

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE POLPA DE ROMÃ (*PUNICA GRANATUM*, L)

EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CHARACTERISTICS PHYSICAL AND CHEMICALS OF POMEGRANATE PULP (*PUNICA GRANATUM*, L)

Michele Tavares Faria¹

Silvia Menezes de Faria Pereira²

¹ Aluna de Graduação do Curso de Farmácia da Faculdade de Medicina de Campos

² Orientadora e Professora da Faculdade de Medicina de Campos

RESUMO

Diversos vegetais têm sido estudados como fonte de antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos. Embora muito conhecida e com muitas propriedades benéficas para a saúde, tais como antiteratogênica, antiproliferativa e ação anti-inflamatória, a romã ainda é pouco consumida no Brasil. Estudos têm relacionado a romã (*Punica granatum*, L) como fonte de substâncias que apresentam propriedades antioxidantes. As substâncias antioxidantes atuam retardando o envelhecimento e prevenindo doenças crônicas. Também impedem os efeitos danosos dos radicais livres e a oxidação das moléculas que constituem as membranas das células. Os antioxidantes sintéticos são potencialmente carcinogênicos quando consumidos em doses elevadas e por tempo prolongado. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, em extratos etanólico e metanólico de polpa de romã *Punica granatum*, L, pelo método DPPH, utilizando o BHT como padrão de antioxidante sintético e, adicionalmente as características físico-químicas da polpa. Os resultados indicaram que o extrato metanólico nas concentrações de 1mg/mL e 0,1mg/mL, obtiveram um percentual de inibição de 49,02% e 21,57 % respectivamente, o que indica um resultado muito favorável por se tratar de um extrato e não de substância isolada. Ambos os extratos apresentaram porcentagem de inibição menor que o antioxidante sintético BHT. Dos parâmetros físico-químicos encontrados para Polpa de Romã neste estudo, apenas o valor de pH, se encontra abaixo do padrão mínimo, descrito no Decreto nº 50.040/1961 os demais parâmetros estão de acordo.

Palavras-chave: Romã. Antioxidante. Radicais Livres.

ABSTRACT

Several vegetables have been studied as a source of natural antioxidants instead of synthetic ones. Although well-known and with many beneficial properties for health, such as anti-atherogenic, antiproliferative and anti-inflammatory action, pomegranate is still little consumed in Brazil. Studies have related pomegranate (*Punica granatum*, L) as a source of substances that have antioxidant properties. Antioxidants act by slowing aging and preventing chronic diseases. They also prevent the damaging effects of free radicals and the oxidation of the molecules that make up the cell membranes. Synthetic antioxidants are potentially carcinogenic when consumed in high doses for a long time. The objective of the present work was to evaluate the antioxidant activity in the ethanolic and methanolic extracts of pomegranate pulp *Punica granatum*, L, by the DPPH method, using BHT as a synthetic antioxidant standard and, additionally, the physicochemical characteristics of the pulp. The results indicated that the methanolic extract at concentrations of 1mg / mL and 0.1mg / mL, obtained a percentage of inhibition of 49.02% and 21.57%, respectively, which indicates a very favorable result because it is an extract and not of isolated substance. Both extracts had lower inhibition percentage than the synthetic antioxidant BHT. From the physical-chemical parameters found for Pomegranate Pulp in this study, only the pH value is below the minimum standard, described in Decree No. 50.040 / 1961, the other parameters are in agreement.

Keywords: Pomegranate. Antioxidant. Free Radicals.

INTRODUÇÃO

O consumo dos alimentos considerados funcionais, bem como de compostos bioativos responsáveis pela sua ação antioxidante e prevenção de doenças têm crescido, uma vez que tem aumentado o conhecimento acerca da relação do alimento com a saúde e da importância de se prevenir enfermidades, ao invés de curá-las. Este fato ocorre, pois os custos para o tratamento são elevados, além das crescentes comprovações científicas sobre as funcionalidades dos alimentos. Desse modo, os consumidores, a indústria alimentícia e a comunidade científica, têm intensificado a busca por informações sobre as substâncias bioativas presentes nos alimentos funcionais (MORAES e COLLA, 2006).

A romã é uma fruta de uma árvore denominada romãzeira (*Punica granatum*), espécie do gênero *Punica*, dentro da família *Lythracea*. O fruto apresenta grande variedade de compostos fenólicos e flavonóides, o que lhe confere poder de inibir radicais livres. Faz parte da história e cultura de várias civilizações e seu cultivo tem uma longa história na Armênia, onde foram encontrados restos de romãs em fósseis datadas de 1000 a.C (ARTIK, MURAKAMI e MORI, 1998).

O Brasil é um país que possui grande número de espécies vegetais com propriedades medicinais que são usadas pela população há muito tempo, como no caso da romã (*Punica granatum* L.). Os preparos obtidos da romãzeira, seja da flor, fruto e casca do fruto, são popularmente usados para tratar vários problemas de saúde, tais como, faringites, laringites, bronquites, lesões e abscessos de pele e mucosas, diarreias de origem bacteriana e parasitária, cólicas, hemorróidas, infecções de vias urinárias e genitais, viroses em geral, infecções por fungos, conjuntivites, gengivites, glossites, estomatites aftosas ou aftas (HOLETZ et al., 2002; RODRIGUES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

A polpa da romã é bem conhecida por possuir excelente atividade antioxidante, antiteratogênica, antiproliferativa e anti-inflamatória, por conter substâncias bioativas, que são poderosos antioxidantes (FARIA e CALHAU, 2011). Entre estas substâncias, se encontram as antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), quercetina, ácidos fenólicos (caféico, catequínico, clorogênico, orto e paracumárico, elágico, gálico e quínico) e os taninos (punicalagina) (NODA et al., 2002; SEERAM et al., 2005).

De acordo com o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, antioxidantes são substâncias que retardam a alteração oxidativa no alimento. Estas substâncias antioxidantes, atuam retardando o envelhecimento, prevenindo doenças crônicas como cardiovasculares, renais, hepáticas e o câncer. Também impedem a oxidação das moléculas que constituem as membranas das células (HALLEWELL, 2001) e os efeitos danosos dos radicais livres que são moléculas liberadas pelo metabolismo do corpo com elétrons altamente instáveis e reativos, que podem causar doenças degenerativas, envelhecimento e morte celular (VASCONCELOS, 2014).

O desenvolvimento científico possibilitou à indústria cosmética a descoberta de vários ativos e, consequentemente, a comercialização de produtos anti-sinais, os quais propõem o combate, controle ou postergação do envelhecimento cutâneo, através, principalmente da ação antioxidante contra os radicais livres (BAUMANN, 2004). Muitos cosméticos anti-idade estão sendo produzidos com antioxidantes como vitamina C, vitamina E, ácido lipóico e coenzima Q10 (Ubiquinona), entre outros, sendo amplamente populares (BAUMANN, 2004).

Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contém, no mínimo, uma hidroxila, podendo ser sintéticos, como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT), amplamente utilizado na indústria alimentícia, ou naturais, como as substâncias bioativas, tais como, organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (REVISTA FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). Porém, os antioxidantes sintéticos, são potencialmente carcinogênicos quando consumidos em doses elevadas e por tempo prolongado (RAMALHO, 2006). O BHT pode causar tumores de fígado, pâncreas e glândulas (HIROSE et al., 1981), além de, adenomas e carcinogênese em células hepáticas (ROSSING, KAHL e HILDEBRANDT, 1985). O uso destes antioxidantes em alimentos é limitado no Canadá e na Comunidade Econômica Européia. No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita 200mg/kg para BHA (butilhidroxianisol) e o TBHQ (terc butil hidroquinona) e 100mg/kg para BHT (butilhidroxitolueno), como concentração máxima permitida (REVISTA FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Diante do exposto, diversos vegetais tem sido estudados como fontes de antioxidantes

naturais em substituição aos sintéticos, e a romã está entre esses vegetais, por conter compostos bioativos que são poderosos antioxidantes

O problema dos compostos naturais, além da instabilidade, é a interferência nas propriedades sensoriais, sendo um desafio tecnológico para as maiores indústrias de alimentos do mundo que, pesquisam formas de evitar o uso dos antioxidantes artificiais.

Tendo em vista a problemática inerente ao consumo de antioxidantes sintéticos, no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar atividade antioxidante pelo método DPPH e adicionalmente, as características físico-químicas, em diferentes extratos de polpa de romã (*Punica granatum*, L).

MATERIALE MÉTODOS

Material vegetal

As romãs utilizadas experimento foram adquiridas na Cidade de Campos dos Goytacazes – RJ, no Distrito de Guarus, nos meses de maio e junho de 2018, a partir de plantação caseira sem uso de aditivos e em estado maduro.

Obtenção do extrato

As frutas foram lavadas, abertas e o conteúdo interno (sementes) colocado em um gral de porcelana e pressionado com um pistilo à temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), peneirado em peneira de plástico, separando o suco. Os caroços e cascas foram descartados. Uma parte do suco extraído foi reduzido em banho-maria a $\pm 40^{\circ}\text{C}$ até evaporação e em seguida foram feitos diferentes extratos (etanólico e metanólico) a partir de 500mg da polpa e 100mL de solvente, removendo a parte solúvel a qual foi utilizado nos testes. Em seguida, estes extratos foram evaporados naturalmente.

Avaliação Físico-Química

Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em um potenciômetro pH Marte, (MB - 10) calibrado com solução padrão pH 4,0 e 7,0, após imersão direta do eletrodo na polpa in natura (AOAC, 1997- proc. 920.151).

Determinação da Acidez Total Titulável (ATT)

A acidez foi determinada, pipetando-se 2ml da amostra de polpa em 50 ml de água destilada e titulada com solução de NaOH 0,1N padronizada, utilizando-se 3 gotas de fenolftaleína. A identificação do ponto de viragem do indicador foi acompanhada com pHmetro até o valor de 8,2. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico. O cálculo foi efetuado de acordo com a fórmula abaixo: (CECCHI, 2000).

$$\% \text{ ácido cítrico} = \frac{V \times N \times F \times P'' \times 100}{P}$$

Onde:

V = volume de NaOH gasto na titulação

N = normalidade corrigida do NaOH

F = fator da solução NaOH

P'' = miliequivalente do ácido cítrico

P = peso amostra (g)

Determinação de Sólidos Solúveis Totais (°Brix)

Para esta determinação foram colocadas 2 gotas da amostra, previamente filtrada em papel de filtro, sobre o prisma do refratômetro de bancada. Os resultados foram expressos em graus °Brix (AOAC, 1997- proc. 920.151).

Atividade Antioxidante

A avaliação espectrofotométrica da atividade antioxidante, foi realizada pelo método 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH). Esse método consiste em avaliar a atividade sequestradora de radical livre DPPH, de coloração violeta que absorve em 515nm na região do Ultravioleta Visível, conforme descrito a seguir.

O método consiste em adicionar 1mL do extrato em concentrações que variam de 0,1 - 1000 µg/mL. A este será adicionado 1 mL de uma solução metanólica de DPPH – 0,1mM (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), processando-se a reação em 1h em ambiente escuro à temperatura ambiente. Imediatamente, a absorção do DPPH é verificada em 515 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (em triplicata). A atividade antioxidante de cada extrato é expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância aromática (controle positivo), o 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT). Após o percentual sequestrador (PS%) de radicais livres é calculado. A capacidade de sequestrar radicais livres é expressa como percentual de inibição da oxidação do radical e

será calculada mediante a seguinte fórmula (YEN e DUH, 1994).

% de inibição = $((A_{DPPH} - A_{Extrator}) / A_{DPPH}) \times 100$
Onde A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização Físico-química

Os resultados médios encontrados para a caracterização físico-química da polpa de romã encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Análises físico-químicas da polpa de romã.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	RESULTADOS
pH	3,11
Acidez Total Titulável (g/100g ácido cítrico)	0,74
Sólidos solúveis (°Brix)	13,03

A determinação do pH é de suma importância para controlar processos de deterioração de alimentos, devido ao crescimento microbiano e atividades enzimáticas, retenção de sabor e odor e a escolha da embalagem, de forma a preservar a vida útil do alimento (MADIGAN et al., 2008). Estudos a respeito da caracterização físico-química da Romã, não são muito comuns, no entanto, pesquisas realizadas por Al-Maiman e Ahmad (2002), avaliaram as mudanças nas propriedades físicas e químicas durante o processo de maturação.

Os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) para polpas de frutas, determinam que o valor de pH da polpa deve ser de 3,30 a 4,50 (PORTARIA Nº 94, de 30 de agosto de 2016). AL-MAIMAN e AHMAD (2002) relatam que a média de pH em polpa de romã é de 3,48, com desvio padrão de $\pm 0,11$. A polpa da romã analisada neste estudo, apresentou valor de pH inferior, provavelmente, devido ao estágio de maturação.

Quiroz (2009) classifica a romã de acordo com o teor de ácido cítrico do suco. São consideradas 'doces' as variedades com teor de ácido cítrico $< 0,9\%$ e 'ácidas' as com teor $> 2\%$. As variedades com teor de ácido cítrico inferior a $0,9\%$ são utilizadas, principalmente, para consumo in natura e as variedades com teor acima de $1,0\%$ são mais apropriadas para fins industriais.

Neste estudo o valor de acidez foi abaixo de $0,9\%$, indicando boa qualidade para consumo in natura. Durante a maturação há um acúmulo de açúcares e uma redução na acidez total (JARDIN

2007). Os principais açúcares são frutose e glicose, cujas concentrações no momento da colheita variam entre 3 e 8% , dependendo do cultivo, com concentrações de sólidos solúveis variando de 10 a 18% (FADAVI et al, 2005; OZGEN et al, 2008).

A polpa de romã apresentou baixo pH e baixa acidez. Esta é uma característica desejável para a industrialização. O pH baixo dispensa a acidificação durante o processamento. Além disso, teor de acidez contribui para o sabor acentuado da polpa (ANDRADE et al, 1993).

A análise de Sólidos Solúveis revelou que o fruto é rico em açúcares, uma vez que o valor encontrado para esta variável foi de $13,03^\circ\text{Brix}$. Este resultado é compatível com Santos et al. (2010), em estudo sobre a composição físico-química dos frutos da romã (*Punica granatum L.*), a polpa de romã apresentou, o valor de $12,89^\circ\text{Brix}$.

De acordo com Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade descrito no Decreto nº 50.040/1961, a polpa de romã deve obedecer às características físico-químicas descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Romã. (Decreto nº 50.040/1961)

Parâmetros Mínimos:	
Sólidos solúveis em °Brix, a 20°C	12,00
pH	3,50
Acidez Total expressa em ácido cítrico (g/100g)	0,60

De acordo com os parâmetros físico-químicos encontrados para Polpa de Romã neste estudo, apenas o valor de pH, se encontra abaixo do padrão mínimo, descrito no D.O.U 2016, os demais parâmetros estão de acordo.

Atividade Antioxidante

A capacidade de sequestrar o radical DPPH expressa em percentual de inibição (% DPPH consumido), exibida pelos extratos etanólico e metanólicos de polpa de romã, nas concentrações de 1mg/mL , $0,1\text{mg/mL}$ e $0,01\text{mg/mL}$, utilizadas neste estudo, assim como o de BHT nas mesmas concentrações, podem ser observadas na figura 1.

O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1- picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm . A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumido pelo antioxidante. Quanto maior o

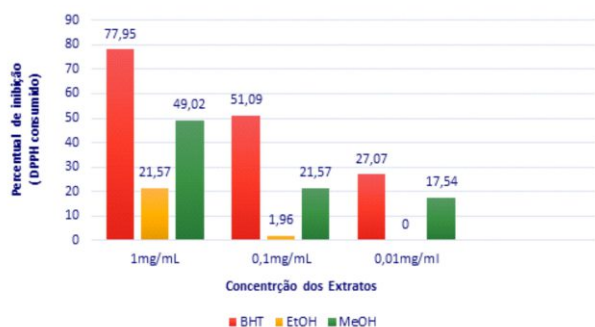


Figura 1- Atividade antioxidante do extrato de polpa de romã em diferentes solventes

consumo de DPPH por uma amostra, maior a sua atividade antioxidante (SOUZA et al, 2007).

Todos os extratos de polpa de romã, avaliados neste estudo, apresentaram menor poder de inibição de acordo com o decréscimo da concentração utilizada.

O BHT apresentou maior eficiência em comparação com os dois extratos analisados. Porém por se tratar de uma substância isolada sendo comparada com um extrato de substâncias mistas, a inibição obtida pelos extratos foi muito expressiva, salientando o ótimo resultado do solvente metanol.

Verificou-se que o percentual de inibição do extrato metanólico, em todas as concentrações testadas, foi maior que os resultados obtidos com o extrato etanólico, provavelmente, devido a polaridade do metanol ser superior ao etanol, o que permite o solvente dissolver substâncias polares como fenóis. Diversos métodos e sistemas de solventes vêm sendo utilizados para a extração de polifenóis de matérias vegetais (CHAVAN; SHAHIDI; NACZK, 2001), visando determinar a capacidade antioxidante (GOLI; BARZEGA; SAHARI, 2004; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na medida da capacidade antioxidante. A presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas também pode afetar os resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

O poder antioxidante, dos extratos avaliados, pode ser atribuído ao conteúdo de substâncias fenólicas em virtude dos solventes utilizados de alta polaridade (metanol e etanol). As substâncias fenólicas são incluídas na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autooxidação. São originados do metabolismo secundário das plantas,

sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, fermentos, radiações UV, dentre outros. (ANGELO e JORGE, 2007).

Autores como PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO (2006) encontraram diferenças significativas na atividade antioxidante pelo método ABTS, influenciadas pela polaridade e pelo pH do solvente, com valores maiores em solventes mais polares e pHs maiores.

JARDIN et al. 2007 relatou que a atividade antioxidante em extrato metanólico + da polpa da romã em baixas concentrações apresentou capacidade na redução do radical DPPH.

Segundo o relatório da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), os alimentos orgânicos apresentam maiores níveis de antioxidantes (FAO, 2000). A fruta orgânica detém maior capacidade antioxidante, comparativamente às frutas que foram cultivadas pelo método convencional.

É necessário a utilização de diferentes metodologias para obter uma melhor visão da atividade antioxidante foi discutida por GIADA e MANCINI-FILHO (2008). O método colorimétrico TBARS (tiobarbituric acid reactive species) baseia-se na reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malonaldeído (MDA), decorrente da quebra dos ácidos graxos insaturados na reação de oxidação (SANCHES et al. 1998). Há também o método desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971) que é baseado na técnica de co-oxidação dos substratos ácido linoleico e do β -caroteno, em um meio emulsão. O método de radical ABTS consiste na produção do radical ABTS a partir de seu precursor, o ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzolin)-6-sulfônico (SCALFI et al. 2000; MAZZA et al. 2002). O Método ORAC desenvolvido por Cão, Alessio, e Culter (1993), se fundamenta no decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda da sua conformidade ao sofrer o dano oxidativo (PRIOR e CÃO, 1999). Entretanto, na redução do DPPH a fração de ácido fenólico ligados a ésteres insolúveis foi mais eficiente na redução de radical que todos as metodologias citadas.

O conteúdo de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante realizada pelos métodos ABTS+ e ORAC em frutos de romãs de diferentes tipos de cultivos (convencional e orgânico) em extrato etanólico, são apresentadas na Tabela 3 (CARMO et al, 2016).

A capacidade antioxidante de romãs variaram de forma considerável devido ao sistema

Tabela 3 - Conteúdo de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante em frutos de romãs de diferentes tipos de cultivos.

Metodologia	Orgânico	Convencional
Fenólicos Totais (mg GAE/g de Polpa)	8,123 ± 0,225	6,815 ± 0,121
Ativ. Antioxidante por ABTS+ (µmolTE/g de Polpa)	43,151 ± 0,652	31,786 ± 0,326
Ativ. Antioxidante por ORAC (µmolTE/g de Polpa)	68,78 ± 4,94	60,77 ± 3,565

empregado em seu cultivo (orgânico ou convencional), sendo o fruto do cultivo orgânico o que apresentou maiores valores dessas variáveis (CARMO et al, 2016) e também maior teor de Fenólicos Totais.

CONCLUSÃO

O extrato metanólico da polpa de romã, na concentração de 1mg/mL, foi mais eficaz no sequestro de radicais livres, pois apresentou percentual de inibição, próximo de 49,02%, enquanto o extrato etanólico na mesma concentração, apresentou percentual de inibição 21,57%.

Mesmo o BHT tendo apresentado valores superiores, os resultados da atividade antioxidante obtido, tanto no extrato de metanol como de etanol foram de grande eficiência por não se tratar de substância isolada como o BHT. Revelando a alta atividade antioxidante que a polpa da romã possui, quando extraída em solventes de alta polaridade.

De acordo com os parâmetros físico-químicos encontrados para Polpa de Romã neste estudo, apenas o valor de pH, se encontra abaixo do padrão mínimo, descrito no Decreto nº 50.040/1961, os demais parâmetros estão de acordo com esta legislação.

Portanto, a polpa de romã avaliada neste estudo, possui ação antioxidante, e características físico-químicas que podem ser de grande utilidade as indústrias de alimentos e cosméticos, como uma alternativa de antioxidante natural diminuindo os prejuízos a saúde causados pelos antioxidantes sintéticos, contribuindo expressivamente para a valorização dessa espécie pela população e pelas indústrias, podendo-se inferir seu uso como alimento funcional.

Para obtenção de dados ainda mais conclusivos, devem ser realizados trabalhos posteriores, utilizando-se outras metodologias para avaliação da capacidade antioxidante e também, para a determinação de substâncias que possuem propriedades antioxidantes, entre eles, os compostos fenólicos.

AGRADECIMENTOS

A todo corpo docente do curso de Farmácia da Faculdade de Medicina de Campos pelas horas e empenho destinada ao ensino, com agradecimento especial a minha orientadora professora Sílvia Menezes de Faria Pereira.

Ao corpo técnico do laboratório da Faculdade, Alecssandra Soares e Larissa Gonçalves, pela boa vontade e auxílio, durante todo o experimento.

A coordenação do curso de Farmácia da Faculdade Medicina de Campos, Professor Carlos Eduardo Faria e a secretária, Fernanda Pinheiro, que nunca pouparam esforços na condução deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos os colegas de curso pela amizade e solidariedade, com especial agradecimento ao aluno Lucas Viana, por fornecer tão gentilmente o material vegetal para o experimento.

REFERÊNCIAS

- AL-MAIMAN S. A.; AHMAD, D. Changes in physical and chemical properties during pomegrate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry* 76 (2002) 437 – 441.
- ANGELO PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66(1): 1-9, 2007.
- ANDRADE Jerusa de S. , Carlos G. ARAGÃO2 , Sidney A. do N Caracterização Física E Química Dos Frutos D E Araçá-Pera (*Psidium acutangulum* D.C.). *ACTA AMAZÔNICA* 23(2-3): 213-217. 1993.
- A.O.A.C International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. Gaithersburg: AOAC International; 2002.
- A.O.A.C. - *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International*. Arlington: Patrícia Cuniff (Ed.), 1997. p.37-10, 42-2, 44-3, 45-16. 2000

- ARTIK, N.; MURAKAMI, H.; MORI, T. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Process.*, Oberhonnefeld- Gierend, v. 12, p. 492- 499, 1998.
- BAUMANN, L. *Dermatologia Cosmética: Princípios e Práticas*. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.
- CÃO,G;ALESSIO,H.M; CULTER, R..Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol.med*, v14, p303-311,1993
- CARMO, et al. Influência das técnicas de cultivo na atividade antioxidante de romã, *Multi-Science Journal*, v. 1, n. 4 (2016) 3-6.
- CHAVAN, U. D.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, v. 75, n. 4, p. 509-512, 2001.
- DECRETO nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961
- Dispõe sobre as Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos.
- D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de janeiro de 1961. Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961 Art 2º § 1º
- FARIA, Calhau C . A bioatividade da romã: impacto na saúde e na doença. *Crit Rev Food Sci Nutr*.2011 ago; 51 (7): 626-34. doi: 10.1080 / 10408391003748100.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome, 2000
- FOOD INGREDIENTS BRASIL - Antioxidantes - Nº6 - 2009. Revista FI. Texto original da Finlays Tea Solutions, traduzido pela Tovani Benzaquem Ingredientes, representante da empresa no Brasil.
- GIADA e MANCINI-FILHO J Antioxidant capacit of the striped sunflower (*Helianthus annuus*, L.) seed extracts evaluated by three in vitro methods. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, V, 1 p 1-7, 2008.
- GOLI, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A. (2004) Antioxidant Activity and Total Phenolic Compounds of Pistachio (*Pistachia vera*) Hull Extracts. *Food Chemistry*, 92, 521-525.
- HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, 2001.
- HOLETZ FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treayment of infectious diseases. *Mem I Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
- ISSN 1677-7042 Nº 169, DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO Sesão 1 pg 6, Regulamento Técnico Para Fixação Dos Padrões De Identidade E Qualidade Para Polpa De Romã, quinta-feira, 1 de setembro de 2016.
- JARDINI, Fernanda Archilla; MANCINI FILHO, Jorge. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.).*Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo , v. 43, n. 1, p. 137-147, Mar. 2007.
- JARDINI, F. A.. Avaliação da atividade antioxidante da Romã (*Punica granatum*, L.) – I. Participação das frações de ácidos fenólicos no processo de inibição da oxidação, São Paulo, p. 13- 14; p. 24 – 27, 2005.
- KULKARNI, AP e Aradhya, SM (2005) Mudanças Químicas e Atividade Antioxidante em Aranhas de Romã durante o Desenvolvimento de Frutas. *Food Chemistry*, 93, 319-324.
- MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall, 2008.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
- PORTARIA Nº 94, de 30 de agosto de 2016
- MORAES, Fernanda P. & COLLA, Luciane M. Alimentos Funcionais E Nutracêuticos: Definições, Legislação E Benefícios À Saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia Vol 3(2)*, 109-122, 2006 ISSN 1808-0804
- NASCIMENTO JUNIOR, B.J. et al . Estudo da ação da romã (*Punica granatum* L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). *Rev. bras. plantas med.*, Botucatu , v. 18, n. 2, p. 423-432, June 2016.
- PÉREZ-JIMÉNEZ,, SAURA-CALIXTO, F. D. Et al, Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP) 2006 Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical
- PEREIRA, Mariana Oliveira. Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioactivos. Instituto Nacional de Agronomia(Mestrado em Engenharia Alimentar).Lisboa, 2010.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.
- QUIROZ, I. Granados, características generales. In: GRANADOS, PERSPECTIVAS YOPORTUNIDADES DE UN NEGOCIO EMERGENTE, 2009, Santiago. Anais... Santiago: Fundación Chile, 2009. p. 6-13.
- RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 29, n. 4, p. 755-760, July 2006 .
- ROCKENBACH, Ismael Ivan et al . Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas,

v. 28, supl. p. 238-244, Dec. 2008 .

RODRIGUES, E.R.; et al. Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. XVI. Punica granatum L. Investigação – Revista Científica da Universidade de Franca (SP), v. 6, n. 1, p. 79-84, 2006.

ROSSING, D.; KAHL, R.; HILDEBRANDT, A. G. Effect of synthetic antioxidants on hydrogen peroxide formation, oxyferro cytochrome P450 concentration and oxygen consumption in liver microsomes. Toxicology, Amsterdam, v. 34, n.1, p. 67-77, 1985.

SANCHES -MORENO, C LARRAURI, JA; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficient polyphenols. J Sci. Food Agric. V.76, p.

SANTOS E.H.B et al; COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS DA ROMÃ (Punica granatum L.). 2010

SOUSA CMM, Silva HR, Vieira GM, Ayres MCC, Costa CS, Araújo DS. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, 30(2): 351-355, 2007.

VASCONCELOS, Thiago Brasileiro et al, Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. UNOPAR Cien Ciênc Biol Saúde 2014;16(3):213-9

YEN, G.C. and Duh, P.D. (1994) Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42.