

AValiação DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO DA CASCA DA *Punica granatum* L.

**Talita de Jesus Cattem Moreno, Nicolly Soares Ferreira,
Juliana Alves Resende, Mariana Drummond Costa Ignacchiti**

Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Farmácia e Nutrição/CCENS, Av. Alto Universitário, s/n, Guararema - 29.500-000 – Alegre – ES, Brasil, morenotalitajesus@gmail.com, ni.colly_ferreira@hotmail.com, juliana.resende@ufes.br, mariana.ignacchiti@ufes.br

Resumo

A *Punica granatum* L. (romã) é rica em metabólitos ativos, como polifenóis, taninos e flavonoides, que conferem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, tornando-a uma alternativa promissora para novas terapias. No entanto, é fundamental assegurar a segurança do extrato para evitar efeitos tóxicos ou sensibilizantes. Assim, este estudo tem como objetivo investigar a atividade hemolítica do extrato da casca da *P. granatum*, a fim de avaliar sua segurança e potencial para uso terapêutico. O ensaio hemolítico utilizou uma suspensão de hemácias diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), com Triton X-100 como controle positivo e PBS como controle negativo. O extrato de romã apresentou biocompatibilidade em todas as concentrações testadas. Concentrações inferiores a 60 mg/mL não causaram hemólise, enquanto a concentração de 100 mg/mL resultou em apenas 1% de hemólise, valor significativamente abaixo do limite considerado seguro na literatura. Esses dados sugerem que o extrato nas concentrações avaliadas é promissor e seguro para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Hemólise. Romã. Produtos Naturais.

Área do Conhecimento: Ciências da saúde.

Introdução

Historicamente, os produtos naturais foram amplamente utilizados em infusões, decocções e até mesmo na forma de plantas maceradas para tratar feridas, combater inflamações e prevenir infecções (Ferreira *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2020). No entanto, com o avanço da medicina convencional, o uso dessas plantas foi gradualmente abandonado. Recentemente, o interesse por abordagens alternativas e complementares à saúde tem ressurgido, resultando em um retorno ao uso de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças (Ferreira *et al.*, 2019; Braga; Silva, 2021). A *Punica granatum* conhecida popularmente como romã, é uma planta arbustiva da família Punicaceae, que cresce amplamente em várias regiões do Brasil, apesar de sua origem ser na Ásia Ocidental e Oriental, Himalaia e Oriente Médio (Shaygannia *et al.*, 2016). O fruto da romã é rico em metabólitos ativos que conferem propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, nefronprotetoras, antineoplásicas e anti-hipertensivas (Silva, 2022; Custódio, 2020).

Os constituintes fitoquímicos da romã incluem taninos, flavonoides e compostos fenólicos, além de minerais como cálcio, ferro e manganês, e as vitaminas B1, B2 e C. Esses componentes conferem à planta propriedades terapêuticas e medicinais, responsáveis pelo seu potencial antimicrobiano, antioxidante e cicatrizante (Sousa *et al.*, 2018). A casca da romã é particularmente rica em polifenóis, destacando-se a punicalagina, um dos taninos mais pesquisados, que apresenta comprovada atividade antioxidante e potencial antifúngico (Mayasankaravalli *et al.*, 2020; Elshafie *et al.*, 2021; Mo *et al.*, 2022). Os taninos tem sido relacionados com a promoção da precipitação de proteínas de membrana, inibição de atividades enzimáticas e depleção de íons metálicos. Já os flavonoides são reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e seu possível papel na prevenção de cânceres relacionados a hormônios (Mayasankaravalli *et al.*, 2020). Os ácidos fenólicos presentes na casca da romã possuem ação

antimicrobiana relacionada com a capacidade de promover a acidificação citoplasmática, precipitação de proteínas e inibição enzimática, podendo até induzir a morte celular (Elshafie *et al.*, 2021; Mo *et al.*, 2022).

Dessa forma, a romã se destaca como uma alternativa natural promissora com potencial antimicrobiano, oferecendo uma valiosa oportunidade para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra infecções fúngicas e ressaltando a importância de explorar os recursos naturais para inovações na área da saúde (Melo *et al.*, 2021). No entanto, é essencial garantir que o extrato seja seguro e não cause efeitos tóxicos ou sensibilizantes que possam comprometer a saúde do paciente. A análise da atividade hemolítica é essencial para determinar a segurança e biocompatibilidade de um produto natural, especialmente quando se pretende utilizá-lo em aplicações terapêuticas. A hemólise refere-se à ruptura das membranas das células vermelhas do sangue, resultando na liberação de hemoglobina. Este teste ajuda a identificar se o produto natural ou seus componentes causam danos às hemácias, o que poderia levar a efeitos adversos ou outras complicações relacionadas à perda de integridade das células sanguíneas (Moreno *et al.*, 2018). Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo avaliar a atividade hemolítica do extrato da casca da *Punica granatum*.

Metodologia

A *Punica granatum* foi escolhida a partir de plantas maduras e livres de doenças. O espécime foi arquivado no Herbarium-CAP da Universidade Federal do Espírito Santo (ES, Brasil). O extrato etanólico da casca de romã foi extraído, sendo preparado por percolação, seguida de evaporação rotativa e liofilização, conforme descrito por Batista *et al.* (2020). O extrato foi acondicionado em frasco de vidro âmbar, embalados em papel alumínio para evitar contato com a luz e armazenado na temperatura de 4° C.

A atividade hemolítica foi avaliada de acordo com Yu *et al.* (1998), com algumas modificações. As amostras de sangue foram diluídas com PBS e centrifugada, as hemácias foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 7×10^8 cél/mL.

O teste de hemólise consistiu na incubação de 500 µL do extrato, nas concentrações de 3, 30, 60 e 100 mg/mL, com 500 µL de suspensão de células sanguíneas a 37°C por 35 minutos. Em seguida, as amostras foram agitadas por 10 minutos e incubadas novamente em banho de gelo, finalizando com uma centrifugação a 3150 rpm por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi analisado em microplacas de 96 poços e a absorbância foi medida a 576 nm. Triton X-100 foi utilizado como controle positivo e PBS como controle negativo. O procedimento foi realizado em triplicata.

A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{OD_S - OD_B}{OD_P}$$

Onde:

OD_S = absorbância da amostra

OD_B = absorbância do controle negativo

OD_P = absorbância do controle positivo

Resultados

As concentrações de 3, 30 e 60 mg/mL não provocaram hemólise significativa, resultando em 0% de lise de hemácias. A concentração de 100 mg/mL resultou em uma hemólise de 1%. Os controles negativos (PBS) e positivo (Triton) mostraram 0% e 97% de hemólise, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Grau de hemólise do extrato de *Punica granatum* L.

Concentração (mg/mL)	Grau de hemólise %
3,0	0
30	0

60	0
100	1
Triton	97
PBS	0

Fonte: o autor

Discussão

O extrato de romã apresentou grau de hemólise 0% nas concentrações de 3, 30 e 60 mg/mL. Sendo considerado seguro nessas concentrações, exibindo uma atividade hemolítica leve em concentrações mais elevadas (100 mg/mL). Embora diferentes espécies apresentem variações nos limites de hemólise aceitáveis (aproximadamente 10% para humanos, 10%–29% para cães e 0%–37% para coelhos), os valores de 10% e 25% de hemólise são comumente considerados como referências: uma hemólise inferior a 10% é classificada como não hemolítica, enquanto valores superiores a 25% são considerados hemolíticos. Esses parâmetros são essenciais para avaliar a segurança de uma substância, especialmente no contexto de aplicações terapêuticas, onde altos índices de hemólise podem limitar seu uso seguro (Amin; Dannenfels, 2006).

Tabosa *et al.* (2019) encontraram resultados divergentes em comparação com o presente estudo. Os autores relatam que o extrato da casca de romã, na concentração 1 mg/mL causou uma hemólise de 7,8%, sugerindo baixa biocompatibilidade. Em concentrações menores, de 0,05, 0,1 e 0,25 mg/mL, o grau de hemólise foi inferior a 5%. Por outro lado, Costa *et al.* (2020) investigaram a atividade hemolítica de filmes poliméricos constituídos de PVA e gelatina, incorporados ou não com extrato de romã na concentração de 1,25% (P/V). Os autores relataram que a incorporação do extrato de romã promoveu um aumento o grau de hemólise, excedendo 5,05%.

Ferreira *et al.* (2016) compararam o efeito hemolítico do óleo de semente de romã puro com o óleo incorporado em nanoemulsões. Na concentração de 0,05 mg/mL, o óleo puro apresentou um alto grau de hemólise, $89,57 \pm 0,25\%$, enquanto as nanoemulsões incorporadas mostraram um grau menor, $28,33 \pm 0,73\%$. No entanto, no estudo também foi observado que concentrações de 0,1 e 0,25 mg/mL, o óleo puro causou menos hemólise em comparação com as nanoemulsões. Essas diferenças destacam a importância de considerar a forma e a concentração da substância testada, bem como o sistema biológico em estudo, ao avaliar a segurança de produtos naturais. A hemólise é uma ferramenta crítica para a avaliação preliminar da biocompatibilidade, e os resultados obtidos neste estudo sugerem que o extrato de romã pode ser uma opção promissora para futuras aplicações terapêuticas, desde que utilizado em concentrações seguras. No entanto, são necessários estudos adicionais para elucidar completamente os mecanismos envolvidos e validar a segurança em modelos clínicos mais amplos. Esses achados têm implicações significativas para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos, particularmente em relação ao uso seguro de substâncias naturais em humanos e animais.

Conclusão

O extrato de romã apresentou biocompatibilidade em todas as concentrações testadas. Concentrações inferiores a 60 mg/mL não causaram hemólise, enquanto a concentração de 100 mg/mL resultou em apenas 1% de hemólise, valor significativamente abaixo do limite considerado seguro na literatura. Esses dados sugerem que o extrato da casca de romã nas concentrações avaliadas é promissor e seguro para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, reforçando seu potencial como ingrediente em formulações terapêuticas e biomateriais.

Referências

- AMIN K., DANNENFELSER R.M. In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, p. 1173–1176, 2006.
- BATISTA S. V. *et al.* In vitro activity of pomegranate peel extract alone and in electrospun poly (vinyl alcohol)/sodium alginate matrix. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 17, p. 294–312, 2020.

BRAGA, J.C.B.; DA SILVA, L.R. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil do consumidor e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Revista Brasileira de Revisão de Saúde**, v. 4, n. 1, p. 3831-3839, 2021.

CARVALHO, N. S. et al. Perception of pregnant women on the use of medicinal plants and herbal medicines: an integrative literature review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 9282–9298, 2020.

COSTA, N. N. et al. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: In vitro analysis and physicochemical evaluation. **Materials science & engineering. C**, Materials for biological applications, v. 109, p. 1-13, 110643, 2020.

CUSTÓDIO, S. R. S., **Atividade biológica do sumo de *Punica granatum* L. da variedade "Assaria"**, 2020. 67f. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas. Universidade do Algarve Faculdade de Ciências e Tecnologias, 2020.

ELSHAFIE, H. S. et al. Study of bio-pharmaceutical and antimicrobial properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) leathery exocarp extract. **Plants**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2021.

FERREIRA, L. M. et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antiglioma activity: optimization and evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and oxidative effects on mononuclear cells. **Pharmaceutical biology**. v. 54, n. 12, p. 2968-2977, 2016.

FERREIRA, E. T et al. The use of medicinal and phytotherapy plants: an integrational review on the nurses 'performance. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 3, p. 1511–1523, 2019.

MAYASANKARAVALLI, C. et al. the phyto-constituents of *Punica granatum* fruits peel extract and accessing its in-vitro antioxidant, anti-diabetic, anti-obesity, and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 3228-3234, 2020.

MELO, F. J. S., LUI, C.L.C., SILVA, V. A. Propriedades farmacológicas da droga vegetal *Punica granatum* L. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**. São Paulo, v.7, n.6, p. 202-210, 2021.

MO, Y. et al. Pomegranate peel as a source of bioactive compounds: A mini review on their physiological functions. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 1-9, 2022.

MORENO, A. H. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. In: ISSN, 2018, Catanduva-São Paulo. **Arq. Ciênc. Saúde**. v. 25, n. 1, p. 11-12. 2018.

SHAYGANNIA, E. et al. A Review Study on *Punica granatum* L. Evidence Based Complementary and Alternative. **Medicine**, v. 21, n. 3, p. 221-227, 2016

SILVA, I. K. R. O. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Punica granatum* L. frente microrganismos da mucosa oral. **Contemporânea –Revista de Ética e Filosofia Política**, v. 2, n. 6, p. 1316-1330, 2022.

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

TABOSA, M.G. O. et al. **Determinação de elagitanninos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e desenvolvimento de forma farmacêutica enxaguatório bucal a partir de extrato bruto seco de *Punica granatum* L. (romã)**. 2019. 33 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). p.1-33, 2019.

Yu B. G. *et al.* Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin
Journal of Controlled Release, v. 53, p. 131-136, 1998.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.