

REVISTA TÓPICOS

FITOQUÍMICA DAS FLORES DE PUNICA GRANATUM L. (PUNICACEAE)

DOI: 10.5281/zenodo.14885019

Francisco José Mininel¹

Silvana Márcia Ximenes Mininel²

RESUMO

A romãzeira (*Punica granatum* L.) da família Punicaceae, é um arbusto lenhoso e ramificado, nativo da região que abrange desde o Irã até o Himalaia, a Noroeste da Índia. Esta planta tem sido cultivada há muito tempo por toda a região Mediterrânea da Ásia, América, África e Europa. Apresenta folhas pequenas, rijas, brilhantes e membranáceas, flores vermelho-alaranjadas dispostas nas extremidades dos ramos, originando frutos esféricos, com muitas sementes angulosas em camadas as quais se acham envolvidas em arilo polposo. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico das flores da espécie vegetal, de modo a identificar a presença de compostos fenólicos importantes para a saúde. Utilizou-se a técnica de inserção direta da amostra (FIA-ESI-IT-MS) para obtenção do espectro de massas em modo full-scan. Detectou-se uma variedade de compostos tais como o ácido elágico, 2-galoil-punicalina, canferol, rutina, quercetina entre outros. Em vista da quantidade de compostos fenólicos detectados, pode-se inferir que a espécie possui

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

grande potencial fitoterápico.

Palavras-chave: *Punica granatum* L. Flores vermelho-alaranjadas. Inserção direta da amostra. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

The pomegranate tree (*Punica granatum* L.) of the Punicaceae family is a woody and branched shrub native to the region that extends from Iran to the Himalayas, northwest of India. This plant has long been cultivated throughout the Mediterranean region of Asia, America, Africa and Europe. It has small, stiff, shiny and membranous leaves, red-orange flowers arranged at the ends of the branches, producing spherical fruits with many angular seeds in layers that are enclosed in a pulpy aril. This study aimed to perform a phytochemical study of the flowers of this plant species, in order to identify the presence of phenolic compounds important for health. The direct sample insertion technique (FIA-ESI-IT-MS) was used to obtain the mass spectrum in full-scan mode. A variety of compounds were detected, such as ellagic acid, 2-galloyl-punicalin, kaempferol, rutin, quercetin, among others. In view of the amount of phenolic compounds detected, it can be inferred that the species has great phytotherapeutic potential.

Keywords: *Punica granatum* L. Orange-red flowers. Direct insertion of the sample. Phenolic compounds.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Punica granatum* L. (Romã), família Punicaceae, é uma planta largamente utilizada na medicina popular para o tratamento de estomatites, faringites e laringites e é popularmente usada para rouquidão e inflamação

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

da garganta. Sua utilização popular tem sido respaldada por estudos científicos de suas propriedades terapêuticas, principalmente antimicrobiana e anti-inflamatória.

É um tipo de planta arbustiva que cresce entre 3 a 5 metros, as suas folhas são opostas e fasciculadas, brilhantes, alternadas e obtusas. As suas flores emergem agrupadas em florescências nas extremidades e possuem um cálice tubular e suculento (Figura 1). Os seus frutos são em de forma arredondada, com uma casca dura de cor amarelo avermelhado, quando maduros rebentam expondo as suas sementes (MYERS et al., 2000).

A romã é o fruto da romãzeira, comum no Mediterrâneo Oriental e Médio Oriente, onde a polpa é usada para a preparação de aperitivos, sobremesa ou algumas vezes em bebida alcoólica. O seu interior é subdividido por finas películas, que formam pequenas sementes possuidoras de uma polpa comestível.

REVISTA TÓPICOS



Figura 1. Aspecto geral das flores de *Punica granatum* L.

(Fonte: https://www.verdeesvida.es/fichas_de_plantas/arboles-y-palmeras_2/granado_30/)

As romãs têm mais de 500 variedades distribuídas globalmente, das quais 50 são cultivadas comercialmente (VERNA et al, 2010). A romã tem um período juvenil médio de 3 a 4 anos, e um alto número de sementes obtidas de uma única fruta torna a hibridização uma técnica muito desejável (JALIKOP, 2010). A romã tem uma biologia floral única; os tipos de flores são às vezes agrupados em duas categorias (masculino, funcional, hermafrodita) (WETZSTEIN, et al, 2011) e às vezes três (masculino funcional, intermediário, hermafrodita) (DHINESH, 2010); que variam significativamente de genótipo para genótipo, condições ambientais e agronômicas (CHAUDHARI & DESAI, 1993). A morfologia da flor de

REVISTA TÓPICOS

cada tipo de flor (Figura 2) também varia significativamente; o androceu e o gineceu têm um grau significativo de variação (WETZSTEIN et al, 2013).

Na maioria das angiospermas, as flores masculinas contêm apenas órgãos masculinos (ou seja, filamento e antera) e as flores femininas contêm apenas órgãos femininos (ou seja, estigma, estilete, ovário, óvulo), no entanto, na romã, todos os tipos de flores contêm órgãos masculinos e femininos. A categorização dos tipos de flores depende do desenvolvimento/diferenciação dos órgãos sexuais. Nas flores masculinas, a parte feminina é quase insignificante e elas nunca produzem frutos, seguida pelo tipo intermediário, onde os órgãos femininos são um tanto desenvolvidos, mas se produzem frutos, geralmente caem ou são de tamanho muito pequeno. O tipo de flor hermafrodita tem órgãos femininos totalmente desenvolvidos e produz frutos de mais alta qualidade. Embora contenham um androceu bem desenvolvido, as flores intermediárias possuem principalmente ovários degenerativos que raramente produzem frutos (WETZSTEIN et al, 2013). A maioria das flores hermafroditas contém heterostilia (estilo elevado acima das anteras), o que torna a romã uma cultura frequentemente polinizada cruzada, e a presença de heterostilia também varia entre os genótipos (TEIXEIRA DA SILVA et al, 2013).

REVISTA TÓPICOS



Figura 2. Dissecação de três tipos de flores em genótipos de romã. Masculino (esquerda intermediário (centro) Hermafrodita (direita).
(Fonte: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9824416/figure/plants-12-00165-f005>)

Neste trabalho, buscou-se estudar a composição química das flores de *Punica granatum* L. (PUNICACEAE), utilizando a técnica de FIA-ESI-IT-MS.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA OU REVISÃO DA LITERATURA

A romã estava entre as cinco primeiras culturas cultivadas, mencionadas no Antigo Testamento da Bíblia, no Alcorão Sagrado, na mitologia grega antiga e no Talmude Babilônico (PIKE, 2007; TAYLOR, 1988). As frutas da romã são ricas em polifenóis (punicalagina e ácido elágico) e antioxidantes em seu suco, casca e sementes. A romã é benéfica para uma ampla gama de doenças médicas, incluindo câncer, HIV, distúrbios cardíacos, hipertensão e até mesmo envelhecimento (ROSS, 2009; KARIMI et al, 2017; IKRAN et al, 2020). O conteúdo antioxidante da romã é tão alto quanto o de qualquer outra cultura alimentar, o que confere sua importância medicinal (SEERAM et al, 2005).

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

Punica granatum L. (romã) é uma fruta consumida no mundo todo. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* provaram que exerce atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, antidiabética e [hipolipidêmica, juntamente com efeitos anticancerígenos e neuroprotetores](#). Essas propriedades podem estar relacionadas predominantemente aos seus polifenóis, tais como a punicalagina, punicalina, ácido galágico, ácido elágico, ácido gálico, entre outros (SEERAM et al, 2005).

De acordo com Seeram et al (2006), os elagitaninos (ETs) do suco de romã (PJ) são relatados como tendo inúmeras propriedades biológicas, mas sua absorção e metabolismo em humanos são mal compreendidos. Para investigar a farmacocinética dos ETs de romã, 18 voluntários saudáveis receberam 180 mL de concentrado de PJ, e amostras de sangue foram obtidas por 6 h depois. Coletas de urina de 24 horas foram obtidas no dia anterior (-1), no dia (0) e no dia seguinte (+1) ao estudo. O ácido elágico (EA) foi detectado no plasma de todos os indivíduos com uma concentração máxima de 0,06 +/- 0,01 micromol/L, área sob a curva de tempo de concentração de 0,17 +/- 0,02 (micromol x h) x L(-1), tempo de concentração máxima de 0,98 +/- 0,06 h e meia-vida de eliminação de 0,71 +/- 0,08 h. Os metabólitos do EA, incluindo o glicuronídeo do ácido dimetilelágico (DMEAG) e os derivados de hidroxí-6H-benzopiran-6-ona (urolitinas), também foram detectados no plasma e na urina em formas conjugadas e livres (Figura 3). O DMEAG foi encontrado na urina obtida de 15 de 18 indivíduos no dia 0, mas não foi detectado no dia -1 ou +1, demonstrando seu potencial como um biomarcador de ingestão. O

REVISTA TÓPICOS

glicuronídeo de urolitina A foi encontrado em amostras de urina de 11 indivíduos no dia 0 e na urina de 16 indivíduos no dia +1. O glicuronídeo de urolitina B foi encontrado na urina de 3 indivíduos no dia 0 e na urina de 5 indivíduos no dia +1. As urolitinas, formadas por bactérias intestinais, podem contribuir para os efeitos biológicos do PJ, pois podem persistir no plasma e nos tecidos e são responsáveis por alguns dos benefícios à saúde observados após o consumo crônico de PJ (SEERAM et al, 2006).

REVISTA TÓPICOS

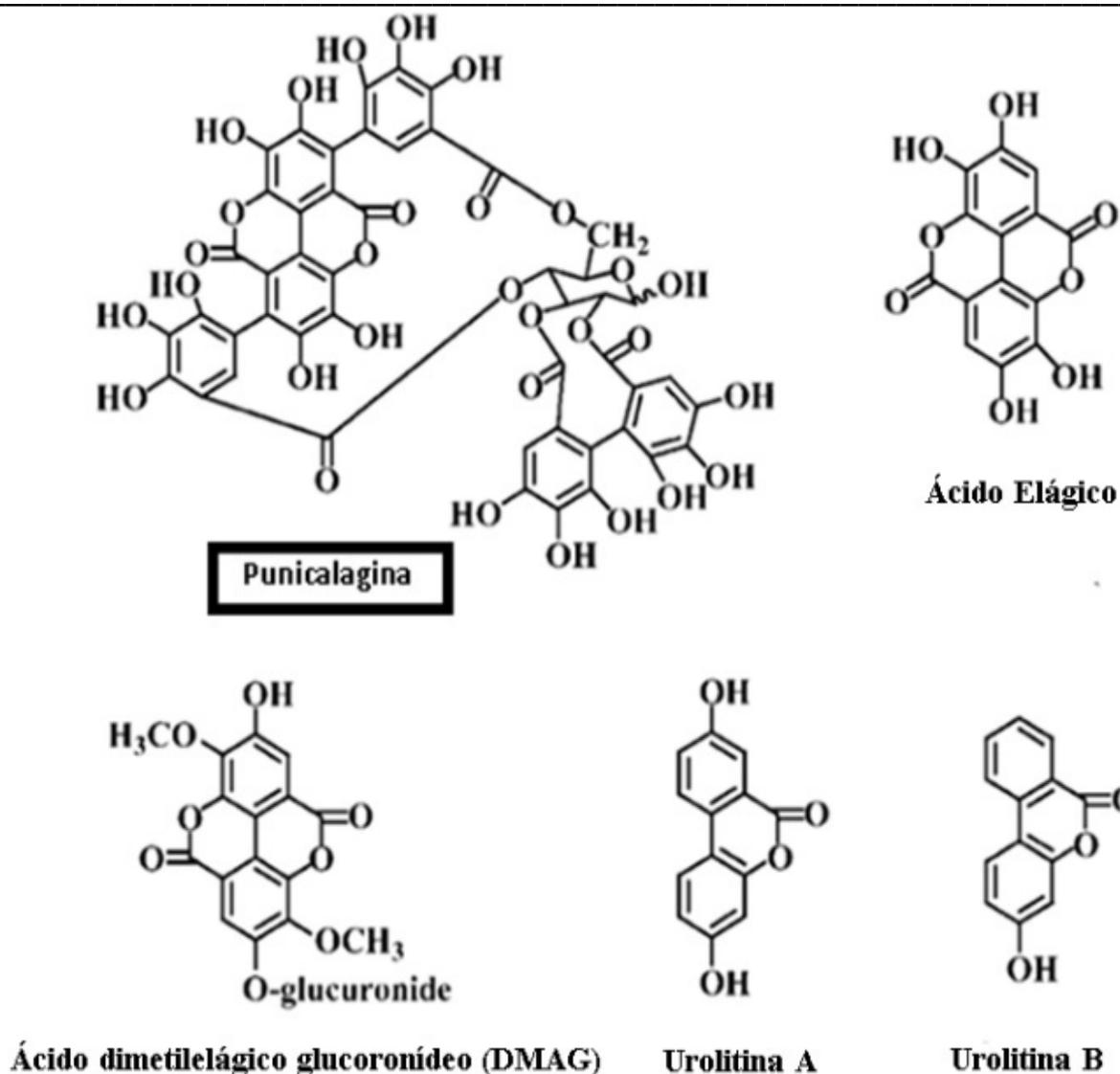


Figura 3. Estruturas químicas dos isômeros da punicalagina, os principais ETs presentes no suco de romã, e seus metabólitos, EA, DMEAG, urolitina A e urolitina B.

(Fonte: SEERAM et al, 2006)

Dessa forma, uma melhor compreensão da diversidade estrutural dos fitoquímicos da romã, bem como suas bioconversões e bioatividades em humanos, facilitará a investigação de suas interações

REVISTA TÓPICOS

sinérgicas/antagônicas e acelerará suas aplicações na quimioprevenção e tratamento de doenças baseados na dieta num futuro próximo.

3 METODOLOGIA

Para a obtenção do espectro de massas em modo full-scan, foi utilizado 1 mg dos extratos secos de flores em etanol 70% dissolvendo-os em 1 mL de metanol grau HPLC. A solução foi filtrada em membrana de PTFE com poro de 0,45 μm . A solução filtrada foi introduzida diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa de vidro impulsionada por meio de um sistema de bombeamento em fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$.

O espectro de massas em modo full-scan é uma técnica que fornece uma imagem qualitativa da composição de uma amostra. O modo full-scan, ou de varredura completa, funciona varrendo a faixa de massa de íons de fragmentos da amostra. A faixa de massa selecionada depende do que se espera encontrar na amostra. A espectrometria de massas é uma técnica analítica que separa átomos ou moléculas com base na sua razão de massa para carga (m/z). As análises por MS foram muito beneficiadas pelo desenvolvimento da ionização por eletrospray (ESI), uma vez que moléculas termolábeis, íons em solução, complexos organometálicos, polímeros e supramoléculas de alta polaridade, alta massa molecular e grande complexidade estrutural podem ser facilmente ionizadas por ESI para investigação por MS.

Em ESI moléculas de baixa ou alta massa molecular, alta polaridade e complexidade estrutural são facilmente ionizadas e analisadas por MS.

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

Nesta técnica as espécies do analito são ionizadas em solução e transferidas para fase gasosa como espécies isoladas, geralmente na forma de moléculas protonadas (modo positivo), ou ainda moléculas desprotonadas (modo negativo), conforme indicado na Figura 4.

REVISTA TÓPICOS

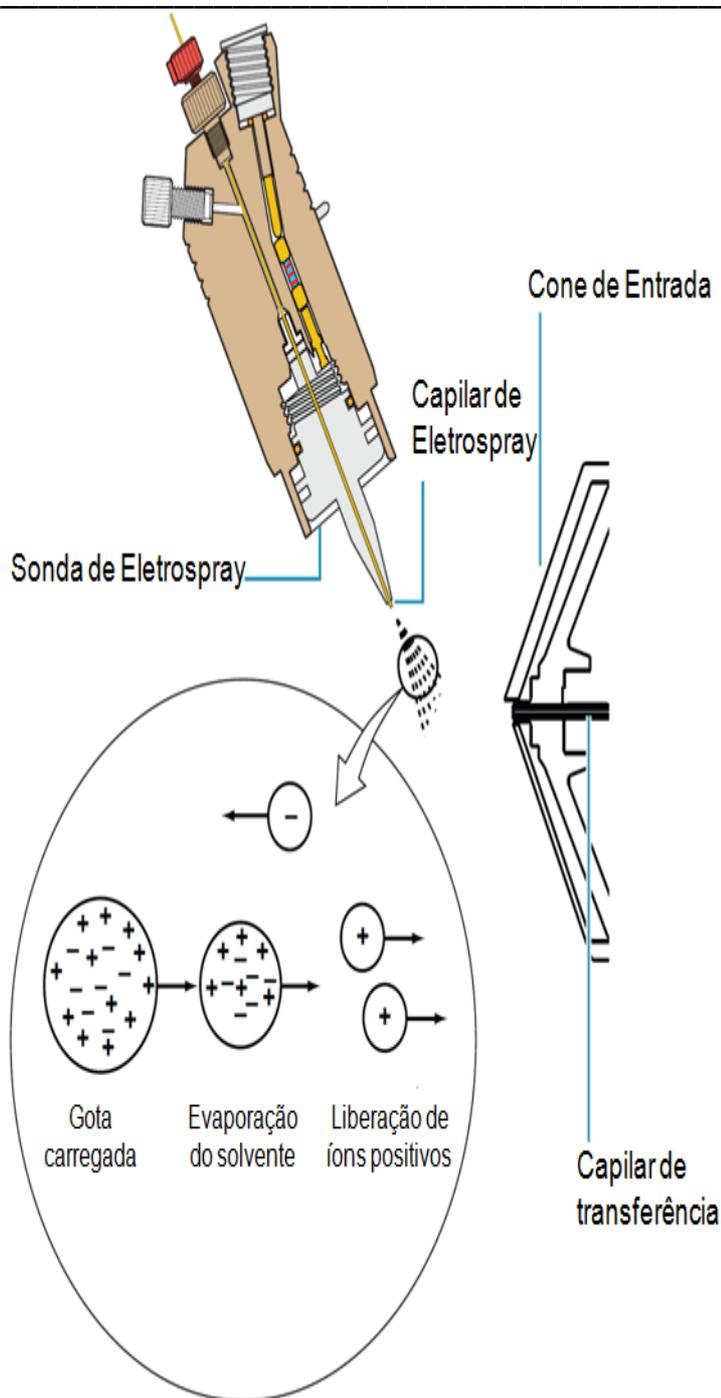


Figura 4. Técnica FIA-ESI-IT-MS.
(Fonte: Thermo Ion Max Hardware Manual)

REVISTA TÓPICOS

Neste trabalho, escolheu-se o modo negativo para geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ).

O primeiro evento foi uma varredura completas (full-scan) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. A partir dos dados da primeira varredura, obteve-se os próximos eventos (experimentos MSⁿ para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento).

Utilizou-se o software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finnigan®) durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 5 mostra o espectro de massas em full-scan apresentando os íon precursores das moléculas desprotonadas ($[M - H]^-$) do extrato EtOH 70% das flores de *Punica granatum* L.

REVISTA TÓPICOS

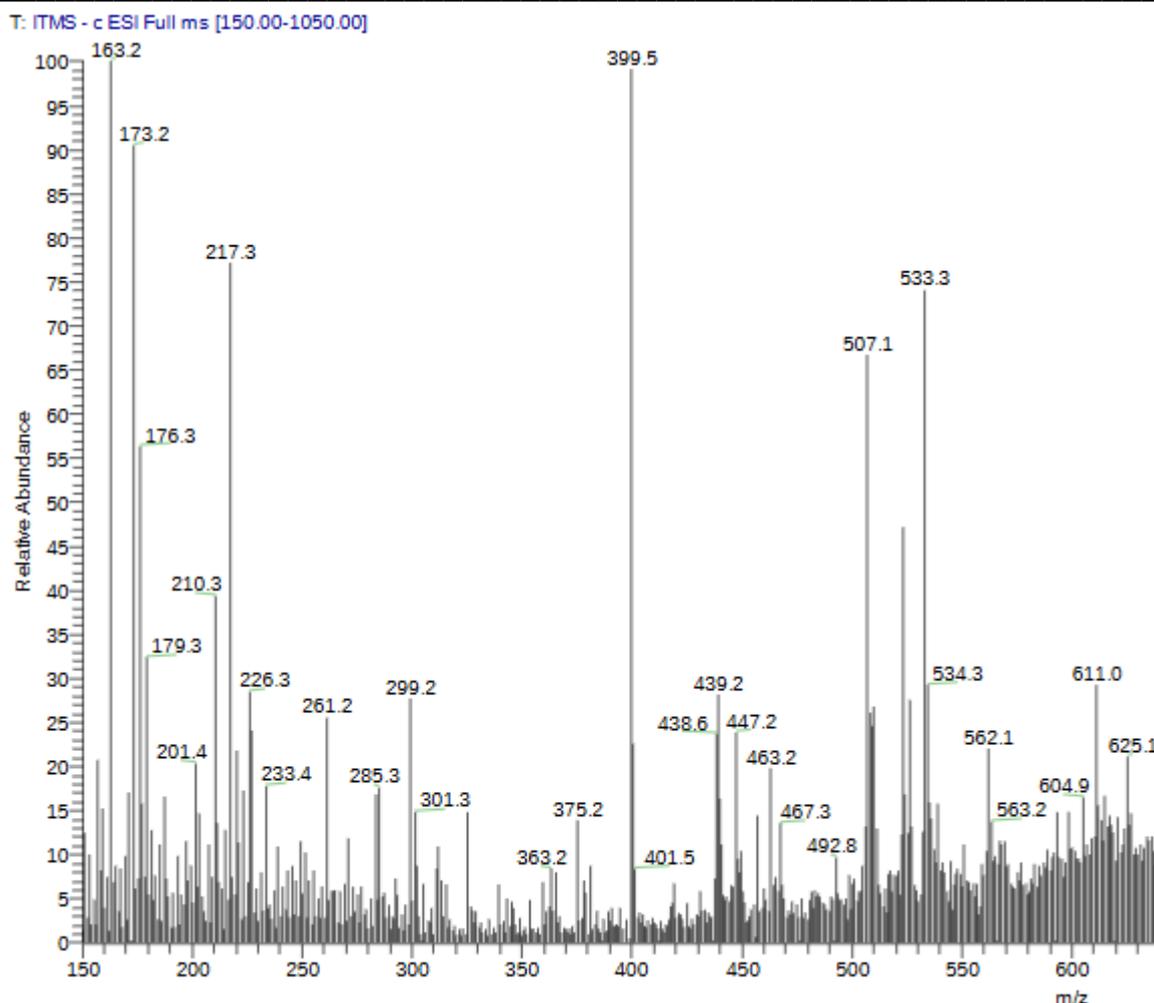


Figura 5. Espectro de massas em full-scan da infusão das flores de *P. granatum* L.

A partir de uma análise mais acurada do espectro de massas em modo full-scan, pode-se perceber que existe um complexo polifenólico em *Punica granatum* L., como por exemplo nas flores, o qual apresenta compostos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias bastante pronunciadas. Os componentes ativos mais importantes da romã são a punicalagina, seguida pelo ácido elágico e ácido gálico. Sabe-se que esses compostos polifenólicos da romã (Tabela 1), têm o efeito terapêutico mais

REVISTA TÓPICOS

pronunciado. Vários estudos mostraram o efeito protetor do ácido elágico, punicalagina, contra danos do estresse oxidativo causados por radicais livres. O potencial da romã como um componente antioxidante e terapêutico em vários sistemas biológicos é alto, de acordo com fontes científicas.

Tabela 1. Relação massa/carga [M-H]⁻ e compostos detectados nas flores de *P. granatum* L.

M/Z [M-H] ⁻	COMPOSTOS DETECTADOS
611	Luteolina-o-diglicosídeo
301	Ácido elágico
401	Apigenina-O-pentosídeo
447	Ácido metil-elágico pentosídeo
463	Ácido elágico hesosídeo

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

179	Ácido cafeico
163	Ácido-p-cumárico
447	Ácido elágico ramnosídeo.
217	Derivados do ácido cafeico
173	Fragmento de ácido quínico
285	Canferol
563	Apigenina-C-hesosídeo-C-pentosídeo
625	Quercetina-3,4`-di-O-glicosídeo
835	Derivado do Calendulosídeo G

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

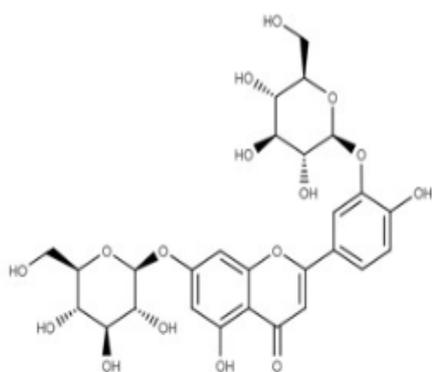
REVISTA TÓPICOS

439	Digaloil hesosídeo
299	Ácido hidroxibenzóico hesosídeo
507	Siringetina hesosídeo
533	Guaiacil (8-5)-ácido ferúlico hesosídeo
933	2-O-galoilpunicalina
611	Rutina
769	Galoil-HHDP-ácido metil elágico
299	Ácido-p-hidroxibenzóico hesosídeo
935	Casuarinina

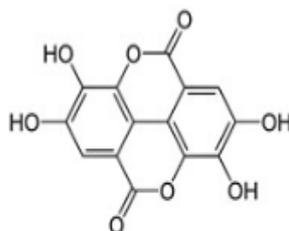
REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

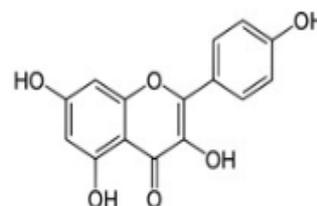
835	Derivado do calendulósídeo G
599	Quercetina-galoil-ramnose



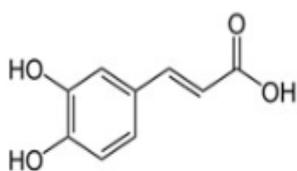
Luteolina-o-diglicosídeo



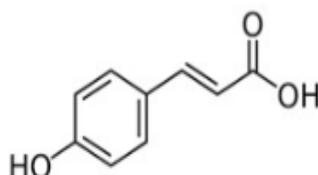
Ácido elágico



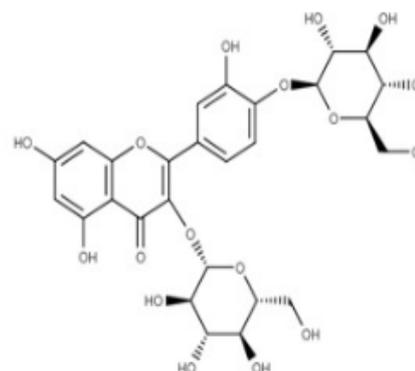
Canferol



Ácido cafeico



Ácido-p-cumárico



Quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

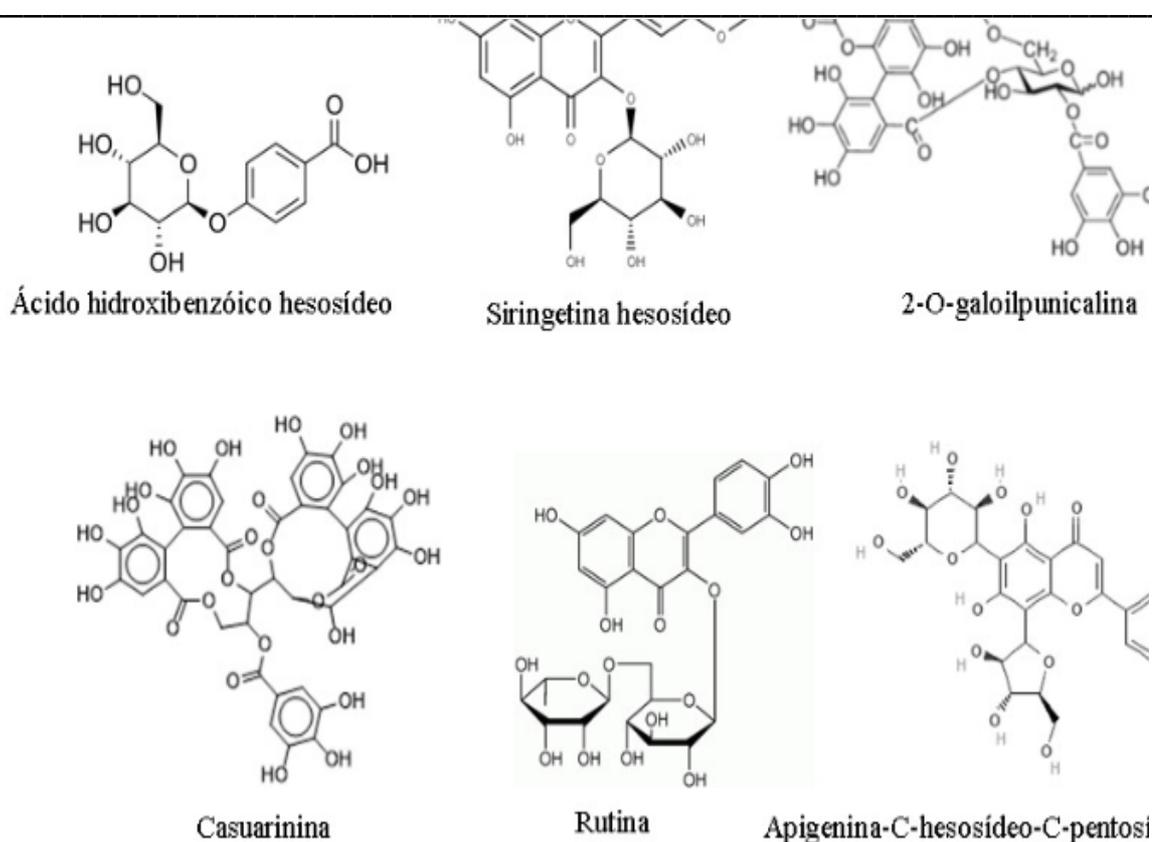


Figura 6. Compostos detectados na infusão das flores de *Punica granatum* L. através de FIA-IT-MS.

(Fonte: Os autores)

No caso do composto ácido elágico (m/z 301), detectado no espectro de massas, mostra que o íon precursor de m/z 301 (Figura 7) quando fragmentado sofre perda de massa m/z 257 $[M-44-H]^-$ e 283,9~284 $[M-18-H]^-$, resultante da perda de CO_2 e água respectivamente (Figura 8). O pico base formado em m/z 229 $[M-H]^-$ é gerado por uma descarboxilação (-44 u) seguida da perda de CO (-28 u) (YISIMAYILI et al., 2018).

REVISTA TÓPICOS

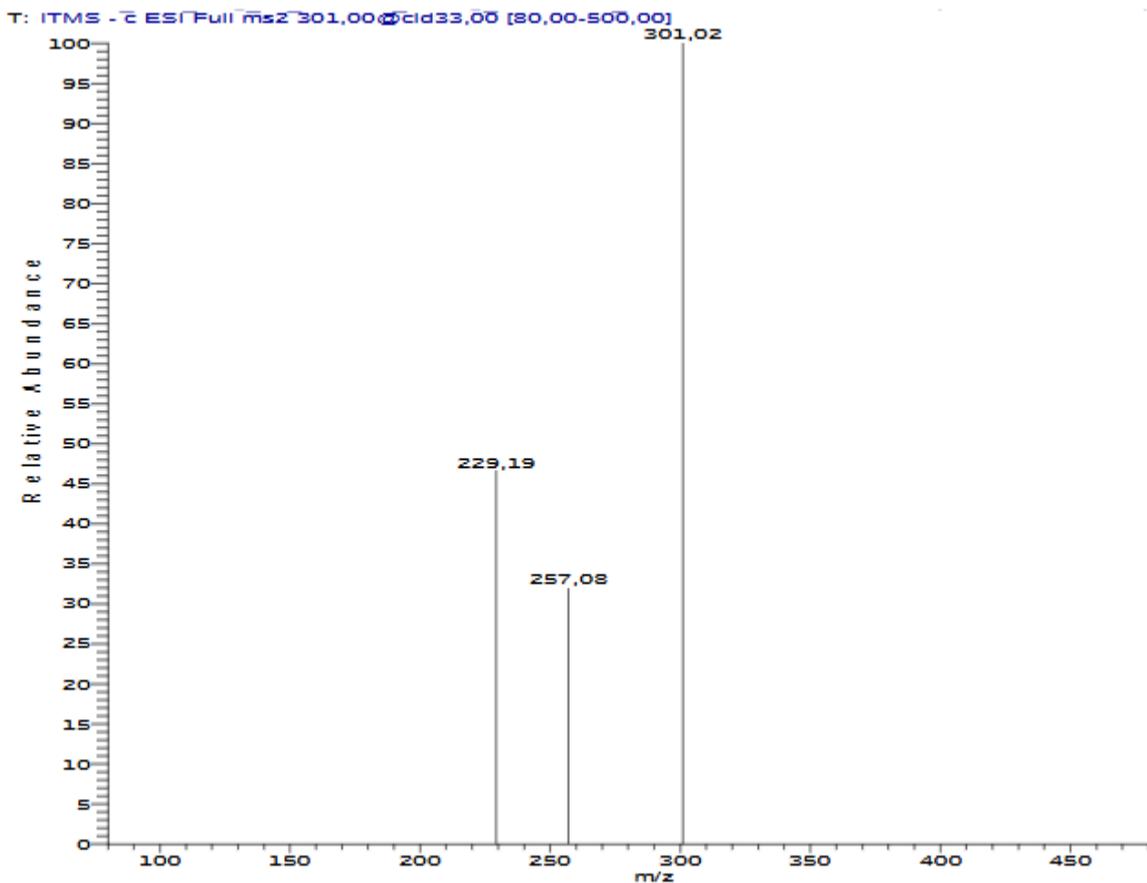


Figura 7. Fragmentação (MS/MS) ácido elágico (m/z 301).
(Fonte: Os autores)

REVISTA TÓPICOS

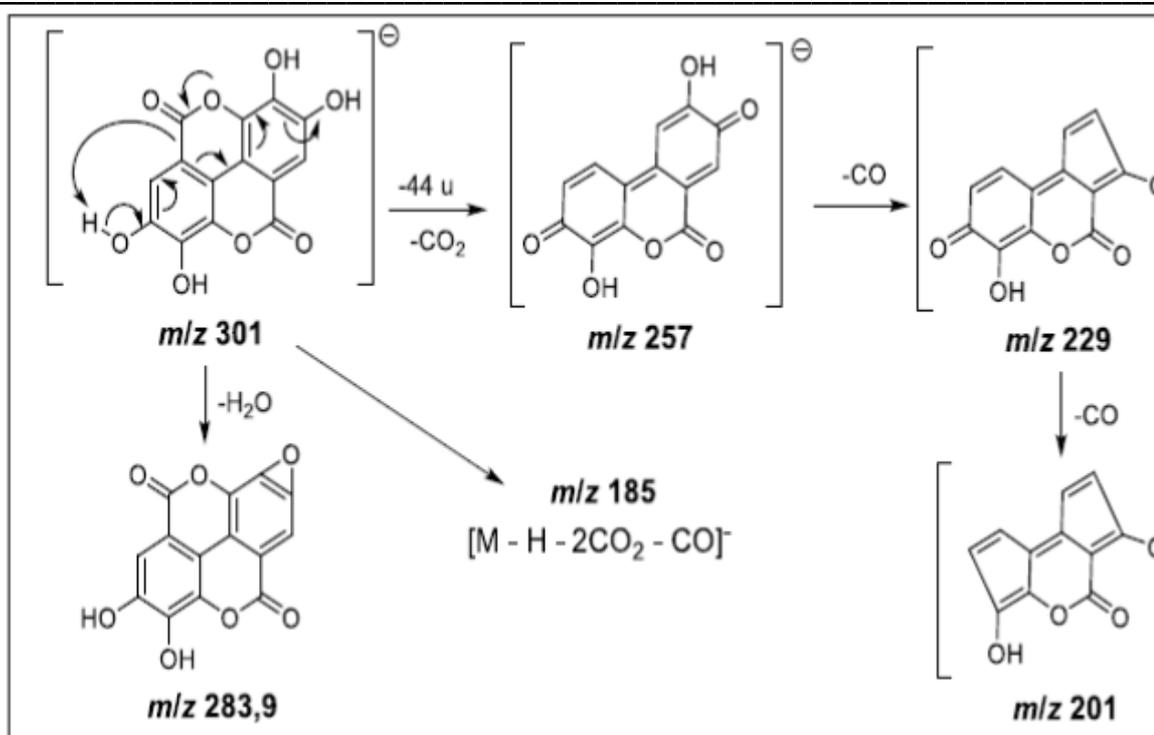


Figura 8. Proposta mecânica e demais fragmentos do ácido elágico.
(Fonte: BEZERRA, 2021)

O ácido elágico atua como um antioxidante ao neutralizar espécies reativas que quando em excesso podem ser danosas ao organismo, tais como os radicais de hidroxila (OH^\bullet), radicais metil (CH_3^\bullet) e de peróxido de nitrogênio (NO_2^\bullet). Devido às quatro hidroxilas presentes em sua estrutura química, o ácido elágico pode se ligar a mais de um radical livre ao mesmo tempo, característica que o torna um antioxidante potente mesmo em concentrações baixas. Dessa forma, este composto confere proteção contra danos ao endotélio vascular, reduz o estresse oxidativo induzido por metais, melhora a atividade de enzimas hepáticas, além modular a resposta imune (RÍOS et al, 2018).

REVISTA TÓPICOS

No estudo de fragmentação do íon em m/z 447, constata-se fragmentos principais em m/z 300 e 301, sendo consistentes com os íons obtidos com a amostra de *Punica granatum* L. Desta forma, os dados indicaram a do ácido elágico ramnosídeo (Figura 9).

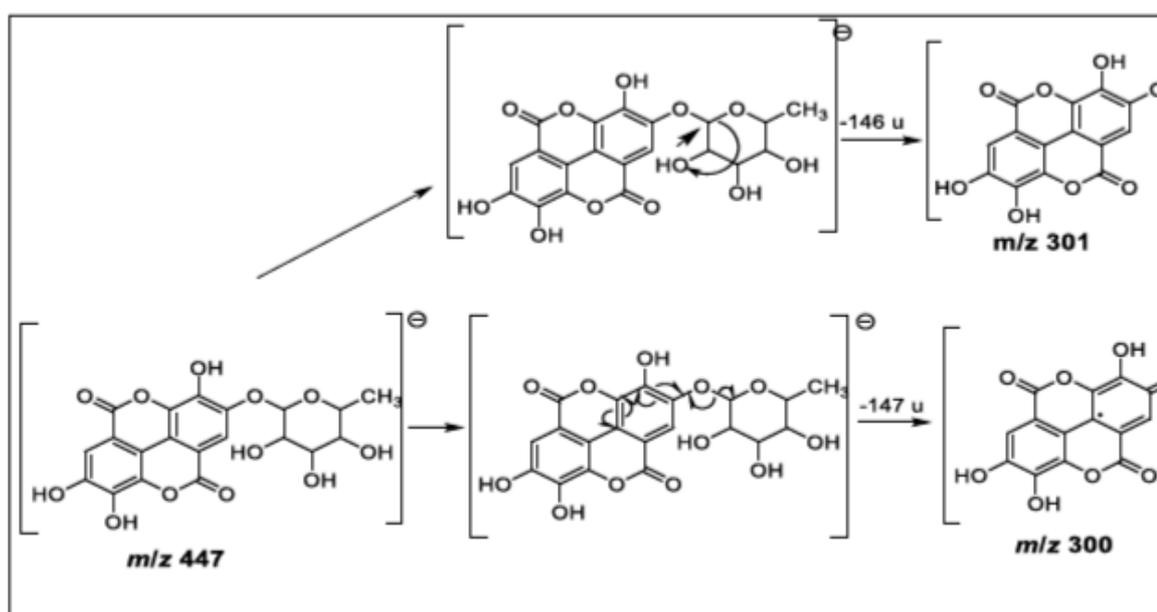


Figura 9. Proposta mecânica do íon m/z 447 e demais fragmentos do ácido elágico ramnosídeo.

(Fonte: BEZERRA, 2021)

O íon precursor de m/z 463 corresponde a molécula desprotonada $[M-H]^-$ do ácido elágico hexosídeo (Figura 10). Este composto não havia sido detectado na infusão direta do extrato hidroalcoólico. MS/MS desse íon levou ao íon produto de m/z 301 devido a perda de hexose (FISCHER, 2011).

REVISTA TÓPICOS

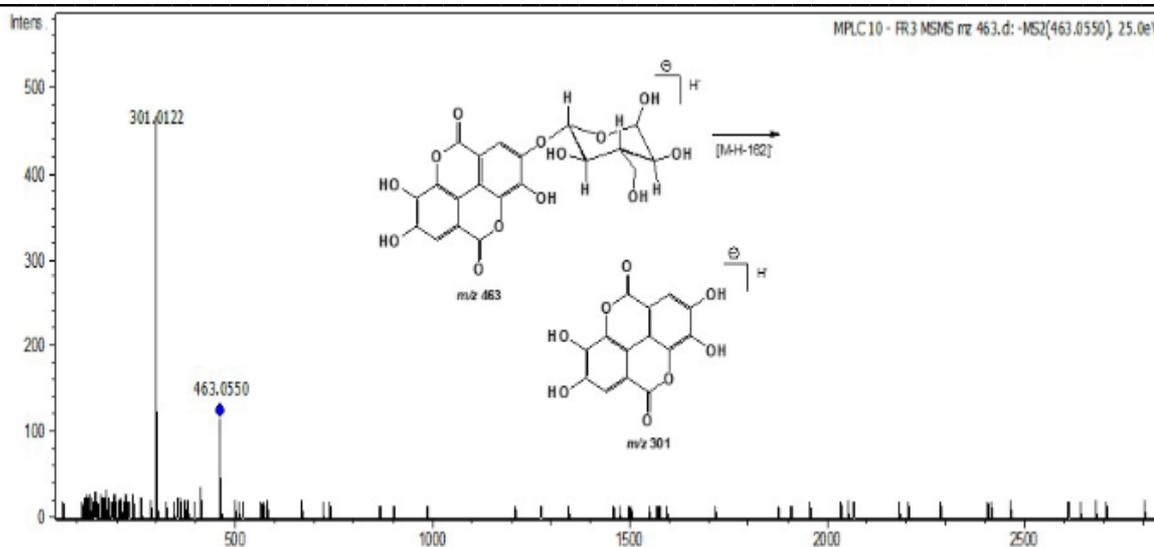


Figura 10. Fragmentação do íon m/z 463 e o fragmento ácido elágico.
(Fonte: Os autores)

O composto em m/z 599, ao ser fragmentado produz o íon em m/z 301 [M-H-galoil-ramnose]⁻, íon em m/z 169 e íon em m/z 151, consistentes com a Quercetina-galoil-ramnose.

No caso do íon em m/z 285,0, possui fórmula molecular C₁₅H₁₀O₆ fragmenta com íon em m/z 257 [M-H-CO]⁻, consistente com a substância Canferol.

A rutina (m/z 611) fragmenta-se nos íons em m/z 447, m/z 465 e m/z 303, conforme demonstrado na Figura 11.

REVISTA TÓPICOS

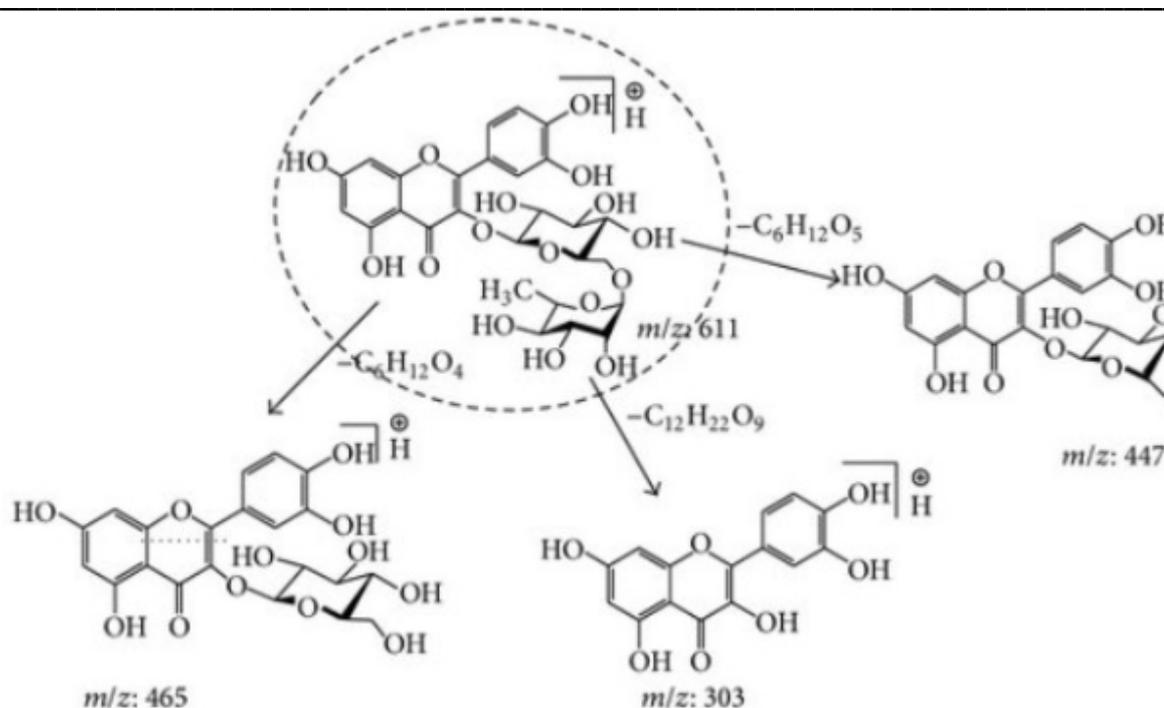


Figura 11. Fragmentação do íon m/z 611 e os fragmentos obtidos.

(Fonte: SATHEESHKUMAR et al, 2014)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A romã (*Punica granatum* L.) reúne diversas propriedades medicinais. Frente à presença de compostos fenólicos na fruta e à importância destes para a saúde do homem, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico das flores a fim de identificar a presença destes compostos fenólicos. Para isso, utilizou-se a técnica FIA-ESI-IT-MS para a detecção de compostos fenólicos, onde foi constatada a presença de variados compostos, a maioria com atividades biológicas importantes no organismo vivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

BEZERRA, Gabriela da Silva et al. Estudo fitoquímico e potencial antioxidante de Caryocar Villosum (Aubl.) Pers. (PIQUIÁ), 2021.

DHINESH BABU K. Floral Biology of Pomegranate (Punica granatum L.) Glob. Sci. Books. 2010.

IKRAM S., SHAFQAT W., QURESHI M.A., DIN S.U., REHMAN S.U., MEHMOOD A., SAJJAD Y., NAFEES M. Causes and Control of Fruit Cracking in Pomegranate: A Review. J. Glob. Innov. Agric. Soc. Sci., 2020.

JALIKOP S.H. Pomegranate Breeding. Fruit, Veg. Cereal Sci. Biothec, 2010.

KARIMI M., SADEGHI R., KOKINI J. Pomegranate as a Promising Opportunity in Medicine and Nanotechnology. Trends Food Sci. Technol., 2017.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, v. 403, n. 6772, p. 853- 857, 2000.

PIKE S.M. Review of The Narcissus and the Pomegranate: An Archaeology of the Homeric Hymn to Demeter by Ann Suter. Pomegranate Int. J. Pagan. Stud., 2007.

RÍOS JL, GINER RM, MARÍN M, RECIO MC. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. Planta Med., 2018.

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

ROSS S.M. Pomegranate: Its Role in Cardiovascular Health. *Holist. Nurs. Pract.*, 2009.

SATHEESHKUMAR, Nanjappan; SHANTIKUMAR, Saladi; KOMALI, Mopuri. Identificação e quantificação de flavonoides inibidores da aldose redutase em formulação herbal e extrato de *Gymnema sylvestre* usando HPLC-PDA e LC-MS/MS. *Chromatography Research International* , v. 2014, n. 1, p. 518175, 2014.

SEERAM N.P., ADAMS L.S., HENNING S.M., NIU Y., ZHANG Y., NAIR M.G., HEBER D. In Vitro Antiproliferative, Apoptotic and Antioxidant Activities of Punicalagin, Ellagic Acid and a Total Pomegranate Tannin Extract Are Enhanced in Combination with Other Polyphenols as Found in Pomegranate Juice. *J. Nutr. Biochem.*, 2005.

SEERAM, Navindra P. et al. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *The Journal of nutrition*, v. 136, n. 10, p. 2481-2485, 2006.

TAYLOR S.H. Pharmacological and Therapeutic Properties of an Ideal β -Blocker. *J. Int. Med. Res.*, 1988.

TEIXEIRA DA SILVA J.A., RANA T.S., NARZARY D., VERMA N., MESHARAM D.T., RANADE S.A. Pomegranate Biology and Biotechnology: A Review. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, 2013.

WETZSTEIN H.Y., YI W., PORTER J.A., RAVID N. Flower Position and Size Impact Ovule Number per Flower, Fruitset, and Fruit Size in

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

Pomegranate. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 2013.

YISIMAYILI, Z.; GUO, X.; LIU, H.; XU, Z.; ABDULLA, R.; AISA, H. A.; HUANG, C. Metabolic Profiling Analysis of Corilagin in Vivo and in Vitro Using High-Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 165, p. 251-260, 2018.

VERMA N., MOHANTY A., LAL A. Pomegranate Genetic Resources and Germplasm Conservation: A Review. Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol. 2010.

¹ Docente do Curso Superior de Farmácia da Universidade Brasil, Campus de Fernandópolis-SP. Doutor em Química pelo Instituto de Química UNESP, Campus de Araraquara-SP. E-mail: kmininel17@gmail.com

² Docente do Curso Superior de Farmácia da Universidade Brasil, Campus de Fernandópolis-SP. Mestre em Química (PPGQUIM/UNESP), Campus de Araraquara-SP. E-mail: silvana.mininel@ub.edu.br