



UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR

Recredenciada pela Portaria – MEC n.º 747, de 10/09/2020 – D.O.U. 11/09/2020

Mantenedora: UNIPAR – SOCIEDADE EMPRESARIAL LTDA.

Coordenação de Pós-Graduação *Stricto Sensu* e Pesquisa

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura

Jéssica dos Santos Carvalho Botega

Valorização sustentável de *Punica granatum*: atividade antioxidante, antibacteriana de extratos de cascas e sementes e sinergismo com nitrito de sódio

Umuarama

2026

Jéssica dos Santos Carvalho Botega

Valorização sustentável de *Punica granatum*: atividade antioxidante, antibacteriana de extratos de cascas e sementes e sinergismo com nitrito de sódio

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura pela Universidade Paranaense – UNIPAR.

Orientador(a): Suelen Pereira Ruiz Herrig

Umuarama

2026

Ficha Catalográfica

B748v Botega, Jéssica dos Santos Carvalho.

Valorização sustentável de *Punica granatum*: atividade antioxidante, antibacteriana de extrato de cascas e sementes e sinergismo com nitrito de sódio / Jéssica dos Santos Carvalho Botega. – Umuarama : Universidade Paranaense – UNIPAR, 2026.

30 f.

Orientadora: Dr^a. Suelen Pereira Ruiz Herrig .
Dissertação (Mestrado) – Universidade Paranaense – UNIPAR.

1. Romã. 2. Segurança de alimentos. 3. Conservantes naturais. 4. Sinergismo. I. Universidade Paranaense – UNIPAR.
II. Título.

(21 ed.) CDD: 583.76

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

Valorização sustentável de *Punica granatum*: atividade antioxidante, antibacteriana de extratos de cascas e sementes e sinergismo com nitrito de sódio

Dissertação aprovada como requisito obrigatório para obtenção do Grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense – UNIPAR, pela seguinte banca examinadora:

Dra. Luciana Furlaneto Maia

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Maiara Kawana Rezende

Universidade Paranaense

Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig

Universidade Paranaense

Universidade Paranaense – UNIPAR

Umuarama, 26 de fevereiro de 2026

AGRADECIMENTOS

A concretização deste estudo representa o culminar de um período de intensa dedicação e esforço, cuja realização não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de indivíduos a quem manifesto a minha profunda gratidão.

Em primeiro lugar, expresso o meu reconhecimento à família, pelo suporte incondicional, pela paciência e pelo incentivo constante, elementos cruciais que proporcionaram o ambiente de estabilidade necessário para a dedicação integral à pesquisa.

Dirijo um agradecimento especial e inestimável à minha orientadora, Dra. Suelen. A sua excelência profissional, o rigor científico e a orientação precisa foram determinantes para a qualidade e o desenvolvimento metodológico deste trabalho. Agradeço a disponibilidade, a partilha de conhecimento e o exemplo de dedicação à ciência.

O meu profundo apreço estende-se às ilustres docentes, Dra. Maria Graciela e Dra. Zilda, pelas valiosas contribuições e insights académicos que enriqueceram substancialmente a abordagem e a análise dos resultados apresentados.

Agradeço, ainda, aos colegas de laboratório pela colaboração e pelo ambiente de trabalho profícuo. Em particular, manifesto o meu reconhecimento a Jorcilene, Bruna e Gabriel, cujo auxílio técnico e parceria foram essenciais para a execução bem-sucedida dos procedimentos experimentais.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a materialização deste projeto, o meu sincero e eterno reconhecimento.

E acima de tudo a Deus:

"Bendize, ó minha alma, o Senhor, e todo o meu ser o seu santo nome" Sl 102,1.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Material Vegetal	12
2.2 Processo de extração	12
2.3 Análise Fitoquímica por UHPLC-MS/MS	13
2.4 Atividade Antioxidante	13
2.4.1 Determinação de Fenóis Totais	13
2.4.2 Determinação de Flavonoides Totais	14
2.4.3 Ensaio de Sequestro de Radicais Livres (DPPH)	14
2.4.4 Ensaio de Poder Redutor do Íon Férrico (FRAP)	14
2.5 Atividade Antibacteriana	15
2.5.1 Microrganismos e Preparo do Inóculo	15
2.5.2 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima	15
2.5.3 Análise do Efeito de Combinação Antibacteriana	16
2.6 Análise Estatística	16
3 RESULTADOS	16
3.1 Composição Química por UHPLC-MS/MS	16
3.2 Atividade antioxidante	19
3.2.1 Fenóis Totais e Flavonoides Totais	19

3.2.2	Capacidade de Sequestro de Radicais Livres (DPPH) e Poder Redutor do Íon Férrico (FRAP)	19
3.3	Atividade Antibacteriana	20
3.3.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	20
3.3.2	Sinergismo	22
3.4	Análise Estatística	22
	DISCUSSÃO	22
	CONCLUSÕES	24
	AGRADECIMENTOS	26
	REFERÊNCIAS	27

Jéssica dos Santos Carvalho Botega

Valorização sustentável de *Punica granatum*: atividade antibacteriana de extratos de cascas e sementes e sinergismo com nitrito de sódio

RESUMO: A crescente demanda por conservantes naturais na indústria alimentícia, impulsionada pela preocupação com aditivos sintéticos, direciona a pesquisa para fontes alternativas. Subprodutos da romã (*Punica granatum*), como cascas e sementes, são promissores devido aos seus compostos bioativos. Este estudo teve como objetivo promover a valorização sustentável da romã por meio da avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de cascas e sementes, composição química, atividade antioxidante, bem como investigar o potencial sinergismo desses extratos com o nitrito de sódio na inibição microbiana. A pesquisa aborda a necessidade de alternativas naturais aos conservantes sintéticos, especialmente para reduzir o uso de nitrito de sódio e seus riscos toxicológicos. Os frutos da romã foram coletados em Mariluz (PR), secos, triturados e submetidos à extração etanólica em concentrações de 50%, 70% e 90%. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de microdiluição, obtendo-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra bactérias patogênicas relevantes em alimentos. O efeito sinérgico com nitrito de sódio foi avaliado pelo método Checkerboard e pelo Índice Fracional Inibitório (FIC). A composição química foi caracterizada por UHPLC-MS/MS, e a atividade antioxidante por ensaios de fenóis totais, flavonoides totais, DPPH e FRAP. Os extratos da casca de romã, especialmente a 90% de etanol, apresentaram menor CIM contra bactérias como *Escherichia coli* (0,08 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (0,52 mg/mL), *Salmonella enterica* Typhi (1,25 mg/mL) e *Listeria monocytogenes* (0,63 mg/mL). Extratos de sementes de romã tiveram CIMs mais elevadas (5,0–20,0 mg/mL), enquanto o nitrito de sódio manteve CIM de 12,50 mg/mL para todas as bactérias. O sinergismo foi notável: a associação de extratos de sementes de romã a 70% com nitrito de sódio resultou em FIC = 0,14 (forte interação sinérgica contra *S. aureus*). A combinação com extratos de cascas de romã a 90% teve FIC = 0,61 (interação sinérgica moderada), indicando que ambos os extratos potencializam a ação antimicrobiana do nitrito de sódio, com maior intensidade para os extratos das sementes. Compostos majoritários identificados nas sementes de romã (70%) incluíram ácidos málico e gálico, catequina e epicatequina (>50 µg/g). Nas cascas de romã (90%), destacaram-se ácido málico e gálico, luteolina (47,28 µg/g) e quercetina (43,34 µg/g). A maior concentração de fenóis na casca de romã a 90% foi de 587,83 µg/mg, e na semente de romã a 70% foi de 39,48 µg/mg. Para flavonoides, a casca de romã a 90% atingiu 181,87 µg/mg, e a semente de romã a 70% alcançou 16,97 µg/mg. Em termos de atividade antioxidante, extratos das cascas de romã a 90% (EC₅₀ = 2,07 mg/mL) demonstraram maior capacidade de sequestro de radicais livres (DPPH), enquanto extratos das sementes de romã a 70% (2,63 µM sulfato ferroso/mg) apresentaram superior poder redutor férrico (FRAP). Em conclusão, os extratos de cascas e sementes de romã possuem notável potencial como conservantes naturais. A capacidade dos extratos das sementes de romã de potencializar sinergicamente a ação do nitrito de sódio abre novas perspectivas para a redução de aditivos sintéticos na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Romã. Segurança de alimentos. Conservantes naturais. Sinergismo.

Jéssica dos Santos Carvalho Botega

Valorização sustentável de *Punica granatum*: atividade antibacteriana de extratos de cascas e sementes e sinergismo com nitrito de sódio

ABSTRACT: The increasing demand for natural preservatives in the food industry, driven by concerns about synthetic additives, directs research towards alternative sources. Pomegranate (*Punica granatum*) by-products, such as peels and seeds, are promising due to their bioactive compounds. This study aimed to promote the sustainable valorization of pomegranate through the evaluation of the antibacterial activity of peel and seed extracts, their chemical composition, antioxidant activity, and to investigate the potential synergism of these extracts with sodium nitrite in microbial inhibition. The research addresses the need for natural alternatives to synthetic preservatives, especially to reduce the use of sodium nitrite and its toxicological risks. Pomegranate fruits were collected in Mariluz (PR), dried, crushed, and subjected to ethanolic extraction at concentrations of 50%, 70%, and 90%. Antibacterial activity was determined by the microdilution method, obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against relevant foodborne pathogenic bacteria. The synergistic effect with sodium nitrite was evaluated by the Checkerboard method and the Fractional Inhibitory Index (FIC). Chemical composition was characterized by UHPLC-MS/MS, and antioxidant activity by total phenols, total flavonoids, DPPH, and FRAP assays. Pomegranate peel extracts, especially with 90% ethanol, showed lower MICs against bacteria such as *Escherichia coli* (0.08 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (0.52 mg/mL), *Salmonella enterica* Typhi (1.25 mg/mL), and *Listeria monocytogenes* (0.63 mg/mL). Pomegranate seed extracts had higher MICs (5.0–20.0 mg/mL), while sodium nitrite maintained an MIC of 12.50 mg/mL for all evaluated bacteria. Synergism was notable: the association of 70% pomegranate seed extracts with sodium nitrite resulted in an FIC = 0.14 (strong synergistic interaction against *S. aureus*). The combination with 90% pomegranate peel extracts had an FIC = 0.61 (moderate synergistic interaction), indicating that both extracts potentiate the antimicrobial action of sodium nitrite, with greater intensity for the seed extracts. Major compounds identified in 70% pomegranate seeds included malic and gallic acid, catechin, and epicatechin (>50 µg/g). In 90% pomegranate peels, malic and gallic acids, luteolin (47.28 µg/g), and quercetin (43.34 µg/g) stood out. The highest phenol concentration in 90% pomegranate peel was 587.83 µg/mg, and in 70% pomegranate seed was 39.48 µg/mg. For flavonoids, 90% pomegranate peel reached 181.87 µg/mg, and 70% pomegranate seed reached 16.97 µg/mg. In terms of antioxidant activity, 90% pomegranate peel extracts (EC₅₀ = 2.07 mg/mL) demonstrated a greater free radical scavenging capacity (DPPH), while 70% pomegranate seed extracts (2.63 µM ferrous sulfate/mg) showed superior ferric reducing power (FRAP). In conclusion, pomegranate peel and seed extracts demonstrate remarkable potential as natural preservatives. The ability of pomegranate seed extracts to synergistically potentiate the action of sodium nitrite opens new perspectives for reducing synthetic additives in the food industry.

Keywords: Pomegranate. Food safety. Natural preservatives. Synergism.

CAPÍTULO I

Fundamentos sobre Patógenos Alimentares e Potencial Antimicrobiano de *Punica granatum*

RESUMO: A crescente busca por conservantes naturais, os subprodutos da *Punica granatum* (romã), como cascas e sementes, emergem como fontes promissoras de compostos bioativos. Este trabalho objetivou valorizar a romã avaliando a atividade antibacteriana, composição química, atividade antioxidante e o sinergismo de seus extratos com nitrito de sódio na inibição microbiana, visando alternativas aos conservantes sintéticos e seus riscos toxicológicos. Frutos de romã foram extraídos com etanol (50%, 70%, 90%). A atividade antibacteriana foi determinada por microdiluição (CIM e CBM) contra bactérias patogênicas alimentares. O sinergismo com nitrito de sódio foi avaliado pelo método Checkerboard (FIC). A composição química foi caracterizada por UHPLC-MS/MS e a atividade antioxidante por fenóis totais, flavonoides totais, DPPH e FRAP. Os extratos da casca de romã (90% de etanol) apresentaram os menores valores de CIM para *Escherichia coli* (0,08 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (0,52 mg/mL), *Salmonella enterica* Typhi (1,25 mg/mL) e *Listeria monocytogenes* (0,63 mg/mL). Extratos de sementes tiveram CIMs mais elevadas (5,0–20,0 mg/mL). O sinergismo demonstrou que a associação do extrato da semente (70%) com nitrito de sódio apresentou forte interação sinérgica (FIC = 0,14) frente a *S. aureus*, enquanto o extrato da casca (90%) resultou em interação moderada (FIC = 0,61). Compostos majoritários nas sementes foram ácido málico e gálico, catequina e epicatequina (>50 µg/g); nas cascas, ácido málico e gálico, luteolina (47,28 µg/g) e quercetina (43,34 µg/g). A casca (90%) obteve maior concentração de fenóis (587,83 µg/mg com 1,00 etanol) e flavonoides (181,87 µg/mg com 0,75 etanol). No ensaio DPPH, a casca (90%) mostrou maior capacidade de sequestro de radicais livres (EC₅₀ = 2,07 mg/mL) que a semente (EC₅₀ = 5,60 mg/mL). No FRAP, a semente (70%) apresentou maior poder redutor (2,63 µM sulfato ferroso/mg) que a casca (1,27 µM sulfato ferroso/mg). Os extratos de romã demonstram notável potencial como conservantes naturais, com o extrato da semente potencializando sinergicamente o nitrito de sódio, abrindo novas perspectivas para a redução de aditivos sintéticos na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Romã. Atividade antioxidante. Atividade antibacteriana. Conservantes naturais. Sinergismo.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos por agentes biológicos ou químicos é uma preocupação global de saúde pública, responsável por mais de 200 patologias que variam de distúrbios gastrointestinais a condições severas como câncer e falência de órgãos. Anualmente, aproximadamente 10% da população mundial adoece devido a alimentos inseguros, resultando em cerca de 420 mil mortes, com um impacto desproporcionalmente severo em crianças menores de cinco anos, que correspondem a 125 mil óbitos anuais, majoritariamente por doenças diarreicas. Além das manifestações agudas, as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) podem levar a sequelas crônicas, como insuficiências renais, hepáticas e distúrbios neurológicos (OMS, 2025).

Essas enfermidades comprometem o desenvolvimento socioeconômico, sobrecarregam os sistemas de saúde e afetam cadeias produtivas, exigindo uma abordagem multissetorial que integre políticas de saúde, agricultura, vigilância sanitária e educação alimentar (World Bank, 2019). Entre os principais agentes etiológicos de DTAs, destacam-se bactérias como *Salmonella enterica* Typhi, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus subtilis*, que são frequentemente associadas a surtos de intoxicação alimentar (Farid, 2023).

Garantir a segurança alimentar é essencial para promover a saúde individual e coletiva e impulsionar o desenvolvimento econômico. A oferta de alimentos seguros depende tanto de fundamentos científicos sólidos quanto da aplicação eficaz e justa da legislação (Fung, Wang e Menon, 2018).

No contexto da conservação de alimentos, nitritos e nitratos são aditivos amplamente empregados em produtos cárneos. Sua função primordial é prevenir a deterioração, estender a vida útil, contribuir para a formação da cor e o desenvolvimento do sabor, além de inibir o crescimento bacteriano, prevenindo quadros de intoxicação alimentar (Lopez *et al.*, 2021). A legislação brasileira estabelece um limite máximo de 150 ppm de nitrito de sódio nesses produtos, refletindo a necessidade de controle rigoroso devido aos riscos potenciais associados ao consumo excessivo (Brasil, 2019). Preocupações toxicológicas, como o aumento de meta-hemoglobina, levaram a European Food Safety Authority (EFSA) a propor uma ingestão diária aceitável de 0,07 mg/kg de peso corporal (EFSA, 2017). Contudo, persiste uma lacuna científica no entendimento detalhado dos mecanismos de ação desses conservantes e na avaliação do risco de desenvolvimento de resistência bacteriana (Abi Assaf, 2024).

A crescente demanda do consumidor por alimentos mais naturais tem impulsionado a busca por substituições aos conservantes sintéticos. Nesse cenário, compostos de origem

vegetal emergem como alternativas promissoras, devido à sua disponibilidade e à riqueza em compostos fenólicos e ácidos orgânicos, que conferem propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Faisal, 2025).

A romã (*Punica granatum* L.), pertencente à família Lythraceae, é uma fruta de importância global, originária da região que abrange o Irã e o norte da Índia, e posteriormente disseminada para diversas regiões do Mediterrâneo, Ásia, África e Américas (Viuda-Martos, 2010). Cerca de 80% do peso total da fruta é composto por partes comestíveis, sendo estas: suco (80%) e sementes (20%) (Afaq *et al.*, 2005). Estudos demonstram que a romã contém uma elevada diversidade de metabólitos secundários, incluindo punicalaginas, punicalinas, ácido elágico, galocatequina, catequina e diversos ácidos fenólicos. Esses compostos polifenólicos, que se dividem em antocianinas e taninos hidrolisáveis, são responsáveis pela coloração da fruta e por grande parte de sua atividade antioxidante (Afaq *et al.*, 2005). Tais compostos bioativos apresentam elevada capacidade antioxidante e estão associados a diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Man *et al.*, 2022; Ruan *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2025).

A romã demonstra um amplo espectro antimicrobiano, com atividade comprovada contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (Chen *et al.*, 2020). A eficácia desses extratos, especialmente da punicalagina, fundamenta-se em mecanismos de ação multifacetados que comprometem a viabilidade celular bacteriana. Estudos recentes indicam que esses compostos atuam diretamente na membrana citoplasmática, provocando despolarização, aumento da permeabilidade e o consequente vazamento de componentes intracelulares vitais, como íons potássio, proteínas e ácidos nucleicos [Song, Z. *et al.* (2025), Liu, H. *et al.* (2024)]. Além do dano estrutural à membrana, a punicalagina interfere na comunicação bacteriana através da inibição do quorum sensing, o que reduz a expressão de genes de virulência e a formação de biofilmes (Song, Z. *et al.*, 2025). Outros mecanismos incluem a modulação direta de fatores de virulência, como a redução da fixação da proteína A estafilocócica (SpA) e a inibição da síntese de hemolisinas e enterotoxinas (Song, Z. *et al.*, 2025).

A natureza desses compostos bioativos confere-lhes uma maior probabilidade de êxito em testes toxicológicos em comparação com agentes sintéticos (Mickymaray, 2019). Além disso, o uso combinado de diferentes agentes antimicrobianos pode gerar sinergismo, ampliando o espectro de ação, reduzindo a toxicidade e retardando o surgimento de resistência microbiana (Sanhueza *et al.*, 2017). Pesquisas como a de Debib *et al.* (2022) compararam o potencial antibacteriano *in vitro* de extratos de casca, suco e sementes de romã contra bactérias

multirresistentes, correlacionando essa atividade ao conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos.

Até o momento, a literatura científica carece de estudos que investiguem explicitamente o sinergismo entre o extrato de romã e o nitrito de sódio na inibição microbiana. A elucidação desse potencial sinergismo é crucial, pois poderia permitir a redução das concentrações de nitrito de sódio em produtos cárneos, mitigando os riscos à saúde associados ao seu consumo excessivo e alinhando-se à crescente demanda por conservantes mais naturais e sustentáveis. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo promover a valorização sustentável da romã por meio da avaliação da atividade antibacteriana de extratos de suas cascas e sementes, sua composição química e atividade antioxidante, bem como investigar o potencial sinergismo desses extratos com o nitrito de sódio na inibição microbiana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Os frutos de romã foram coletados de árvores saudáveis e maduras em jardins domésticos no município de Mariluz, noroeste do estado do Paraná, Brasil, nas coordenadas (24°00'26.0"S 53°09' 12.6"W), entre fevereiro e março de 2025. Essa região apresenta solos de textura arenosa e média, associados aos arenitos da Formação Caiuá do Cretáceo Superior. Os frutos coletados foram lavados abundantemente com água destilada para eliminar quaisquer impurezas. As romãs foram processadas para a obtenção das cascas e sementes. Inicialmente, as cascas foram removidas manualmente, garantindo a separação precisa do exocarpo (camada externa da casca) do mesocarpo (tecido esponjoso branco). Concomitantemente, as sementes foram cuidadosamente separadas das demais partes do fruto. Tanto o exocarpo quanto as sementes foram então submetidos à secagem em estufa com circulação de ar forçada (TE-39413, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 50 °C por um período de 48 horas. Após a secagem completa, os materiais foram triturados em um moedor doméstico e subsequentemente classificados por meio de peneiras com malha de 42 mesh, a fim de assegurar a uniformidade do tamanho das partículas para as etapas subsequentes de extração.

2.2 Processo de extração

O pó de cascas e sementes de romã foi submetido individualmente à extração com etanol. O processo foi conduzido na proporção de 1:10 (m/v) em uma incubadora de agitação orbital refrigerada, mantida a 30 °C e 90 rpm, por um período de 24 horas (Kupinik *et al.*, 2021). As concentrações de etanol investigadas foram de 50%, 70% e 90%. Após a extração, os

extratos foram filtrados e subsequentemente concentrados sob condições controladas. O rendimento de cada extrato liofilizado foi determinado por pesagem em balança analítica de precisão (Gehaka, modelo AG20C). Os extratos concentrados foram então armazenados sob refrigeração até o momento das análises.

2.3 Análise Fitoquímica por UHPLC-MS/MS

A caracterização do perfil de compostos fenólicos presentes nos extratos da casca (90%) e da semente (70%) da romã foi realizada por cromatografia líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS), seguindo a metodologia detalhada por Dias Bertoco Júnior *et al.* (2025). O sistema utilizado (Shimadzu® modelo 8050 MS e Nexera® X2 HPLC) empregou uma coluna C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm), mantida a 40 °C. A fase móvel consistiu em água Milli-Q acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol grau MS (B), operada a uma vazão de 0,5 mL/min em modo gradiente linear. A detecção e quantificação dos compostos foram realizadas em modo de Monitoramento de Múltiplas Reações (MRM), utilizando uma fonte de ionização por Electrospray (ESI) operada nos modos positivo e negativo. Parâmetros específicos de voltagem, temperatura e fluxo de gases foram ajustados para otimizar a ionização e fragmentação dos analitos. A quantificação foi baseada em curvas analíticas (10 – 250 µg/L) de padrões de referência, incluindo diversos ácidos fenólicos, flavonoides e outros compostos, como quercetina, ácido gálico e catequina, utilizando o software Insight versão 5.123 (Shimadzu®).

2.4 Atividade Antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante dos extratos etanólicos de cascas e sementes de romã foi realizada por meio da determinação dos teores de compostos bioativos (fenóis e flavonoides totais) e da capacidade de sequestro de radicais livres e redução de metais (DPPH e FRAP).

2.4.1 Determinação de Fenóis Totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado seguindo o protocolo de Hills e Swain (1959), com modificações. O extrato bruto foi diluído em metanol nas concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg/mL. A mistura reacional consistiu em 0,3 mL da amostra diluída, 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu (10% v/v em água Milli-Q) e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (7,5% m/v em água Milli-Q). Após repouso por 60 minutos em abrigo da luz, a absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro (FEMTO). A quantificação foi

realizada por meio de uma curva de calibração de ácido gálico (0–100 µg/mL), e os resultados foram expressos em microgramas de equivalente de ácido gálico (µg EAG) por miligrama de amostra.

2.4.2 Determinação de Flavonoides Totais

O conteúdo de flavonoides totais foi mensurado pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio, conforme Alves e Kubota (2013). Os extratos foram ressuspensos em solução de etanol:água (80:20 v/v) para atingir a concentração de 0,25 mg/mL. Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi misturada a 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio (2% m/v em metanol) e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 425 nm. A concentração foi calculada utilizando uma curva padrão de quercetina (5–40 µg/mL), com resultados expressos em µg equivalentes de quercetina (µg EQ) por mg de extrato.

2.4.3 Ensaio de Sequestro de Radicais Livres (DPPH)

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi avaliada segundo a metodologia de Rufino *et al.* (2007). Alíquotas de 10 µL dos extratos em diferentes concentrações (0,2; 0,5; 0,7 e 1,0 mg/mL) foram adicionadas a 290 µL de solução metanólica de DPPH (60 µM), preparada no momento do ensaio. O controle negativo consistiu em 10 µL de metanol em 290 µL da solução de DPPH. A mistura foi mantida no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente, e a absorbância foi medida a 515 nm (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader). A quercetina (60 µM) foi utilizada como padrão de referência (100%). A concentração necessária para reduzir 50% dos radicais livres (EC_{50}) foi determinada a partir da correlação entre a absorbância e a concentração da amostra.

2.4.4 Ensaio de Poder Redutor do Íon Férrico (FRAP)

O potencial antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) foi avaliado conforme Rufino *et al.* (2006). O reagente FRAP foi preparado pela combinação de 25 mL de tampão acetato (0,3 M), 2,5 mL de solução aquosa de TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil) - s-triazina – 10 mM), 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM) e 3 mL de água destilada. Alíquotas de 10 µL dos extratos (0,2; 0,5; 0,7 e 1,0 mg/mL) foram misturadas a 290 µL do reagente FRAP em microplacas e incubadas a 37 °C por 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader). A atividade foi calculada com base em uma curva padrão de sulfato ferroso (0–2000 µM) e expressa em µM de sulfato ferroso por mg de amostra.

2.5 Atividade Antibacteriana

2.5.1 Microrganismos e Preparo do Inóculo

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos da casca e semente de romã foi conduzida frente a um painel de microrganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) e Gram-negativos (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* Typhi ATCC 19214 e *Escherichia coli* ATCC 25922). Os microrganismos foram provenientes do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Vegetais e Microrganismos. O preparo do inóculo foi realizado a partir de cultura de 24 horas em ágar Mueller-Hinton, padronizado para 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em solução salina (0,85%) e conferido em espectrofotômetro (SpectraMax® Plus 384) a 625 nm. Posteriormente, foi realizada diluição 1:10 ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL) para utilização no ensaio.

2.5.2 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), utilizando o método de microdiluição em caldo, conforme as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), com modificações para produtos naturais.

Para a determinação da CIM, os extratos das cascas e sementes de romã foram inicialmente diluídos em água destilada, resultando em uma faixa de amostras de 0,0025 a 0,1608 mg/mL. Essas diluições foram realizadas em série (1:2) em microplacas de 96 poços, cada um contendo 50 µL de caldo Mueller-Hinton. Posteriormente, 50 µL de inóculo bacteriano padronizado ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL) foram adicionados a cada poço, e as microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. O nitrito de sódio, dissolvido em água destilada estéril, foi empregado como controle padrão, com concentrações variando de 1,25 a 100 mg/mL. A leitura da CIM foi efetuada após a adição de 20 µL de uma solução de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1,0% (Reatec®) em cada poço, seguida de incubação a 35 °C por 20 minutos. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato ou do controle padrão capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano (ausência de coloração vermelha).

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada a partir dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível na etapa de CIM. Alíquotas de 10 µL de cada um desses poços, bem como do controle positivo de crescimento bacteriano, foram subcultivadas em placas contendo meio de cultura fresco e incubadas sob condições apropriadas. A CBM foi estabelecida como a menor concentração do extrato ou do controle padrão que resultou na ausência completa de crescimento bacteriano visível nos subcultivos.

2.5.3 Análise do Efeito de Combinação Antibacteriana

O potencial efeito sinérgico antibacteriano entre os extratos de romã (casca 90% e semente 70%) e o nitrito de sódio foi avaliado pelo método Checkerboard (Odds, 2003) em microplacas de 96 poços. As concentrações dos extratos e do nitrito de sódio utilizadas no ensaio foram baseadas em suas respectivas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) previamente determinadas, sendo o nitrito de sódio utilizado em sua CIM de 12,5 mg/mL para o ensaio.

Para a execução do método, diluições seriadas (1:2) dos extratos de romã e do nitrito de sódio foram aplicadas ao longo dos eixos X e Y das microplacas, respectivamente, criando uma matriz de combinações. O inóculo bacteriano foi padronizado para aproximadamente $1,5 \times 10^5$ UFC/mL e adicionado a cada poço. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. A leitura da inibição foi realizada pela adição de 20 µL de revelador 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1,0% em cada poço, seguida de incubação a 35 °C por 20 minutos.

O resultado da combinação foi interpretado através do Índice de Concentração Fracional Inibitória (FIC), calculado pela soma dos CIMs de cada composto em combinação dividida pelo CIM do composto isolado. A interpretação do FIC seguiu os critérios estabelecidos por Batista *et al.* (2019): $FIC \leq 0,5$ indica sinergismo; $0,5 < FIC \leq 1$ indica adição; $1 < FIC \leq 4$ indica indiferença; e $FIC > 4$ indica antagonismo.

2.6 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos como média aritmética \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Minitab Statistical Software.

3. RESULTADOS

3.1 Composição Química por UHPLC-MS/MS

A análise por UHPLC-MS/MS revelou perfis fitoquímicos distintos entre os extratos etanólicos da casca (90%) e da semente (70%) de romã, conforme detalhado na Tabela 1. O extrato da semente de romã foi caracterizado pela predominância de fenóis simples, com a vanilina apresentando a maior concentração ($46,173 \pm 1,600$ µg/g), aproximadamente três vezes superior à observada na casca. Outros compostos majoritários na semente incluíram isovanilina ($17,777 \pm 0,127$ µg/g), ácido p-hidroxibenzóico ($14,704 \pm 0,041$ µg/g) e ácido cafeico ($14,769 \pm 0,338$ µg/g).

Em contraste, o extrato da casca de romã demonstrou um enriquecimento significativo em flavonoides estruturais, com elevadas concentrações de luteolina ($47,254 \pm 0,278 \mu\text{g/g}$) e quercetina ($43,340 \pm 1,059 \mu\text{g/g}$). Além disso, a casca apresentou níveis superiores de ácido quínico ($19,396 \pm 0,501 \mu\text{g/g}$) e kaempferol ($>50 \mu\text{g/g}$). A rutina também foi encontrada em alta concentração na casca ($>50 \mu\text{g/g}$), diferentemente da semente ($4,143 \pm 0,081 \mu\text{g/g}$). Compostos como catequina, ácido gálico e epicatequina excederam o limite de quantificação ($>50 \mu\text{g/g}$) em ambas as matrizes, indicando uma alta densidade de metabólitos secundários. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre as concentrações de compostos fenólicos nos extratos da casca (90%) e semente (70%) de romã ($p = 0,22$), sugerindo desempenho equivalente em termos de teor total desses metabólitos.

Tabela 1. Composição química ($\mu\text{g/g}$ de extrato seco) por UHPLC-MS dos extratos etanólicos das cascas (90%) e sementes (70%) de romã.

Composto	Sementes 70%	Cascas 90%
Ácido Fenólico		
Ac. Cafeico	14,769 \pm 0,338	13,861 \pm 0,584
Ac. Clorogenico	1,978 \pm 0,108	2,221 \pm 0,214
Ac. Ferulico	10,057 \pm 0,084	3,424 \pm 0,320
Ac. Galico	>50	>50
Ac. p-cumarico	4,789 \pm 0,356	7,342 \pm 0,316
Ac. p-hiroxibenzoico	14,704 \pm 0,041	4,653 \pm 0,091
Ac. Protocatecuico	10,280 \pm 0,151	5,351 \pm 0,116
Ac. Resorcilico	9,227 \pm 0,093	5,117 \pm 0,484
Ac. Salicilico	<0,1	<0,1
Ac. Sinapico	1,424 \pm 0,103	0,535 \pm 0,051
Ac. Siringico	5,102 \pm 0,359	2,257 \pm 0,203
Ac. Vanilico	12,992 \pm 1,043	4,285 \pm 0,153
Ácido Orgânico		
Ac. Fumarico	8,544 \pm 0,249	9,304 \pm 0,138
Ac. Malico	>50	>50
Ac. Nicotinico	2,719 \pm 0,068	1,668 \pm 0,006
Ac. Quinico	4,545 \pm 0,275	19,396 \pm 0,501
Alcalóide		
Cafeína	0,87 \pm 0,04	0,74 \pm 0,05
Aldeído Fenólico		
Coniferil Aldeído	3,32 \pm 0,31	ND
Hidroxibenzaldeído	2,31 \pm 0,23	1,51 \pm 0,034
Isovanilina	17,78 \pm 0,13	3,82 \pm 0,13
Seringaldeído	3,20 \pm 0,07	1,88 \pm 0,17
Sinapaldeído	2,18 \pm 0,14	0,37 \pm 0,021
Vanilina	46,17 \pm 1,60	16,51 \pm 0,02
Flavonóides		
Catequina	>50	>50
Epicatequina	>50	>50
Kaempferol	<0,1	>50
Luteolin	<0,1	47,25 \pm 0,28
Morina	<0,1	ND
Naringenina	3,21 \pm 0,05	2,45 \pm 0,15
Quercetina	<0,1	43,34 \pm 1,06
Rutina	4,14 \pm 0,08	>50

Os resultados representam a média \pm desvio padrão.

Aplicando-se o teste T de Student para comparação entre as concentrações dos compostos fenólicos nos extratos de cascas a 90 % de etanol e sementes a 70 % de etanol da romã, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações do composto nos extratos de cascas 90% e sementes 70% ($p = 0,22$), indicando que ambos os tratamentos apresentaram desempenho equivalente em termos de teor deste metabólito.

3.2 Atividade Antioxidante

3.2.1 Fenóis Totais e Flavonoides Totais

Os extratos da casca de romã apresentaram concentrações de fenóis totais significativamente superiores às dos extratos da semente, independentemente da concentração avaliada (Tabela 2). A casca de romã a 1,0 mg/mL alcançou $587,83 \pm 30,97 \mu\text{g EAG/mg}$, um valor quase 30 vezes maior que o da semente na mesma condição ($19,92 \pm 0,90 \mu\text{g EAG/mg}$). De forma similar, os níveis de flavonoides na casca de romã superaram amplamente os da semente em todas as concentrações (Tabela 3). Na concentração de 1,0 mg/mL, a casca atingiu $176,05 \mu\text{g EQ/mg}$, enquanto a semente apresentou apenas $7,83 \mu\text{g EQ/mg}$, demonstrando que a casca é a principal fonte desses metabólitos.

Tabela 2. Concentração de fenóis totais (μg de equivalente de ácido gálico/mg) na casca e semente de romã em diferentes concentrações de extrato.

Extrato	1,00	0,75	0,50	0,25
Semente 70%	$19,92 \pm 0,90^{\text{aB}}$	$39,48 \pm 0,31^{\text{aB}}$	$34,69 \pm 7,69^{\text{aB}}$	$5,72 \pm 0,64^{\text{aB}}$
Casca 90%	$587,83 \pm 30,97^{\text{aA}}$	$328,09 \pm 38,72^{\text{bA}}$	$155,83 \pm 4,87^{\text{cA}}$	$31,77 \pm 3,17^{\text{dA}}$

Os resultados representam a média \pm desvio padrão em triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações (colunas) e letras maiúsculas entre as partes do fruto (linhas) pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$).

Tabela 3. Concentração de flavonoides totais (μg equivalente de quercetina/mg) nos extratos das cascas e sementes de romã em diferentes concentrações de etanol.

Extrato	1,00	0,75	0,50	0,25
Semente 70%	$7,83 \pm 1,46^{\text{bB}}$	$6,12 \pm 0,45^{\text{bB}}$	$16,97 \pm 2,63^{\text{aB}}$	$1,51 \pm 1,09^{\text{cB}}$
Casca 90%	$176,05 \pm 3,75^{\text{aA}}$	$181,87 \pm 6,03^{\text{aA}}$	$178,35 \pm 3,23^{\text{aA}}$	$173,12 \pm 7,92^{\text{aA}}$

Os resultados representam a média \pm desvio padrão em triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações (colunas) e letras maiúsculas entre as partes do fruto (linhas) pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$).

3.2.2 Capacidade de Sequestro de Radicais Livres (DPPH) e Poder Redutor do Íon Férrico (FRAP)

O extrato da casca de romã demonstrou o melhor desempenho antioxidante nos ensaios de DPPH e FRAP (Tabela 4). No ensaio de DPPH, a casca exibiu um menor valor de EC_{50} ($2,07 \pm 0,06 \text{ mg/mL}$), indicando maior capacidade de sequestro de radicais livres em comparação com a semente ($5,60 \pm 1,90 \text{ mg/mL}$). Complementarmente, no ensaio FRAP, a casca de romã também apresentou maior eficácia, com um valor de $1,27 \pm 0,02 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso/mg de amostra, superando o extrato da

semente ($2,63 \pm 0,05 \mu\text{M}/\text{mg}$). Os padrões quercetina (DPPH) e Trolox (FRAP) apresentaram os maiores potenciais, como esperado para substâncias puras.

Tabela 4. Atividade antioxidante avaliada por meio dos ensaios de capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) e do poder redutor férrico (FRAP).

Extrato	DPPH	FRAP
	EC ₅₀ (mg/mL)	(μM sulfato ferroso/mg de amostra)
Semente 70%	$5,60 \pm 1,90^c$	$2,63 \pm 0,05^b$
Casca 90%	$2,07 \pm 0,06^b$	$1,27 \pm 0,02^c$
Quercetina	$0,01 \pm 0,01^a$	-
Trolox	-	$9,17 \pm 0,01^a$

Os resultados representam a média \pm desvio padrão em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$). EC₅₀ = Concentração do extrato que inibe 50% dos radicais livres.

3.3 Atividade Antibacteriana

3.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A avaliação da atividade antimicrobiana demonstrou que os extratos da casca de romã exibiram maior eficácia em comparação com os extratos da semente e o nitrito de sódio (Tabela 5). Os valores de CIM para os extratos da casca, especialmente nas concentrações de 70% e 90%, variaram entre 0,08 e 1,25 mg/mL contra *S. aureus*, *S. enterica* Typhi, *L. monocytogenes* e *E. coli*. Em contraste, os extratos da semente apresentaram CIMs predominantemente superiores (10 a 20 mg/mL). Para *P. aeruginosa*, apenas os extratos da casca a 50% exibiram atividade moderada (10 mg/mL).

Os valores de CBM corroboraram a maior eficácia da casca de romã, com resultados entre 2,50 e 20 mg/mL para a maioria das espécies testadas, enquanto os extratos da semente apresentaram CBMs superiores a 40 mg/mL. O nitrito de sódio, utilizado como controle, exibiu atividade inferior, com CIMs fixas de 12,5 mg/mL e CBMs entre 25 e 100 mg/mL, demonstrando menor potência em comparação aos extratos da casca de romã.

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos da semente e da casca da romã nas variáveis 50%, 70% e 90% de etanol (mg/mL).

Bactérias	Semente 50 %	Semente 70 %	Semente 90 %	Casca 50 %	Casca 70 %	Casca 90 %	Nitrito de sódio
CIM							
<i>S. aureus</i> ATCC 27853	10,00±0,00 ^c	10,00±0,00 ^c	20,00±0,00 ^e	1,25±0,72 ^b	0,63±0,36 ^a	0,52±0,18 ^a	12,50±0,00 ^d
<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 19214	10,00±0,00 ^c	10,00±0,00 ^c	20,00±0,00 ^e	0,63±0,00 ^{ab}	0,63±0,18 ^a	1,25±0,36 ^b	12,50±0,00 ^d
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	10,00±5,77 ^{ab}	10,00±0,00 ^a	20,00±11,55 ^b	0,63±0,00 ^a	1,25±0,36 ^a	0,63±0,36 ^a	12,50±0,00 ^a
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10,00±0,00 ^{bc}	10,00±2,89 ^b	20,00±5,77 ^c	1,25±0,00 ^a	0,16±0,09 ^a	0,08±0,05 ^a	12,50±0,00 ^{bc}
CBM							
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	20,00±11,55 ^b	20,00±0,00 ^b	40,00±23,09 ^c	2,50±0,00 ^a	5,00±2,17 ^a	2,50±1,91 ^a	100,00±0,00 ^d
<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 19214	20,00±0,00 ^b	20,00±0,00 ^b	40,00±0,00 ^c	2,50±0,00 ^a	2,50±1,26 ^a	2,50±0,72 ^a	100,00±0,00 ^d
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	20,00±0,00	20,00±0,00	40,00±11,55	2,50±0,00	2,50±0,36	12,50±0,36	>100±0,00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>40,00±0,00	>40,00±0,00	>40,00±0,00	10,00±0,00 ^a	20,00±15,28 ^a	20,00±0,00 ^a	25,00±0,00 ^a

Os resultados representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$).

3.3.2 Sinergismo

Os extratos etanólicos de romã demonstraram forte interação sinérgica com o nitrito de sódio contra *S. aureus* ATCC 29313 (Tabela 6). A combinação do extrato da casca de romã a 90% com nitrito de sódio resultou em um FIC de 0,61, indicando um efeito sinérgico moderado. Notavelmente, a combinação do extrato da semente de romã a 70% com nitrito de sódio apresentou um FIC de 0,14, o que sugere um sinergismo elevado. Esses achados reforçam o potencial da romã como fonte de compostos bioativos capazes de otimizar a eficácia antimicrobiana de conservantes convencionais.

Tabela 6. Índice fracional inibitório (FIC) dos extratos etanólicos de *Punica granatum* (casca 90% e semente 70%) e nitrito de sódio contra *S. aureus* ATCC 29313.

Bactéria	Composto	FIC
<i>S. aureus</i> ATCC 29313	Casca a 90 % + nitrito de sódio	0,61
	Semente a 70 % + nitrito de sódio	0,14

3.4 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos como média aritmética \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Minitab Statistical Software.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram o potencial da romã (*Punica granatum*) como fonte de compostos bioativos com atividades antioxidantes e antibacterianas, destacando as diferenças significativas entre os extratos da casca e da semente, bem como o sinergismo com o nitrito de sódio. Esta discussão integra nossos achados com a literatura científica recente, fornecendo uma perspectiva aprofundada sobre os mecanismos e implicações biotecnológicas. A análise por UHPLC-MS/MS revelou que a casca de romã é uma fonte rica em flavonoides, como luteolina e quercetina, e ácidos fenólicos, como o ácido quínico, enquanto a semente concentra fenóis simples, como a vanilina. Estes achados estão em consonância com estudos recentes que confirmam a casca como o principal reservatório de elagitaninos, a exemplo da punicalagina, e flavonoides, compostos conhecidos por suas potentes atividades biológicas (Cava *et al.*, 2024; Chaaba *et al.*, 2025).

As médias foram comparadas pelo teste t de Student para amostras independentes, adotando-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) (Montgomery & Runger, 2012). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os extratos de casca (90%) e semente (70%) ($p = 0,22$), indicando desempenho equivalente quanto ao teor do metabólito.

A maior diversidade e concentração de polifenóis na casca justificam sua superioridade em diversas aplicações, como observado em nossos ensaios. Nossos resultados de atividade antioxidante, avaliados pelos ensaios de DPPH e FRAP, corroboram a literatura que aponta a casca de romã como um potente antioxidante natural. A casca apresentou um valor de EC_{50} significativamente menor no ensaio DPPH ($2,07 \pm 0,06$ mg/mL) em comparação com a semente ($5,60 \pm 1,90$ mg/mL). Esta maior capacidade de sequestro de radicais livres na casca é atribuída à alta densidade de grupos hidroxila em sua estrutura polifenólica, que facilita a doação de hidrogênios e a estabilização de radicais livres (Faizatun *et al.*, 2026; Yuniarto *et al.*, 2025). No ensaio FRAP, a casca de romã também demonstrou maior poder redutor ($1,27 \pm 0,02$ μ M de sulfato ferroso/mg de amostra) em relação à semente ($2,63 \pm 0,05$ μ M/mg). Este resultado é consistente com a literatura, que posiciona subprodutos agroindustriais de romã como antioxidantes superiores a conservantes sintéticos em matrizes lipídicas, devido à sua capacidade de doar elétrons e quelar metais de transição que catalisam reações oxidativas (Cava *et al.*, 2025). A presença de compostos como quercetina e luteolina na casca contribui diretamente para essa elevada capacidade antioxidante, atuando em diferentes fases da oxidação lipídica e protegendo a integridade celular.

A avaliação da atividade antibacteriana revelou que os extratos da casca de romã exibiram maior eficácia contra um painel de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, com valores de CIM variando entre 0,08 e 1,25 mg/mL. Essa superioridade é atribuída à presença de punicalagina e outros polifenóis, que atuam desestabilizando a membrana citoplasmática bacteriana, inibindo sistemas enzimáticos e interferindo na formação de biofilmes (Forgione *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2025).

Um dos achados mais relevantes deste estudo foi o sinergismo observado entre os extratos de romã e o nitrito de sódio. A combinação do extrato da semente de romã a 70% com nitrito de sódio resultou em um Índice de Concentração Fracional Inibitória (FIC) de 0,14, indicando um sinergismo elevado. Para a casca de romã a 90%, o FIC foi de 0,61, sugerindo um sinergismo moderado. Este efeito sinérgico é de grande importância para a indústria alimentícia, pois permite a redução da concentração de conservantes sintéticos, como o nitrito de sódio, sem comprometer a segurança microbiológica dos alimentos (Elgadir *et al.*, 2025). A

literatura recente tem explorado a combinação de extratos vegetais com nitritos para mitigar os riscos associados ao uso excessivo de nitrito, como a formação de nitrosaminas, e nossos resultados reforçam essa estratégia (Feng *et al.*, 2024; Sulieman *et al.*, 2023). O mecanismo de sinergismo pode envolver a ação multialvo dos polifenóis, que desestabilizam a parede celular bacteriana, facilitando a ação do nitrito na inibição enzimática respiratória.

Os resultados deste estudo destacam o potencial biotecnológico dos extratos de romã, especialmente da casca, como agentes antioxidantes e antimicrobianos naturais. A capacidade de sinergismo com o nitrito de sódio abre novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de conservação de alimentos mais seguras e sustentáveis, alinhadas com a crescente demanda por alternativas naturais na indústria alimentícia. A utilização desses extratos pode contribuir para a redução de aditivos sintéticos, melhorando a qualidade e a segurança dos produtos alimentícios.

CONCLUSÕES

Este estudo investigou o potencial sinérgico antibacteriano dos extratos de casca e semente de romã (*Punica granatum* L.) em combinação com o nitrito de sódio, um conservante amplamente utilizado na indústria cárnea. Nossos resultados demonstraram que a romã possui um espectro antimicrobiano significativo, atuando por meio de mecanismos multifacetados que incluem a desorganização da membrana celular, a interferência na expressão proteica e a inibição de fatores de virulência e *quorum sensing* bacteriano. Tais achados corroboram o crescente interesse em compostos bioativos naturais como alternativas ou coadjuvantes aos aditivos sintéticos.

A contribuição mais relevante deste trabalho reside na elucidação do potencial sinergismo entre os extratos de romã e o nitrito de sódio. A identificação de um Índice de Concentração Fracional Inibitória (FIC) que indica sinergismo ou adição para as combinações testadas representa um avanço significativo. Este efeito combinado não apenas amplia o espectro de ação antimicrobiana, mas também oferece uma estratégia promissora para a redução das concentrações de nitrito de sódio em produtos alimentícios. Tal redução é de suma importância para mitigar os riscos toxicológicos associados ao consumo excessivo de nitritos, como a formação de meta-hemoglobina e a potencial geração de nitrosaminas, ao mesmo tempo em que atende à crescente demanda do consumidor por alimentos mais seguros e com menor teor de aditivos químicos.

Em um cenário global onde a segurança alimentar e a sustentabilidade são imperativas, a valorização da romã como fonte de agentes antimicrobianos naturais e sinérgicos com conservantes tradicionais abre novas perspectivas para a inovação na indústria alimentícia. Os resultados aqui apresentados não apenas preenchem uma lacuna na literatura científica sobre o sinergismo entre extratos de romã e nitrito de sódio, mas também fornecem uma base sólida para o desenvolvimento de formulações mais eficazes e seguras para a conservação de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam sua profunda gratidão à Universidade Paranaense (UNIPAR) e a Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo apoio institucional, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas e financiamento de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABI ASSAF, Justin *et al.* Common food preservatives impose distinct selective pressures on *Salmonella Typhimurium* planktonic and biofilm populations. **Food Microbiology**, v. 121, p. 104517, 2024.
- AFAQ, Farrukh *et al.* Pomegranate Fruit Extract Modulates UV-B-mediated Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinases and Activation of Nuclear Factor Kappa B in Normal Human Epidermal Keratinocytes. **Photochemistry and photobiology**, v. 81, n. 1, p. 38-45, 2005.
- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 34(1), 2013.
- BATISTA, A. F. P. *et al.* Inhibition of *Salmonella* entérica serovar Typhimurium by combined carvacrol and potassium sorbate in vitro and in tomato paste. **LWT – Food Science and Technology**, v. 100, p. 92-98, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 272, de 14 de março de 2019. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 52, p. 73, 18 mar. 2019. Disponível em: https://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/67378977/do1-2019-03-18-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-272-de-14-de-marco-de-2019-67378770#wrapper. Acesso em: 14 nov. 2025.
- CAVA, Ramón *et al.* Assessing the impact of pomegranate peel extract active packaging and high hydrostatic pressure processing on color and oxidative stability in sliced nitrate/nitrite-reduced iberian dry-cured loins. **Foods**, v. 13, n. 3, p. 360, 2024.
- CAVA, R.; MONTERO, I.; LADERO, L. Impacto sinérgico do extrato da casca de romã e da alta pressão hidrostática no controle da descoloração e oxidação em linguiça seca ibérica durante o armazenamento. **Food and Bioprocess Technology**, v. 18, p. 481-495, 2025.
- CHAABA, Raja *et al.* Atividade antioxidante e potencial efeito modulador do colesterol do extrato hidroetanólico da casca de *Punica granatum* L. **Chemistry & Biodiversity**, v. 23, n. 1, p. e01668, 2025.
- CHEN, Jing *et al.* Antimicrobial activity of pomegranate peel and its applications on food preservation. **Journal of Food Quality**, v. 2020, n. 1, p. 8850339, 2020.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests. Approved Standard M07-A10. CLSI, Wayne, 2015.
- DEBIB, Aicha *et al.* Efeito inibitório bacteriano de extratos de romã argelina (*Punica granatum* L.) (casca, suco e semente) contra bactérias multirresistentes. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 11, n. 4, p. e4622-e4622, 2022.

DIAS BERTOCO JÚNIOR, Fábio *et al.* Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Flavonoids from Banana Inflorescence and Characterization of Its Fibrous Residue. **Separations**, v. 12, n. 5, p. 109, 2025.

ELGADIR, M. Abd et al. Plant-based preservation of meat: a critical narrative review of bioactive extracts, essential oils, and next-generation delivery systems. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 9, p. 1722227, 2025.

FAISAL, Muhammad *et al.* Natural Meatball Preservative Using Edible Coating from Modified Shrimp Shells Chitosan and Durian Skin Liquid Smoke. **South African Journal of Chemical Engineering**, 2025.

FAIZATUN, Faizatun; MIFTAHURROHMAH, Nur; ROSMAWATI, Rosmawati. Atividades antioxidantes e anticologenase do suco de casca de romã fermentada (*Punica granatum L.*). **Cosméticos**, v. 13, n. 2, pág. 73, 2026.

FARID, Neha; WAHEED, Amna; MOTWANI, Simran. Antimicrobianos sintéticos e naturais como controle de patógenos transmitidos por alimentos: uma revisão. **Heliyon**, v. 9, n. 6, 2023.

FENG, Xiaohui; SHEN, Zhiyu; XUE, Xiaoling; LÜ, Hui; BI, Haidan. Effect of partial nitrite substitution by pomegranate powder and tea polyphenols on inulin ham sausage quality [Efeito da substituição parcial de nitrito por pó de romã e polifenóis do chá na qualidade de salsicha de presunto com inulina]. **Science and Technology of Food Industry**, v. 45, n. 10, p. 84–92, 2024. DOI: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070208>.

FORGIONE, Giuseppina *et al.* Extratos de casca de romã e folha de oliveira para otimizar a conservação de carne fresca: aditivos alimentares naturais para prolongar a vida útil. **Microorganisms**, v. 12, n. 7, p. 1303, 2024.

FUNG, Fred; WANG, Huei-Shyong; MENON, Suresh. Food safety in the 21st century. **Biomedical journal**, v. 41, n. 2, p. 88-95, 2018.

HILLIS, W. E.; SWAIN, T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. II.—The analysis of tissues of the Victoria plum tree. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 2, p. 135-144, 1959. doi: 10.1002/jsfa.2740100211.

LIU, Hongli *et al.* Atividade antimicrobiana e mecanismos da punicalagina contra *Vibrio parahaemolyticus*. **Foods**, v. 13, n. 9, p. 1366, 2024.

LOPEZ, Constanza Maria *et al.* Strategies for nitrite replacement in fermented sausages and effect of high pressure processing against *Salmonella* spp. and *Listeria innocua*. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2617, 2021.

MAN, Guowei et al. Perfil da composição fenólica na casca da romã de nove cultivares selecionadas usando UHPLC-QTOF-MS e UPLC-QQQ-MS. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 807447, 2022.

MICKYMARAY, Suresh. Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 257, 2019.

MONTGOMERY, Douglas C.; RUNGER, George C. Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros. 5. ed. Rio de Janeiro: **LTC**, 2012.

ODDS, Frank C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.

Painel da EFSA sobre aditivos alimentares e fontes de nutrientes adicionadas aos alimentos (ANS) *et al.* Reavaliação do nitrito de potássio (E 249) e do nitrito de sódio (E 250) como aditivos alimentares. **Efsa journal**, v. 15, n. 6, p. e04786, 2017.

RUAN, Jing-Hui *et al.* Compostos fenólicos e bioatividades das cascas da romã (*Punica granatum L.*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 70, n. 12, p. 3678-3686, 2022.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH, **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico**, 2007.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP), **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico**, 2006.

SANHUEZA, Loreto *et al.* Interações sinérgicas entre compostos fenólicos identificados no extrato de bagaço de uva com antibióticos de diferentes classes contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0172273, 2017.

SONG, Zhuoning *et al.* Antibacterial and antiviral properties of punicalagin. **Medicine International**, v. 5, n. 6, p. 65, 2025.

VIUDA-MARTOS, Manuel; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, Javier; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 6, p. 635-654, 2010.

WANG, Jing *et al.* Punicalagina inibe o crescimento e a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*: a ômica integrada revela mecanismos potenciais. **BMC microbiology**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 2025.

WORLD BANK. **The safe food imperative: accelerating progress in low- and middle-income countries**. Washington, D.C.: World Bank Group, 2019. Disponível em: <https://documents.worldbank.org/en/publication/documents-reports/documentdetail/484371545400065950/the-safe-food-imperative-accelerating-progress-in-low-and-middle-income-countries>. Acesso em: 8 nov. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne diseases**. Geneva: WHO, [202-?]. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1. Acesso em: 11 fev. 2026. Acesso em: 6 set. 2025.

YUNIARTO, Ari; JUNAINIDIN; SETIAWAN, Abdul Aziz; JUANDA, Dadang; et al. Analysis of antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract: voltammetric, spectrophotometric, and in silico studies as a potential antidiabetic candidate. **Talanta Open**, v. 12, art. 100569, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talo.2025.100569>

ZHOU, Zhiping *et al.* Componentes fenólicos e atividade biológica da romã. **Chemistry & Biodiversity**, v. 22, n. 3, p. e202402301, 2025.