XXIX SEPE Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão
Teaching, Research and Extension Symposium
Presente e futuro:
uso consciente da Inteligência Artificial
Today and tomorrow:
the conscious use of Artificial Intelligence
E-book
ISBN 978-65-5852-415-1
20 A 22 DE OUTUBRO DE 2025
OCTOBER 20th to 22nd, 2025
UFN Universidade Franciscana Franciscan University
70 ANOS

DOI: https://doi.org/10.48195/sepe2025.29777

CITOTOXICIDADE E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE ROMÃ E ÁCIDO ELÁGICO VISANDO APLICAÇÃO TÓPICA

Larissa Gindri Wenning[1]*; Francine Carla Cadoná[2]; Camila Franco[3]

RESUMO

Os melasmas atingem 90% de incidência na população, sendo controlados por hidroquinona 2-5%, niacinamida 1-5%, ácido kójico 1-4% e ácido azeláico 15-20%, geralmente associados em formulações tópicas. O ácido elágico possui efeito clareador e antioxidante e, é encontrado no óleo de romã, o qual contém polifenóis antioxidantes e inibidores da tirosinase, sendo alternativas terapêuticas. Entretanto, há poucas informações de seus empregos de forma isolada. O estudo da citotoxicidade e potencial antioxidante do óleo de romã e ácido elágico em concentrações tópicas de 1-10% objetiva futura aplicação em formulação tópica. A citotoxicidade foi realizada por ensaio de brometo de (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tretrazolina em queratinócitos (HaCaT) e melanomas humano e de camundongo (A375 e B16F10). Aplicaram-se tratamentos a 100% (100 µM), 25%, 10%, 5% e 1% de ambos os compostos, meio de cultura Dulbeccos Modified Eagles Medium, peróxido de hidrogênio 0,01%, dimetilsulfóxido 1% e éster de metotrexato 0,01%. A atividade antioxidante foi avaliada por DCFH_DA e óxido nítrico. Em 24 horas, o óleo de romã nas concentrações de 10 a 5% reduziu a viabilidade das células A375 e B16F10, em 72 horas o ácido elágico foi citotóxico para as células HaCaT e, para A375 e B16F10 tanto ácido elágico quanto óleo de romã foram citotóxicos em diferentes concentrações. A produção de espécies reativas de oxigênio ocorreu em melanomas com especial destaque para o ácido elágico. A geração de espécies reativas de nitrogênio foi também observada nas três linhagens, na maioria dos tratamentos, especialmente após 72 horas. Conclui-se que ácido elágico e o óleo de romã são seguros aos queratinócitos e eficazes no controle de melanomas por gerarem citotoxicidade e, geram espécies de oxigênio em como espécies de nitrogênio, portanto agem por diferentes mecanismos que levam a morte das células tumorais, podendo ser utilizados como antitumorais e antioxidantes via tópica.

Palavras-chave: Atóxico, Eficácia, Melasma, Seguro.

INTRODUÇÃO

A procura por cosméticos e procedimentos estéticos tem crescido de forma significativa, devido à valorização do autocuidado (Santos; Amorim; Rodrigues, 2021). Os melasmas se destacam pela prevalência em 90% das mulheres em idade fértil (Silva; Moraes, 2022). Ocorre

[1] Larissa Gindri Wenning, estudante de graduação curso de Farmácia - Universidade Franciscana-UFN, Santa Maria, RS. E-mail:Larissagwenning7@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0009-0009-0732-428X

o aumento de melanina na pele, manifestado por manchas amarronzadas e irregulares, cuja origem está relacionada à exposição da pele à luz solar, fontes de calor, alterações hormonais, sendo predominante na face, em especial nas bochechas, têmporas e nariz (Gonçalves, 2021).

A melanina além de ser responsável pela cor da pele, pelos e cabelos, tem ação fotoprotetora, reduzindo a absorção da radiação ultravioleta (UV) (Macrini, 2004). Porém quando em excessose deposita na pele e gera melasmas, que, fisiologicamente não trazem dano, mas esteticamente afetam a autoestima do indivíduo (Sanches, *et al*, 2024).

O controle dos melasmas baseia-se em tratamentos tópicos que reduzem as manchas e evitam sua progressão. Recomenda-se o uso diário de protetor solar com FPS ≥ 30 e o tratamento padrão-ouro é a hidroquinona de 2–5%, que inibe a tirosinase e a formação de melanina (SBCD, 2024). Sua eficácia pode ser potencializada por associação com ácido glicólico, corticosteroides ou ácido retinóico, embora esses tratamentos possam causar irritação, vermelhidão, prurido, fotossensibilidade e são contraindicados na gestação (Mahajan *et al*., 2022). Outros ativos são empregadados como niacinamida (vitamina B3) a 1-5% e; o ácido kójico de 1–4 e o ácido azelaico de 15-20%, mas estes últimos apresentam alguns efeitos adversos (irritações e dermatite de contato pigmentada paradoxal e; ardência, queimação e coceira na pele, respectivamente) (Portilho, Pacheco, 2016; Mahajan *et al*, 2022; Castro; Jesus; Brum, 2023).

O uso de plantas e compostos naturais se destacam, sendo veiculados em formulações cosméticas (Ferreira, 2019). Entre os bioativos, destaca-se o ácido elágico (AE), encontrado no óleo de romã (OR) e, presente em cosméticos com ação clareadora e ação antioxidante, como em: Serum Intensive Elastin® – Peelline (acerola e romã) e, Peeling Enzimático® – Lakma (extrato de romã, niacinamida e nanopartículas de ácido kójico) ou ainda, composições contendo AE 1% + talasferas de vitamina C a 5% e niacinamida a 4% (ácido elágico 30g - Drogaria Minas-Brasil, 2025).

A romã é o fruto produzido pela *Punica granatum L*., romãzeira e, sua composição é rica em polifenólicos, que possuem um potencial antioxidante (Valero-Mendonza *et al*.,2023). Alguns compostos se destacam como o AE, um potente antioxidante, capaz de combater radicais livres, potencializando o efeito da glutationa, protegendo da ação dos raios solares e inibindo a atividade da tirosinase (Websix, [s.d.]). Com o uso prolongado, pode diminuir a produção desta enzima e inibir a proliferação dos melanócitos (Lima; Felipe, 2017).

Portanto, o estudo do OR e do AE quanto a citotoxicidade e potencial antioxidante frente a queratinócitos humanos (células HaCaT) e melanomas de humanos e camundongos (A375 e

B16F10, respectivamente), considerando concentrações entre 1-10%, referenciadas por Lima; Felipe (2017) como sendo de uso terapêutico para combater melasmas, é o objetivo desta pesquisa para futuras aplicações. A relevância está no desenvolvimento de formulação para hipercromias a partir de um produto natural e isolado, com possibilidade de redução de custos ao usuário, confirmação de eficácia e segurança e, redução de efeitos adversos em relação a formulações com ativos sintéticos e associações.

METODOLOGIA

MATERIAIS

Ácido Elágico (90% pureza, PM = 302,19 g/mol, Active Pharmaceutica), Óleo de Romã (*Punica granatum* L, 100% pureza, d = 0,916 g/mL, Mundo dos Óleos®), brometo de (3-4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tretrazolina (MTT, Invitrogen®), Meio de cultura Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma Aldrich®), Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco®), Penicilina-Streptomicina (Sigma Aldrich®), Dimetilsulfóxido p.a. (DMSO, Synth®), diclorofluoresceína diacetato (DCFH_DA, Sigma Aldrich®), tampão tris/HCl (tris(hidroximetil)aminometano, Sigma Aldrich), etanol p.a. (Neon®), sulfanilamida (Sigma Aldrich®), hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenediamina (Sigma Aldrich®), ácido fosfórico p.a. (Synth®), tripsina 0,05% de /edta-Na_2 (Sigma Aldrich®), tampão fosfato (PBS, Laborclin®), peróxido de hidrogênio (H_2O_2, Synth®), éster dietílico de metotrexato (EM, PM 510,55 g/mol, grau de pureza de 70%).

MÉTODOS

Ensaio de viabilidade celular por MTT

As células HaCaT (ATCC® PCS-200-011TN), B16F10 (ATCC®CRL-6475) e A375 (ATCC® CRL-1619) foram cultivadas em meio de cultura DMEM com alta glicose, suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina e estreptomicina e mantidas em atmosfera de 5% de CO_2/95% de O_2 a 37ºC em garrafas de cultivo. Após crescimento foram mantidas em placas de 96 poços contendo (2.10^4 células/poço para 24h e 5.10^4 células/poço para 72h) por 24h antes da aplicação dos tratamentos. Posterior a incubação, os tratamentos preparados utilizando: 0,666 g de AE, 500 µL de DMSO (1%) e qsp 50 mL de DMEM, perfazendo a solução-mãe (100 µM, 100%) e foram diluídos a 25%, 10%, 5% e 1%; além dos controles DMEM, H_2O_2 a 0,01%, DMSO a 1% e éster de metotrexato (EM) a 0,01% (1,74 µM), sendo incubado em estufa por 24 e 72h. O OR foi preparado da mesma forma, considerando d = 0,916

g/mL, portanto 727 µL em 500 µL de DMSO e qsp 50 mL de DMEM, seguido das mesmas diluições e incubação.

No dia da análise foi realizada a remoção de todo o conteúdo dos poços e a solução de MTT a 5 mg mL^{-1} foi adicionada e incubada por 3h. A seguir, os cristais de formazan formados por clivagem do tetrazolium foram dissolvidos em DMSO e a absorbância será lida em 570 nm (Anthos 2010 Instrulab, Software Adapt). A viabilidade celular foi calculada usando a Equação 1: Viabilidade Celular (%) = $(Abs_{amostra}/Abs_{controle}) \times 100$,

onde: $Abs_{amostra}$ é a absorbância das células tratadas com diferentes concentrações de AE e OR; $Abs_{controle}$ é a absorbância das células tratadas com o controle, ou seja, incubadas com meio de cultura DMEM. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) e analisadas por análise de variância – fator único, seguido de Tukey em programa Excel ($p<0.05$ de significância).

Ensaio da atividade antioxidante por DCFH_DA:

Após 24h, os tratamentos foram aplicados permanecendo 24h em estufa e, após esse período, 50 µL do sobrenadante foram removidos para uma placa preta de 96 poços juntamente com 65 µL de tampão Tris/HCl (tris(hidroximetil) aminometano) a 10 mM pH 7,4; e 10 µL de DCFH-DA a 1 mM previamente diluída 1:10 em etanol, sendo novamente incubada por 1h a temperatura ambiente e protegida da luz. A seguir foi realizada a leitura da fluorescência por espectrofluorímetro a 488/525 nm (Synergy HTX reader, BioTek®).

Ensaio da atividade antioxidante por NO:

Após 24h da aplicação dos tratamentos e incubação em estufa, foram pipetados 100 µL de sobrenadante para uma placa de 96 poços transparente, adicionados a 100 µL do reagente de Griess (0,23 g de sulfanilamida, 0,012 g de N-(1-naftil) etilenediamina dihidrocloreto e 10 mL de ácido fosfórico, preparado sob agitação magnética e aquecimento a 40ºC), deixado à temperatura ambiente por 15 minutos e realizado a leitura a 540 nm no espectrofotômetro (Synergy HTX reader, BioTek®) (Choi *et al.*, 2012).

Os resultados dos ensaios em cultura celular foram expressos como média ± desvio padrão (DP, n=3) e foram analisados por análise de variância fator único (ANOVA), seguido Tukey em Excel ($p<0.05$ de significância).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

O ensaio de viabilidade celular realizado por método colorimétrico de MTT, sendo considerados citotóxicos quando reduzem a viabilidade celular abaixo de 75% (Oliveira *et al.*, 2018), conforme resultados apresentados na Figura 1.

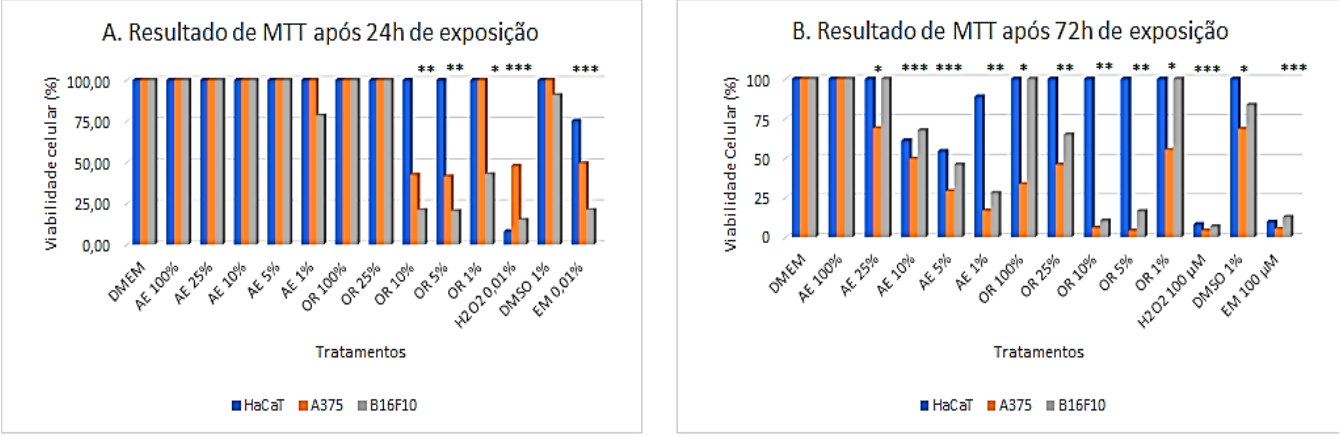


Figura 1. Resultado de viabilidade celular por MTT em 24 horas (A) e 72h (B). Diferenças estatísticas foram consideras para $p<0,05$ e descritas no texto. ANOVA fator único e Tukey/24h: HaCaT: F = 23,05, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $1,53.10^{-11}$, HSD = 0,61; A375: F = 71,88, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $5,76.10^{-18}$, HSD = 0,25; B16F10: F = 328,67, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $5,12.10^{-27}$, HSD = 0,17. ANOVA fator único e Tukey/72h: HaCaT: F = 7,39, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $5,21.10^{-06}$, HSD = 0,85; A375: F = 161,99, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $9,02.10^{-23}$, HSD = 0,19; B16F10: F = 45,42, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $2,58.10^{-15}$, HSD = 0,23.

Fonte: autora própria

Em queratinócitos após 24h de exposição, AE e OR não afetaram a viabilidade celular nas concentrações testadas, portanto, demonstra segurança de uso. Houve a redução de viabilidade somente pelo H_2O_2, uma vez que esse composto é um agente oxidante que desencadeia estresse oxidativo intracelular, promovendo danos às biomoléculas, interrupção da progressão do ciclo celular e, consequentemente, a morte celular (Heo; Kim; Kang, 2020).

A exposição de melanomas aos tratamentos após 24h, ambas as linhagens, observou-se o controle de proliferação celular com OR 10 e 5% e, ainda se confirma a ação do H_2O_2 e o EM ambos a 0,01%. Ainda, OR 1% reduziu a viabilidade de B16F10, sendo essa linhagem mais sensível. Não se observou eficácia do AE frente aos melanomas nas 24h.

O EM é um antimetabólito, antifolato, que bloqueia enzimas essenciais para a síntese de DNA e RNA, resultando no efeito citotóxico para o tratamento do câncer (Koźmiński *et al.*, 2020; Hanoodi; Mittal, 2025; Cronstein, 1997). Ainda, estudos com células JAR (carcinoma

corneocelular) demostraram que a exposição ao EM de 0,1-2,5 µg/mL gerou apoptose após 48h (Chen *et al*., 2009).

Já nas 72h, os queratinócitos sofreram citotoxicidade por AE 10 e 5% (61,1-54,4%, respectivamente), H_2O_2 0,01% e EM 0,01%. Considerando que o AE é um polifenol e estudos clínicos com polifenóis, como o resveratrol, demonstraram a permanência cutânea do ativo em janela de poucas horas (que não excede 8h) sobre a pele humana quando aplicado em nanoemulsão a 2% (Nastiti *et al*., 2020). Este tempo de permanência sobre a pele não é suficiente para induzir respostas citotóxicas em células normais, pois há outros fatores fisiológicos como área de aplicação e a temperatura da pele que podem influenciar a absorção, evaporação e distribuição cutânea do fármaco (Pensado *et al*., 2025). Confirma-se, portanto, as observações por MTT, onde AE não teve ação citotóxica frente às células HaCaT em 24h de exposição, tendo citotoxicidade somente após 72h, a 10 e 5% nos experimentos *in vitro*, o que não aconteceria supostamente *in vivo*.

Zago *et al*., (2025) relatou que, o AE em concentrações superiores a 39 µM e após 72h de tratamento, afetou a viabilidade das células NOK (queratinócitos orais normais). Nas linhagens A375 e B16F10, a citotoxicidade foi observada em 72h, com AE (25–1% e 10–1%) e OR (100–1% e 25–5%), respectivamente, o que pode ser explicado pela sobrecarga lipídica que dificulta a permeação celular (Röhrl et al., 2020). Para o OR, apesar da ausência de estudos em queratinócitos, Zare *et al*., (2020), analisou células KYSE-30 (células de câncer esofágico) tratadas com OR em diferentes concentrações por 24, 48 e 72 h, com redução significativa da proliferação celular em todas as concentrações, com maior efeito citotóxico em 2000 µg/mL.

Além disso, observou-se que o DMSO 1% reduziu a viabilidade em A375 em 72h, embora previamente descrito como seguro até esta concentração em MCF-7 (Franco, 2015), indicando maior sensibilidade desta linhagem.

A literatura científica é escassa quanto a avaliações do OR e, especialmente do AE, quanto ao potencial antineoplásico em ensaios de culturas celulares. Esses achados reforçam que AE e OR a 10 e 5% possuem segurança em células normais e potencial antineoplásico em melanomas, sendo candidatos promissores para aplicação em formulações tópicas nestas concentrações, conforme Lima e Felipe (2017).

RESULTADO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR DCFH_DA

A avaliação do potencial antioxidante dos compostos, foi realizada pelos ensaios DCFH_DA conforme Figura 2, sendo considerado que fluorescências superiores a 100%

indicam a produção de EROs (Kim; Xue, 2020). Quando EROs são produzidas pelas células e suas concentrações se elevam no meio, geram estresse oxidativo que, desencadeiam condições patológicas que levam a progressão tumoral (Mazzuco,2018).

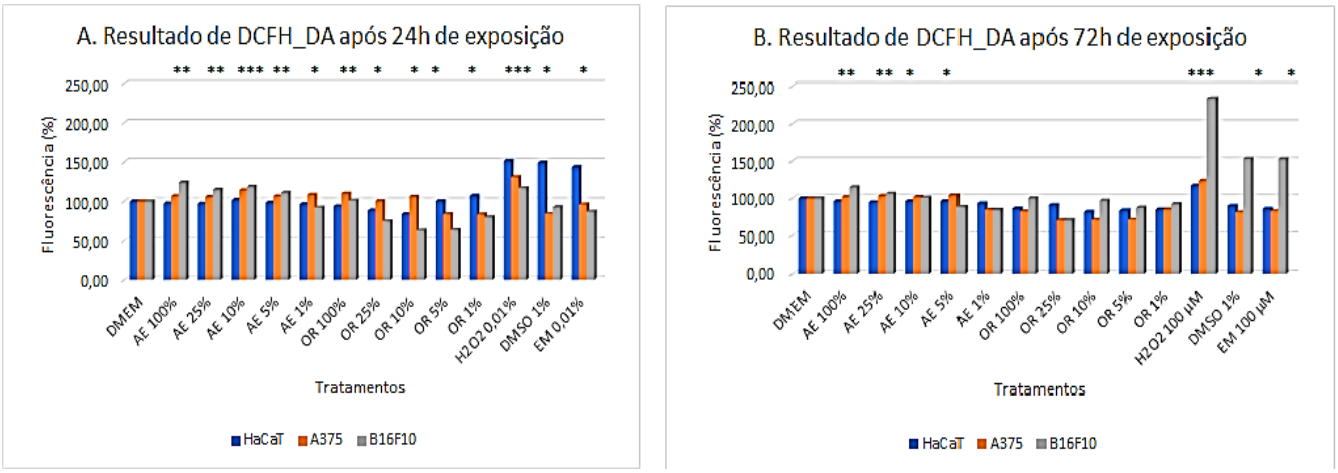


Figura 2. Resultado de ensaio antioxidante por DCFH_DA em 24 horas (A) e 72h (B). Diferenças estatísticas foram consideras para p<0,05 e descritas no texto. ANOVA fator único e Tukey/24h: HaCaT: F =9,34, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $4{,}93.10^{-07}$, HSD = 0; A375: F = 23,75, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $1{,}04.10^{-11}$, HSD = 0; B16F10: F = 26,60, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $2{,}52.10^{-12}$, HSD = 0. ANOVA fator único e Tukey/72h: HaCaT: F = 13,45, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $9{,}13.10^{-09}$, HSD = 0; A375: F = 13,91, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $6{,}27.10^{-09}$, HSD = 0; B16F10: F = 37,66, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $2{,}98.10^{-14}$, HSD = 0.

Fonte: autora própria

EROs são radicais livres de oxigênio que, em baixas concentrações, participam de processos fisiológicos, mas em excesso induzem estresse oxidativo e diversas patologias (Santos; Andrade, 2022). Abrantes (2025) relata que células tumorais apresentam níveis basais mais elevados de EROs devido ao microambiente tumoral, enquanto células normais contam com sistemas antioxidantes mais eficientes, permitindo maior resistência a elevações de EROs intracelular (Gupta *et al.*, 2012). Pode-se observar pelos resultados experimentais que esse perfil foi reproduzido, onde HaCaT não produziu EROs em 24h ou 72h, entretanto, os melanomas tiveram elevação da produção de EROs em ambos os tempos.

Como podemos observar, tanto AE quanto OR promovem a produção de EROs em 24h de exposição, entretanto, após 72h, somente o AE mantém esse comportamento. O OR é descrito por possuir compostos polifenólicos, incluindo o AE, que exercem uma potente ação antioxidante e contribuem para redução do estresse oxidativo (Martins, 2024). Já o AE por estar livre, apresentou a produção de EROs e promoveu o estresse oxidativo (Eghbali *et al.*, 2021).

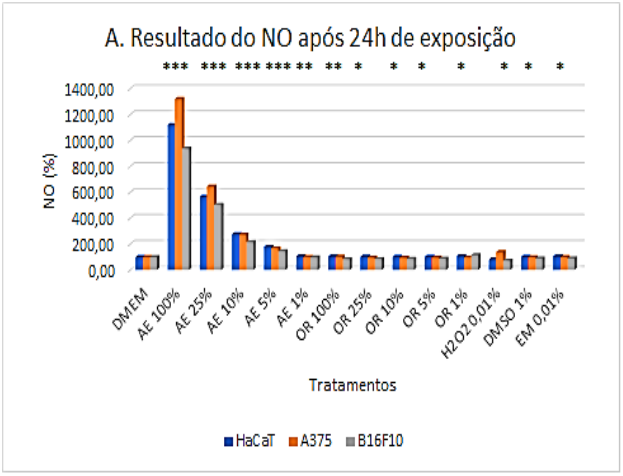
A produção excessiva de EROs danifica lipídios, proteínas, glicídios e DNA, além de induzir disfunção mitocondrial e apoptose (Luo *et al*., 2021). Em cultivo *in vitro*, esses efeitos tendem a ser intensificados pela menor presença de antioxidantes e maior concentração de O_2 (Kalyanaraman *et al*., 2012). De acordo com Nakai; Tsuruta (2021) polifenóis como os presentes no OR atuam em células tumorais, capturando EROs, suprimindo a proliferação celular e induzindo a apoptose. A apoptose induzida por polifenóis é modulada por Klotho (fator antienvelhecimento), que apresenta caráter seletivo, levando a morte de células tumorais, e preservando os queratinócitos. Assim, o OR apresentou potencial antioxidante superior ao AE isolado, sobretudo em exposições prolongadas.

RESULTADO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR NO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que atua como sinalizadora, produzida principalmente por macrófagos ativados, regula funções fisiológicas do corpo, como a resposta imune e o metabolismo e, participa de reações formando espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Souza *et al*., 2007; Sharp *et al*., 2016).

As ERNs quando são produzidas em baixas a médias concentrações (50-300 nM) são considerados agentes pró-angiogênicos e pró-tumorais, favorecendo a progressão neoplásica, contudo, em concentrações mais elevadas (>1 µM) exercem efeito anti-tumoral promovendo danos devido a reações com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, gerando modificações como nitrosilação, nitratação de tirosinas e danos oxidativos ao DNA que resultam em alterações enzimáticas, disfunção mitocondrial e ativação de vias inflamatórias e pró-apoptóticas, provocando estresse nitrosativo, levando a morte celular por apoptose (Xu *et al*., 2002; Pacher; Beckman; Liaudet, 2007; Tejero, Shiva, Gladwin, 2019; Franco *et al*., 2022).

Os resultados experimentais são apresentados na Figura 3.



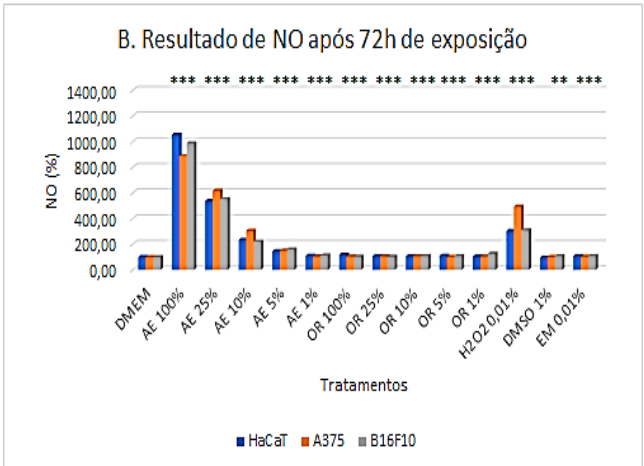


Figura 3. Resultado de ensaio antioxidante por NO em 24 horas (A) e 72h (B). Diferenças estatísticas foram consideras para p<0,05 e descritas no texto. ANOVA fator único e Tukey/24h: HaCaT: F =879,66, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $5{,}72.10^{-33}$, HSD = 160,90; A375: F = 2863,02, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $3{,}95.10^{-40}$, HSD = 265,80; B16F10: F = 2496,78, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $2{,}68.10^{-39}$, HSD = 304,80. ANOVA fator único e Tukey/72h: HaCaT: F = 233,63, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $5{,}79.10^{-25}$, HSD = 83,80; A375: F = 80,24, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $1{,}31.10^{-18}$, HSD = 54,60; B16F10: F = 449,58, $F_{crítico}$ = 2,08, p = $6{,}59.10^{-29}$, HSD = 137,60

Fonte: autora própria

Pode-se inferir que tanto o AE quanto o OR são protetores ao câncer, quando avaliados pelos ensaios de DCFH_DA e NO, agindo por mecanismos diferentes. Ainda, segundo Brêtas (2018), em média o OR contém de em torno de 40% do AE e, por o OR ser um blend de fenólicos, este parece ser melhor antioxidante que o AE.

A utilização de compostos que apresentam propriedades antineoplásicas combinadas com ação antioxidante pode diminuir tanto a ocorrência quanto a intensidade dos danos oxidativos provocados por EROs e ERNs, além de auxiliar na supressão do crescimento tumoral (Franco *et al.*, 2022).

CONCLUSÃO

Conclui-se que o AE e o OR são seguros para queratinócitos e eficazes no controle de melanomas nas concentrações de 5% a 10%. O OR demonstrou possuir maior potencial antioxidante que o AE, considerando a produção de EROs enquanto, o AE estimulou a produção de ERNs, confirmando o potencial antineoplásico.

A capacidade antioxidante superior do OR possivelmente se dá pela presença de diferentes polifenóis, incluindo cerca de 40% de AE. Portanto, confirma-se o potencial emprego de AE e OR em formulações tópicas de 5 a 10% para futura avaliação de estabilidade e aplicação no tratamento de melasmas.

Este trabalho de acesso aberto está licenciado sob Creative Commons - Atribuição (CC BY 4.0).

REFERÊNCIAS

ABRANTES, RENATA ALBUQUERQUE. Efeito apoptótico do fenilpropanoide benzoato de (E)-4-(1-epoxi-7,8-propenil) fenila (CV2) em linhagem de célula de câncer de mama humano (MCF-7) e toxicidade em modelo de peixe zebra, Repositório Institucional da UFPB BDTD -

UFPB UFPB - Campus I - João Pessoa Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, p. 1-153, 2025.

BRÊTAS, Juliana Machado. Controle de qualidade físico-químico e biológico de extratos secos da casca do fruto de Romã (Punica granatum L.) comercializados em farmácias magistrais. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 7250 7257, 2018.

CASTRO, A. C. DE; JESUS, K. A. L. DE; BRUM, H. C. C. Tratamentos farmacológicos de uso tópico para o melasma. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 7, p. e13912742640, 25 jul. 2023.

CHEN, Y. X. *et al*. Methotrexate induces apoptosis of human choriocarcinoma cell line JAR via a mitochondrial pathway. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, V. 143, E. 2 p107-111 Abril de 2009.

CHOI, WOO SUK *et al*. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cellular Immunology,** v. 280, n. 2, p. 164–170, 2012.

CRONSTEIN, B. N. THE MECHANISM OF ACTION OF METHOTREXATE. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 739–755, nov. 1997.

EGHBALI, S. *et al*. Therapeutic Effects of Punica granatum (Pomegranate): An Updated Review of Clinical Trials. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2021, p. 1–22, 16 nov. 2021.

FERREIRA, F. J. V. Ingredientes de origem natural para cosméticos antienvelhecimento da pele: a Vitis vinifera e Arbutus unedo. **Relatório de Estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à Faculdade de Farmácia**, p. 66, set, 2019.

FRANCO C, *et al*. Efeito Protetor de Nanopartículas Poliméricas com Indometacina contra Citotoxicidade Induzida por Estresse Oxidativo em Modelo Celular de Adenocarcinoma de Mama Humano. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 68 n. 4, 2022.

FRANCO, CAMILA. Desenvolvimento de nanocápsulas funcionalizadas com o tripeptídeo LDV para vetorização ativa de um agente antioneoplasico visado o tratamento do câncer, **tese de doutorado**, Porto Alegre-RS, 2015.

GONÇALVES, DANIELE APARECIDA. Tratamento do melasma: ativos químicos despigmentantes e associações. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Faculdade Anhanguera de Taubaté**, p. 28, 2021.

GUPTA, S.C. *et al*. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. **Antioxid Redox Signal**. 2012.

HANOODI M, MITTAL M. Metotrexato. StatPearls 2024. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; jan. de 2025. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556114/.

HEO, S.; KIM, S.; KANG, D. The Role of Hydrogen Peroxide and Peroxiredoxins throughout the Cell Cycle. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 280, 26 mar. 2020.

KALYANARAMAN, B. *et al*. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2012.

KIM, H.; XUE, X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. **Journal of Visualized Experiments**, n. 160, 23 jun. 2020.

KOŹMIŃSKI P, HALIK PK, CHESORI R, GNIAZDOWSKA E. Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3483. Published 2020 May 14. doi:10.3390/ijms21103483

LIMA, MICAELA SANTOS; FELIPE, DANIELE FERNANDA. Desenvolvimento de uma formulação cosmética contendo ativos naturais para tratamento de melasma. **UNICESUMAR - Centro Universitário de Maringá**, *[S. l.]*, 2017.

Luo, H. *et al*. A exposição ao cádmio induz osteoporose por meio da senescência celular, associada à ativação da via NF-ÿB e à disfunção mitocondrial. **Environ. Pollut**. 2021, 290, 118043.

MACRINI, DACLÉ JULIANI. Avaliação de extratos de plantas da região amazônica quanto à atividade inibitória da tirosinase**. Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos Área de Produção e Controle Farmacêuticos,** *[S. l.]*, p. 122, 2004.

MAHAJAN, V. K. *et al*. Medical therapies for melasma. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 21, n. 9, p. 3707–3728, 31 jul. 2022.

MARTINS, SOLANO DANTAS. Mecanismos de ação da Punica Granatum l. durante a vitrificação de tecido ovariano. 2024. 81f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2024.

MAZZUCO, CAROLINA CROSO. A Romã (Punica granatum L.) como Perspectiva Terapêutica para o Câncer de Mama. **Universidade de São Paulo: São Paulo, Brazil**, 2018.

NAKAI, K.; TSURUTA, D. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 10799.

NASTITI, C. M. R. R. et al. Novel Nanocarriers for Targeted Topical Skin Delivery of the Antioxidant Resveratrol. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 108, 29 jan. 2020.

OLIVEIRA, CATIÚSCIA P. *et al*. Enhanced and selective antiproliferative activity of Methotrexate-Functionalized-Nanocapsules to human breast cancer cells (MCF-7). **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, p. 24, 2018.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 2007.

PENSADO, A. *et al.* Cutaneous pharmacokinetics of a volatile drug post-application to the skin. **Drug Delivery and Translational Research**, 26 jun. 2025.

PORTILHO, L, PACHECO, H, Niacinamida e Dermatologia, **Brazilian Journal of Proteção solar - SBCD**. Disponível em: <https://www.sbcd.org.br/sou-paciente/para-a-sua-pele/protecao-solar/>.

REIS, DESIRÉE LOPES. Estudo sobre alterações no metabolismo intermediário e indução de morte em células de carcinoma mamário humano induzidas pelo óleo de semente de romã, 2017, n.66, tese de mestrado Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

RÖHRL, C. *et al.* Increased Cellular Uptake of Polyunsaturated Fatty Acids and Phytosterols from Natural Micellar Oil. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 150, 5 jan. 2020.

SANCHES, M, H da F. et al. Melasma: Epidemiologia, patogênese, apresentação clínica e diagnóstico. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1580–1597, 10 out. 2024.

SANTIAGO, M. d. A., Godoy, R. d. O., Borguini, R., Paim, D., Santos, L., Wilberg, V, Freitas, S. (2014). Determinação de punicalagina em romã (Punica granatum L.) por cromatografia líquida de alta eficiência. Comunicado Técnico Embrapa.

SANTOS, I. DA C.; ANDRADE, L. G. O papel dos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 3, p. 906–916, 31 mar. 2022.

SANTOS, MÔNICA; AMORIM, ANA PAULA LIMA; RODRIGUES, AIRTON. Elevando a autoestima: a associação do cosmético como recurso terapêutico para mulheres em tratamento oncológico. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 49–58, jan./mar. 2021.

SBD. Hiperpigmentação. [S. l.], 2024. Disponível em: https://www.sbd.org.br/tratamentos/hiperpigmentacao/.

SHARP, RUSSELL. *et al.* Avaliação in vitro de efeitos anti-inflamatórios de extratos de pouteria torta (mart.) RADLK E POUTERIA RAMIFLORA (MART.) RADLK. **Carbohydrate Polymers**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2016.

SILVA, L.; MORAES, E. Melasma – há tratamento?. **Enciclopédia biosfera**, v. 19, n. 40, 30 jun. 2022.

SOUZA, WESLEY. M. *et al*. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 191–196, jun. 2007.

TEJERO, J.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 311–379, 2019.

VALERO-MENDOZA, A. G. *et al*. The whole pomegranate (Punica granatum. L), biological properties and important findings: A review. **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 100153, 1 out. 2023.

WEBSIX. **Atena Editora**. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/post/potencial-despigmentante-do-acido-elagico-uma-revisao-da-literatura>.

XU, W., LIU, L., LOIZIDOU, M. *et al.* O papel do óxido nítrico no câncer. ***Cell Res*** v. 12, n. 311–320, 2002.

ZAGO, P M W. et al., Cytotoxic and Metalloproteinase-inhibitory Effects of Ellagic Acid Against Oral Squamous Cell Carcinoma. **Anticancer Research**, v. 45, n. 7, p. 2871–2880, 27 jun. 2025.

ZARE M, SHAVERDI H, EBRAHIMI VOSTA KALAEE S. Efeitos anticancerígenos do óleo de semente de romã na linhagem celular de câncer de esôfago (KYSE-30). **Gene Cell Tissue**, 2021.