

REVISTA TÓPICOS

ESTUDO FITOQUÍMICO DA INFUSÃO DAS CASCAS DO FRUTO DA ROMÃ (PUNICA GRANATUM L.) E ANÁLISE POR FIA-ESI-IT-MS

DOI: 10.5281/zenodo.14675974

Francisco José Mininel¹

Silvana Márcia Ximenes Mininel²

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a Fitoquímica da espécie *Punica granatum* L., conhecida popularmente como romã. A infusão das cascas dos frutos foi analisada por espectrometria de massas (FIA-ESI-IT-MS). Inicialmente foi feito uma varredura completa (full-scan) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. A partir dos dados da primeira varredura, obtiveram-se os próximos eventos (experimentos MS^n) para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. Foram detectados uma série de compostos farmacologicamente importantes, tais como punicalagina, punicalina, ácido galágico, pedunculagina I e II, 1,3,6-Tri-O-galoil- β -D-glicose, 1,6-di-O-galoil-D-glicose e ácido elágico. Dessa forma, conhecer o perfil químico da espécie torna-se importante, uma vez que algumas atividades já foram avaliadas e descritas, incluindo as atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, antiparasitária, entre outras.

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

Palavras-chave: Fitoquímica. *Punica granatum* L. Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

This study aimed to study the phytochemistry of the species *Punica granatum* L., popularly known as pomegranate. The infusion of the fruit peels was analyzed by mass spectrometry (FIA-ESI-IT-MS). Initially, a full-scan of the mass spectrum was performed to acquire data for the ions in the established m/z range. From the data of the first scan, the next events (MS_n experiments) were obtained for pre-selected precursor ions with collision energy between 25 and 30% of the total energy of the instrument. A series of pharmacologically important compounds were detected, such as punicalagin, punicalin, gallagic acid, pedunculagin I and II, 1,3,6-Tri-O-galloyl- β -D-glucose, 1,6-di-O-galloyl-D-glucose and ellagic acid. Therefore, knowing the chemical profile of the species becomes important, since some activities have already been evaluated and described, including antimicrobial, anti-inflammatory, antitumor, antiparasitic activities, among others.

Keywords: Phytochemistry. *Punica granatum* L. Mass Spectrometry.

1 INTRODUÇÃO

Punica granatum L. (Figura 1), tem sido usada na medicina holística há muito tempo. A romã (*Punica granatum* L.) é uma fruta importante que pode ser produzida em diversas condições agroclimáticas. Esta fruta é uma granada esférica, abrangendo numerosos anéis cheios de conteúdo vermelho escuro e succulento. Esses anéis estão contidos em um pericarpo

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

brilhante e resistente, ou casca (SINGH et al, 2018). A fruta *P. granatum* contém propriedades curativas, incluindo propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias. O câncer de pele e de mama são inibidos pelo óleo de romã. É rico em atividade antioxidante, enquanto o óleo da semente contém produtos químicos fitoestrogênicos. A casca e a fruta da romã tratam disenteria, diarreia e parasitas intestinais. As sementes são usadas como um tônico para infecções de garganta e doenças cardíacas. É usado para tratar hemorroidas e para limpar o nariz e as gengivas (AL-SAID et al, 2009).



REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS



REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS



Figura 1. Aspecto dos frutos de *Punica granatum* L. (Romã).
(Fonte: os autores)

A Tabela 1 contém a classificação taxonômica de *Punica granatum* L (KUMARI et al, 2021).

Tabela 1. Classificação taxonômica de *Punica granatum*.

--	--	--

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

Classificação taxonômica	Táxon
Reino	Plantae
Divisão	Traqueófitas
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Myrtales
Família	Lithraceae
Gênero	Punica
Espécies	Granatum
Nome comum	Romã

REVISTA TÓPICOS

Esse trabalho teve como objetivo estudar a fitoquímica da infusão da casca do fruto da romã (*Punica granatum* L.) a partir da técnica de espectrometria de massas FIA-ESI-IT-MS e detectar compostos de interesse farmacológico, em vista das propriedades curativas apresentadas pela espécie.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A romã, que recebe o nome científico de *Punica granatum*, é um fruto originário da Pérsia e foi cultivado no Norte da Índia e na região do Mediterrâneo desde a Antiguidade. Atualmente, também é cultivada no Norte da África, na África tropical, na Europa, na América do Norte e na América do Sul (SHARMA et al, 2017).

Várias partes de *Punica granatum* L, como sementes, cascas, frutos e folhas, têm diversos componentes químicos, como por exemplo, flavonoides, flavonóis, antocianinas e flavan-3-ol. Estes são os componentes flavonoídicos mais comuns encontrados na casca da romã. Ela também contém derivados de ácido elágico e precursores e até 0,2 por cento de ácido elágico (GE et al, 2021).

O componente comestível da fruta, particularmente os anéis, é essencial e nutritivo e rico em fenólicos, fragmentos não comestíveis da casca contêm altas quantidades de nutrientes essenciais e biologicamente ativos em comparação com os anéis comestíveis. A casca da romã é rica em vitaminas, minerais, ácidos graxos, fibras alimentares e substâncias

REVISTA TÓPICOS

fenólicas, incluindo proantocianidina, elagitaninos e galotaninos (MAGANGANA,2020).

As propriedades terapêuticas, anti-inflamatórias e antioxidante, são atribuídas ao seu elevado teor de taninos hidrolisáveis e antocianinas. Quando comparado com a atividade de outros antioxidantes, como a da Vitamina E, do β -caroteno e do ácido ascórbico, os antioxidantes da romã se destacam, pois possuem uma significativa ação contra vários tipos de radicais livres e uma ampla gama de polifenóis (SHAYGANNIA et al, 2016).

Bhandary et al (2013), realizaram um estudo de toxicidade para determinar a faixa de dosagem segura do extrato da casca do fruto desta espécie por via oral. Demonstrou-se que não foram observados sinais de toxicidade com a administração diária de 2000 mg/kg de extrato etanólico por via oral, durante 28 dias em camundongos, sendo considerado como não tóxico. Resultados semelhantes foram encontrados por Ahad e colaboradores (2018), onde o estudo de toxicidade oral aguda mostrou que os extratos brutos são seguros até a dosagem de 2.000 mg/kg de peso corporal.

Em cascas de frutas de romã, os isômeros α e β da punicalagina (designados punicalaginas) são a forma predominante de taninos hidrolisáveis, respondendo por mais de 85% do total de taninos (SEERAM et al., 2006). Outros taninos hidrolisáveis importantes em cascas de frutas incluem punicalina, ácido elágico, ácido galágico e glicosídeos de ácido elágico. Na maioria dos casos, os taninos hidrolisáveis estão presentes tanto na casca da fruta quanto no suco. Existem apenas alguns relatos sobre

REVISTA TÓPICOS

taninos hidrolisáveis em sementes de romã; curiosamente, o ácido 3,3'-di-O-metilelágico e o ácido 3,3',4'-tri-O-metilelágico foram identificados em sementes, mas não em cascas de frutas ou suco. Vale a pena notar que a identificação do metabólito depende dos tipos de romã que estão sendo analisadas. Por exemplo, um derivado de castalagina e um derivado de galoil-bis-HHDP-hexosídeo (casuarinina) foram detectáveis apenas em cascas de frutas de determinado tipo, mas não nos outros tipos de romã da Tunísia (“Gabsi”, “Nebli” e “Tounsi”) (ABID et al., 2017). Por outro lado, punicalaginas, galoil-HHDP-hexosídeo, galoil-HHDP-DHHDP-hexosídeo (granatina B) e digaloil-HHDP-hexosídeo (pedunculagina II) estavam presentes em cascas de frutas de todas os quatro tipos (ABID et al., 2017).

3 METODOLOGIA

Na primeira etapa do estudo foi realizada a caracterização dos metabólitos secundários presentes na infusão das cascas de *Punica granatum* L. com a técnica ESI-ITMS/MS empregando o modo de inserção direta.

A infusão de cascas de *Punica granatum* L. foi obtida com 1 g de cascas. O material triturado foi mantido em contato com 10 mL de água aquecida (80°C) por 10 min. A mistura contendo a solução e o material particulado foi filtrado em papel de filtro e resfriado a temperatura ambiente, em seguida uma alíquota da solução foi novamente filtrada, agora em membrana de PTFE com poro de 0,45 µm.

A infusão filtrada (500 µL) foi diluída com MeOH para o volume final de 1 mL e a solução introduzida diretamente na fonte de ESI por meio de uma

REVISTA TÓPICOS

seringa de vidro impulsionada por um sistema de bombeamento em fluxo de $5 \mu\text{L min}^{-1}$.

Esta técnica permitiu a obtenção do espectro de massas em modo full-scan apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas ($[\text{M} - \text{H}]^-$) da infusão de cascas de *Punica granatum* L.

Fragmentação de segunda-ordem (MS/MS) para cada um desses íons levou à identificação de diversos metabólitos, conforme discutido a seguir e a nomenclatura utilizada seguiu as recomendações sugeridas por MURRAY e coautores (2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O primeiro evento foi uma varredura completa (full-scan) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. A partir dos dados da primeira varredura, obtiveram-se os próximos eventos (experimentos MS^n) 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. A Figura 2 mostra o espectro de massas em modo full-scan, apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas ($[\text{M} - \text{H}]^-$) da infusão das cascas de *Punica granatum* L.

REVISTA TÓPICOS

Francisco_am1_1mg_ml_esipos_14072011_110713152906#2-20 RT: 0.07-0.32 AV: 16 NL: 3.30E1
T: ITMS - c ESI Full ms [100.00-2000.00]

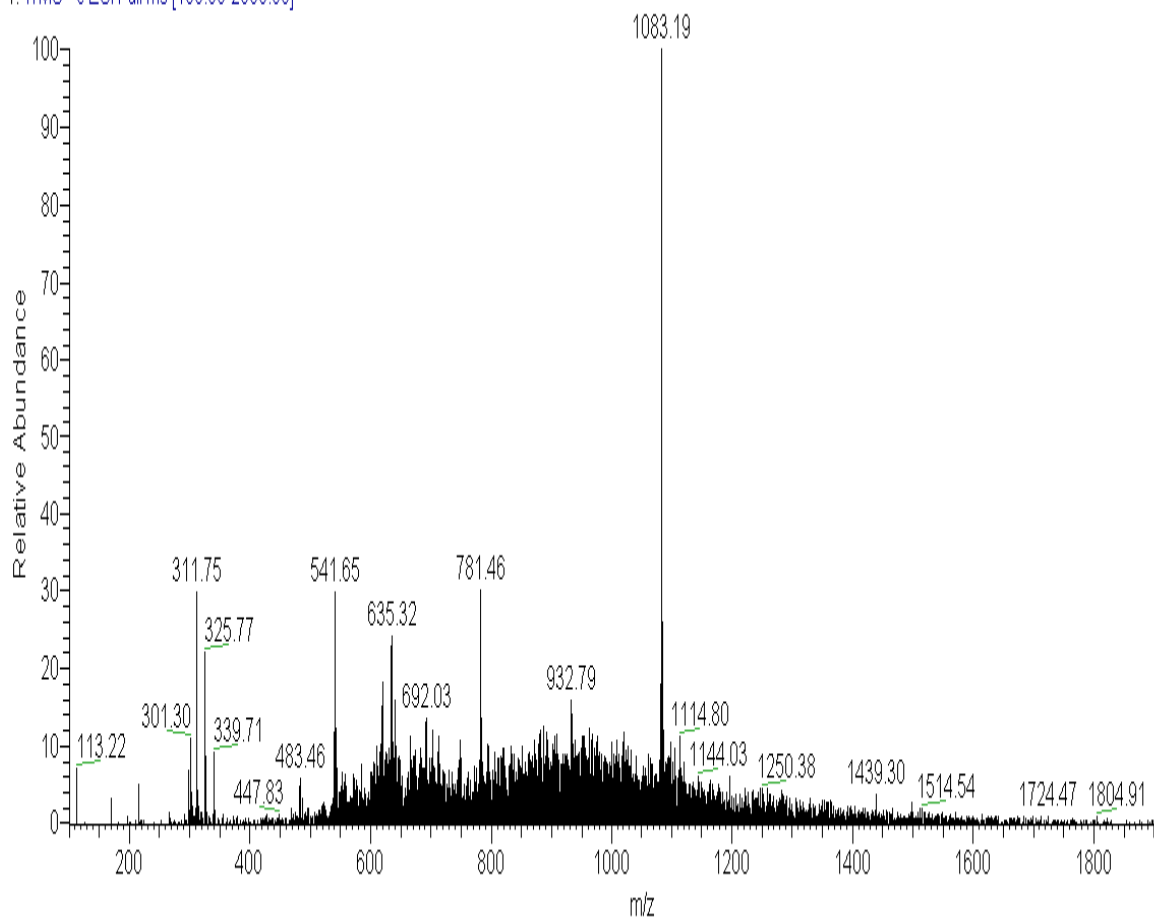


Figura 2. Espectro de massas em modo full-scan da infusão de cascas do fruto de Punica granatum L.

A primeira varredura (modo full-scan) revela os íons detectados e seus respectivos m/z, conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 2. Compostos detectados na primeira varredura (modo full-scan).

Compostos detectados	m/z	Íons
----------------------	-----	------

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

Punicalagina	1083	781, 601
Punicalina	781	601
Ácido galágico	601	494
Pedunculagina I	783	419
Pedunculagina II	785	301
1,3,6-Tri-O-galoil- β -D-glicose	635	483, 465, 313, 301, 169
1,6-di-O-galoil-D-glicose	483	465, 331, 313, 271, 169
Ácido elágico	301	257, 229, 185

REVISTA TÓPICOS

A punicalagina (Figura 3) é um tanino hidrolisável (elagitanino), com atividades antioxidante e antiinflamatória reconhecidas, se destacando como uma promissora molécula multifuncional (GONZÁLEZ MOLINA et al., 2009). Na romã, ela se concentra em maior parte na casca e no mesocarpo do fruto (FISCHER et al., 2011), confirmando os resultados obtidos neste trabalho.

Portanto, dentre os diversos compostos fenólicos presentes na casca de romã, encontram-se os isômeros da punicalagina (GIL et al., 2000).

Análise de MS/MS indicam o padrão de fragmentação da punicalagina (m/z 1083) em punicalina (m/z 781) e ácido galágico (m/z 601), conforme indicado na Figura 3. O íon precursor com m/z 1083 (Figura 3) corresponde à molécula desprotonada da punicalagina. MS/MS deste íon levou ao íon produto de m/z 781 da punicalina a partir da perda da unidade hexahidroxidifenoíla (HHDP) [M-H-302]⁻. A perda de um resíduo de açúcar leva ao fragmento em m/z 601 correspondente ao ácido galágico.

REVISTA TÓPICOS

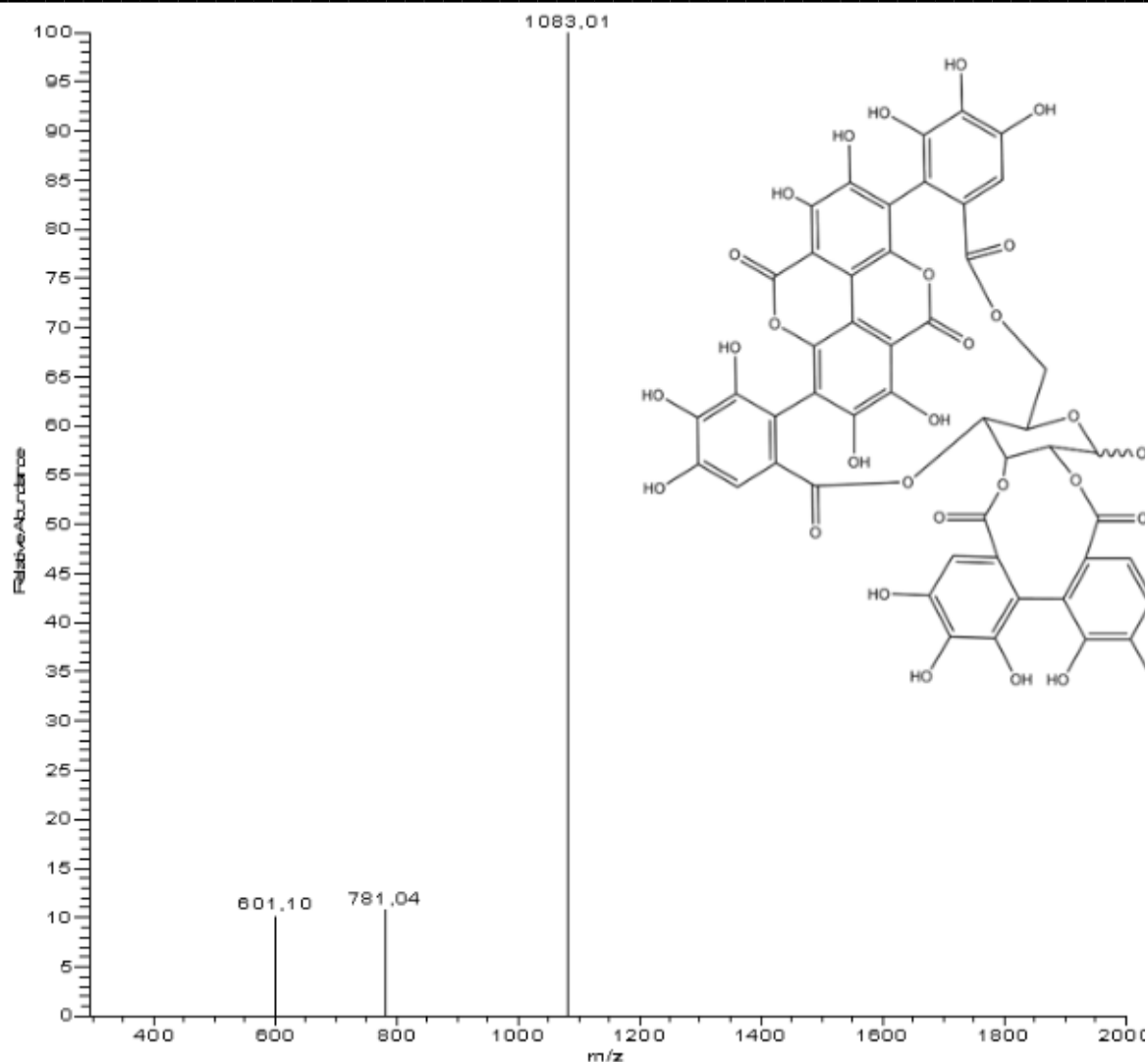


Figura 3. Espectro de massas de segunda ordem (MS^2) do íon em m/z 1083 (punicalagin

Fragmentação em segunda e terceira ordem do íon precursor de m/z 781 (Figura 4) sugeriu a presença do ácido galágico em m/z 601 (Figura 4), conforme descrito anteriormente. Analisando a fragmentação de segunda-ordem do íon precursor em m/z 601 (Figura 5), verifica-se a formação de um fragmento em m/z 299 provavelmente devido à perda de duas unidades

REVISTA TÓPICOS

galoila [M-H-152-152]⁻. Os fragmentos com m/z 271 e m/z 243 surgem a partir da perda de duas moléculas de monóxido de carbono (m/z 28), respectivamente (PFUNDSTEIN, 2010).

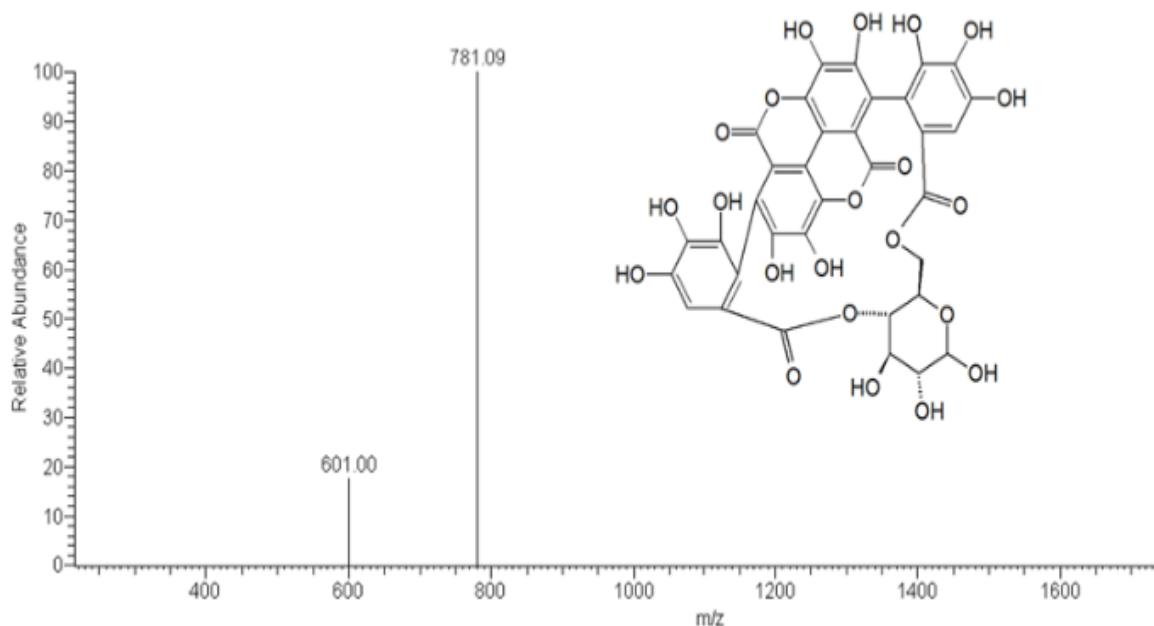


Figura 4. Espectro de massas de segunda ordem (MS^2) do íon em m/z 781 (punicalina)

REVISTA TÓPICOS

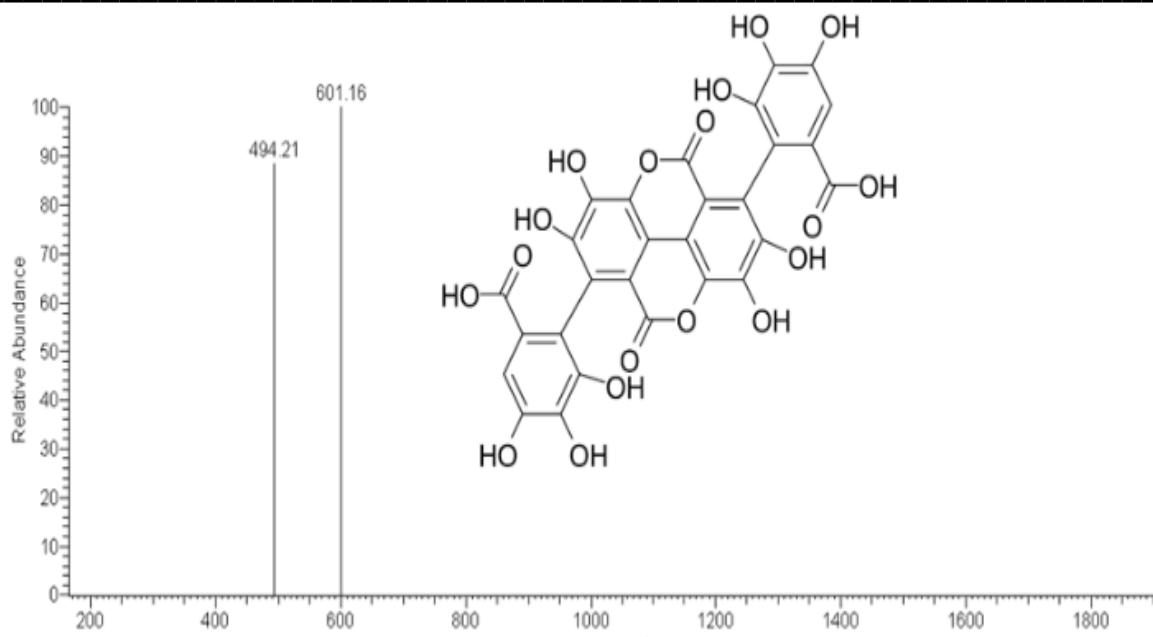


Figura 5. Espectro de massas de segunda ordem (MS^2) do íon em m/z 601 (ácido galálgic

Foram detectados também, os íons em m/z 783 e m/z 785, característicos provavelmente, dos compostos pedunculaginas I e II (Figura 6). Pedunculagina é um elagitanino isolado de espécies de plantas distribuídas em todo mundo e estudos realizados mostraram que pedunculagina apresenta inúmeras propriedades biológicas, tais como: antitumoral, antioxidante, hepatoprotetora, antiinflamatória. Pedunculagina é membro de uma ampla classe de compostos polifenólicos vegetais hidrolisáveis conhecidos como elagitaninos (FELDMAN; SMITH, 1996). Sua estrutura química consiste em duas porções de (S)-hexahidroxidifenoil (HHDP) localizadas nas posições 2,3 e 4,6- de D-glicose (LIU, 1989).

REVISTA TÓPICOS

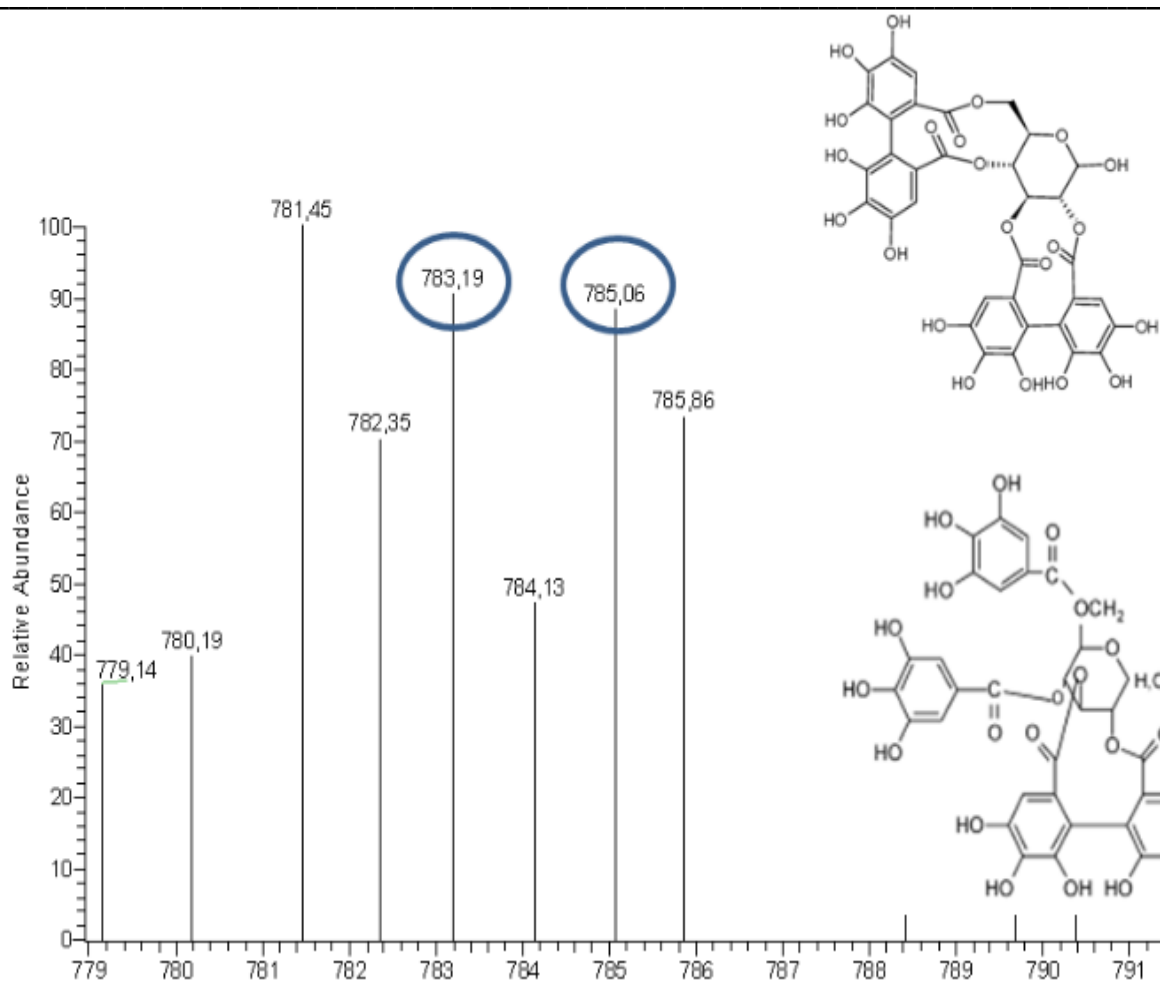


Figura 6. Espectro de massas indicando íon m/z 783 (Pedunculagina I) e m/z 785 (Pedunculagina II).

Na Figura 7, está indicado o íon em m/z 635, estrutura pertence à classe dos galotaninos. O espectro de fragmentação mostrou íons fragmentos característicos de perdas do grupo galoil, que foi proposto por mecanismo QM (GU et al., 2003).

REVISTA TÓPICOS

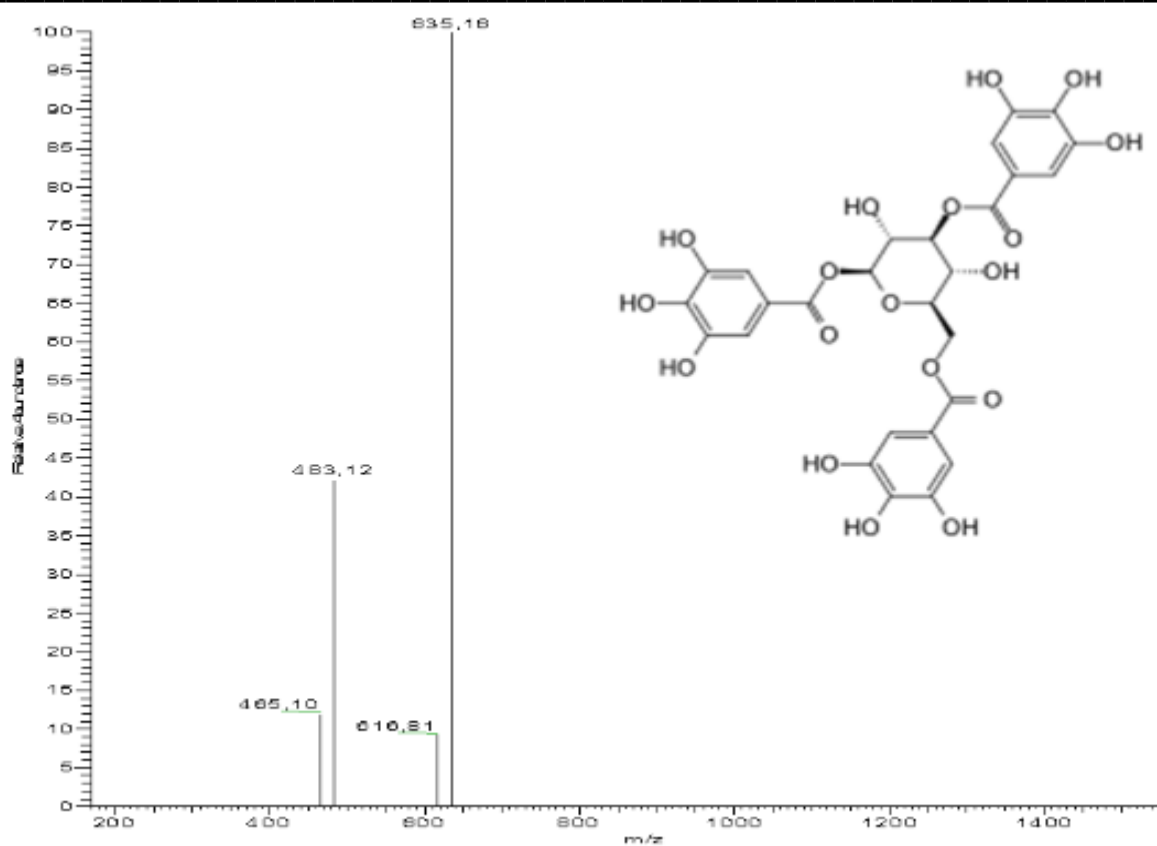


Figura 7. Espectro de massas de segunda ordem (MS²) do íon em m/z 635 (1,3,6-Tri-O-ga β -D-glicose).

REVISTA TÓPICOS

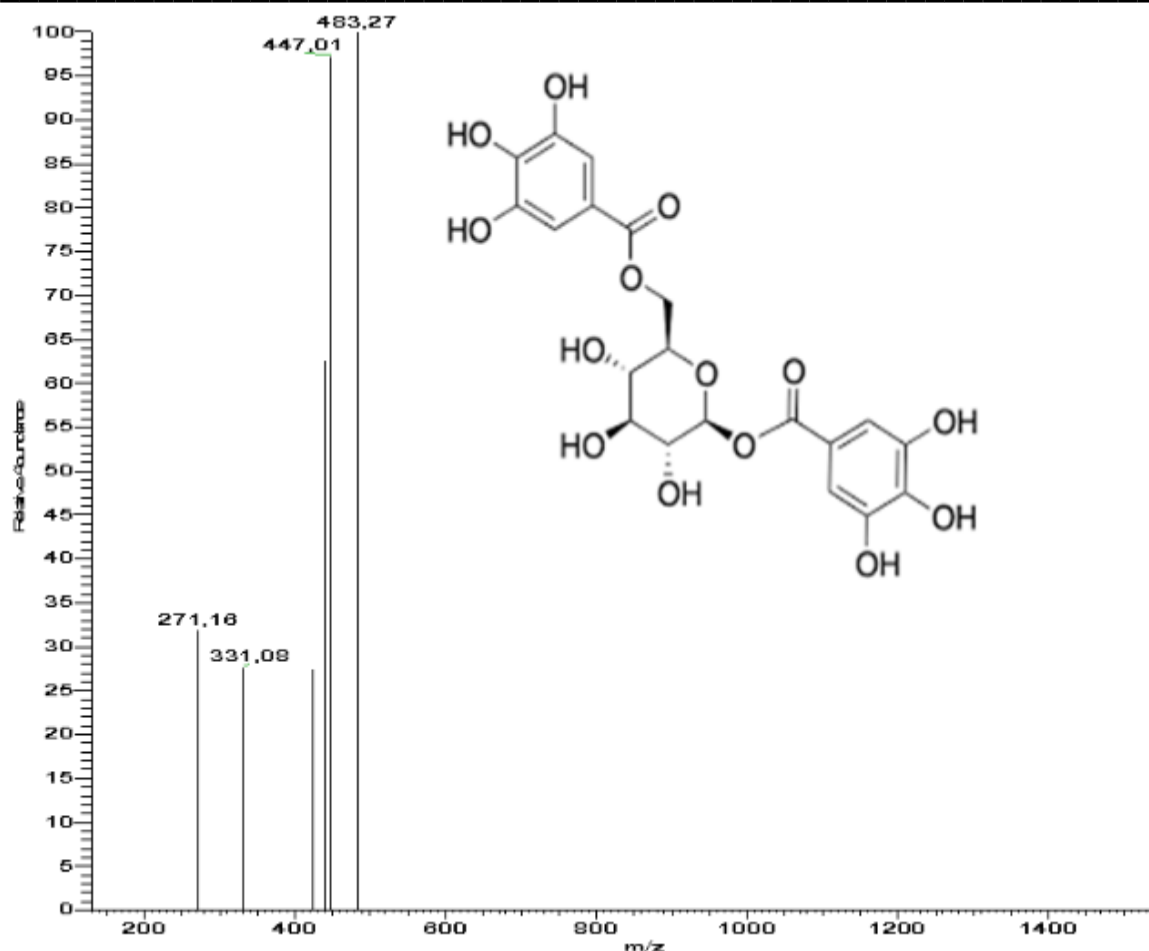


Figura 8. Espectro de massas de segunda ordem (MS²) do íon em m/z 483 (3,6-di-O-galoi glicose).

Dessa forma, os digaloil-hexosídeos com base em seus íons [M - H]⁻ em m/z 483 (Figura 8) e íons de fragmentos MS/MS em m/z 331 [M - H - 152]⁻ aparecem devido à perda de um grupo galoíla (MÄMMELÄ, 2000) .

Portanto, os dois derivados do ácido gálico m/z 483,0 e m/z 635,0 [M-H]⁻ foram identificados como 1,6-di-O-galoil-D-glicosídeo e trigaloil-

REVISTA TÓPICOS

glicosídeo. Os espectros de massas apresentaram fragmentos típicos referentes às perdas do grupo galoil e galato.

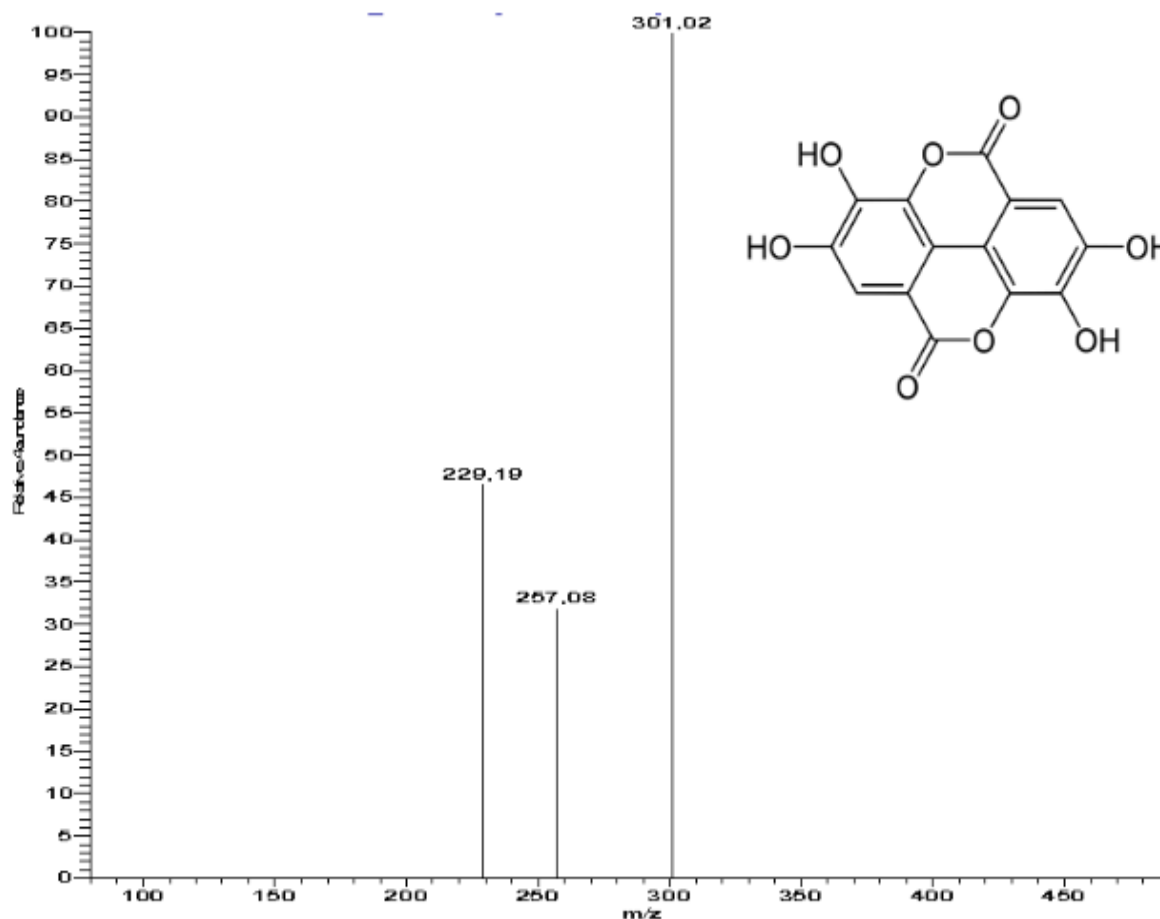


Figura 8. Espectro de massas de segunda ordem (MS^2) do íon em m/z 301 (ácido elágico)

O ácido elágico foi confirmado pela análise ESI-MS que mostrou um pico de íon molecular proeminente em m/z 301. O padrão de fragmentação do ácido elágico constitui-se basicamente das perdas no espectro de segunda ordem (Figura 8) de 44 Da (CO_2) e 28 Da (CO). Estes íons foram detectados a partir do íon precursor m/z 301, originando os íons m/z 257

REVISTA TÓPICOS

$[M - H - CO_2]^-$, m/z 229 $[M - H - CO_2 - CO]^-$ e m/z 185 $[M - H - 2CO_2 - CO]^-$ respectivamente (SEERAM et al., 2006).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização das técnicas de FIA-ESI-IT-MS/MS, possibilitou avaliar de maneira rápida a composição química da infusão das cascas da espécie *Punica granatum* L. (romã), permitindo a identificação e/ou confirmação de oito substâncias. A partir do perfil químico por FIA-ESI-IT-MS/MS, pode-se inferir, qualitativamente, que a infusão das cascas da fruta de *Punica granatum* L. possui majoritariamente o composto punicalagina, ácidos fenólicos, ácido elágico e seus derivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID, M., YAICH, H., CHEIKHROUHO, S., KHEMAKHEM, I., BOUAZIZ, M., ATTIA, H., et al. Propriedades antioxidantes e caracterização do perfil fenólico por LC-MS/MS de cascas selecionadas de romã tunisiana. *J. Food Sci. Technol.* 54, 2890–2901, 2017.

AHAD, S; TANVEER, S; MALIK, T.A; NAWCHOO, I.A. Anticoccidial activity of fruit peel of *Punica granatum* L. *Microb Pathog.*, 2018.

AL-SAID, F.A.; OPARA, LU.; AL-YAHYARI, R.A. Atributos de qualidade físico-química e textural de cultivares de romã (*Punica granatum* L.) cultivadas no Sultanato de Omã. *J Food Eng.*, 2009.

REVISTA TÓPICOS

BHANDARY, B.S.K; SHARMILA, K.P; KUMARI, N.S; BHAT, V. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extracts of Punica granatum (Linn). Whole fruit and seeds and synthetic ellagic acid in swiss albino mice. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 6(4): 192-198. 9, 2013.

FELDMAN, K. S.; SMITH, R. S. Ellagitannin Chemistry. First Total Synthesis of the 2,3- and 4,6-Coupled Ellagitannin Pedunculagin. The Journal of organic chemistry, v. 61, n. 8, p. 2606–2612, 1996.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/ MS. Food Chemistry, v. 127, n. 2, p. 807-821, Jul. 2011.

GE, S.; DUO, L.; WANG, J.; GEGENZHUL.; YANG, J.; LI, Z.; TU, Y. Uma compreensão única da medicina tradicional da romã, Punica granatum L. e seu status atual de pesquisa. J Ethnopharmacol, 2021.

GIL, M. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 10, p. 4581-4589, Oct. 2000.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; MORENO, D. A.; GARCÍAVIGUERA, C. A new drink rich in bioactives combining lemon and pomegranate juices. Food Chemistry, Barking, v. 115, n. 4, p. 1364-1372, Aug. 2009.

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; PRIOR, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 38, p. 1272-1280, 2003.

KUMARI, I.; KAURAV, H.; CHAUDHARY, G. J. *Punica granatum L*: importância terapêutica da planta frutífera mais antiga do mundo. *Drug deliv ther*, 2021.

LIU, L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annual review of biochemistry*, v. 58, n. type I, p. 351–375, 1989.

MAGANGANA, T.P.; MAKUNGA; N.P; FAWOLE, O.A; OPARA, U.L. Fatores de processamento que afetam as propriedades fitoquímicas e nutricionais dos resíduos da casca da romã (*Punica granatum L.*): uma revisão. *Molecules*, 2020.

MÄMMELÄ, Pirjo et al. Análise de taninos de carvalho por cromatografia líquida-espectrometria de massa de ionização por electrospray. *Journal of Chromatography A* , v. 891, n. 1, p. 75-83, 2000.

MURRAY, K. K.; BOYD, R. K.; EBERLIN, M. N.; LANGLEY, G. J.; LI, L.; NAITO, Y.;

TABET, J. C. Standard definitions of terms relating to mass spectrometry. *Pure and Applied Chemistry*, 2006.

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

PFUNDSTEIN, Beate et al. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. *Phytochemistry*, v. 71, n. 10, p. 1132-1148, 2010.

SHARMA, P; MCCLEES S.F; AFAQ, F. Pomegranate for prevention and treatment of cancer: an update. *Molecules*, 2017.

SHAYGANNIA E, BAHMANI M, ZAMANZAD B, RAFIEIAN-KOPAEI M. A review study on *Punica granatum* L. *J Evid Based Complementary Altern Med.*, 2016.

SEERAM, Navindra P. et al. Extratos de amora-preta, framboesa-preta, mirtilo, cranberry, framboesa-vermelha e morango inibem o crescimento e estimulam a apoptose de células cancerígenas humanas in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry* , v. 54, n. 25, p. 9329-9339, 2006.

SINGH, B.; SINGH, J.P., KAUR, A.; SINGH, N. Compostos fenólicos como fitoquímicos benéficos na casca da romã (*Punica granatum* L.): uma revisão. *Food Chem.* 2018.

¹ Docente do curso 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 de Farmácia da Universidade Brasil, Campus de Fernandópolis-SP. Mestre em Química (PPG/UNESP- Campus de Araraquara-SP). E-mail: Silvana.mininel@ub.edu.br

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672

REVISTA TÓPICOS

REVISTA TÓPICOS - ISSN: 2965-6672