FUNDAÇÃO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS DE UBÁ
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

DAYANA HERCULANO LAMAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICO DOS EXTRATOS DE FOLHAS E CASCAS DOS FRUTOS DE *Punica granatum*

UBÁ - MG
2017

DAYANA HERCULANO LAMAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICO DOS EXTRATOS DE FOLHAS E CASCAS DOS FRUTOS DE *Punica granatum*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Fundação Presidente Antônio Carlos de Ubá como parte das exigências do curso de graduação em Farmácia, para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

Orientador: Prof. Msc. César Augusto Caneschi

UBÁ

2017

DAYANA HERCULANO LAMAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICO DOS EXTRATOS DE FOLHAS E CASCAS DOS FRUTOS DE *Punica granatum*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Fundação Presidente Antônio Carlos de Ubá, como parte das exigências do curso de graduação em Farmácia, para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Msc. Luiz Gustavo de Oliveira

Fundação Presidente Antônio Carlos – FUPAC

_____

Prof[a]. Msc. France Araújo Coelho

Fundação Presidente Antônio Carlos – FUPAC

_____

Prof. Msc. César Augusto Caneschi (Orientador)

Fundação Presidente Antônio Carlos – FUPAC

RESUMO

INTRODUÇÃO: A *Punica granatum* (romã), planta utilizada como medicinal e nutricional, apresenta diversos compostos farmacologicamente ativos, que desempenham entre outras propriedades a ação antioxidante, que na romã está relacionada com os compostos fenólicos. As cascas da romã, subproduto gerado pela indústria de alimentos, podem ter diversos compostos bioativos; bem como as folhas, que estão em grande disponibilidade na natureza, sendo ambas empregadas em diversos usos na medicina popular. Dessa forma, a avaliação do potencial antioxidante e toxicológico dos extratos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum* é de grande relevância frente a sua importância para a indústria que almeja novos compostos antioxidantes, meios para reduzir os resíduos por ela produzidos, além de esclarecer à população sobre a composição, potencial antioxidante e toxicidade de folhas e cascas dos frutos dessa espécie. **OBJETIVO**: Identificar o potencial antioxidante e toxicológico dos extratos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum*. **METODOLOGIA**: Os extratos secos analisados, folhas e cascas dos frutos, foram preparados a partir da droga vegetal, através dos processos de maceração e de liofilização; os quais foram submetidos à triagem fitoquímica para identificação dos metabólitos especiais. O potencial antioxidante foi determinado via atividade do radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e a toxicidade foi avaliada através do ensaio com *Artemia salina* Leach. **RESULTADOS**: Em ambos os extratos foi identificada a presença de antraquinonas, esteroides, flavonoides e taninos. O potencial antioxidante para os extratos de folhas e cascas dos frutos, foram respectivamente 0,953 e 0,367 µg mL^{-1}, o qual pode ser classificado como ótimo (IC_{50} < 15 µg mL^{-1}). Ambos os extratos apresentaram toxicidade frente à *A. salina* Leach com CL_{50} igual a 499,743 µg mL^{-1} e 478,861 µg mL^{-1} para o extrato de folhas e das cascas dos frutos, respectivamente. **CONCLUSÃO**: Assim, pode-se atribuir ótimo potencial antioxidante aos extratos das folhas e cascas dos frutos de *P. granatum*, no entanto, estes revelaram toxicidade, o que sugere a realização de estudos mais específicos a fim de garantir que o uso destas estruturas vegetais como medicinal seja seguro.

Palavras-chave: *Punica granatum*. Antioxidante. Toxicidade.

ABSTRACT

INTRODUCTION*: Punica granatum* (pomegranate), a medicinal and nutritional plant, contains several pharmacologically active compounds, which among other properties possess an antioxidant activity that is related to the presence of phenolic compounds. Pomegranate peels, as a byproduct generated by the food industry, may contain several bioactive compounds, and leaves, which are abundantly available in the nature, have been used in folk medicine for various purposes. Thus, evaluating the antioxidant potential and toxicity of leaf and bark extracts of pomegranate fruits is of great relevance owing to its importance to the industry seeking new antioxidant compounds. In addition to clarifying the composition, antioxidant potential and toxicity of the leaves and bark of pomegranate fruits, using these byproducts could reduce the waste produced by food industry. **OBJECTIVE**: To identify the antioxidant potential and toxicity of the leaf and bark extracts of *P. granatum* fruits. **METHODOLOGY**: Dried leaf and fruit-peels extracts were prepared in vegetable drugs through maceration and lyophilization processes; which were then subjected to phytochemical screening for the identification of specific metabolites. The antioxidant potential of the extracts was determined via 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)-free radical activity assay, and the toxicity was assessed by the *Artemia salina* Leach assay. **RESULTS**: Both the extracts contained anthraquinones, steroids, flavonoids, and tannins. The antioxidant potential of the leaf and fruit peel extracts was 0.953 and 0.367 $\mu g mL^{-1}$, respectively, which can be classified as optimal (IC_{50} < 15 $\mu g\ mL^{-1}$). Both the extracts presented toxicity to *A. salina* Leach, with LC_{50} values of 499.743 $\mu g\ mL^{-1}$ and 478.861 $\mu g\ mL^{-1}$for the leaf and fruit peel extracts, respectively. **CONCLUSION**: Thus, the leaf and bark extracts of *P. granatum* fruits possess enormous antioxidant potential, however, they also exhibit toxicity, which suggests that more specific studies are required to ensure the safe use of these plant structures as medicinal agents.

Keywords: *Punica granatum*. Antioxidant.Toxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 6
2 METODOLOGIA 8
2.1 TIPO DE ESTUDO 8
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO 8
2.3 MATERIAL VEGETAL 8
2.3.1 Preparo das amostras 8
2.4 *SCREENING* FITOQUÍMICO 9
2.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE 9
2.6 BIOENSAIO COM *ARTEMIA SALINA* LEACH 10
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 11
4 CONCLUSÃO 14
REFERÊNCIAS 15

1 INTRODUÇÃO

A *Punica granatum* (romã) é uma planta de origem asiática, empregada na medicina popular e na área alimentícia (DEGÁSPARI e DUTRA, 2011; BOPITIYA e MADHUJITH, 2012), que encontrou no Brasil condições favoráveis para o crescimento vegetativo, florescimento, frutificação e produção de frutos de qualidade (MORZELLE, 2016). Essa espécie vegetal é um arbusto lenhoso, ramificado, pertencente à família *Punicaceae*, cujas folhas são pequenas, rijas, brilhantes e membranáceas, e as flores vermelho-alaranjadas dispostas nas extremidades dos ramos, originando frutos globosos, com muitas sementes, as quais se acham envolvidas em arilos polposos (NASCIMENTO et al., 2013; VIEIRA, 2014; SUZUKI, 2016).

Considerada como símbolo de riqueza pelo império romano, o fruto da romã é composto por aproximadamente 3% de sementes, 30% de polpa e 67% de casca (incluindo as membranas internas). Esta contém diversos compostos bioativos, que desempenham as seguintes propriedades: antitumoral, antibacteriano, anti-hepatotóxico, antilipoperoxidativo e, com destaque, para a antioxidante que ajuda a reduzir doenças degenerativas como câncer, artrite, aterosclerose e disfunção cerebral (SANTOS et al., 2010; BARROS, 2011; BOPITIYA e MADHUJITH, 2012; ISMAIL et al., 2012; SILVA e SIRASA, 2018).

A atividade antioxidante é a capacidade de um composto, em baixas concentrações, retardar ou inibir a oxidação ocorrida em lipídeos ou em outras moléculas, o que evita o início ou a propagação de reações oxidativas, através de diferentes mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação com metais (SALGADO et al., 2012; SOUZA, 2013; CRUZ, 2014; MORAIS et al., 2016). Na romã, essa propriedade está relacionada com os compostos fenólicos, que podem ser encontrados na parte interna dos frutos, sendo eles as antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina) que conferem cor vermelha ao fruto, os flavonoides (quercetina e rutina), os taninos hidrolisáveis (elagio e galotaninos) presentes no fruto inteiro e também os ácidos fenólicos (ácido gálico e elágico) (JARDINI, 2010; NASCIMENTO et al., 2013; ALENCAR, 2016; CARMO et al., 2016).

Além do uso medicinal, o fruto da *P. granatum* é consumido diretamente com os arilos frescos e em forma de suco, manipulado pela indústria alimentícia, na produção de geleias, concentrados, aromatizantes e corantes (TEHRANIFAR et al.,

2010; BASTOS, 2014; LABBÉ et al., 2016). No entanto, as bebidas elaboradas a partir da polpa da romã produzem subprodutos, por exemplo, as cascas. Estas possuem grande diversidade de moléculas orgânicas bioativas, como os compostos fenólicos, quando comparada com sua polpa, podendo vir a ser uma importante fonte de nutrientes; porém essas são descartadas (BARROS, 2011; KHARCHOUFI et al., 2018).

Além dos frutos, as folhas da romãzeira também são empregadas na medicina popular e possuem elevada disponibilidade na natureza. Essas são conhecidas por suas propriedades anti-inflamatórias, anticolinesterásicas, por sua atividade citotóxica, e por apresenta-se eficaz no controle de complicações diabéticas, como a hiperlipidemia (BEKIR et al., 2013; MESTRY et al., 2017). Essas características estão relacionadas com uma ampla gama de compostos bioativos presentes nessa estrutura vegetal, entre eles, os compostos fenólicos e os taninos, que desempenham entre outras funções, a ação antioxidante (WANG et al., 2013).

Desde a década de 1980, um dos desafios da indústria é a busca por compostos antioxidantes naturais para uso em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, a fim de substituir os antioxidantes sintéticos, cujo potencial carcinogênico já fora observado (SOUZA, 2013; CRUZ, 2014; LEÃO et al., 2017).

Estes compostos bioativos, que apresentam diferentes propriedades são denominados de metabólitos especiais, são produtos do metabolismo especial dos vegetais e podem ser encontrados por todas as partes do vegetal (rizoma, raiz, caule, folha, flor e fruto) com a finalidade de protegê-las de parasitas, predadores e intempéries (OLIVEIRA, 2016). Assim, alguns desses componentes podem apresentar toxicidade aos animais e ao ser humano quer seja por meio da inalação, ingestão ou contato direto com o vegetal (SIMÕES et al., 2017).

A segurança no uso de plantas e seus derivados na medicina popular é garantida através da investigação de suas ações farmacológicas e toxicológicas. Para avaliar a toxicidade *in vivo* pode ser empregado o bioensaio com *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada pertencente à ordem *Anostraca* (MERINO et al., 2015). Trata-se de um método rápido, de baixo custo e seguro, que permite analisar a segurança de novas substâncias para uso humano e em animais (MEYER et al., 1982; SANTOS, 2016).

Diante do exposto, a avaliação do potencial antioxidante e toxicológico dos extratos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum* é de grande relevância frente

a sua importância para a indústria que almeja novos compostos antioxidantes, meios para reduzir os resíduos por ela produzidos, além de esclarecer à população sobre a composição, potencial antioxidante e toxicidade dessa espécie.

Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar o potencial antioxidante e toxicológico dos extratos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum*.

2 METODOLOGIA

2.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental onde foi analisado o potencial antioxidante e toxicológico de extratos secos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum.*

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO

Os extratos foram produzidos e analisados no Laboratório de Química da Fundação Presidente Antônio Carlos de Ubá (FUPAC-Ubá) e no Laboratório do Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

2.3 MATERIAL VEGETAL

As folhas e cascas dos frutos de *P. granatum* analisadas foram coletadas no município de Piraúba - Minas Gerais, no mês de março de 2017. Uma exsicata dessa espécie vegetal foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora, campus Juiz de Fora, sob o número de identificação CESJ 68916.

2.3.1 Preparo das amostras

As amostras vegetais foram secas em estufa (Medicate, MD 1.3) a 40°C, por 48 horas (BRASIL, 2011) e em seguida as drogas vegetais foram trituradas e armazenadas em local seco e ao abrigo da luz.

Os extratos hidroetanólicos 70% (v/v) das respectivas drogas vegetais foram preparados por maceração dinâmica, onde uma fração das drogas vegetais em pó (25 g) foi empregada para o preparo de cada extrato fluido. Em seguida, os

macerados foram concentrados no evaporador rotativo (TECNAL, TE-211) sob pressão reduzida à temperatura de 45°C e secos em liofilizador (ALFHA 1-4 LD plus, Christ, Alemanha) sob pressão de 1,8 mbar e -14° C.

2.4 *SCREENING* FITOQUÍMICO

Os extratos secos foram submetidos à triagem fitoquímica para detecção das principais classes de metabólitos especiais, através de reações químicas que resultaram no desenvolvimento de coloração ou na formação de precipitado; característico para cada classe de substância; antraquinonas (reação de Borntrager); alcaloides (reação de Mayer); cumarinas (reação com hidróxido de potássio sob luz ultravioleta); esteroides (reação com anidrido acético e ácido sulfúrico); flavonoides (reação com hidróxido de sódio); saponinas (teste de espuma) e taninos (reação com acetato de chumbo). As substâncias foram identificadas qualitativamente pela presença ou ausência (MATOS,1997; SIMÕES et al., 2017).

2.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O potencial antioxidante foi determinado via atividade sequestradora do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma Aldrich Chemistry, EUA), de acordo com metodologia descrita por Dutra, Leite e Barbosa (2008), monitorando o consumo do radical pelos componentes da amostra, através da medida do decréscimo da absorvância por soluções de diferentes concentrações.

As amostras dos extratos vegetais foram solubilizadas em etanol PA (Vetec) na concentração de 1 mg mL^{-1} e submetidas à diluição seriada com etanol PA na faixa de 250 a 0,97µg mL^{-1}. A solução de DPPH foi preparada na concentração de 0,05 mM; e a solução padrão de ácido L-ascórbico (Sigma Aldrich Chemistry, EUA) foi preparada e diluída nas mesmas concentrações da amostra.

O ensaio antioxidante foi realizado em triplicata com o emprego de microplacas de 96 poços de fundo chato. Alíquotas da solução de DPPH (150 µL) foram adicionadas a 50 µL de cada diluição da amostra, e posteriormente submetidas à agitação e incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as placas foram lidas em espectrofotômetro (Libra S-12, Biochrom, Reino Unido) no comprimento de onda de 510 nm. O ácido L-ascórbico foi empregado como solução antioxidante padrão sendo analisado nas mesmas

condições descritas. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do DPPH:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Absorvância branco do DPPH} - \text{Absorvância amostra x 100}}{\text{Absorvância do branco do DPPH}}$$

O percentual de inibição foi correspondente a quantidade de DPPH consumida, pelo antioxidante; sendo que estes representam a concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. A IC_{50} foi calculada a partir da equação do gráfico de dispersão linear.

A atividade antioxidante foi classificada de acordo com os valor de IC_{50} como ótimo ($IC_{50} < 15$ µg mL^{-1}), bom (15 µg $mL^{-1} < IC_{50} < 50$ µg mL^{-1}), médio (50 µg $mL^{-1} < IC_{50} < 100$ µg mL^{-1}) e baixo ($IC_{50} \geq 100$ µg mL^{-1}) (MARTINS et al., 2016).

2.6 BIOENSAIO COM *ARTEMIA SALINA* LEACH

A avaliação da toxicidade frente às larvas do microcrustáceo *Artemia salina* Leach foi adaptada e realizada de acordo com a metodologia descrita por Meyer e colaboradores (1982). Os ovos de *A. salina* foram adquiridos comercialmente e colocados em um recipiente contendo água do mar artificial produzida com os seguintes sais, cloreto de sódio (Química fina), cloreto de cálcio (Vetec), cloreto de potássio (Vetec), brometo de potássio (Vetec) e sulfato de sódio (Vetec), deixados sob uma lâmpada incandescente em temperatura ambiente por 48 horas para eclodirem.

Os extratos secos foram testados em diferentes concentrações (10, 50, 100, 500 e 1.000 µg mL^{-1}) frente a 10 larvas de *A. salina* inoculadas em cada diluição; o ensaio foi acompanhado do controle negativo (água do mar) e controle positivo (solução de timol 1 mg mL^{-1}) (Vetec).

Utilizou-se método gráfico de análise para obtenção da CL_{50} (concentração capaz de matar 50% dos animais expostos). A classificação da toxicidade dos extratos seguiu os critérios estabelecidos por Meyer e colaboradores (1982), a saber: “tóxico”, se $CL_{50} < 1.000$ µg mL^{-1} e “não tóxicos” se $CL_{50} > 1.000$ µg mL^{-1} (MEYER et al., 1982; SILVA et al., 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica dos extratos secos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum* demonstrou a presença de diferentes compostos químicos, o que pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Análise qualitativa dos metabólitos especiais dos extratos secos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum*.

Classe de Metabólito especial	Extrato seco	
	Folhas	Cascas dos frutos
Alcaloides	-	-
Antraquinonas	+	+
Cumarinas	-	-
Esteroides/Triterpenos	+	+
Flavonoides	+	+
Taninos	+	+
Saponinas	-	-

(+) presença, (-) ausência. Fonte: A autora, 2017.

Neste estudo foi possível evidenciar a presença de compostos fenólicos (antraquinonas, flavonoides e taninos) e esteroides em ambos os extratos secos produzidos com folhas e cascas dos frutos de *P. granatum*. Resultados que corroboram em parte com os encontrados por Amri e colaboradores (2017), onde em um estudo realizado na Tunísia, com duas variedades de *P. granatum* (Tounsi e Nana) encontraram nos extratos metanólicos de diferentes estruturas da espécie (flores, folhas, suco e cascas) os mesmos compostos fenólicos (antraquinonas, flavonoides e taninos). Esses compostos evidenciam as propriedades terapêuticas da *P. granatum* frente patologias, tais como inflamações, infecções microbianas e complicações diabéticas, as quais estão relacionadas com os metabólitos especiais (MESTRY et al., 2017). Tais fatos podem estar associados com a atividade antioxidante, que de acordo com Simões e colaboradores (2017) proporcionam inúmeros benefícios a saúde humana.

Além dos compostos citados anteriormente, Alencar (2016) durante a análise das atividades antifúngicas e antibiofilme do extrato de folhas de *P. granatum*,

obtidos com o mesmo solvente e metodologia, verificou também a presença de saponinas e chalconas. Por outro lado, Jurenka (2008) em uma revisão de literatura em busca dos usos terapêuticos da *P. granatum* verificou que na maioria dos estudos, as folhas apresentavam taninos e flavonoides e as cascas apresentavam antocianidinas, flavonoides e taninos. Em outra revisão literária, realizada por Pereira (2015) em busca de evidências científicas sobre o uso terapêutico da *P. granatum* observou-se que, as folhas apresentaram principalmente esteroides, flavonoides, taninos, saponinas e alcaloides e as cascas dos frutos apresentaram principalmente os compostos fenólicos (antocianidinas, flavonoides e taninos).

Assim, tais resultados demonstram que os componentes químicos de extratos vegetais podem sofrer variações, pois esses podem ter sido coletados em épocas diferentes, em locais diferentes, além de que os compostos fenólicos são influenciados diretamente pela luz solar. E os metabólitos especiais podem ser estimulados positiva ou negativamente por fatores internos relacionados ao metabolismo vegetal e fatores externos, tais como solo, temperatura, clima, luminosidade, época de coleta e processamento do vegetal (SALGADO et al., 2012).

O potencial antioxidante dos extratos secos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum* e do padrão ácido L-ascórbico está descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Atividade antioxidante dos extratos secos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum* e do ácido L-ascórbico.

Amostra	**Atividade antioxidante** IC_{50} **(µg** mL^{-1}**)**
Extrato seco de folhas	0,953
Extrato seco de cascas	0,367
Ácido L-ascórbico	1,499

IC_{50}: Valor da concentração do extrato vegetal que inibiu 50 % dos radicais DPPH.
Fonte: A autora, 2017.

De acordo com os valores de IC_{50}, o extrato seco das folhas de *P. granatum* e das cascas dos frutos apresentaram potencial antioxidante classificado como ótimo, ou seja, $IC_{50} < 15$ µg mL^{-1}, os valores para os extratos foram respectivamente 0,953 e 0,367 (µg mL^{-1}), sendo, estes valores inferiores ao valor apresentado pelo ácido L-ascórbico (IC_{50} = 1,499 µg mL^{-1}), o que demonstra, numericamente, ação antioxidante superior à do ácido L-ascórbico.

O potencial antioxidante das estruturas vegetais analisadas, pode ser atribuído a presença dos compostos fenólicos identificados pela triagem fitoquímica (antraquinonas, flavonoides e taninos), sendo estes capazes de inibir ou retardar reações oxidativas em seus diferentes mecanismos de ação (SOUZA, 2013). Em estudo conduzido por Amri e colaboradores (2017), ambas as variedades analisadas (Tounsi e Nana) apresentaram excelente potencial antioxidante para as folhas e para as cascas de *P. granatum*; a variedade Nana, apresentou valor IC_{50} para os extratos de folhas e cascas, respectivamente de 0,085 e 1,13 µg mL^{-1} e a variedade Tounsi, apresentou 0,84 e 1,9 µg mL^{-1}, o que corrobora os resultados da Tabela 2.

Nos estudos de Bekir e colaboradores (2013) e Wang e colaboradores (2013) também foram relatadas a intensa atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *P. granatum*. Segundo Gul, Shinwari e Afzal (2012), isto pode ser proporcionado pelos compostos fenólicos, presentes em diversas estruturas como raiz, folhas e frutos dos vegetais.

Em relação à atividade antioxidante do extrato seco das cascas de *P. granatum*, Moreira (2014) encontrou IC_{50} igual a 3,788 µg mL^{-1}, o que, de acordo com Martins e colaboradores (2016), indica ótima atividade, assim como a obtida pelo presente estudo.

Diante do ótimo potencial antioxidante dos extratos secos das folhas e das cascas dos frutos de *P. granatum*, estes se mostram promissores, podendo vir a ser utilizados para possíveis aplicações em indústrias alimentícias, que buscam a substituição dos antioxidantes sintéticos pelos de origem natural, e também na indústria cosmecêutica (LEÃO et al., 2017). De acordo com Martins e colaboradores (2016) os compostos antioxidantes além de impedirem a formação de radicais livres, também atuam absorvendo energia no ultravioleta, o que garante efeito fotoprotetor e antioxidante a diversos cosméticos.

A avaliação da toxicidade dos extratos secos de folhas e de cascas dos frutos de *P. granatum* frente à *A. salina* permitiu o cálculo da CL_{50}, de acordo com a Tabela 3, onde ambos os extratos foram caracterizados como tóxicos, $CL_{50} < 1.000$ µg mL^{-1}.

Tabela 3: Toxicidade dos extratos secos de folhas e cascas dos frutos de *P. granatum*.

Extrato seco	Toxicidade CL_{50} (µg mL^{-1})
Folhas	499,743
Cascas dos frutos	478,861

CL_{50}: Valor da concentração do extrato vegetal capaz de matar 50% dos animais expostos. A autora, 2017.

De forma semelhante, Fontenele e colaboradores (1988 *apud* WERKMAN, 2008, p. 108) avaliaram a toxicidade do extrato aquoso das cascas de *P. granatum* frente a *A. salina* e observaram a morte de todas as larvas. Em outro estudo Sundararaju e colaboradores (2010) analisaram extratos aquosos e metanólicos das cascas desta mesma espécie vegetal, os quais proporcionaram a morte de todos os microcrustáceos.

A toxicidade apresentada pelos extratos secos das folhas e cascas dos frutos de *P. granatum* mediante o bioensaio com *A. salina*, corrobora a necessidade de estudo da toxicidade de espécies vegetais utilizadas como medicinais (BEZERRA et al., 2017). Sendo este microcrustáceo um organismo simples e sensível a compostos orgânicos, a alta letalidade para a mesma indica possível toxicidade (LUNA, 2006; BATISTA, 2013). Dessa forma, é notória a toxicidade atribuída aos extratos de *P. granatum*, no entanto é necessária a avaliação mais detalhada do seu potencial toxicológico para o ser humano. É importante ressaltar que esta propriedade pode ser benéfica e desejável caso apresente propriedades citotóxicas frente a células cancerígenas (PEDRIALI et al., 2010; OLIVEIRA et al.,2010; BEKIR et al., 2013; LI et al., 2016).

4 CONCLUSÃO

Em suma, os extratos secos das folhas e das cascas dos frutos de *P. granatum* apresentaram antraquinonas, esteroides, flavonoides e taninos, além de ótima atividade antioxidante para ambos os extratos. No entanto, estes foram caracterizados como tóxicos no modelo de estudo com *Artemia salina*.

Os resultados são promissores, mas para o emprego destes extratos com ótimo potencial antioxidante quer seja na indústria farmacêutica, de cosméticos ou

de alimentos, são necessárias análises mais detalhadas para avaliar sua eficácia e segurança.

Portanto, sugere-se a realização de análises cromatográficas para identificação dos metabólitos especiais e análises toxicológicas, a fim de avaliar a ecotoxicidade, a citotoxicidade e toxicidade *in vivo* dos extratos vegetais em estudo.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, P. M. F. A. de. **Efeitos do extrato da folha de *Punica granatum* L. sobre o crescimento de células planctônicas, na formação de biofilme e sobre biofilmes pré-formados em isolados orais de *Candida albicans* de pacientes com AIDS**. 2016. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Ceuma, São Luís, 2016.

AMRI, Z. et al. Phytochemical content, Fatty acids composition and antioxidant potential of different pomegranate parts: Comparison between edible and non edible varieties grown in Tunisia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 274-280, nov. 2017.

BARROS, Z. M. P. **Cascas de frutas tropicais como fonte de antioxidante para enriquecimento de suco pronto**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BASTOS, T. S. **Efeito antitumoral induzido por apoptose e avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos do extrato aquoso de *Punica granatum* Linn em modelo Murino**. 2014. 152 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2014.

BATISTA, J. A. N. **Potencial antioxidante dos extratos de *Moringa Oleifera* Lamark em sistemas lipídicos de baixa estabilidade oxidativa**. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

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

BEZERRA, J. W. A. et al. Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 437-442, nov. 2017.

BOPITIYA, D.; MADHUJITH, T. Antioxidant potential of Pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Sri Lanka. **Tropical Agricultural Research**, v. 24, n.1, p. 71-81, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de fitoterápicos** d**a Farmacopeia Brasileira**. 1. ed. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

CARMO, M. C. L. do. et al. Influência das técnicas de cultivo na atividade antioxidante de romã. **Multi-Sciense Journal**, v.1, n. 4, p.3-6, 2016.

CRUZ, R. G. **Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo de condições de extração e aplicação em sistema lipídico**. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

DEGÁSPARI, C. H.; DUTRA, A. P. C. Propriedades fitoterápicas da Romã (*Punica granatum* L.). **Visão Acadêmica**, v. 12, n. 1, p. 36-46, 2011.

DUTRA, R. C.; LEITE, M. N.; BARBOSA, N. R. Quantification of Phenolic Constituentes and Antioxidant Activity of *Pterodonemarginatus* Vogel Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 4, p. 606-614, 2008.

FONTENELE, A. F. et al. Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina* Leach. 1988. *apud* WERKMAN, C. et al*.* Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 3, p. 104-111, 2008.

GUL, F.; SHINWARI, Z. K.; AFZAL, I. Screening of Indigenous Knowledge of Herbal Remedies for Skin Diseases Among Local Communities of North west Punjab, Pakistan. **Phoenix Usa**, v. 44, n. 5, p. 1609-1616, 2012.

ISMAIL, T. et al*.* Effect of pomegranate peel supplementation on nutritional, organoleptic and stability properties of cookies. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, n. 6, p. 661-666, 2014.

JARDINI, F. A. **Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da Romã (*Punica granatum* L.) – avaliação *in vivo* e em culturas de células**. 2010. 115 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

JURENKA, J. S. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, v. 13, n. 2, p. 128-144, 2008.

KHARCHOUFI, S. et al. Antimicrobial and antioxidant features for ‘Gabsi’ pomegranate peel extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 345-352, jan. 2018.

LABBÉ, M. et al. Characterization of chemical compositions and bioactive compounds in juices from pomegranates (“Wonderful”; “Chaca” and “Codpa”) at different maturity stages. **Chilean Journal of Agricultural Research,** v. 76, n. 4, p. 479-486, 2016.

LEÃO, L. L. et al. Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 94-100, 2017.

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

LUNA, J. S. **Estudo de Plantas Bioativas**. 2006. 233 f. Tese (Doutorado em Química).Universidade Federal de Pernambuco**,** Recife, 2006.

MARTINS, F. J. et al*.* Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 34-39, aug. 2016.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza. Ed. UFC, 1997.

MERINO, F. J. Z. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii Dusén* frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 1031-1040, 2015.

MESTRY, S. N. et al.Attenuation of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats by *Punica granatum* Linn. leaves extract. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 3, p. 273-280, 2017.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MORAIS, N. R.L. et al*.* Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Cnidoscolus phyllacanthus* (müll. Arg.) Pax & k.hoffm. Oriundo de Apodi – RN. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**,v. 18, n. 1, p. 180-185, 2016.

MORZELLE, M. C. **Efeito neuroprotetor da casca de Romã (*Punica granatum*)**. 2016. 124 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

MOREIRA, G. M. B. **Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Punica Granatum*Linn. sobre bactérias de interesse à mastite bovina**. 2014. 41 f. Tese (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes- Paraná, 2014.

NASCIMENTO, K. O.et al. Determinação da atividade antioxidante da Romã (*Punica granatum*) pelos métodos de DPPH e FRAP.**Higiene Alimentar**, v. 27, n. 218/219, p. 1499-1502, 2013.

OLIVEIRA, L. M. L. de. ***Punica granatum*: quantificação de polifenóis de extratos e potencial antifúngico contra *Candida albicans***. 2016. 43 f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica). Faculdade de Odontologia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, 2016.

OLIVEIRA, L. P. et al*.* Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 201-207, 2010.

PEDRIALI, C. et al*.* Antioxidant activity, cito-and phototoxicity of pomegranate (*Punica granatumL*.) seed pulp extract. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 1017-1021, 2010.

PEREIRA, S. T. **Obtenção e caracterização do extrato seco por *spray drying* de *Punica granatum* para o desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos**. 2015. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

SALGADO, J. M. et al. Increased Antioxidant Content in Juice Enriched with Dried Extract of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 39-43, 2012.

SANTOS, E. H. de B. et al. **Composição físico-química dos frutos da Romã (*Punica granatum* L**.). In: V Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação, 2010. Alagoas.

SANTOS, J. P. **Perfil antioxidante e bioatividade de três espécies de macroalgas da praia do Morro de Pernambuco no litoral Sul da Bahia**, **Brasil**. 2016. 225 f. Tese (Doutorado em Botânica). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SILVA, S. L. da. et al. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (*Apocynaceae*). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.

SILVA, K. D. R. R.; SIRASA, M. S. F. Antioxidant properties of selected fruit cultivars grown in Sri Lanka. **Food Chemistry**, v. 238, p. 203-208, jan. 2018.

SIMÕES, C. M, O. et al. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Artmed, p. 167-175, Porto Alegre, 2017.

SOUZA, W. de. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos de vegetais**. 2013. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.

SUNDARARAJU, D. et al*.* Antioxidant activity and Brine Shrimp Lethality of *Punica granatum* Fruit Rind. **Asian Journal of Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 1628-1630, 2010.

SUZUKI, E. T. **Avaliação fenológica, análise econômica e estudo da cadeia produtiva da Romã (*Punica granatum*)**. São Paulo, 2016. 115 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.

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

VIEIRA, A. C. S. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Punica granatum* L.** (Romã). Alagoas, 2014. 61 f. Tese (Mestrado em Enfermagem) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

WANG, C. et al. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 587-594, 2013.