



Universidade de Brasília

Instituto de Química

RICARDO RODRIGUES DA SILVA SOUSA

**ANÁLISE METABOLÔMICA NO ESTUDO DA ONTOGENIA DO EXTRATO  
DAS FOLHAS DE *RUTA GRAVEOLENS L.* (ARRUDA) E COMPARAÇÃO DE  
SEU ÓLEO ESSENCIAL EM RELAÇÃO AO AMBIENTE**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO 2**

BRASÍLIA – DF

2º/2021



Universidade de Brasília

Instituto de Química

RICARDO RODRIGUES DA SILVA SOUSA

**ANÁLISE METABOLÔMICA NO ESTUDO DA ONTOGENIA DO EXTRATO  
DAS FOLHAS DE *RUTA GRAVEOLENS L.* (ARRUDA) E COMPARAÇÃO DE  
SEU ÓLEO ESSENCIAL EM RELAÇÃO AO AMBIENTE**

Trabalho de Conclusão do Curso em Bacharel em  
Química apresentado ao Instituto de Química da  
Universidade de Brasília, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Bacharel em Química

**Orientador:** Mauro Vicentini Correia

BRASÍLIA – DF

2º/2021

## **AGRADECIMENTOS**

Expresso minha gratidão aos meus pais, Maria Aparecida e Francisco, pelo apoio incondicional, carinho e paciência, durante toda a minha trajetória de vida, sem esse apoio nada aconteceria.

Agradeço aos amigos que encontrei no curso, Leticia, Malaquias, Clarisse, Matheus, Carol, Athos, Julia, Gabriel, Guilherme Tin e Jeffrey, que sempre estiveram comigo nos momentos bons e ruins do curso, e nunca me deixaram desistir.

Agradeço à Mariana, pelas dicas, que foram úteis na hora do experimento, e pela sua amável companhia.

Agradeço ao meu orientador, Mauro Vicentini, por toda paciência, participação e orientação na realização deste trabalho. Aos professores, Angelo e Carlos Martin, pela participação na banca e sugestões no trabalho. Ao técnico Alan Mól, pela ajuda em toda parte instrumental do trabalho.

## RESUMO

A *Ruta graveolens L.*, ou popularmente conhecida como arruda, é uma espécie vegetal da família das Rutaceas, abundante em diversas regiões geográficas por não ser exigente quanto ao clima e as formas de cultivo, é também conhecida por ser uma planta com variadas propriedades medicinais. O presente trabalho propõe-se a estudar a *Ruta graveolens L.* com uma abordagem metabolômica comparativa. O objetivo central do atual trabalho é utilizar a metabolômica como ferramenta para estudar o metabolismo da *Ruta graveolens L.* em relação à diferentes situações, ou seja, traçar um perfil metabólico (do inglês *metabolic profiling*) do crescimento da planta e das plantas adultas adquiridas em diferentes comércios, com análises entre diferentes grupos. Para a execução do projeto foi aplicado um fluxograma de trabalho contendo etapas como: coleta, extração por maceração, preparo de amostra, análise instrumental e análise de dados, com isso espera-se ampliar o conhecimento do metabolismo da *Ruta graveolens L.* e da variação de seu óleo essencial, obtido através de destilação por arraste a vapor em aparelho clewenger. As análises de óleo essencial mostram diferenças na composição do óleo para espécimes adquiridas em diferentes comércios. A análise de componentes principais dos extratos metanólicos aponta uma diferença entre plantas mais jovens e adultas, mostrando que o ambiente e a ontogenia são fatores que podem alterar o metabolismo da *Ruta graveolens L.*

Palavras-chave: Metabolômica, ontogênese, *Ruta graveolens L.*, PCA, GC-MS, DIMS, óleo essência.

## ABSTRACT

*Ruta graveolens* L., or popularly known as rue, is a plant species of the Rutaceae family, abundant in several geographic regions for not being demanding as the climate and the forms of cultivation, it is also known for being a plant with varied medicinal properties. The central objective of the present work is to use metabolomics as a tool to study the metabolism of *Ruta graveolens* L. in relation to different situations, that is, to trace a metabolic profiling of the growth of the plant and of the adult plants acquired in different shops, with analyses among different groups. For the execution of the project a work flowchart was applied containing steps such as: collection, extraction by maceration, sample preparation, instrumental analysis and data analysis, with this it is expected to increase the knowledge of the metabolism of *Ruta graveolens* L. and the variation of its essential oil, obtained through steam distillation in a clevenger apparatus. The essential oil analysis show differences in the composition of the oil for specimens purchased in different shops. The principal component analysis of the methanolic extracts points out a difference between younger and adult plants, showing that environment and ontogeny are factors that can change the metabolism of *Ruta graveolens* L.

Keywords: Metabolomics, ontogeny, *Ruta graveolens* L., PCA, GC-MS, DIMS, essential oil.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DIMS	Espectrometria de massas por injeção direta
GC-MS	Cromatografia gasosas acoplada à espectrometria de massas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
MS	Espectrometria de massas
PLE	Extração com líquido pressurizado
PCA	Análise de componentes principal
PSL-DA	Método dos mínimos quadrados parcial discriminante
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RNA	Ácido ribonucleico
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
SFE	Extração com fluido supercrítico
UV	Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Vantagens e desvantagens de métodos de extração

**Tabela 2.** Comparação entre RMN e MS (GC-MS e LC-MS)

**Tabela 3.** *Softwares* de pré-processamento de dados.

**Tabela 4.** Rendimento percentual do óleo essencial da espécie vegetal *Ruta Graveolens L.* a partir da massa fresca.

**Tabela 5.** Amostras de diferentes grupos de *Ruta graveolens L.* analisadas por espectrometria de massas por injeção direta.

**Tabela 6.** Componentes químicos identificados a partir do óleo essencial de *Ruta Graveolens L.* do Cruzeiro.

**Tabela 7.** Componentes químicos identificados a partir do óleo essencial de *Ruta Graveolens L.* da amostra OL<sub>1</sub> da Leroy Merlin

**Tabela 8.** Componentes químicos identificados a partir do óleo essencial de *Ruta Graveolens L.* da amostra OL<sub>2</sub> da Leroy Merlin

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Funcionamento celular
- Figura 2.** Fluxograma de trabalho para metabolômica alvo e metabolômica global.
- Figura 3.** Análise do metaboloma no contexto das ciências ômicas e abordagens da metabolômica
- Figura 4.** Gráfico de *Scores* dos extratos de *Brassica rapa ssp. Pekinensis*
- Figura 5.** Resumo do fluxograma de trabalho em metabolômica
- Figura 6.** Ocorrências da espécie *Ruta graveolens L.* no planeta.
- Figura 7.** Folhas e flores da espécie *Ruta graveolens L.*
- Figura 8.** Enantiômeros de  $\alpha$ -Pineno e  $\beta$ -Pineno
- Figura 9.** Estrutura molecular das Furanocumarinas.
- Figura 10.** Os três componentes majoritários encontrados no óleo essencial da espécie vegetal *Ruta graveolens L.*
- Figura 11.** A) espécimes de *Ruta graveolens L.* cultivadas em ambiente caseiro; B) espécimes de *Ruta graveolens L.* cultivadas em incubadora BOD.
- Figura 12.** Variação de tamanho das folhas de um espécime adulto de *Ruta graveolens L.* adquirido em comércio local.
- Figura 13.** Alinhamento de cromatogramas e transformação para dados numéricos.
- Figura 14.** Esquema do aparelho de Clevenger e destilação por arraste a vapor.
- Figura 15.** Óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em aparelho de Clevenger.
- Figura 16.** Cromatogramas das amostras de óleo essencial de espécimes da *Ruta graveolens L.* obtidas na Floricultura Nice, situada no bairro Cruzeiro – DF.
- Figura 17.** Cromatogramas das amostras de óleo essencial de espécimes da *Ruta graveolens L.* obtidas na Leroy Merlin Park Sul, da marca Veiling Holambra (**OL**).



**Figura 18.** Compostos encontrados nas amostras de óleo essencial nas espécies vegetais de *Ruta graveolens L.* do Cruzeiro (OC) e na amostra OL<sub>2</sub>.

**Figura 19.** Diferenças visuais entre espécimes da marca Veiling Hollambra adquiridas na loja Leroy Merlin.

**Figura 20.** Gráfico de scores dos diferentes grupos de espécimes da *Ruta graveolens L.*

**Figura 21.** Gráfico de loadings referente à análise entre os grupos da *Ruta graveolens L.*

**Figura 22.** Mapa de calor referente à análise entre os grupos da *Ruta graveolens L.* e seus íons.

**Figura 23.** Espécimes de *Ruta graveolens L.* de diferentes idades cultivadas em diferentes ambientes

**Figura 24.** Cromatograma da amostra de solvente acetato de etila (AcOEt).

**Figura 25.** Cromatograma da amostra de origem do Cruzeiro – DF.

**Figura 26.** Cromatograma de origem da Leroy Merlin (OL<sub>1</sub>).

**Figura 27.** Cromatograma de origem da Leroy Merlin (OL<sub>2</sub>).

**Figura 28.** Espectro de massa da solução 1:1 de metanol/água (branco).

**Figura 29.** Cromatogramas de DIMS de todos os extratos líquidos alinhados pelo *software* XCMS.

**Figura 30.** Espectros de massas das réplicas das amostras de *Ruta graveolens L.* adquiridas no Cruzeiro – DF.

**Figura 31.** Espectros de massas das réplicas das amostras de espécimes de *Ruta graveolens L.* com 4 semanas de idade cultivadas em ambiente caseiro

**Figura 32.** Espectros de massas das réplicas das amostras de espécimes de *Ruta graveolens L.* adquiridas na Leroy Merlin, da marca Veiling Hollambra.

**Figura 33.** Espectros de massas das réplicas das amostras de espécimes de *Ruta graveolens L.* com 12 semanas de idade cultivadas em ambiente controlado em incubadora BOD

**Figura 34.** Espectros de massas das réplicas das amostras de espécimes de *Ruta graveolens* L. com 8 semanas de idade cultivadas em ambiente caseiro

## SUMÁRIO

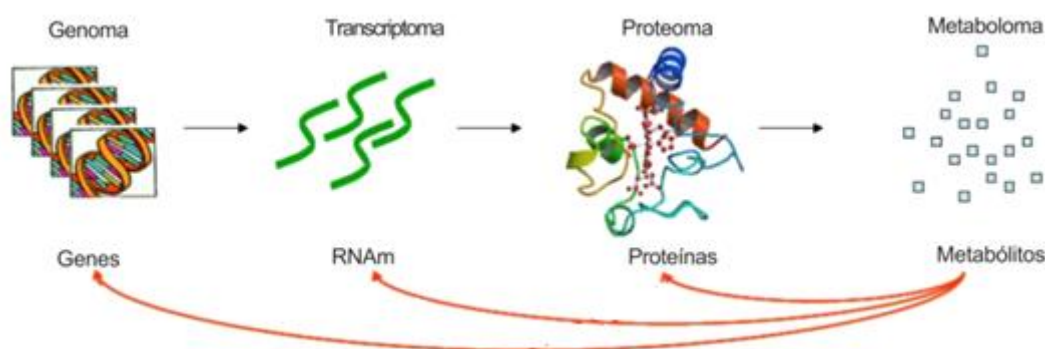
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 ABORDAGENS METABOLÔMICAS .....	16
2.1.1 Metabolômica alvo .....	16
2.1.2 Metabolômica global .....	17
2.1.3 Perfil metabólico .....	18
2.2 FLUXOGRAMA DE TRABALHO EM METABOLÔMICA .....	20
2.3 <i>Ruta graveolens L.</i> .....	30
2.4 Óleos essenciais.....	36
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	38
3.1.2 Objetivos específicos .....	38
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>39</b>
4.1 COLETA E OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	39
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	40
4.3 ANÁLISE POR GC-MS.....	41
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL.....	41
4.5 ANÁLISE POR DIMS.....	42
4.6 PRÉ-TRATAMENTO DE DADOS.....	43
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA.....	44
4.8 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS.....	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>45</b>
5.1 ÓLEO ESSENCIAL DA <i>RUTA GRAVEOLENS L.</i> .....	45
5.1.1 Rendimento do óleo essencial.....	45
5.1.2 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE VEGETAL RUTA GRAVEOLENS L. POR GC-MS.....	46
5.2 ANÁLISE DOS EXTRATOS LÍQUIDOS DA ESPÉCIE VEGETAL RUTA GRAVEOLENS L. POR DIMS.....	50
5.2.1 Crescimento da <i>Ruta graveolens L.</i> .....	54

<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS, ESPECTROS DE MASSA E COMPARAÇÕES COM BANCOS DE DADOS REFERENTES AO ÓLEO ESSENCIAL DE RUTA GRAVEOLENS L. ....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS DE DIMS E ESPECTROS DE MASSA DOS EXTRATOS LÍQUIDOS DE RUTA GRAVEOLENS L.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Para uma melhor análise de um sistema biológico, nasceram algumas áreas de pesquisa específicas com o objetivo de mapear sistemas celulares, no intuito de entender cada vez mais processos extracelulares e intracelulares que ocorrem em um determinado sistema biológico. Essa análise sobre um sistema biológico foi separada em 4 principais áreas: Gênômica, Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica (BARH; BLUM; MADIGAN, 2012). Essas tecnologias permitem uma abordagem holística em torno do dogma central da biologia molecular através do compartilhamento de dados entre elas. A genômica trabalha com dados adquiridos do genoma, obtendo informações sobre o DNA (ácido desoxirribonucleico) do organismo estudado. A transcriptômica estuda o transcriptoma (RNAs), que possuem a função de expressão gênica. A proteômica se dá pela aquisição de dados de proteínas oriundas da expressão gênica, identificando-as e entendendo suas funções no organismo. A metabolômica envolve a análise quantitativa e qualitativa de metabólitos, mostrando as concentrações e influências sofridas por diversos fatores externos ou genéticos. (SOUZA; RHODEN; PAMPHILE, 2014). As quatro abordagens “ômicas” são utilizadas para o entedimento sobre funcionamento celular, como visto na **figura 1**.

**Figura 1** – funcionamento celular com as etapas para a produção de metabólitos, com origem nos genes, passando por etapas com a formação do transcriptoma, proteoma e por fim o metaboloma. Os metabólitos são fundamentais para regular as etapas anteriores, indicadas com as setas em laranja.



Fonte: Villas-Bôas, S.G.; Gombert, A.K. 2006 adaptado.

Na célula, a informação do material genético é transcrita em uma molécula de RNAm, que posteriormente vai ser traduzida em uma proteína, quando essa proteína

não tem função estrutural, ela irá participar de reações bioquímicas no meio celular, sendo responsável por catalisar transformações de pequenas moléculas, conhecidas como metabólitos. Os metabólitos desempenham papel fundamental nas diferentes vias bioquímicas em um organismo vivo, podendo ser substratos, cofatores ou produtos no metabolismo celular e também regulando atividade das proteínas (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). O conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular (< 1500 Da) modificados ou produzidos por um organismo biológico é chamado de metaboloma (OLIVER, S.G. et al. 1998).

O termo metabolômica foi citado pela primeira vez pelo Dr. Oliver Fiehn e seus colaboradores no início dos anos 2000 (FIEHN et al. 2000) em resposta à alguns aspectos ainda não esclarecidos da biologia sistêmica. Alterações nos níveis de transcrição do RNA mensageiro não necessariamente alteram os níveis e atividade das proteínas (GYGI et al. 1999), que podem ou não estar enzimaticamente ativas (SUMNER et al. 2003). Dessa forma, mudanças no transcriptoma e no proteoma nem sempre correspondem à modificações fenotípicas. A existência dos metabólitos indica informação direcional da função celular a nível molecular, determinando o fenótipo de uma célula, ou tecido, em resposta a alterações externas ou genéticas (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006), ou seja, a compreensão do metaboloma é de extrema importância para determinar a função de um gene. (FIEHN, 2002)

Os primeiros trabalhos sobre metabolômica indicam que essa nova área de estudo é uma plataforma tecnológica mais útil para o entendimento da biologia de sistemas. Suas implicações na pesquisa de produtos naturais incluem benefícios na busca de substâncias de origem naturais em plantas, animais, micro-organismo, desenvolvimento de fármacos e fitomedicamentos (ROCHFORT, 2005; SHYUR; YANG, 2008). Além disso, a metabolômica tem como característica ser muito versátil, sendo utilizada em diversos tipos de estudo, tais como na investigação de alterações no metaboloma em resposta ao estresse produzidos por agentes físicos (temperatura, luz UV, umidade, etc.), agentes químicos (fármacos, reagentes químicos, etc.) ou por agentes biológicos, como patógenos, comparando os subconjuntos de metabólitos antes e depois de serem expostos. (FUNARI et al., 2013).

Além de ser amplamente utilizada na química de produtos naturais, a metabolômica desempenha papel importante em diversas áreas como: ambiental, clínica, toxicologia, nutrição, microbiologia e parasitologia.

Em organismos vegetais, o número estimado de metabólitos é aproximadamente 200.000 por espécie, e muitas delas chamam a atenção pela gama de utilidades que podem prover, podendo ter diversos usos e aplicações. (CANUTO et al., 2018)

Um exemplo de espécie que contém diversas aplicações é justamente a *Ruta graveolens L.*, também conhecida como arruda, planta da família das *Rutaceae*s, objeto de estudo do presente trabalho. As aplicações podem ir das mais simples, como na decoração de ambientes e simbolismos, até as mais complexas como extração de substâncias presentes no metabolismo da arruda para o tratamento de doenças específicas, como por exemplo o vitiligo. A espécie vegetal *Ruta graveolens L.* chama a atenção para ser estudada pela comunidade científica em razão da pouca exigência quanto as formas de cultivo, combinado com um grande leque de atributos medicinais como propriedades regulatórias, analgésicas, anti-inflamatórias, antifúngicas e antibacterianas, tendo numerosas possibilidades de processamento industrial e comercial (RODRIGUES; GONZAGA, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015)

O presente trabalho busca iniciar uma análise sobre o metabolismo da *Ruta graveolens L.* tendo como temática central diferentes situações em que a planta se encontra, com relação à ontogenia e ao ambiente. A abordagem utilizada será a metabolômica não alvo, ou seja, uma abordagem de análise geral. A metodologia proposta ocorrerá como a maioria dos trabalhos em metabolômica são efetuados, com etapas de coleta do material vegetal e obtenção da amostra, análise instrumental com a utilização de técnicas cromatográficas de alto desempenho acopladas a um espectrômetro de massas e análises estatísticas multivariadas, tendo como objetivo verificar se há diferenças metabólicas entre espécimes de *Ruta graveolens L.* em relação à diferentes situações da espécie vegetal, como idade e locais de cultivo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ABORDAGENS METABOLÔMICAS

O metaboloma pode ser segmentado em dois diferentes grupos: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são apresentados como compostos indispensáveis para as funções básicas das células de um organismo, como a atividade da respiração, biossíntese de aminoácidos e vários outros compostos que possuem relação com o crescimento, desenvolvimento e manutenção de um ser vivo. Todos os organismos compartilham os mesmos tipos de metabolismo primário, mas que podem ter diferenças, devido à variedade de rotas biossintéticas que existem. Os metabólitos secundários são específicos, eles desempenham papel na interação de uma célula com o ambiente, adquirindo características específicas, não necessariamente relacionadas à manutenção da vida, mas que garantem vantagens para a sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie em seu ecossistema, por exemplo, no caso de plantas, para atrair polinizadores ou para se defender contra pragas e doenças (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007).

Diferentes abordagens podem ser utilizadas para o estudo desses metabólitos dependendo do objetivo do estudo em questão, com duas principais estratégias (**Figura 2**): metabolômica alvo (em inglês: *targeted metabolomic*) e metabolômica não alvo (em inglês: *untargeted metabolomic*) também chamada de metabolômica global (CANUTO et al., 2018). Ainda há uma terceira abordagem ramificada das duas principais, chamada de perfil metabólico (em inglês: *metabolite profiling ou metabolic profiling*) que se subdivide em *fingerprinting* (tradução do inglês: impressão digital metabólica) e exometabolômica, também conhecida como *footprinting* (ainda não há tradução para o português) metabólico. (VILLAS-BÔAS et al., 2005).

#### 2.1.1 Metabolômica alvo

Estudos sobre metabolômica alvo tem foco na identificação e quantificação de um definido conjunto de metabólitos ou de uma determinada via metabólica. Usualmente, esse conjunto de metabólitos ou uma via específica são antecipadamente



determinados de acordo com a questão científica a ser analisada e pelas características da plataforma analítica e instrumentação a ser utilizada. A coleção de dados resultantes, geralmente cromatogramas, espectros de massa e de ressonância magnética nuclear são analisados a fim de identificar e quantificar metabólitos em uma amostra, assim podendo interpretar o resultado com base no contexto em que está sendo apresentado. A identificação é efetuada com o auxílio de bancos de dados disponíveis no próprio equipamento analítico ou através de bibliotecas disponíveis na Internet (BINGOL, 2018; TSUGAWA, 2018). Esses bancos de dados contêm valores de razão massa/carga ( $m/z$ ) já estabelecidos para muitos metabólitos e contêm também informações como tempo de retenção relativo, deslocamento químico e fórmula química. Essas informações são utilizadas para comparar as amostras e os padrões de referência. Tais dados são convertidos em valores de concentração dos metabólitos na amostra e logo em seguida são submetidos a análises estatísticas univariadas e multivariadas (CAMBIAGHI; FERRARIO; MASSEROLI, 2017).

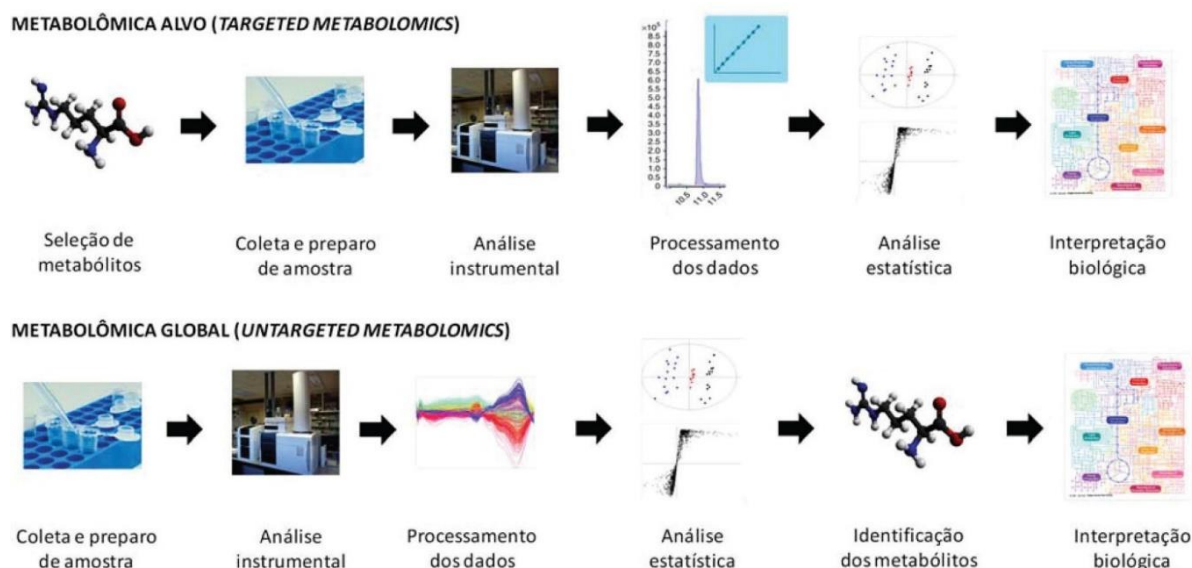
Tendo em vista que vários estudos da metabolômica tem como objetivo investigar diferenças metabólicas entre diferentes grupos, ferramentas estatísticas são necessárias para avaliar essas diferenças e ter um melhor entendimento sobre fenótipos metabólicos (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; ROBERTS et al. 2012). Na maioria dos casos, a metabolômica alvo é orientada por hipóteses, e não uma abordagem para geração de hipóteses, visando a análise de compostos específicos (RAUL et al., 2019).

### 2.1.2 Metabolômica não alvo ou global

Estudos sobre a metabolômica não alvo tem como objetivo avaliar simultaneamente o maior número de metabólitos possível em uma amostra biológica (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Qualquer molécula que ionize dentro de uma faixa específica de valores de massa será medida nesse tipo de abordagem. Os experimentos alvo oferecem melhor quantificação, enquanto os experimentos globais ou não alvo fornecem uma cobertura mais ampla da amostra estudada. As análises metabolômicas de âmbito global podem levar à identificação de novos metabólitos ainda não descritos na literatura, e a estrutura desses metabólitos pode ser caracterizada em etapas posteriores, (VINAYVEKHIN; SAGHATELIAN, 2010). A metabolômica não alvo também é

utilizada como ferramenta de triagem para discriminar amostras de diversos estados biológicos ou de diferentes origens. Nesse tipo de abordagem, etapas de preparação e tratamento das amostras podem ser simplificadas ou até mesmo eliminadas. (RAUL et al., 2019)

**Figura 2** – Fluxograma de trabalho para metabolômica alvo e metabolômica global.



Fonte: CANUTO et al., 2017

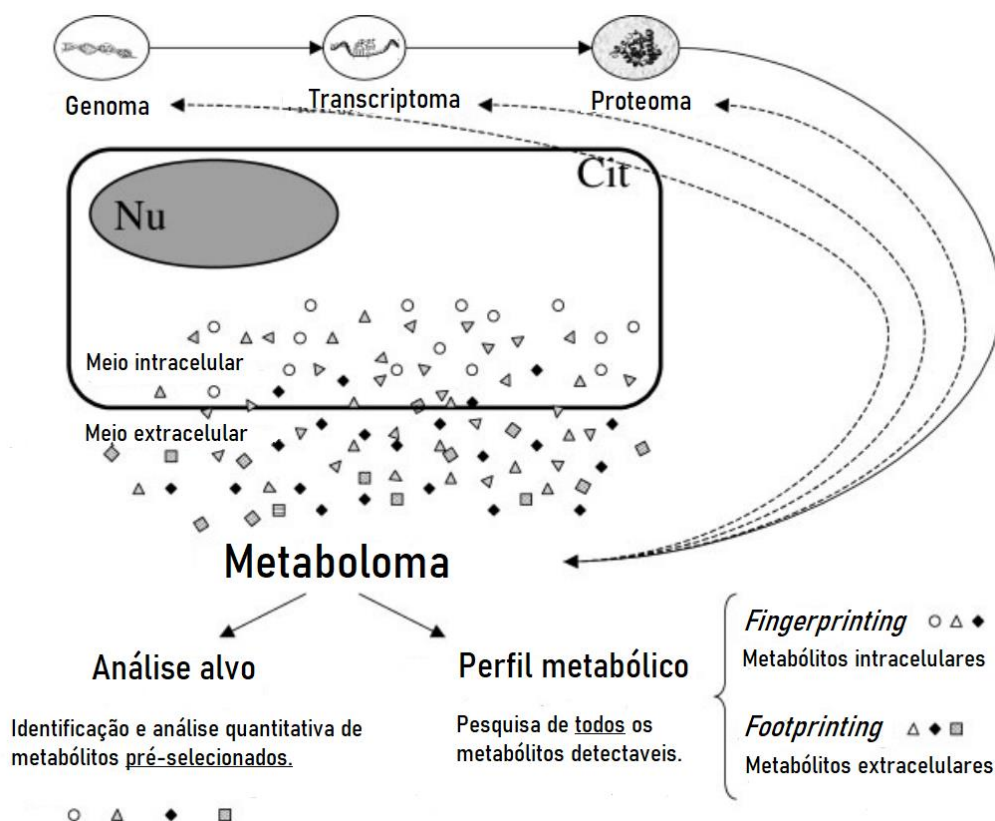
### 2.1.3 Perfil metabólico

Os estudos metabolômicos eram inicialmente divididos em duas categorias: estudos alvo e não alvo. Atualmente, existem outras subcategorias que visam refletir os diferentes objetivos e especificidades dos estudos metabolômicos (PILON et al., 2020). O perfil metabólico envolve a análise rápida, muitas vezes não quantitativa, de um grande número de metabólitos diferentes, com o objetivo de identificar um perfil metabólico específico que caracterize uma dada amostra, produzindo uma informação independente que pode ser interpretada em termos de vias bioquímicas conhecidas e/ ou interações fisiológicas. Essa abordagem pode ser subdividida em *metabolic fingerprinting* e *metabolic footprinting* (DETTMER; HAMMOCK, 2004; VILLAS-BÔAS et al. 2004).

A abordagem *fingerprinting* cobre a varredura de um grande número de metabólitos intracelulares detectados por uma técnica analítica ou por uma combinação

de diferentes técnicas em uma situação definida (VILLAS-BÔAS et al. 2004), a intenção nessa abordagem não é identificar cada composto em uma amostra, mas comparar os padrões que mudam em resposta a algum estímulo, como doenças, fármacos, mudanças no ambiente (KOSMIDES et al., 2013). A comparação entre essas “impressões digitais” é realizada utilizando ferramentas analíticas e estatísticas, como análise hierárquica de clusters ou PCA (análise de componentes principais) (FUNARI et al., 2013). No caso de essas análises multivariadas determinarem uma separação da amostra em agrupamentos metabólicos únicos, posteriormente esses metabólitos podem ser caracterizados (DETTMER; HAMMOCK, 2004). Já o *metabolic footprinting*, também conhecido como exometabolômica, é uma abordagem mais recente, que é tecnicamente semelhante ao *fingerprinting*, mas é focada na medição de todos os metabólitos extracelulares presentes em um meio. Os compostos indicados são metabólitos secretados pelas células para algum meio, e os componentes do meio transformados bioquimicamente pelo organismo que excretou esses metabólitos (VILLAS-BÔAS et al. 2004).

**Figura 3** – Análise do metaboloma no contexto das ciências ômicas e abordagens da metabolômica.



Fonte: VILLAS-BÔAS et al. 2004 adaptado.

## 2.2 FLUXOGRAMA DE TRABALHO EM METABOLÔMICA

Um fluxograma de trabalho metabolômico envolve uma série de etapas. De modo geral, pode ser organizado em ordem como: formulação do objetivo de estudo e contexto, coleta e obtenção da amostra, *quenching* metabólico, extração da amostra, preparação da amostra para a análise, análise instrumental, processamento de dados e interpretação biológica (KHOOMRUNG; WANICHTHANARAK; NOOKAEW, 2017).

Tendo em vista que os trabalhos na área da metabolômica começaram a se tornar mais maduros e vistos com uma maior frequência, em 2005 foi formada a MSI (<http://metabolomics-msi.org/>) - *Metabolomics Standards Initiative* (tradução do inglês: Sociedade de Metabolômica), onde define uma padronização dos procedimentos para estudos de metabolômica divididos em diferentes grupos de trabalhos. Cada grupo tem um diferente tipo de especialização e uma inspeção relacionada à esse grupo de trabalho (FIEHN et al., 2007).

A linha de partida para um trabalho sobre metabolômica é definir uma questão biológica e a partir dessa questão escolher uma ou mais das diferentes abordagens (alvo, global ou suas variações) que podem ser aplicadas. A partir da seleção da abordagem podem ser determinadas as etapas do planejamento do experimento e os tipos de análise que podem ser empregados. A escolha de todas essas etapas deve ser feita de forma cuidadosa antes do início do experimento, para que posteriormente não ocorram erros na análise e na interpretação. (RAUL et al., 2019). Nessa etapa, também é definido o tipo de amostra. A análise do metaboloma pode ser aplicada em um alto número de amostras biológicas, incluindo tecidos, biofluidos (saliva, sangue, fezes, urina, etc), cultura de células e plantas, levando em consideração o contexto em que esses materiais biológicos estão inseridos (NALBANTOGLU, 2019).

No caso de organismos vegetais, o modo de plantio e armazenagem dessas plantas deve ser feito sob condições controladas e com a garantia de que todas as unidades da amostra estão sob as mesmas condições de luz, temperatura, irrigação e de gradiente de dióxido de carbono, tendo em vista que mudanças nessas condições podem levar à uma mudança no perfil do metabolismo de plantas originalmente idênticas, assim como efeitos sazonais. Também precisa ser levado em consideração, na hora da coleta da amostra, o tipo de tecido a ser analisado. Podem ser utilizados raiz, caule, folha, flor ou

frutos. Os períodos ontogênicos também devem ser considerados, visto que em idades diferentes o metaboloma pode ter perfis diferentes (PILON et al., 2020).

Os resultados das análises em metabolômica devem corresponder ao perfil metabólico de uma amostra biológica *in vivo*, representando a forma do metaboloma em um sistema biológico, contudo, muitos intermediários nas reações do metabolismo têm tempos de ciclagem na ordem de segundos. Então, para que o metaboloma seja representado de modo fidedigno na hora da coleta e da amostragem, a atividade enzimática deve ser inibida imediatamente para manter a integridade do metabolismo, dado que quaisquer erros na manipulação da amostra podem determinar desvios indesejados na composição metabólica. Esse processo de parada total do metabolismo é chamado de *quenching* metabólico. A interrupção rápida da atividade metabólica pode ser adquirida por meio do uso de solventes específicos ou baixa temperatura, (XU et al. 2010; CANELAS et al., 2008). Os métodos mais comuns de se aplicar o *quenching* metabólico tem como fundamento a mudança de pH ou temperatura. Quando o *quenching* é feito com a mudança de pH, o meio é imediatamente alterado para básico pela adição de substâncias como KOH e NaOH, ou alterado para meio ácido com a adição substâncias como HCl e HClO<sub>4</sub> (MASHEGO et al. 2007).

Os métodos relacionados à temperatura devem modificá-la para -20 °C ou menos. Um método de *quenching* bastante utilizado é a adição de metanol em temperaturas menores que -40°C, sendo considerado um bom solvente para a parada rápida do metabolismo, tendo miscibilidade em água e ponto de congelamento baixo como boas características. Entretanto, a utilização do metanol frio tem a possibilidade de ocasionar a perda na concentração de metabólitos devido as interações do solvente nas membranas celular por meio de uma ruptura de membrana. (CANELAS et al., 2008; PINU; VILLAS-BOAS; AGGIO, 2017). Outra opção para o *quenching* metabólico também fundamentada na baixa temperatura é a utilização de nitrogênio líquido ou de gelo seco (CO<sub>2</sub> sólido). A imersão da amostra biológica em nitrogênio líquido (-180°C) ou a imersão da amostra em gelo seco (-78°C) garantem a inibição enzimática (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010).

Os métodos de extração em metabolômica podem variar de acordo com o objetivo do estudo principal e o tipo de análise. Para a análise global, o objetivo é ser abrangente e conseguir extrair o máximo de metabólitos possíveis com perdas mínimas, com o mínimo de tratamento da amostra, pois esse tipo de análise é de esfera mais geral.

Na análise alvo, são necessárias etapas mais complexas de extração para atingir certa classe metabólitos ou a via metabólica, podendo envolver extrações do tipo líquido-líquido, sólido-líquido ou extração em fase sólida, objetivando as espécies de interesse. (CANUTO et al., 2017; RAUL et al., 2019). Para plantas, existem vários tipos de extrações que podem ser aplicadas, a mais comum delas é a extração por maceração, que consiste em deixar a amostra em contato com um solvente extrator durante um longo tempo (horas ou até dias), com a posterior evaporação desse solvente. Esses solventes extratores usados neste procedimento geralmente são solventes orgânicos polares, tais como metanol, solução de água com metanol, etanol, e solventes orgânicos apolares como clorofórmio, acetato de etila e hexano (VILLAS-BÔAS et al. 2004).

Outros métodos de extração podem ser empregados, como a extração por ultrassom, que utiliza ondas sonoras de baixa frequência resultando no fenômeno da cavitação, que é a formação de bolhas por efeito de pressão e temperatura, facilitando o processo de extração das espécies (DE FREITAS et al., 2015). Também podem ser utilizados extração com líquido pressurizado (PLE), que utiliza os solventes comuns de extração com alta pressão e temperatura afim de melhorar a extração (DA CUNHA et a., 2020) e extração com fluido supercrítico (SFE), como o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), com propriedades termodinâmicas acima de seus pontos críticos (MAUL et al. 1996). Esses diferentes métodos têm vantagens e desvantagens, como visto na **tabela 1**, e devem ser levadas em consideração na hora da escolha.

Alguns tipos de células ou tecidos tem sua parede celular rígida, dificultando a extração, então podem ser utilizados equipamentos de auxílio mecânico para a ruptura celular, como o próprio ultrassom, vórtex, *tissue lyzer* (moinho de esferas) e homogeneizadores de tecido. Porém, com o uso desses equipamentos, há a possibilidade de degradação da amostra e perda de metabólitos por aumento de temperatura (CANUTO, 2016).

**Tabela 1.** Vantagens e desvantagens de métodos de extração

<i>Técnica</i>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<i>Maceração</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Baixo custo;</li> <li>➤ Extrai grandes quantidades de amostra.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Requer evaporação do solvente;</li> <li>➤ Uso de grandes quantidades de solvente;</li> <li>➤ Alto tempo de extração.</li> </ul>
<i>Ultrassom</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Velocidade de extração;</li> <li>➤ Baixo custo;</li> <li>➤ Extrai grandes quantidades de amostra.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Requer evaporação do solvente;</li> <li>➤ Requer filtração</li> <li>➤ Uso de grandes quantidades de solvente.</li> <li>➤ Dificuldade de manuseio.</li> </ul>
<i>PLE</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Velocidade de extração;</li> <li>➤ Baixas quantidades de solvente</li> <li>➤ Automatizado</li> <li>➤ Fácil manuseio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Alto custo.</li> </ul>
<i>SFE</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Velocidade de extração;</li> <li>➤ Baixas quantidades de solvente;</li> <li>➤ CO<sub>2</sub> não contamina o meio ambiente (Química verde);</li> <li>➤ Temperatura e pressão podem ser variadas;</li> <li>➤ Pode ser automatizado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Alto custo</li> <li>➤ Tamanho da amostra limitado</li> </ul>

**Fonte:** Adaptado de JACQUES, 2005

Existem diversas técnicas analíticas que podem ser utilizadas para estudos metabolômicos. Devido à variedade de propriedades que os diversos metabólitos podem apresentar não existe um só método que pode abranger todas as classes de metabólitos. As técnicas mais utilizadas são a ressonância magnética nuclear (RMN) (VERPOORTE;

CHOI; KIM, 2007) e espectrometria de massas (MS) acoplada à alguma técnica de separação como cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (GOWDA; DJUKOVIC, 2014). A escolha da técnica vai depender das propriedades químicas e físicas dos metabólitos de interesse e do desempenho analítico que cada técnica pode oferecer, como precisão, exatidão, sensibilidade entre outras (DUNN et al., 2011).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas utilizadas para análises metabolômicas. O fundamento dessa técnica consiste nos núcleos dos átomos absorvendo energia eletromagnética de uma frequência determinada pelo equipamento, na presença de um campo magnético forte (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012). É uma técnica simples, potente e que requer pouca manipulação da amostra. Uma das grandes vantagens do uso do RMN é que a amostra não é destruída ao final da análise podendo ser utilizada posteriormente em outras técnicas analíticas. Outro benefício da técnica é a possibilidade de usar amostras sólidas e semi-sólidas, permitindo analisar amostras biológicas intactas. Em análises metabolômicas são utilizados espectros de ressonância magnética de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), porém precisam ser utilizados campos magnéticos mais fortes para adquirir uma alta resolução, o que requer equipamentos mais caros, além de apresentar sensibilidade (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010; CANUTO et al., 2018; MARKLEY et al., 2017).

A espectrometria de massas é a técnica mais utilizada para análises metabolômicas, podendo ser acoplada à diferentes técnicas de separação, como em a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida, ou por injeção direta. O fundamento dessas técnicas cromatográficas é a separação das espécies em uma amostra em função da polaridade, em que uma fase móvel vai passar por uma fase estacionária. As espécies que interagirem melhor com a fase estacionária vão ficar retidas por mais tempo dentro de uma coluna cromatográfica (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006). Em análises de GC, a fase móvel é um gás, então a amostra precisa ser volatilizada. O desafio em se analisar amostras de origem biológica são as fortes interações intermoleculares das moléculas, que conseqüentemente vão diminuir a volatilidade dessas amostras, o que pode causar degradação da amostra. A alternativa para contornar esse problema é a derivatização da amostra, para que se tornem mais voláteis à temperatura mais baixas. Porém, é um procedimento trabalhoso, que pode introduzir erros. Em contrapartida, o GC-MS oferece alta sensibilidade, seletividade, repetibilidade e credibilidade no



momento da identificação dos metabólitos, combinando a informação dos padrões de fragmentação com tempos de retenção e cruzando com bancos de dados para GC-MS. (GOWDA; DJUKOVIC, 2014; PILON et al., 2020; CANUTO et al., 2018).

Análises por cromatografia líquida tem o mesmo fundamento, mas agora a fase móvel é um líquido, eliminando a necessidade de volatilização da amostra e derivatização. É atualmente a técnica mais aplicada em metabolômica, pois apresenta boa sensibilidade e há uma grande gama de classes de compostos que podem ser analisados devido à grande variedade de solventes de diferentes polaridades e fases estacionárias. (VILLAS-BÔAS et al., 2004) (DUNN; ELLIS, 2005). A cromatografia líquida de alta eficiência para análise de amostras de origem vegetal é utilizada para a análise de muitos grupos de metabólitos secundários, como flavonoides, alcaloídes, terpenos, poliamidas, saponinas, compostos fenólicos, entre outros. (PILON et al., 2020)

**Tabela 2.** Comparação entre RMN e MS (GC-MS e LC-MS)

<i>Técnica</i>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<i>RMN</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Amostra não destruída;</li> <li>➤ Amostras sólidas e aquosas;</li> <li>➤ Pouca manipulação de amostra.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Baixa seletividade;</li> <li>➤ Baixa sensibilidade.</li> </ul>
<i>GC-MS</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Seletividade;</li> <li>➤ Sensibilidade;</li> <li>➤ Maior banco de dados de informação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Derivatização;</li> <li>➤ Amostra destruída;</li> <li>➤ Dificuldade de identificação de compostos após a derivatização.</li> </ul>
<i>LC-MS</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sem necessidade de derivatização;</li> <li>➤ Seletividade;</li> <li>➤ Sensibilidade.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Menor banco de dados comparado com GC-MS;</li> <li>➤ Limitações na elucidação das estruturas.</li> </ul>

Fonte: adaptado de VILLAS-BÔAS et al., 2004

Os dados brutos originados das análises instrumentais citadas são de alta complexidade, conseqüentemente devem ser tratados e processados com o objetivo de evitar erros tendenciosos de interpretação e manter a integridade genuína das diferenças biológica de interesse. No caso das análises de RMN, são tratados os espectros de ressonância magnética nuclear, e para as técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas, são tratados os cromatogramas com espectros de massas, vários *softwares* gratuitos e licenciados podem ser utilizados para essa finalidade, com ferramentas de agrupamento dos dados, alinhamento de picos, correção de ruídos, normalização, entre outras mais específicas de cada *software* (VAN DEN BERG et al., 2006; MISRA; VAN DER HOOFT, 2016). A **tabela 3** mostra alguns dos *softwares* gratuitos online como XCMS, MZmine e MetAlign, sendo os mais utilizados para pré-processamento de dados em metabômica.

**Tabela 3.** *Softwares* de pré-processamento de dados.

<b>Software</b>	<b>Website</b>
XCMS	<a href="https://xcmsonline.scripps.edu/">https://xcmsonline.scripps.edu/</a>
<b>MZmine</b>	<a href="http://sourceforge.net/projects/mzmine/">http://sourceforge.net/projects/mzmine/</a>
<b>OpenMS</b>	<a href="http://open-ms.sourceforge.net/">http://open-ms.sourceforge.net/</a>
<b>MetAlign</b>	<a href="http://www.metalign.nl">http://www.metalign.nl</a>
<b>MSFACTs</b>	<a href="http://bioinfo.noble.org/download/">http://bioinfo.noble.org/download/</a>
<b>Metabolite Detector</b>	<a href="http://metabolitedetector.tu-bs.de/">http://metabolitedetector.tu-bs.de/</a>
<b>MET-IDEA</b>	<a href="http://bioinfo.noble.org/download/">http://bioinfo.noble.org/download/</a>
<b>SpectConnect</b>	<a href="http://spectconnect.mit.edu">http://spectconnect.mit.edu</a>
<b>MultAlign</b>	<a href="http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/">http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/</a>
<b>MetSign</b>	<a href="http://metaopen.sourceforge.net/metsign.html">http://metaopen.sourceforge.net/metsign.html</a>

Fonte: (RAUL et al., 2019)

Após o pré-processamento dos dados obtidos, análises estatísticas univariadas e multivariadas podem ser empregadas para se extrair informações relevantes desses dados. As análises univariadas como o teste t de Student e ANOVA (análise de variância) (SUMNER et al., 2007) podem ser utilizadas como aliadas às técnicas multivariadas

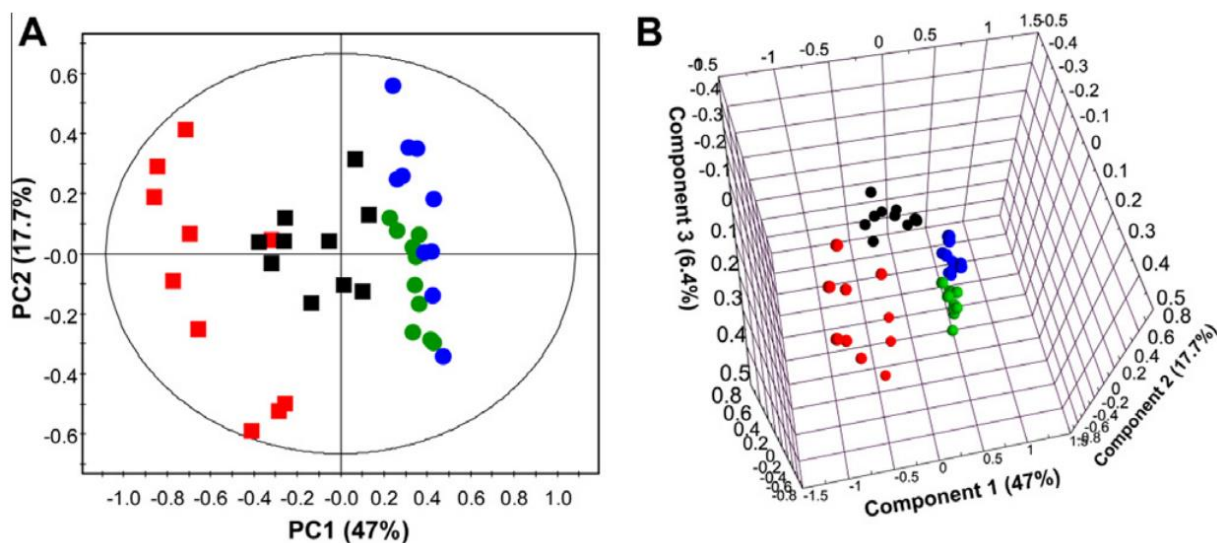
como análise de componentes principais (PCA) ou análise discriminante por mínimos quadrados parcial (PLS-DA) e suas variações (WORLEY; POWERS, 2013).

Em metabolômica, a análise de PCA é comumente utilizada. Essa técnica de análise estatística multivariada consiste em preservar a variância dentro de um conjunto complexo de dados (espectros de RMN ou cromatogramas), transformando essas informações complexas em informações mais simples, chamados componentes principais (PCs). O PCA tem como objetivo chegar a uma transformação linear que preserve a maior parte dos dados originais, porém com uma menor dimensionalidade. Os componentes principais são vetores ortogonais ordenados pela quantidade de variância que explicam e que representam as contribuições dos metabólitos no modelo. Duas matrizes são produzidas, uma matriz de *scores*, que organiza pontos em um novo sistema de coordenadas de acordo com as variáveis originais e uma matriz de *loadings*, que demonstra os pesos e influências das variáveis originais na determinação das coordenadas. (WORLEY; POWERS, 2013; LILAND, 2011). A técnica é bastante utilizada para agrupamento e discriminação de grupos. Jaham Kim e colaboradores utilizaram essa técnica em metabolômica para comparar os perfis metabólicos de *Brassica rapa ssp. Pekinensis* (Couve Napa) plantada em diferentes regiões geográficas. Dois cultivadores diferentes plantaram a espécie vegetal na China e na Coreia, foi feita a análise de PCA (**Figura 4**) com os espectros de RMN <sup>1</sup>H dos extratos obtidos em cada região. (KIM et al., 2013).

Nota-se no trabalho de KIM et al., 2013, que o perfil metabólico muda de acordo com cada região, formando dois grupos e que há diferenças entre as couves da mesmo região plantadas por diferentes pessoas (**Figura 4**), colaborando com a ideia de que variados fatores, como diferentes regiões e cultivos, podem alterar o perfil metabólico de um organismo (PILON et al., 2020)

**Figura 4.** Gráfico de *Scores* dos extratos de *Brassica rapa ssp. Pekinensis* – O gráfico **A** mostra o resultado da análise por PCA com duas coordenadas de componentes principais, onde apresenta agrupamentos da couve de acordo com os cultivadores Chunjung (CJ) e Chunmyeong (CK) e a região em que foram cultivadas, os pontos quadrados em vermelho (CJ) e preto (CK) nas coordenadas mais à esquerda são das couves plantadas na China e os pontos redondos em azul (CJ) e verde (CK) são da couve plantada na Coreia. O gráfico

**B** apresenta uma coordenada adicional PC3, aumentando a diferença entre as réplicas no gráfico, entretanto a componente principal 3 contém apenas 6,4% da informação.

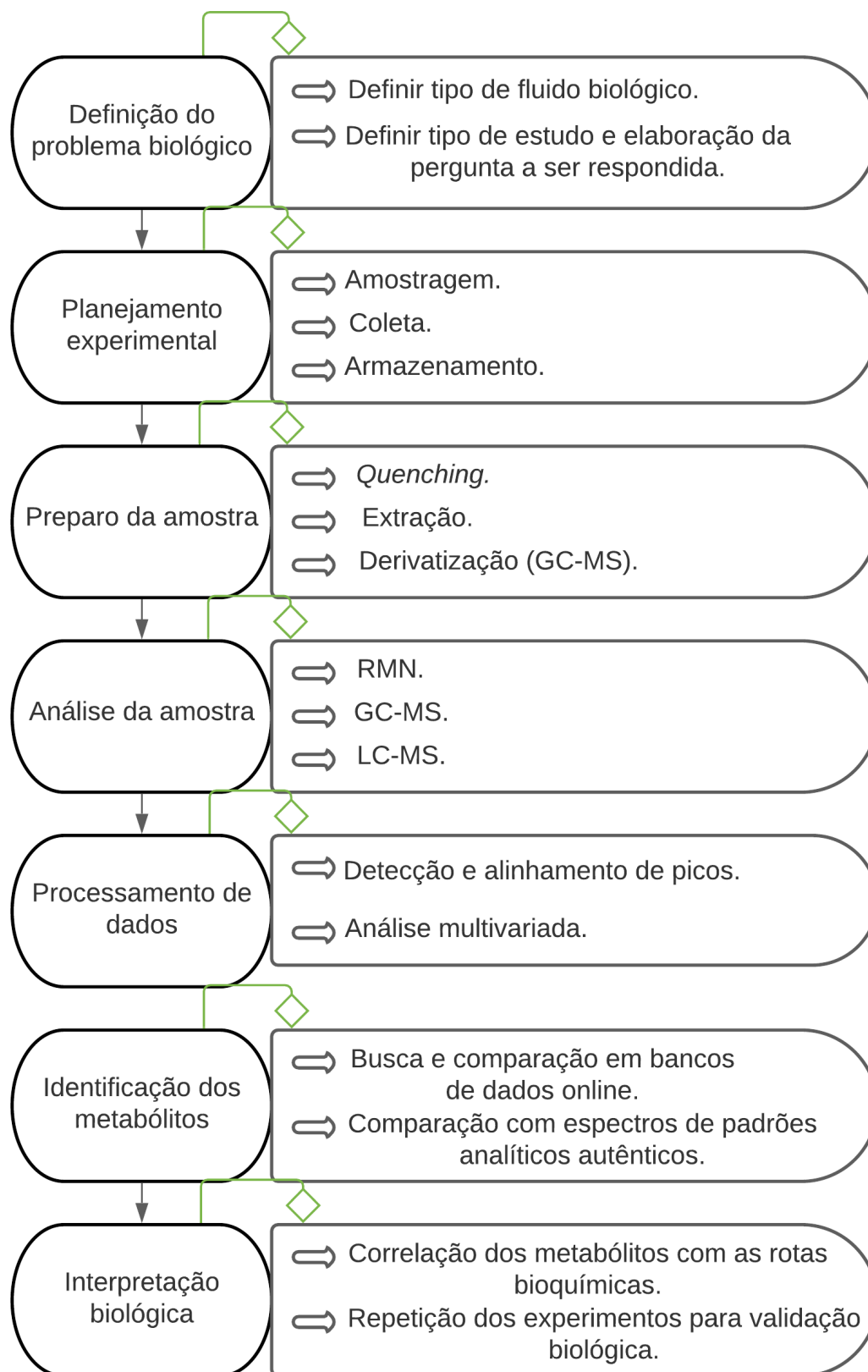


Fonte: KIM et al., 2013

A diferença entre o metabolismo das couves concorda com elevados níveis de açúcares (frutose, glucose, sacarose) e metabólitos relacionados com o metabolismo das purinas e das pirimidinas (inosina, guanossina), encontrados nas amostras coreanas, enquanto que os níveis de ácido gama-aminobutírico (GAMA) e ácido fenólico encontrados nas amostras chinesas eram muito mais elevados que nas amostras coreanas. As mudanças nos níveis das concentrações dessas substâncias devem-se ao fato de que as localidades de estudo têm climas e condições de crescimento muito diferentes, além de questões como temperatura, estresse hídrico e o tratamento de fertilizantes, que são capazes de alterar o metabolismo ou a composição do metabolismo da *Brassica rapa ssp. Pekinensis* (KIM et al., 2013).

A interpretação biológica de um trabalho em metabolômica, como visto no trabalho de KIM et al., 2013 se realiza a partir de uma combinação das últimas etapas de um fluxograma de trabalho (**Figura 5**), como a análise multivariada, a busca pelos metabólitos e suas quantidades, e a correlação desses metabólitos com as rotas bioquímicas. (RAUL et al., 2019)

**Figura 5** – Resumo do fluxograma comum de trabalho em metabolômica. As etapas podem variar de acordo com o tipo de abordagem (*targeted* ou *untargeted*) ou de acordo com a necessidade de cada problema biológico a ser resolvido.

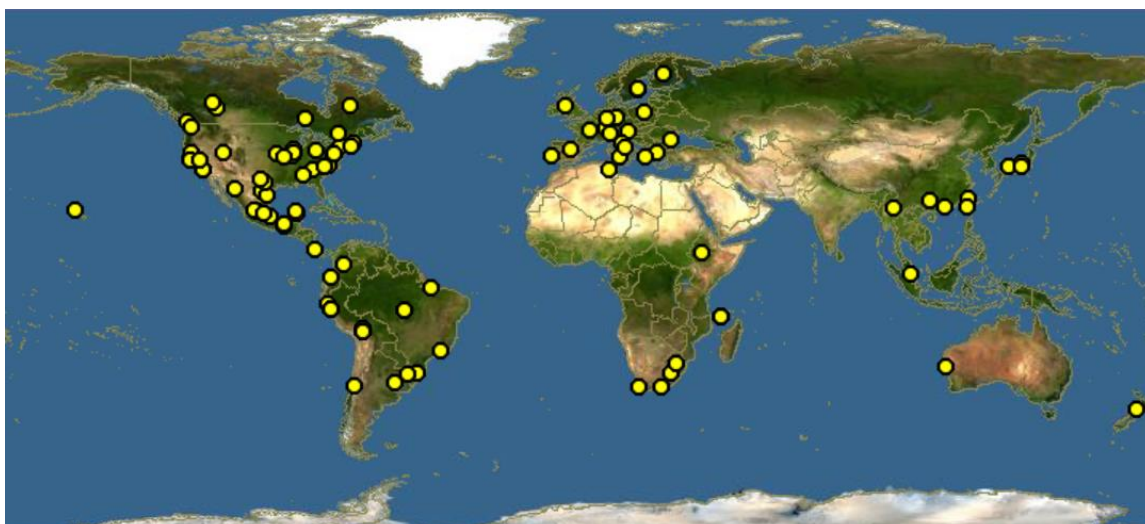


### 2.3 RUTA GRAVEOLENS L.

A espécie *Ruta graveolens* L. é uma das mais de 1600 espécies vegetais distribuídas em mais de 160 gêneros que compõem a família *Rutaceae*, a distribuição dessa família pelo planeta se dá com grande ocorrência em regiões com climas tropicais, subtropicais e temperado, podendo ser encontrada em países do mundo todo, especialmente em regiões da América tropical, sul da África e Oceania (RIBEIRO, 2015) (PRONCZUK, 1989). No Brasil, a família das rutáceas dispõe de 194 espécies divididas em 33 gêneros, sendo reportadas na Amazônia e na Mata atlântica (PIRANI; GROppo, 2014).

Mais conhecida como Arruda, a *Ruta graveolens* L. apresenta diferentes nomenclaturas populares em diferentes regiões do Brasil, nomes como: Arruda, Ruta, ruta-fedorenta, arruda-fedorenta, ruta-de-cheiro-forte, ruta aromática, ruda e arruda-do-povo. Em inglês é comumente chamada de Rue e em espanhol Ruda (LORENZI; MATOS, 2008). A arruda é originada da região mediterrânea, sendo encontrada primeiramente em países do sul da Europa, norte da África e oeste da Ásia. Como a planta é tolerante à vários tipos de clima, pode ser encontrada em diversas partes do planeta (KANNAN; BABU, 2012).

**Figura 6.** Ocorrências da espécie *Ruta graveolens* L. no planeta.



Fonte: Discover Life 2021 (<https://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Ruta>)

A arruda é descrita como um subarbusto que pode chegar até um metro e meio de altura, de folhagem alterna, densa, carnosa, glaucas, com folíolos oblongos na forma de elipse de 9 a 15 milímetros de comprimento na cor verde-acinzentada ou verde azulada, as ramificações dos ramos são herbáceos e com o crescimento da planta se tornam lenhosos na base. A planta é fortemente aromática e o cheiro pode incomodar com o tempo. As flores são numerosas, surgem no verão e são hermafroditas com pétalas livres entre si, pequenas, amareladas e esverdeadas. O fruto é uma capsula onde se encontram as sementes pardas e rugosas. A espécie tem notável adaptação às diversas condições climáticas, o que explica sua grande ocorrência em diferentes regiões, seu plantio se dá por meio de sementes e recomenda-se sombreamento parcial e solos permeáveis e ricos em matéria orgânica (RODRIGUES; GONZAGA, 2001) (PATRO, 2014).

**Figura 7.** Folhas e flores da espécie *Ruta graveolens* L.



Fonte: JINOUS ASGARPAHAH, 2012

A *Ruta graveolens L.* é bastante utilizada na cultura popular, sendo seus principais usos: decoração, medicinal, místico/reliгиозo. O mito em volta da arruda diz que ela tem utilidade de afastar maus olhares e energizar as pessoas, sendo requisitada em diversos rituais religiosos (TORIANI, 2006). Estudos farmacêuticos da *Ruta graveolens L.* indicam diversas propriedades medicinais, sendo uma planta anti-inflamatória, anti-hemorrágica, antifúngica, antimicrobiana, vermífida, aromática e também pode ser utilizada como herbicida natural (JINOUS; ASGARPANAH, 2012). O uso da planta pode ser indicado para dores de cabeça, afecções cardíacas, nos rins, fígado e bexiga, sarna, piolho, inflamação nos olhos. Como a arruda tem propriedades emenagógicas, ou seja, aumentam o fluxo menstrual, então é contraindicado para gestantes por poder provocar aborto. O uso tópico em excesso é contraindicado para pessoas com pele sensível (RODRIGUES; GONZAGA, 2001).

Por ser uma planta popular com diversos usos e várias propriedades medicinais, a *Ruta graveolens L.* chamou a atenção de programas do Ministério da Saúde, em 2015 uma monografia específica para essa espécie foi produzida, a monografia traz um compilado de informações relevantes de diversos estudos nacionais e internacionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Esse produto é fruto do Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF), que incentiva estudos e usos responsáveis de plantas com propriedades medicinais e fortalecimento da fitoterapia nacional no âmbito da assistência farmacêutica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

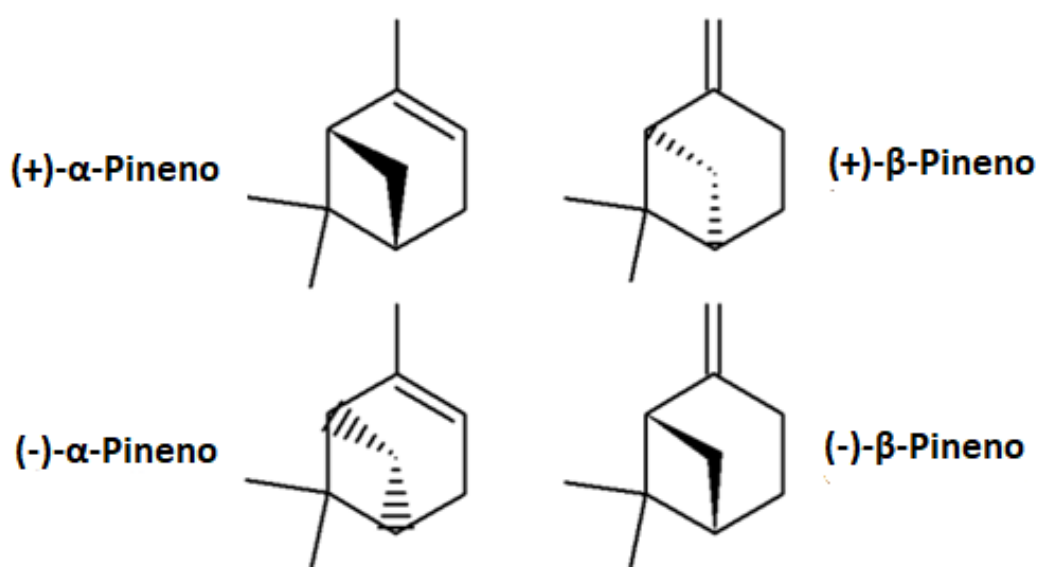
No PNPMF há uma Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) criada em 2009, que conta com uma lista 71 espécies com o interesse de estudo, entretanto há autores que indicam que essa lista deve ser regionalizada, visto que a distribuição das espécies medicinais da lista não é igual no território nacional (CORREA et al., 2018). A situação da RENISUS até 2019 conta com 3 monografias publicadas, 51 monografias sendo finalizadas, 21 monografias sendo elaboradas e um total de R\$ 2.010.226,00 investidos, como mostra o website do ministério da saúde (saúde.gov.br). A monografia da *Ruta graveolens L.* tem uma série de levantamentos bibliográficos que contam com estudos toxicológicos, clínicos e não clínicos, granulometria, testes de composição qualitativos e quantitativos, testes farmacêuticos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, além de informações gerais de identificação botânica, administração, efeitos, interações e outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).



Nazish e colaboradores fizeram um estudo de triagem da *Ruta graveolens L.* para detectar grupos funcionais característicos presentes na espécie vegetal por meio de uma prospecção fitoquímica. Foram utilizados diferentes reagentes em diferentes tipos de extrato das partes aéreas da planta. A prospecção indicou a presença de várias classes de constituintes químicos: flavonoides, aminoácidos, fenóis, esteroides, alcaloides, carboidratos, resinas, proteínas, glicosídeos, taninos e mucilagem. As saponinas foram a única classe de substâncias que não foi detectada pela prospecção fitoquímica nos diferentes tipos de extrato (NAZISH et al., 2009).

Testes de identificação foram feitos por meio de técnicas espectroscópicas, cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Todas as partes da *Ruta graveolens L.* foram utilizadas: raiz, caule, folha, flores e frutos. Os princípios ativos estão em maior concentração nas partes aéreas da planta antes do período em que há floração. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Os principais constituintes químicos encontrados na espécie *Ruta graveolens L.* foram: Furanocumarinas (psolareno, xantotoxina, bergapteno, isopimpinellina) (MILESI et al., 2001), monoterpenos ( $\alpha$ -Pineno,  $\beta$ -Pineno), metilnilcetona (MEDEIROS, 2019) e os constituintes químicos descritos por Nazish na prospecção fitoquímica (NAZISH et al., 2009).

**Figura 8.** Enantiômeros de  $\alpha$ -Pineno e  $\beta$ -Pineno

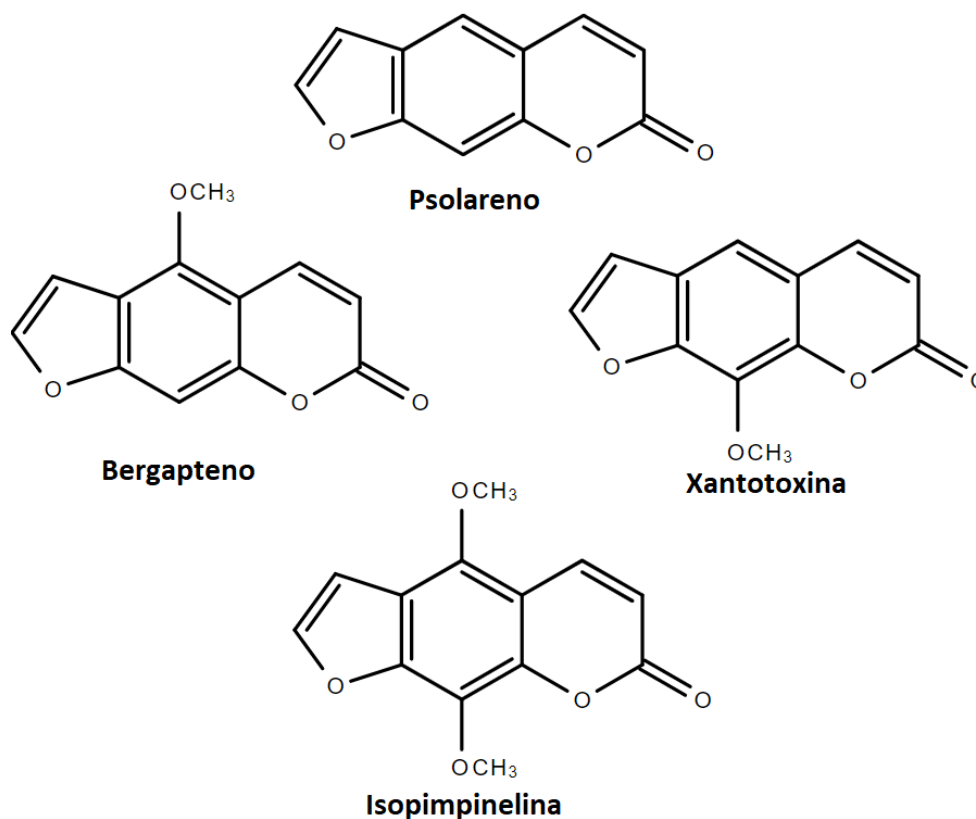


Fonte: SILVA et al., 2012

Os pinenos são constituintes de óleos essenciais e tem potencial anti-inflamatório, antitumoral e antimicrobiano. Fazem parte da família dos terpenos, que são compostos comumente encontrados em extratos vegetais e representam uma das maiores classes de metabólitos secundários com mais de 50.000 membros isolados até hoje. Os pinenos são classificados como monoterpenos e são constituídos de duas unidades de isopreno ( $C_6H_{10}$ ). Tanto o  $\alpha$ -Pinoeno como o  $\beta$ -Pinoeno são moléculas quirais (**Figura 8**), que apresentam as mesmas propriedades físico-químicas, a diferença é que um composto promove o desvio da luz plano polarizada para esquerda, e o outros para a direita (SILVA et al., 2012; COSTA, 2017).

As furanocumarinas (**Figura 9**) são uma subclasse das cumarinas caracterizadas por conter um anel furano adicional aos carbonos nas posições C6/C7 ou C7/C8 das cumarinas comuns. O potencial medicinal dessas moléculas é alto, sendo anti-oxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticoagulantes. A xantotoxina e o bergapteno possuem propriedades fotossensíveis que auxiliam no tratamento de leucodermia solar e vitiligo (BERGHEUL et al., 2019; MILESI et al., 2001).

**Figura 9.** Estrutura molecular das Furanocumarinas.



Fonte: MILESI et al., 2001

Por mais que a *Ruta graveolens L.* tenha sido numerosamente estudada por ser uma espécie de fácil obtenção, cultivo e por ter propriedades que interessam a comunidade científica, a grande maioria desses estudos de análises qualitativas e quantitativas foi realizado com a espécie na fase adulta (MEDEIROS, 2019; MILESI et al., 2001; NAZISH et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). O grande diferencial do presente trabalho, comparando-se com outros trabalhos já realizados com *Ruta graveolens L.*, além da identificação dos metabólitos, foi investigar se há diferenças na composição do metaboloma entre diferentes idades da planta, investigação essa que será efetuada por análises estatísticas que são habitualmente realizadas na área metabolômica, com isso se diferenciando da fitoquímica clássica (PILON et al., 2020).

Há evidências que mostram que a ontogenia de uma planta pode influenciar o seu perfil metabólico. Uma planta nos estágios iniciais do seu desenvolvimento, pode apresentar dificuldades de produção de metabólitos secundários devido a limitações na área foliar, que tem impacto direto na taxa fotossintética da planta, e na biomassa de raiz (GAIA, 2014). Em estudos com a *Cannabis sativa*, foi verificado que a composição metabólica de plantas jovens tem significativa diferença de plantas adultas (VOGELMANN; TURNER; MAHLBERG, 1988). Para a *Ruta graveolens L.*, já se tem conhecimento de que os princípios ativos da planta estão em maior concentração no período antes da floração e o estudo da ontogenia pode auxiliar na indústria de produção de medicamentos ao indicar qual é o período de vida planta em que se pode extrair a maior concentração de substâncias de interesse. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; DE OLIVEIRA; LABRA; BERMUDEZ, 2006)

## 2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Em materiais de origem vegetal, podem ser encontradas importantes substâncias originadas do metabolismo secundário, como os óleos essenciais, que são sintetizados, armazenados e liberados por diversos tipos de planta. Os óleos essenciais são compostos voláteis produzidos por determinadas plantas, que conferem odor ou sabor característico a cada uma delas, podendo ser relacionadas a variadas funções, como ação defensiva contra herbívoros e na atração de polinizadores. (COELHO et al. 2019)

Sendo uma substância complexa, a composição de um óleo essencial pode variar de dezenas a centenas de compostos com diferentes concentrações. No geral, os óleos essenciais tem um composto predominante, que determinará sua aplicação. A composição química e o rendimento de cada óleo dependerá de diversos fatores, como período de colheita, idade da planta, nutrientes, fatores genéticos e fatores ambientais (LIMA; CARDOSO, 2007).

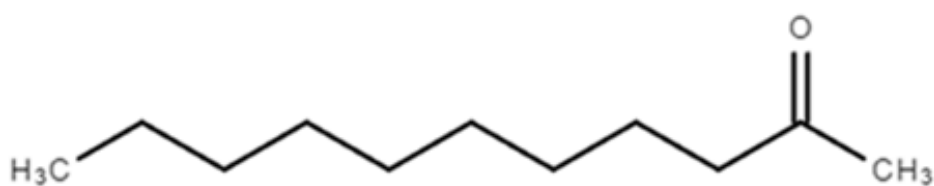
Os usos para óleos essenciais são diversos, sendo matéria-prima utilizada na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. Um uso bastante comum desses óleos é na aromaterapia, promovendo o bem-estar e aliviando sintomas de ansiedade, depressão, insônia, dependendo da origem do óleo. Pode ser utilizado também na fabricação de perfumes, óleos de massagem, hidratantes de pele e produtos de limpeza. (GNATTA; DORNELLAS; DA SILVA, 2011).

Os óleos essenciais podem ser extraídos das partes aéreas da planta, como folha, caule, tronco, frutos, sementes. Podem ser extraídos por diferentes métodos, como extração por solvente, maceração, fluídos supercríticos, micro-ondas e hidrodestilação, sendo essa a última a mais aplicada (SANTOS, et al. 2004).

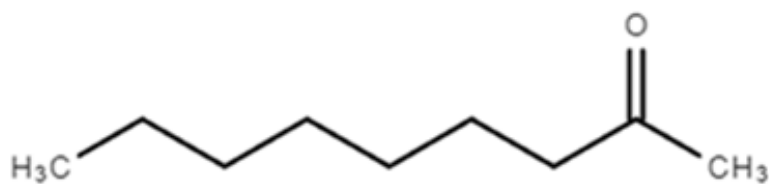
O óleo essencial de *Ruta graveolens L.* possui propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antibacterianas, além de ser utilizado como estimulante circulatório, repelente natural e em limpeza domiciliar com seu potente poder aromatizante. Pode ser indicado para tratamento de micoses, dores musculares e articulares e aromaterapia (OLIVEIRA, et. al. 2020). Há estudos que comprovam a eficácia do uso de óleo essencial de *Ruta graveolens L.* nas fases iniciais e finais de cicatrização de feridas em ratos, auxiliando na reparação dos tecidos internos (PISTORE, et al. 2014)

Estudos do óleo essencial da *Ruta graveolens L.* mostram a presença de três componentes majoritários: 2-undecanona, 2-nonanona e acetato de nonila (**Figura 10**). Também foram encontrados terpenoides e furanocumarinas (**Figura 9**) (DE FEO; DE SIMONE; SENATORE, 2002; YAACOB; ABDULLAH; JOULAIN, 1989)

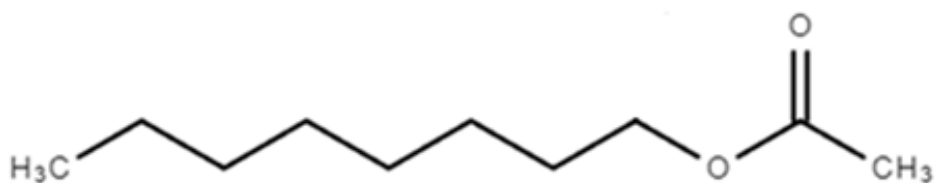
**Figura 10.** Os três componentes majoritários encontrados no óleo essencial da espécie vegetal *Ruta graveolens L.*



2-undecanona



2-nonanona



Acetato de octila

Fonte: ChemSpider

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar um estudo metabolômico do tipo *untargeted* (global) com os extratos metanólicos das folhas e dos óleos essenciais da espécie *Ruta graveolens L.* com o objetivo de verificar se há diferenças entre os óleos essenciais de plantas adquiridas em diferentes comércios e se há diferenças no perfil metabólico dos extratos metanólicos de plantas em diferentes idades.

#### 3.2 Objetivos específicos

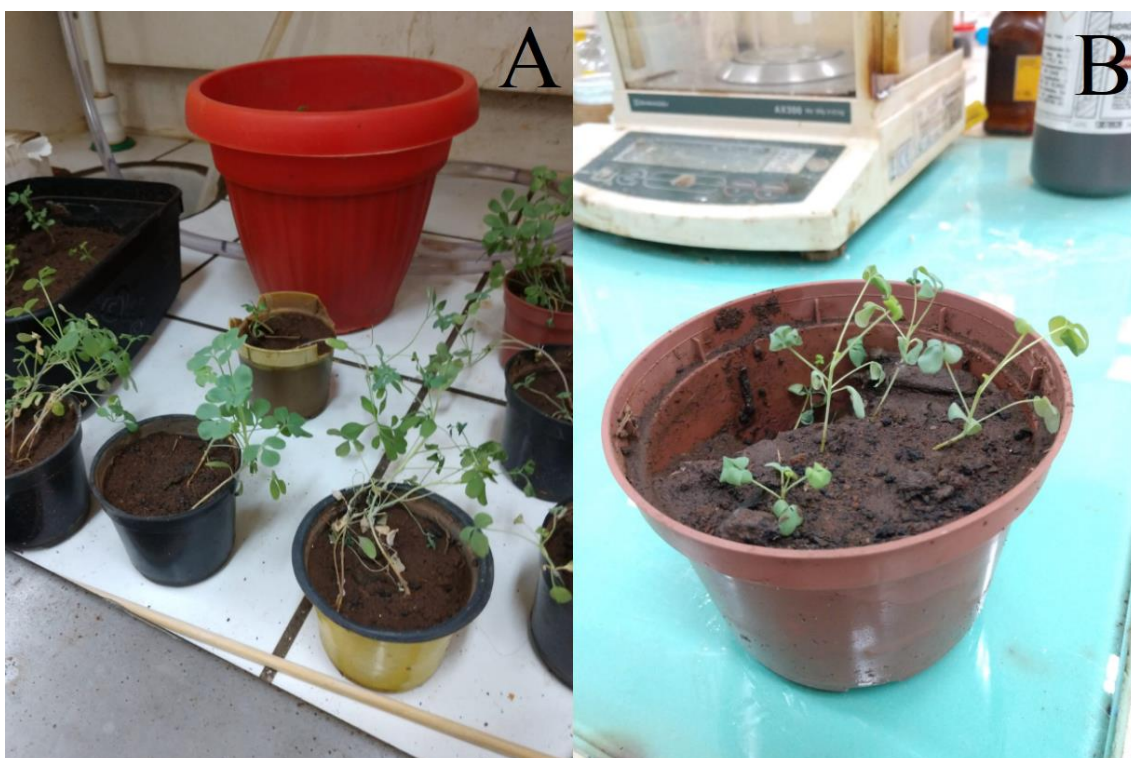
- Cultivar a espécie vegetal *Ruta graveolens L.* em laboratório com condições controladas (umidade, temperatura e luminosidade).
- Analisar os extratos das folhas por análise de espectroscopia de massas por injeção direta (DIMS).
- Analisar os óleos essenciais de espécimes adquiridos em diferentes comércios por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.
- Realizar o pré-tratamento de dados e executar análises estatísticas dos dados tratados.
- Realizar o processo de anotação de metabólitos por comparação com bancos de dados online.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA E OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A espécie vegetal *Ruta graveolens* L. foi cultivada em incubadora BOD, devido instabilidade na energia da Universidade de Brasília e consequentemente instabilidade no funcionamento da incubadora BOD, foram cultivados dois lotes da planta ao ar livre. As plantas foram semeadas em vasos de jardinagem com terra vegetal rica em nutrientes e as sementes foram da marca Isla Sementes. As unidades da arruda cultivadas em incubadora BOD com fotoperíodo de 8h de luminosidade por dia, com irrigação e temperatura a 24°C e umidade de 50%. As unidades da arruda cultivadas ao ar livre, foram mantidas em ambiente aberto e com irrigação diária. Os espécimes de *Ruta graveolens* L. na fase adulta foram obtidos na Floricultura Nice, situada no bairro Cruzeiro – DF e na Leroy Melin Park Sul, onde foram obtidos espécimes da marca Veilling Holambra.

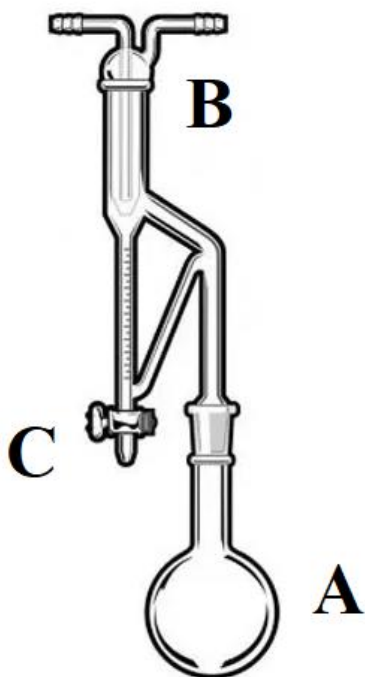
**Figura 11.** A) espécimes de *Ruta graveolens* L. cultivadas ao ar livre; B) espécimes de *Ruta graveolens* L. cultivadas em incubadora BOD.



## 4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, com um aparelho de destilação Clevenger (**Figura 12**). Foram adicionados aproximadamente 50 gramas das partes aéreas da espécie vegetal *Ruta graveolens L. in natura* e 250 mL de água destilada a um balão de fundo redondo de 500 mL sobre uma manta aquecedora. O processo de destilação por arraste a vapor foi realizado por 3 horas para cada réplica de espécimes das plantas adultas adquiridas em comércio local, as amostras de óleo essencial de plantas obtidas na loja Leroy Merlin foram codificadas como de OL e as amostras obtidas de plantas no Cruzeiro Novo foram codificadas como de OC. Após o uso o término da destilação as amostras de óleo foram submetidas a extrações líquido-líquido para a separação da água, filtradas e rotoevaporadas à 30°C.

**Figura 12.** Esquema do aparelho de Clevenger e destilação por arraste a vapor. A água é aquecida em um balão de fundo redondo contendo o material vegetal cortado em pequenos pedaços em **A**, o calor faz com que as paredes celulares da planta se abram e o óleo presente entre as células evapora junto com os vapores de água, com os voláteis indo em direção ao condensador em **B**. Por serem menos densos que a água, os óleos essenciais ficam concentrados sob a camada de água, podendo ser separados em **C**.



Fonte: [Glasslab.com/vidrarias/aparelhoclevenger](http://Glasslab.com/vidrarias/aparelhoclevenger) adaptado.



### 4.3 MÉTODO DE ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL POR GC-MS

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, sendo preferível análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. O método de análise foi uma adaptação do método visto no trabalho de óleos essenciais da espécie vegetal *Ruta Graveolens L.* de De Feo et al. (2002). A rampa de aquecimento se inicia a 40°C até 200°C com 4°C/min, e de 200°C até 250°C com 10°C/min e temperatura do injetor a 230°C. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo GC-2010 da Shimadzu, com o espectrômetro de massas GC-MSQP2010 plus e injetor AOC-5000.

### 4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

Aproximadamente de 50 mg de folhas da espécie vegetal *Ruta graveolens L.* foram apanhadas de forma randomizada e submetidas à baixas temperaturas em um processo de *quenching* metabólico com o uso de uma solução 1:1 de água/ metanol gelados, no objetivo de inibir a atividade metabólica para o extrato corresponder à espécie vegetal *in vivo* (XU et. al. 2010; CANELAS et al., 2008). A extração foi realizada por meio de maceração exaustiva, em que a amostra gelada ficou em contato com uma solução 1:1 de metanol/água com o propósito de facilitar a extração (DE FREITAS et al., 2015) Após a extração, a amostra foi filtrada. Foram feitas amostras para espécimes cultivados em incubadora BOD por 12 semanas, cultivadas ao ar livre por 4 e 8 semanas e espécimes adultos adquiridos em comércios já citados. Para cada grupo proposto, os extratos foram feitos em triplicata.

As folhas dos espécimes adultos comprados em comércio têm tamanho que variam de dois a três centímetros de comprimento, de coloração verde escura.

**Figura 13.** Variação de tamanho das folhas de um espécime adulto de *Ruta graveolens* L. adquirido em comércio local. Foto **A** – Folha de 3 centímetros de comprimento; Foto **B** – Folha de 2 centímetros de comprimento



#### 4.5 MÉTODO DE ANÁLISE DE MASSAS POR INJEÇÃO DIRETA (DIMS)

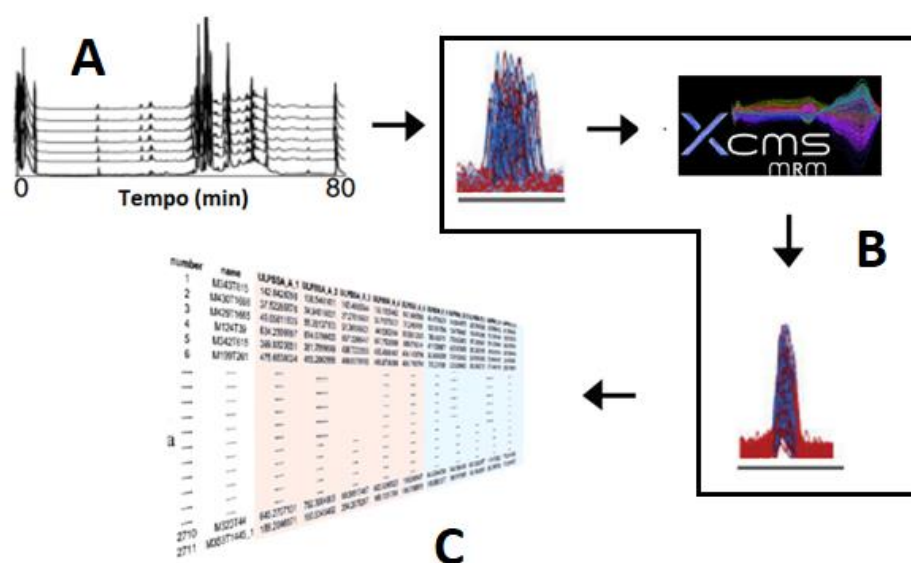
O ideal para análises metabolômicas é a utilização de mais de uma técnica analítica, porém, a escolha da técnica de espectrometria de massas como única deve-se ao fato de que a quantidade de material vegetal era limitada, por isso um equipamento com maior sensibilidade era recomendado em relação à equipamentos com baixa sensibilidade como o RMN (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010).

Os extratos referentes aos diferentes grupos da *Ruta graveolens* L. foram analisados por um equipamento de espectrometria de massas TripleTof 5600+ (AB Sciex), com fonte de ionização por eletrospray no modo positivo [ESI(+)]MS], utilizando uma solução 1:1 de metanol/H<sub>2</sub>O como solvente carreador, em um fluxo de 0,01mL de 0 a 3 minutos. Especificações do espectrômetro de massas: deslocamento de placa (+), 500V; voltagem capilar (+), 4000V; pressão do nebulizador. 4 bar, fluxo de nitrogênio, 5 Lmin<sup>-1</sup>, 180 °C; taxa de aquisição do espectro, 1 Hz, faixa de massa (*m/z*) de 70 até 1000, método adaptado de Amazonas et al. (2019).

#### 4.6 PRÉ-TRATAMENTO DE DADOS

Os dados brutos obtidos das análises dos extratos da folha de *Ruta graveolens* L. por DIMS de foram submetidos a um pré-tratamento de dados. A plataforma online utilizada foi o XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>), um software da área de bioinformática que introduziu o conceito de alinhamento não linear do tempo de retenção, permitindo a avaliação estatística dos picos detectados. A partir dessa plataforma foram corrigidos possíveis ruídos provenientes do equipamento e onde foi feito o alinhamento de picos de dados obtidos por análises de DIMS. Os dados das análises de cada grupo da planta foram agrupados e alinhados, com o objetivo de preparar os dados das amostras para posteriores análises estatísticas multivariadas, a partir da transformação dos gráficos cromatográficos alinhados em dados numéricos em tabela, como visto na **figura 14**.

**Figura 14.** Alinhamento de cromatogramas e transformação para dados numéricos. **A)** Obtenção de dados brutos por GC-MS ou LC-MS. **B)** Alinhamento de picos de diversos cromatogramas pelo *software* XCMS. **C)** Transformação das informações dos picos cromatográficos para valores numéricos em tabela.



Fonte: adaptado de MUTCH et al. 2007 e xcmsonline.scripps.edu

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA E MAPA DE CALOR

Os dados obtidos a partir do pré-tratamento no software XCMS foram submetidos a análise de PCA. O *software* utilizado para a análise de PCA foi o MetaboAnalyst 5.0 (disponível gratuitamente em <https://www.metaboanalyst.ca/>). Do pré-tatamento realizado no XCMS obteve-se uma tabela no formato excel, contendo para cada amostra (linhas), as massas dos íons com suas intensidades (colunas). O tempo de retenção utilizado para a extração dos íons com suas respectivas áreas foi de 0,46 – 0,48 minutos. A tabela foi salva em formato .CSV, formato aceito pelo programa MetaboAnalyst 5.0. No MetaboAnalyst 5.0. Antes das análises estatísticas, os dados foram normalizados pela massa fresca das plantas utilizadas para a preparação do extrato metanólico (**tabela 4**). O dimensionamento de dados escolhido foi o *Pareto scaling*. A análise de PCA foi realizada com os parâmetros padrões do programa. Para a análise do mapa de calor, os parâmetros utilizados foram: medida de distância: Euclidiana; método de *cluster*: Ward. Para a construção da imagem, foram utilizadas as intensidades das 25 massas de íon mais influentes nas componentes principais.

#### 4.8 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

A pesquisa dos metabólitos das amostras de óleo essencial ocorreu pelo cruzamento dos espectros de massa de razão massa/carga ( $m/z$ ) obtidos dos picos dos cromatogramas gasosos com o banco de dados *Wiley 9th edition/NIST08 structure database (W9N08.sdb)*. Não foi possível a identificação dos metabólitos das amostras de extrato metanólico pelo baixo nível de confiabilidade dos resultados no cruzamento automático dos espectros de massa com o banco de dados GNPS (*The Global Natural Product Social Molecular Networking*) e pelo cruzamento manual no banco de dados METLIN.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ÓLEO ESSENCIAL DA *RUTA GRAVEOLENS L.*

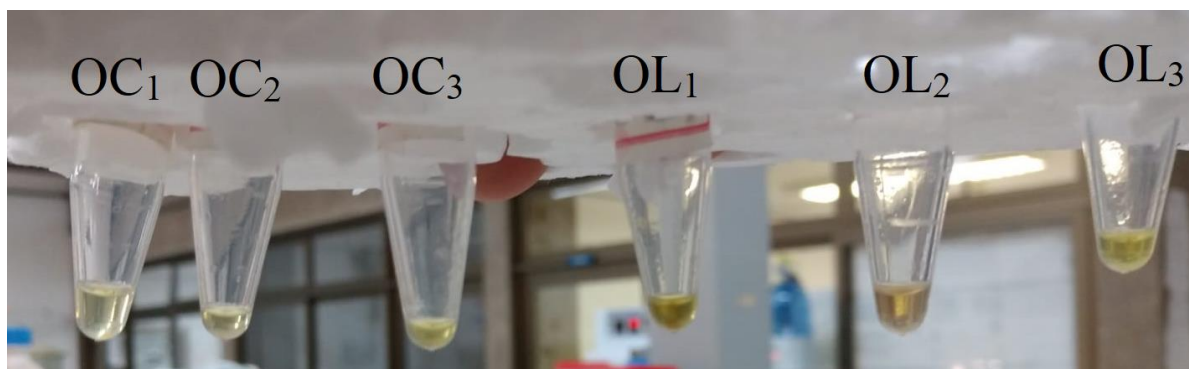
#### 5.1.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL

O rendimento esperado para o óleo essencial da *Ruta Graveolens L.* obtido pelo método de destilação por arraste a vapor pode variar de 0,01% a 0,21% (MELATO, 2017; EL-SHERBENY et al., 2008). O rendimento do óleo essencial obtido neste trabalho variou de 0,062% a 0,105% com média de 0,087%, ficando dentro da faixa esperada segundo as referências. Os respectivos valores estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4.** Rendimento percentual do óleo essencial da espécie vegetal *Ruta Graveolens L.* a partir da massa fresca.

Amostra	Origem do material vegetal	Massa do material vegetal fresco (gramas)	Massa de óleo essencial (gramas)	Rendimento
OC <sub>1</sub>	Cruzeiro - DF	74,552 g	0,0723 g	0,097%
OC <sub>2</sub>	Cruzeiro - DF	50,426 g	0,0417 g	0,083%
OC <sub>3</sub>	Cruzeiro - DF	61,776 g	0,0648 g	0,105%
OL <sub>1</sub>	Leroy Merlin	48,352 g	0,0413 g	0,085%
OL <sub>2</sub>	Leroy Merlin	38,118 g	0,0236 g	0,062%
OL <sub>3</sub>	Leroy Merlin	49,223 g	0,0453 g	0,092%

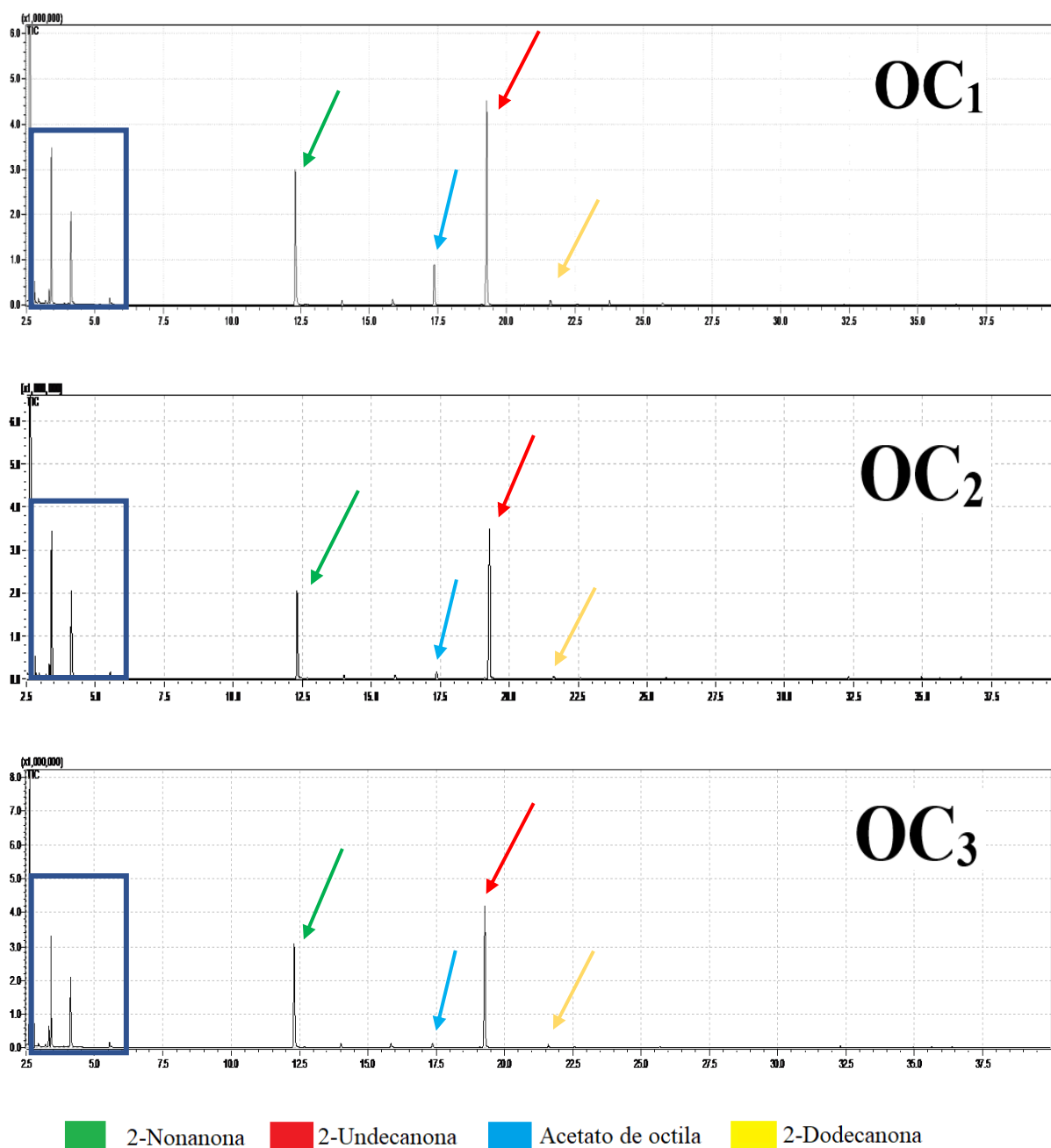
**Figura 15.** Óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em aparelho de Clevenger.



### 5.1.2 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE VEGETAL *RUTA GRAVEOLENS* L. POR GC-MS

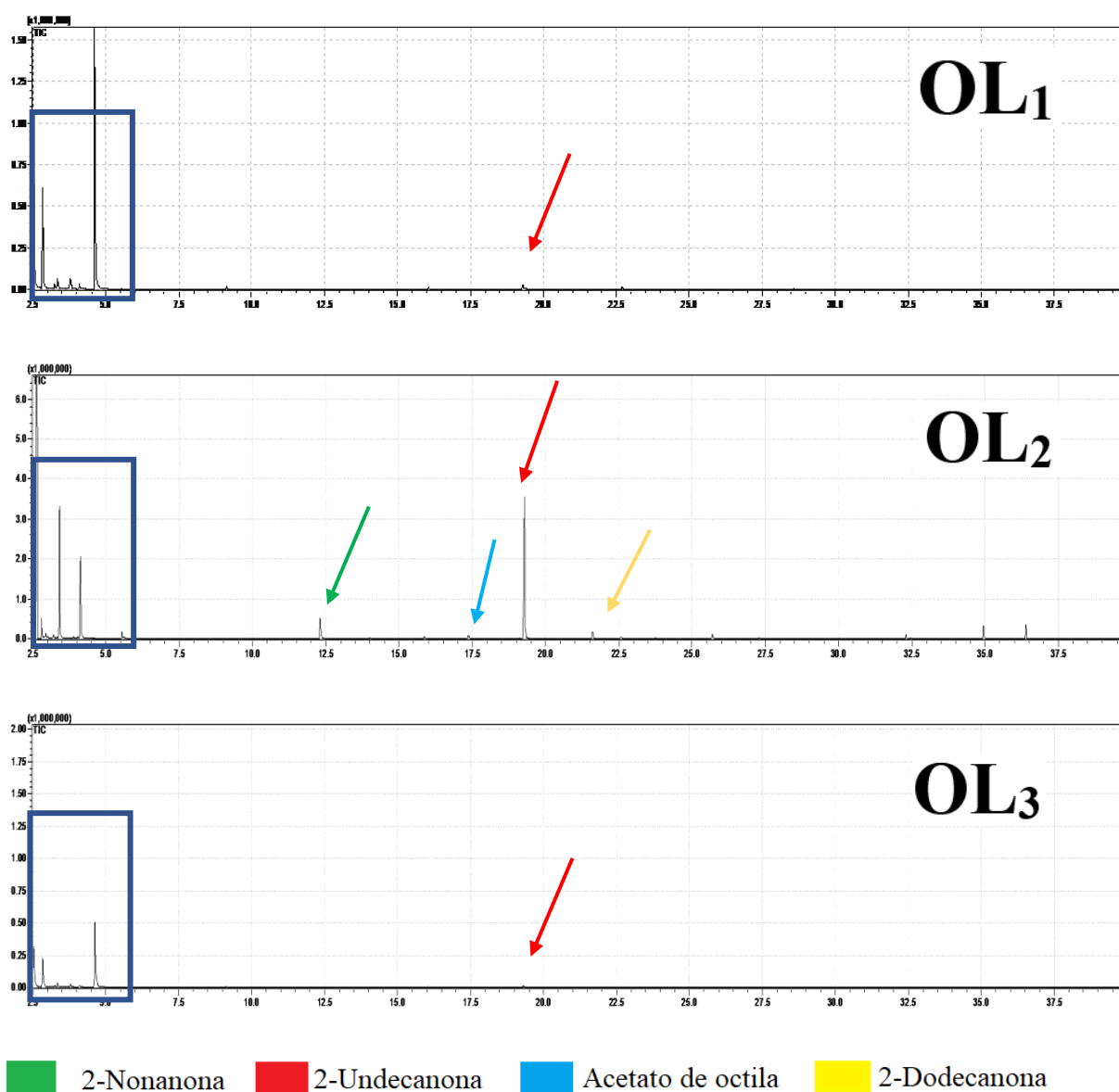
A seguir serão discutidos os cromatogramas (**figuras 16 e 17**) obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas dos óleos essenciais de espécimes de *Ruta graveolens* L. e dos metabólitos identificados pela comparação automática no banco de dados *Wiley 9th edition/NIST08 structure database (W9N08.sdb)*

**Figura 16.** Cromatogramas das amostras de óleo essencial de espécimes da *Ruta graveolens* L. obtidas na Floricultura Nice, situada no bairro Cruzeiro – DF (OC). Retângulo azul – picos provenientes do solvente AcOEt, visto no **apêndice A**.



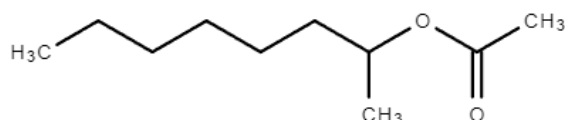
O óleo essencial das plantas adquiridas no Cruzeiro (OC) apresentou como compostos majoritários o 2-nonanona e 2-undecanona, indicados pelas setas verde e vermelho respectivamente, também foram encontrados compostos minoritários como o acetato de octila e 2-dodecanona, indicados pelas setas azul e amarelo respectivamente (**figura 16**). As amostras OC<sub>1</sub>, OC<sub>2</sub> e OC<sub>3</sub> são similares entre si. As comparações entre os espectros de massa das amostras do tipo OC com o banco de dados estão no **apêndice A**.

**Figura 17.** Cromatogramas das amostras de óleo essencial de espécimes da *Ruta graveolens* L. obtidas na Leroy Merlin Park Sul, da marca Veiling Holambra (OL). picos provenientes do solvente AcOEt, visto no **apêndice A**.

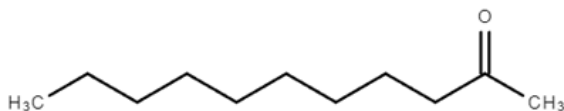


O óleo essencial de origem das plantas adquiridas na loja Leroy Melin, da marca Veiling Hollambra (OL), assim como as amostras OC, apresentou natureza metilcetônica, contendo como compostos como 2-undecanona indicado pela seta vermelha. As amostras OL<sub>1</sub> e OL<sub>3</sub> são similares, enquanto a OL<sub>2</sub> se diferencia com picos também vistos nas amostras do tipo OC. Em OL<sub>1</sub> e OL<sub>3</sub> temos a presença de 2-undecanona, mas não foi detectada a presença de acetato de octila, 2-nonanona e 2-dodecanona. A amostra OL<sub>2</sub> apresenta picos de, 2-nonanona, acetato de octila e 2-dodecanona e 2-undecanona. As comparações entre os espectros de massa das amostras OL<sub>1 e 3</sub> e amostra OL<sub>2</sub> com o banco de dados estão no **apêndice A**.

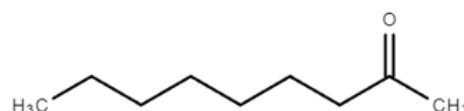
**Figura 18.** Compostos encontrados nas amostras de óleo essencial nas espécies vegetais de *Ruta graveolens L.* do Cruzeiro (OC) e na amostra OL<sub>2</sub>.



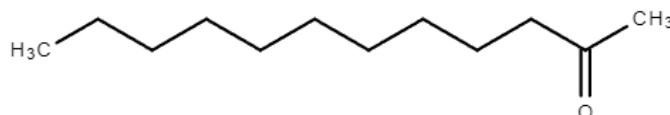
2-octil acetato



2-undecanona



2-nonanona



2-dodecanona

Fonte: ChemSpider

Comparando-se os cromatogramas das amostras OC com as amostras OL, é possível afirmar que existe diferença entre os óleos das plantas adquiridas em diferentes localidades há diferenças qualitativas, como o acetato de octila, o 2-nonanona e o 2-



dodecanona que não estão presentes nas réplicas OL<sub>1</sub> e OL<sub>2</sub>. Também foram observadas diferenças qualitativas, como pode ser visualizado entre a amostra OL<sub>2</sub> e as amostras OC, tanto em OL<sub>2</sub>, como em OC, foi notada a presença de 2-nonanona, 2-undecanona, acetato de octila e 2-dodecanona, compostos que já eram esperados em um óleo essencial de *Ruta graveolens* L. (DE FEO; DE SIMONE; SENATORE, 2002; YAACOB; ABDULLAH; JOULAIN, 1989; NAHAR et al., 2021; ORLANDA; MOUCHREK, 2021), mas o pico do composto 2-nonanona é visivelmente menor em OL<sub>2</sub> e inexistente em OL<sub>1</sub> e OL<sub>3</sub>.

Com essa diferença, pode ser levantada a hipótese de que o local de origem em que os espécimes da *Ruta graveolens* L. eram mantidos pode alterar a composição do óleo essencial, como pode ser visto em diversos trabalhos em que o ambiente e a localidade alteram a forma em que o óleo essencial. No trabalho de Toncer et al. (2010), o óleo essencial da espécie *Origanum syriacum* varia de acordo a variação de temperatura, umidade e níveis de chuva. A espécie vegetal *Coriandrum sativum* L., estudada por Izgi et al. 2017, também tem a composição do seu óleo essencial alterada em dois ambientes distintos.

Vários trabalhos sobre metabolômica apontam que o ambiente é um fator que pode determinar variações no metabolismo secundário (PILON et al., 2020). O local em que os espécimes da Veiling Hollambra (OL) estavam sendo mantidos era um ambiente de comércio, como de um supermercado, no qual as plantas ficam em prateleiras, em um galpão coberto, com luz artificial e temperatura fixa de ar condicionado. Diferentemente das plantas na Leroy Merlin, as plantas que eram mantidas na casa de jardinagem do Cruzeiro ficavam em ambiente aberto, cercado de diversas outras espécies, com luz solar e variações de temperatura ambiente durante o dia.

As réplicas OL<sub>1</sub> e OL<sub>3</sub> são morfologicamente diferentes da réplica OL<sub>2</sub>, mesmo sendo da mesma marca e do mesmo local de compra. (**figura 20**), OL<sub>1</sub> e OL<sub>3</sub> são visivelmente menores se comparado com OL<sub>2</sub>, levando-se a crer que OL<sub>2</sub> é uma planta mais velha, por causa de seu tamanho. Diversos trabalhos salientam que a idade de uma espécie vegetal pode influenciar em seu óleo vegetal, Shiferaw et al. (2019) mostra que a ontogenia da espécie *Eucalyptus globulus* tem influência direta na composição de seu óleo essencial, assim como Kandota et al. (2014) apresenta que a composição do óleo essencial e seu rendimento variam de acordo com a idade da espécie vegetal *Corymbia citriodora*.

**Figura 19.** Diferenças visuais entre espécimes da marca Veiling Hollambra adquiridas na loja Leroy Merlin. A) espécime de *Ruta graveolens* L. que deu origem ao óleo essencial da amostra OL<sub>2</sub> B) espécimes de *Ruta graveolens* L. que deram origem aos óleos essenciais das amostras OL<sub>1</sub> e OL<sub>3</sub>.

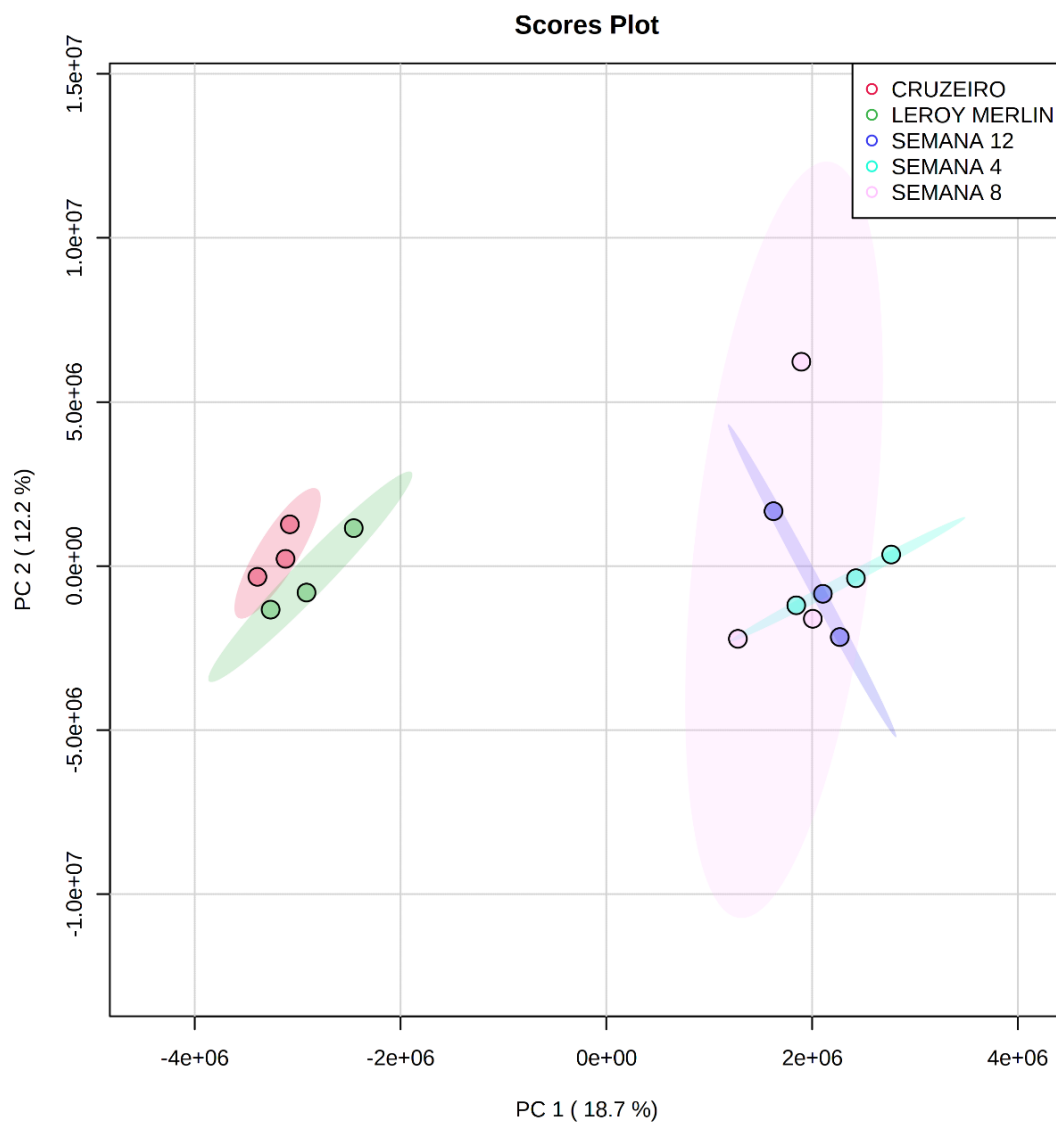


## 5.2 ANÁLISE DOS EXTRATOS LÍQUIDOS DA ESPÉCIE VEGETAL *RUTA GRAVEOLENS* L. POR DIMS

**Tabela 5.** Amostras de diferentes grupos de *Ruta graveolens* L. analisadas por espectrometria de massas por injeção direta.

Amostra	Idade	Grupo ambiente	Massa fresca (gramas)
B <sub>1</sub>	12 semanas	BOD	0,0430g
B <sub>2</sub>	12 semanas	BOD	0,0405g
B <sub>3</sub>	12 semanas	BOD	0,0423g
N1	4 semanas	Ar livre	0,0423g
N2	4 semanas	Ar livre	0,0410g
N3	4 semanas	Ar livre	0,0410g
M1	8 semanas	Ar livre	0,0418g
M2	8 semanas	Ar livre	0,0413g
M3	8 semanas	Ar livre	0,0432g
L <sub>1</sub>	Adulto	Leroy Merlin	0,0620g
L <sub>2</sub>	Adulto	Leroy Merlin	0,0606g
L <sub>3</sub>	Adulto	Leroy Merlin	0,0630g
C <sub>1</sub>	Adulto	Cruzeiro	0,0702g
C <sub>2</sub>	Adulto	Cruzeiro	0,0775g
C <sub>3</sub>	Adulto	Cruzeiro	0,0790g

**Figura 20.** Gráfico de scores dos diferentes grupos de espécimes da *Ruta graveolens* L., as componentes PC1 e PC2 representam as componentes mais importantes da informação original. As amostras do Cruzeiro de da Leroy Merlin são representadas pelos pontos em vermelho e verde respectivamente, enquanto as amostras de 4, 8 e 12 semanas são representadas pelos pontos azul piscina, rosa e roxo respectivamente.



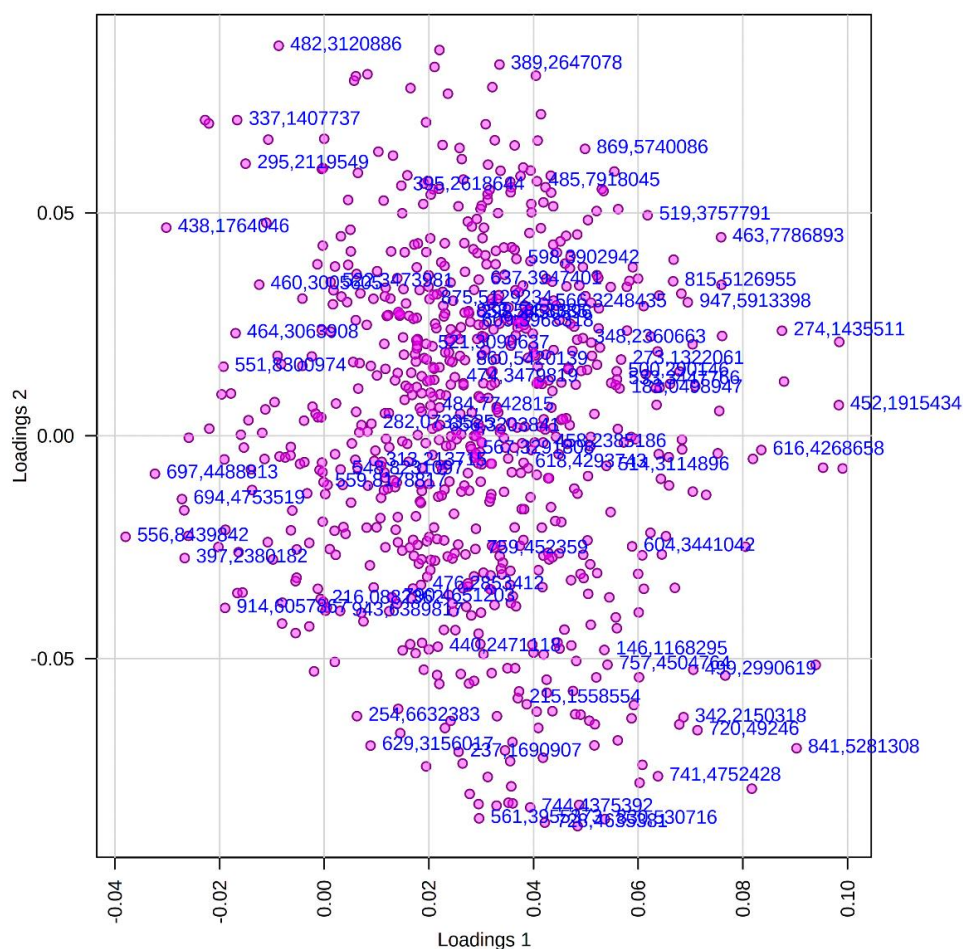
MetaboAnalyst 5.0

No caso deste trabalho, a análise de PCA foi necessária, visto que os espectros de massa das amostras de *Ruta graveolens* L. são complexos, e mesmo que similares à primeira vista (**apêndice B**), tem diferenças que não podem ser calculadas a olho nu.

O gráfico de scores da análise de componentes principal obtido no MetaboAnalyst indica que o perfil metabólico dos espécimes adultos de *Ruta graveolens* L. obtidos na floricultura do Cruzeiro – DF e na Leroy Merlin se assemelham, estando

com suas réplicas nos valores negativos da componente principal 1 (PC1). O perfil metabólico das plantas de 4, 8 e 12 semanas são similares, pois os pontos estão aproximados, formando um grande grupo no lado positivo da componente principal 1 (PC1). Nota-se pela coordenada PC1, que utiliza 18.7% da informação original, que o metabolismo das plantas adultas é diferente das plantas mais jovens, já pela coordenada PC2, que utiliza 12,2% da informação original, que todas as amostras tem certa similaridade. Pelo gráfico de scores é possível afirmar que os espécimes adultos e os espécimes com até 12 semanas tem o perfil metabólico diferente, pois se diferem em dois grupos de pontos distintos.

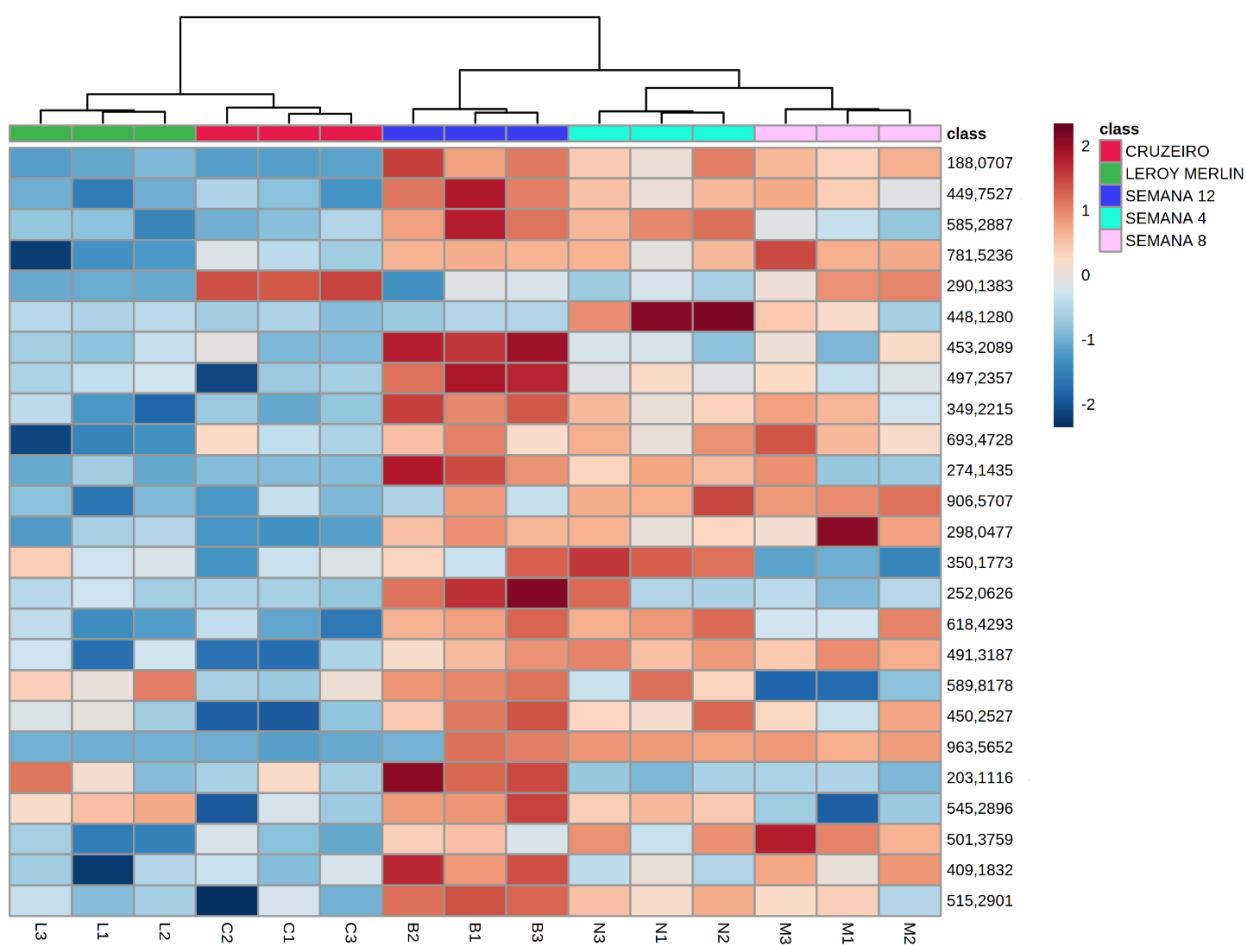
**Figura 21.** Gráfico de loadings referente à análise entre os grupos da *Ruta graveolens L.*, cada ponto representado no gráfico indica um íon presente nas amostras analisadas, as coordenadas *Loadings 1* e *2* então relacionadas as coordenadas PC1 e 2 do gráfico de scores.



O gráfico de loadings apresenta os íons dos metabólitos presentes nas amostras analisadas de *Ruta graveolens L.* que foram determinantes para evidenciar a diferença entre os grupos, cada íon representado pelos pontos rosados tem uma massa própria.

A maior parte dos íons indicados está nos valores numéricos positivos das coordenadas *Loadings 1* e *2* indicam o lado das amostras de 4 a 12 semanas, pois no gráfico de scores (**figura 20**) os pontos que representam essas amostras também estão nos valores positivos de componentes principais (PC), indicando que esses íons estão presentes nas amostras com menor idade, se comparados com as amostras da *Ruta graveolens L.* em fase adulta.

**Figura 22.** Mapa de calor referente à análise entre os grupos da *Ruta graveolens L.* e seus 25 íons mais importantes na comparação entre as réplicas, no mapa de calor há a combinação das massas dos íons, com os grupos de amostras e suas réplicas, a cor indica a concentração desse íon em cada amostra, indo de menor concentração na cor azul até maior concentração na cor vermelha.



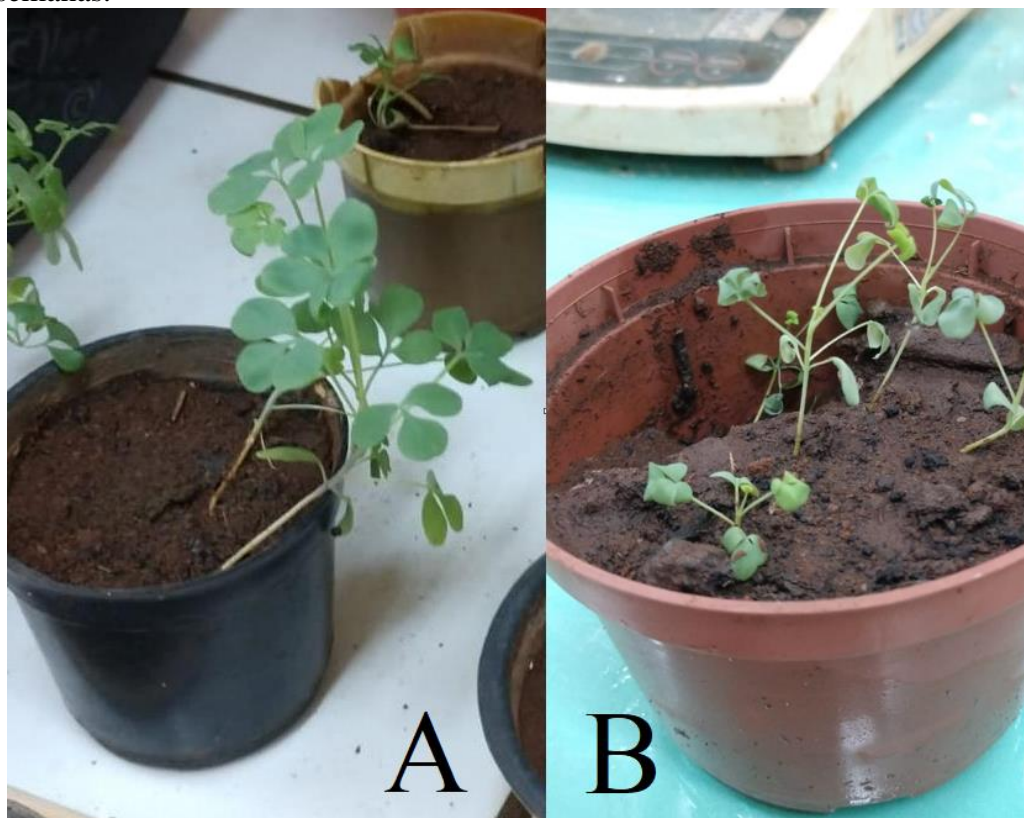
MetaboAnalyst 5.0

O mapa de calor apresentado mostra o cruzamento e a relação entre os grupos de amostras, as réplicas de cada grupo e a massa dos 25 íons mais influentes na diferenciação das amostras propostas, o grupo adulto (Cruzeiro e Leroy Merlin) tem a maior parte do mapa na cor azulada, indicando que esses íons influentes não estão presentes nesse tipo de amostra, diferente das amostras das semanas 4, 8 e 12, onde o mapa está com a maior parte com a coloração avermelhada, indicando presença nessas amostras e apontando que a *Ruta graveolens L.* tem um número maior de metabólitos com 12 semanas do que na fase adulta. Os espectros de massa de todas as amostras propostas estão disponíveis no **apêndice B**. O chaveamento indica que os grupos da cor verde e vermelho estão com o metabolismo similares, mas com algumas diferenças. Os grupos na cor azul marinho, azul piscina e rosa formam um grupo, mas dentro desse grupo os pontos em azul piscina se mostram mais similares aos pontos rosas

### 5.2.1 Crescimento da *Ruta graveolens L.*

Os espécimes cultivados em incubadora BOD foram plantados no dia 17/01/2022 (12 semanas), enquanto os espécimes cultivados em ao ar livre foram plantados dia 03/02/2022 e 12/03/2022 (8 e 4 semanas). Para os espécimes de *Ruta graveolens L.* cultivados ao ar livre foi observado um período de 7 a 10 dias para as sementes brotarem, enquanto para os espécimes cultivados no BOD foi observado um período de 18 dias para as sementes brotarem, também foi notado que o crescimento da planta no BOD foi, aparentemente, afetado, como pode ser visto na **figura 23**, em que um espécime com 8 semanas cultivado em ambiente natural é visualmente maior do que espécimes com 12 semanas cultivados em BOD.

**Figura 23.** Espécimes de *Ruta graveolens* L. de diferentes idades cultivadas em diferentes ambientes. A) Cultivo em ambiente natural, 8 semanas. B) Cultivo em incubadora BOD, 12 semanas.



Como pode ser visto em em Juntilla et al. (1993), luz e temperatura são os dois principais fatores que influenciam no crescimento de um organismo vegetal, as reações metabólicas mais básicas são intimamente dependentes da temperatura, e a luz é a fonte de energia. As plantas cultivadas em BOD ficaram em uma temperatura travada em 24°C, enquanto as plantas em ambiente natural acompanhavam a temperatura ambiente, que nessa época do ano pode ir de 16°C a 32°C. Outro fator que pode ter sido decisivo para o crescimento lento das plantas cultivadas em BOD é o fato de que esses espécimes eram irrigados com intervalos de 48 horas, devido a questões de logística, enquanto as plantas criadas ao ar livre eram irrigadas com maior frequência, recebendo água duas vezes ao dia. Não se pode negar, também, a influência que o mal funcionamento da incubadora BOD pode ter causado no desenvolvimento da planta, visto que pela instabilidade de energia na Universidade de Brasília, o equipamento foi involuntariamente desligado e suas funções, como temperatura, luminosidade e umidade foram desconfiguradas.

## 6 CONCLUSÕES

O trabalho cumpriu o seu objetivo principal de diferenciar espécimes da *Ruta graveolens* L. com relação a sua ontogenia e com relação a sua ambientação, sendo comparados dois diferentes tipos de amostra, o óleo essencial e extrato líquido.

Foram realizadas nesse trabalho quase todas as etapas de um fluxograma de metabolômica, com pequenas diferenças para a obtenção da amostra e análise instrumental, onde a amostra de óleo essencial foi obtida com destilação por arraste a vapor e analisada por GC-MS e a amostra líquida foi obtida por maceração com solvente extrator e analisada por espectrometria de massas por injeção direta.

Para o óleo essencial foi observado por análises de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas (GC-MS) que os óleos essenciais dos espécimes das plantas adquiridos na Floricultura Nice Cruzeiro – DF e na Leroy Melin Park Sul – DF são diferentes, onde no óleo essencial das plantas do cruzeiro há compostos como o 2-nonanona, 2-undecanona, acetato de octila e 2-dodecanona, e no óleo essencial das plantas da Leroy Merlin há a presença de 2-undecanona, mas não há a presença de acetato de octila e 2-dodecanona, e o 2-nonanona é visto em menor concentração, ou não é visto, dependendo da réplica. Nota-se também que há diferença entre os cromatogramas das réplicas da Leroy Merlin, visto que o tamanho das plantas dessas réplicas é diferente, tendo como justificativa de que a além do ambiente, a ontogenia também pode afetar a composição do óleo essencial, mas para a total confirmação é necessária uma análise de no mínimo 3 réplicas para cada tamanho de planta.

Para os extratos líquidos, foi observado por uma análise de componentes principais (PCA) que plantas com 4, 8 e 12 semanas tem o metabolismo similar entre elas, mas se comparado com uma planta adulta, tem diferenças no perfil metabólico, nota-se também que o perfil metabólico das plantas adultas do Cruzeiro e da Leroy Merlin são próximos, mas não são idênticos, podendo ter o óleo essencial, discutido na parte anterior, tendo participação na pequena diferença vista entre as plantas adultas, seriam necessárias análises mais profundas para concluir quais são todas as diferenças entre o metabolismo dessas plantas adultas de diferentes ambientes. O mapa de calor apresentado no trabalho apresenta as massas dos íons dos compostos que mais influenciam na diferença entre as réplicas mais jovens e as mais antigas, o próximo passo para uma análise mais completas



obre essas diferenças seria a identificação desses compostos de massa conhecida mostrados no mapa de calor.

Todas as informações desse trabalho podem direcionar estudos futuros para uma formação de um perfil mais completo sobre o metabolismo da espécie vegetal *Ruta graveolens L.* e como esse metabolismo se comporta em diferentes idades e ambientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NARH, D.; BLUM, K. OMICS Biomedical perspectives and applications. Boca Raton, FL: **CRC Press**, 2012.

SOUZA, L.; RHODEN, S.; PAMPHILE, J., A importância das ômicas como ferramentas para o estudo da prospecção de microrganismos: perspectivas e desafios. **Revista Uningá Review**, v. 18, n. 2, 2014.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. "Análise do Metaboloma", *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, v. 9, n. 36, p. 58-69, 2006

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome **Trends Biotechnol.** v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998.

FIEHN, O. et al. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 11, p. 1157–1161, 2000.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**. v. 19, n. 3 p. 1720-1730, 1999.

SUMNER, L.W.; MENDES, P.; DIXON, R.A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**. v. 62, n.6, p. 817-836, 2003.

FIEHN, O. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**. v. 48, p. 155-71, 2002.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J.C. Metabonomics a generic platform for the investigation of drug toxicity, altered gene function and disease processes. **Drug Discovery World Summer**, p. 23–28, 2004.

ROCHFORT, S. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, 2005.

SHYUR, L.F.; YANG, N.S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 66-71, 2008.

FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

CANUTO, G. A. B. et al. Metabolomics: Definitions, state-of-the-art and representative applications. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

RODRIGUES, V.G.S.; GONZAGA, D. S. de O. M., Arruda: (*Ruta graveolens L.*) **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)**, 2001.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 1, p. 3–14, 2007.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613–646, 2004.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Global metabolite analysis of yeast: Evaluation of sample preparation methods. **Yeast**, v. 22, n. 14, p. 1155–1169, 2005.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of bioscience and bioengineering**. v. 100 n. 4, p. 347–354, 2005.

BINGOL, K., Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/NMR Methods. **High Throughput**. v. 7, n. 2, 2018

TSUGAWA, H., Advances in computational metabolomics and databases deepen the understanding of metabolisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 54 p. 10-17, 2018

CAMBIAGHI, A.; FERRARIO M.; MASSEROLI M., Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. **Briefings in Bioinformatics**, v. 18, n. 3, p. 498-510, 2017.

PATTI, G.J.; YANES, O.; SIUZDAK, G., Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 263-9, 2012.

ROBERTS, L.D., et al., Targeted metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 1-24, 2012.

RAUL, J. et al. Metabolômica microbiana: inovações e aplicações **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 546–559, 2019.

VINAYAVEKHIN, N.; A. SAGHATELIAN, Untargeted metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**. v. 30, n. 1, p. 1-24, 2010.

PILON, A. et al. Metabolômica De Plantas: Métodos E Desafios. **Química Nova**, v. 43, p. 320–354, 2020.

DETTMER, K.; B.D. HAMMOCK, Metabolomics: a new exciting field within the "omics" sciences. **Environmental health perspectives**, v. 112, n. 7, p. A396-A397, 2004.

KOSMIDES, A. K. et al. Metabolomic fingerprinting: Challenges and opportunities. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 41, n. 3, p. 205–221, 2013.

KHOOMRUNG, S.; WANICHTHANARAK, K.; NOOKAEW, I. Metabolomics and Integrative Omics for the Development of Thai Traditional Medicine. **Frontiers in Pharmacology** v. 8, n. July, p. 1–11, 2017.

FIEHN, O. et al. The metabolomics standards initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 175–178, 2007.

NALBANTOGLU, S. Metabolomics: basic principles and strategies. **IntechOpen**. p. 1–15, 2019.

XU, F.; ZOU, L.; ONG, C. N. Experiment-originated variations, and multi-peak and multi-origination phenomena in derivatization-based GC-MS metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, 2010.

CANELAS, A. B. et al. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. **Metabolomics**, v. 4, n. 3, p. 226–239, 2008.

MASHEGO, M.R.; RUMBOLD, K.; DE MEY, M.; VANDAMME, E.; SOETAERT, W.; HEIJNEN, J.J. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. **Biotechnology Letters.**, v. 29, p. 1, 2007.

PINU, F. R.; VILLAS-BOAS, S. G.; AGGIO, R. Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: Quenching and extraction protocols. **Metabolites**, v. 7, n. 4, 2017.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 536–549, 2010.

DE FREITAS, P. C. et al. Extração assistida por ultrassom para determinação colorimétrica de ferro em solo: Uma comparação com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 570–574, 2015.

DA CUNHA, E. S.L. et al. Extração com líquido pressurizado: Montagem de uma unidade de multipropósito laboratorial e desenvolvimento de um procedimento operacional padrão (POP). **Revista Brasileira de Iniciação Científica (RBIC)**, v. 7, n.6, p. 134-149, 2020.

CANUTO, G. A. B. **Avaliação metabolômica comparativa *in vitro* de fármaco candidato ao tratamento de leishmaniose.** Universidade de São Paulo, 2016.

JACQUES, R. A. **Caracterização química da erva mate (*Ilex paraguariensis*): Aplicação de diferentes processos de extração e influências das condições de plantio sobre a composição química.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2 p. 185-200, 1996.

GOWDA, G.A.N. AND D. DJUKOVIC, Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. **Methods in molecular biology**. v. 1198: p. 3-12, 2014.

DUNN, W.B., et al., Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 6, n. 7, p. 1060-1083, 2011.

J. P. CLAYDEN, N. GREEVES, S. G. WARREN, P. D. WOTHERS 2000, **Organic Chemistry**, 1st ed, Oxford University Press

MARKLEY, J.L., et al., The future of NMR-based metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 43 p. 34-40, 2017.

D. A. SKOOG, D. M. WEST, F. J. HOLLER e S. R. CROUCH – **Fundamentos de Química Analítica**, 1 a ed., Thomson, 2008

SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2006, 836p.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005.

VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, p. 1–15, 2006.

MISRA, B.B.; VAN DER HOOFT, J.J. Updates in metabolomics tools and resources. **Electrophoresis**. v. 37, n. 1, p. 86-110, 2016.

SUMNER, L. W. et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, 2007.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2013.

LILAND, K. H. Multivariate methods in metabolomics - from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 827–841, 2011.

KIM, J. et al. Discrimination of cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) cultivars grown in different geographical areas using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics. **Food Chemistry**, v. 137, n. 1–4, p. 68–75, 2013.

BRASIL. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Ruta graveolens* L. (Arruda). v. 5, p. 140, 2015.

PRONCZUK, J. *Ruta graveolens* L., 1989 Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pims/plant/rutagrav.htm#SubSectionTitle:3.1.3>. Acesso em 02 set. 2021

RIBEIRO, C.C., **As Galipeínae (Galípeae, Rutaceae) no estado da Bahia**, Brasil. Universidade de São Paulo, 2015.

PIRANI, J.R & GROppo, M. *Rutaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB212> Acesso em 02 set. 2021

LORENZI, H.; MATOS, F.J.D.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA; p. 576, 2008

ORLANDA, J.F.F. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (Rutaceae)**. Universidade Federal da Paraíba; 2011.

KANNAN, R.; BABU, U.V. Identity and pharmacognosy of *Ruta graveolens* Linn. **Ancient Sci Life.**, v. 32, n. 1, p. 9-16, 2012.

JINOUS ASGARPAHAH. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 23, 2012.

Patro, R; Arruda – *Ruta graveolens*. Disponível em: <https://www.jardineiro.net/plantas/arruda-ruta-graveolens.html> Acesso: 02 set. 2012

Toriani A.L.T., **Ruta Graveolens L (arruda) O conhecimento e suas particularidades**, Faculdades Integradas “Espirita”, 2006.

NAZISH, I et al. Preliminary pharmacognostical standardisation of *Ruta graveolens* L. aerial parts. **Research Journal of Medicinal Plant.**; v. 3, n. 2, p. 41-44, 2009

MEDEIROS, K. A. et al. **O efeito toxicológico para mulheres grávidas dos metabólitos presentes na arruda e romã.** Anais IV CONAPESC, Campina Grande, 2019.

SILVA, A.C.R.D.; LOPES, P.M.; AZEVEDO, M.M.B.D.; COSTA, D.C.M.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6305-6316. 2012

COSTA, D.F.N. **Potencial imunomodulador e antimicrobiano do (+)- $\alpha$ -Pineno e (+)- $\beta$ -Pineno.** Universidade Federal da Paraíba, 2017

BERGHEUL, S. et al. Comparative study of the production of coumarins and furanocoumarins in three Ruteae species. **HAL archives-ouvertes**, v. 10, n. 2, p. 137-142, 2020.

MILESI, S. et al., *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. **Plant Science**. v. 161, n. 1, p. 189-99, 2001.

GAIA, A. M. **Metabólitos secundários e ontogenia em espécies de *Piper*.** Universidade de São Paulo, 2014.

VOGELMANN, A., TURNER, J.C., & MAHLBERG, P. Cannabinoid composition in seedlings compared to adult plants of *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 1075-1079, 1988.

DE OLIVEIRA, E. A.; LABRA, M. E.; BERMUDEZ, J. Public production of medicines in Brazil: An overview. **Cadernos de Saude Publica**, v. 22, n. 11, p. 2379–2389, 2006.

MAHIEU, N.G.; GENENBACHER, J.L.; PATTI G.J. A Roadmap for the XCMS Family of Software Solution in Metabolomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 30, p. 87-93, 2016

MUTCH, D. M. et al. Mobilization of pro-inflammatory lipids in obese *Plscr3*-deficient mice. **Genome Biology**, v. 8, n. 3, 2007.



SMITH, C.A. et al. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 779–787. 2006

COELHO, A. G.; LEAL, E. R.; DE VASCONCELOS, J. F. S. Emprego De Óleos Essenciais Como Matéria-Prima Para a Produção De Repelentes De Insetos. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 37, p. 178–182, 2019.

LIMA, R. K. .; CARDOSO, M. G. Lamiaceae Family: Important Essential Oils with Biological and Antioxidant Activity. **Revista Fitos**, v. 3, 2007.

GNATTA, J. R.; DORNELLAS, E. V.; DA SILVA, M. J. P. O uso da aromaterapia no alívio da ansiedade. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 2, p. 257–263, 2011.

SANTOS, A. S. et al. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, n. 91, p. 1–6, 2004.

Plantas Medicinais nas PICS. Revista Revise, v.05, fluxo contínuo (2020): Dossiê experiências de integração ensino serviço nas Práticas Integrativas e Complementares, p. 195-218.

PISTORE, M. et al. Avaliação do uso tópico do óleo essencial de *Ruta Graveolens* L. (Arruda) na cicatrização de feridas em ratos. **Perspectiva**, v. 38, n. 14, p. 57–68, 2014.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 573–578, 2002.

YAACOB, K. B.; ABDULLAH, C. M.; JOULAIN, D. Essential oil of *ruta graveolens* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, n. 5, p. 203–207, 1989.

MELATO, E. Development and essential oil performance of *ruta graveolens* l. Under micorrhytic inoculation and different phosphorus doses. **UNIPAR**, 2017.

EL-SHERBENY, S. E. et al. Effect of sowing date and application of foliar fertilizers on the yield and chemical composition of rue (*Ruta graveolens* L.) herb. **Herba Polonica**, v. 54, n. 1, p. 47–56, 2008.

NAHAR, L. et al. **Ruta essential oils: Composition and bioactivities**. [s.l: s.n.]. v. 26, 2021.

ORLANDA, J. F. F.; MOUCHREK, A. N. Efeito larvica do óleo essencial das folhas de *Ruta graveolens* LINNEAU no controle de *Aedes aegypti* (LINNAEU, 1762) (Diptera: Culicidae). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e115101220028, 2021.

TONCER, O.; KARAMAN, S.; DIRAZ, E. An annual variation in essential oil composition of *Origanum syriacum* from Southeast Anatolia of Turkey. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 11, p. 1059–1064, 2010.

İZGI, M. N.; TELCI, İ.; ELMASTAŞ, M. Variation in essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties cultivated in two different ecologies. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 6, p. 494–498, 2017.

CLOTTRILDA KANDOTA, E. M. Essential Oil Yield of *Corymbia citriodora* as Influenced by Harvesting Age, Seasonal Variation and Provenance at Citrifine Plantations in Northern Malawi. **Journal of Biodiversity Management & Forestry**, v. 03, n. 03, 2014.

SHIFERAW, Y. et al. Investigation of Essential Oil Composition Variation with Age of *Eucalyptus globulus* Growing in Ethiopia. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 07, n. 02, 2019.

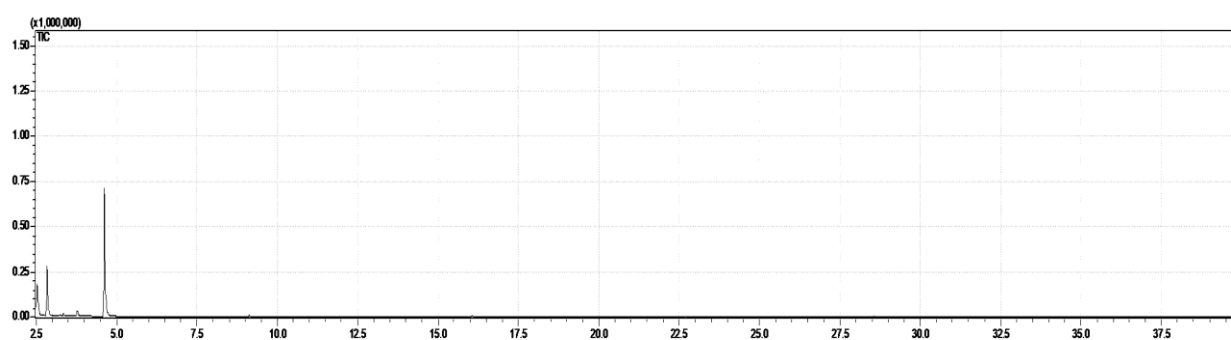
AMAZONAS, D. R. et al. High throughput mass spectrometry platform for prospecting high value chemicals from bioconversion of glycerin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2712–2720, 2019.

## APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS, ESPECTROS DE MASSA E COMPARAÇÕES COM BANCOS DE DADOS REFERENTES AO ÓLEO ESSENCIAL DE *RUTA GRAVEOLENS L.*

### A.1 SOLVENTES

Solvente AcOEt

**Figura 24.** Cromatograma da amostra de solvente acetato de etila (AcOEt)



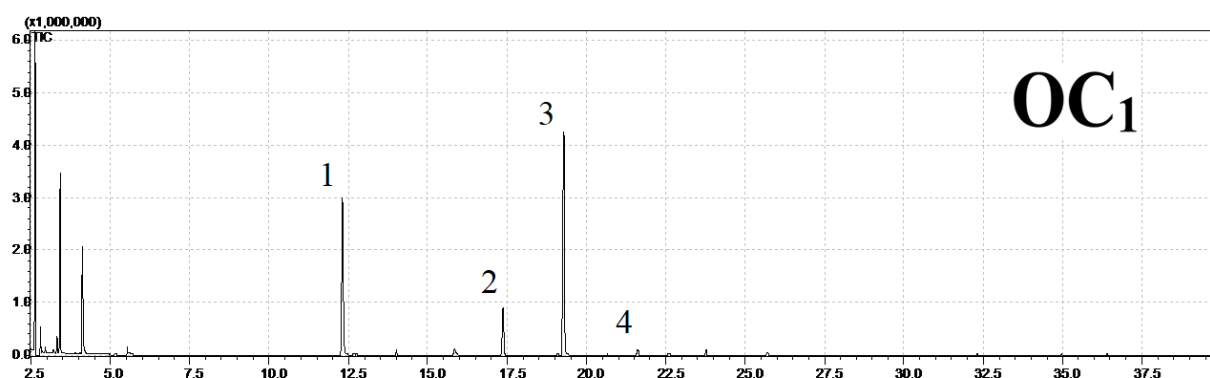
### A.2 COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL COM O BANCO DE DADOS WILEY 9TH EDITION/NIST08 STRUCTURE DATABASE (W9N08.SDB)

A.2.1 Amostras de óleo de espécimes da *Ruta graveolens L.* obtidas na Floricultura Nice, situada no bairro Cruzeiro – DF (OC).

Como as amostras do tipo OC são similares, o exemplo de comparação será realizado com a amostra OC<sub>1</sub>.

Amostra OC<sub>1</sub>

**Figura 25.** Cromatograma da amostra de origem do Cruzeiro – DF

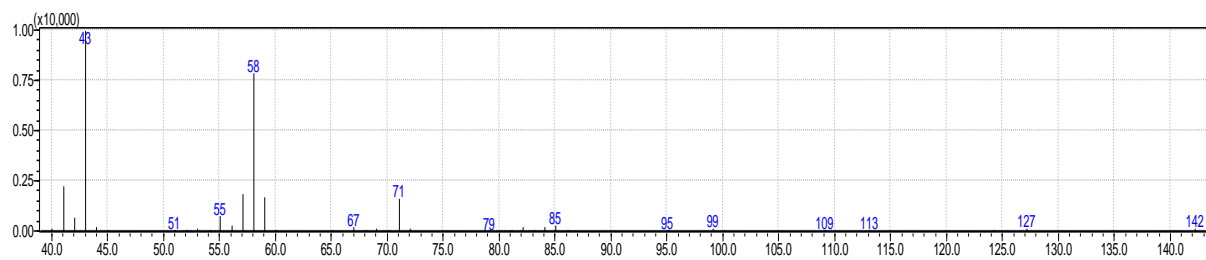


**Tabela 6.** Componentes químicos identificados a partir do óleo essencial de *Ruta Graveolens* L. do Cruzeiro.

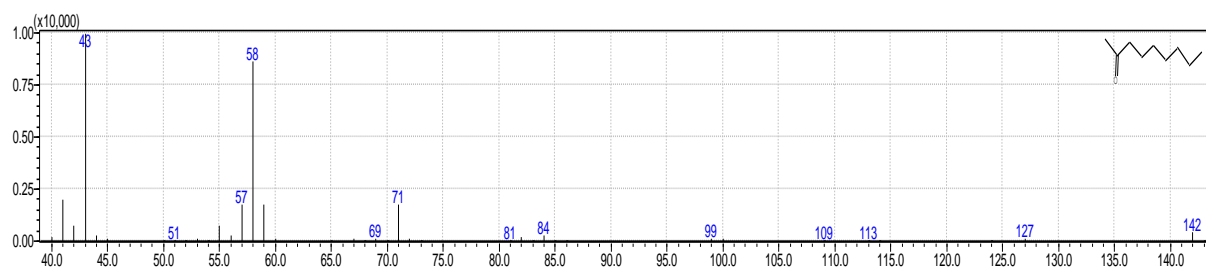
Pico	Tempo de retenção (minutos)	Nome do composto	Área do pico
1	12,310	2-Nonanona	2710963
2	17,365	Acetato de octila	981630
3	19,281	2-Undecanona	3914657
4	21,610	2-Dodecanona	80801

## 2-Nonanona

### Amostra

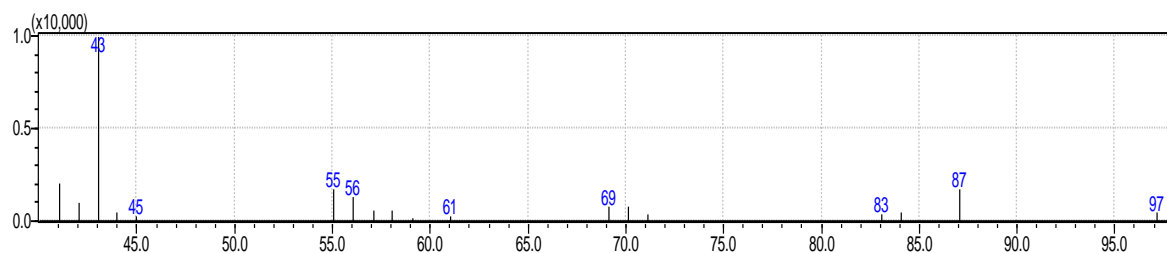


### Banco de dados

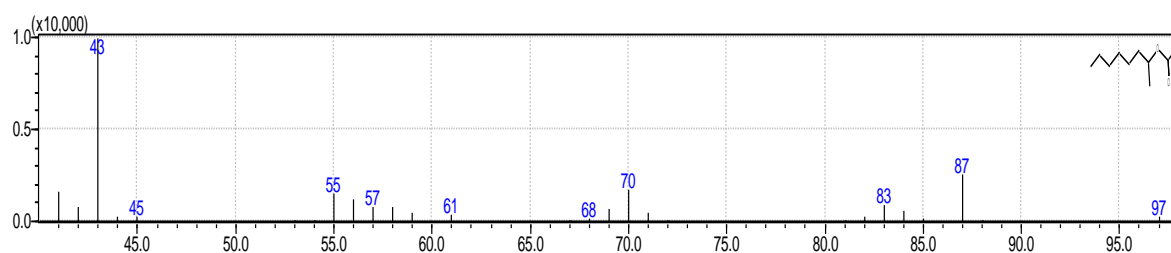


## Acetato de octila. 2-Octil acetato.

## Amostra

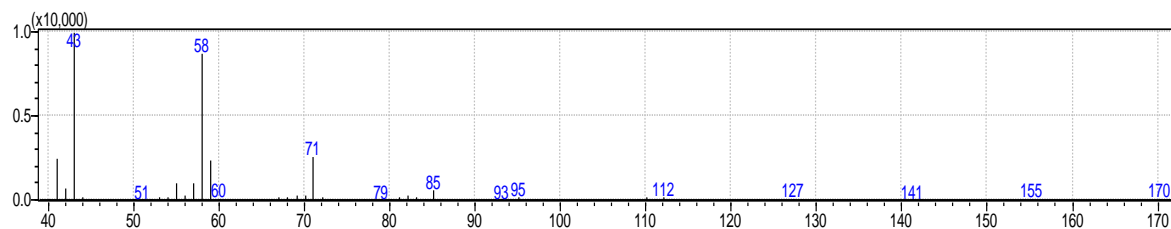


## Banco de dados

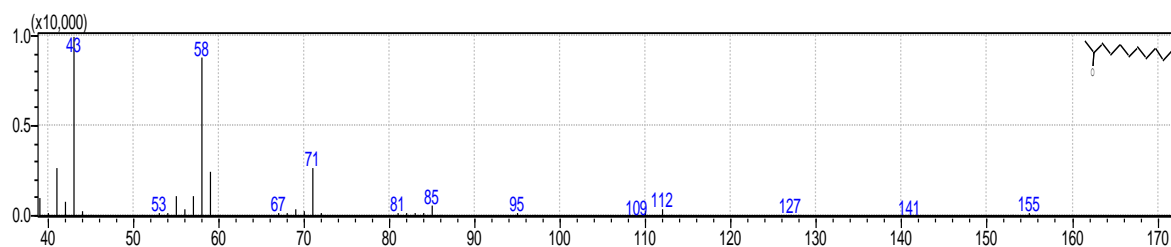


## 2-Undecanona

## Amostra

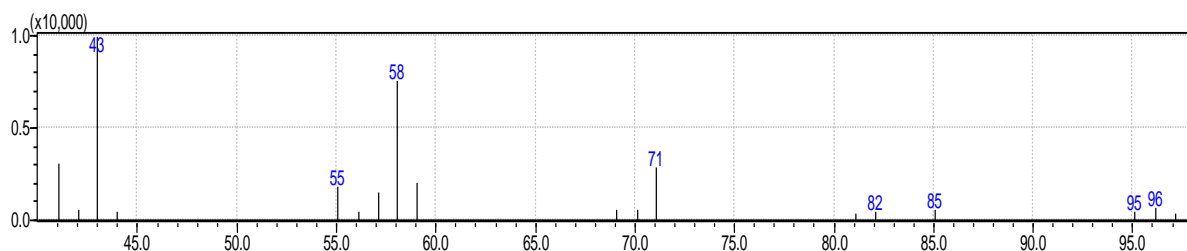


## Banco de dados

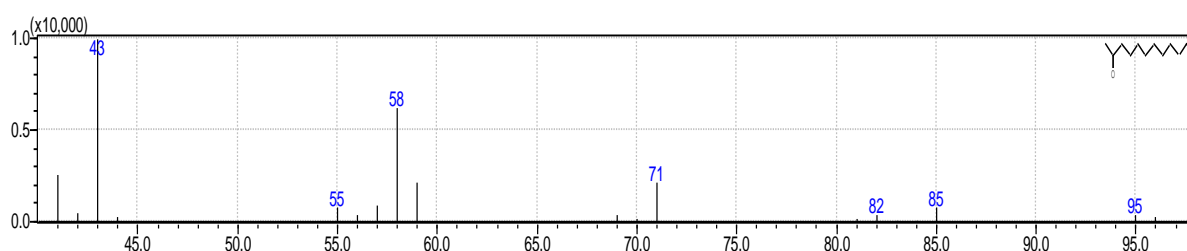


## 2-Dodecanona

## Amostra



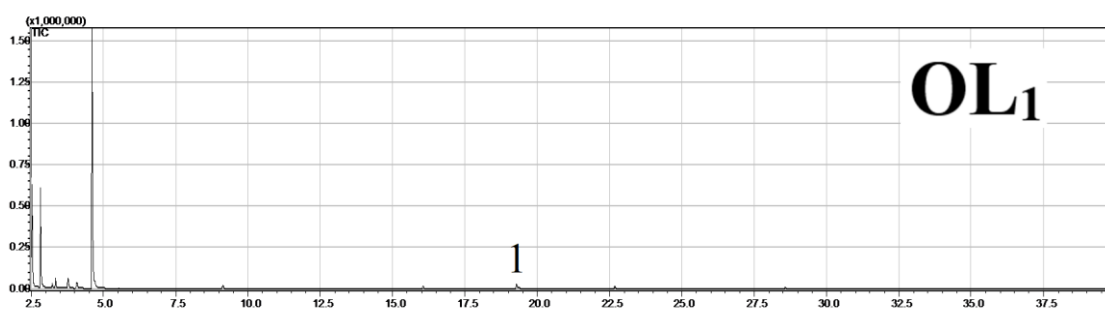
## Banco de dados



A2.2 Amostras de óleo de espécimes da *Ruta graveolens* L. obtidas na Leroy Merlin do Park Sul – DF (OL).

As amostras OL1 e OL3 são similares, o exemplo de comparação será realizado com a amostra OL<sub>1</sub>.

**Figura 26.** Cromatograma de origem da Leroy Merlin (OL<sub>1</sub>).

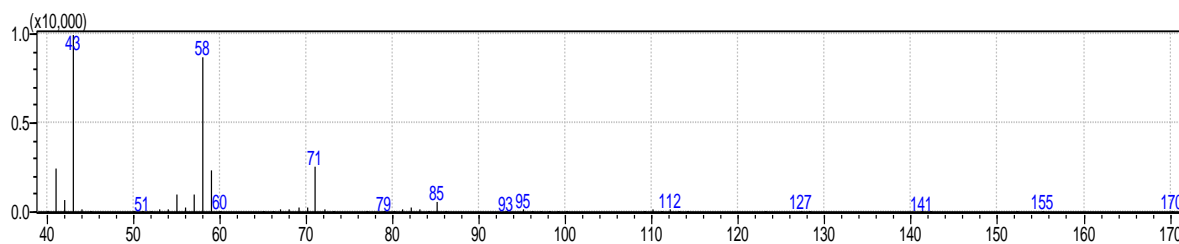


**Tabela 7.** Componentes químicos identificados a partir do óleo essencial de *Ruta Graveolens* L. da amostra OL<sub>1</sub> da Leroy Merlin.

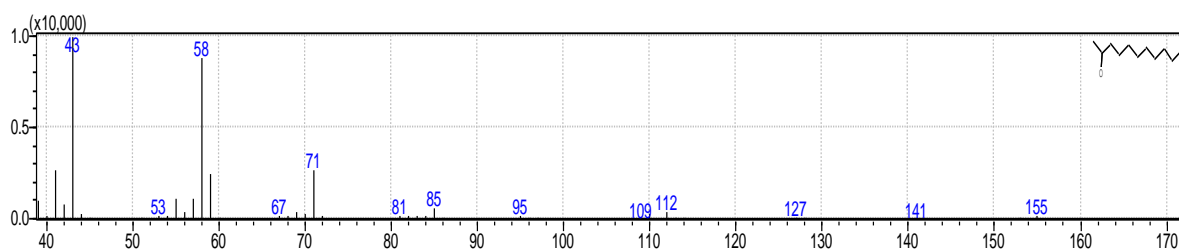
Pico	Tempo de retenção (minutos)	Nome do composto	Área do pico
1	19,291	2-Undecanona	48012

## 2-Undecanona

## Amostra

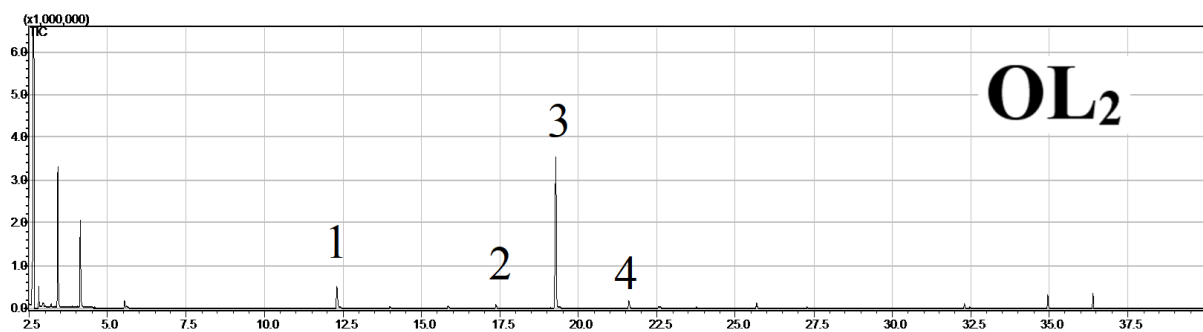


## Banco de dados



A amostra OL<sub>2</sub> é diferente das outras duas amostras do mesmo grupo, será realizada uma comparação apenas para essa réplica.

**Figura 27.** Cromatograma de origem da Leroy Merlin (OL<sub>2</sub>).

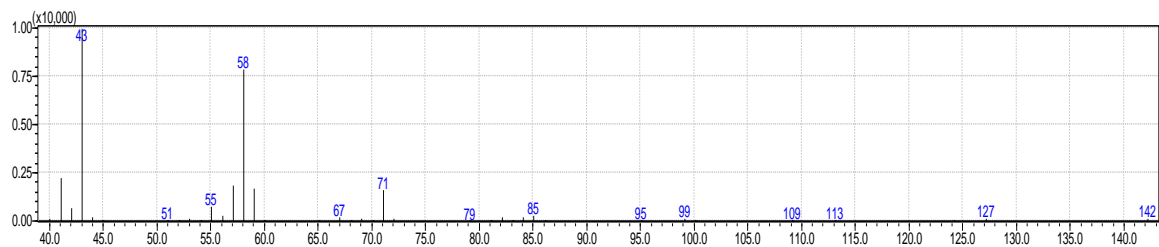


**Tabela 8.** Componentes químicos identificados a partir do óleo essencial de *Ruta Graveolens* L. da amostra OL<sub>2</sub> da Leroy Merlin

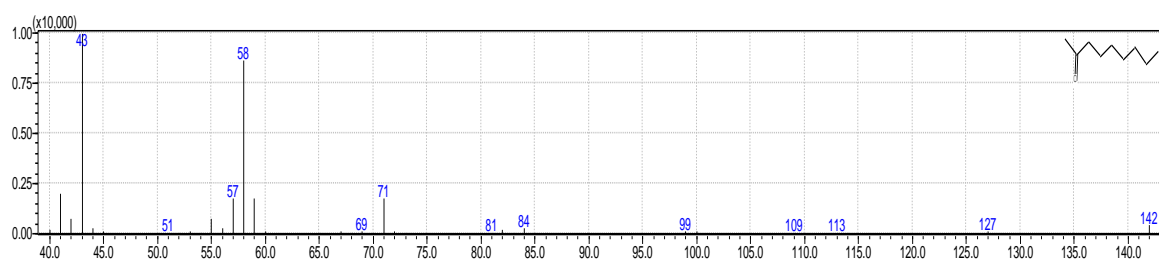
Pico	Tempo de retenção (minutos)	Nome do composto	Área do pico
1	12,309	2-Nonanona	480581
2	17,368	Acetato de octila	89935
3	19,274	2-Undecanona	2943418
4	21,606	2-Dodecanona	126536

## 2-Nonanona

## Amostra

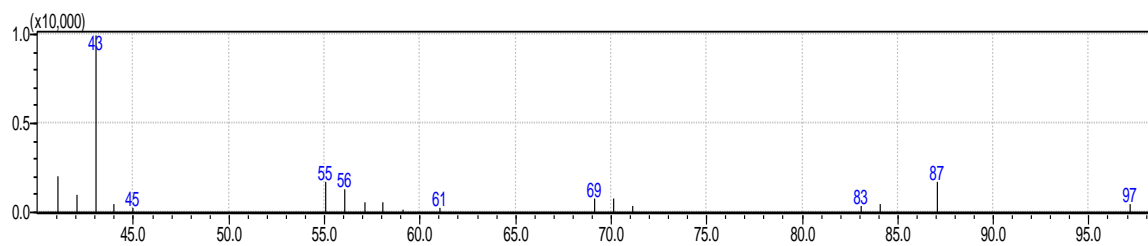


## Banco de dados

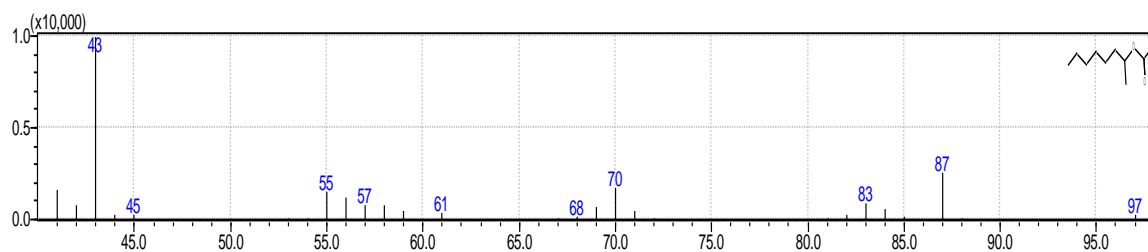


## Acetato de octila. 2-Octil acetato.

## Amostra



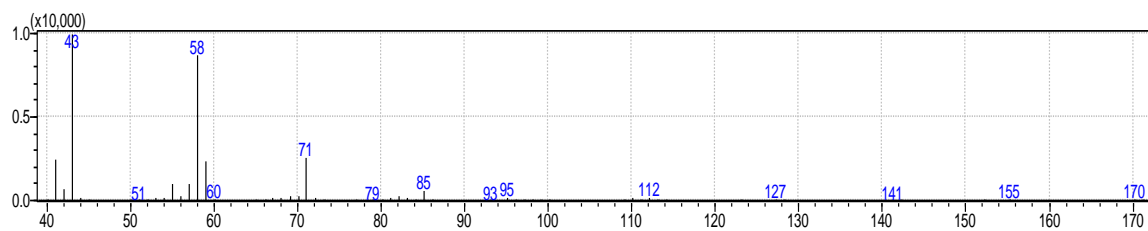
## Banco de dados



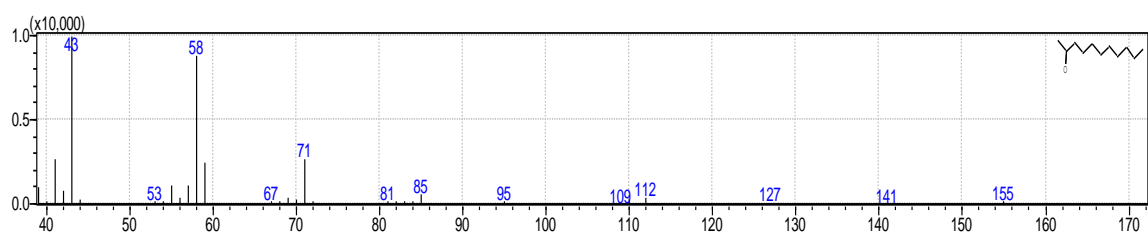


## 2-Undecanona

Amostra

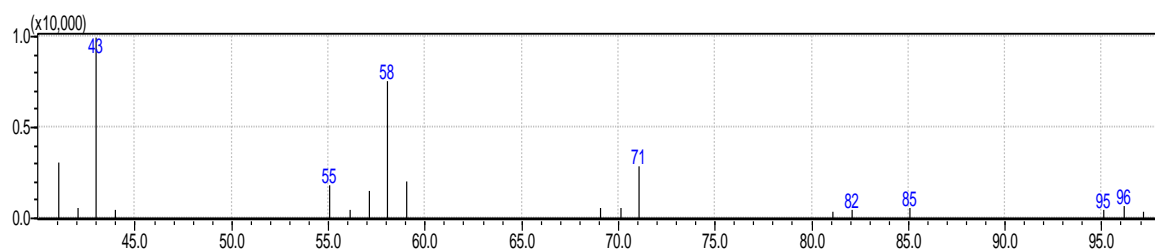


Banco de dados

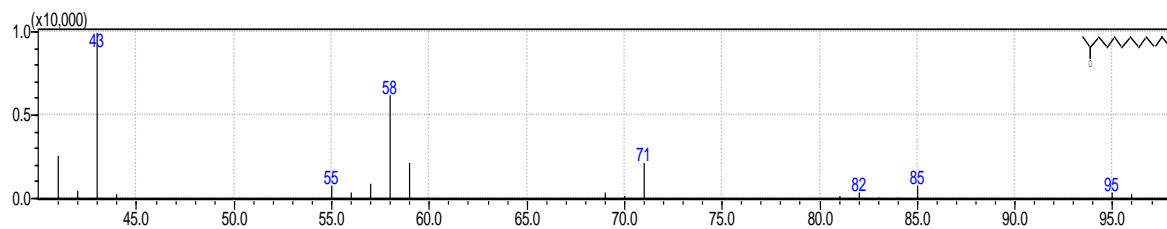


## 2-Dodecanona

Amostra

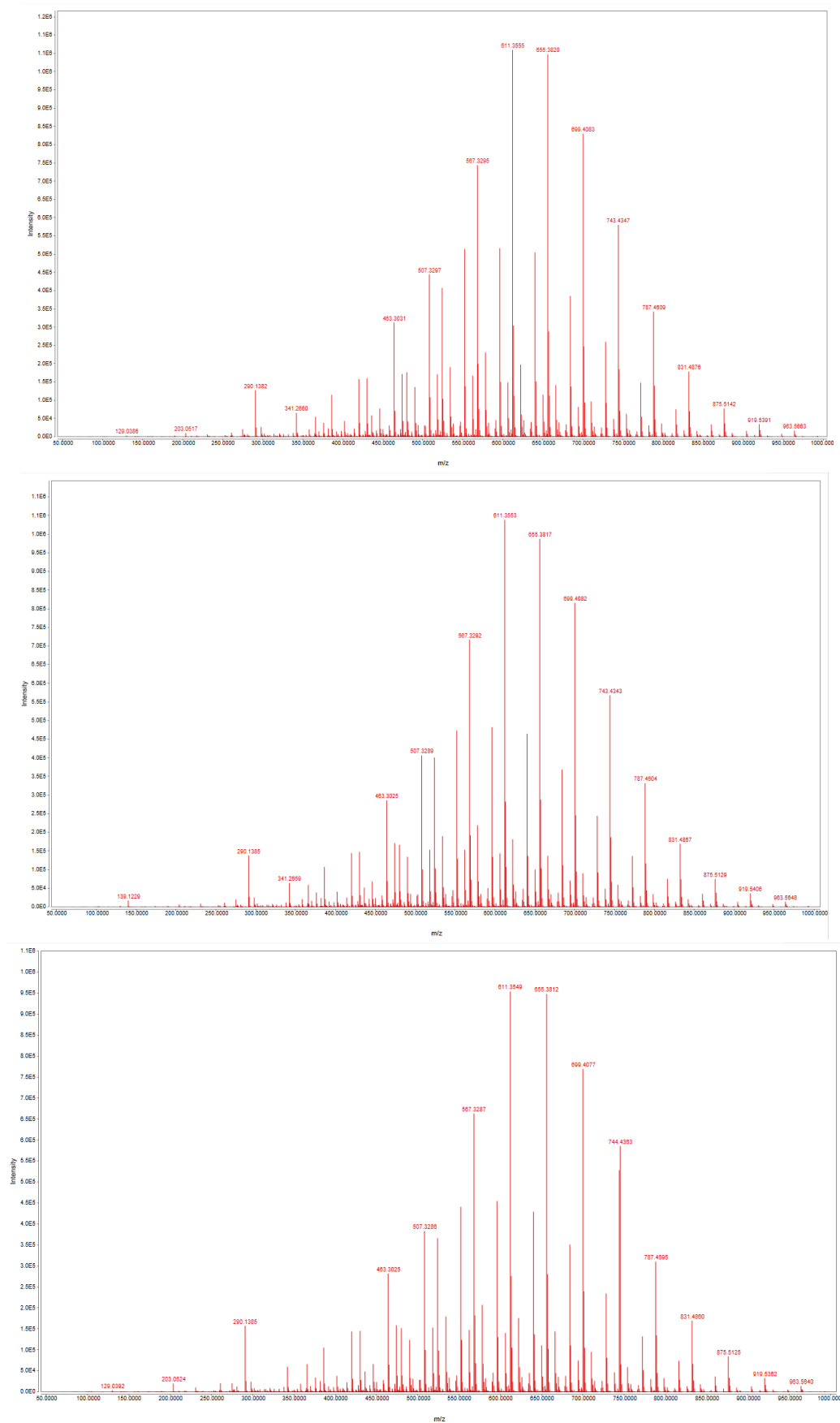


Banco de dados

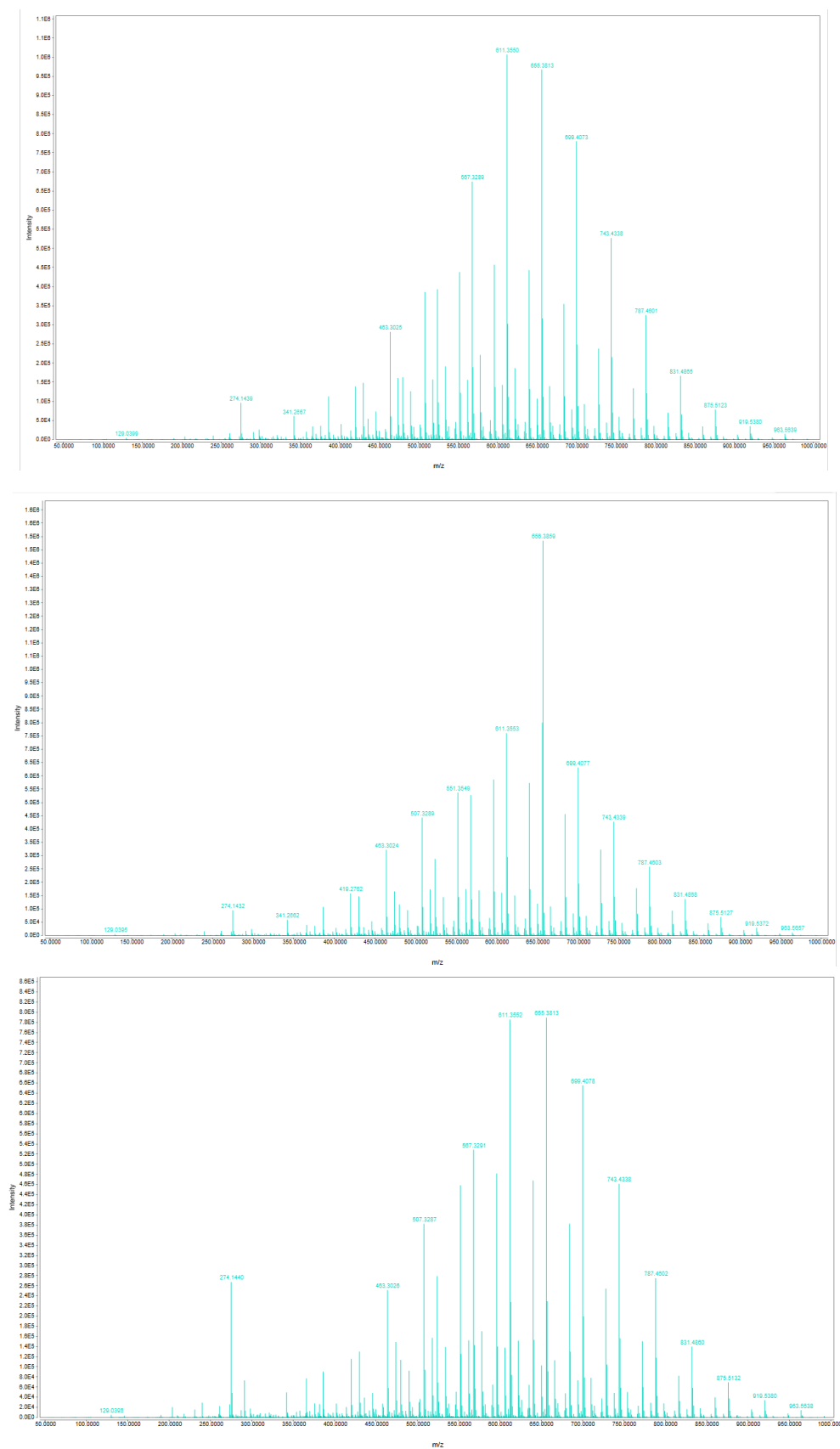




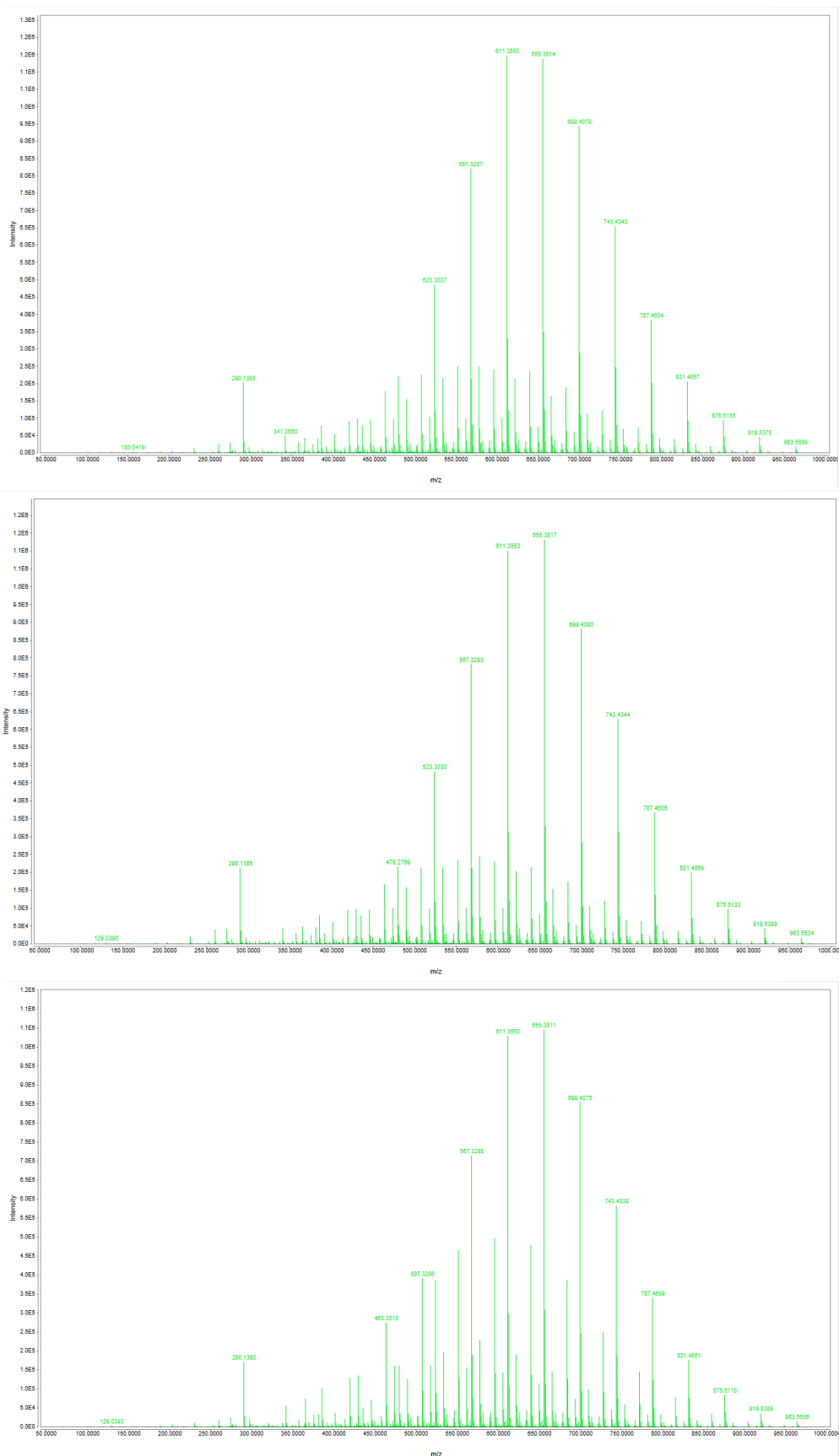
**Figura 30.** Espectros de massas das réplicas das amostras de *Ruta graveolens* L. adquiridas no Cruzeiro – DF. (réplicas 1,2 e 3 na ordem)



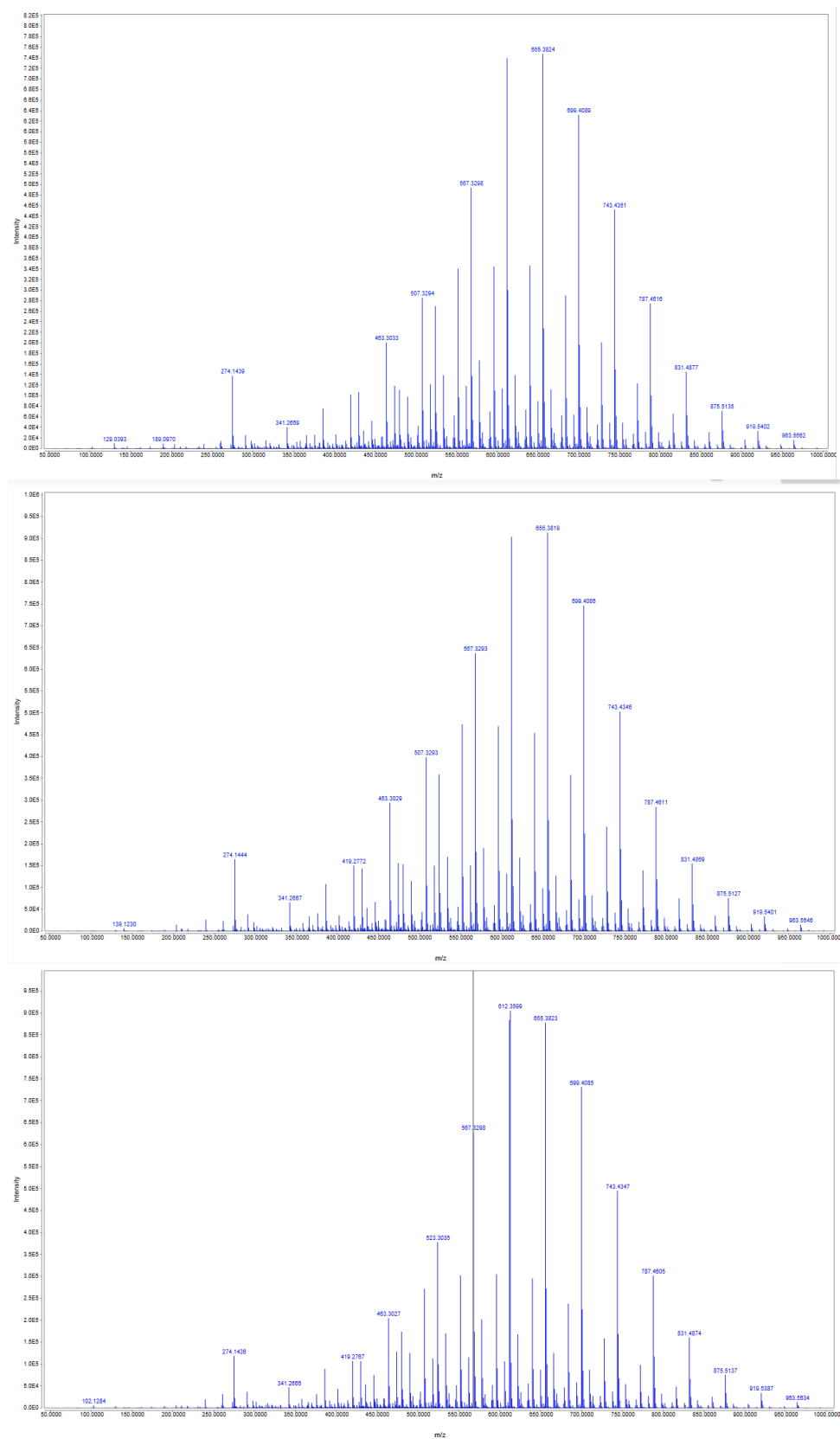
**Figura 31.** Espectros de massas das réplicas das amostras de espécimes de *Ruta graveolens* L. com 4 semanas de idade cultivadas ao ar livre (réplicas 1,2 e 3 na ordem)



**Figura 32.** Espectros de massas das réplicas das amostras de espécimes de *Ruta graveolens* L. adquiridas na Leroy Merlin, da marca Veiling Hollambra. (réplicas 1,2 e 3 na ordem)



**Figura 33.** Espectros de massas das réplicas das amostras de espécimes de *Ruta graveolens* L. com 12 semanas de idade cultivadas em ambiente controlado em incubadora BOD. (réplicas 1,2 e 3 na ordem)



**Figura 34.** Espectros de massas das réplicas das amostras de espécimes de *Ruta graveolens* L. com 8 semanas de idade cultivadas ao ar livre. (réplicas 1,2 e 3 na ordem)

