

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DA ROMÃ: PUNICA GRANATUM L

ANTIOXIDANT CAPACITY OF AQUEOUS AND ETHANOLIC EXTRACTS OF
POMEGRANATE: PUNICA GRANATUM L

Ciências da Saúde • 27/11/2024

REGISTRO DOI: [10.5281/zenodo.14231568](https://doi.org/10.5281/zenodo.14231568)

Francisco José Mininel¹

Silvana Márcia Ximenes Mininel²

RESUMO

Punica granatum L. é conhecida popularmente no Brasil como romã. É um arbusto lenhoso pertencente à família Punicaceae. A espécie vegetal apresenta em sua composição fitoquímica compostos fenólicos tais como, taninos, flavonoides, antocianinas, compostos antraquinônicos, açúcares, vitaminas do complexo B (B1, B2, B3, B5 e B6) e alcaloides. A Romã possui como propriedades farmacológicas, ação anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica, antineoplásica. Dentre os medicamentos e produtos fitoterápicos a base de romã podem ser desenvolvidas cápsulas e sachês de sais efervescentes, pomadas e anestésicos locais, bem como sprays. O objetivo desse trabalho consiste em verificar a capacidade antioxidante de *Punica granatum* L. em reduzir o radical livre DPPH em extratos aquoso e etanólico. A metodologia utilizada caracteriza-se em adicionar 1,5 mL da solução etanólica de DPPH, uma alíquota de 0,5 mL das soluções contendo as diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico. Por fim foram feitas leituras da absorbância, realizada em espectrofotômetro a 517 nm, após 5, 10, 20 e 30 minutos do início da reação. Observou-se que, o extrato aquoso apresentou maior capacidade de reagir com o radical DPPH, conseqüentemente tem o maior potencial antioxidante, pois se obteve um EC50 menor (306) que o extrato etanólico (1340).

Palavras-chave: *Punica granatum* L. Antioxidante. DPPH.

ABSTRACT

Punica granatum L. is popularly known in Brazil as pomegranate. It is a woody shrub belonging to the Punicaceae family. The plant species presents in its phytochemical composition phenolic compounds such as tannins, flavonoids, anthocyanins, anthraquinone compounds, sugars, B complex vitamins (B1, B2, B3, B5 and B6) and alkaloids. Pomegranate has anti-inflammatory,

antioxidant, antifungal and antineoplastic pharmacological properties. Among the medicines and phytotherapeutic products based on pomegranate, capsules and sachets of effervescent salts, ointments and local anesthetics, as well as sprays can be developed. The objective of this study is to verify the antioxidant capacity of *Punica granatum* L. in reducing the free radical DPPH in aqueous and ethanolic extracts. The methodology used is characterized by adding 1.5 mL of the ethanolic solution of DPPH, an aliquot of 0.5 mL of the solutions containing the different concentrations of the aqueous and ethanolic extracts. Finally, absorbance readings were taken in a spectrophotometer at 517 nm, after 5, 10, 20 and 30 minutes from the start of the reaction. It was observed that the aqueous extract presented a greater capacity to react with the DPPH radical, consequently having the greatest antioxidant potential, since a lower EC50 (306) was obtained than the ethanolic extract (1340).

Keywords: *Punica granatum* L. Antioxidant. DPPH.

1 INTRODUÇÃO

Punica granatum L., conhecida também como Romãzeira, é um arbusto ramoso de até 3 m de altura, com folhas simples, cartáceas, dispostas em grupo de 2 a 3, de 4-8 cm de comprimento. Flores solitárias, constituídas de corola vermelho-alaranjada e um cálice esverdeado, duro e coriáceo. Frutos do tipo baga, globoides, medindo até 12 cm, com numerosas sementes envolvidas por um arilo róseo, cheio de um líquido adocicado, comestível (Figura 1). É, muito provavelmente, originária da Ásia e espalhada em toda a região do Mediterrâneo, sendo cultivada em quase todo o mundo, inclusive no Brasil.

Figura 1. Aspecto dos frutos de *Punica granatum* L.



(Fonte: <https://www.fortheloveofnature.in/products/punica-granatum-bhagwasinduro-pomogranate-not-applicable>).

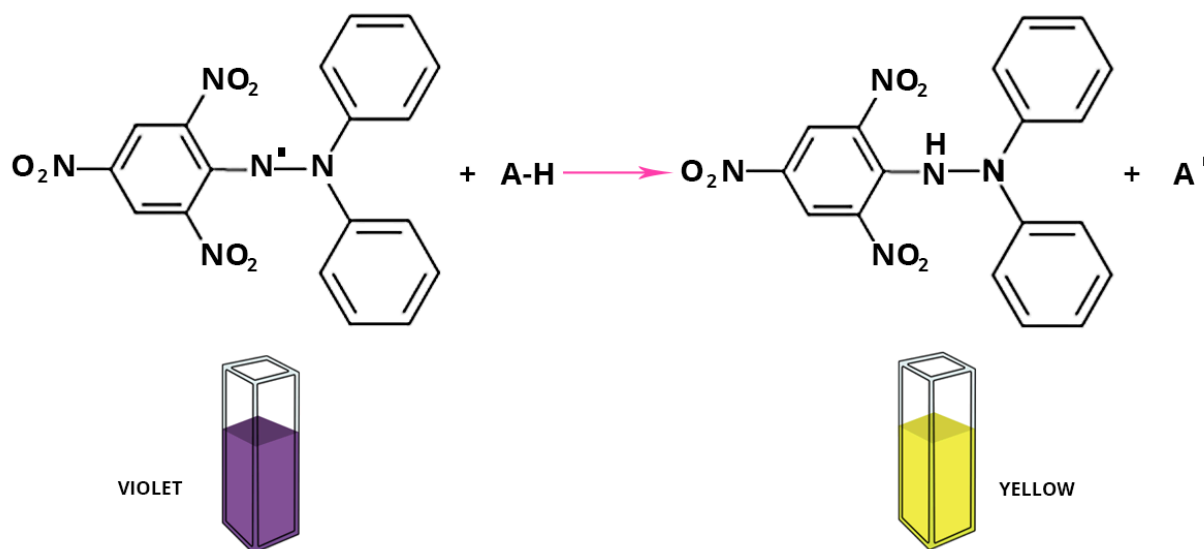
As potencialidades medicinais de *Punica granatum* L. têm sido confirmadas mediante diferentes atividades farmacológicas, como (RAHIME et al, 2012), anti-inflamatória, antioxidante (KACHKOUL et al, 2020), anticarcinogênica, neuroprotetora, hipoglicêmica (MESTRY, et al, 2016).

Estudos de toxicidade para determinar a faixa de dosagem segura do extrato da casca do fruto desta espécie por via oral, demonstraram que não foram observados sinais de toxicidade com a administração diária de 2000 mg/kg de extrato etanólico por via oral, durante 28 dias em camundongos, sendo considerado como não tóxico (BHANDARY et al, 2013). Resultados semelhantes foram encontrados por Ahad e colaboradores (2018), onde o estudo de toxicidade oral aguda mostrou que os extratos brutos são seguros até a dosagem de 2.000 mg/kg de peso corporal.

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação (PIETTA, 2000; FERREIRA e MATSUBARA, 1997), através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000) prevenindo a formação de doenças, contribuindo, dessa maneira, para uma maior longevidade. Desta forma, torna-se essencial o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O método pelo qual foi feita a análise consiste na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio (Figura 2). Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H^+ sendo então reduzido. O radical DPPH é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela.

Figura 2. Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.



(Fonte: <https://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe/1>)

Portanto, este trabalho tem o propósito de verificar a capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação que será evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema. Isso é

possível graças a fácil detecção por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH e a amostra, em solução. Então a porcentagem de DPPH restante é proporcional à concentração de antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; BONDET et al., 1997).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Punica granatum L. é uma espécie originária do oriente, distribuída em todo o mundo, conhecida popularmente no Brasil como romãzeira, onde adaptou-se bem às zonas áridas e semiáridas. É citada em várias tradições como na mitologia grega, na arte egípcia, no antigo testamento e no Talmude da Babilônia (WHU & TIAN, 2017). Diversos usos medicinais têm sido atribuídos a esta espécie como hemostático, antibacteriano, antifúngico, antiviral, cicatrizante, no tratamento de bronquite, diarreia, problemas digestivos, impotência sexual e diabetes (LANSKY & NEWMAN, 2007).

A espécie é popularmente utilizada para combater diversas doenças, mas existem pesquisas científicas apontando seu uso para prevenção e tratamento de câncer, doença cardiovascular, diabetes, doenças dentárias, disfunção erétil e infertilidade masculina, proteção contra radiação ultravioleta, antimicrobianos, isquemia cerebral infantil, doença de Alzheimer, artrite, feridas dérmicas e obesidade. Nestes estudos foram utilizados os frutos (e suas partes), folhas, sementes ou caules desta planta (CRAVOTTO et al., 2010; FARIA & CALHAU, 2011).

Middha e colaboradores (2013) determinaram em seus estudos que o extrato de *Punica granatum* L. é rico em compostos antioxidantes, principalmente flavonóides e compostos fenólicos,

podendo ser utilizado em pesquisas pela sua composição natural antioxidante (NIWANO et al., 2011). Outras pesquisas também revelaram, em sua composição, a presença de princípios ativos (alcalóides, lactonas, triterpenóides, esteróides, fenóis, flavonóides, taninos, cumarinas, saponinas, carboidratos, aminoácidos, quinonas, antocianidinas entre outros) (GÖZLEKÇI et al., 2011) importantes na ação anti-inflamatória, antiparasitária (NUÑEZ et al., 2008), bactericida, bacteriostática, anti-malária (VALDÉS et al., 2010), entre outras atividades.

O extrato de *Punica granatum* L., ao ser administrado por via oral em ratos, visando à cicatrização de feridas, gerou menor tempo de epitelização e maior percentagem de cicatrização nos animais tratados com extrato deste fruto comparado ao grupo controle. Os animais tratados com dexametasona obtiveram maior tempo para epitelização e menor grau de cicatrização, efeitos revertidos quando se associou o tratamento com o extrato (ADIGA et al., 2010). A aplicação tópica deste fruto também apresentou efeito positivo na cicatrização de feridas (HAYOUNI et al., 2011).

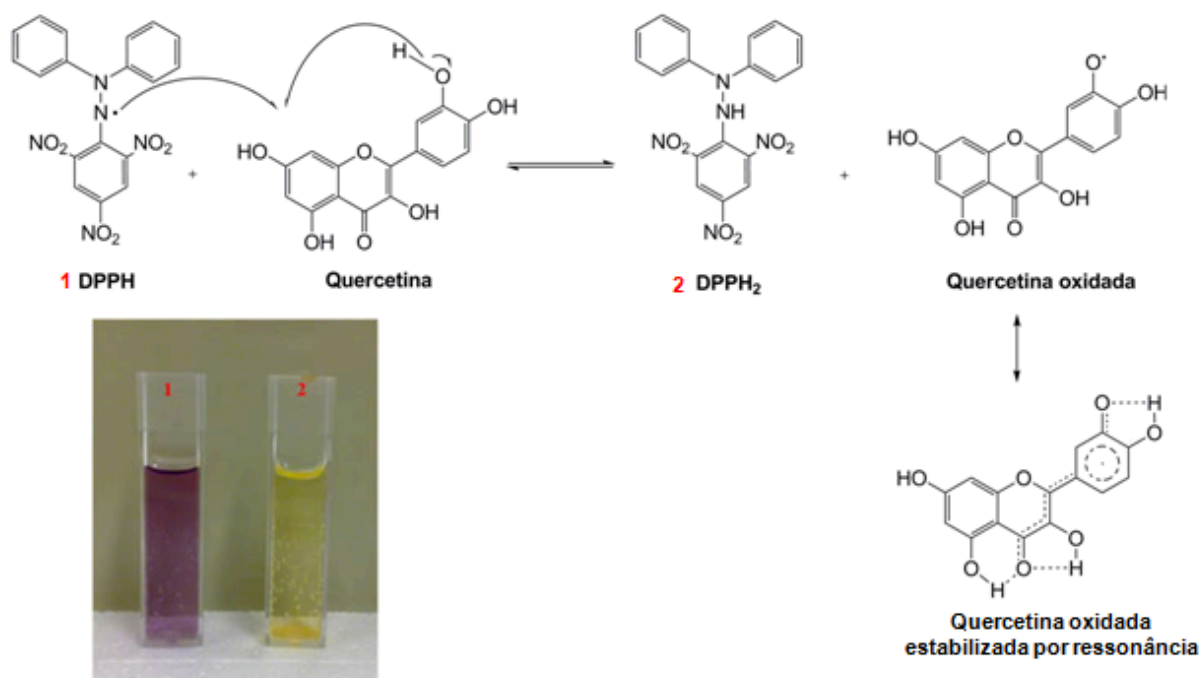
Punica granatum L. é rica em antocianinas que possuem alta capacidade antioxidante (ZHAO & YUAN, 2021), potencialmente benéficas à saúde e responsáveis pela coloração dos produtos obtidos a partir do suco de romã, que influenciam na aceitação sensorial pelos consumidores. Desta forma, segundo Suzuki (2016) o tamanho, a coloração e sanidade dos frutos de romã são aspectos a serem considerados para a compra, sendo requeridos frutos sem manchas, avermelhados e graúdos.

O DPPH foi descoberto por Goldschmidt e Renn em 1922, sendo bastante utilizado em pesquisa de reações envolvendo radicais

livres. Mas sua principal aplicação é como reagente colorimétrico em testes para verificar a ação antioxidante, mais conhecidos como testes de captura (do inglês scavenge) do DPPH.

O DPPH pode agir como um capturador de outros radicais livres ou de substâncias neutras capazes de estabilizá-lo. As substâncias com propriedades antioxidantes possuem essa capacidade. No teste de captura com DPPH ocorre uma reação de oxi-redução, onde o DPPH, que apresenta coloração violeta, é reduzido, ou seja, o elétron desemparelhado do nitrogênio se emparelha com o elétron cedido por um radical hidrogênio de um antioxidante, tornando a solução amarela e ocorrendo a formação do DPPH-H, reduzido e estável. É essa característica de mudança de coloração que permite o acompanhamento visual da reação (Figura 3).

Figura 3. Redução do radical livre DPPH pelo flavonoide antioxidante quercetina.



(Fonte: <https://qnint.sbg.org.br/novo/index.php?hash=molecula.160>)

3 METODOLOGIA

3.1 Extratos

O procedimento foi adaptado de Larrauri, et al, (1997) em que foi utilizado 50 g de sementes de romã (*Punica granatum* L.), coletadas em quintal e, em seguida foi adicionado os solventes. Para o extrato aquoso adicionou-se 100 mL de água destilada e para o extrato etanólico utilizou-se 100 mL de álcool etílico e posteriormente foi submetido a agitação por 60 minutos. Após a agitação os extratos foram colocados em tubos falcon para serem centrifugados por 10 minutos, posteriormente foi retirado o sobrenadante do precipitado com uma pipeta e armazenado em um recipiente com identificação até sua utilização.

3.2 Determinação da capacidade de sequestrar radicais livres

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos, adicionou-se a 1,5 mL de solução etanólica de DPPH• ($6 \times 10^{-5} \text{M}$) uma alíquota de 0,5 mL das soluções contendo diferentes concentrações: 800 µg/mL, 1000 µg/mL, 1500 µg/mL dos extratos aquoso e etanólico. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm, após 5, 10, 20 e 30 minutos do início da reação. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH, conforme fórmula abaixo.

$$\% \text{ de proteção} = (\text{Abscontrole} - \text{Absamostra}) / \text{Abscontrole} \quad \text{[Eq. 01]}$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na avaliação da atividade antioxidante por este método, o radical livre DPPH reage com o antioxidante, convertendo-se à sua forma

reduzida. Nessa reação, a solução etanólica de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se amarela; e o grau deste descolorimento, monitorado através do espectrofotômetro, indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre. Uma forma usual de expressar os resultados nesse ensaio é calcular a quantidade do antioxidante capaz de sequestrar metade dos radicais livres DPPH presentes na solução. Esse índice denomina-se EC50. Quanto menor o valor de EC50 apresentado pelo extrato, menor quantidade do extrato será necessária para reduzir 50 % do radical livre DPPH, e maior será sua atividade antioxidante (LIMA, 2008) Os valores do EC50 para cada extrato estão representados na Tabela 1.

Extrato	EC50
Aquoso	302
Etanólico	1340

Dessa forma, podemos inferir que o extrato aquoso apresentou menor EC50 o que resulta numa maior atividade antioxidante, quando comparado ao extrato etanólico. EC50 é a potência do fármaco ou a concentração em que o fármaco produz 50% de seu efeito máximo. (LIMA, 2008).

A reação de cada extrato, em suas diferentes concentrações, pode ser visualizada nos gráficos abaixo (Gráficos 1 e 2), o que mostra o sequestro do radical a partir da absorbância adquirida em cada intervalo de tempo.

1. Controle
2. 800 µg/mL
3. 1000 µg/mL
4. 1500 µg/mL

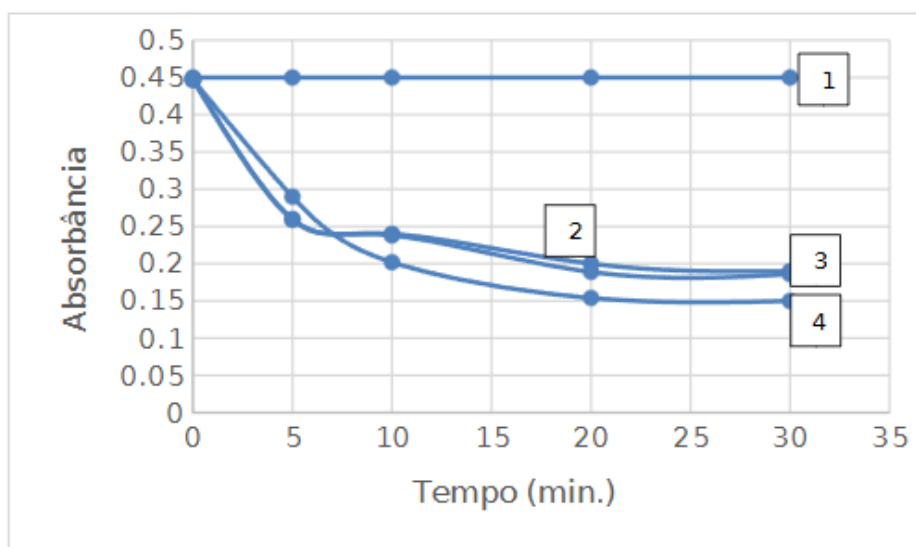


Gráfico 1. Curvas referentes à concentração do extrato aquoso.

1. Controle
2. 800 µg/mL
3. 1000 µg/mL
4. 1500 µg/mL

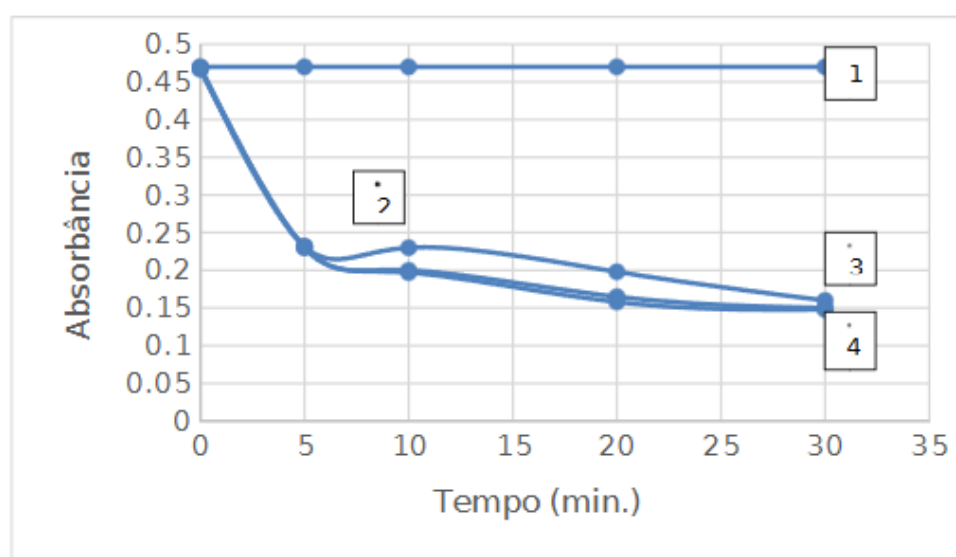


Gráfico 2. Curvas referentes à concentração do extrato etanólico.

4 CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos indicaram que o valor de EC50, ou seja, a quantidade do antioxidante capaz de sequestrar metade dos radicais livres DPPH presentes na solução, mostram que o extrato aquoso demonstra melhor atividade antioxidante que o extrato etanólico.

Analisando os dados do gráfico 1, verifica-se que as concentrações de 800 µg/mL e 1000 µg/mL se aproximam muito, diferentemente do gráfico 2 em que elas se distanciam. Verifica-se, também, que a concentração de 1500 µg/mL no extrato aquoso apresenta-se mais

distante das outras concentrações, enquanto no extrato etanólico as da reação com o radical DPPH encontram-se muito próximos.

Observa-se que no decorrer do tempo a tendência é o extrato reagir cada vez mais com o radical DPPH, como se observa nos Gráficos 1 e 2. Analisando os gráficos obtidos, foi possível verificar que o extrato de concentração mais elevada é o que reage mais intensamente com o radical, ou seja, tanto o extrato aquoso quanto o etanólico reagiram em maior proporção nas concentrações maiores, 1500 µg/mL.

Assim sendo, podemos inferir que as sementes da romã apresentam potencial antioxidante, verificado pela presença de compostos com capacidade redutora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIGA, Shalini; TOMAR, Prakash; R.R ,Rajput. Effect of punica granatum peel aqueous extract on normal and dexamethasone suppressed wound healing in wistar rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. 5 (2): 3437, 2010.

AHAD S., TANVEER S., MALIK T.A, NAWCHOO, I.A. Anticoccidial activity of fruit peel of *Punica granatum* L. **Microb. Pathog**, 2018.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensm-Wiss Technol**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BHANDARY, B.S.K, SHARMILA, K.P, KUMARI, N.S, BHAT, V. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extracts of *Punica granatum* (Linn). Whole fruit and seeds and synthetic ellagic acid in swiss

albino mice. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss Technol**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; GENZINI, L.; GARELLA, D. Phytotherapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. 35: 11–48, 2010.

FARIA, Ana; CALHAU, Conceição. The Bioactivity of Pomegranate: Impact on Health and Disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 51: 626–634, 2011.

FERREIRA, L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**,v. 43, n.1, p. 61-8, 1997.

GOLDSCHMIDT, St; RENN IV, K. Amine oxidation IV. Diphenyltrinitrophenylhydrazyl. **Chem. Ber**, v. 55, p. 628-643, 1922.

GÖZLEKÇİ, Şadiye; SARAÇOĞLU, Onur; ONURSAL, Ebru; ÖZGEN, Mustafa. Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. **Pharmacognosy Magazine**. 7(26): 161–164, 2011.

HAYOUNI, E.A.; MILED,K.; BOUBAKER, S.; BELLASFAR, Z.; ABEDRABBA, M.; IWASKI, H.; OKU, H.; MATSUI, T.; LIMAM, F.; HAMDİ, M. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine**. 18: 976-984, 2011.

KACHKOUL, R. et al. Chemical Compounds Identification and Antioxidant and Calcium Oxalate Anticrystallization Activities of *Punica granatum* L. **Based Complement Alternat Med**, 2020.

LANSKY EP, NEWMAN RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **J Ethnopharmacol**, 2007.

LARRAURI, JOSÉ A., PILAR RUPÉREZ, AND FULGENCIO SAURACALIXTO. "Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels." **Journal of agricultural and food chemistry**, 1997.

LIMA, A. de. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) **Tese (doutorado)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p.182, 2008.

MESTRY, S.N., DHODI, J.B., KUMBHAR, S.B., JUVEKAR A.R. Attenuation of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats by *Punica granatum* Linn. leaves extract. **J Trading Complement Med**, 2016.

MIDDHA, Sushil Kumar; USHA, Talambedu; PANDE, Veena. HPLC Evaluation of Phenolic Profile, Nutritive Content, and Antioxidant Capacity of Extracts Obtained from *Punica granatum* Fruit Peel. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2013.

NIWANO, Yoshimi; SAITO, Keita; YOSHIZAKI, Fumihiko; KOHNO, Masahiro; OZAWA, Toshihiko. Extensive screening for herbal extracts

with potent antioxidant Properties. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. 48(1): 78–84, 2011.

NUÑEZ, Blanca del Rosario Peña; RODRÍGUEZ, Zulema Morejón; HERNÁNDEZ, Ana Ibis García; RODRÍGUEZ, Francisco Morón. Estandarización y tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de *Punica granatum* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. 13 (4), 2008.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.

RAHIMI, H.R; ARASTOO, M; OSTAD, S.N. A comprehensive review of *Punica granatum* (pomegranate) properties in toxicological, pharmacological, cellular and molecular biology researches. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 2012; 11(2):385.

Suzuki, E. T. Avaliação fenológica, análise econômica e estudo da cadeia produtiva da romã (*Punica granatum*). (**Tese de doutorado**). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil, 2016.

WU S, TIAN L. Diverse Phytochemicals and Bioactivities in the Ancient Fruit and Modern Functional Food Pomegranate (*Punica granatum*). **Molecules**, 2017.

VALDÉS, Aymé Fernández-Calienes; MARTÍNEZ, Judith Mendiola; LIZAMA, Ramón Scull; GAITÉN, Yamilet Gutiérrez; RODRÍGUEZ, Deyanira Acuña; PAYROL, Juan Abreu. In vitro antimalarial activity and cytotoxicity of some selected cuban medicinal plants. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 52(4): 197-201, 2010.

ZHAO, X. & YUAN, Z. Anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum* L.) and their role in antioxidant capacities in vitro. **Chemistry & Biodiversity**, 18 (10), 1-21, 2021.

¹ Discente do Curso Farmácia da Universidade Brasil, *Campus* Fernandópolis-SP, e-mail: [acesse o artigo original para visualizar o e-mail](#), Dr. em Química pela UNESP-SP – Campus de Araraquara-SP.

² Docente do Curso Superior de Farmácia da Universidade Brasil, *Campus* Fernandópolis-SP, e-mail: [acesse o artigo original para visualizar o e-mail](#). Mestre em Química pela UNESP, Campus de Araraquara-SP.