

Identificação dos compostos da arruda através de cromatografia e uso do amostrador *Headspace*

Rodrigo Gallotti Lima¹

RESUMO

A presente pesquisa utiliza a Arruda (*Ruta graveolens L.*), erva bastante utilizada para fins terapêuticos. O objetivo desta pesquisa é otimizar a extração dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV's) da *Ruta graveolens L.* utilizando a técnica do *headspace*, afim de melhor identificar os COV's da erva através da cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Para tal, como método de extração, escolheu-se o *headspace* utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas como técnicas de detecção e identificação respectivamente. A condição que promoveu a melhor identificação dos componentes contemplando boa resolução, separação e intensidade de sinal obtidos nos cromatogramas foi encontrada utilizando 3g de folhas colocadas em frascos de *headspace* de 20 ml, juntamente com 5 ml de água e 1,5 gramas de NaCl, prensadas e maceradas e submetidos à aquecimento na temperatura de 60°C durante 23 minutos, para posterior análise cromatográfica. Após realização da análise cromatográfica, fez-se a detecção e identificação dos compostos mediante uso de biblioteca considerando como valor mínimo 90% de similaridade, resultando na presença de ésteres, aldeídos, cetonas, alcoóis, amins além de mono terpenos cíclicos, perfazendo um total de dezessete compostos identificados que são utilizados para diversos fins tais como fabricação de produtos cosméticos, confecção de odores artificiais, solvente de resinas, pigmentos, tintas, na fabricação de adesivos, tratamento da hiperplasia benigna prostática etc.

Palavras-chave: *Ruta Graveolens*. Cromatografia gasosa. *Headspace*.

¹ Mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente (UFS). Professor e Coordenador do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe (IFS) - Campus Aracaju. Contato: florafertil@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

A arruda (*Ruta graveolens* L.) é uma planta da família *Rutaceae*, nativa do nordeste da Europa e sudeste da África. Este subarbusto é cultivado mundialmente devido à aromaticidade substancial de suas folhas e tem sido constantemente utilizado na medicina em decorrência de suas propriedades terapêuticas, atribuídas ao longo dos séculos (DI STASI E HIRUMA-LIMA(2002) E LORENZI E MATOS(2002)). A *Ruta graveolens* L. é largamente utilizada como recurso medicinal pela população local em todo o Brasil. De suas folhas, produzem-se os chás que são utilizados para fins calmantes ou aplicação das folhas secas em pó no combate a insetos da ordem *Phthiraptera* (AL-QURAINY et al., 2011).

A atividade biológica da Arruda tem sido atribuída à presença de substâncias a exemplo de cumarinas e alcalóides, particularmente quinolinas, furanocumarinas e furanoquinolinas, mediante realização de estudos fitoquímicos (CUNHA et al., 2003).

A arruda contém várias substâncias em sua composição, das quais se destacam o psoraleno, a rutina e a quercetina. A espécie destaca-se como venotônica, antiparasitária, espasmolítica e fotosensibilizante. À rutina, atribuem-se as seguintes propriedades: inibe a aldose-redutase, combate a fragilidade dos capilares, hipotensor, antitrombogênico, antidermatítico, antiinflamatório, antiedêmico, antieritêmico, antihematúrico, antihistamínico, antidiabético, antioxidante, pesticida, antitumor, antiviral, preventivo do câncer, protetor capilar, anticatarata, larvístático e espasmolítico (SANTOS et al., 2009).

À quercetina são atribuídas as propriedades analgésica, antiHIV, antialérgica, bactericida, antidiabética, carminativa, antigástrica, hepatoprotetora, antihistamínica, antiinflamatória, antioxidante, antiespasmódica, antitumoral, antiviral e larvístático. O psoraleno é usado em casos de vitiligo e psoríase. (DONG et al., 2003; KAMINSKI et al., 2003).

Dentre os métodos mais utilizados para analisar COV'S destaca-se aquele que faz uso do *headspace* em conjunto com um espectrômetro de massas acoplado cromatógrafo a gás (NAVARRO et al., 2005)

O headspace é uma técnica excelente e sensível, utilizada para analisar compostos em baixas concentrações. Nesta técnica, na qual o analito é, necessariamente, mais volátil que a matriz, este volatiliza preferencialmente, podendo ser determinado sem os interferentes dos

outros componentes da amostra, através da análise do vapor desprendido do analito (GOBATO E LANÇAS, 2001).

Uma vez que a fase de amostra é introduzida no interior do frasco e este é fechado, os componentes voláteis difundem-se na fase gasosa até que o espaço da cabeça do frasco seja atingido e entre em equilíbrio, como representado pelas setas (Figura 1). Em seguida, a amostra é retirada do espaço ao nível da cabeça do frasco.

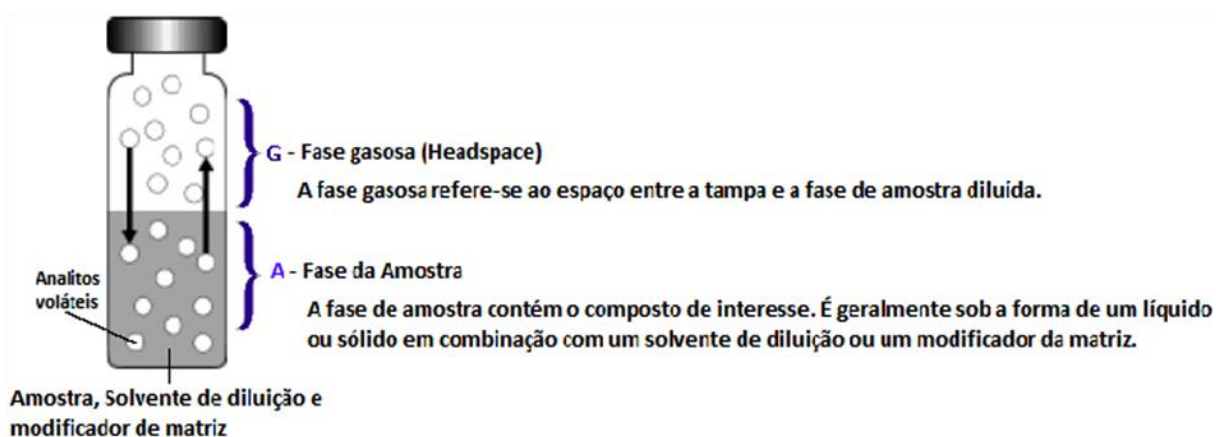


Fig. 1 – As duas fases de um frasco de *Headspace*
Fonte: Adaptado de Melquiades et al, 2006

A cromatografia gasosa é uma ferramenta fundamental na identificação e quantificação de diversos compostos, especialmente os de origem vegetal, devido ao auxílio das bibliotecas espectrais, com detector de massas (GC-MS) operando sob condições de impacto de elétrons. A quantificação é realizada através do uso de padrão interno, que compensa uma possível baixa recuperação durante o processo de extração e a variação na resposta instrumental (RODRIGUES, 2006).

O presente trabalho tem como objetivo otimizar a extração dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV's) da *Ruta graveolens L.* utilizando a técnica do *headspace*, afim de melhor identificar os COV's da erva através do GC-MS.

DESENVOLVIMENTO

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostra

Amostras da *Ruta graveolens* L. (galhos com folhas frescas e verdes) foram adquiridas em um mercado local, armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório para análise. No intuito de se obter máxima concentração dos voláteis da amostra, estas foram analisadas no mesmo dia da sua compra.

2. Preparo das amostras

Os galhos foram desfolhados no laboratório manualmente e as folhas por sua vez foram cortadas com uma tesoura, em pedaços medindo aproximadamente de 0,5 a 0,8 cm. As massas 1g, 1,5g e 3g da folha foram pesadas em balança analítica e colocadas em frascos de *headspace* de 20 ml como sendo as massas da amostra.

3. Parâmetros do “headspace”

Para o procedimento de extração, os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Extração: A seco (somente a folha), com solvente (folha + água), com solução salina (folha + água + 1,5g de NaCl).
- Temperatura de extração: 50, 60 e 70°C.
- Tempo de extração: 15, 23 e 30min.

Obs.: A água utilizada foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). O volume injetado da amostra foi de 500µL e cada amostra foi analisada em triplicata.

4. Cromatografia gasosa / Espectrometria de massas

Utilizou-se um cromatógrafo a gás da marca Varian modelo 3900 equipado com injetor Split/Splitless (250°C Razão Split 1:20). A coluna utilizada foi a DB-1MS (100% dimetilpolisiloxano) (baixa polaridade - 30m, 0.25mm d.i., 0.25µm e.f.). O forno foi programado com uma temperatura inicial de 40°C (Patamar de 1 min.), rampa até 210°C à razão de 7°C min⁻¹, e tempo total de 25,29 min. A pressão do gás Hélio foi de 350 kPa, com velocidade linear de 36,6 cm/s, o mesmo estava acoplado

a um Espectrômetro de Massas modelo Saturn 2100T com energia de ionização de 70eV e com varredura de massas com range de m/z 35 a 400 u.m.a. para identificação dos componentes da planta.

Para a identificação dos compostos detectados na amostra utilizou-se as bases de dados de espectros de massas NIST105, NIST21 EWILEY139 com similaridade acima de 90%. O banco de dados é limitado e, em alguns casos, indica quais seriam os prováveis constituintes, por aproximação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após tentativas em triplicatas de todas as combinações de métodos amostrais possíveis, a condição que promoveu melhor identificação dos componentes contemplando boa resolução, separação e intensidade de sinal obtido no cromatograma foi encontrada utilizando:

- Extração: 3g de folhas colocadas em frascos de *headspace* de 20 ml, juntamente com 5 ml de água e 1,5 gramas de NaCl, prensadas e maceradas.
- Temperatura de extração: 60°C.
- Tempo de extração: 23min.
- Quanto ao tipo de extração, 3g da amostra prensadas e maceradas na solução salina foi o tipo que melhor apresentou resultados, uma vez que o sal pôde desprender melhor os COV's da amostra em relação os outros tipos de extração que apresentavam baixos picos e má resolução.
- Quanto a temperatura de extração, 60°C foi a que melhor respondeu a esta pesquisa uma vez que despreendeu maior quantidade de COV's da amostra.
- Quanto ao tempo de extração, até 23 minutos, foram identificados todos os compostos mais relevantes.

A representatividade foi constatada, uma vez que as diferenças entre as replicatas da amostra estudada não foram significativas.

Um perfil cromatográfico representativo foi obtido conforme mostra a Figura 2. Para melhor visualização os picos foram numerados e identificados na Tabela 1.

Da análise cromatográfica observou-se a presença de ésteres, aldeídos, cetonas, alcoóis, aminas além de mono terpenos cíclicos destacando a presença do ácido propanóico, do pentil ester utilizado para fabricação de produtos cosméticos e tintas de impressão, o 2-hexenal, (E) um componente de feromônios de alarme de

percevejos que tem mostrado ação cairomonal eficiente para parasitóides de ovos, biciclo[3.1.1]hept-2-eno, 2,6,6-trimetil-(α -pineno) muito utilizado para fins farmacêuticos e na confecção de odores artificiais, o ciclohexeno, 1-metil-4-(metiletenil)-, (S)- (L-Limonene) usado como solvente de resinas, pigmentos, tintas, na fabricação de adesivos etc. Também é usado pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias como componente aromático e para dar sabor (flavorizantes) na obtenção de sabores artificiais de menta e na fabricação de doces e chicletes, a isoquinolina, 7-metil- as quinolinas são úteis em terapia, em particular no tratamento da hiperplasia benigna prostática, a 2-undecanone que é um abortivo se usado em altas concentrações, podendo causar morte uterina e a 9,10-antracenediona, 1-(metilamina)-4-[(4-metilfenil)amina]- que é utilizado como solventes em corantes. Outros voláteis possivelmente presentes na amostra não foram detectados em função da sensibilidade do detector.

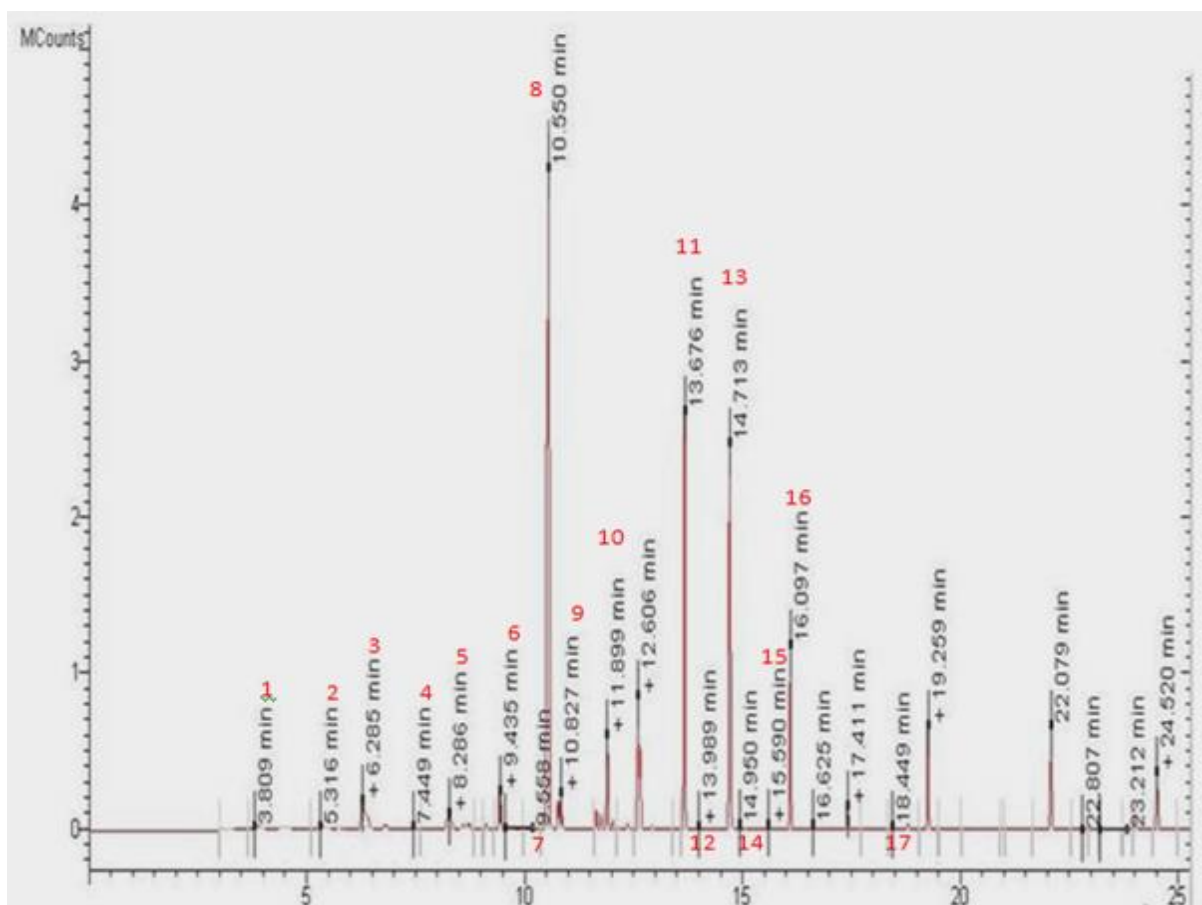


Figura 2 – Cromatograma da amostra de arruda.

Pico	Nome do Composto	Tempo de Retenção (min.)	CAS nº
1	Ácido propanóico, pentil ester	3,809	624-54-4
2	2-hexenal, (E)	5,316	6728-26-3
3	Ácido Bunatonoico, 2-metil-, propil ester	6,285	37064-20-3
4	Biciclo[3.1.1]2 hepteno, 2,6,6-trimetil-	7,449	2437-95-8
5	2-Heptanona, 4-metil-	8,286	6137-06-0
6	Ciclohexeno, 1-metil-4-(metiletenil)-, (S)-	9,435	5989-54-8
7	3-Octanol, acetato	9,558	4864-61-3
8	Isoquinolina, 7-metil-	10,550	54004-38-5
9	2-decanol	10,827	1120-06-5
10	Ciclopenteno, 3-etenil-	11,899	26727-45-7
11	Hidroxilamina, o-decil-	13,676	29812-79-1
12	2-Dodecanona	13,989	6175-49-1
13	2-Undecanona	14,713	112-12-9
14	2-Tetradecanol	14,950	4706-81-4
15	5-Dodecanol acetato	15,590	60826-24-6
16	9,10-antracenediona,1-(metilamino)-4- [(4metilfenil)amina]-	16,097	128-85-8
17	2-Tridecanona	18,449	593-08-8

Tabela 1 – Composição química dos voláteis das amostras de arruda.

Segundo Orlanda (2011), ao extrair e analisar os compostos do óleo essencial da *Ruta Graveolens L.* via GC-MS, obtiveram-se os seguintes constituintes químicos: a classe metilcetônica ou monoterpenóides, representada por quatro compostos: 2-nonanona, 2-decanona, 2-undecanona e 2-dodecanona. Além destes compostos foram identificados os ésteres, acetato de octila, ftalato de etila e acetato de pentadecanila. Os últimos não foram identificados por diversos motivos dentre eles: sensibilidade do detector, diferentes métodos de extração dos COV's, e em função da amostra (época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento, condições de temperatura, luminosidade e umidade do ar às quais o material vegetal é submetido etc).

Os compostos identificados em ambas pesquisas: 2-nonanona e 2-undecanona da *Ruta Graveolens L.*, apresentam as seguintes propriedades comprovadas: bactericida, fungicida, aleloquímicos, antioxidante, inseticida, repelente, alelopático, expectorantes, antivirais, descongestionantes hepáticos, estimulantes da circulação e do sistema nervoso central (DE FEO et al., 2002).

CONCLUSÃO

De acordo dos resultados encontrados foi possível otimizar a extração dos Compostos Orgânicos Voláteis (COV's) da *Ruta graveolens L.* utilizando a técnica do *headspace*, afim de melhor identificar os COV's da erva através do GC-MS.

Através dos experimentos realizados, observou-se que aspectos como tipo, temperatura e o tempo de extração foram determinantes na melhor condição identificação dos componentes contemplando boa resolução, separação e intensidade de sinal obtido no cromatograma em *Mcounts*.

Nesta pesquisa observa-se que o presente método uma vez otimizado é simples e constitui uma boa ferramenta para análise de COV's da *Ruta graveolens L.* Por fim, sugere-se esta metodologia para extrair e identificar COV's de outras espécies vegetais medicinais.

REFERÊNCIAS

- AL-QURAINY, A.; KHAN, S.; ALI, M. A.; FAHAD, M.; AL-HEMAID, MOHAMED, T.; ASHRAF, M. Authentication of *Ruta graveolens* and its adulterant using internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. **Pakistan Journal of Botany**. 43(3): 1613-1620, 2011.
- CUNHA, P. A.; SILVA, P. A.; ROQUE, R.O., **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.
- DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**. 61: 573-578, 2002.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora UNESP. 2. ed. São Paulo, 2002. 592 P.
- DONG, N. T.; BAE, K.; KIM, Y. H.; HWANG, G. S.; HEO, O. S.; KIM, S. E.; KANG, J. S. Quantitative determination of psoralen and angelicin from some medicinal herbs by high performance liquid chromatography. **Archives of Pharmacal Research**. v. 26, n. 07. p. 516-520, 2003.
- KAMINSKI, M.; KARTANOWICZ, R.; KAMINSKI, M. M.; KROLICKA, A.; SIDWA GORYCKA, M.; LOJKOWSKA, E.; GORZEN, W. HPLC-DAD in identification and quantification of selected coumarins in crude extracts from plant cultures of *Ammi majus* and *Ruta graveolens*. **Journal of Separation Science**. v. 26, n. 14, p. 1287-1291, 2003.
- GOBATO, E. A. A. F.; LANCAS, F. M. Comparação entre injeção na coluna ("on-column") e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, Apr. 2001.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Nova Odessa**. Instituto Plantarum, 2002. 544p.
- MELQUIADES, R. A.; LOBO.; GUEDES, C. L. B.; PINTO, J. P. Análise de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em solos por headspace e cromatografia gasosa/detector de ionização de chama. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 27, p. 113-120, 2006.
- NAVARRO, M.; SENA, Vera L. M.; SRIVASTAVA, R. M. e NAVARRO, D. M. A. F. Atualizando a química orgânica experimental da licenciatura. **Quím. Nova [online]**. vol.28, n.6, pp. 1111-1115. 2005 ISSN 0100-4042.
- ORLANDA, J. F. F.; **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (RUTACEAE)**. 2011. 105f - João Pessoa, PB. Tese (Doutorado em Química Analítica). Universidade Federal da Paraíba, 2011.
- RODRIGUES, M. V. N.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA J. S.; S. A.

S.; REHDER, V. L. G. . Utilização de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência** (UNICAMP), v. 7, p. 1-14, 2006.

SANTOS, L. M.; SENS, R. C. V.; DIAS, J. F. G.; BALESTRIM, L; KALEGARI, M; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Avaliação da atividade alelopática de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) na germinação e crescimento de sementes de *Lactuca sativa* cv. Babá. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.10, n.1 - ISSN 1518-5192. Jan. - Jun./2009.

ABSTRACT

This research uses the Rue (*Ruta graveolens* L.) herb widely used for therapeutic purposes. The objective of this research is to optimize the extraction of Volatile Organic Compounds (VOCs) from *Ruta graveolens* L. using the technique of headspace in order to better identify the VOCs herb by gas chromatography and mass spectrometry. To do so, picked up as the headspace extraction method using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer as detection techniques and identification respectively. The condition which provided better identification of components comprising good resolution, separation and signal intensity obtained in the chromatograms were found using 3g of sheets placed in headspace vials of 20 ml, along with 5 ml of water and 1.5 grams of NaCl, pressed and crushed and subjected to heating at 60 ° C for 23 minutes for subsequent chromatographic analysis. After gas chromatographic analysis, it was the detection and identification of library compounds by using as the minimum value whereas 90% similarity, resulting in the presence of esters, aldehydes, ketones, alcohols, amines plus mono cyclic terpene, a total seventeen compounds identified that are used for various purposes such as manufacturing of cosmetic products, preparation of artificial odors, solvent for resins, pigments, inks, in the manufacture of adhesives, treatment of benign prostatic hyperplasia etc.

Key-words: *Ruta Graveolens*. Gas Cromatography. Headspace.

Recebido em 26/10/2012

Aprovado em 15/12/2012