

**Perfil toxicológico e efeito antioxidante e antiglicante *in vitro* de um extrato glicólico do resíduo do fruto da *Punica granatum***

**Toxicological profile and *in vitro* antioxidant and antiglycolic effect of a glycolic extract of the fruit residue of *Punica granatum***

DOI:10.34117/bjdv8n11-209

Recebimento dos originais: 14/10/2022

Aceitação para publicação: 18/11/2022

**Mariana Conti Parron**

Graduanda em Engenharia Biotecnológica

Instituição: Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitario, Assis - SP, CEP: 19806-900

E-mail: mariana.parron@unesp.br

**Julia Amanda Rodrigues Fracasso**

Mestranda em Ciências

Instituição: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Rod. Mal. Rondon, S/N, Jardim Nova York, Araçatuba - SP,

CEP: 16066-840

E-mail: j.fracasso@unesp.br

**Luísa Taynara Silvério da Costa**

Doutoranda em Ciências

Instituição: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Rod. Mal. Rondon, S/N, Jardim Nova York, Araçatuba - SP,

CEP: 16066-840

E-mail: luisa.silverio@unesp.br

**Debora Barros Barbosa**

PhD. em Reabilitação Oral

Instituição: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Rua José Bonifácio, 1193, Vila Mendonça, Araçatuba - SP, CEP: 16015-050

E-mail: debora.b.barbosa@unesp.br

**Aimée Maria Guiotti**

Ph.D. em Odontologia

Instituição: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Rod. Mal. Rondon, S/N, Jardim Nova York, Araçatuba - SP,

CEP: 16066-840

E-mail: aimee.m.guiotti@unesp.br

**Renata Aparecida de Camargo Bittencourt**

PhD. em Bases Gerais da Cirurgia pela Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Instituição: Universidade Paulista (UNIP)

Endereço: Rua Myrtes Spera, Rua José Conceição, 301, Conj. Hab. Nelson Marcondes, Assis - SP, CEP: 19813-550

E-mail: renata.bittencourt1@docente.unip.br

**Valdecir Faria Ximenes**

Livre Docente em Bioquímica

Instituição: Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Av. Eng. Luís Edmundo Carrijo Coube, 2085, Nucleo Res. Pres. Geisel,  
Bauru - SP, CEP: 17033-360

E-mail: valdecir.ximenes@unesp.br

**Lucinéia dos Santos**

PhD. em Ciências pela Universidade de São Paulo (USP)

Instituição: Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis - SP, CEP: 19806-900

E-mail: lucineia.santos@unesp.br

**RESUMO**

A casca do fruto da romãzeira (*Punica granatum*), a romã, é um resíduo produzido em abundância em território nacional. Sabendo-se que a espécie é rica em compostos fenólicos, metabólitos secundários com relevantes atividades terapêuticas, entre elas a antioxidante e antiglicante, e buscando suprir a demanda de fitocosméticos eficazes e seguros que possam prevenir o envelhecimento da pele; o presente estudo teve como objetivo analisar os aspectos fitoquímicos, antioxidantes e antiglicantes de um extrato produzido a partir da casca da romã, visando o aproveitamento integral do fruto. Para tanto, realizou-se os seguintes estudos *in vitro*: 1) fitoquímicos (dosagem de flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis); 2) citotoxicidade (MTT); 3) farmacológicos - atividade antioxidante (DPPH e lipoperoxidação) e atividade antiglicante no ensaio de albumina sérica bovina (BSA) com glicose e metilglioxal (MGO). O extrato apresentou o seguinte perfil fitoquímico de compostos fenólicos: flavonoides  $1.9 \pm 0.3$  g de equivalente em quercetina para cada 100 g de extrato seco; taninos condensados  $40.36 \pm 9.5$  g de equivalente em proantocianidina para cada 100 g de extrato seco e taninos hidrolisáveis  $20.22 \pm 6.3$  de equivalente em ácido gálico para cada 100 g de extrato seco. Além de que no ensaio de MTT, a Concentração Citolóxica 50% para 24 h foi 899  $\mu\text{g/mL}$ , para 48 h foi de 482  $\mu\text{g/mL}$  e para 72 h foi 426  $\mu\text{g/mL}$ . A atividade farmacológica, apresentou na concentração de 600  $\mu\text{g/mL}$  uma atividade antioxidante para DPPH de 78.3% e uma atividade antiglicante de 62.19% no ensaio de lipoperoxidação; no sistema BSA/Glicose todas as concentrações promoveram 100% de atividade antiglicante e no BSA/MGO a concentração de 600  $\mu\text{g/mL}$  promoveu atividade antiglicante em 40%. O extrato, portanto, se demonstra como um potencial candidato para formulação de um novo fitocosmético que possa ser utilizado na prevenção do envelhecimento da pele.

**Palavras-chave:** envelhecimento, fitocosmético, lipoperoxidação.

**ABSTRACT**

The pomegranate (*Punica granatum*) fruit peel is a residue produced in abundance in the national territory. Knowing that the species is rich in phenolic compounds, secondary metabolites with relevant therapeutic activities, including antioxidant and antiglycant, and seeking to supply the demand for effective and safe phytocosmetics that can prevent skin aging, the present study aimed to analyze the phytochemical, antioxidant and antiglycant aspects of an extract produced from the pomegranate peel, aiming the integral utilization of the fruit. For this, the following *in vitro* studies were carried out: 1) phytochemical (flavonoids, condensed and hydrolyzable tannins); 2) cytotoxicity (MTT); 3) pharmacological - antioxidant activity (DPPH and lipoperoxidation) and antiglycant

activity in the assay of bovine serum albumin (BSA) with glucose and methylglyoxal (MGO). The extract had the following phytochemical profile of phenolic compounds: flavonoids  $1.9 \pm 0.3$  g of quercetin equivalent per 100 g of dry extract; condensed tannins  $40.36 \pm 9.5$  g of proanthocyanidin equivalent per 100 g of dry extract and hydrolyzable tannins  $20.22 \pm 6.3$  of gallic acid equivalent per 100 g of dry extract. Besides that in the MTT assay, the 50% Cytotoxic Concentration for 24 h was 899  $\mu\text{g/mL}$ , for 48 h was 482  $\mu\text{g/mL}$  and for 72 h was 426  $\mu\text{g/mL}$ . The pharmacological activity, presented in the 600  $\mu\text{g/mL}$  concentration an antioxidant activity for DPPH of 78.3% and an antiglycant activity of 62.19% in the lipoperoxidation assay; in the BSA/Glucose system all concentrations promoted 100% of antiglycant activity and in the BSA/MGO the 600  $\mu\text{g/mL}$  concentration promoted 40% of antiglycant activity. The extract, therefore, is shown as a potential candidate for formulation of a new phytocosmetic that can be used in the prevention of skin aging.

**Keywords:** aging, phytocosmetic, lipoperoxidation.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais possuem papel expressivo na formulação de compostos medicamentosos há séculos, em virtude de sua comprovada atividade terapêutica no tratamento de diversos distúrbios patológicos e na promoção da saúde (Lyu et al., 2022). Nessa direção, a ação farmacológica dessas espécies vegetais se dá pela presença de diferentes metabólitos secundários, entre eles, polifenóis, compostos orgânicos caracterizados por suas propriedades antiglicantes e antioxidantes, os quais podem ser aplicados como agentes preventivos e/ou terapêuticos em condições de saúde (Mendonça et al., 2022).

Dentro desse contexto, destaca-se a *Punica granatum L.*, popularmente conhecida como romãzeira, uma espécie rica em polifenóis, pertencente à família Punicaceae e que pode ser cultivada em climas variados (Magangana et al., 2020). O seu fruto, a romã, apresenta três estruturas principais, incluindo a casca, a polpa vermelha comestível e as inúmeras sementes, sendo que cada parte possui diferentes nutrientes e composição fitoquímica. No processo de extração do suco da romã a partir de sua polpa, são produzidos cerca de 60% de resíduos, entre eles destaca-se a sua casca (Faten et al., 2018). A casca da romã é abundante em compostos fenólicos, minerais e carboidratos complexos (Moga et al., 2021; Turrini et al., 2015) e, deste modo, em vista de sua composição, configura-se como um importante candidato para o desenvolvimento de fitocosméticos que combatam o processo de dano celular e envelhecimento da pele (Thilagavathi et al., 2016).

A pele, caracterizada como barreira protetora do corpo, está frequentemente exposta a fatores intrínsecos e extrínsecos, que aceleram seu envelhecimento (Silva-Palacios et al., 2018). Os fatores externos predominantes que contribuem para esse processo estão na exposição à radiação UV, inflamação crônica, doenças autoimunes, entre outros (Bu et al., 2022). Além dos estímulos ambientais, o processo endógeno de glicação, no qual açúcares redutores reagem com proteínas através da reação de Maillard e originam produtos finais da glicação avançada, denominados de AGEs (*Advanced Glycation end Products*), é considerado como um importante fator acelerador do envelhecimento cronológico causando danos à pele e degradação do colágeno, induzindo o estresse oxidativo e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Abbasi et al., 2021; Chilukuri et al., 2018).

Os efeitos biológicos dos polifenóis em reduzir o estresse oxidativo e o acúmulo de ROS têm sido associados à sua capacidade antioxidante, amplamente demonstrada em estudos realizados *in vitro* (Coudriet et al., 2017; Moudache et al., 2016; Das et al., 2016). Esta tem sido relatada através de mecanismos que envolvem a transferência de um átomo de H<sup>+</sup> ou um único elétron para radicais, e os polifenóis se comportam como *scavengers* eficazes de espécies oxidantes, estabilizando-os (Chyau et al., 2015). Além disso, também são capazes de quelar íons metálicos ativos, como Fe<sup>2+</sup> e/ou Cu<sup>2+</sup>, que catalisam reações do tipo Fenton, removendo fator causal para a produção de espécies resultantes do processo de estresse oxidativo e glicante, que agem em sinergismo corroborando com danos a pele (Ayuda-Durán et al., 2019; Qin; Hou, 2016).

Enfim, levando-se em consideração a hipótese de que a presença em abundância de compostos fenólicos em abundância na casca da romã resulta em atividades biológicas relevantes, este estudo, avaliou o extrato glicólico da casca romã quanto as suas propriedades fitoquímica, farmacológica e toxicológica, visando o futuro desenvolvimento de um fitocosmético, que contribua para a redução do envelhecimento da pele.

## 2 MÉTODOS

O resíduo vegetal da casca do fruto da *Punica granatum* já desidratada, triturada e esterilizada, foi entregue em lote único pela Companhia Santos Flora (Santos Flora Com. De Ervas, Mairiporã, SP – Latitude: -23.3184, Longitude: -46.5872 23° 19' 6" Sul, 46° 35' 14" Oeste). O produto possui certificação da agência reguladora, Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), além agências de técnicas farmacêuticas e microbiológicas.

Para o preparo do extrato glicólico do resíduo da casca da romã (EGR) foram seguidas as seguintes etapas: (1) O pó das cascas das romãs foi submetido ao processo de maceração com etanol a 70 °G. Foram adicionados 10 g de cascas em pó com 30 mL de etanol a 70 °G por 24 horas. A seguir, a solução foi filtrada. (2) Ao resíduo sólido foi adicionado novamente o etanol 70 °G e realizado o processo de maceração. Este processo foi repetido por cinco vezes até que não se observou mais a presença de sólidos solúveis no extrato. (3) As cinco frações foram misturadas e concentradas em rotoevaporador a 60 °C, até obtenção do extrato mole, posteriormente liofilizado, pesado e preparado na proporção 30:70 (p/v) em Propilenoglicol PA (Synth, SP, Brasil). Esta solução foi mantida em banho-maria a 40 °C sob agitação, até completa homogeneização (Curti, 2020).

Para melhor compreensão dos compostos fenólicos presentes no EGR foram analisadas as concentrações de flavonoides, taninos condensados e taninos hidrolisados.

O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo método espectrofotométrico baseado na formação de complexos de flavonoides com íons  $Al^{3+}$  (Peršurić et al., 2020). Primeiro, 1 mL de uma amostra foi misturado com 0.3 mL de  $NaNO_2$  (5%, p/v) e 0.5 mL de  $AlCl_3$  (2%, p/v). Uma amostra foi misturada e 6 minutos depois foi neutralizada com 0.5 mL de solução de  $NaOH$  1 mol/L. A mistura foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente e então a absorbância foi medida a 510 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de quercetina (EQ) em g/100 g de extrato seco.

O conteúdo de taninos condensados foi analisado pela metodologia descrita por Martins (2019), por meio de reação colorimétrica com solução de vanilina. Em tubos de ensaios pré-aquecidos a 30 °C por 30 min foram adicionados 1.0 mL dos extratos dissolvidos em álcool etílico PA, 2.5 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 25% em álcool etílico PA (v/v) e 2.5 mL de vanilina 1% em álcool etílico PA (p/v). Os tubos foram agitados em vórtex para homogeneização e aquecidos por 20 minutos a 30 °C em banho-maria, ao abrigo da luz. Em seguida, a leitura em espectrofotômetro foi a 500 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de proantocianidina (EP) em g/100 g de extrato seco.

O conteúdo de taninos hidrolisáveis foi estimado em espectrofotômetro com adaptações realizadas por Garcia et al. (2011). 2 mL das amostras foram misturados com

8 mL da solução reagente contendo sulfato de amônio férrico (FAS), que consiste em 89% de solução 50% (m/v) ureia/tampão acetato 0.1 M pH 4.4, 10% de solução de goma arábica 1% em água destilada e 1% da solução de sulfato de amônio férrico em ácido clorídrico 1M. Após 20 min de reação, a absorbância foi lida em 580 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) em g/100 g de extrato seco.

O ensaio de citotoxicidade do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] foi realizado conforme descrito anteriormente por Mosmann (1983) com modificações (Tsuboy et al., 2010). Para este ensaio, fibroblastos de camundongos de origem dérmica (NIH/3T3, ATCC® CRL-1658™) foram inoculados em placas de microtitulação de 96 poços e incubados em meio de cultura por um período de 24 h a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após uma confluência de aproximadamente 75% (24 h), essas células foram expostas a cinco concentrações diferentes de EGR (100, 200, 400 e 600 µg/mL), ao controle negativo (solução fisiológica) e ao controle positivo, Tween 80 a 2% (v/v). O tempo de tratamento foi de 24, 48 e 72 horas, a fim de analisar a Concentração Citotóxica 50% (CC50%) foi realizado nos três tempos também uma equação da reta para obtenção desses valores.

A atividade antioxidante *in vitro* do EGR foi investigada nas concentrações de 100, 200, 400 e 600 µg/mL. Como controle negativo (CN) o extrato foi substituído pela água, e como o controle positivo (CP) pela quercetina 300 µg/mL.

A primeira análise antioxidante foi realizada pelo método do DPPH (sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Este método foi realizado em triplicata, sendo adicionado em cada tubo uma alíquota de 0.1 mL do extrato, nas diferentes concentrações analisadas e 3.9 mL do radical DPPH (0.06 mM). Cada solução foi homogeneizada em agitador de tubos e permaneceram por 30 minutos no escuro, e em seguida foram analisadas usando um espectrofotômetro UV-Vis em um comprimento de onda de 517 nm.

A segunda análise antioxidante foi a peroxidação lipídica induzida pelo sulfato ferroso. Em cada tubo de ensaio foram adicionados 0.4 mL de solução de FeSO<sub>4</sub> (0.17 M), 0.4 mL do extrato nas diferentes concentrações analisadas e 4 mL do homogenato de gema do ovo 10% (m/v). As reações foram incubadas por 30 minutos a 37 °C. Após o resfriamento, 2 mL das amostras foram centrifugadas com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 15% a 1200 G por 10 minutos. Em seguida, 2 mL do sobrenadante foram misturados com 2 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0.67%) e incubado a 95 °C por 60

minutos. As amostras foram resfriadas em banho de gelo. Para fins quantitativos, as absorvâncias foram medidas usando espectrofotômetro a 532 nm. Este método foi realizado em triplicata.

Para a determinação da atividade antiglicante *in vitro* inicialmente foi realizado o teste BSA/GLICOSE. Em tubos de ensaio foram pipetados 0.5 mL das diferentes diluições dos extratos em água (100, 200, 400 e 600 ug/mL), 2 mL de solução contendo 20 mg/mL de BSA, 500 mM de glicose, 0.02% (p/v) de azida de sódio em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4). Após incubação a 37 °C durante três semanas, a quantidade formada de AGEs fluorescentes foi determinada utilizando um espectrômetro de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 330 nm e comprimento de onda de emissão de 410 nm. A porcentagem de inibição de formação de AGEs foi calculada utilizando a seguinte equação:

Equação 1.

$$\% \text{ Inibição} = [1 - (\text{FI amostra} - \text{FI branco}) / (\text{FI controle} - \text{FI controle branco})] \times 100$$

Sendo que:

FI amostra - FI branco: será a diferença entre a intensidade de fluorescência de uma amostra incubada com glicose e outra sem a adição de glicose.

FI controle - FI controle branco: será a diferença entre a intensidade de fluorescência do controle de água destilada com a glicose e o controle sem glicose.

Posteriormente, foi avaliado o sistema BSA/MGO, cuja glicação de proteínas é mediada por MGO (Metilglioxal, agente glicante intracelular). Foram adicionados 0.5 mL das soluções dos extratos em água (100, 200, 400 e 600 ug/mL) e 2 mL de solução contendo 20 mg/mL de BSA, 1 M MGO e 0.02% (p/v) de azida de sódio em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4). Então, as amostras foram incubadas a 37 °C durante uma semana. A formação de AGEs fluorescentes total foi determinada pela porcentagem de inibição da formação de AGEs para cada diluição do extrato, conforme descrito acima.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a composição polifenólica encontrada para o extrato glicólico da casca romã:

Tabela 1. Média  $\pm$  DP de flavonoides, taninos condensados e taninos hidrolisados presentes no extrato do resíduo da casca da romã (EGR). Resultados expressos em gramas equivalentes do padrão para 100 gramas do extrato seco.

Flavonoides	1.90 $\pm$ 0.3 EQ g/100 g
Taninos Condensados	40.36 $\pm$ 9.5 EP g/100 g
Taninos Hidrolisáveis	20.22 $\pm$ 6.3 EAG g/100 g

EQ - equivalente de quercetina em g/100 g de extrato seco; EP - equivalente de proantocianidina em g/100 g de extrato seco; EAG - equivalente de ácido gálico em g/100 g de extrato seco.

El Beltagi et al. (2022), estudando o extrato aquoso da casca da romã, encontraram uma concentração de flavonoides de 0.04 EQ g/100g. As análises qualitativas de taninos condensados e hidrolisáveis na casca da romã efetuadas por Da Silva et al. (2021) mostraram resultados positivos, sinalizando a presença de ambos os metabólitos. Estudos da casca da romã em metodologias de extração com soxhlet e percolação expressaram, respectivamente, 6.2 mg/g e 4.2 mg/g de ácido elágico, uma subclasse de taninos hidrolisáveis. Analisando a concentração de taninos totais no extrato aquoso da farinha da casca da romã, Campos et al. (2016) encontraram um valor médio de 0,810 mg de equivalentes ácido tânico (EAT) em 100g de amostra integral.

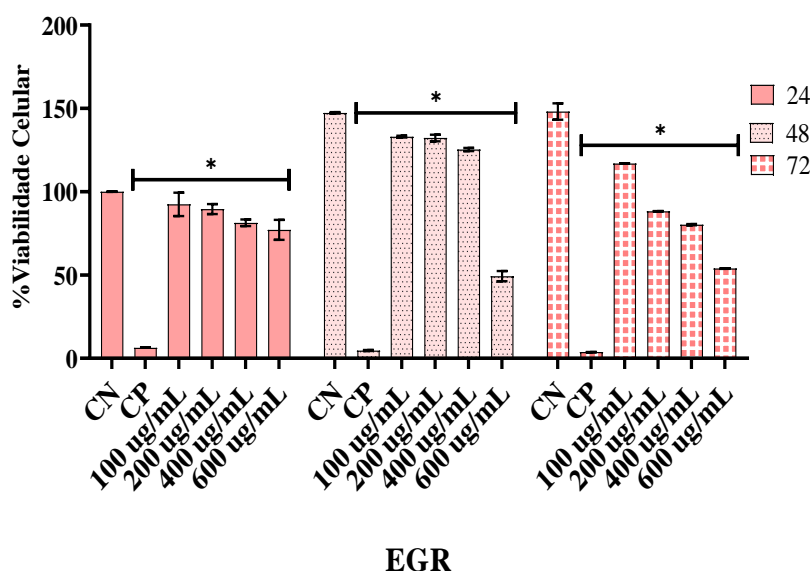
Observa-se, por meio de uma análise comparativa dos dados obtidos na literatura com os resultados deste estudo, que os compostos fenólicos realmente estão presentes na casca da romã, e que o método de extração glicólica foi mais eficaz, resultando em maiores valores de compostos fenólicos, tanto de flavonoides, como de taninos. Ainda, considerando que os compostos fenólicos apresentam atividade antienvhecimento, principalmente devido às suas características redox, que lhes permitem servir como agentes redutores, inibidores de oxigênio, doadores de hidrogênio e quelantes de metais (Lotito et al., 2006) o uso do EGR pode configurar como uma opção importante para o desenvolvimento de um fitocosmético.

Para a análise da citotoxicidade do EGR foi utilizada a metodologia do MTT. Neste teste é avaliada a viabilidade mitocondrial das células metabolicamente ativas. Isto porque, pela ação de enzimas mitocondriais o MTT é biotransformado, formando cristais de formazan. Uma redução menor que 70% da viabilidade celular neste teste configura-se como um efeito citotóxico (Pegorin-Brasil et al., 2022).



Por meio da Figura 1 é possível constatar que no tempo de 24 horas todas as concentrações do EGR diferiram de forma significativa ( $p < 0.05$ ) do controle negativo (solução fisiológica), porém neste tempo de análise nenhuma concentração foi considerada como citotóxica. Nos tempos de 48 e 72 horas todas as concentrações do EGR diferiram de forma significativa ( $p < 0.05$ ) do controle negativo, mas somente a concentração de 600  $\mu\text{g/mL}$  promoveu uma redução da viabilidade celular menor que 50%, sendo considerada citotóxica nos dois tempos analisados. A Concentração Citotóxica 50% para 24 h foi 899  $\mu\text{g/mL}$ , para 48 h foi de 482  $\mu\text{g/mL}$  e para 72 h foi 426  $\mu\text{g/mL}$ .

Figura 1. Média  $\pm$  DP dos valores em % referente a taxa de viabilidade celular em fibroblastos NIH 3T3 nos diferentes tempos de avaliação (24, 48 e 72 h) após a realização dos seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Tween 80 a 2% - controle positivo (CP); Extrato glicólico do resíduo da casca da romã (EGR) concentrações de 100, 200, 400 e 600  $\mu\text{g/mL}$ . O asterisco (\*) significa  $p < 0.05$  diferença significativa em relação ao grupo CN.



Celiksoy et al. (2020) realizou tratamento nos fibroblastos humanos com extrato aquoso da casca da romã e, estes reduziram a viabilidade dessas células nos tempos de 24, 48 e 72 h, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  sendo inferior a 50%, ao contrário do presente estudo, que na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  nos três tempos avaliados, demonstrou aumento da viabilidade celular em 100% ( $p < 0.05$ ). Além disso, é possível encontrar na literatura a ação dos extratos aquosos, metanólicos e hidroalcoólicos da casca da romã, como potente citotóxico a linhagens tumorais (Jalali et al., 2021; Seidi; Jahanban-Esfahlan; Abas et al., 2016; Ferreira et al., 2017; Oliveira et al., 2010).

Nesse contexto, novamente é possível constatar que o extrato glicólico da casca da romã apresentou menor citotoxicidade que os extratos aquoso, metanólico e hidroalcoólico. Mas, para garantir a segurança de seu uso em um fitocosmético, e impedir que os níveis de citotoxicidade sejam atingidos, será de extrema importância a realização de uma nova análise após a sua inclusão em uma formulação cosmética.

Na análise da capacidade antioxidante *in vitro* do EGR, o primeiro teste realizado foi o DPPH (Figura 2A). O controle negativo apresentou 0.00% de atividade antioxidante (AA), o controle positivo 95.5% e o EGR na concentração de 600  $\mu\text{g/mL}$  78.3%, evidenciando significativa atividade antioxidante ( $p < 0.05$ ). A concentração inibitória de 50% do radical livre DPPH (IC50) para o EGR foi de 45  $\mu\text{g/mL}$ .

Para o extrato hidroalcoólico da casca da romã, Moreira et al. (2014) relatou uma IC50 de 378.80  $\mu\text{g/mL}$ . Já, para o extrato aquoso da farinha da casca da romã, Campos et al. (2016) relataram uma IC50 de 510  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados antioxidantes obtidos neste estudo com o extrato glicólico da romã foram superiores aos obtidos com os extratos alcoólicos e aquosos, relatados na literatura.

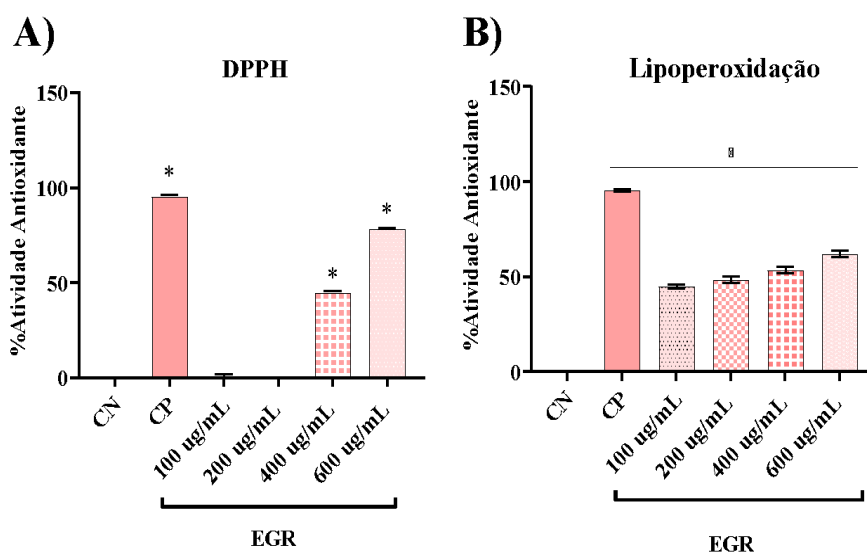
Em complemento, a atividade antioxidante do EGR foi analisada pelo método da lipoperoxidação lipídica (Figura 2B). Os resultados mostram que o controle positivo inibiu 95.60% da lipoperoxidação, já o EGR na concentração de 600  $\mu\text{g/mL}$  promoveu uma inibição de 62.19%. A partir dos dados obtidos a concentração inibitória da lipoperoxidação (IC50) para o EGR foi de 27  $\mu\text{g/mL}$ .

Não foi possível encontrar na literatura estudos semelhantes *in vitro* que avaliaram a capacidade de inibição da lipoperoxidação pelo extrato da casca da romã. Todavia, a capacidade de inibição da lipoperoxidação apresentada pela romã pode ser também observada em estudos *in vivo*. Chidambara et al. (2002) trataram previamente ratos com o extrato metanólico da casca da romã (50 mg/kg) antes da administração em dose única de tetracloreto de carbono (2.0 g/kg de peso corporal) e constataram a preservação das concentrações séricas de catalase, peroxidase e superóxido dismutase, e a inibição da peroxidação lipídica em 54%. Ademais, testes antioxidantes *in vivo* com a folha da romã foram realizados por Dassprakash; Arun; Abraham; Premkumar (2012). Este estudo demonstrou o poder de inibição da lipoperoxidação equivalentes a 10.25%, 59.88% e 20.05% nas concentrações de 400, 600 e 800 mg/kg, respectivamente.

A importância desses resultados é evidenciarmos ao se considerar que a peroxidação lipídica (LPO) nas células resulta na degradação da bicamada lipídica que

compõe as membranas celulares (Agmon, 2017; Gaschler; Stockwell, 2017). Além disso, um produto em especial produzido pela LPO é o malondialdeído (MDA), estes podem promover ainda mais mutagênese ou oxidação de proteínas, perturbando a homeostase celular, o que corrobora com suas implicações na saúde humana foram extensivamente revisadas (Suresh; Annam, 2013; Halliwell, 2000; Bow; Logan, 2010; Ramana; Srivastava; Singhal, 2017; Barrera; 2012; Celi, 2010). O ferro utilizado nesta metodologia estimula a peroxidação lipídica, pois pode gerar uma reação de transferência de elétrons e conseqüentemente aumentando da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Assim, a sobrecarga de ferro em um organismo vivo resulta na implicação de diferentes doenças como, doenças de pele, câncer, doenças hepáticas, cardíacas, cerebrais e neurodegenerativas (Milman et al., 2001; Sabir; Abbas; Shahida, et al., 2020). Os peróxidos lipídicos são marcadores alarmantes de danos teciduais, especialmente, a pele (Sabir; Abbas; Shahida, et al., 2020).

Figura 2. Média  $\pm$  DP dos valores em % da atividade antioxidante através do (A) DPPH e (B) Lipoperoxidação após os seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Quercetina 300  $\mu$ g/mL - controle positivo (CP); Extrato glicólico do resíduo da casca da romã (EGR) nas concentrações de 100, 200, 400 e 600  $\mu$ g/mL. O asterisco (\*) significa  $p < 0.05$  diferença significativa em relação ao grupo CN.



O conhecimento científico sobre os AGEs gerados nos processos de glicação mostra que esses são capazes de aumentar o estresse oxidativo, e o concomitantemente aumento de radicais livres leva a um aumento da atividade de glicação de açúcares em diferentes moléculas biológicas. Portanto, as atividades antioxidante e antiglicante estão

correlacionadas, visto que a glicação e oxidação de proteínas interagem sinergicamente (Dil; Ranjkesh; Goodarzi, 2019; Neha; Haider; Pathak, 2019).

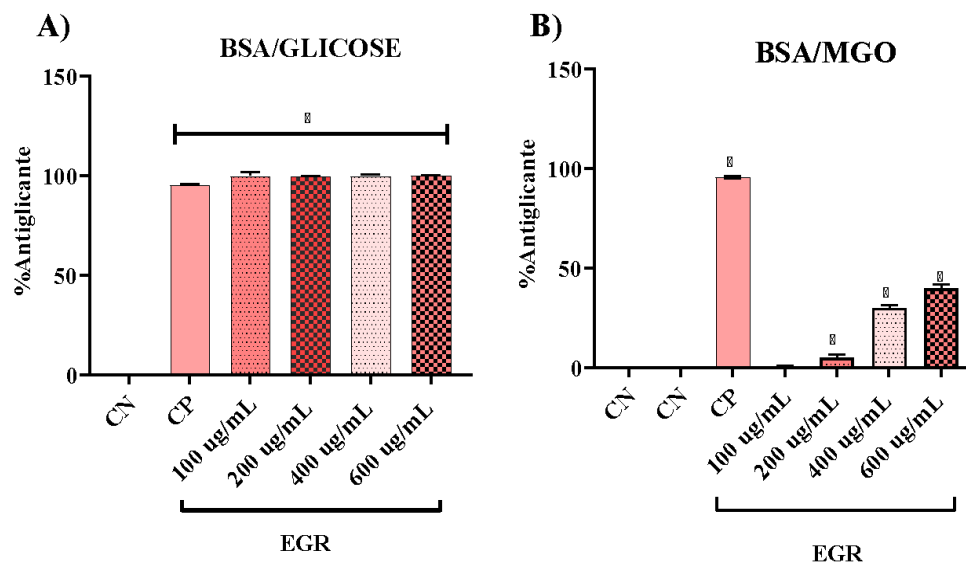
A fim de compreender esta interação, foi realizada a análise da atividade antiglicante do EGR, conforme resultados apresentados na Figura 3A. No sistema BSA/GLICOSE, todas as concentrações, de 100 a 600  $\mu\text{g/mL}$ , promoveram 100% de atividade antiglicante, enquanto o controle positivo promoveu 95% de inibição da glicação, diferindo de forma significativa do controle negativo ( $p < 0.05$ ).

O MGO é um composto carbonílico reativo e sua inibição pode ser uma estratégia eficaz para a prevenção de doenças relacionadas à idade, doenças crônicas e de pele (Mesias et al., 2013). Para BSA/MGO (Figura 3B), as concentrações de 100 a 200  $\mu\text{g/mL}$  do EGR não apresentaram atividade antiglicante, não tendo diferença significativa do controle negativo. A concentração de 600  $\mu\text{g/mL}$  promoveu uma inibição da glicação em 40%, diferindo de forma significativa do controle negativo ( $p < 0.05$ ). Neste teste, a partir dos dados obtidos a concentração inibitória da glicação (IC50) para o EGR foi de 660  $\mu\text{g/mL}$ .

O efeito inibidor dos extratos vegetais agindo como inibidores naturais dos eventos da glicação está amplamente ilustrado na literatura. Porém, nenhum relato foi observado com o extrato da casca da romã ou de outras partes desse fruto. Dos Santos et al., (2022) relataram que o extrato vegetal da *Passiflora* inibiu a formação de AGEs, apresentando um IC50 de 366  $\mu\text{g/mL}$  para o modelo BSA/GLICOSE e 360  $\mu\text{g/mL}$  para BSA/MGO. Mohd Dom et al., (2020), descreveram que o maior percentual de inibição da glicação, para o modelo BSA/GLICOSE, foi encontrado com o tratamento de *Ficus deltoidea* - 83,7% na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Os resultados obtidos neste estudo, em comparação aos obtidos com outras plantas mostra que para o modelo BSA/GLICOSE o EGR apresenta uma capacidade antiglicante muito superior. Inclusive, mesmo na menor concentração analisada, de 100  $\mu\text{g/mL}$ , o EGR apresentou uma capacidade antiglicante superior ao do controle positivo, a quercetina.

Figura 3. Média  $\pm$  DP dos valores em % da atividade antiglicante através do (A) BSA/GLICOSE e (B) BSA/MGO após os seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Quercetina 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  - controle positivo (CP); Extrato glicólico do resíduo da casca da romã (EGR) nas concentrações de 100, 200, 400 e 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O asterisco (\*) significa  $p < 0.05$  diferença significativa em relação ao grupo CN.



#### 4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato glicólico da casca da romã apresenta uma composição polifenólica relevante, com expressivas concentrações de flavonoides, taninos condensados e hidrolisados. Provavelmente esses metabólitos estão respondendo pela atividade antioxidante do EGR comprovada nos métodos do DPPH e da inibição da lipoperoxidação. Assim, como pela potente atividade antiglicante do EGR constatada no teste do BSA/GLICOSE. O EGR apresentou uma viabilidade celular preservada nas concentrações de 100, 200 e 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nos tempos de 24, 48 e 72 h de análise. Assim, estes dados sinalizam o EGR como um extrato em potencial a ser utilizado no desenvolvimento futuro de um novo fitocosmético que possa ser empregado na prevenção ao envelhecimento da pele.

**REFERÊNCIAS**

- Abbasi, BH, Khan T; Khurshid R, Nadeem, M, Drouet S, Hano C. UV-C mediated accumulation of pharmacologically significant phytochemicals under light regimes in in vitro culture of *Fagonia indica* (L.). **Scientific Reports**, v. 11, 2021. doi: 10.1038/s41598-020-79896-6.
- Agmon E, Stockwell BR. Homeostase lipídica e morte celular regulada. *atual Opinião. Química Biol.* n.39, p.83-89, 2017. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.06.002
- Amrani A, Lahneche AM, Benaissa O, Boubekri N, Demirtaş I, Benayache F, Zama D. *In vitro* Antiproliferative and inhibition of oxidative DNA damage activities of n-butanol extract of *Limonium bonduelli* from Algeria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2019, v. 62, 2019. doi.org/10.1590/1678-4324-2019170779.
- Barrera G. Estresse Oxidativo e Produtos de Peroxidação Lipídica na Progressão e Terapia do Câncer. **ISRN Oncol.**, p.1–21, 2012. doi.org/10.5402/2012/137289.
- Bowe WP, Logan AC. Implicações clínicas da peroxidação lipídica na acne vulgar: Vinho velho em garrafas novas. **Lipídios Saúde Dis.**, v.9, n.141, 2010. doi: 10.1186/1476-511X-9-141.
- Bu J, Lin Y, Qing LQ, Hu G, Jiang P, Hu HF, Shen EX. Prediction of skin disease using a new cytological taxonomy based on cytology and pathology with deep residual learning method. **Sci Rep.**, 2;11(1):13764, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-92848-y.
- Campos RP, Silva MJF, Silva, CF, Fragoso MR, Candido, CJ. Elaboração e Caracterização de Farinha da Casca de Pequi. *Agroecologia*, v. 1, n. 2, 2016.
- Celi P. O papel do estresse oxidativo na saúde e produção de pequenos ruminantes. **Rev. Brás. Zootec.**, v.39, p.348-363, 2010. doi: 10.1590/S1516-35982010001300038.
- Celiksoy V, Moses RL, Sloan AJ, Moseley R, Heard CM. Evaluation of the *In Vitro* Oral Wound Healing Effects of Pomegranate (*Punica granatum*) Rind Extract and Punicalagin, in Combination with Zn (II). **Biomolecules**, v.25, n.10, p.1234, 2020. doi: 10.3390/biom10091234.
- Chidambara MKN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. **J Agric Food Chem.**, v.14 n.17, p.4791-5, 2022. doi: 10.1021/jf0255735. PMID: 12166961.
- Chilukuri H, Kulkarni MJ, Fernandes M. Revisiting amino acids and peptides as anti-glycation agents. **Medchemcomm.**, v.12, n.9, p.614-624, 2018. doi: 10.1039/c7md00514h.
- Chyau CC, Chu CC, Chen SY, Duh PD. Djulis (*Chenopodiun formosaneum*) e seus compostos bioativos protegem contra o estresse oxidativo em células humanas HepG2. **J. Função. Alimentos.**, n.18, p.159-170, 2015. doi: 10.1016/j.jff.2015.06.025.

Coudriet GM, Delmastro-Greenwood MM, Previte DM, Marré ML, O'Connor EC, Novak EA, Vincent G, Mollen KP, Lee S, Dong HH, et al. Treatment with a Catalytic Superoxide Dismutase (SOD) Mimetic Improves Liver Steatosis, Insulin Sensitivity, and Inflammation in Obesity-Induced Type 2 Diabetes. **Antioxidants**. n.6, p.85, 2017. doi: 10.3390/antiox6040085

Cruz-Valenzuela MR, Ayala-Soto RE, Ayala-Zavala JF, Espinoza-Silva BA, González-Aguilar GA, Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R, Nazzaro F, Fratianni F, Tapia-Rodríguez MR, Bernal-Mercado AT. Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extracts as Antimicrobial and Antioxidant Additives Used in Alfalfa Sprouts. **Foods**., v.6 n.11, p.2588, 2022. doi: 10.3390/foods11172588. PMID: 36076774; PMCID: PMC9455905.

Da Silva SF, Dias Ferreira-Romanichen, FM, Antonelli-Ushirobira TM. Antimicrobial activity *in vitro* of *Punica granatum* on gram-negative and gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Development**, v.7., n.11, pp.104581–104591, 2021. doi: 10.34117/bjdv7n11-196

Das AK, Rajkumar V., Nanda PK, Chauhan P., Pradhan SR, Biswas S. Eficácia antioxidante de Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Extrato de pericarpo em nuggets de carne de ovelha. **Antioxidantes**., v. 5, n.16, 2016. doi: 10.3390/antiox5020016.

Dassprakash MV, Arun R, Abraham SK, Premkumar K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. **Pharm Biol.**, v.50, n.12, p.1523-30, 2012. doi: 10.3109/13880209.2012.689771.

Dil FA, Ranjkesh Z, Goodarzi MT. Uma revisão sistemática de plantas medicinais antiglicação. **Diabetes Metab Syndr.**, n.13, p.1225-1229, 2019.

Dos Santos FAR, Xavier JA, da Silva FC, Merlin JPJ, Goulart MOF, Rupasinghe HPV. Antidiabetic, Antiglycation, and Antioxidant Activities of Ethanolic Seed Extract of *Passiflora edulis* and Piceatannol In Vitro. **Molecules**., v.24, n.13, p.4064, 2022. doi: 10.3390/molecules27134064.

El-Beltagi HS, Eshak NS, Mohamed HI, Bendary ESA, Danial AW. Physical Characteristics, Mineral Content, and Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* or *Citrus sinensis* Peel Extracts and Their Applications to Improve Cake Quality. **Plants (Basel)**., v.30, n.13, p.1740, 2022. doi: 10.3390/plants11131740.

Ferreira JB, Martins BHB, Tominaga WM, Lisboa EMJ, Albiero LR, Rosa AC, Sugui MM. Activity assessment antimutagenic / mutagenic *Pomegranate* (*punica granatum* l.) Through the *in vivo* test micronucleus. **Scientific Electronic Archives**, v.10 n.3, p.76–82, 2017. doi: 10.36560/1032017325

García, A. et al. Mobile phone platform as portable chemical analyzer. *Sensors and Actuators B*, v. 156, n. 1, p. 350-359, 2011. KHODAIE, L; BAMDAD, S.; DELAZAR, A.; NAZEMIYEH, H. Teores de antioxidantes, fenóis totais e flavonóides de dois pediculares L. Espécies do leste do azerbaijão, Irã. *BioImpacts: BI*, v.2, n.1, p.43–57, 2012.

Gaschler MM, Stockwell BR. Peroxidação lipídica na morte celular. **Bioquímica. Biophys. Res. Comum.**, n.482, p.419-425, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.

Halliwell B. Peroxidação lipídica, antioxidantes e doenças cardiovasculares: Como devemos avançar?. **Cardiovasc. Res.**, n.47, p.410-418, 2000. doi: 10.1016/S0008-6363(00)00097-3.

Jalali A, Kiafar M, Seddigh M, Zarshenas MM. *Punica granatum* as a Source of Natural Antioxidant and Antimicrobial Agent: A Comprehensive Review on Related Investigations. **Curr Drug Discov Technol.**, v.18, n.2, p.207-224, 2021. doi: 10.2174/1570163817666200430001822.

Jardini FA et al. Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da romã (*Punica granatum, L.*) sobre células da linhagem Caco-2. **Food Science and Technology**, v. 27, suppl 1, pp. 80-83, 2007. doi:10.1590/S0101-20612007000500014.

Jung E, Park SB, Jung WK, Kim HR, Kim J. Antiglycation Activity of Aucubin *In Vitro* and in Exogenous Methylglyoxal Injected Rats. **Molecules**, v.10, s.24, n.20, p.3653, 2019. doi: 10.3390/molecules24203653. PMID: 31658696; PMCID: PMC6832881.

Lotito S., Frei B. Consumo de alimentos ricos em flavonóides e aumento da capacidade antioxidante do plasma em humanos: causa, consequência ou epifenômeno?. **Biologia e Medicina dos Radicais Livres**, v.4, n.12, p.1727-1746, 2006. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033.

Lyu JL, Liu YJ, Wen KC, Chiu CY, Lin YH, Chiang HM. Protective Effect of Djulis (*Chenopodium formosanum*) Extract against UV- and AGEs-Induced Skin Aging via Alleviating Oxidative Stress and Collagen Degradation. **Molecules**, v.4, s.27, n.7, p.2332, 2022. doi: 10.3390/molecules27072332.

Magangana TP, Makunga NP, Fawole OA, Opara UL. Processing Factors Affecting the Phytochemical and Nutritional Properties of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel Waste: A Review. **Molecules**, v.14, s.25, n.20, p.4690, 2020. doi: 10.3390/molecules25204690.

Martins, R. O. **Desenvolvimento de uma nova metodologia MISPE para extração de taninos**. 2019. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

Mendonça JDS, Guimarães RCA, Zorgetto-Pinheiro VA, Fernandes CDP, Marcelino G, Bogo D, Freitas KC, Hiane PA, de Pádua Melo ES, Vilela MLB, Nascimento VAD. Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. **Molecules**, v.27 n.11, p.3563, 2022. doi: 10.3390/molecules27113563.

Mesias M., Navarro M., Gokmen V., Morales FJ Efeito antiglicativo de extratos de sementes de frutas e vegetais: Inibição da formação de AGEs e habilidades de captura de carbonil. **J. Sci. Alimentos Agrícolas**, v.9, p.2037-2044, 2013. doi: 10.1002/jsfa.6012.



Milman N, Pedersen P, Steig T, Byg KE, Graudal N, Fenger K. Hemocromatose hereditária clinicamente evidente na Dinamarca 1948–1985: Epidemiologia, fatores de significância para a sobrevivência a longo prazo e causas de morte em 179 pacientes. **Ana Hematol.**, v.80, p.737–44, 2001.

Moga M. A., Dimienescu O. G., Bălan A., et al. Pharmacological and therapeutic properties of *Punica granatum* phytochemicals: possible roles in breast cancer. **Molecules**, v.26, n.4, p.1054, 2021. doi: 10.3390/molecules26041054.

Mohd Dom NS, Yahaya N, Adam Z, Nik Abd Rahman NMA, Hamid M. Antglycation and Antioxidant Properties of *Ficus deltoidea* Varieties. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v,7, p.6374632, 2020. doi: 10.1155/2020/6374632.

Moreira GMB, Matsumoto LS, Silva RMG, Domingues SPF, Mello-Peixoto ECT. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 626-632, 2014. doi.org/10.1590/S0100-736X2014000700003.

Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Perspectivas medicinais de antioxidantes: Uma revisão. **Eur J Med Chem.**, v..178, p.687-704, 2019.

Oliveira LP, Pinheiro RC, Vieira MS, Paula JR, Bara MRF, Marize MCV, Ligianne P. et al. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, pp. 201-207, 2010. doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200011

Oliveira, LML. ***Punica granatum*: quantification of extract of polyphenols and potential antifungal against candida albicans.** Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2016.

Nam TG. Lipid peroxidation and its toxicological implications. **Toxicol Res.**, v.27, n.1, p.1-6, 2011. doi: 10.5487/TR.2011.27.1.001.

Peršurić Ž, Saftić Martinović L, Malenica M, Gobin I, Pedisić S, Dragović-Uzelac V, Kraljević Pavelić S. Assessment of the Biological Activity and Phenolic Composition of Ethanol Extracts of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels. **Molecules.**, v.14, s.25, n.24, p.5916, 2020. doi: 10.3390/molecules25245916.

Qin S, Hou DX. Regulações múltiplas do sistema Keap1/Nrf2 por fitoquímicos dietéticos. **Mol. Nutr. Alimentos Res.**, n. 60, p.1731-1755, 2016. doi: 10.1002/mnfr.201501017.

Ramana KV, Srivastava S., Singhal SS Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2016. **Oxid. Med. Célula. Longev.**, n.2017, p.1–2, 2017. doi: 10.1155/2017/2163285.

Sabir SM, Abbas SR, Shahida S. et al. Antioxidante *in-vitro*, atividades peroxidativas antilípídicas e estudo *in-silico* de compostos bioativos de *Terminalia chebula*. **Clin Phytosci**, n.6, p.83, 2020. doi: 10.1186/s40816-020-00233-5

Santos-Buelga C, González-Paramás AM, Oludemi T, Ayuda-Durán B, González-Manzano S. Plant phenolics as functional food ingredients. **Adv Food Nutr Res.**,n.90, p.183-257, 2019. doi: 10.1016/bs.afnr.2019.02.012.

Seidi, K., Jahanban-Esfahlan, R., Abasi, M. Propriedades antitumorais do extrato de sementes de *Punica granatum* (romã) em diferentes células cancerosas humanas. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.17, v.3, p. 1119-1122, 2016.

Silva-Palacios A., Ostolga-Chavarría M., Zazueta C., Königsberg M. Nrf2: regulação molecular e epigenética durante o envelhecimento. **Envelhecimento Res. Rev.**, n.47, p.31-40, 2018. doi: 10.1016/j.arr.2018.06.003.

Suresh DR, Annam V. Peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total na saúde e na doença - Fisiopatologia e marcadores: Uma visão geral. **Int. J. Med. Sci. Cura Pública.**, v.2, n.478, 2013.

Thilagavathi T, Renuka R, Priya RS. Bio-synthesis of silver nanoparticles using *Punica granatum* (pomegranate) peel extract: A novel approach toward waste utilization. **Int. J. Adv. Sci. Eng**, v.3, n.1, p.234–236, 2016.

Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C. Potential effects of pomegranate polyphenols in cancer prevention and therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**,p.1-15, 2015. doi: 10.1155/2015/938475.938475

Y.G. Faten; F. Abdelsalam; El-Zalaki, E.S. and Moharam Characterization of Wastes from Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice and Its Use as a Functional Drink. **Egypt. J. Food Sci.** 46, 91-100, 2018.

Xu W, Deng Z, Guo H, Ling P. A rapid and sensitive determination of aucubin in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic application. **Biomédical Chromatography**, v.26, n. 9, p.1066-1070, 2012. doi: 10.1002/bmc.1748.