, E.; DELL'AGLI, M. Uma revisão sobre a atividade anti-inflamatória da romã no trato gastrointestinal. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 247145, 2013.

CONCENÇO, F. I. G. da R. et al. Romã (*Punica granatum* L.): uma fruta exótica e rica em antioxidantes. In: **Congresso Brasileiro De Fruticultura**, 26., 2023. *Anais [...]*. 2023.

COSTA, F. et al. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 66, p. 56-62, 2013.

CROSS, A. S. What is a virulence factor? *Critical Care*, v. 12, n. 6, p. 196, 2008.

CRUZ, D. C. et al. COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DE PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE PRÓPOLIS. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 11, n. 8, p. 312-322, 2025.

DAHAM, S. S. et al. Antibacterial and antifungal activities of pomegranate (*Punica granatum* L.). **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 9, n. 3, p. 273-281, 2010.

DI MARTINO, P. Antimicrobial agents and microbial ecology. **AIMS Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-3, 2022.

DUFOURC, E. J. Wine tannins and their aggregation/release with lipids and proteins: Review and perspectives for neurodegenerative diseases. **Biophysical Chemistry**, v. 307, p. 107178, 2024.

DURASAMY, R. et al. Extraction, screening and spectral characterization of tannins from *Acacia xanthophloea* (fever tree) bark. **Research Journal of Textile and Leather**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2020.

DUTTA, S. et al. In-vitro scientific validation of anti-inflammatory activity of *Punica granatum* L. on Leukemia monocytic cell line. **African Health Sciences**, v. 24, n. 4, p. 240-249, 2024.

ELLER, S. C. W. S. et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, 2015.

EL-HABIBI, E. M. Renoprotective effects of *Punica granatum* against adenine-induced chronic renal failure in male rats. **Life Science Journal**, v. 10, n. 4, p. 2059-69, 2013.

ERKAN, M.; DOĞAN, A. Pomegranate (*Punica granatum*). In: RODRIGUES, S. (ed.). **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health**. 2. ed. London: Academic Press, Elsevier, 2018. v. 1-2, p. 1179-1193.

ESSA, M. M. et al. Long-term dietary supplementation with pomegranates, figs and dates alleviates neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120964, 2015.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and juices using HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 807–821, 2011

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.

FOURATI M, S. S. et al. Bioactive Compounds and Pharmacological Potential of Pomegranate (*Punica granatum*) Seeds - A Review. **Plant Foods Hum Nutr**. 2020 Dec;75(4):477-486.

FRANZEN, F. L. et al. Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. **Acta Iguazu**, v. 7, n. 1, p. 9–21, 2018.

FREITAS, L. C. et al. Caracterização físico-química, fitoquímica e avaliação da eficácia antimicrobiana de um gargarejo fitoterápico. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 50, n. 1, p. 253-268, 2021.

GUERRERO-SOLANO, J. A. et al. Pomegranate as a potential alternative of pain management: a review. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 419, 2020.

GAO, L. et al. The antithrombotic activity of natural and synthetic coumarins. **Fitoterapia**, v. 154, p. 104947, 2021.

GONZÁLEZ-HORTA, A. Avenanthramide C, the main oat polyphenol, has antioxidant and antihemolytic properties. **International Journal of Health Science**, v. 4, n. 2, p. 45-55, 2025.

HAMRITA, B. et al. Phytochemical composition and antimicrobial, and anti-quorum sensing activities of *Punica granatum* L. methanolic extract. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 373, 2022.

HE, J. et al. Cold stress regulates accumulation of flavonoids and terpenoids in plants by phytohormone, transcription process, functional enzyme, and epigenetics. **Critical reviews in biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 680-697, 2023.

KALING, M. et al. UV-B mediated metabolic rearrangements in poplar revealed by non-targeted metabolomics. **Plant, cell & environment**, v. 38, n. 5, p. 892-904, 2015.

KESSLER, A.; KALSKE, A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 49, n. 1, p. 115-138, 2018.

KHAN, J. et al. Dietary flavonoids: Cardioprotective potential with antioxidant effects and their pharmacokinetic, toxicological and therapeutic concerns. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 4021, 2021.

KIRAN, S. et al. Punicalagin, a pomegranate polyphenol, sensitizes antibiotic activity against three multidrug-resistant Enterobacteriaceae pathogens. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 24, n. 1, p. 93, 2024.

KRAKER, M. E. A.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. **PLoS medicine**, v. 13, n. 11, p. e1002184, 2016.

KÖPPEN, W. P. Die klimate der erde: Grundriss der klimakunde. Berlin: Walter de Gruyter & So., 1923. 369p.

- KOLEY, D.; BARD, A. J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 39, p. 16783-16787, 2010.
- KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D. M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of immunological methods**, v. 64, n. 3, p. 313-320, 1983.
- KUMARI, C.; KUMARI, A.; JAYARAJ, G. R. Preliminary phytochemical screening, photoluminance study and TLC of leaf extracts of *Punica granatum*. **International Journal of Creative Research Thoughts**, v. 12, n. 3, p. 624–631, 2024
- KUS-LÍSKIEWICZ, M.; FICKERS, P.; BEN TAHAR, I. Biocompatibility and cytotoxicity of gold nanoparticles: recent advances in methodologies and regulations. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 20, p. 10952, 2021.
- LES, F. et al. Bioactive properties of commercialised pomegranate (*Punica granatum*) juice: antioxidant, antiproliferative and enzyme inhibiting activities. **Food & Function**, v. 6, n. 6, p. 2049–2057, 2015.
- LUCARINI, S. et al. Synthesis, structure–activity relationships and in vitro toxicity profile of lactose-based fatty acid monoesters as possible drug permeability enhancers. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 81, 2018.
- LYDIA, D. E. et al. Photo-activated synthesis and characterization of gold nanoparticles from *Punica granatum* L. seed oil: An assessment on antioxidant and anticancer properties for functional yoghurt nutraceuticals. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 206, p. 111868, 2020.
- MACHADO, T. B. et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 21, n. 3, p. 279-284, 2003.
- MACHYŇÁKOVÁ, A.; HROBOŇOVÁ, K. Simultaneous determination of coumarin derivatives in natural samples by ultra-high performance liquid chromatography. **Journal of Food & Nutrition Research**, v. 56, n. 2, 2017.
- MAGGIORE, I.; SETTI, L. New biorefinery approach for the valorization of fruit processing waste at a local scale: Pomegranate pomace as case study. **Waste and Biomass Valorization**, v. 16, n. 6, p. 2749-2766, 2025.
- MAHESHWARAN, L. et al. Methods and principles of phytochemical tests for preliminary screening/qualitative tests. **Asian Plant Research Journal**, v. 12, n. 5, p. 11-38, 2024.
- MAHMOOD, M. S. et al. Portrayal of *Punica granatum* L. peel extract through High Performance Liquid Chromatography and antimicrobial activity evaluation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e244435, 2021.
- MALIK, S. et al. Root-zone temperature alters alkaloid synthesis and accumulation in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum*. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 318-325, 2013.
- MAPHETU, Nhlanhla et al. Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum* L. (pomegranate) plant extracts: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113256, 2022.
- MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química nova**, v. 36, p. 1248-1255, 2013.

- MEIGHANI, H.; GHASEMNEZHAD, M.; BAKHSHI, D. Effect of different coatings on postharvest quality and bioactive compounds of pomegranate fruits (*Punica granatum* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 4507-4514, 2015.
- MELGAREJO-SÁNCHEZ, P. et al. Pomegranate variety and plant part, relevance from a bioactive point of view: A review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, p. 1-29, 2021.
- MENDES, L. P. M. et al. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, 2011.
- MENDES, P. M. et al. Therapeutic Potential of *Punica granatum* and Isolated Compounds: Evidence-Based Advances to Treat Bacterial Infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2023, n. 1, p. 4026440, 2023.
- MENDONÇA, L. M. et al. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 675, n. 1-2, p. 29-34, 2009.
- MIAO, L. et al. Flavonoids. In: **Antioxidants Effects in Health**. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 353-374.
- MININEL, F. J. et al. Capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico da romã (*Punica granatum* L.). **Revista Tópicos**, v. 2, n. 15, p. 1-17, 2024.
- MOHAN, Maureen et al. Review of pharmacological and medicinal uses of *punica granatum*. **Cureus**, v. 16, n. 10, 2024.
- MOTA, P. J. et al. Romã (*Punica granatum* Linn) no tratamento das inflamações gengivais associadas ao biofilme supragengival: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Implant News**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 68-73, jul./ago. 2023.
- MPHAHLELE, R. R. et al. Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 143, 2016.
- MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.
- NOGUEIRA, L. P. S. et al. Beneficiamento e caracterização de resíduos da romã orgânica para aproveitamento agroindustrial. **Rev. Bras. de Gestão Ambiental** (Pombal, PB), v. 14, n. 01, p. 60-63, 2020.
- OLCHOWIK-GRABAREK, E. et al. The structural changes in the membranes of *Staphylococcus aureus* caused by hydrolysable tannins witness their antibacterial activity. **Membranes**, v. 12, n. 11, p. 1124, 2022.
- OLIVEIRA, J. R. Ensaio de citotoxicidade de extratos naturais após determinação da concentração microbiana mínima para *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e *Candida* spp. 2011. 134 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, 2011.
- OSTROSKY, E. A. et al. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

- LOUDANE, B. et al. Isolation, characterization, antioxidant activity, and protein-precipitating capacity of the hydrolyzable tannin punicalagin from pomegranate yellow peel (*Punica granatum*). **Journal of Molecular Structure**, v. 1156, p. 390-396, 2018.
- PAARVANNOVA, B. et al. Hemolysis by saponin Is accelerated at hypertonic conditions. **Molecules**, v. 28, n. 20, p. 7096, 2023.
- PAL, J. et al. Antimicrobial activity of pomegranate and orange peels extracts against selected food borne pathogens. **Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 4, p. 176-178, 2018.
- PAVINATTO, A.; SOARES, A. C.; TORRES, B. B. M. **Filmes drop-casting e dip-coating**. In: Nanotecnologia aplicada a polímeros. São Paulo: Blucher, 2022. p. 303–326
- PENG, J. et al. A Plant-derived alkaloids: promising disease-modifying agents for inflammatory bowel disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 351, 2019.
- PERŠURIĆ, Ž. et al. Assessment of the biological activity and phenolic composition of ethanol extracts of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5916, 2020.
- PINNAMANENI, R. Preliminary Phytochemical Investigation of peel of Pomegranate *Punica granatum* L. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 11, n. 8, p. 3609-3613, 2018.
- PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325 p.
- PIRZADEH, M. et al. Pomegranate as a source of bioactive constituents: A review on their characterization, properties and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 982-999, 2021.
- POZAROWSKA, D.; POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometric assessment of cytostatic and cytotoxic effects of topical glaucoma medications on human epithelial corneal line cells. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 78, n. 2, p. 130-137, 2010.
- RAFIQUE, S. et al. Investigation of the antimicrobial, antioxidant, hemolytic, and thrombolytic activities of *Camellia sinensis*, *Thymus vulgaris*, and *Zanthoxylum armatum* ethanolic and methanolic extracts. **Food Science & Nutrition**, v. 11, n. 10, p. 6303-6311, 2023.
- RANJHA, M. M. A. N. et al. A comprehensive review on phytochemistry, bioactivity and medicinal value of pomegranate (*Punica granatum*) bioactive compounds. **Advances in Traditional Medicine**, p. 1–21, 2021.
- REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.
- RODRIGUES, A. R. S. P.; DE ALENCAR, C. D. C. Chemical profile and pharmacological activities of *Punica granatum* (Punicaceae): a review. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 52, n. 2, p. 1–17, 2023.
- RODRIGUES, F. F. M.; ARAUJO, J. W. M.; AZEVEDO, M. G. B.; SOUZA, J. B. P. Extratos de cascas de romã (*Punica granatum* L.): caracterização físico-química e atividade antimicrobiana. In: **Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas – Edição Natal-RN, 2023**, Natal-RN. *Resumos do Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas – Edição Natal-RN*. Brasília: Conselho Federal de Farmácia, 2023. p. 846.

SÆBØ, I. P. et al. Optimization of the hemolysis assay for the assessment of cytotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2914, 2023.

SANG, H. et al. Gallic acid exerts antibiofilm activity by inhibiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* adhesion. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 17220, 2024.

SANTANA, M. B. et al. Desempenho da romã em sistema de produção orgânico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 2, 2018.

SANTOS, J. A. et al. Physical-chemical, nutritional characterization and bioactive compounds of pomegranate. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e18511222777, 2022.

SARMENTO, D. H. A. et al. Quality and productivity of two varieties of pomegranate in the state of Ceará. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e82791110158, 2020.

SANTIAGO, M. C. P. A. et al. Determinação de punicalagina em romã (*Punica granatum* L.) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, 2014. Folheto.

SCAGLIONE, E. et al. Antimicrobial efficacy of *Punica granatum* Lythraceae peel extract against pathogens belonging to the ESKAPE group. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1383027, 2024.

SHAYGANNIA, E. et al. A review study on *Punica granatum* L. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 21, n. 3, p. 221-227, 2016.

SHIMIZU, G. D. et al. Antioxidant activity and chemical composition from different parts of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Scientific Electronic Archives**, v. 16, n. 4, 2023.

SILVA, F. M. et al. Análises bioquímicas e microbiológicas de garrafadas medicinais comercializadas em feiras livres no interior do Ceará, Brasil. **Nutrição Brasil**, v. 23, n. 5, p. 1164-1180, 2024.

SILVA, J. A. T. et al. Pomegranate biology and biotechnology: A review. **Scientia horticultrurae**, v. 160, p. 85-107, 2013.

SILVA, L. M. et al. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso dos rizomas de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae). **Revista Fitos**, v. 17, n. 1, p. 9-17, 2023.

SILVA, S. F.; FERREIRA-ROMANICHEN, F. M. D.; ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M. Atividade antimicrobiana *in vitro* da *Punica granatum* sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 104581-104591, 2021.

SOUSA, N. C. F. et al. Propriedades farmacológicas de *Punica granatum* L. (romã): uma revisão de literatura. **Revista Ceuma Perspectivas**, v. 31, n. 1, p. 57-67, 2018.

SUN, Y.; NIU, G.; MASABNI, J.; GANJEGUNTE, G. Relative salinity tolerance of 22 pomegranate (*Punica granatum*) cultivars. **HortScience**, v. 53, p. 1513–1519, 2018.

STEPANIC, V. et al. Selected attributes of polyphenols in combating oxidative stress in cancer. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 496–509, 2015.

SWEIDAN, N. et al. Phytochemical analysis, antioxidant, and antimicrobial activities of Jordanian pomegranate peels. **PLOS ONE**, v. 18, n. 11, p. e0295129, 2023.

- SYAHPUTRA, A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Punica granatum* L. extract and *in vivo* anti-inflammatory activity of nanogel on Wistar rats gingiva. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 17, n. 3, p. 189-199, 2025.
- TIMILSENA, Y. P.; PHOSANAM, A.; STOCKMANN, R. Perspectives on saponins: food functionality and applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 17, p. 13538, 2023.
- UNGUREANU, A. R. et al. Cytotoxicity analysis and *in silico* studies of three plant extracts with potential application in treatment of endothelial dysfunction. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2125, 2023.
- WU, S.; TIAN, L. Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*). **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1606, 2017.
- YAN, L. et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of six Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. sup1, p. S94–S107, 2017.
- YASSIN, M. T. et al, Abdulaziz Abdulrahman. In vitro evaluation of biological activities and phytochemical analysis of different solvent extracts of Punica granatum L.(Pomegranate) peels. **Plants**, v. 10, n. 12, p. 2742, 2021.
- YESHI, K. et al. Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses have potential application in pharmaceutical product development. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 313, 2022.
- YUAN, Z. et al. The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 7, p. 1363–1374, 2018.
- ZAHEDI, S. M. et al. Evaluation of drought tolerance in three commercial pomegranate cultivars using photosynthetic pigments, yield parameters and biochemical traits as biomarkers. **Agricultural Water Management**, v. 261, p. 107357, 2022.
- ZAOUAY, F. et al. Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 81–89, 2012.
- ZARFESHANY, A.; et al. Potent health effects of pomegranate. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 1, p. 100, 2014.
- ZASHEVA, D. et al. Cytotoxic effects of plant secondary metabolites and naturally occurring bioactive peptides on breast cancer model systems: molecular mechanisms. **Molecules**, v. 29, n. 22, p. 5275, 2024.
- ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, p. 221–225, 2001.
- ZHANG, L. H. et al. Effects of fertilization and drought stress on tannin biosynthesis of *Casuarina equisetifolia* seedlings branchlets. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1639–1649, 2012.
- ZHANG, H. et al. Effect of solvents on polyphenol recovery and antioxidant activity of root isolates of *Asparagus officinalis* from Chinese and New Zealand cultivars. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 10, p. 2369–2377, 2018.

ZHANG, R. S. et al. Furostanol saponins from *Asparagus cochinchinensis* and their cytotoxicity. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, n. 6, p. 651–658, 2021.

ZHONG, L. et al. Effects of water stress on physiological, biochemical and chemical components of *Cinnamomum cassia* seedlings. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 46, n. 9, p. 2158–2166, 2021.