

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO HEADSPACE APLICADA AO  
ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS DE PLANTAS INFESTADAS POR  
GALHAS FOLIARES ENTOMÓGENAS**

FLAVIANA CARDOSO DAMASCENO

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, agosto de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FLAVIANA CARDOSO DAMASCENO

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO HEADSPACE APLICADA AO  
ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS DE PLANTAS INFESTADAS POR  
GALHAS FOLIARES ENTOMÓGENAS**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre  
em Química

Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini  
Orientadora

Porto Alegre, agosto de 2007.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre setembro de 2004 e agosto de 2007, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Cláudia Alcaraz Zini. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão examinadora:**

---

Prof. Dr. João Henrique Z. dos Santos  
(IQ – UFRGS)

---

Prof. Dr. Geraldo Luiz G. Soares  
(IB – UFRGS)

---

Profa. Dra. Maria do Carmo R. Peralba  
(IQ – UFRGS)

---

Profa. Dra. Maria Regina A. Rodrigues  
(IQ – UFPel)

---

Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini  
Orientadora

---

Flaviana Cardoso Damasceno

É melhor tentar e falhar do que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

M. Luther King.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus, pelo mais belo presente, a vida, e por estar comigo em toda a minha jornada, dando-me força, quando em mim já não havia.

A todos aqueles, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a execução desta importante etapa na minha vida.

E alguns agradecimentos especiais:

Aos meus queridos pais, Aldo e Leira, pelo incentivo, confiança e amor incondicional, exemplos de coragem e perseverança, e a minha irmã Elaine e sobrinha Caroline, que são presentes de Deus na minha vida.

A professora e orientadora Cláudia Zini, grande profissional e exemplo de dedicação, pelo incentivo, paciência e convivência enriquecedora, por ter me mostrando o caminho, fornecendo as bases essenciais para a concretização deste trabalho.

A professora Dr. Maria Regina Rodrigues (UFPel) pela amizade, estímulo e impulso inicial nessa jornada, por ter me apresentado ao lindo e perfumado mundo dos óleos essenciais.

A professora Dr. Elina Caramão (UFRGS) por ter tornado possível a realização de um dos meus sonhos.

Ao professor Dr. Geraldo Soares (UFRGS) pela importante colaboração no processo de coleta e identificação das plantas usadas nesse trabalho, além de sua prestimosa contribuição bibliográfica e valorosos comentários.

Ao professor Dr. Nelson Matzenbacher pela ajuda no processo de localização, coleta e identificação da *S. polygamus*.

Aos meus amigos Silvana Moraes e Marcelo Migliorini, pelas boas risadas, por terem me oferecido apoio, incentivo, paciência e compreensão, por terem vivido comigo meus problemas e dividido minhas dificuldades.

As amigas Laíza Krause, Kátia Castagno e Luiza Luz pelo apoio e amizade oferecidos e por terem me recebido com tanto carinho.

A minha amiga de longa estrada Márcia Silva, por continuar sendo minha verdadeira amiga mesmo em minha “ausência”.

A todos os colegas do LAAO pela simpatia, gentileza e colaboração oferecidas.

Aos colegas e amigos Rogério Petersen e Patrícia Schossler pelos auxílios e trocas de conhecimentos, fundamentais ao sucesso de todos.

A graduanda Karine Nicole, pela ajuda valorosa e fundamental no desenvolvimento desse projeto, pois sem toda a sua dedicação esta caminhada teria sido muito mais árdua.

Aos colegas Márcia Brasil, Diego Wunsch, Guilherme Schneider e Rafael Soares por tantos “galhos quebrados”.

A CAPES e FAPERGS pelas bolsas de estudo.

A SUPELCO (EUA) pelas fibras doadas, que tornaram possível a realização desse trabalho.

# SUMÁRIO

	Pág.
DECLARAÇÃO DE AUTORIA E ORIENTAÇÃO.....	II
DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
SUMÁRIO.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XIII
ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
I INTRODUÇÃO.....	1
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1 Óleos voláteis.....	5
2 Galhas ou cecídeas.....	7
3 Características do gênero <i>Schinus</i> .....	9
4 Características do gênero <i>Baccharis</i> .....	11
5 Infoquímicos (aleloquímicos).....	14
6 Técnicas de extração de compostos voláteis de plantas.....	15
6.1 Hidrodestilação.....	15
6.2 Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> (HS-SPME).....	16
6.2.1 Princípios básicos de absorção aplicados a SPME.....	17
6.2.2 Princípios básicos de adsorção aplicados a SPME.....	19
6.2.3 Características dos revestimentos poliméricos.....	21
7 Objetivo geral.....	25

8	Objetivos específicos.....	25
III	PARTE EXPERIMENTAL.....	26
1	Materiais empregados.....	27
2	Coleta e preparo do material.....	27
3	Hidrodestilação.....	28
4	Microextração em fase sólida.....	30
4.1	Escolha do filme polimérico.....	30
4.2	Microextração em fase sólida dos voláteis de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	31
5	Determinação dos índices de retenção dos componentes voláteis do óleo hidrodestilado e dos voláteis do <i>headspace</i> de folhas e galhas de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	32
6	Análises por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/qMS).....	33
IV	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
1	Hidrodestilação com clevenger.....	36
1.1	<i>Schinus polygamus</i> .....	36
1.2	<i>Baccharis spicata</i> .....	45
2	Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> dos compostos voláteis de folhas e galhas de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	49
2.1	Escolha da melhor fibra para extração dos voláteis de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	49
2.2	Compostos voláteis extraídos das folhas e galhas de <i>Schinus polygamus</i> .....	54
2.3	Compostos voláteis extraídos das folhas e galhas de <i>Baccharis spicata</i> .....	63



3	Considerações sobre a importância químico-ecológica de alguns compostos detectados nas galhas de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	70
4	Resumo dos resultados obtidos neste trabalho.....	74
V	CONCLUSÕES.....	78
VI	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	ANEXOS.....	90
	Anexo A – Figuras.....	91
	Anexo B – Publicações.....	101

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema da rota biossintética dos compostos terpenóides em plantas.....	6
Figura 2. Espécime de <i>Schinus polygamus</i> .....	10
Figura 3. Folhas (A) e galhas (B) de <i>Baccharis spicata</i> .....	13
Figura 4. Esquema representativo de um corte de filme poroso.....	20
Figura 5. Esquema representativo da classificação dos revestimentos poliméricos comerciais para SPME.....	22
Figura 6. Fórmulas estruturais dos polímeros presentes nos revestimentos poliméricos.....	23
Figura 7. Extrator Clevenger utilizado para hidrodestilação das folhas de <i>Schinus polygamus</i> , <i>Baccharis spicata</i> e <i>Eugenia uniflora</i> .....	29
Figura 8. Procedimento de preparação da amostra, extração e dessorção dos voláteis presentes nas folhas de <i>Eugenia uniflora</i> e folhas e galhas de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	30
Figura 9. Foto de amostras representativas de folhas e galhas de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	32
Figura 10. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas sadias de <i>Schinus polygamus</i> coletadas em Guaíba.....	43
Figura 11. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas sadias de <i>Schinus polygamus</i> coletadas em Viamão.....	43
Figura 12. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas sadias de <i>Schinus polygamus</i> coletadas em Porto Alegre.....	44

Figura 13.	Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação dos frutos de <i>Schinus polygamus</i> coletados em Porto Alegre.....	45
Figura 14.	Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas de <i>Baccharis spicata</i> coletadas em Porto Alegre.....	48
Figura 15.	Representação da média das áreas normalizadas dos quatro compostos voláteis monitorados na fase gasosa de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> , os quais foram extraídos com nove tipos de filmes poliméricos.....	50
Figura 16.	Cromatogramas (GC-FID) mostrando comparação dos resultados obtidos após extração do <i>headspace</i> de folhas picadas de <i>Eugenia uniflora</i> com as fibras 16A. PDMS 7 $\mu\text{m}$ , 16B. PDMS 30 $\mu\text{m}$ , 16C. PDMS 100 $\mu\text{m}$ , 16D. PA 85 $\mu\text{m}$ , 16E. CW(PEG) 60 $\mu\text{m}$ , 16F. CAR-PDMS 85 $\mu\text{m}$ , 16G. PDMS-DVB 65 $\mu\text{m}$ , 16H. DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex e 16I. DVB-CAR-PDMS 50/30 metal	51
Figura 17.	Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no <i>headspace</i> das folhas saudáveis de <i>Schinus polygamus</i> coletadas em Porto Alegre.....	56
Figura 18.	Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no <i>headspace</i> das galhas de <i>Schinus polygamus</i> , coletadas em Porto Alegre.....	57
Figura 19.	Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no <i>headspace</i> da parte saudável das folhas galhadas de <i>Schinus polygamus</i> coletadas em Porto Alegre.....	58
Figura 20.	Cromatogramas de corrente iônica total mostrando compostos majoritários presentes em amostras de <i>Schinus polygamus</i> .....	60
Figura 21.	Cromatogramas de corrente iônica total para verificar possível contaminação laboratorial das amostras de <i>Schinus polygamus</i> com solventes orgânicos.....	62

Figura 22.	Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no <i>headspace</i> das folhas de <i>Baccharis spicata</i> coletadas em Porto Alegre.....	65
Figura 23.	Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no <i>headspace</i> das galhadas de <i>Baccharis spicata</i> coletadas em Porto Alegre.....	66
Figura 24.	Cromatogramas de corrente iônica total, mostrando compostos majoritários presentes em amostras de <i>Baccharis spicata</i> .....	67
Figura A1	Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos monoterpênicos e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e <i>headspace</i> (HS-SPME) da <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	92
Figura A2	Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos monoterpênicos oxigenados e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e <i>headspace</i> (HS-SPME) de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	93
Figura A3	Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e <i>headspace</i> (HS-SPME) de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	94
Figura A4	Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e <i>headspace</i> (HS-SPME) de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	95
Figura A5	Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e <i>headspace</i> (HS-SPME) de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	96

Figura A6	Fórmulas estruturais de alguns sesquiterpenos oxigenados e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e <i>headspace</i> (HS-SPME) de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	97
Figura A7	Fórmulas estruturais de alguns sesquiterpenos oxigenados e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e <i>headspace</i> (HS-SPME) de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	98
Figura A8	Fórmulas estruturais de compostos de vários grupos funcionais e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e <i>headspace</i> (HS-SPME) de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	99
Figura A9	Fórmulas estruturais de compostos de vários grupos funcionais e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e <i>headspace</i> (HS-SPME) de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	100

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
Tabela I. Condições experimentais empregadas durante a extração de alcanos lineares, utilizando-se HS-SPME.....	33
Tabela II. Condições operacionais para separação cromatográfica dos compostos presentes no óleo essencial de <i>Schinus polygamus</i> e <i>Baccharis spicata</i> .....	34
Tabela III. Rendimentos (m/m) obtidos na hidrodestilação de folhas e frutos de <i>Schinus polygamus</i> .....	37
Tabela IV. Identificação tentativa e análise quantitativa dos compostos de vários óleos voláteis de <i>Schinus polygamus</i> .....	38
Tabela V. Comparação da composição (%) dos óleos essenciais de folhas e frutos de <i>Schinus polygamus</i> coletados em Porto Alegre (Brasil), com a composição de um óleo essencial chileno e outro argentino de plantas da mesma espécie.....	40
Tabela VI. Identificação tentativa e análise quantitativa dos compostos do óleo volátil das folhas de <i>Baccharis spicata</i> .....	46
Tabela VII. Diferenças qualitativas (identificação tentativa) e quantitativas encontradas nos cromatogramas provenientes da extração por HS-SPME dos voláteis das folhas sadias, galhas, partes sadias das folhas galhadas e óleo hidrodestilado de <i>Schinus polygamus</i> .....	54
Tabela VIII. Diferenças qualitativas (identificação tentativa) e quantitativas encontradas nos cromatogramas provenientes da extração por HS-SPME dos voláteis das folhas e galhas e do óleo hidrodestilado de <i>Baccharis spicata</i> .....	64

## ABREVIATURAS

CAR-PDMS	Carboxen-Polidimetilsiloxano
CW-DVB	Carbowax-Divinilbenzeno
CW(PEG)	Carbowax (Polietileno Glicol)
DVB-CAR-PDMS	Divinilbenzeno-Carboxen-Polidimetilsiloxano
DMADP	Dimetilalil difosfato (do inglês “ <i>Dimethylallyl Diphosphate</i> ”)
FDP	Farnesil difosfato (do inglês “ <i>Farnesyl Diphosphate</i> ”)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês “ <i>Gas Chromatography</i> ”)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (do inglês “ <i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i> ”)
GC/qMS	Cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrômetro de massas quadrupolar (do inglês “ <i>Gas Chromatography – Quadrupole Mass Spectrometry</i> ”)
GDP	Geranil difosfato (do inglês “ <i>Geranyl Diphosphate</i> ”)
HD	Hidrodestilação
HS	<i>Headspace</i> ou espaço confinado, que é definido como sendo constituído de compostos voláteis contidos na fase de vapor sobre uma solução em equilíbrio, mantida em ambiente fechado.
HS-SPME	Microextração em fase sólida no modo <i>headspace</i> (do inglês “ <i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> ”)
IDP	Isopentenil difosfato (do inglês “ <i>Isopentenyl Diphosphate</i> ”)
LTPRI	Índices de Retenção com Programação Linear de Temperatura (do inglês “ <i>Linear Temperature Programmed Retention Index</i> ”)
MAE-HS-SDME	Microextração no modo <i>headspace</i> em gota suspensa de solvente assistida por microondas (do inglês “ <i>Microwave-Assisted Extraction followed by Headspace Single-Drop Microextraction</i> ”)

MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (do inglês “ <i>2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate</i> ”)
m/m	massa/massa
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno
ppb	parte por bilhão
SFE	Extração com fluido supercrítico (do inglês “ <i>Supercritical Fluid Extraction</i> ”)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês “ <i>Solid-Phase MicroExtraction</i> ”)
SWE	Extração com água quente superaquecida (do inglês “ <i>Superheated Water Extraction</i> ”)
TLC	Cromatografia em camada delgada (do inglês “ <i>Thin-Layer Chromamatography</i> ”)
VOC	Compostos orgânicos voláteis (do inglês “ <i>Volatile Organic Compounds</i> ”)
v/v	volume/volume



## RESUMO

Neste trabalho foi verificada a eficiência da HS-SPME associada à GC/qMS como ferramenta capaz de detectar alterações no perfil de compostos voláteis de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*. Estas alterações são provocadas por insetos herbívoros (cecidógenos) que utilizam as folhas destas plantas como local para se alimentarem e se reproduzirem e, como consequência, produzem alterações no tecido vegetal (galhas). Para este propósito foi usado, como fase extratora, o filme polimérico DVB-CAR-PDMS, que apresenta alta capacidade de extração.

Na *S. polygamus*, tanto folhas saudias, como galhas apresentaram grande quantidade de n-heptano (> 38,2 %) e n-nonano (> 24,4 %), sendo que este não foi detectado no óleo hidrodestilado de folhas da mesma amostra. Nas galhas também foi constatada a presença de alguns mono- e sesquiterpenos não detectados nas folhas, sendo o  $\alpha$ -pineno (17,6 %), um dos compostos majoritários. Foi também observado um acréscimo significativo na concentração do limoneno.

Os compostos majoritários no *headspace* das folhas de *B. spicata* foram: 1-undeceno (17,8 %), limoneno (15,3 %),  $\beta$ -pineno (13,5 %), (*E*)-cariofileno (12,8 %) e  $\gamma$ -muroleno (11,4 %), enquanto que nas galhas, os compostos majoritários foram o  $\alpha$ -pineno (40,9 %) e o limoneno (19,1 %). O 1-undeceno não foi detectado no óleo hidrodestilado de folhas desta planta, enquanto que o espatulenol foi o composto majoritário deste óleo (34,3%), encontrando-se em baixas concentrações nos voláteis extraídos por HS-SPME.

As diferenças constatadas na composição dos VOC de folhas e galhas nas espécies *S. polygamus* e *B. spicata* podem ser um fator indicativo de que a presença do cecidógeno estimula a biossíntese de alguns compostos, que podem apresentar algum tipo de função infoquímica. Evidências de diferenças qualitativas entre o óleo hidrodestilado das folhas saudias e o perfil dos compostos voláteis do *headspace* das mesmas também são um indicativo de que o emprego de temperaturas amenas na HS-SPME propicia a obtenção de um perfil de compostos voláteis mais próximo daquele da planta *in vivo*. O acesso a estas diferenças (qualitativas e quantitativas) só foi possível através do emprego da HS-SPME, o que evidencia o potencial desta técnica como ferramenta investigativa para compostos infoquímicos, abrindo horizontes para futuras pesquisas.

## ABSTRACT

HS-SPME coupled to GC/qMS was employed in this work as an efficient tool to verify differences in the volatile compounds composition of *Schinus polygamus* and *Baccharis spicata* leaves and galls. Plant volatile composition may be changed when herbivore insects (cecidógenos) use leaves as a site for reproduction and for feeding purposes. The action of those insects may resulting changes in plant tissue, which are called galls. The triple layer DVB-CAR-PDMS fiber was employed as sorbing phase, in order to achieve high efficiency in the extraction process.

Galled and ungalled *S. polygamus* leaves presented high amount of n-heptane (> 38,2 %) and n-nonane (> 24,4 %), while n-heptane was not detected in the hydrodistilled oil of leaves of the same sample. The presence of  $\alpha$ -pinene was observed only in galls, along with some other mono- and sesquiterpenes. Also, the amount of limonene was higher in galls than in ungalled leaves.

Major compounds in the *headspace* of *B. spicata* leaves were: 1-undecene (17,8 %), limonene (15,3 %),  $\beta$ -pinene (13,5 %), (*E*)-caryophyllene (12,8 %) e  $\gamma$ -muurolene (11,4 %), while in galls  $\alpha$ -pinene (40,9 %) and limonene (19,1 %) were present in higher concentrations. One-undecene was not detected in the hydrodistilled oil of the leaves of this plant and spathulenol was the major compound of this oil (34,3%), being present in low concentrations in the chromatographic profile of HS-SPME.

Differences found in the VOC composition of galls and ungalled leaves of *S. polygamus* e *B. spicata* may be an evidence of the cecidogene presence, which might stimulate the biosynthesis of some infochemical compounds. Qualitative differences between hydrodistilled oil and headspace chromatographic profile of the same sample indicates that HS-SPME mild temperatures provide a volatile compounds profile closer to that of *in vivo* plant. Approaching qualitative and quantitative differences in plant volatile compounds profile was made possible only through the use of HS-SPME. This fact highlights the potential of this technique as a research tool for infochemical compounds studies, and opens new horizons for future investigations of distinct plants.

*CAPÍTULO I*  
*INTRODUÇÃO*



Nos últimos anos vem crescendo a idéia do uso da Química de forma menos agressiva ao meio ambiente. Os Químicos Analíticos tentam se adaptar a estas tendências, reduzindo o uso de solventes orgânicos e utilizando métodos de preparo de amostras mais simplificados e miniaturizados.<sup>1;2</sup> Esta proposta, além de minimizar efeitos prejudiciais ao meio ambiente e ao analista, reduz etapas da análise.<sup>2</sup> Um exemplo prático desta tendência é o emprego da técnica de Microextração em Fase Sólida (SPME do inglês “*Solid-Phase MicroExtraction*”).

Na extração de óleos voláteis, quando o objetivo é obter uma composição mais próxima daquela da planta *in vivo*, torna-se necessário eliminar temperaturas elevadas que possam provocar eventual degradação de alguns compostos.<sup>3</sup> A SPME é uma técnica que supre estas necessidades, por isso é bastante usada na extração de voláteis de plantas,<sup>4</sup> e apresenta como vantagem<sup>5-9</sup> ser simples, rápida, sensível, seletiva, não utilizar solventes, descartar a etapa de pré-concentração e empregar temperaturas baixas.<sup>2;10</sup>

As substâncias voláteis de plantas, conhecidas por suas propriedades farmacêuticas,<sup>11</sup> também despertam atenção por sua função ecológica,<sup>12</sup> que envolve as implicações de sua liberação nas relações entre os seres vivos e com o meio ambiente em que vivem.<sup>13</sup> Esta importância ecológica pode estar relacionada à capacidade de defesa da planta contra herbívoros e organismos patogênicos e à sua capacidade de competir com outras espécies vegetais (alelopatia). No entanto, nem sempre os voláteis atuam como substâncias defensivas que favorecem a espécie vegetal que os produz, pois eles também podem agir como estimulantes para a alimentação e reprodução de insetos herbívoros. Por outro lado, as substâncias voláteis podem constituir-se em um sinal químico com efeito atrativo para polinizadores, para animais dispersores de frutos, assim com um sinal para predadores de herbívoros.<sup>12</sup> A investigação da existência e função de substâncias que apresentam tais características pode resultar no uso posterior das mesmas como defensivos agrícolas ou florestais, apresentando vantagem de um menor impacto ambiental.<sup>14-18</sup>

Um dos processos que pode gerar resposta da planta por meio de alterações na composição dos voláteis das mesmas está relacionado ao ataque de insetos indutores de galhas (cecidógenos). As galhas, também denominadas de cecídias, são tumores vegetais originados por alterações morfológicas e fisiológicas no tecido vegetal, provocadas por um organismo indutor.<sup>19</sup>

Entre as plantas nativas do Rio Grande do Sul que sofrem a ação de galhadores estão a *Schinus polygamus* Cav. (Cabr.) (Anacardiaceae) e a *Baccharis spicata* (Lam.) Baillon (Asteraceae). A *S. polygamus*, popularmente conhecida como “assoviadeira”, é um arbusto resistente, sempre verde, mede de 1 a 3 m, apresenta ramos terminados em espinhos, se multiplica por sementes<sup>20</sup> e apresenta galhas foliares do tipo cônicas. A *B. spicata*, cujo nome vulgar é “vassoura-da-folha-estreita”, é um arbusto com cerca de 0,80 a 1,50 m de altura, com ramos pilosos e sulcados<sup>21</sup> e apresenta galhas foliares do tipo legume.<sup>22</sup> Embora estas duas espécies nativas sejam empregadas na medicina popular, não existe qualquer estudo sobre o óleo volátil da *B. spicata* e, nenhum trabalho que mostre o perfil cromatográfico de *S. polygamus* brasileira.

Tendo em vista as características favoráveis inerentes à SPME para extração de compostos voláteis, a ausência de estudos relacionados à alteração da composição de óleos voláteis de plantas galhadas e também, considerando a possibilidade de alteração do perfil dos componentes voláteis das espécies citadas frente ao ataque de cecidógenos, este estudo se propõe a investigar a potencialidade da técnica de SPME para a extração dos compostos voláteis de *S. polygamus* e *B. spicata*.

*CAPÍTULO II*  
*REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*



## **1 ÓLEOS VOLÁTEIS**

Os óleos voláteis são misturas aromáticas líquidas de aparência oleosa, geralmente incolores ou ligeiramente amareladas, lipofílicas, solúveis em solventes orgânicos de baixa polaridade, não muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais.<sup>23</sup> São obtidos de matérias-primas vegetais e encontrados estocados em estruturas secretoras em diferentes órgãos das plantas, tais como: folhas, flores, frutos e raízes. Alguns óleos essenciais apresentam grande valor agregado, isso porque são amplamente utilizados na indústria para produção de perfumes considerados de qualidade superior, cosméticos em geral, fármacos, materiais de limpeza, além de servir como matéria-prima para alguns processos sintéticos.<sup>24</sup> Atualmente também é considerada sua função ecológica, especialmente como inibidores de germinação,<sup>18;25;26</sup> proteção contra predadores<sup>27-29</sup> e atração de polinizadores.<sup>23</sup>

No mercado, seu valor está associado à qualidade do produto, que é determinada pela sua composição. Esta é conhecida por sua complexidade, visto que seus constituintes contam com vários grupos funcionais, tais como, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres e éteres, ocorrendo na forma de moléculas simples ou complexas dos grupos dos terpenos e dos arilpropanóides.

O perfil volátil pode ser afetado por vários fatores que culminam em dado tipo de resposta expressa na constituição do óleo.<sup>24</sup> A composição de um óleo essencial além de depender de fatores genéticos que possibilitam a biossíntese de determinados metabólitos secundários, por meio de fornecimento de enzimas adequadas, também depende de fatores ambientais e de cultivo. Isso faz com que uma mesma espécie possa apresentar diferentes composições em função de sua localização geográfica (altitude e latitude), fatores climáticos (temperatura, luz e umidade) ou mesmo condições de estresse em virtude da interação com outras

plantas ou animais.<sup>23</sup> Embora estes óleos apresentem uma grande variedade de compostos, a maior parte dos mesmos é constituída de mono- e sesquiterpenóides, os quais exibem ampla diversidade de estruturas moleculares. Os terpenóides são derivados de duas rotas metabólicas secundárias: a rota do mevalonato que é ativada no citosol e a rota do 2-C-metila-D-eritritol-4-fosfato (MEP do inglês “2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate”) ativada nos plastídeos. Qualquer uma dessas rotas conduz a formação de unidades de C<sub>5</sub>, que podem ser o isopentenil difostato (IDP do inglês “Isopentenyl Diphosphate”) ou seu isômero alílico dimetilalil difostato (DMADP do inglês “Dimethylallyl Diphosphate”). Nas duas rotas o IDP e o DMADP são usados pela prenil transferase em reações de condensação para a formação de geranil difostato (GDP do inglês “Geranyl Diphosphate”), precursor de monoterpênos e farnesil difostato (FDP do inglês “Farnesyl Diphosphate”), precursor de sesquiterpenos, como é possível verificar no esquema representado na Figura 1.<sup>30</sup>

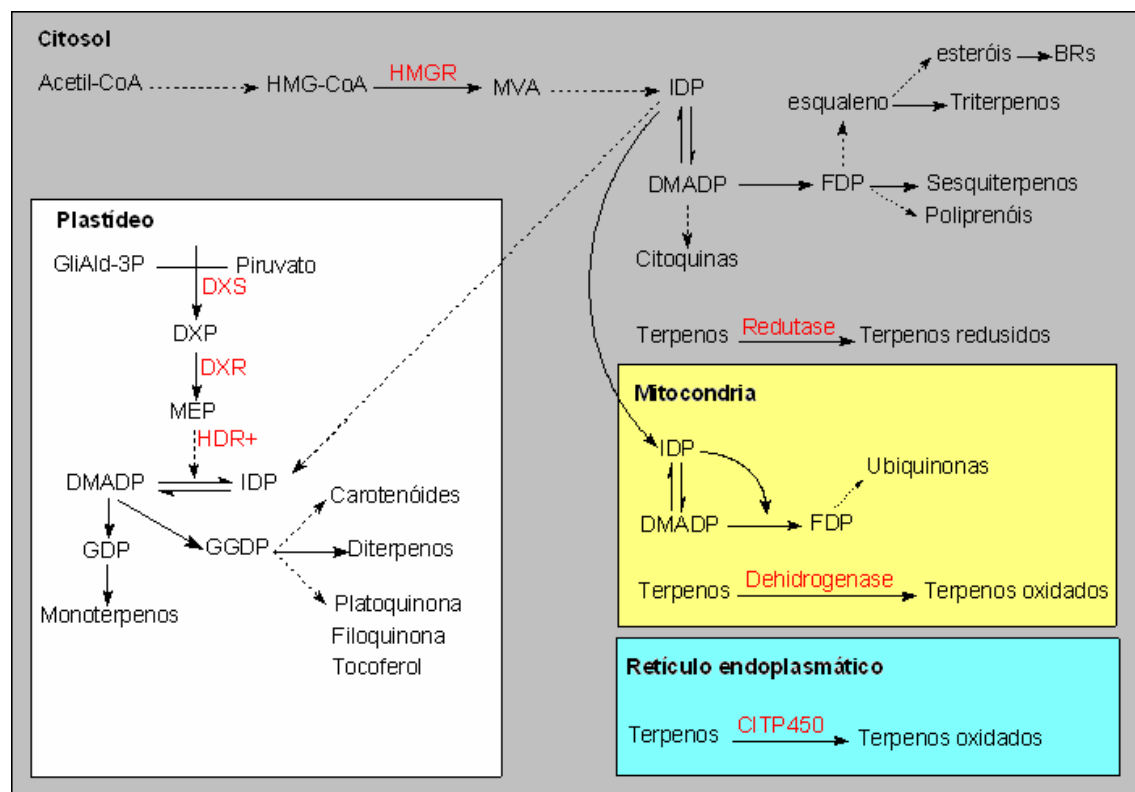


Figura 1. Esquema da rota biossintética dos compostos terpenóides em plantas.<sup>30</sup>



A grande variedade de substâncias que compõe os óleos essenciais apresenta várias atividades farmacológicas. Dentre estas atividades, podem ser citadas algumas, como por exemplo: ação analgésica local e atividade anti-séptica para o óleo de cravo-da-índia, devido ao alto conteúdo de eugenol; ação antiinflamatória aos óleos que apresentam azulenos, como o óleo de camomila e ação estimulante sobre o sistema nervoso central, para óleos que apresentam cânfora em sua constituição, como os óleos de losna e sálvia, que em doses elevadas podem provocar convulsões ou ter efeito psicotrópico. Algumas outras propriedades farmacológicas conferidas aos óleos voláteis são: ação antiespasmódica; cardiovascular; estimulante sobre secreções do aparelho digestivo; irritante tópico e secretolítica.<sup>23</sup>

## **2 GALHAS OU CECÍDIAS**

A interação de algumas espécies vegetais com vírus, bactérias, fungos ou insetos herbívoros podem conduzir à formação de anomalias no tecido vegetal, chamadas de galhas ou cecídias. Este processo se caracteriza pela hipertrofia e hiperplasia celular e é muito comum em diversas famílias de plantas floríferas (angiospermas).<sup>19</sup> As galhas são encontradas em qualquer órgão vegetal, principalmente nas folhas, e apresentam uma grande variedade de formas,<sup>31</sup> sendo esta morfologia determinada pela interação entre o inseto galhador e a planta hospedeira.<sup>32</sup> Para a planta, a formação da galha pode ser uma forma de neutralizar as toxinas produzidas pelo organismo indutor.<sup>19</sup> Já o inseto indutor da galha, ao se instalar na planta hospedeira, tem por objetivo buscar uma fonte de alimento, de proteção e um local para se reproduzir,<sup>19;31</sup> sendo, portanto, a qualidade e a quantidade de recursos oferecidos pelo vegetal um dos fatores preponderantes para seleção da planta hospedeira.<sup>22;33</sup> Um outro fator que pode influenciar na escolha da planta hospedeira pelos cecidógenos, no caso de plantas dióicas (apresenta órgãos reprodutores masculinos e femininos em indivíduos distintos, unissexuais), é o sexo,

isso porque a qualidade nutricional do vegetal pode ser influenciada por essas características, uma vez que plantas femininas produzem menor quantidade de nutrientes. Esta redução se deve a gastos de energia e nutrientes com o sistema reprodutivo, que por sua vez produz mais carbono, o qual é empregado na produção de compostos defensivos, tornando a planta mais resistente ao ataque de insetos.<sup>22</sup>

O comportamento galhador pode ser encontrado em diversos grupos de insetos, notavelmente nos pertencentes às ordens Díptera, Hemíptera e Himenóptera. Há uma grande diversidade taxonômica de galhadores nestas ordens e a relação entre insetos e a planta hospedeira é específica, o que quer dizer que uma espécie de galhador geralmente está associada a uma determinada espécie de planta hospedeira.<sup>22;31;31</sup>

A presença de galhas nos vegetais é um fenômeno comum e desperta o interesse biológico,<sup>19;34</sup> ecológico<sup>31</sup> e, em alguns casos, econômico.<sup>35;36</sup> Entre exemplos de importância econômica relacionados a galhas desenvolvidas pela interação inseto-planta, se destacam as galhas presentes em alguns tipos de carvalho (*Quercus* spp. - Fagaceae). Estas apresentam alto valor de mercado por terem elevado conteúdo de ácido tânico, sendo por isto empregadas na produção de tintas para escrita, para fios de lã e couros. Entre as galhas que apresentam alto conteúdo de ácido tânico produzidas nos frutos de carvalho, estão as que são originadas pela presença do *Cynips quercus-calycis* (Cynipidae – Himenoptera), que pode conter até 50 % de ácido tânico.<sup>31</sup> Porém, a presença de galhas também pode representar uma desvantagem econômica, isso se a interação inseto-planta provocar alterações na composição química de uma planta usada por suas propriedades medicinais ou aromáticas, principalmente se esta alteração ocorrer nos compostos que são responsáveis por sua atividade.<sup>35</sup>

No Rio Grande do Sul existem várias espécies de plantas que estão sujeitas a ação de galhadores, entre elas, a *Schinus polygamus* e a *Baccharis spicata*. No entanto, a literatura não apresenta informações sobre os óleos voláteis e as variações induzidas pelas galhas para estas duas espécies.

### 3 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *Schinus*

*Schinus* L. pertence à família Anacardiaceae, que é formada de aproximadamente 600 espécies típicas de regiões tropicais e subtropicais.<sup>37</sup> Essas plantas são conhecidas pela denominação comum de “aroeira”<sup>38</sup> e apresentam diversas espécies, entre as quais, podem ser destacadas a aroeira vermelha (*S. terebinthifolius* Raddi), aroeira-do-campo (*S. lenfiscifolius* March), aroeira salso L. (*S. molle*)<sup>37;38</sup> e a aroeira de espinho ou assoviadeira (*S. polygamus* Cav. (Cabr.)).<sup>39;40</sup> Além das espécies do gênero *Schinus*, a denominação de “aroeira” também é conferida às plantas do gênero *Lithraea* Miers ex Hook. & Arn e *Astronium* Jacq, igualmente pertencentes à família Anacardiaceae.<sup>38</sup>

O termo “aroeira” está associado à indução de dermatites de contato, entretanto, apenas algumas dessas plantas apresentam compostos como os catecóis alquenilados, que têm potencial alergênico.<sup>41</sup> Em contraponto, diversos estudos com espécies desses três gêneros atribuem a eles várias propriedades medicinais, por apresentarem em sua constituição, substâncias biologicamente ativas que desempenham papel de antiinflamatório, analgésico, antibacteriano, fungicida, citotóxico, entre outros.<sup>11;42-44</sup> Apesar de existirem vários estudos sobre as propriedades farmacológicas das plantas da família Anacardiaceae, estudos no âmbito da ecologia química e da interação inseto-plantas são escassos. Medal e colaboradores<sup>45</sup> observaram que o inseto *Heteroperreia hubrichi* (Hymenoptera: Pergidae) atuou como agente de controle biológico específico contra a espécie invasora *S. terebinthifolius*, provocando dano significativo na planta, sem prejudicar as espécies nativas. Scrivanti e colaboradores<sup>25</sup> testaram as propriedades alelopáticas do óleo volátil de *S. aroeira* em sementes germinadas de milho (*Zea mays* L.) e constataram que os voláteis apresentavam a capacidade de inibir o crescimento da raiz.

Entre as várias aroeiras, uma das menos estudadas é a *S. polygamus* (Figura 2), para a qual a literatura apresenta apenas uma citação relacionada à ocorrência de flavonóides<sup>46</sup> e duas citações referentes à composição de seu óleo essencial.<sup>39;40</sup> Este arbusto espinhoso nativo do Brasil, Argentina, Chile, Uruguai e Peru<sup>47</sup> foi estudado por Gonzalez e colaboradores,<sup>39</sup> onde foi determinada a

composição do óleo essencial das folhas e o seu potencial antimicrobiano, além de sua atividade contra o *Bacillus cereus*. Nos resultados deste estudo foram identificados 30 constituintes, sendo os majoritários o  $\alpha$ -felandreno e o limoneno.



Figura 2. Espécime de *Schinus polygamus*. Detalhe: folhas galhadas (A), folhas saudáveis (B) e ramo com espinhos, folhas saudáveis e folhas galhadas (C).

Em um outro trabalho com folhas e frutos de uma planta chilena, foi feito pela primeira vez um estudo farmacológico de seus extratos, baseado nos usos da medicina tradicional, que utiliza as partes aéreas dessa espécie como antipirético, antiinflamatório e analgésico. A presença do  $\beta$ -sitosterol e da quercitina parece justificar as atividades farmacológicas supracitadas, uma vez que estes são

compostos geralmente associados a propriedades analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas. O óleo essencial tanto das folhas como dos frutos apresentou proporção similar de mono e sesquiterpenos, sendo o  $\beta$ -pineno o constituinte majoritário em ambos os órgãos.<sup>40</sup>

#### 4 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *Baccharis*

*Baccharis* L. pertence à família Asteraceae (Compositae) e possui mais de 500 espécies espalhadas pelo sul e sudeste do Brasil, além de Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia.<sup>48;49</sup> Possível origem desse gênero é o Brasil ou os Andes, isto porque nestas regiões são encontradas grandes quantidades destas espécies. No Brasil o número mínimo de espécies pode chegar a 120,<sup>50</sup> porém na obra “Flora Ilustrada Catarinense” estão descritas 79 espécies de *Baccharis* distribuídas no Brasil, pelo Rio Grande de Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro. Algumas dessas plantas são bem conhecidas, entre elas a vassoura ou vassourinha, nome popular atribuído a várias espécies, tais como a *B. dracunculifolia*, *B. retusa* e a *B. pseudomyriocephala*, e as carquejas *B. trimeria*, *B. articulata*, *B. genistolloides*.<sup>21</sup> Várias das plantas dessas espécies são usadas na medicina popular para tratamento de doenças como males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata e processos de desintoxicação do organismo, como diurético, principalmente na forma de infusões ou decocções.<sup>51</sup> Embora muitas das espécies sejam empregadas na medicina popular, a algumas delas são atribuídas propriedades tóxicas. Um exemplo disto é a *B. halimifolia*, que apresenta compostos tóxicos para o gado, provocando transtornos gastrointestinais, tremores e convulsões. Por outro lado, algumas espécies de *Baccharis* podem trazer benefício econômico, quando empregadas, para prevenir a erosão do solo, com é o caso da *B. pluralis* e *B. micranthas*. Já espécies como *B. salicifolia* e *B. pluralis* são plantas que durante o período de floração atraem abelhas e o néctar dessas plantas leva a produção de mel de excelente qualidade. Outras ainda são usadas como espécies

ornamentais (*B. angustifolia*, *B. glomeruliflora* e *B. neglecta*) e o óleo essencial de algumas delas é considerado produto de alto valor de mercado para a indústria de fragrâncias (*B. dracunculifolia* e *B. genistelloides*).<sup>50</sup>

A grande variedade de aplicações talvez possa ser explicada em virtude da ampla quantidade de compostos presentes nesse gênero. Entre eles podem ser destacados flavonóides,<sup>29;52-54</sup> ácido fenólicos,<sup>52;55-57</sup> ácidos graxos,<sup>55</sup> diterpenos clerodanos,<sup>57;58</sup> diterpenos labdanos,<sup>52;57;58</sup> triterpenos,<sup>29;54;56</sup> mono- e sesquiterpenos<sup>59-63</sup> e acetofenonas.<sup>64</sup> Dentre esses compostos, os flavonóides são considerados bons marcadores quimiotaxonômicos para as Asteraceae, muito raramente na forma glicosilada, fato característico da família.<sup>50</sup> A literatura reporta vários estudos que identificaram flavonóides neste gênero, os quais são compostos que despertam grande interesse na área medicinal, uma vez que em várias ocasiões aparecem associados a atividades farmacológicas<sup>29;52-54</sup> entre elas a de antioxidantes.<sup>29;52;53;65;66</sup> Um outro grupo importante são os tricotecenos, compostos que até a década de 70, supunha-se que fossem metabólitos produzidos exclusivamente por fungos. Estes são considerados poderosos agentes citotóxicos e foram identificados pela primeira vez em plantas em *B. megapotamica* e posteriormente em *B. coridifolia*.<sup>67</sup> Entre as várias investigações com extratos de plantas desse gênero, uma refere-se ao exsudato resinoso das partes aéreas da *B. grisebachii*, do qual, após várias etapas de fracionamento, foram isolados dois diterpenos labdano, oito derivados do ácido *p*-cumárico e duas flavonas. Este resultado exemplifica um pouco da grande diversidade de compostos presentes no gênero.<sup>52</sup>

Os óleos essenciais de algumas das plantas pertencentes a esse gênero têm sido investigado<sup>59;60;60</sup> e caracterizam-se por uma grande quantidade de mono- e sesquiterpenos e seus derivados oxigenados. Um exemplo disto é o óleo essencial da *B. dracunculifolia*, que é empregado na indústria de perfumes, apresentando nerolidol e o espatulenol entre seus constituintes majoritários.<sup>61</sup>

Um fato importante relativo ao gênero *Baccharis* é a ocorrência de galhas, em virtude da interação inseto-planta, como em *B. pseudomyriocephala* e em *B. linearis*.<sup>22;29</sup> Alguns compostos presentes na cera epicuticular de folhas da *B. linearis*, por exemplo o espatulenol, apresentam efeito fagoinibidor em larvas de *Spodoptera littoralis*. Este mesmo tipo de atividade, relacionada à larva do inseto *Tebrio molitor*, também foi atribuída a compostos diterpenicos com esqueleto de

clerodano, extraídos da *B. sagittalis*.<sup>68</sup> Nestes casos essas substâncias podem atuar no mecanismo de defesa química da planta, reduzindo a ação dos predadores e parasitos.<sup>29</sup>

Quanto a *B. spicata* (Figura 3), uma revisão bibliográfica mostrou o registro de poucos estudos sobre a espécie, sendo todos associados a seus extratos.<sup>60;69;70</sup> Entretanto, não existe referência quanto à caracterização do seu óleo essencial. Um dos poucos estudos que incluí esta espécie, consiste no desenvolvimento de um método por Cromatografia em Camada Delgada (TLC, do inglês “*Thin-Layer Chromatography*”), para diferenciação de espécies de *Baccharis* nativas do Rio Grande do Sul, que são empregadas com plantas medicinais.<sup>71</sup> O extrato orgânico da *B. spicata* também apresenta atividade *in vitro* contra o protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de chagas, confirmando o uso popular da espécie no tratamento ou alívio dos sintomas de infecções provocadas por parasitas e a atividade antiprotozoária atribuída a espécies da família Asteraceae.<sup>72</sup> Os extratos aquoso e metanólico das partes aéreas de *B. spicata* apresentam atividade antioxidante maior que o Trolox<sup>®</sup> (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico).<sup>73</sup>

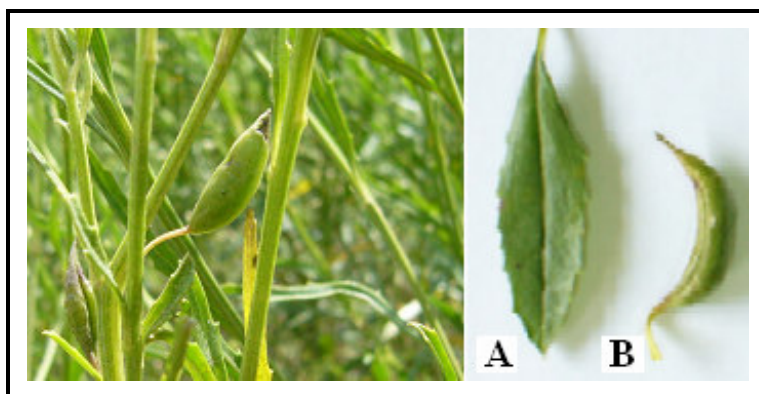


Figura 3. Folhas (A) e galhas (B) de *Baccharis spicata*.

## **5 INFOQUÍMICOS (ALELOQUÍMICOS)**

Características morfológicas e/ou químicas podem constituir mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de predadores e parasitas.<sup>74</sup> Quando o mecanismo de defesa está relacionado à substâncias pré-existentes ou sintetizadas devido a alterações metabólicas, esses “metabólitos de defesa” são classificados entre os infoquímicos.<sup>74;75</sup> Os infoquímicos são divididos em dois grupos: os feromônios e os aleloquímicos. O primeiro grupo é responsável por mediar interações entre organismos de uma mesma espécie, já o segundo, é responsável por mediação entre organismos de espécies diferentes.<sup>76</sup>

Os aleloquímicos ainda podem estar divididos em alomônios, cairomônios e sinomônios. Os alomônios são infoquímicos que são pertinentes à biologia de um organismo (organismo 1) que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie (organismo 2), são favoráveis somente para o organismo 1. Os cairomônios são infoquímicos que são pertinentes à biologia de um organismo (organismo 1) que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie (organismo 2), são favoráveis somente para o organismo 2. Já os sinomônios são aqueles infoquímicos que são pertinentes à biologia de um organismo (organismo 1) que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie (organismo 2), são favoráveis para ambos os organismos.<sup>76</sup>

O ataque de insetos a uma planta pode gerar uma série de respostas fisiológicas e químicas na planta, como aumento de fotossíntese e ganho de carbono, mudanças no metabolismo secundário, aumento de atividade enzimática, entre outras. Uma das formas de resposta é a emissão de compostos voláteis, os quais podem ser emitidos com a finalidade de atrair algum herbívoro, ou atrair um predador do herbívoro que ataca a planta.<sup>77</sup>

Os óleos essenciais, produzidos por espécies vegetais de diversos grupos taxonômicos, podem apresentar algumas propriedades ecológicas relacionadas aos seus mono- e sesquiterpenos.<sup>75</sup> Algumas dessas substâncias parecem mimetizar a ação dos hormônios juvenis de insetos, interferindo no seu desenvolvimento normal. Monoterpenos podem atuar como toxinas, impedindo que algumas espécies de insetos herbívoros se alimentem e se reproduzam, influenciando efetivamente nos



mecanismos de defesa de espécies vegetais.<sup>12</sup> Além disso, alguns óleos voláteis apresentam atividade antifúngica e bactericida, podendo representar uma barreira significativa contra a infestação do tecido vegetal por organismos patogênicos. Danos físicos ao tecido vegetal podem culminar com a liberação de defensivos químicos naturais, impedindo infestações secundárias.<sup>75</sup> No entanto, deve-se considerar que a resposta dada por um determinado metabólito secundário pode ser específica para cada tipo de inseto, sendo que esta resposta também pode ser afetada por condições fisiológicas, estação do ano e outros fatores endógenos e/ou exógenos.<sup>78</sup>

## **6 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PLANTAS**

### **6.1 HIDRODESTILAÇÃO**

A hidrodestilação é um processo simples e amplamente utilizado para extração de óleos voláteis e está dividido em duas técnicas: arraste a vapor e coobação (destilação repetida do mesmo líquido). A primeira técnica é amplamente usada, principalmente na extração de voláteis para fins industriais, e diferencia-se da segunda por apresentar reservatórios distintos para a água e a matriz vegetal. A coobação, sistema que utiliza equipamento com recirculação de águas condensadas, apresenta como vantagem sobre o arraste a vapor menor perda de voláteis por manipulação do sistema pelo operador. Nesse tipo de equipamento não existe a necessidade de esvaziar o recipiente receptor do vapor de água e voláteis condensados, porém água e matriz vegetal ficam em um mesmo reservatório. Um exemplo de equipamento usado na coobação é o Clevenger. Neste equipamento quando a mistura formada por água e uma matriz vegetal entram em ebulição, os

vapores de água e os voláteis são conduzidos para o condensador, onde ocorre uma troca térmica e os vapores são condensados. O óleo volátil se separa da água por densidades e a água retorna ao balão, onde está a amostra vegetal.<sup>79</sup>

A literatura sobre óleos essenciais apresenta o equipamento Clevenger e suas variações<sup>27;39;80;81</sup> como um dos equipamentos mais usados para as extrações em escala laboratorial, embora também relate o uso de outras técnicas, como o arraste a vapor<sup>82</sup> e a extração-destilação (método de Likens-Nickerson).<sup>83;84</sup> Técnicas mais modernas, como a extração assistida com microondas,<sup>83</sup> extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês “*Supercritical Fluid Extraction*”),<sup>83;85</sup> extração com água superaquecida (SWE, do inglês “*Superheated Water Extraction*”),<sup>86</sup> ou ainda técnicas hífenizadas como a microextração no modo *headspace* em gota suspensa de solvente assistida por microondas (MAE-HS-SDME, do inglês “*Microwave-Assisted Extraction followed by Headspace Single-Drop MicroExtraction*”),<sup>87</sup> também são reportadas.

Os estudos relacionados à extração de óleos voláteis de aroeiras utilizam principalmente a hidrodestilação com Clevenger,<sup>11;27;44;80;85;88</sup> embora outros trabalhos empreguem fluido supercrítico<sup>85</sup> e extração-destilação.<sup>89</sup> Uma desvantagem da hidrodestilação, quando se quer obter a composição mais próxima já de uma planta *in vivo*, é a alta temperatura empregada, a qual pode provocar transformações químicas.<sup>3;90</sup>

## 6.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO *HEADSPACE*

As técnicas de *headspace* (HS – *headspace* ou espaço confinado, que é definido como sendo constituído dos compostos voláteis contidos na fase de vapor sobre uma solução em equilíbrio, mantida em ambiente fechado)<sup>91</sup> são vantajosas na extração de compostos voláteis de plantas por permitirem que o processo de extração ocorra a temperaturas baixas, reduzindo a probabilidade de alterações na composição da mistura volátil. Estas técnicas podem ser empregadas no modo estático e no modo dinâmico. O modo estático consiste na simples coleta de uma fração volátil que está em contato com a amostra, introduzindo-se, na seqüência,

esta fração no equipamento de separação. No modo dinâmico é empregado um fluxo de gás inerte que passa através da amostra e arrasta os analitos para uma armadilha criogênica ou para um material adsorvente, onde os analitos são coletados. A dessorção pode ser térmica ou por meio do uso de um solvente, embora a primeira opção exija o uso de equipamentos mais caros e não seja conveniente para compostos termolábeis. Entretanto, a dessorção térmica confere maior simplicidade ao método, facilidade de automação e sensibilidade, além de não apresentar picos cromatográficos relativos ao solvente.<sup>4</sup>

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica simples e rápida que se baseia na sorção dos analitos presentes na amostra ou no seu *headspace*, que são absorvidos e/ou adsorvidos em uma fase extratora, que consiste de um filme polimérico líquido, sólido ou misto, suportado sobre uma fibra de sílica fundida.<sup>4</sup> Para extração de voláteis de vegetais, o modo *headspace* é o mais amplamente empregado (HS-SPME – do inglês “*Headspace Solid-Phase MicroExtraction*”), o qual se baseia na exposição do filme polimérico à fase gasosa acima da amostra. Neste caso, os analitos a serem extraídos, apresentam suficiente volatilidade na temperatura de extração desejada.<sup>92</sup> Entre os fatores que influenciam a eficiência do processo extrativo estão a escolha do filme polimérico mais apropriado ao analito que se deseja extrair e o tipo de matriz em que está contido.<sup>93</sup> A escolha do filme, bem como de sua espessura, é geralmente feita em uma etapa de otimização das condições de análise,<sup>2</sup> tendo como base as características físico-químicas dos analitos<sup>94</sup> e das fibras disponíveis.<sup>2,9;95</sup>

### 6.2.1 Princípios básicos de absorção aplicados a SPME

A absorção é o mecanismo de extração das fases poliméricas PDMS (polidimetilsiloxano) e PA (poliacrilato) e baseia-se em princípios termodinâmicos e de transferência de massa, considerando-se condições ideais.

A SPME é um processo de múltiplos equilíbrios. Porém, para considerações matemáticas são consideradas três fases: o filme polimérico, a fase gasosa e a matriz. Durante o processo de extração, os analitos migram entre as três fases até

que o equilíbrio seja atingido. Como a massa dos analitos permanece constante durante todo o processo, temos:

$$C_o V_a = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_a^\infty V_a \quad \text{equação (1)}$$

Onde  $C_o$  é a concentração inicial do analito na matriz;  $C_f^\infty$ ,  $C_h^\infty$  e  $C_a^\infty$  são a concentrações de equilíbrio do analito no filme polimérico, do analito na fase gasosa e do analito na matriz, respectivamente;  $V_f$ ,  $V_h$  e  $V_a$  são os volumes do filme polimérico, da fase gasosa e da amostra, respectivamente. Se as constantes de distribuição para o filme polimérico-fase gasosa e fase gasosa-amostra forem definidas como:  $K_{fh} = C_f^\infty / C_h^\infty$  e  $K_{ha} = C_h^\infty / C_a^\infty$  respectivamente, e, sendo a massa do analito absorvida no filme polimérico dada por  $n = C_f^\infty V_f$ , então esta massa pode ser expressa pela seguinte equação,

$$n = \frac{K_{fh} K_{ha} V_f C_o V_a}{K_{fh} K_{ha} V_f + K_{ha} V_h + V_a} \quad \text{equação (2)}$$

Como os analitos estão presentes em nível de traços, é possível determinar as constantes de distribuição sem usar as atividades, pois neste tipo de situação as concentrações são boas aproximações.

O potencial químico do analito nas três fases pode ser expresso como:

$$\mu_h = \mu^\circ(T) + RT \ln \left( \frac{p_h}{p^\circ} \right) \quad \text{equação (3)}$$

$$\mu_f = \mu^\circ(T) + RT \ln \left( \frac{p_f}{p^\circ} \right) \quad \text{equação (4)}$$

$$\mu_a = \mu^\circ(T) + RT \ln \left( \frac{p_a}{p^\circ} \right) \quad \text{equação (5)}$$

Onde  $\mu_h$ ,  $\mu_f$  e  $\mu_a$  são o potencial químico do analito na fase gasosa, no filme polimérico e na matriz, respectivamente;  $p_h$ ,  $p_f$  e  $p_a$  são as pressões de vapor do analito na fase gasosa, no filme polimérico e na matriz, respectivamente;  $\mu^\circ(T)$  é o potencial químico do analito na pressão padrão  $p^\circ$  (geralmente  $p^\circ = 1 \text{ atm}$ ) e temperatura  $T$ .

Quando o sistema atinge o equilíbrio, o potencial químico da amostra nas três fases passa a ter o mesmo valor, ou seja,  $\mu_f = \mu_h = \mu_a$ . Considerando as equações do potencial químico do analito nas três fases (equações 3 a 5), podemos então considerar que,  $p_f = p_h = p_a$ .

Algumas outras ponderações podem ser feitas a respeito dessa técnica, a partir de considerações matemáticas, as quais são mencionadas a seguir. Nas condições de equilíbrio, a quantidade de analito extraído não depende da posição do filme extrator no sistema, desde que não ocorra variação no volume do filme polimérico, da fase gasosa e da amostra. A massa extraída de um analito é proporcional a sua concentração inicial na amostra. Além disso, a cinética do processo de extração, que determina a velocidade do mesmo, baseia-se na segunda lei da difusão de Fick, levando-se em consideração a geometria cilíndrica da fibra e o espaço tridimensional do sistema de amostragem.<sup>92</sup>

## 6.2.2 Princípios básicos de adsorção aplicados a SPME

Até pouco tempo atrás, o revestimento polimérico líquido PDMS foi o mais empregado em SPME para extração de compostos orgânicos voláteis (VOC, do inglês “*Volatile Organic Compounds*”). Entretanto, nos últimos anos vêm crescendo o interesse por fibras que contenham em sua composição filmes poliméricos com fase sólida porosa (fibras mistas), uma vez que estas geralmente apresentam maior capacidade de extração.<sup>2;5;96;97</sup> A presença de fase porosa e conseqüente processo de adsorção aumentam a capacidade de extração da fibra em curto tempo de

extração e condições de não equilíbrio, porém a etapa de quantificação é mais complexa, uma vez que existe um processo de competição entre os analitos para ocupar os espaços na superfície porosa do revestimento.<sup>98</sup>

O modelo teórico descrito no artigo de Koziel e colaboradores<sup>98</sup> para revestimentos sólidos, ou seja, para processos de adsorção, considera que quando o revestimento é exposto ao ar em movimento, uma interface ou camada limítrofe com espessura  $\delta$  é criada entre a massa de ar e a superfície da fibra, conforme mostrado na Figura 4. O transporte dos analitos pela massa de ar para a superfície do revestimento ocorre por meio de difusão molecular através da camada limítrofe. A concentração do analito na massa de ar ( $C_g$ ) é considerada constante para tempos de amostragem curtos, uma vez que existe um suprimento contínuo do analito por meio de convecção.

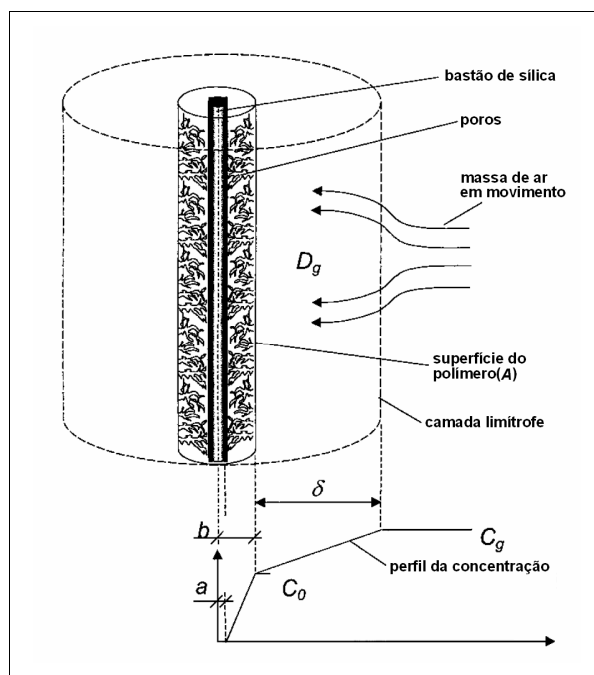


Figura 4. Esquema representativo de um corte de filme poroso.<sup>98</sup>

O uso de um revestimento sólido na SPME permite considerar que esta fibra se comporta como um coletor perfeito, sendo que a adsorção acontece imediatamente à chegada do analito, onde a concentração inicial do analito na

superfície do revestimento ( $C_\theta$ ) é considerada zero. Considerando-se que o tempo de extração é curto e a concentração do analito na amostra é baixa, a superfície do revestimento fica longe da saturação. A massa de analito extraído pode ser determinada por meio da equação abaixo:

$$n(t) = \frac{2\pi D_g L}{\ln((b+\delta)/b)} C_g t \quad \text{equação (6)}$$

onde:  $n(t)$  é a massa de analito extraído em um dado tempo de amostragem dada em ng,  $D_g$  é o coeficiente de difusão molecular da fase gasosa dado em  $\text{cm}^2/\text{s}$ ,  $b$  é o raio externo do polímero dado em cm,  $L$  é o comprimento do polímero dado em cm,  $\delta$  é a espessura da camada limítrofe dada em cm e  $C_g$  é a concentração do analito na massa de ar dada em  $\text{ng/mL}$ .<sup>98</sup>

### 6.2.3 Características dos revestimentos poliméricos

No mercado, existe uma variedade considerável de filmes poliméricos cada vez mais resistentes, tais como as fibras StableFlex, que são mais flexíveis e, portanto, apresentam menor probabilidade de quebra, além de maior tempo de vida, em função de maior estabilidade e menor sangria do filme.<sup>99</sup> Além das fibras StableFlex, foi lançada recentemente uma nova geração de fibras, cuja agulha é feita de um metal mais resistente e flexível, que também tem como função minimizar a incidência de quebra.<sup>100</sup>

Quanto aos revestimentos, eles são classificados segundo sua polaridade (Figura 5) como apolares (PDMS), polares (PA, CW-DVB)<sup>94;101</sup> e semipolares (PDMS-DVB, CAR-PDMS).<sup>94</sup> Existe também a DVB-CAR-PDMS (Figura 6), dotada de triplo revestimento, que é considerada como de polaridade intermediária.<sup>101</sup> Esta gama de polaridades disponível oferece vantagens como seletividade, possibilidade de maior recuperação de analitos específicos e redução da extração de interferentes.<sup>94</sup> As fibras mistas, por apresentarem subcamadas com diferentes

polaridades, têm papel importante na seletividade no que se refere à extração de analitos com pequenas diferenças de polaridades.<sup>2:8</sup> À parte da polaridade, os revestimentos das fibras ainda podem ser classificados como polímeros puros homogêneos, tais como as fibras de PDMS e PA ou como polímeros sólidos dispersos em uma matriz polimérica líquida (fibras mistas), que são os de dupla ou tripla camada, tais como: CAR-DVB, PDMS-DVB, CW-DVB e DVB-CAR-PDMS.<sup>94</sup> Estes últimos apresentam menor estabilidade mecânica que as fases poliméricas homogêneas, mas ganham em seletividade, embora estas mesmas fases na nova versão (StableFlex) tenham aprimorado suas propriedades mecânicas.<sup>99</sup>



Figura 5. Esquema representativo da classificação dos revestimentos poliméricos comerciais para SPME.

A DVB-CAR-PDMS é composta por uma camada interna de 30µm de Carboxen ligada com PDMS e uma camada externa de 50µm de DVB, também ligada com PDMS. A camada de DVB tem a função de reter os analitos maiores e menos voláteis e permitir que os menores e mais polares passem direto e sejam retidos pelo filme de Carboxen<sup>102</sup> uma vez que os microporos de DVB são relativamente grandes quando comparados com os microporos do polímero Carboxen.<sup>94</sup> Esta fibra porosa, lançada no mercado em 1998, com sua grande área superficial, atua primariamente por adsorção, um fenômeno de superfície, e é indicada para compostos voláteis e semi-voláteis que apresentam entre 3 a 20 carbonos<sup>103</sup> além de cobrir uma ampla faixa de polaridade.<sup>104</sup> A literatura indica seu



uso para as mais variadas amostras, que vão desde matrizes vegetais, como folhas secas e frescas,<sup>2;105</sup> frutos,<sup>101</sup> óleos essenciais,<sup>106;107</sup> condimentos tais como alho e pimentões,<sup>108;109</sup> além de voláteis de culturas de fungo<sup>95</sup> e de produtos alimentícios, tais como voláteis de queijo,<sup>103</sup> empregando temperaturas que vão deste a ambiente até 80 °C, dependendo da matriz.

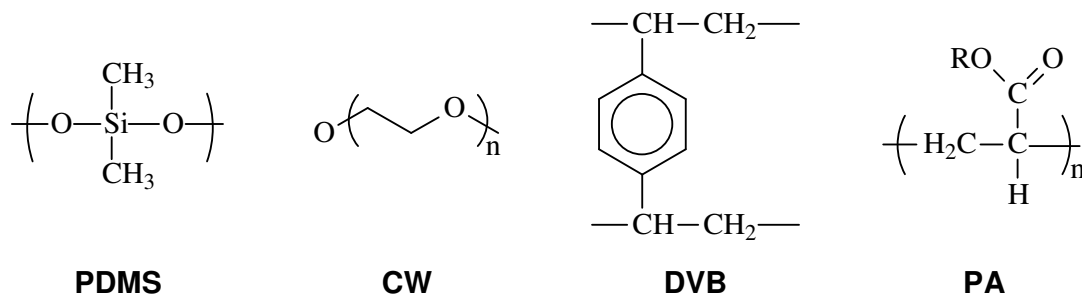


Figura 6. Fórmulas estruturais dos polímeros presentes nos revestimentos poliméricos.

Jirovetz e colaboradores<sup>106;107</sup> utilizaram esta fibra para avaliar o perfil volátil de diferentes matrizes, tais como bulbos de alho macerados e óleo essencial de rosas a temperatura ambiente por 30 minutos. Nestas condições, foi possível verificar a presença de uma ampla gama de compostos extraídos, como álcoois, ácidos carboxílicos, cetonas, hidrocarbonetos, além de mono e sesquiterpenos.<sup>106;107</sup>

Após a escolha de um filme polimérico conveniente e das condições adequadas de extração para os compostos de interesse, verifica-se que a HS-SPME apresenta excelentes resultados.<sup>2;7;83</sup> Embora a literatura apresente vários tipos de filmes poliméricos para extração de compostos voláteis de plantas, observa-se que, nos últimos tempos, o uso das fibras mistas, em várias situações tem apresentado uma performance superior em termos de capacidade de extração.<sup>2;5;95;97;110;111</sup>

Quanto ao uso da SPME para investigação de compostos com função infoquímica, a literatura apresenta um trabalho realizado por Zini e colaboradores<sup>7</sup> com folhas picadas de eucaliptos, no qual foram identificados alguns compostos, que não estavam presentes nos óleos hidrodestilados dos mesmos espécimes. Através de comparações com a literatura, verificou-se que tais compostos desempenhavam atividade infoquímica em outras plantas, sendo, portanto,

elencados como potenciais infoquímicos dos eucaliptos estudados. Além dos compostos citados, outros foram detectados logo após o corte da folha, evidenciando a possibilidade de monitoramento dos processos enzimáticos que ocorrem após o corte, através da HS-SPME.<sup>7:112</sup> Outro estudo mostra a eficiência da SPME para investigar voláteis da *Solanum viarum*, os quais apresentam interesse ecológico. Esta planta é conhecida por atrair e estimular a oviposição de *Helicoverpa armigera*, que é considerada uma praga que provoca sérios danos nos frutos de tomate e em outras plantas de interesse econômico. Este tipo de estudo é importante, uma vez que insetos mostram preferência por determinada planta hospedeira. O conhecimento dos voláteis que compõem seu perfil pode ser útil na construção de armadilhas que possibilitem fazer o controle do inseto por meio de semioquímicos.<sup>15</sup>

À vista de todas as informações acima mencionadas, verifica-se que a HS-SPME é uma técnica sensível, seletiva e empregada com sucesso na extração de voláteis de matrizes vegetais. Além disso, ela permite o emprego de baixas temperaturas nas extrações, evitando assim a transformação de compostos termolábeis e possibilitando a obtenção de um perfil de compostos voláteis mais próximos daquele da planta *in vivo*. Tendo por base a ausência de registros de estudos na literatura científica que empreguem HS-SPME para investigação de alterações na composição dos componentes voláteis de plantas galhadas, este trabalho visa investigar a potencialidade desta técnica para este fim e também viabilizar, através do uso de HS-SPME, a comparação entre os compostos voláteis presentes em materiais vegetais sadios e galhados de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

## 7 OBJETIVO GERAL

Investigar a potencialidade da técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) associada à cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas (GC/qMS) para o estudo da composição volátil do *headspace* de folhas sadias e galhas de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*, verificando se também uma possível ação aleloquímica dos compostos presentes nos diferentes tecidos vegetais à luz de dados existentes na literatura científica.

## 8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Extrair e conduzir identificação preliminar dos compostos voláteis das folhas de *S. polygamus* e *B. spicata* por hidrodestilação (HD).

➤ Selecionar o melhor revestimento polimérico para extração dos compostos voláteis presentes no *headspace* das folhas e galhas das duas espécies vegetais através de HS-SPME.

➤ Identificar os compostos presentes nas amostras de óleo essencial das folhas e compostos presentes no *headspace* das folhas e galhas de *S. polygamus* e *B. spicata*, por meio de seus índices de retenção e dados oferecidos por seus espectros de massas.

➤ Examinar diferenças qualitativas e quantitativas no perfil volátil emitido pelas folhas e galhas das duas espécies, através do emprego de HS-SPME.

➤ Comparar as diferenças existentes no perfil cromatográfico obtido para os componentes voláteis do óleo hidrodestilado e aquele proveniente de HS-SPME.

➤ Verificar na literatura científica, o possível papel infoquímico dos compostos presentes na folhas e galhas.

*CAPÍTULO III*  
*PARTE EXPERIMENTAL*



## 1 MATERIAIS EMPREGADOS

Os solventes utilizados, hexano e metanol grau PA da Quimex (São Paulo, SP, Brasil), foram bidestilados e conservados em frasco âmbar. Os padrões de alcanos lineares de C9 a C24, com grau de pureza acima de 98%, foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, USA). O sulfato de sódio anidro da Quimex (São Paulo, SP, Brasil), usado para retirar a umidade residual do óleo obtido por hidrodestilação, foi previamente seco em estufa a 150 °C por 2 horas e armazenado em dessecador. Para preparo da solução tampão, usada na HS-SPME, foram utilizados Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ambos da Synth (São Paulo, SP, Brasil).

Foram utilizadas nove fibras poliméricas para HS-SPME: PDMS 7 µm StableFlex, PDMS 30 µm, PDMS 100 µm, PDMS/DVB 65 µm StableFlex, CAR/PDMS 85 µm StableFlex, CW(PEG) 60 µm metal, PA 85µm, DVB/CAR/PDMS 50/30 StableFlex e DVB/CAR/PDMS 50/30 metal, fornecidas pela Supelco (Bellefonte, PA, USA).

## 2 COLETA E PREPARO DO MATERIAL

As amostras de folhas de *S. polygamus* foram coletadas de forma aleatória por toda a copa das árvores em três locais diferentes: na cidade de Guaíba-RS, próximo ao Km 308 da rodovia BR 116 (GPS: 30° 10' 47'' S, 51° 23' 33'' W, altitude 169 m), na cidade de Porto Alegre-RS no Campus do Vale na UFRGS (GPS: 30° 04' 29,2'' S, 51° 07' 20,4'' W, altitude 291 m) e em Viamão-RS na FEPAGRO

(Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária). As amostras de frutos foram todas coletadas de uma árvore no Campus do Vale da UFRGS.

As folhas de *Baccharis spicata* foram coletadas de 5 indivíduos de uma mesma população localizados no Campus do Vale na UFRGS.

Tanto a *S. polygamus* como a *B. spicata* foram identificadas por um botânico local e depositadas no herbário na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN), sendo seus vouchers 148777 e 148798, respectivamente.

As folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora*) foram coletadas por toda a copa de uma árvore localizada na cidade de Porto Alegre-RS no Campus do Vale (UFRGS).

As folhas foram utilizadas frescas ou secas à temperatura ambiente, à sombra por um período de tempo que variou entre 5 e 7 dias.

O teor de umidade foi determinado por meio de secagem de aproximadamente 2 g de folhas em estufa a 70 °C ( $\pm 3$  °C) até peso constante. Esta determinação foi realizada em triplicata.<sup>113</sup> Para pesagem foi utilizada uma balança analítica de precisão Shimadzu modelo AY220 (Japão).

### 3 HIDRODESTILAÇÃO

A hidrodestilação foi realizada em um aparelho Clevenger como mostrado na Figura 7. Em um balão de vidro de 2L foram introduzidos aproximadamente 150 g de folhas frescas ou secas e 1L de água destilada para cada extração. Para pesagem das folhas, foi empregada uma balança Marte modelo AM5500 (Brasil).

A extração em Clevenger ocorreu durante 4 horas, a partir do momento da ebulição. Foi usado um sistema de refrigeração que operou entre  $-3$  e  $4$  °C, utilizando-se como sistema de refrigeração uma mistura de 15% de etilenoglicol em água, para minimizar a perda de compostos voláteis.<sup>4</sup> O óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar em atmosfera enriquecida

com nitrogênio e guardado em freezer à temperatura de aproximadamente de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para as folhas de *S. polygamus* a hidrodestilação também foi realizada em laboratório livre de solventes orgânicos, a fim de descartar a hipótese de contaminação advinda da atmosfera do laboratório.



Figura 7. Extrator Clevenger utilizado para hidrodestilação das folhas de *Schinus polygamus*, *Baccharis spicata* e *Eugenia uniflora*.

## 4 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

### 4.1 ESCOLHA DO FILME POLIMÉRICO

Foram realizadas extrações por HS-SPME (Figura 8) de 0,5 g de folhas picadas de pitangueira (*Eugenia uniflora*) em 4 mL de solução tampão ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,025 M) em frasco de vidro de 10 mL com tampa provida de um septo.<sup>4</sup> Os filmes poliméricos testados foram PDMS 7  $\mu\text{m}$  StableFlex, PDMS 30  $\mu\text{m}$ , PDMS 100  $\mu\text{m}$ , PDMS-DVB 65  $\mu\text{m}$  StableFlex, CAR-PDMS 85  $\mu\text{m}$  StableFlex, CW(PEG) 60  $\mu\text{m}$  metal, PA 85  $\mu\text{m}$ , DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex e, DVB-CAR-PDMS 50/30 metal.

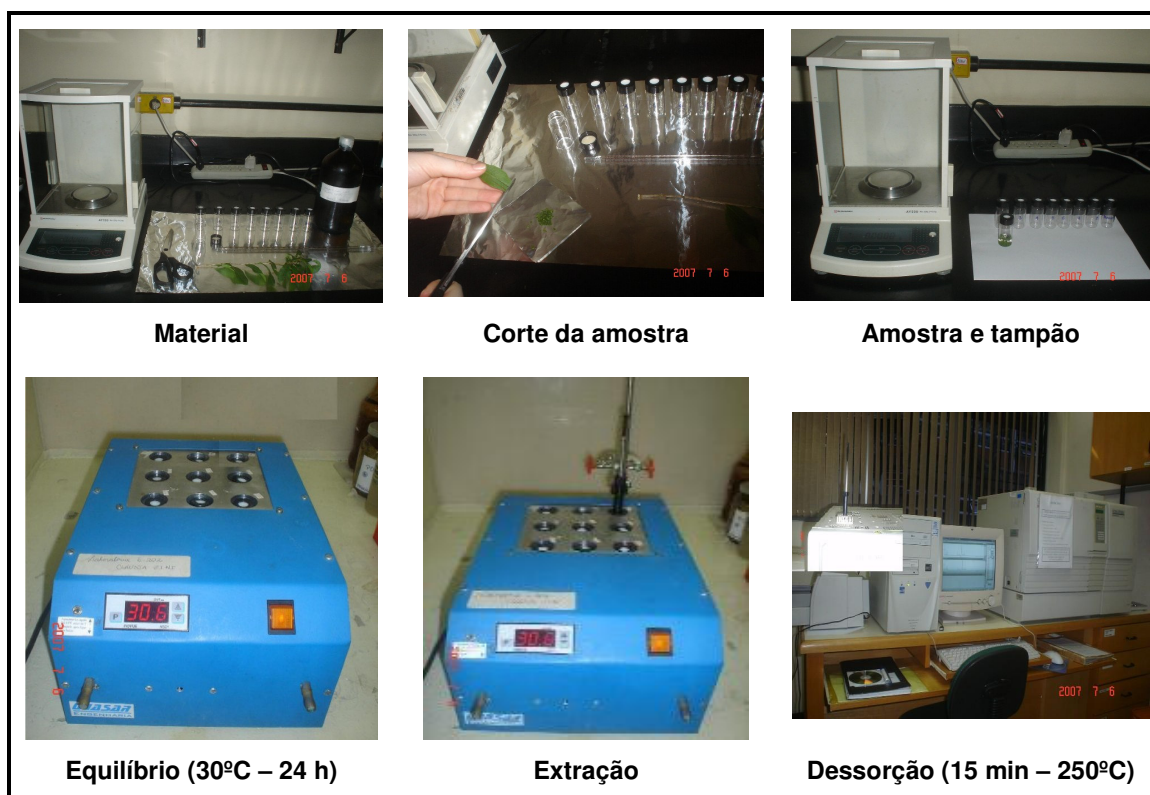


Figura 8. Procedimento de preparação da amostra, extração e dessorção dos voláteis presentes nas folhas de *Eugenia uniflora* e folhas e galhas de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.



As fibras empregadas nesse trabalho foram condicionadas durante o dobro do tempo recomendado pelo fabricante. O tempo de extração foi de 20 minutos a 30 °C ( $\pm 0,6$  °C).<sup>4</sup> Para fins de comparação da eficiência de extração de cada uma das fibras, foram monitoradas as áreas dos picos cromatográficos dos *trans*- $\beta$ -ocimeno (hidrocarboneto monoterpênico), linalol (monoterpeno oxigenado), biciclogermacreno (hidrocarboneto sesquiterpênico) e viridiflorol (sesquiterpeno oxigenado).

#### **4.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DOS VOLÁTEIS DE *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata***

As folhas e galhas (Figura 9) utilizadas para HS-SPME (Figura 8) foram coletadas em uma árvore de *S. polygamus* no Campus do Vale na UFRGS nos meses de dezembro de 2006 e janeiro de 2007. As folhas e galhas de *B. spicata* foram coletadas de 5 indivíduos localizados no Campus do Vale na UFRGS no mês de março de 2007. A coleta foi sempre realizada no mesmo dia do preparo das amostras e foi dividida em: folhas sadias, galhas incluindo 0,5 cm da parte da folha que fica situada no entorno da galha e parte saudável da folha galhada para a *S. polygamus*. No caso da *B. spicata*, as amostras coletadas foram de folhas e galhas (Figura 9). Tanto as folhas, como as galhas foram cortadas com tesoura de aço inoxidável em pedaços de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>. A extração foi realizada à temperatura de 30 °C ( $\pm 0,6$  °C) por 30 minutos para a *S. polygamus* e 5 minutos para a *B. spicata*.<sup>7</sup>

Para verificar possível ocorrência de contaminação durante o processo de extração das folhas sadias de *S. polygamus* o procedimento descrito acima foi realizado em laboratório livre de compostos orgânicos. Além disso, a fibra foi exposta por 15 min à atmosfera local e posteriormente dessorvida no injetor do GC/qMS.

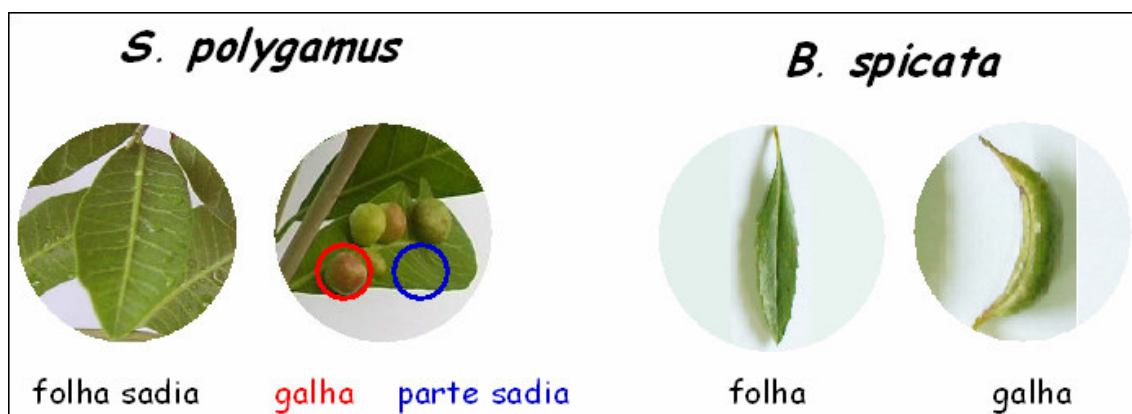


Figura 9. Foto de amostras representativas de folhas e galhas de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

## 5 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES DE RETENÇÃO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO ÓLEO HIDRODESTILADO E DOS VOLÁTEIS DO HEADSPACE DE FOLHAS E GALHAS DE *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*

Os índices de retenção dos compostos do óleo hidrodestilado foram obtidos empregando-se uma solução 1% em hexano volume/volume (v/v) de padrões de alcanos lineares (C9-C24) e uma solução hexânica de mesma concentração de óleo essencial. De cada uma destas soluções foram injetados 0,5  $\mu$ L em triplicata, no GC-FID.

Para determinação de índices de retenção por HS-SPME, foi feito um estudo preliminar para verificação das condições de extração (tempo e temperatura de extração) para diferentes grupos de alcanos, tendo em vista suas volatilidades distintas. Com base nesse estudo, os alcanos foram divididos em três grupos: C9-C12, C13-C16 e C17-C20. Todas as soluções foram preparadas a 1% em metanol (v/v) em balão volumétrico, seguidas de diluição em 2 mL água em frascos de 10 mL (Tabela I). A extração dos diferentes grupos de compostos foi realizada em frascos de vidro, extraíndo-se primeiramente os menos voláteis e ao final, os mais voláteis.

Todas as injeções foram realizadas em GC/qMS. As condições cromatográficas foram as mesmas usadas para o óleo, sendo o modo de injeção “splitless”.

Tabela I. Condições experimentais empregadas durante a extração de alcanos lineares, utilizando-se HS-SPME:

<b>Padrões alcanos</b>	<b>Concentração</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo de extração(min.)</b>
C9-C12	250 µL/mL água	~20	1
C13-C16	250 µL/mL água	30	1
C17-C20	500 µL/mL água	30	5

## **6 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (GC-FID) E CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC/qMS)**

As análises cromatográficas foram realizadas em GC-FID (GC17A, Shimadzu) e GC/qMS (GCMS-QP5050, Shimadzu) equipados com coluna OV5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Estado Unidos) e Supelcowax10 (Supelco, Estados Unidos), ambas de comprimento 30m, diâmetro interno 0,25 mm e espessura de filme 0,25 µm, gás de arraste hélio com pureza analítica de 99,999% (WhiteMartins, Brasil). As condições operacionais empregadas estão listadas na Tabela II.

A identificação tentativa dos compostos presentes no óleo essencial, bem como no *headspace* das plantas picadas foi feita por meio de comparação entre os índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI, do inglês “*Linear Temperature Programmed Retention Index*”), obtidos experimentalmente, com os fornecidos pela literatura,<sup>114</sup> em conjunto com a comparação dos espectros

de massas dos compostos desconhecidos e os da biblioteca Wiley. A identificação de n-heptano e n-nonano foi confirmada por co-injeção com padrões.

Tabela II. Condições operacionais para separação cromatográfica dos compostos presentes no óleo essencial de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

<b>Cromatografia Gasosa</b>	
Programa de temperatura OV5	60 °C – 3 °C/min – 250 °C
Injetor e detector	250 °C
Programa de temperatura Supelcowax10	40 °C – 3 °C/min – 220 °C
Injetor e detector	220 °C
Fluxo	1 mL/min
Split	1:10
<b>Espectrometria de massas com impacto de elétrons</b>	
Faixa de varredura de massa	45 m/z a 400 m/z
Velocidade de escaneamento	1000 amu/s
Voltagem do detector	2 KV
Intervalo de escaneamento	0,5 s

Para análise dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação foi injetado um volume de 0,5 µL, em triplicata, de uma solução hexânica 1% (v/v). Para os VOC presentes no *headspace*, a análise foi realizada em quintuplicata. Em todas as análises cromatográficas, a variação entre os tempos de retenção foi inferior a 0,02 min para um mesmo composto, dentro de sua triplicata ou quintuplicata. As mesmas soluções de óleo essencial usadas na análise qualitativa foram empregadas para análise quantitativa em um GC-FID. Os percentuais de cada composto na mistura foram calculados considerando-se o somatório das áreas dos picos cromatográficos equivalente a 100% dos compostos no óleo volátil (método de normalização).<sup>115</sup>

*CAPÍTULO IV*  
*RESULTADOS E DISCUSSÃO*



## 1 HIDRODESTILAÇÃO COM CLEVINGER

### 1.1 *Schinus polygamus*

As hidrodestilações (HD) de folhas secas e frescas foram realizadas com a finalidade de comparar qualitativamente e quantitativamente o perfil volátil de *S. polygamus* encontrado na região de Guaíba, Porto Alegre e Viamão com aquele reportado na literatura para plantas nativas do Chile e da Argentina.<sup>39;40</sup> O óleo volátil de folhas frescas foi obtido para fins de comparação com os compostos voláteis obtidos por HS-SPME.

Os valores de rendimento obtidos estão na Tabela III, tanto para folhas frescas como secas, e também para frutos. A literatura não apresenta valores de rendimento para o óleo volátil de *S. polygamus*.

A identificação tentativa dos compostos presentes no óleo de *S. polygamus* foi realizada conforme descrito no item 6 do Capítulo 3. Nos casos em que a identificação não foi possível, o componente foi considerado “não identificado” (ni) e para alguns destes compostos, foi citado o grupo ao qual o composto possivelmente pertence, conforme Tabela IV, a qual apresenta os resultados das análises cromatográficas do óleo com seus respectivos LTPRI.

A comparação entre os óleos voláteis extraídos das folhas de diferentes locais mostrou que eles apresentam mais de 85 % de similaridade na sua constituição. O n-nonano foi à substância majoritária em todas as amostras, responsável por mais de 77% da composição do óleo. Embora a composição dos óleos voláteis das três amostras de folhas sadias coletadas em Guaíba (Schfg), Viamão (Schfv) e Porto Alegre (Schfp) apresentem uma grande variedade de substâncias, estas diferenças perfazem menos de 15% da composição total e em

grande parte devem-se à presença de compostos presentes em pequenas quantidades.

Tabela III. Rendimentos (m/m) obtidos na hidrodestilação de folhas e frutos de *Schinus polygamus*.

Local da amostragem	HD	Rendimento base úmida (%)	Rendimento base seca (%)	Obs.
Guaíba	1	0,5	-	a
	2	-	0,7	a
	3	0,2	0,4	a
	4	0,7	0,8	a
	5	0,8	0,9	a
	6	0,7	0,8	a
P. Alegre (UFRGS)	7	0,4	0,6	a
	8	0,2	0,7	b
	9	0,1	0,2	a
Viamão (FEPAGRO)	10	-	-	a

Cálculos de rendimento foram realizados com base na massa das folhas ou frutos e do óleo obtidos destes (m/m); a. folhas; b. frutos.

No óleo essencial dos frutos (Schfrp) de *S. polygamus*, o n-nonano também foi à substância majoritária, porém, outros compostos como o germacreno D, o  $\alpha$ -muroleno, o  $\alpha$ -cadinol e o  $\delta$ -cadineno foram detectados em percentual de 32%. Estes resultados mostram um perfil de compostos voláteis bem diferente daquele encontrado na literatura para esta planta. Na planta nativa da Argentina, os dois compostos mais abundantes do óleo das folhas foram o limoneno e o  $\alpha$ -felandreno,<sup>39</sup> enquanto que no estudo de uma planta chilena, os compostos majoritários das folhas foram  $\beta$ -pineno, 1-decanol,  $\alpha$ -terpineol e 4-terpineol. O óleo essencial dos frutos desta mesma planta chilena apresentou como compostos majoritários os terpenóides  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol, murelol,  $\alpha$ -pineno e limoneno (Tabela V).<sup>40</sup>

O total de compostos detectados nos óleos essenciais de folhas de *S. polygamus* foi de 29 na planta de Guaíba, 30 na de Porto Alegre e 17 na de Viamão. Os frutos apresentaram 40 compostos. Todos estão listados na Tabela IV.

A Figura 10A mostra o cromatograma obtido com o óleo das folhas sadias de *S. Polygamus*, coletadas em Guaíba, e a Figura 10B o cromatograma ampliado, da mesma forma as Figuras 11A, 11B, 12A, 12B, 13A, 13B e 13C apresentam os perfis cromatográficos do óleo hidrodestilado obtido de folhas sadias de *S. polygamus* coletados em Viamão, Porto Alegre e dos frutos coletados em Porto Alegre, respectivamente. A numeração apresentada corresponde a da Tabela IV.

Tabela IV. Identificação tentativa e análise quantitativa dos compostos de vários óleos voláteis de *Schinus polygamus*.

N°	Compostos	<i>Schinus polygamus</i>				Concentração (%)			
		IR OV5 <sup>e</sup>	IR Lit. <sup>f</sup>	IR Wax <sup>g</sup>	IR Lit. <sup>h</sup>	Schfg <sup>a</sup>	Schfv <sup>b</sup>	Schfp <sup>c</sup>	Schfrp <sup>d</sup>
1	n-nonano	900	900	901		85,4	77,8	77,0	29,4
2	álcool	906						2,0	
3	álcool	909						0,6	
4	álcool	922						1,5	
5	$\alpha$ -pineno	933	939				0,8	0,5	
6	ni	942						0,5	
7	ni	950						0,3	
8	ni	965						0,5	
9	ni	989					0,3		
10	<i>trans</i> -isolimoneno	1000	985				0,5		
11	n-octanal	1000	999	1293		0,3		0,3	4,9
12	( <i>Z</i> )-acetato de hexenila	1007	1005					0,4	
13	<i>o</i> -cimeno	1023	1026					0,3	
14	ni	1025							0,1
15	limoneno	1027	1029			0,5		2,9	
16	1,8-cineol	1031	1031	1206		0,1		0,5	
17	2-acetato de heptila	1039	1044						0,1
18	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	1045	1050	1252	1253	1,2	3,4	1,2	
19	n-octanol	1069	1068			0,2			4,4
20	cetona	1070						0,2	
21	cetona	1083		1360		5,0	2,6	3,9	2,5
22	2-nonanona	1089	1090	1393		1,2			1,8
23	álcool	1096				tr			
24	n-undecano	1100	1100			2,1	1,4	1,4	1,2
25	acetato de heptila	1111	1115						0,1
26	ni	1115				tr		0,4	
27	<i>cis</i> -3-butanoato de hexenila	1185	1186					0,2	
28	salicilato de metila	1191	1192			0,1			
29	n-decanal	1202	1202	1501	1498	0,6	0,7	0,5	3,9
30	acetato de octila	1209	1214						1,6
31	ni	1219							0,1
32	ni	1231						0,3	
33	geraniol	1257	1253			0,2			
34	n-decanol	1272	1270						5,0
35	ni (cetona)	1286				0,2			



N°	Compostos	<i>Schinus polygamus</i>				Concentração (%)			
		IR OV5 <sup>e</sup>	IR Lit. <sup>f</sup>	IR Wax <sup>g</sup>	IR Lit. <sup>h</sup>	Schfg <sup>a</sup>	Schfv <sup>b</sup>	Schfp <sup>c</sup>	Schfrp <sup>d</sup>
36	2-undecanona	1291	1294	1602		1,1	1,2	0,8	
37	ni	1292							0,1
38	δ-elemeno	1338	1338	1466	1464		1,6	0,4	0,3
39	α-copaeno	1378	1377						0,2
40	β-elemeno	1393	1391						0,4
41	dodecanal	1406	1409			0,3		0,2	0,4
42	α-gurjuneno	1412	1410	1521	1519				0,3
43	α-cis-bergamoteno	1416	1413			0,1	0,2		
44	(E)-cariofileno	1422	1419	1586	1586				0,4
45	aromadendreno	1442	1441						0,2
46	α-humuleno	1456	1455	1661	1667				0,4
47	aloaromadendreno	1464	1460						0,3
48	γ-muroloeno	1476	1480						0,2
49	α-amorfeno	1479	1485						0,4
50	germacreno D	1483	1485	1702	1707	0,3	3,1	1,2	12,9
51	cis-β-guaieno	1492	1493				0,9		
52	ni	1493				tr			
53	biciclogermacreno	1499	1500	1729	1731	0,1		0,2	0,5
54	α-muroloeno	1500	1500	1720	1714				8,1
55	(E,E)-α-farneseno	1507	1506	1749	1744	0,6	2,5	1,0	
56	γ-cadineno	1516	1514						0,5
57	dodecanoato de metila	1524	1526			tr			
58	δ-cadineno	1526	1523	1753	1754				5,4
59	germacreno B	1560	1561				0,4		
60	(E)-nerolidol	1564	1563					0,3	
61	(Z)-3-benzoato de hexenila	1570	1567					0,2	
62	ledol	1572	1569						0,2
63	dendrolasina	1578	1572			0,2	1,1		
64	4-germacrenol D	1578	1576						0,6
65	ni	1580				0,1			
66	globulol	1588	1585	2073	2073				0,4
67	viridiflorol	1595	1593						0,5
68	guaiol	1607	1601						0,2
69	ni	1631					1,4		0,2
70	ni	1632						0,3	
71	ni	1634				0,1			
72	epi-α-murolol	1645	1642						3,4
73	α-murolol	1649	1646						0,6
74	α-cadinol	1657	1654			tr			6,4
75	7(11)eudesmen-4-ol	1696	1700						1,4
76	benzoato de benzila	1763	1760			tr			
77	ni	2121				0,1			

a. óleo das folhas coletas em Guaíba (Schfg); b. óleo das folhas coletados na Viamão (Schfv); c. óleo das folhas coletas em Porto Alegre (Schp); d. óleo dos frutos coletados em Porto Alegre (Schfrp); e. índices de retenção OV5 calculados experimentalmente (IR OV5); f. índices de retenção em coluna OV5 registrados na literatura (IR Lit.)<sup>114</sup>; g. índices de retenção em coluna Carbowax calculados experimentalmente (IR Wax); h. índices de retenção em coluna Carbowax registrados na literatura (IR Lit.); ni = não identificado; tr = compostos presentes no nível de traços.

Tabela V. Comparação da composição (%) dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Schinus polygamus* coletados em Porto Alegre (Brasil), com a composição de um óleo essencial chileno e outro argentino de plantas da mesma espécie.

N°	Compostos	Óleo hidrodestilado de <i>Schinus polygamus</i> (% área)				
		brasileira		chilena <sup>40</sup>		argentina <sup>39</sup>
		Folhas	Frutos	Folhas	Frutos	Folhas
1	n-nonano	77,0	29,4			
2	álcool	2,0				
3	álcool	0,6				
4	álcool	1,5				
5	$\alpha$ -tujeno			0,62	0,17	
6	$\alpha$ -pineno	0,5		4,06	6,55	
7	ni	0,5				
8	ni	0,3				
9	ni	0,5				
10	sabineno					3,7
11	$\beta$ -pineno			8,91	19,07	
12	mirceneno			0,26		3,3
13	n-octanal	0,3	4,9			
14	$\alpha$ -felandreno					12,9
15	(Z)-acetato de hexenila	0,4				
16	$\alpha$ -terpineno					6,2
17	p-cimeno			0,96	1,83	
18	$\sigma$ -cimeno	0,3				
19	ni		0,1			
20	limoneno	2,9		2,36	5,75	22,6
21	1,8-cineol	0,5				
22	(Z)- $\beta$ -ocimeno					3,0
23	2-acetato de heptila		0,1			
24	(E)- $\beta$ -ocimeno	1,2				1,0
25	n-octanol		4,4	0,20	3,55	
26	cetona	0,2				
27	cetona	3,9	2,5			
28	óxido de <i>cis</i> -linalol					2,0
29	2-nonanona		1,8			
30	linalol			1,37	0,79	
31	n-undecano	1,4	1,2			
32	acetato de heptila		0,1			
33	ni	0,4				
34	endo-fenchol			0,51	0,41	
35	<i>cis</i> -p-2-meten-1-ol					2,0
36	<i>trans</i> -pinocarveol			0,93	1,10	
37	<i>trans</i> -p-2-meten-1-ol					2,1

N°	Compostos	Óleo hidrodestilado de <i>Schinus polygamus</i> (% área)				
		brasileira		chilena <sup>40</sup>		argentina <sup>39</sup>
		Folhas	Frutos	Folhas	Frutos	Folhas
38	cânfora				2,46	0,6
39	borneol			0,33	1,47	
40	4-terpineol			5,98	3,96	
41	<i>cis</i> -3-butanoato de hexenila	0,2				
42	$\alpha$ -terpineol			6,83	12,11	
43	mirtenol			1,16	0,77	
44	n-decanal	0,5	3,9			
45	acetato de octila		1,6			
46	ni		0,1			
47	ni	0,3				
48	<i>trans</i> -geraniol			0,55		
49	n-decanol		5,0	8,56	1,31	
50	acetato de endobornil				0,32	
51	2-undecanona	0,8				
52	ni		0,1			
53	$\delta$ -elemeno	0,4	0,3			
54	$\alpha$ -cubebeno				0,11	
55	acetato de citronelil					0,9
56	$\alpha$ -copaeno		0,2			
57	$\beta$ -cubebeno			0,42		
58	$\beta$ -elemeno		0,4			0,8
59	ni					0,2
60	longifoleno					2,0
61	dodecanal	0,2	0,4			
62	$\alpha$ -gurjuneno		0,3			0,8
63	( <i>E</i> )-cariofileno		0,4	2,96	0,10	0,1
64	ni					0,1
65	aromadendreno		0,2	0,44		
66	$\alpha$ -humuleno		0,4	0,69	0,14	0,8
67	( <i>E</i> , $\beta$ )-farneseno					0,8
68	aloaromadendreno		0,3			
69	1-dodecanol			5,57	0,34	
70	$\gamma$ -muroloeno		0,2			
71	$\alpha$ -amorfenol		0,4			
72	germacreno D	1,2	12,9			3,3
73	biciclogermacreno	0,2	0,5			
74	epibiciclosesquifelandreno			0,58	0,16	
75	$\alpha$ -muroloeno		8,1	0,56	1,54	0,6
76	( <i>E</i> , <i>E</i> )- $\alpha$ -farneseno	1,0				
77	$\gamma$ -cadineno		0,5	0,32	1,46	0,1
78	$\delta$ -cadineno		5,4	3,46	3,37	3,2

N°	Compostos	Óleo hidrodestilado de <i>Schinus polygamus</i> (% área)				
		brasileira		chilena <sup>40</sup>		argentina <sup>39</sup>
		Folhas	Frutos	Folhas	Frutos	Folhas
79	germacreno B					2,8
80	elemol			0,41	0,56	
81	(E)-nerolidol	0,3				
82	(Z)-3-benzoato de hexenila	0,2				
83	ledol		0,2			
84	dendrolasina					
85	4-germacrenol D		0,6			
86	espatulenol			0,81		3,7
87	óxido de cariofileno					2,5
88	globulol		0,4			
89	viridiflorol		0,5		0,47	
90	guaiol		0,2			
91	ni		0,2			
92	ni	0,3				
93	epoxi-aloaromadendreno			1,68		
94	epi- $\alpha$ -murulol		3,4			
95	selina-3,11-dien-6- $\alpha$ -ol			0,68	0,29	
96	$\alpha$ -murolol		0,6		8,19	
97	cubenol					5,6
98	$\beta$ -eudesmol					1,5
99	$\alpha$ -cadinol		6,4	1,05		7,1
100	longifolol				1,58	
101	7(11)eudesmen-4-ol		1,4			

O óleo obtido, no presente estudo, se destaca porque, além de apresentar uma composição bem diferente da citada na literatura para outras plantas de *S. polygamus*,<sup>39;40</sup> também apresenta uma composição atípica para óleos essenciais, tendo no n-nonano seu principal constituinte. Na literatura, não foi encontrada nenhuma planta que apresentasse o n-nonano como composto majoritário de óleo volátil ou pelo menos como um dos compostos mais representativos. Geralmente, quando este composto se faz presente em misturas voláteis de plantas, encontra-se em pequenas quantidades ou em nível de traços.<sup>15;116</sup> Esse resultado sugere que as populações de *S. polygamus* estudadas representam um ecótipo particularmente diferente das plantas dessa espécie estudadas na Argentina e no Chile, quanto à sua composição de óleo essencial, ou seja, sofre alterações no seu metabolismo em função da localização geográfica.<sup>117</sup>

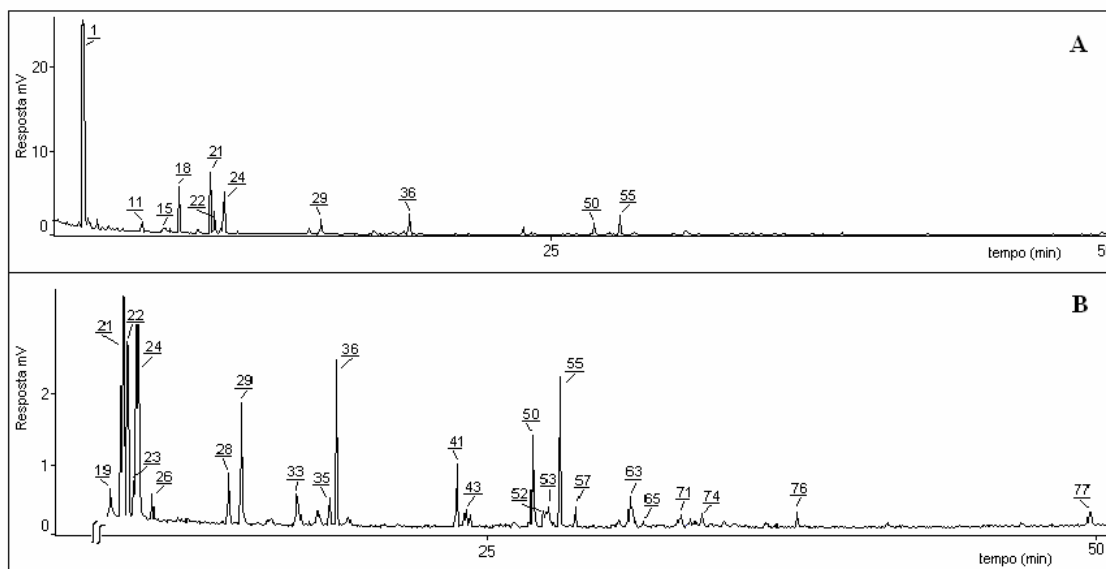


Figura 10. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas sadias de *Schinus polygamus* coletadas em Guaíba. A Figura 10B corresponde a ampliação de uma parte do cromatograma da Figura 10A. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e a numeração corresponde à apresentada na Tabela IV.

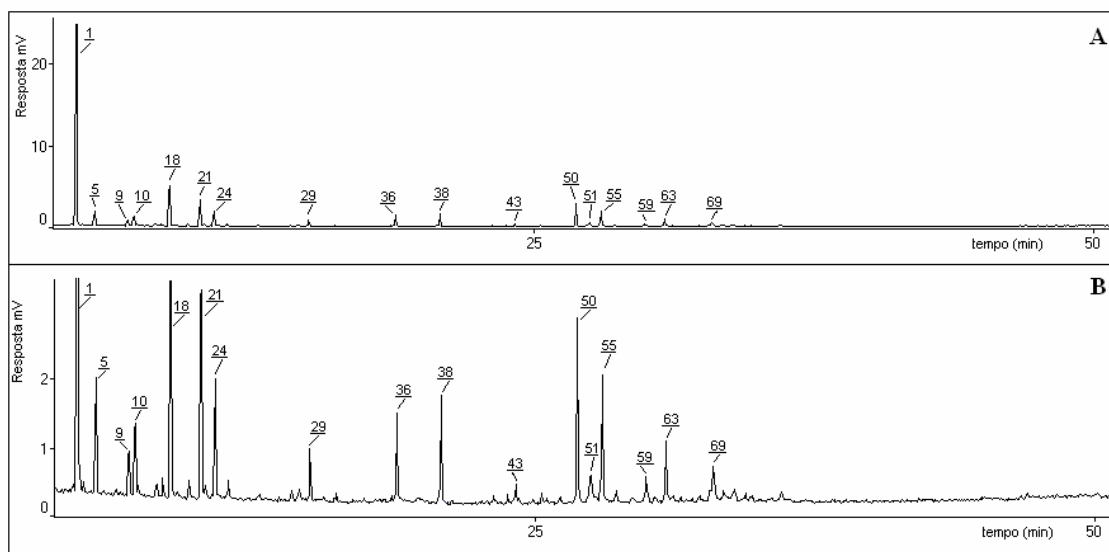


Figura 11. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas sadias de *Schinus polygamus* coletadas em Viamão. A Figura 11B corresponde ao cromatograma ampliado da Figura 11A. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e a numeração corresponde à apresentada na Tabela IV.

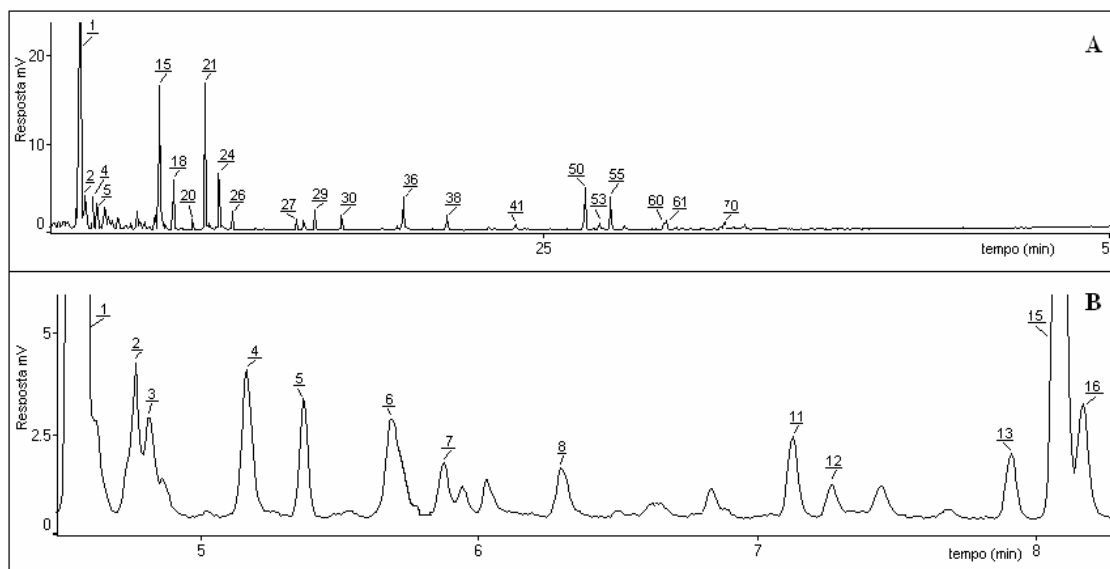


Figura 12. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas sadias de *Schinus polygamus* coletadas em Porto Alegre. A Figura 12B corresponde ao cromatograma ampliado da região entre 4,4 e 8,3 min do cromatograma da Figura 12A. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e a numeração corresponde à apresentada na Tabela IV.

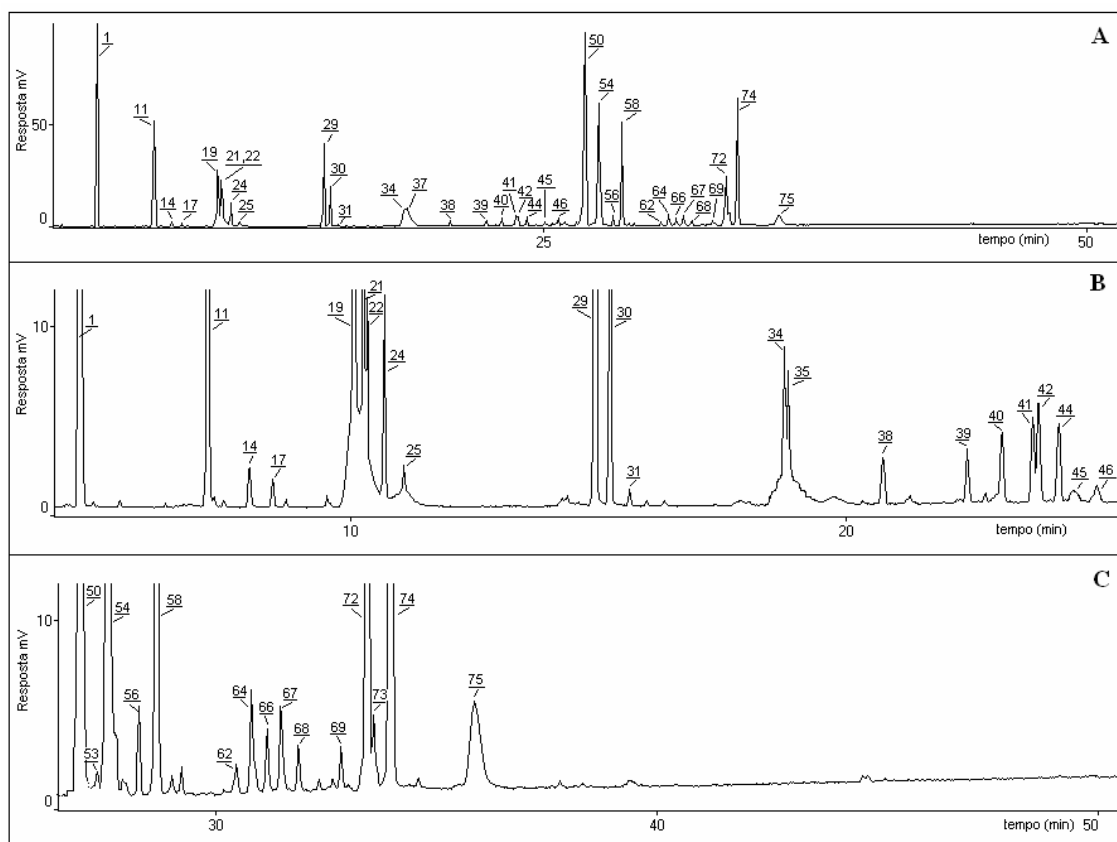


Figura 13. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação dos frutos de *Schinus polygamus* coletados em Porto Alegre. A Figura 13B e 13C correspondem à ampliação de duas partes do cromatograma da Figura 13A. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e a numeração corresponde à apresentada na Tabela IV.

## 1.2 *Baccharis spicata*

As hidrodestilações foram realizadas com a finalidade de identificar qualitativa e quantitativamente o perfil de compostos voláteis das folhas de *B. spicata* coletadas na região de Porto Alegre, comparando o mesmo com os compostos voláteis obtidos por HS-SPME.

A literatura não apresenta nenhum estudo sobre o óleo essencial das folhas de *B. spicata*, tornando assim inviável a comparação dos resultados deste trabalho

com o de outras plantas de *B. spicata*. Em virtude do baixo volume de óleo obtido após a hidrodestilação, foi necessário o auxílio de um solvente (hexano) para sua coleta, não sendo possível a determinação do rendimento.

A identificação tentativa dos compostos presentes no óleo de *B. spicata* foi realizada conforme descrito no item 6 do Capítulo 3. Quando não foi possível fazer a identificação, o componente foi considerado “não identificado” (ni), conforme Tabela VI, a qual apresenta os resultados das análises cromatográficas do óleo com seus respectivos LTPRI.

Tabela VI. Identificação tentativa e análise quantitativa dos compostos do óleo volátil das folhas de *Baccharis spicata*.

N°	Compostos	<i>Baccharis spicata</i>				Concentração (%)
		IR OV5 <sup>a</sup>	IR Lit. <sup>b</sup>	IR Wax <sup>c</sup>	IR Lit. <sup>d</sup>	
1	$\alpha$ -pineno	933	939	1016	1015	0,7
2	$\beta$ -pineno	976	979	1103	1108	8,0
3	mirreno	988	991	1160	1160	0,6
4	limoneno	1027	1029	1195	1195	5,4
5	$\alpha$ -terpineol	1189	1189			0,7
6	( <i>E</i> )-cariofileno	1418	1419			4,4
7	$\alpha$ -humuleno	1451	1455	1658	1657	2,0
8	germacreno D	1479	1485	1699	1707	2,8
9	biciclogermacreno	1494	1500	1723	1720	2,0
10	$\delta$ -cadineno	1522	1523	1748	1748	1,7
11	espatulenol	1575	1578	2124	2120	34,3
12	óxido de cariofileno	1588	1583	1966	1964	8,1
13	viridiflorol	1594	1593			1,8
14	ni	1604				2,0
15	ni	1609				3,0
16	ni	1638				3,4
17	$\alpha$ -murolol	1643	1646			2,4
18	$\alpha$ -cadinol	1656	1654	2228	2223	4,5
19	ni	1690				9,8
20	ni	1734				2,4

a. índice de retenção OV5 calculados experimentalmente (IR OV5); b. índices de retenção em coluna OV5 registrados na literatura (IR Lit.)<sup>114</sup>; c. índice de retenção Carbowax calculados experimentalmente (IR Wax); d. índices de retenção em coluna Carbowax registrados na literatura (IR Lit.);ni = não identificado.

A Figura 14A mostra o cromatograma obtido com o óleo das folhas de *B. spicata* coletadas em Porto Alegre e a Figura 14B e 14C a ampliação do cromatograma da Figura 14A. A numeração apresentada corresponde a



apresentada na Tabela VI. No óleo da *B. spicata* foram detectados 20 compostos, sendo destes 15 tentativamente identificados por meio de seus índices de retenção e espectros de massas. Este óleo contém alto teor do sesquiterpeno espatulenol, que representou 34,3 % da amostra. Entre os outros compostos tentativamente identificados que se destacam, podem ser citados os monoterpenos  $\beta$ -pineno (8,0 %) e o limoneno (5,4%), o sesquiterpeno (*E*)-cariofileno (4,4 %) e o sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno (8,1 %). Embora a literatura não forneça informações relativas à composição química do óleo essencial da *B. Spicata*, outras espécies de *Baccharis* têm seus óleos voláteis bem caracterizados. Entre essas, pode-se citar a *B. dracunculifolia*, que é conhecida por apresentar um perfil rico em mono-, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, destacando-se entre os seus constituintes o (*E*)-nerolidol, motivo pelo qual é usada na perfumaria.<sup>61</sup> Um estudo, que comparou dois métodos de extração para essa espécie, apresentou um óleo hidrodestilado com alta concentração de  $\beta$ -pineno, limoneno, (*E*)-nerolidol e espatulenol. Entretanto, quando o óleo foi extraído com CO<sub>2</sub> supercrítico, os compostos majoritários foram (*E*)-nerolidol, e espatulenol.<sup>62</sup> Este trabalho exemplifica a influência da técnica de extração e das condições de extração empregadas sobre a composição do óleo volátil. Tal fato também pode ser observado neste trabalho, como veremos no item 2.3 deste capítulo. A caracterização de óleos voláteis hidrodestilados de sete espécies de *Baccharis* apresentaram como constituintes majoritários o  $\beta$ -cariofileno na *B. caprariaefolia*, o  $\beta$ -selineno e (*E*)-nerolidol na *B. dracunculifolia*, o  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -cariofileno e espatulenol na *B. erioclada*, o  $\delta$ -cadineno e (*E*)-nerolidol na *B. myriocephala*, o espatulenol na *B. platipoda* e *B. tridentada* e na *B. vincaefolia* o  $\beta$ -cariofileno e  $\delta$ -cadineno.<sup>60</sup> Estes dados da literatura mostram que a presença majoritária de sesquiterpenos e seus derivados oxigenados é comum ao gênero. O óleo da *B. spicata* confirma esta observação, visto que o componente majoritário do óleo é o espatulenol.

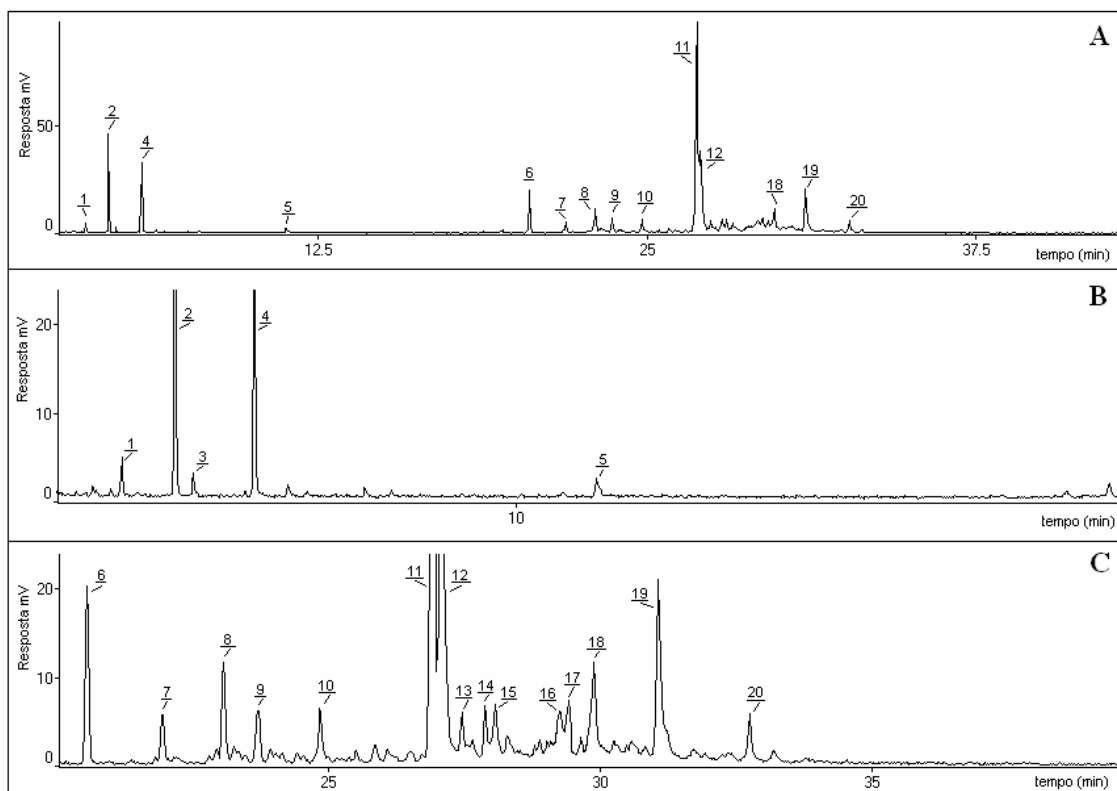


Figura 14. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas de *Baccharis spicata* coletadas em Porto Alegre. A Figura 14B e 14C corresponde à ampliação de duas partes do cromatograma da Figura 14A. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e a numeração corresponde à apresentada na Tabela VI.

## **2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO *HEADSPACE* DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FOLHAS E GALHAS DE *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.**

### **2.1 ESCOLHA DA MELHOR FIBRA PARA EXTRAÇÃO DOS VOLÁTEIS DE *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata***

Essa etapa do trabalho envolveu uma série de análises preliminares com a finalidade de escolher qual dos filmes poliméricos disponíveis era o mais adequado para fazer a extração dos compostos voláteis das folhas e galhas de *S. polygamus* e *B. spicata*. Tendo em vista que os óleos voláteis das espécies em estudo são, de forma geral, compostos de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados, hidrocarboneto sesquiterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados, foram escolhidos quatro compostos que representassem estas classes. Os compostos escolhidos foram *trans*- $\beta$ -ocimeno, linalol, biciclogermacreno e viridiflorol, respectivamente.

A *Eugenia uniflora* (pitangueira) foi escolhida para a realização deste experimento, por ser uma espécie cujo óleo volátil é rico tanto em monoterpênicos como em sesquiterpênicos,<sup>118</sup> por apresentar bom rendimento em óleo volátil (1 a 1,8 %),<sup>119</sup> e também por estar sujeita à ação de galhadores. A determinação da composição do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* apresentou um perfil cromatográfico muito similar a de outros óleos voláteis de plantas da mesma espécie.<sup>118;119</sup> Os compostos foram tentativamente identificados por meio dos índices de retenção calculados experimentalmente, seus espectros de massas e dados oferecidos pela literatura. A caracterização dos VOC permitiu identificar como compostos majoritários germacreno D (11,0 %), furanodieno (21,9 %) e biciclogermacreno (25,1 %). A HS-SPME das folhas de *E. uniflora* foi realizada com todas as fibras disponíveis, PDMS 7  $\mu$ m StableFlex, PDMS 30  $\mu$ m, PDMS 100  $\mu$ m, PDMS-DVB 65  $\mu$ m StableFlex, CAR-PDMS 85  $\mu$ m StableFlex, CW(PEG) 60  $\mu$ m metal, PA 85  $\mu$ m, DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex e,

DVB-CAR-PDMS 50/30 metal. O filme polimérico DVB-CAR-PDMS apresentou a maior capacidade de extração dos compostos selecionados (Figura 15), tendo também proporcionado uma extração mais abrangente, isto é, extraiu o maior número de compostos (Figura 16). O número médio de picos cromatográficos detectados foi: 16 com a fibra PDMS 7  $\mu\text{m}$  StableFlex, 47 com a PDMS30  $\mu\text{m}$ , 50 com a PDMS100  $\mu\text{m}$ , 48 com a PA 85  $\mu\text{m}$ , 24 com a CW(PEG) 60  $\mu\text{m}$  metal, 65 com a CAR/PDMS 85  $\mu\text{m}$  StableFlex, 84 com a PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  StableFlex, 101 com a DVB/CAR/PDMS 50/30 StableFlex, e 109 com a DVB/CAR/PDMS 50/30 metal.

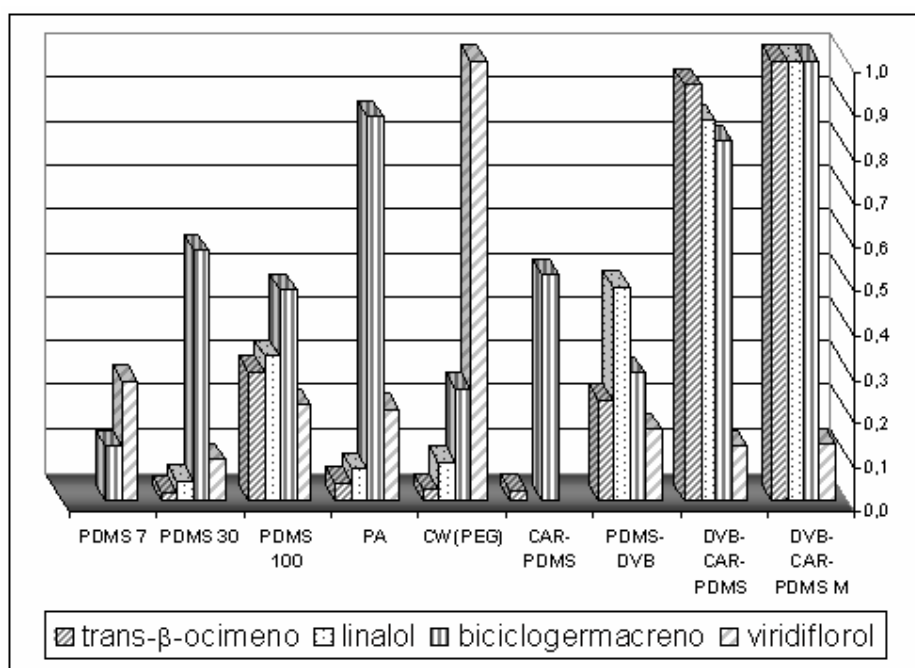


Figura 15. Representação da média das áreas normalizadas dos quatro compostos voláteis monitorados na fase gasosa de folhas de *Eugenia uniflora*, os quais foram extraídos com nove tipos de filmes poliméricos.

Quando as três primeiras fibras (Figura 16A, 16B e 16C) foram testadas, ocorreu um aumento da capacidade de extração com o aumento da espessura do revestimento, resultado este, já esperado, uma vez que ocorreu um aumento da

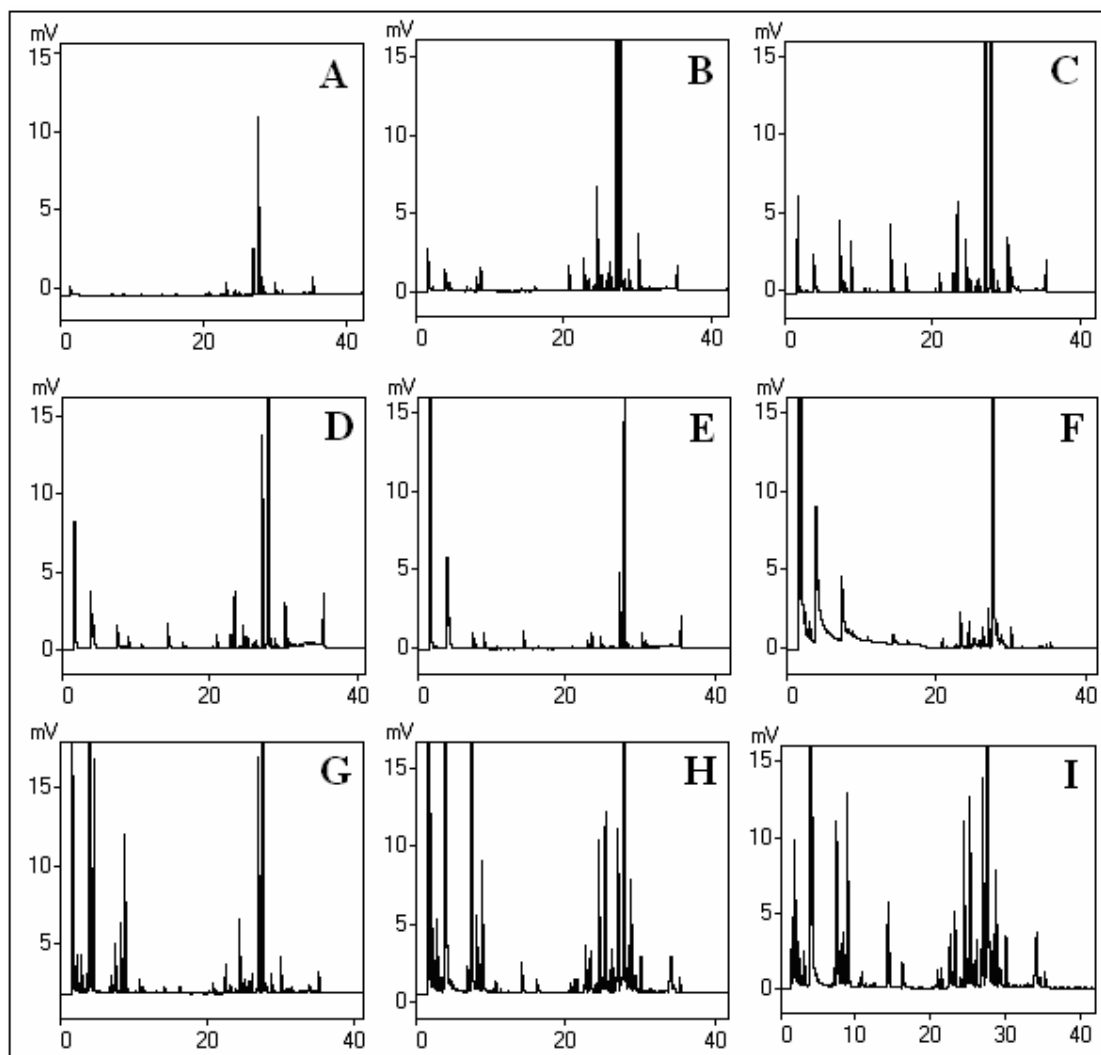


Figura 16. Cromatogramas (GC-FID) mostrando comparação dos resultados obtidos após extração do headspace de folhas picadas de *Eugenia uniflora* com as fibras 16A. PDMS 7  $\mu\text{m}$  StableFlex, 16B. PDMS 30  $\mu\text{m}$ , 16C. PDMS 100  $\mu\text{m}$ , 16D. PA 85  $\mu\text{m}$ , 16E. CW(PEG) metal 60  $\mu\text{m}$ , 16F. CAR-PDMS 85  $\mu\text{m}$  StableFlex, 16G. PDMS-DVB 65  $\mu\text{m}$  StableFlex, 16H. DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex e 16I. DVB-CAR-PDMS 50/30 metal. Condições cromatográficas citadas no item 6 do Capítulo 3.

área de sorção, à medida que o revestimento tornou-se mais espesso. Apesar de o revestimento polimérico PDMS ser o mais usado para extração de voláteis e de apresentar afinidade por mono- e sesquiterpenos, alguns estudos mostram que este revestimento não é eficiente na extração de compostos mais voláteis que os monoterpenos.<sup>6;101;111</sup> Isto pode ser observado em um trabalho que reporta a

composição volátil de agulhas de coníferas. Quando comparados, o PDMS 100  $\mu\text{m}$  e o CAR-PDMS, o revestimento apolar PDMS apresentou boa capacidade de extração para mono- e sesquiterpenos, porém não extraiu compostos mais voláteis do que estes, embora a presença dos componentes mais voláteis tenha sido observada no cromatograma obtido através da dessorção de CAR-PDMS.<sup>6</sup>

O filme polimérico PA geralmente demanda maiores tempos de extração e dessorção e pode resultar em caudas nos picos cromatográficos.<sup>120</sup> Além disso, a combinação de temperatura elevada e presença de oxigênio no pósito de injeção pode levar ao escurecimento da fibra e à sua rápida inutilização.<sup>94</sup> Neste estudo, a fibra apresentou boa capacidade de sorção para a substância majoritária (bicyclogermacreno) (Figura 16D), porém, quando o número total de compostos extraídos é comparado a algumas das fibras testadas, a capacidade de extração foi considerada baixa.

A CW(PEG) metal é uma fibra nova que foi lançada para substituir a CW-DVB devido à indisponibilidade de matéria-prima para sua fabricação.<sup>121</sup> A literatura ainda não apresenta resultados sobre seu desempenho, porém a CW-DVB é considerada uma fibra adequada para analitos polares, sendo facilmente oxidável quando em presença de oxigênio e temperatura elevada.<sup>94</sup> Publicações relativas à performance da CW-DVB mostram que ela é pouco usada, por apresentar baixa capacidade de extração,<sup>5;95;96</sup> fato este confirmado neste trabalho para a CW(PEG), pois, dentre todas as fibras testadas, com exceção da PDMS 7 $\mu\text{m}$ , esta foi a que apresentou menor capacidade de extração (Figura 16E).

A CAR-PDMS, que também é uma fibra mista, apresenta uma fase porosa que determina o tamanho dos analitos retidos,<sup>122</sup> sendo indicada para análises em que os compostos de interesse apresentam entre 2 e 12 carbonos. Moléculas maiores ficam fortemente retidas, dificultando sua dessorção, enquanto que analitos pequenos difundem-se rapidamente pelos poros e, por isso, são facilmente dessorvidos.<sup>94;122</sup> A este filme polimérico é atribuída a capacidade de provocar rearranjo molecular em alguns terpenóides, além de apresentar efeito de memória.<sup>123</sup> Na extração dos voláteis das folhas de pitangueira, esta fibra apresentou como desvantagem à formação de cauda nos picos de alguns dos compostos (Figura 16F), o que pode ser consequência de forte retenção dos analitos. Além disso, sua capacidade de extração mostrou-se moderada.

A PDMS-DVB é constituída por um polímero similar ao da CAR-PDMS, entretanto apresenta uma fase porosa diferente e é mais eficiente para analitos que contêm entre 6 e 15 átomos de carbono na molécula. Devido à sua alta capacidade de adsorção, é indicada para analitos presentes em nível de traços.<sup>94</sup> Neste trabalho, foi possível observar sua eficiência de extração (número de compostos detectados e intensidade de sinal) (Figura 16G) foi superior à dos revestimentos anteriormente citados, em especial no que diz respeito à extração de compostos de baixa massa molecular (região do cromatograma onde os tempo de retenção estão abaixo de 10 min). Entretanto, a performance deste revestimento mostrou-se inferior à demonstrada pela fibra tripla DVB-CAR-PDMS (Figura 16H e 16I). A DVB-CAR-PDMS, considerada de polaridade intermediária<sup>101</sup> vem se destacando nos últimos anos pela freqüência com que tem sido preferida na extração de voláteis de diversas matrizes vegetais em detrimento de outros filmes poliméricos disponíveis, devido a sua performance superior.<sup>2;95;101;103;105-109</sup> Esta maior capacidade de sorção deve-se à presença de três camadas de filme polimérico, cada uma com composição distinta. A camada de DVB retém os analitos maiores e menos voláteis e permite que os menores e mais polares se difundam através da mesma e sejam retidos pelo filme de Carboxen.<sup>102</sup> O processo de sorção desta fibra porosa, com sua grande área superficial, é primordialmente adsorção.<sup>102</sup> Este tipo de fibra é indicado para compostos voláteis e semi-voláteis, que apresentem entre 3 a 20 carbonos,<sup>103</sup> além de cobrir uma ampla faixa de polaridade,<sup>104</sup> explicando assim, sua maior capacidade de sorção de diferentes analitos. Esta capacidade foi confirmada nesse trabalho, como é possível verificar pelo maior número de compostos obtidos nos cromatogramas das Figuras 16H (DVB-CAR-PDMS 50/30 StableFlex) e 16I (DVB-CAR-PDMS 50/30 metal). À vista destes resultados, foi escolhido o filme polimérico DVB-CAR-PDMS com guia de metal, porque além de ser o filme polimérico com maior capacidade de extração, também apresenta maior resistência à quebra, devido à sua agulha metálica mais flexível.

## 2.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS E GALHAS DE *Schinus polygamus*

A identificação tentativa dos compostos presentes na fase gasosa das folhas sadias, galhas e parte saudável das folhas galhadas, bem como a análise quantitativa dos mesmos, estão descritas no item 6 do Capítulo 3. Estes procedimentos permitiram a observação das diferenças qualitativas e quantitativas entre os três tipos de amostras investigadas, conforme mostrado na Tabela VII.

A Figura 17A mostra o cromatograma obtido por HS-SPME das folhas sadias (FS) da *S. polygamus*, coletadas em Porto Alegre, e as Figuras 17B e 17C correspondem à ampliação do cromatograma da Figura 17A. A Figura 17D refere-se ao branco da fibra DVB-CAR-PDMS. Da mesma forma as Figuras 18A, 18B, 18C, 19A, 19B e 19C apresentam o perfil cromatográfico da HS-SPME das galhas (G) e da parte saudável das folhas galhadas (PSFG) e suas ampliações, respectivamente. A numeração apresentada corresponde àquela que consta da Tabela VII.

Tabela VII. Diferenças qualitativas (identificação tentativa) e quantitativas encontradas nos cromatogramas provenientes da extração por HS-SPME dos voláteis das folhas sadias, galhas, partes sadias das folhas galhadas e óleo hidrodestilado de *Schinus polygamus*.

Nº	Compostos	IR <sup>d</sup>	IR Lit. <sup>e</sup>	Concentração (%)			
				FS <sup>a</sup>	G <sup>b</sup>	PSFG <sup>c</sup>	Óleo HD
1	<b>n-heptano*</b>			<b>44,8</b>	<b>38,2</b>	<b>40,3</b>	
2	ni			1,1	0,3	0,7	
3	ni			0,3			
4	ni			1,2	0,1	0,4	
5	ni			4,2	2,3		
6	<b>n-nonano*</b>	900	900	<b>35,3</b>	<b>24,4</b>	<b>27,6</b>	<b>77,0</b>
7	álcool	906					2,0
8	álcool	909					0,6
9	álcool	922					1,5
10	<b>α-pineno</b>	930	939		<b>17,6</b>		<b>0,5</b>
11	ni	942					0,5
12	ni	950					0,3
13	ni	965					0,5
14	<b>β-pineno</b>	971	979		<b>0,2</b>		
15	<b>mirreno</b>	986	991		<b>0,4</b>		



Nº	Compostos	IR <sup>d</sup>	IR Lit. <sup>e</sup>	Concentração (%)			
				FS <sup>a</sup>	G <sup>b</sup>	PSFG <sup>c</sup>	Óleo HD
16	n-octanal	1001	999				0,3
17	<i>cis</i> -3-acetato de hexenila	1002	1005	5,7	2,6	15,9	0,4
18	( <i>o</i> )-cimeno	1023	1026				0,3
<b>19</b>	<b>limoneno</b>	1023	1029	<b>0,1</b>	<b>5,4</b>		<b>2,9</b>
20	1,8- cineol	1031	1031				0,5
<b>21</b>	<b><math>\Delta</math>-3-careno</b>	1031	1031	<b>0,1</b>	0,5	0,5	
<b>22</b>	<b>(<i>Z</i>)-<math>\beta</math>-ocimeno</b>	1041	1037	<b>1,2</b>	<b>4,7</b>	<b>5,0</b>	
<b>23</b>	<b>(<i>E</i>)-<math>\beta</math>-ocimeno</b>	1045	1050				<b>1,2</b>
24	n-octanol	1067	1068			0,2	
25	cetona	1070					0,2
26	cetona	1080		0,3	0,1	0,3	3,9
27	cetona	1087				0,2	
28	álcool	1094		0,9		1,2	
29	n-undecano	1097	1100	3,5	1,8	2,5	1,4
30	ni	1112				0,4	0,4
31	ni	1138				0,2	
32	ni	1162				0,4	
33	<i>cis</i> -3-butanoato de hexenila	1181	1186	0,3	0,1	1,9	0,2
34	n-decanal	1203	1202				0,5
35	ni	1228		0,3		1,0	0,3
37	álcool	1300		0,3		0,2	
38	ni	1333				0,2	
39	$\delta$ -elemeno	1339	1338				0,4
40	dodecanol	1407	1409				0,2
<b>41</b>	<b><math>\alpha</math>-bergamoteno</b>	1410	1413		<b>0,8</b>		
<b>42</b>	<b>(<i>E</i>)-cariofileno</b>	1412	1419			<b>0,1</b>	
43	$\gamma$ -muroleno	1474	1480	0,1	0,3	0,6	
44	germacreno D	1483	1485				1,2
45	biciclogermacreno	1499	1500				0,2
46	( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -farneseno	1505	1506		0,1	0,2	1,0
47	ni	1509		0,3			
<b>48</b>	<b><math>\gamma</math>-cadineno</b>	1518	1514		<b>0,1</b>		
49	( <i>E</i> )-nerolidol	1564	1563				0,3
50	( <i>Z</i> )-3-benzoato de hexenila	1570	1567				0,2
51	ni	1632					0,3

a. folha sadia (FS); b. galha acrescida de 0,5 cm de folha em torno da mesma (G); c. parte saudável da folha galhada (PSFG); d. índices de retenção em coluna OV5 calculados experimentalmente; e. índices de retenção em coluna OV5 registrados na literatura<sup>114</sup>; ni = não identificado; \*compostos identificados por injeção de padrões

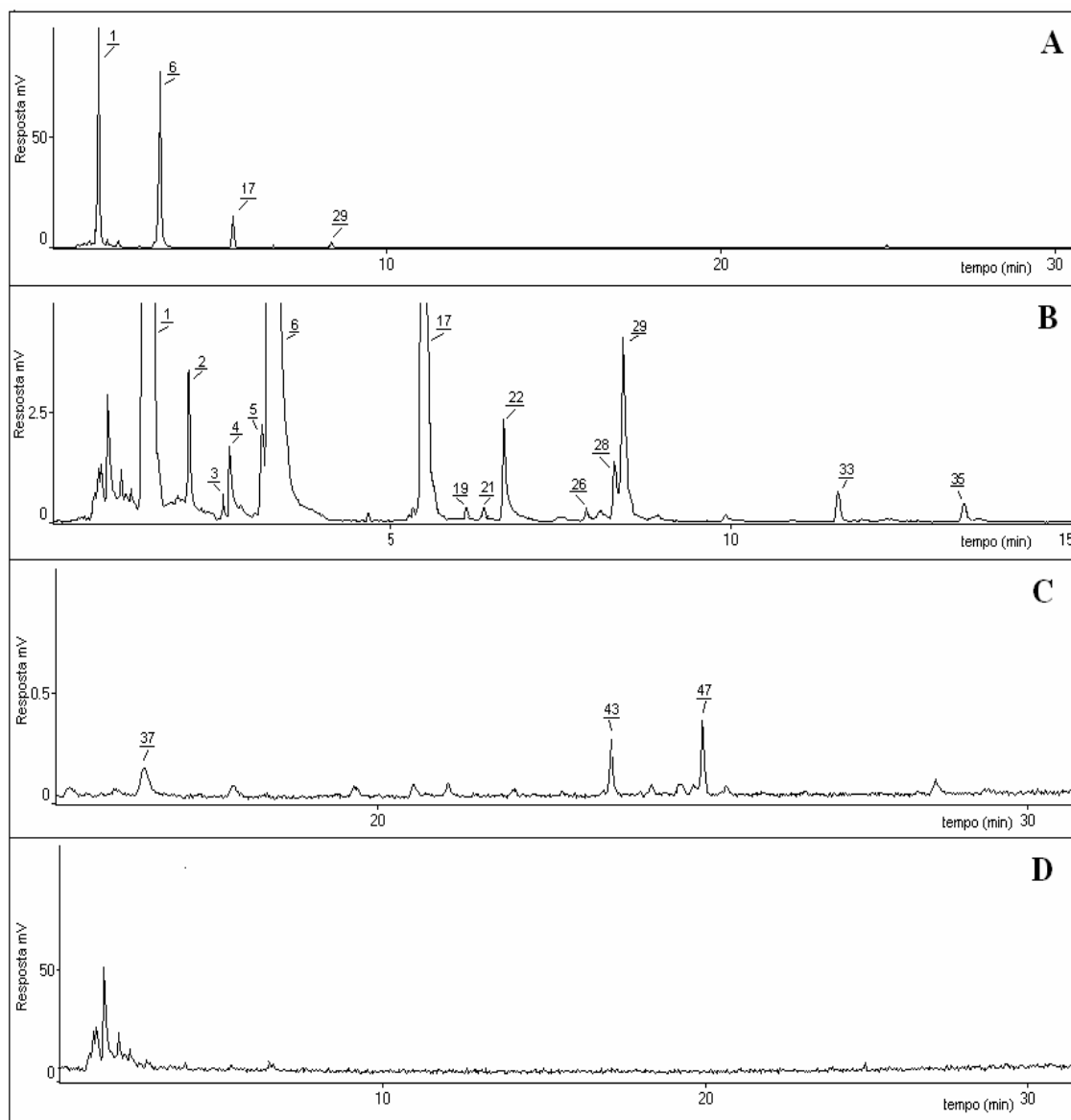


Figura 17. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no *headspace* das folhas sadias de *Schinus polygamus* coletadas em Porto Alegre. A Figura 17B e 17C correspondem ao cromatograma ampliado da Figura 17A e a Figura 17D ao branco do filme polimérico DVB-CAR-PDMS. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e numeração correspondente a Tabela VII.

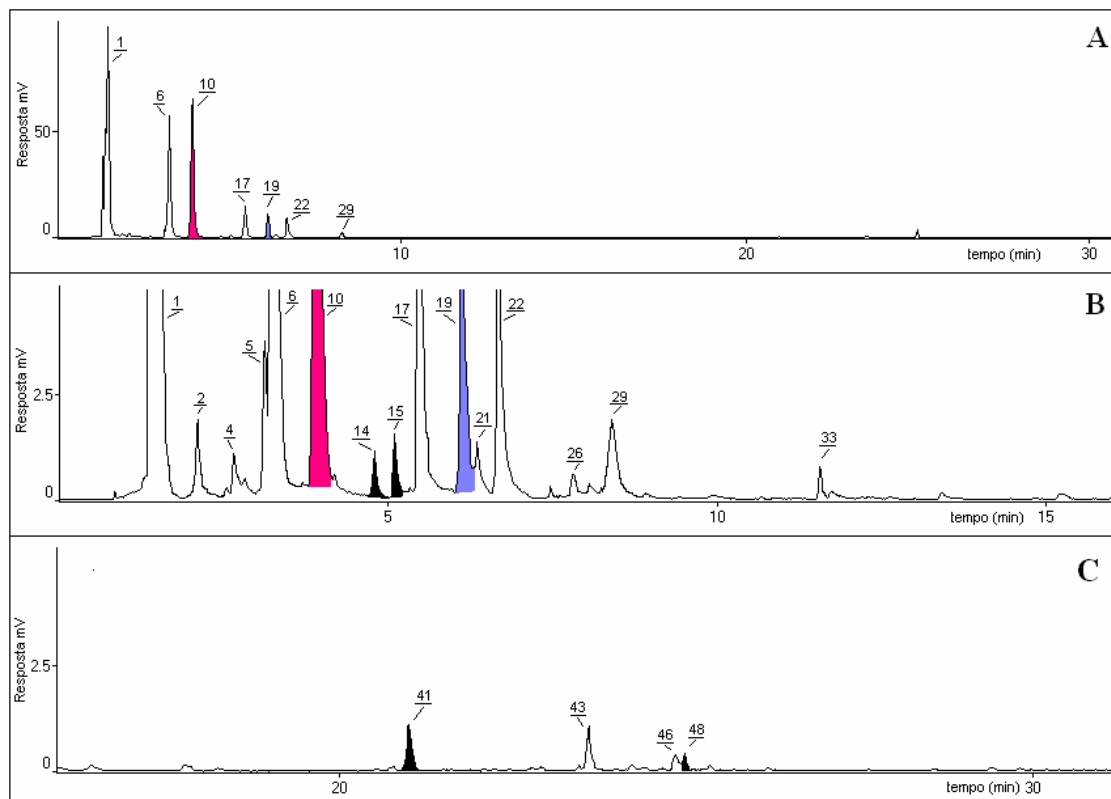


Figura 18. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no *headspace* das galhas de *Schinus polygamus*, coletadas em Porto Alegre. A Figura 18B e 18C correspondem ao cromatograma ampliado da Figura 18A. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e numeração correspondente a Tabela VII.

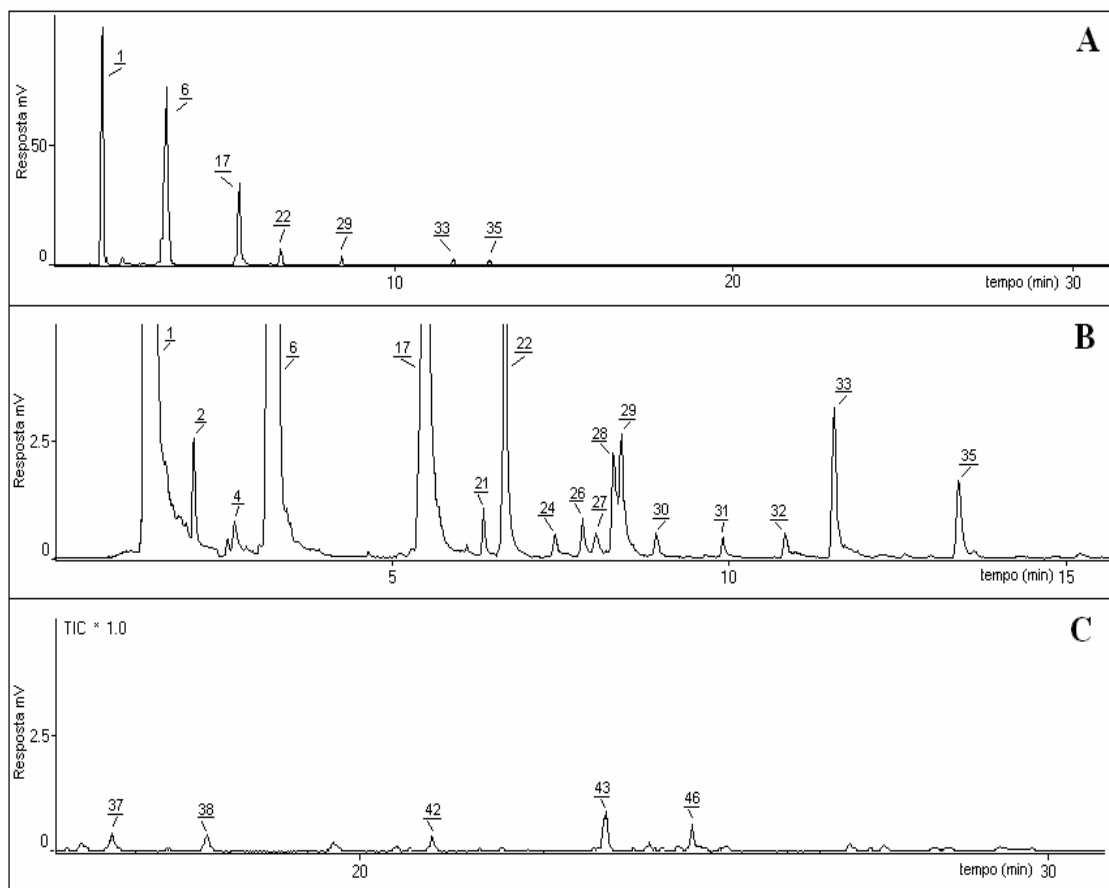


Figura 19. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no *headspace* da parte saudável das folhas galhadas de *Schinus polygamus* coletadas em Porto Alegre. As Figuras 19B e 19C correspondem ao cromatograma ampliado da Figura 19A. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e numeração correspondente a Tabela VII.

É importante registrar que esta é a primeira vez que a técnica HS-SPME está sendo avaliada para o estudo das diferenças de composição de voláteis de amostras de folhas saudáveis e galhas provenientes de plantas que sofreram a ação de galhadores. Além disto, esta também é a primeira vez que esta técnica é empregada para caracterização de voláteis de *S. polygamus* e de *B. spicata*.

A comparação dos VOC presentes no *headspace* de folhas saudáveis, galhas e parte saudável das folhas galhadas, destaca a presença do  $\alpha$ -pineno entre os compostos detectados apenas nas galhas, sendo este, junto com o n-heptano e o n-nonano, os compostos voláteis majoritários nas galhas. A concentração do

$\alpha$ -pineno no *headspace* desta amostra representa 17,6 % da área média total dos picos cromatográficos dos compostos detectados na amostra galhada. No *headspace* das galhas ainda foi verificada a presença, em menor concentração, dos monoterpenos  $\beta$ -pineno (0,2 %) e mirceno (0,4 %) e dos sesquiterpenos *cis*- $\alpha$ -bergamoteno (0,3 %) e  $\gamma$ -cadineno (0,1 %), compostos estes que não fazem parte da composição das outras duas amostras (folhas sadias e parte saudável das folhas galhadas). Também foi identificado um aumento na concentração de limoneno (5,4 %) no *headspace* das folhas galhadas, em relação às folhas sadias, onde a concentração deste composto é de 0,1 %. O fato de alguns destes compostos terem sido detectados apenas nas galhas, é sugestivo da alteração da sua biossíntese e pode estar relacionado ao mecanismo de defesa das plantas, do galhador à atração de predadores. Para muitas espécies de insetos, a localização de alimentos depende diretamente do olfato. Algumas investigações têm demonstrado que insetos podem responder a odores específicos de plantas, conseguindo detectar um único composto em baixa concentração.<sup>124-128</sup> Um exemplo é a *Melanophila acuminata* que consegue detectar derivados do guaiacol em concentrações na ordem de partes por bilhão (ppb).<sup>129</sup> Buttery e Ling<sup>130</sup> verificaram que a presença de baixas concentrações (aproximadamente 10 ppb) de compostos voláteis em raízes de milho resultou na atração de insetos como a larva da *Diabrotica* ssp. Nesta mistura volátil, alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram identificados como compostos majoritários.

Quando comparado o perfil cromatográfico obtido para o óleo hidrodestilado e aquele resultante da HS-SPME, uma das principais diferenças é a presença do n-heptano, identificado no cromatograma resultante da HS-SPME, como mais um hidrocarboneto linear presente na mistura volátil. No óleo essencial, possivelmente o pico cromatográfico deste composto ficou encoberto pelo pico do solvente (hexano). O pico cromatográfico do n-heptano apresentou-se com intensidade superior à do n-nonano, composto majoritário do óleo essencial desta planta, como pode ser visualizado na Figura 20. Embora o n-heptano e o n-nonano, até o momento, não tenham sido encontrados como compostos majoritários em óleos essenciais, é possível verificar sua presença em alguns óleos voláteis.<sup>131-134</sup> Entre as plantas que apresentam hidrocarbonetos como parte de seus voláteis, podem ser citadas as

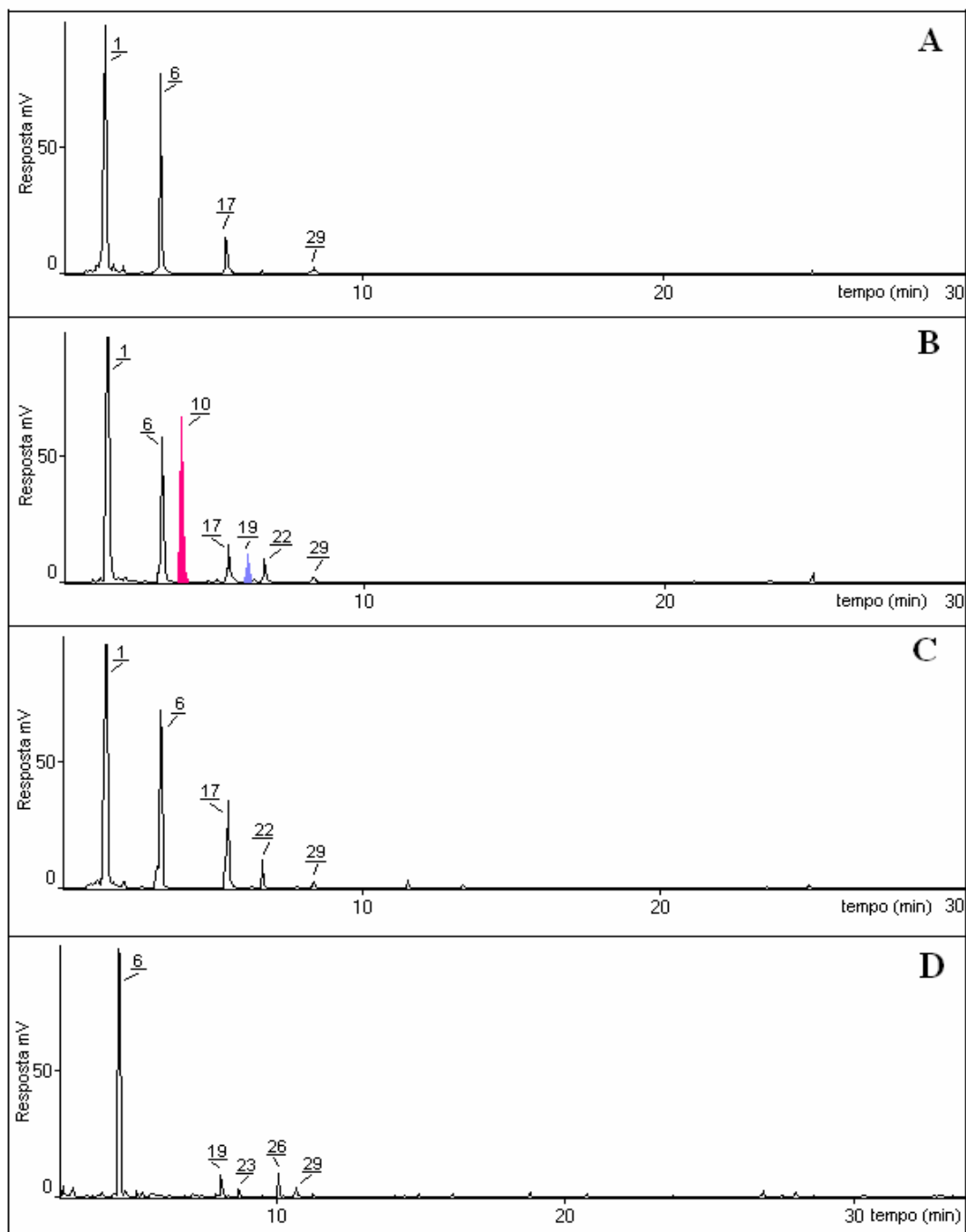


Figura 20. Cromatogramas de corrente iônica total mostrando compostos majoritários presentes em amostras de *Schinus polygamus*. As Figuras 20A, 20B e 20C representam o *headspace* de folhas sadias, galhas e parte saudável das folhas galhadas, respectivamente, todos obtidos por SPME. A Figura 20D representa os compostos majoritários do óleo essencial obtido por hidrodestilação. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e a numeração corresponde a Tabela VII.

flores de jasmim (*Jasminum sambac* - Oleaceae), em cujo *headspace* foram detectados 37 compostos, entre eles o n-heptano que representou 0,03% da composição.<sup>133</sup> Na amostra obtida por arraste a vapor, seguido de extração com solvente, das flores dos frutos de kiwi (*Actinidia chinensis* - Actinidiaceae), foram identificados 87 compostos, dos quais, 23 hidrocarbonetos, entre eles o n-heptano (0,03 %) e o n-nonano (2,08 %).<sup>134</sup> Nas folhas de joá-bravo (*Solanum viarum* - Solanaceae) a extração do *headspace* com a fibra CAR-PDMS detectou entre outros hidrocarbonetos o n-nonano (1,87 %).<sup>15</sup> Alcanos em óleos essenciais, tanto saturados como insaturados, são compostos derivados de ácidos graxos e sua presença é razoavelmente comum nos óleos voláteis.<sup>132</sup> Neste trabalho foram detectados n-heptano e n-nonano em grande quantidade. O processo de hidrodestilação foi realizado por várias vezes, com folhas de vários indivíduos, a fim de verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos (Tabela III, item 1.1 deste capítulo). Além disso, tanto a hidrodestilação, como a HS-SPME foram realizadas em laboratório livre da presença de solventes orgânicos, eliminando-se com este procedimento, a possibilidade de contaminação laboratorial. A Figura 21 mostra os cromatogramas do branco da fibra DVB-CAR-PDMS, dos componentes extraídos da atmosfera do laboratório, do *headspace* da solução tampão empregada nas extrações das folhas e do *headspace* das folhas picadas de *S. polygamus*.

A comparação das duas técnicas de extração, ainda permitiu observar outras diferenças qualitativas, entre os compostos detectados no óleo hidrodestilado e nos voláteis presentes no *headspace* das folhas sadias. Dos compostos tentativamente identificados presentes somente no óleo hidrodestilado das folhas sadias estão n-octanal (0,3 %), o-cimeno (0,3 %), 1,8-cineol (0,5 %), (E)- $\beta$ -ocimeno (1,2 %), n-decanal (0,5 %), 2-undecanona (0,8 %),  $\delta$ -elemeno (0,4 %), dodecanol (0,2 %), germacreno D (1,2 %), biciclogermacreno (0,2 %), (E)-nerolidol (0,3 %), (Z)-3-benzoato de hexenila (0,2 %). Na HS-SPME das folhas sadias foi encontrado o  $\Delta$ -3-careno (0,1 %), (Z)- $\beta$ -ocimeno (1,2 %) e o  $\gamma$ -muroleno (0,1 %), que por sua vez não foram detectados no óleo hidrodestilado. Estas diferenças qualitativas na composição podem ser justificadas em função da técnica de extração usada.

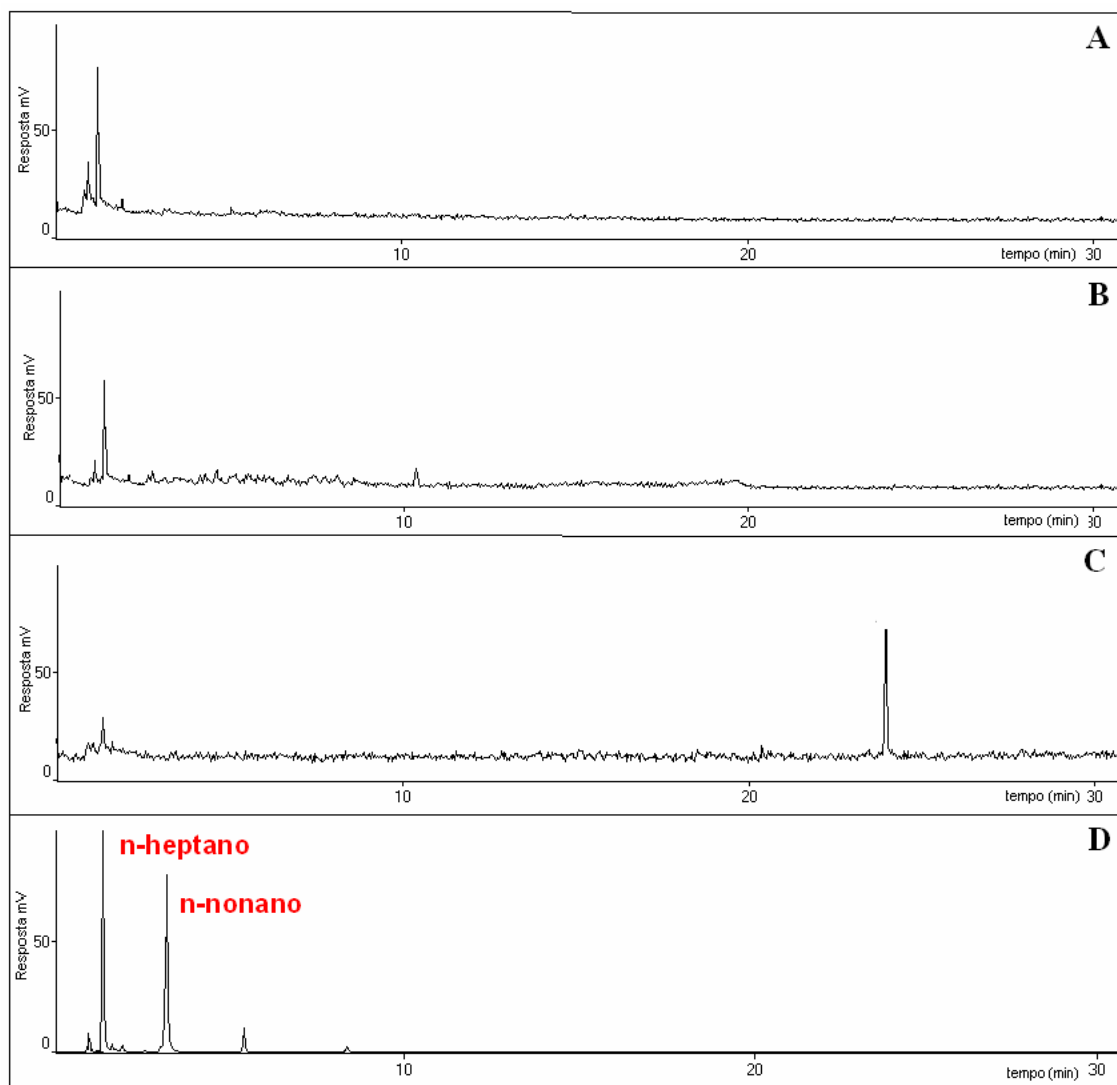


Figura 21. Cromatogramas de corrente iônica total para verificar possível contaminação laboratorial das amostras de *Schinus polygamus* com solventes orgânicos. As Figuras 21A, 21B, 21C e 21D representam (A) branco da fibra DVB-CAR-PDMS; (B) amostragem da atmosfera do laboratório; (C) branco do tampão, (D) *headspace* das folhas saudáveis de *Schinus polygamus*, respectivamente, todos obtidos por SPME. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II.

Na hidrodestilação o perfil cromatográfico corresponde à composição do óleo, já na HS-SPME, a composição reflete o perfil dos compostos presentes no *headspace* do material vegetal picado, sendo neste último caso, função da volatilidade dos compostos e da afinidade destes pela fibra polimérica. As diferenças encontradas



entre os perfis dos compostos voláteis podem também estar associadas a transformações químicas e formação de artefatos durante a hidrodestilação. Um exemplo disto pode ser observado na presença de  $\Delta$ -3-careno no *headspace* de folhas e galhas de *S. polygamus* e em sua ausência no óleo hidrodestilado, verificando-se concomitantemente, a identificação do componente *o*-cimeno neste mesmo óleo. Este fato pode ser resultado da degradação térmica do  $\Delta$ -3-careno durante o processo de hidrodestilação, que origina vários produtos aromáticos, entre os quais o *o*-cimeno, formado a partir de reações de rearranjo, acompanhadas de desidrogenação.<sup>135</sup> De forma semelhante, observa-se a presença de 1,8-cineol somente no óleo hidrodestilado. Em estudos realizados com o óleo essencial de limão-galego foi verificada redução na concentração de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno e um acréscimo na composição do 1,4-cineol, 1,8-cineol, *p*-cimeno, terpinoleno e  $\alpha$ -terpineol, sendo estes considerados produtos de transformações químicas sofridas pelo  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno durante o processo de destilação do óleo volátil.<sup>136</sup>

### **2.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS E GALHAS DE *Baccharis spicata***

A identificação tentativa dos compostos presentes no *headspace* das folhas e galhas de *B. spicata*, bem como a análise quantitativa dos mesmos, estão descritas no item 6 do Capítulo 3. Estes procedimentos permitiram a observação das diferenças qualitativas e quantitativas entre as amostra de folhas e galhas, conforme mostrado na Tabela VIII.

A Figura 22A mostra o cromatograma obtido por HS-SPME das folhas da *B. spicata*, coletadas em Porto Alegre, e as Figuras 22B e 22C correspondem à ampliação do cromatograma da Figura 22A. Da mesma forma as Figuras 23A, 23B, 23C apresentam o perfil cromatográfico da HS-SPME do *headspace* das galhas. A numeração apresentada corresponde a da Tabela VIII.

Tabela VIII. Diferenças qualitativas (identificação tentativa) e quantitativas encontradas nos cromatogramas provenientes da extração por HS-SPME dos voláteis das folhas e galhas e do óleo hidrodestilado de *Baccharis spicata*.

Nº	Compostos	IR <sup>a</sup>	IR Lit. <sup>b</sup>	Concentração (%)		
				Folhas	Galhas	Óleo HD
1	ni				0,6	
2	ni			3,2	1,1	
3	ni			4,7		
4	ni				0,1	
5	ni			1,4		
<b>6</b>	<b>n-heptano</b>	701	700		<b>0,2</b>	
7	ni	760		1,0		
8	ni	765			0,2	
9	(E)-3-hexenol	849	854	2,7		
10	ni	863		1,0		
<b>11</b>	<b>α-tujeno</b>	923	930		<b>0,2</b>	
12	α-pineno	930	939	1,6	3,0	0,7
13	sabineno	969	975	0,3		
<b>14</b>	<b>β-pineno</b>	973	979	<b>13,5</b>	<b>40,9</b>	<b>8,0</b>
15	mirreno	987	991	2,2	6,6	0,6
16	o-cimeno	1020	1026	0,4		
<b>17</b>	<b>limoneno</b>	1024	1029	<b>15,3</b>	<b>19,1</b>	<b>5,4</b>
18	(E)-β-ocimeno	1043	1050	0,5	3,7	
<b>19</b>	<b>γ-terpineno</b>	1053	1060		<b>0,1</b>	
<b>20</b>	<b>terpinoleno</b>	1082	1089		<b>0,1</b>	
21	ni	1083		0,4		
<b>22</b>	<b>1-undeceno</b>	1089	1087	<b>17,8</b>	<b>1,1</b>	
<b>23</b>	<b>α-terpineol</b>	1187	1189		<b>0,1</b>	0,7
24	ni	1333			0,2	
25	α-copaeno	1371	1377	0,9	0,3	
<b>26</b>	<b>β-burboneno</b>	1380	1388		<b>0,1</b>	
27	β-cubebeno	1385	1388	0,7	0,4	
28	β-elemeno	1388	1391	0,9	0,6	
<b>29</b>	<b>α-gurjuneno</b>	1405	1410		<b>0,1</b>	
<b>30</b>	<b>(E)-cariofileno</b>	1413	1419	<b>12,8</b>	<b>6,2</b>	<b>4,4</b>
<b>31</b>	<b>β-gurjuneno</b>	1426	1434		<b>0,1</b>	
32	α-humuleno	1448	1455	2,1	1,3	2,0
<b>33</b>	<b>γ-muroleno</b>	1475	1480	<b>11,4</b>	<b>7,0</b>	
<b>34</b>	<b>germacreno D</b>	1479	1485			<b>2,8</b>
35	biciclogermacreno	1493	1500	2,7	5,1	2,0
<b>36</b>	<b>germacreno A</b>	1501	1509		<b>0,2</b>	
37	ni	1502			0,2	
38	δ-cadineno	1518	1523	0,9	0,6	1,7
<b>39</b>	<b>espatulenol</b>	1572	1578	<b>0,7</b>	<b>0,2</b>	<b>34,3</b>
40	óxido de cariofileno	1575	1583	0,8	0,2	8,1
<b>41</b>	<b>ni</b>	1577			<b>0,1</b>	
<b>42</b>	<b>viridiflorol</b>	1594	1593			<b>1,8</b>
43	ni	1604				2,0
44	ni	1609				3,0
45	ni	1621			0,1	

Nº	Compostos	IR <sup>a</sup>	IR Lit. <sup>b</sup>	Concentração (%)		
				Folhas	Galhas	Óleo HD
46	ni	1638				3,4
47	<b>α-murolol</b>	1643	1646			<b>2,4</b>
48	<b>α-cadinol</b>	1656	1654			<b>4,5</b>
49	ni	1690				9,8
50	ni	1734				2,4

a. índices de retenção OV5 calculados experimentalmete (IR); b.índices de retenção em coluna OV5 registrados na literatura (IR Lit.)<sup>114</sup>; ni = não identificado;

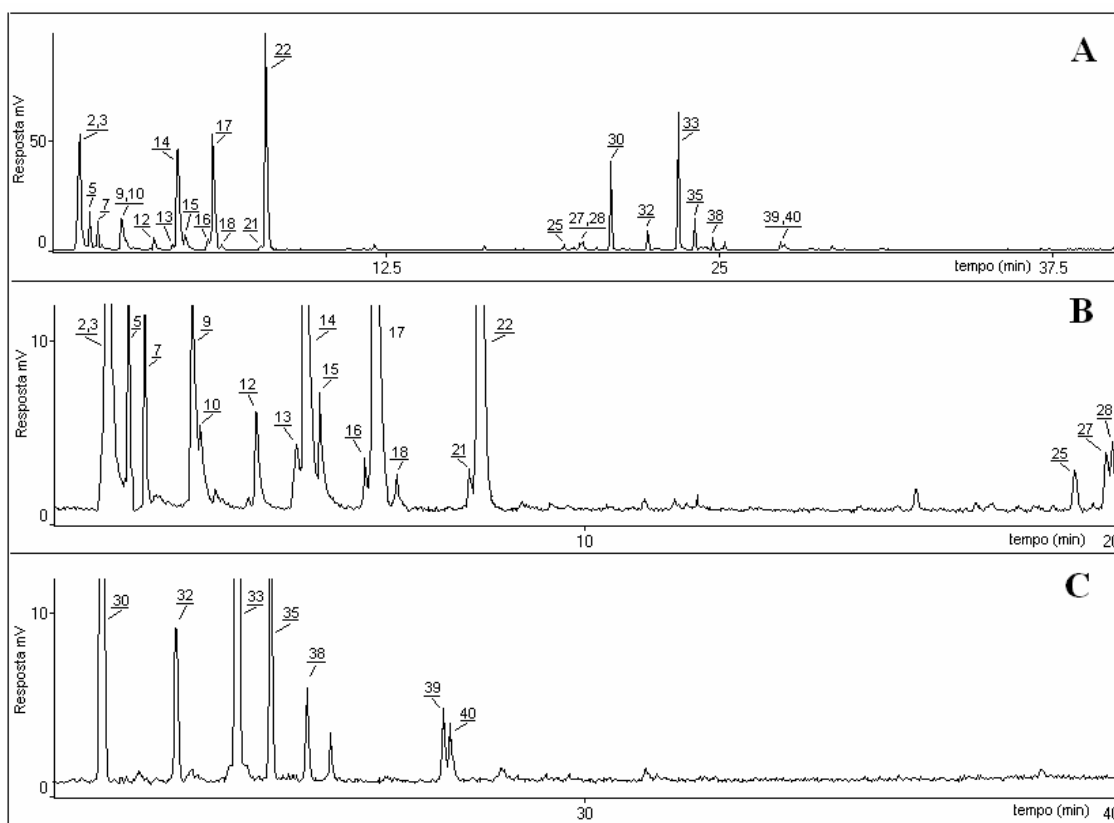


Figura 22. Cromatograma de corrente iônica total para os compostos presentes no headspace das folhas de *Baccharis spicata* coletadas em Porto Alegre. A Figura 22B e 22C correspondem à ampliação de duas partes do cromatograma da Figura 22A. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e numeração correspondente à Tabela VIII.

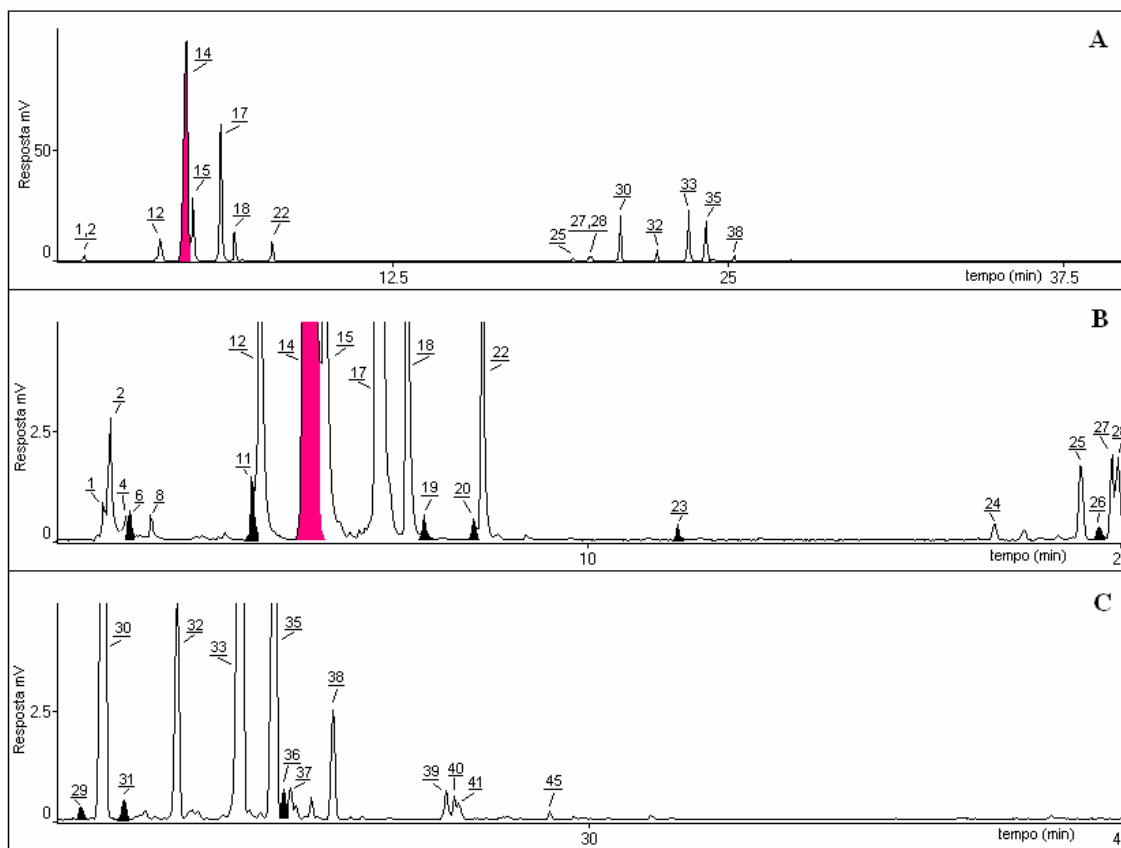


Figura 23. Cromatogramas de corrente iônica total para os compostos presentes no *headspace* das galhas de *Baccharis spicata* coletadas em Porto Alegre. A Figura 23B e 23C corresponde ao cromatograma ampliado da Figura 23A. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela II e numeração correspondente a Tabela VIII.

Comparando-se os VOC amostrados no *headspace* das folhas e galhas da *B. spicata*, verificou-se que foi detectado um número maior de compostos no *headspace* das galhas. Neste, foram detectados 33 compostos, sendo que os majoritários foram os monoterpenos  $\beta$ -pineno (40,9 %) e limoneno (19,1 %) enquanto que nas folhas foram detectados 25 compostos, sendo os majoritários o 1-undeceno (17,8%), limoneno (15,3 %),  $\beta$ -pineno (13,5 %), (*E*)-cariofileno (12,8 %) e  $\gamma$ -muroлено (11,4 %). Mesmo presentes em baixa concentração, somente nas galhas foi verificada a presença de n-heptano,  $\alpha$ -tujeno,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -burboneno,  $\alpha$ -gurjuneno,  $\beta$ -gurjuneno e o germacreno A. A presença desses compostos somente na fase gasosa das galhas pode ter sido consequência

da interação inseto-planta hospedeira, possivelmente por alteração na atividade enzimática. Diferenças de composição podem ser visualizadas nos cromatogramas apresentados na Figura 24A, 24B e 24C, que correspondem ao perfil volátil das folhas e galhas amostradas por HS-SPME e do óleo das folhas extraído por hidrodestilação, respectivamente. A numeração apresentada corresponde àquela que consta da Tabela VIII.

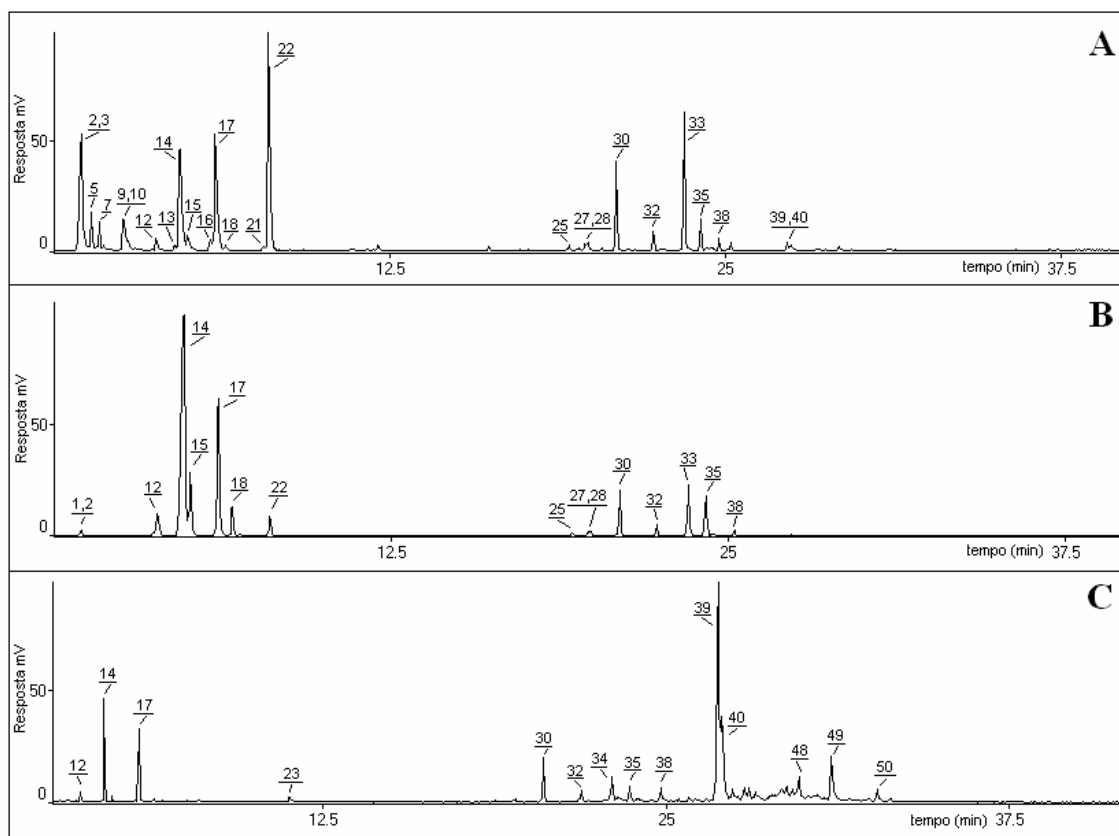


Figura 24. Cromatogramas de corrente iônica total, mostrando compostos majoritários presentes em amostras de *Baccharis spicata*. As Figuras 24A e 24B representam os compostos presentes no *headspace* das folhas e galhas, respectivamente, todos obtidos por HS-SPME. A Figura 24C representa os compostos majoritários do óleo essencial obtido por hidrodestilação. Numeração conforme a Tabela VIII.

Estas análises permitiram comparar duas técnicas de extração e observar semelhanças e diferenças entre a composição volátil das folhas e galhas de *B. spicata*, verificando-se vantagens e desvantagens de ambas as técnicas. A HS-SPME das folhas apresentou um perfil diferente do encontrado para seu óleo hidrodestilado. Na HS-SPME o composto majoritário foi o hidrocarboneto linear insaturado 1-undeceno, representando 17,8 % dos compostos extraídos. Este composto já foi encontrado em outras plantas da mesma família, tais como as espécies de *Centaurea deflexa* e *Centaurea iconiensis*, onde o 1-undeceno representa 4,0 % e 84,3 % da amostra, respectivamente.<sup>137</sup> Entre os outros compostos majoritários na extração realizada no *headspace* nas folhas de *B. spicata*, estão os monoterpenos limoneno (15,3 %) e  $\beta$ -pineno (13,5 %) e os sesquiterpeno (*E*)-cariofileno (12,8 %) e  $\gamma$ -muroleno (11,4 %). Para o óleo obtido por hidrodestilação, o composto majoritário foi o espatulenol, sesquiterpeno oxigenado, representando 34,3 % da área dos picos do cromatograma correspondente a este óleo. Entretanto, este composto foi encontrado em baixa concentração (0,7 %) no *headspace* das folhas. Uma das hipóteses levantada para diferença tão acentuada na concentração, está relacionado com menor volatilidade do composto, que implicaria em sua menor disponibilidade no *headspace* durante o processo de HS-SPME. Por outro lado, a hidrodestilação é um processo exaustivo de extração, enquanto que a HS-SPME é um processo de equilíbrio. Zini e colaboradores<sup>7</sup> encontraram resultado análogo em um estudo com folhas de *Eucalyptus citrodora*, *E. dunnii* e *E. saligna*. O estudo comparou o óleo hidrodestilado, com o perfil dos compostos voláteis extraídos do *headspace*, usando a fibra PDMS 7  $\mu$ m. Nas três amostras o espatulenol foi detectado apenas no óleo hidrodestilado. Em um outro trabalho de pesquisa com hepáticas (*Plagiochila* ssp. - Plagiochilaceae), descobriu-se a transformação do (-)-*ent*-biciclogermacreno em (-)-*ent*-espatulenol, à temperatura ambiente.<sup>138</sup> Uma vez que o biciclogermacreno é um dos compostos presente no *headspace* das folhas de *B. spicata*, pode ser levantada uma segunda hipótese sobre uma concentração tão acentuada do espatulenol na hidrodestilação em relação à da HS-SPME. Este acréscimo pode ser consequência da transformação do biciclogermacreno em espatulenol, durante a hidrodestilação.

A comparação dos perfis cromatográficos obtidos a partir da amostra do óleo essencial das folhas de *B. spicata*, extraído por hidrodestilação, e dos voláteis

presentes no *headspace*, por meio de HS-SPME, permitiram observar também diferenças qualitativas, assim como ocorreu com a *S. polygamus*. Os compostos  $\alpha$ -terpineol (0,7 %), germacreno D (2,8%), viridiflorol (1,8 %),  $\alpha$ -murolol (2,4 %) e  $\alpha$ -cadinol (4,5 %) foram detectados apenas no óleo hidrodestilado das folhas. Os cromatogramas obtidos através da extração do *headspace* das folhas por HS-SPME revelou a presença o (*E*)-3-hexenol (2,7 %), sabineno (0,3 %), *o*-cimeno (0,4 %), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (0,5 %), 1-undeceno (0,5 %),  $\alpha$ -copaeno (0,9 %),  $\beta$ -cubebeno (0,7 %),  $\beta$ -elemeno (0,9 %) e  $\gamma$ -muroleno (11,4 %). Estes compostos por sua vez não foram detectados no óleo hidrodestilado.

A presença de compostos na região do cromatograma onde eluem os sesquiterpenos oxigenados permite observar que a hidrodestilação extraiu quantidades maiores de compostos de maior massa molecular do que a HS-SPME. A literatura mostra que diferentes técnicas de extração podem resultar em diferentes composições de extrato. Exemplo disto são as diferenças encontradas em um estudo que compara o perfil cromatográfico de um óleo volátil de *B. dracunculifolia* obtido por hidrodestilação com outro obtido através do uso de CO<sub>2</sub> supercrítico.<sup>62</sup> Neste caso o uso do CO<sub>2</sub> supercrítico para extração dos compostos voláteis apresentou um conteúdo de sesquiterpenos oxigenados superior ao do óleo hidrodestilado, além de não ter sido detectado neste óleo alguns monoterpenos presentes em grande quantidade no óleo hidrodestilado. Quando o perfil cromatográfico de compostos voláteis é obtido por hidrodestilação e HS-SPME, pode-se também verificar dessemelhanças, as quais podem ser consequência de diversos fatores que diferenciam as duas técnicas.<sup>7;83;84;139</sup> Entretanto, é importante ressaltar que, devido à possibilidade de emprego de condições brandas na HS-SPME, pode-se obter um perfil de compostos voláteis mais próximo daquele emitido pela planta viva.

Durante os processos de destilação, alguns terpenos podem ser transformados através de reações de hidratação, desidratação, ou migração de dupla liga, dando origem a isômeros.<sup>140</sup> No caso da *B. spicata*, parte do limoneno pode ter sido transformado em  $\alpha$ -terpineol, composto encontrado somente no óleo essencial hidrodestilado, por reação de hidratação.<sup>140</sup>

Não foi encontrada nenhuma alusão às demais diferenças qualitativas entre os perfis cromatográficos do óleo hidrodestilado e da HS-SPME na literatura

científica disponível. Contudo, é possível verificar algumas similaridades estruturais entre compostos presentes no óleo hidrodestilado e compostos presentes no *headspace* das folhas de *B. spicata*. Das diferenças verificadas entre a hidrodestilação e a HS-SPME, o  $\alpha$ -murolool e o  $\alpha$ -cadinol, podem ser produtos da oxidação do  $\gamma$ -muroleno, uma vez que estes apresentam grande similaridade estrutural, conforme pode ser verificado nas Figuras do Anexo A. Outra possível explicação para a presença de alguns sesquiterpenos oxigenados somente no óleo essencial reside nos diferentes princípios de extração das técnicas empregadas, conforme anteriormente comentado para *S. polygamus*.

O óleo essencial e os voláteis do *headspace* de folhas de *S. polygamus* e *B. spicata*, embora tenham apresentado perfis cromatográficos distintos, mostram em ambas as plantas a presença do germacreno D somente no óleo hidrodestilado e a presença do  $\gamma$ -muroleno apenas na HS-SPME.

### **3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A IMPORTÂNCIA QUIMIO-ECOLÓGICA DE ALGUNS COMPOSTOS DETECTADOS NAS GALHAS DE *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.**

A resposta do metabolismo dos voláteis de uma determinada planta ao ataque de um herbívoro pode resultar na produção de compostos que podem sinalizar o processo de herbivoria e desempenhar um papel importante na interação da planta com outros organismos associados.<sup>78</sup> Esta resposta varia de acordo com o inseto e com a planta alvo.<sup>141;142</sup>

A comparação dos perfis de compostos voláteis de folhas e galhas de *S. polygamus* e *B. spicata* detectou que a presença de galhas produz alterações na composição volátil da planta, porém, no geral, estas alterações ocorrem somente no local de desenvolvimento do tumor, não se difundindo pela planta. A literatura apresenta vários trabalhos que discutem a interação inseto-planta, principalmente no que se refere a aspectos morfológicos, fatores de seleção de uma planta pelo



galhador, desenvolvimento das galhas e galhadores em determinadas espécies<sup>22;33;143</sup> e à importância dos compostos voláteis no comportamento de insetos herbívoros.<sup>142;144;145</sup> Porém, trabalhos que investigam o perfil de compostos voláteis de galhas e a influência de galhadores na composição dos óleos essenciais, são escassos.<sup>35;36</sup>

Entre os estudos nesta área, está uma investigação das partes aéreas e das galhas da *Pistacia palaestina* Boiss (*terebinth*, nome comum em inglês), que assim como a *S. polygamus* pertence à família Anacardiaceae. No óleo hidrodestilado da *P. palaestina* foi detectado um perfil de voláteis constituído basicamente por monoterpenos, tanto nas folhas, como nas galhas, sendo o composto majoritário em ambas, o  $\alpha$ -pineno. A presença do inseto galhador, além de produzir alterações na composição do óleo volátil, também estimulou a produção de óleo essencial. Embora as alterações detectadas na composição do óleo essencial possam ter resultado em alguns efeitos prejudiciais para herbívoros ou onívoros, não foram prejudiciais ao galhador dessa espécie.<sup>36</sup> Em outro trabalho com uma planta aromática argentina, pertencente à família Lamiaceae, a *Mintosthachys mollis*, foram avaliados os voláteis do óleo obtido por hidrodestilação de folhas que haviam sido alvo do ataque de duas espécies diferentes de insetos herbívoros, utilizando-se um micro Clevenger. Um destes insetos era um galhador desta espécie de planta (Diptera: Cecydomyiidae) ou outro que danificava as folhas (*Chromatomyia platensis* (Diptera: Agromyzidae)). Foram avaliadas folhas de ramos com e sem galhas e folhas danificadas e não danificadas, visto que apenas o inseto não galhador provocava dano às folhas. Foram observadas alterações quantitativas nos dois compostos presentes em maiores concentrações (mentona e pulegona) em função da presença do inseto que provocou dano nas folhas, porém não foi detectada influência da presença do galhador na composição desses mesmos compostos. O trabalho não reporta possíveis alterações em compostos presentes em menor concentração.<sup>35</sup> Entretanto, é possível observar que a alteração química nos metabólitos secundários está relacionada ao tipo de inseto que a ataca.

Entre os compostos presentes somente nas galhas de *S. polygamus* estão os monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e mirceno e os sesquiterpenos  $\alpha$ -bergamoteno e  $\gamma$ -cadineno, além de haver-se observado um acréscimo significativo na área do pico cromatográfico correspondente ao limoneno. Para a *B. spicata* se destaca um

acréscimo significativo na quantidade do  $\beta$ -pineno nas galhas, onde foi encontrado em uma concentração três vezes maior do que a das folhas. Os componentes n-heptano,  $\alpha$ -tujeno,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -burboneno,  $\alpha$ -gurjuneno,  $\beta$ -gurjuneno e o germacreno A foram detectados somente nas galhas. Destes compostos, os que mais freqüentemente aparecem associados a fenômenos de interação inseto-planta na literatura são o  $\alpha$ -pineno e o  $\beta$ -pineno, embora também sejam encontrados, alguns relatos sobre a importância do mirceno e do limoneno.

O  $\alpha$ -pineno, um dos compostos majoritários nas galhas de *S. polygamus*, não detectado nas folhas, é considerado um alelopático capaz de inibir o crescimento de raízes de plântulas de milho (*Z. mays* L.)<sup>25</sup> e, quando combinado com mirceno ou limoneno, tem efeito atrativo para fêmeas de *Dioryctria amatella* (Hulst) (Lepidoptera: Pyralidae). Neste caso, este composto parece ser importante para que o inseto reconheça o local da oviposição.<sup>146</sup> Na planta hospedeira do besouro *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae), é considerado precursor da verbenona, isso porque, ao fazer parte da dieta do inseto é oxidado e convertido por meio de duas etapas oxidativas dando origem, em um primeiro momento, ao álcool (*E*)-verbenol e depois à verbenona, ambos considerados repelentes e sintetizados pelo inseto a partir dos voláteis emitidos pela sua planta hospedeira. Esta ação repelente é conveniente para os machos que já se encontram instalado na planta, de forma que estes podem provocar o afastamento de outros machos da mesma espécie.<sup>74</sup> O (-)- $\alpha$ -pineno também se apresenta como um cairomônio capaz de atrair algumas espécies de besouros presentes em madeira, servindo como uma armadilha eficaz para estes.<sup>14</sup>

Um outro composto que se destacou neste trabalho foi o acréscimo na ordem de três vezes na área do  $\beta$ -pineno presente nas galhas da *B. spicata*, quando comparado com sua concentração nas folhas. O  $\beta$ -pineno, isolado da *Salvia leucophylla*, foi considerado um alelopático, pois interfere no crescimento da *Brassica campestris*, por inibição da proliferação celular e síntese de DNA da raiz da planta.<sup>26</sup> Portanto, a presença de galhas e o estímulo na produção de substâncias potencialmente alelopáticas pode ter um papel importante na capacidade competitiva da planta hospedeira. Esse benefício inusitado pode explicar o sucesso de determinadas interações entre espécies vegetais e seus indutores de galhas. Alguns trabalhos mostram que alterações nas razões dos enantiômeros do  $\alpha$ - e do

$\beta$ -pineno estão associadas à presença de galhas de *Antistrophus rufus* L. (Hymenoptera: Cynipidae) na sua planta hospedeira (*Silphium laciniatum* L. (Asteraceae)). Estudos feitos com o galhador *A. rufus* L. mostraram que estes compostos podem servir como sinalizadores para localização dos parceiros destas vespas e dos sítios de oviposição.<sup>142;144;145</sup>

Mukherjee<sup>28</sup> avaliou a influência de alguns aleloquímicos considerados inseticidas e que estão presentes em plantas danificadas pelo inseto *Spodoptera litura*. Ao avaliar a influência da presença dos terpenóides  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno na dieta da larva do inseto, verificou-se que o efeito destes compostos culminou em redução na taxa de crescimento das larvas. Isto se deve a uma menor assimilação dos nutrientes, por parte das larvas, durante a digestão devido à presença dos terpenóides.

Entre as alterações no perfil dos compostos voláteis da *S. polygamus* foi possível observar que a presença de galhas provocou um acréscimo significativo no processo de biossíntese de limoneno, quando comparado às folhas saudáveis. Além disso, verificou-se também um acréscimo na ordem de três vezes na área do pico cromatográfico do mirceno nas galhas de *B. spicata*. Este mesmo monoterpene foi detectado apenas no *headspace* das galhas de *S. polygamus*. Testes com o inseto *Spodoptera litura* mostram que dieta enriquecida com  $\alpha$ -,  $\beta$ -pineno, D-limoneno e mirceno, apesar de não exercer efeito na ingestão, reduziu a eficiência digestiva. Provavelmente o inseto usa de um mecanismo para superar o efeito negativo desses aleloquímicos, como, por exemplo, sua excreção.<sup>28</sup> Entretanto, para algumas outras espécies de insetos, o limoneno atua como um eficiente inseticida, tanto quando o contato do inseto com este composto ocorre por meio das vias respiratórias, como quando este se dá através da pele ou por meio de ingestão.<sup>141</sup> No entanto, outros insetos são capazes de metabolizar compostos terpenóides considerados tóxicos e transformá-los, de forma a não sofrerem nenhuma consequência da presença desses em sua dieta.<sup>74;147</sup> O mirceno, presente na planta hospedeira do besouro *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae), é considerado precursor do feromônio ipsdienol. No momento em que o mirceno faz parte da dieta do inseto, ele é oxidado por meio do citocromo P450 e convertido neste feromônio, que tem a capacidade de repelir outros insetos da mesma espécie.<sup>148</sup>

A presença do  $\alpha$ -terpineol, mesmo que em baixa concentração, apenas nas galhas de *B. spicata* permite relacionar este composto a uma possível função infoquímica. Este monoterpênóide pode ser um promissor inseticida natural, uma vez que testes realizados em estufa destacam o  $\alpha$ -terpineol como composto que apresenta boa atividade larvicida, evidenciando que este composto foi capaz de proteger raízes de milho contra a larva do inseto que a ataca.<sup>149</sup>

Alguns sesquiterpenos desempenham papel de proteção de arbustos e árvores contra insetos, entre os quais está o  $\alpha$ -gurjuneno, composto detectado nas galhas de *B. spicata*. Este composto é um dos sesquiterpenos presentes na resina de *Dipterocarpus kerrii*, o qual atuou como agente defensor desta árvore contra o ataque do cupim *Zootermopsis angusticollis*.<sup>150</sup>

Na *S. polygamus* também foi avaliado o perfil cromatográfico da parte saudável da folha galhada, porém ficou evidente que as diferenças qualitativas foram observadas em maior número no tecido galhado. Entretanto, o (*E*)-cariofileno foi encontrado apenas na parte saudável das folhas galhadas.<sup>151</sup> Este componente é um sesquiterpeno que apresenta atividade anti-inflamatória<sup>152</sup>, e é considerado um feromônio sexual capaz de atrair o macho do inseto *Anthonomus grandis*,<sup>153</sup> além de apresentar efeito altamente tóxico contra a larva da *Spodoptera exigua*.<sup>154</sup>

#### 4. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTE TRABALHO

Os principais resultados obtidos neste trabalho estão resumidos a seguir:

➤ Os perfis de compostos voláteis das folhas das plantas investigadas foram diferentes quando a técnica empregada foi hidrodestilação ou HS-SPME, demonstrando que as condições experimentais de cada uma destas técnicas (temperatura, presença de água, etc) influenciam no resultado obtido.

➤ O emprego da HS-SPME tornou possível a observação de diferenças na composição volátil do *headspace* de folhas e galhas da *S. polygamus* e *B. spicata*.

As plantas galhadas produzem alguns monoterpenos e sesquiterpenos que não estão presentes nas folhas saudáveis. Este fato pode ser um indício do papel infoquímico destes compostos.

➤ Entre os compostos voláteis detectados somente nas galhas de *S. polygamus* foram observados o  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, *cis* - $\alpha$ -bergamoteno e o  $\gamma$ -cadineno. Na *B. spicata* os compostos presentes apenas nas galhas foram: n-heptano,  $\alpha$ -tujeno,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -burboneno,  $\alpha$ -gurjuneno,  $\beta$ -gurjuneno e o germacreno A.

➤ O uso da HS-SPME permitiu verificar a presença do hidrocarboneto linear n-heptano no *headspace* da *S. polygamus*, o qual não foi detectado nas análises do óleo hidrodestilado.

➤ Entre os vários filmes poliméricos testados, o DVB-CAR-PDMS foi o que apresentou maior capacidade de extração dos voláteis presentes nas folhas picadas de *E. uniflora*, e por isto foi escolhido para extração dos voláteis de folhas e galhas de *S. polygamus* e *B. spicata*.

➤ A comparação do perfil cromatográfico do óleo hidrodestilado e do *headspace* da *S. polygamus* e *B. spicata* apresentou diferenças da composição volátil em função da técnica de extração empregada. Dos compostos tentativamente identificados presentes somente no óleo hidrodestilado das folhas sadias de *S. polygamus* estão n-octanal (0,3 %), *o*-cimeno (0,3 %), 1,8-cineol (0,5 %), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (1,2 %), n-decanal (0,5 %), 2-undecanona (0,8 %),  $\delta$ -elemeno (0,4 %), dodecanol (0,2 %), germacreno D (1,2 %), biciclogermacreno (0,2 %), (*E*)-nerolidol (0,3 %), (*Z*)-3-benzoato de hexenila (0,2 %), enquanto que na *B. spicata* foram o  $\alpha$ -terpineol (0,7 %), germacreno D (2,8%), viridiflorol (1,8 %),  $\alpha$ -murolol (2,4 %) e  $\alpha$ -cadinol (4,5 %). Na HS-SPME da folhas sadias de *S. polygamus* foi encontrado o n-heptano (44,8 %),  $\Delta$ -3-careno (0,1 %), (*Z*)- $\beta$ -ocimeno (1,2 %) e o  $\gamma$ -muroleno (0,1 %), já na *B. spicata* os compostos foram o (*E*)-3-hexenol (2,7 %), sabineno (0,3 %), *o*-cimeno (0,4 %), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (0,5 %), 1-undeceno (0,5 %),  $\alpha$ -copaeno (0,9 %),  $\beta$ -cubebeno (0,7 %),  $\beta$ -elemeno (0,9 %) e  $\gamma$ -muroleno (11,4 %), que por sua vez não foram detectados no óleo hidrodestilado.

➤ A quantidade de compostos voláteis detectados no *headspace* das folhas de *S. polygamus* coletadas em Porto Alegre foram: 18 nas folhas sadias, 19 nas

galhas e 22 na parte saudável das folhas galhadas, num total de 31 substâncias. Destes, dois foram identificados e 15 tentativamente identificados. Na *B. spicata* foram detectados 25 compostos nas folhas e 30 nas galhas, num total de 41 compostos, dos quais, 28 foram tentativamente identificados.

➤ Na *S. polygamus*, a HS-SPME permitiu observar importantes semelhanças e diferenças quantitativas no perfil cromatográfico de folhas saudáveis, galhas e parte saudável das folhas galhadas. Em todas as três amostras o n-heptano (>38,0 %) e o n-nonano (>24,0 %) foram os compostos majoritários, além disso, nas galhas foi detectado a presença de um outro compostos majoritário, o  $\alpha$ -pineno (17,6 %).

➤ Na *B. spicata*, a HS-SPME permitiu observar importantes diferenças quantitativas no perfil cromatográfico de folhas e galhas. Nas folhas os compostos majoritários são 1-undeceno (17,8 %), limoneno (15,3 %),  $\beta$ -pineno (13,5 %), (*E*)-cariofileno (12,8 %) e  $\gamma$ -muroleno (11,4 %), enquanto que nas galhas são  $\alpha$ -pineno (40,9 %) e limoneno (19,1 %). O  $\alpha$ -pineno apresentou um acréscimo em sua concentração nas galhas da ordem de três vezes ao encontrado nas folhas.

➤ O n-nonano, composto majoritário do óleo essencial de três amostras de folhas de *S. polygamus* (Porto Alegre, Guaíba e Viamão), representa mais 77,0 % destes óleos, sendo que as semelhanças entre os mesmos representam aproximadamente 87,0 %.

➤ O óleo volátil de *S. polygamus* apresenta uma composição completamente diferente daquela encontrada em outros estudos sobre esta planta, sendo também diferente da composição dos óleos essenciais comumente registrada na literatura, uma vez que o n-nonano é seu composto majoritário. O óleo da *B. spicata* é rico em terpenos, sendo o composto majoritário um sesquiterpeno oxigenado, o espatulenol, composto bem característico de vários óleos essenciais de plantas deste gênero.

➤ No óleo das folhas de *S. polygamus*, coletadas em Porto Alegre, foram detectados 30 compostos, nos frutos 40, nas folhas coletadas em Guaíba, 30 e nas coletadas em Viamão, 17 compostos, perfazendo um total de 77 componentes distintos. Destes, o n-nonano foi identificado e, 56 outros compostos foram

tentativamente identificados. No óleo das folhas de *B. spicata* foram detectados 20 compostos, sendo que 15 foram tentativamente identificados.

➤ O rendimento em base seca, do óleo hidrodestilado, de folhas e frutos de *S. polygamus* ficou entre 0,2 e 0,9 %; para a *B. spicata* não foi possível determinar rendimento.

*CAPÍTULO V*  
*CONCLUSÕES*





A aplicação da SPME na análise do *headspace*, tanto das folhas sadias como das galhas de *S. polygamus* e *B. spicata*, demonstrou, pela primeira vez, o potencial desta técnica para a investigação de alterações na composição qualitativa e quantitativa de compostos voláteis destas espécies, as quais são provocadas pela interação inseto-planta. O uso da HS-SPME para este fim abre horizontes para futuras aplicações desta técnica a muitas outras espécies vegetais sujeitas à ação de galhadores ou outros organismos.

O emprego do filme polimérico com tripla camada DVB-CAR-PDMS apresentou grande capacidade de extração, destacando-se entre os demais revestimentos por conseguir sorver compostos de uma ampla faixa de polaridade e diferentes tamanhos de moléculas.

Dentre as vantagens oferecidas pela SPME comparativamente à hidrodestilação pode-se destacar a exigência de uma quantidade mínima de amostra, característica esta muito importante no caso da análise de voláteis de galhas foliares, cujo material disponível é escasso. O uso da HS-SPME também foi vantajoso por proporcionar acesso à composição volátil mais próxima daquela da planta *in vivo*, visto que a extração ocorreu à temperatura ambiente, permitindo a observação de compostos presentes somente em um tipo de tecido da planta (galha, folha sem galha, ou parte sadia da planta galhada). Esta mesma característica da técnica de extração favoreceu a obtenção de dados complementares a partir de ambas as técnicas de extração empregadas, visto que foram encontradas diferenças qualitativas na composição dos óleos essenciais hidrodestilados e do *headspace* dos tecidos vegetais. O óleo essencial da *B. spicata* é reportado aqui pela primeira vez na literatura científica, sendo que o mesmo é válido para a *S. polygamus* brasileira. Alguns dos compostos encontrados nas galhas já são reconhecidos pela literatura por apresentarem efeitos aleloquímicos, algumas vezes como atrativos, outras como repelentes, dependendo do inseto. Alguns desses compostos também apresentam potencial alelopático. Esses resultados permitem atribuir a estes componentes um possível papel ecológico, uma vez que sua biossíntese é, possivelmente, estimulada a partir da interação da planta com seu respectivo inseto

galhador. A ausência de solvente na HS-SPME também proporcionou a identificação de um dos compostos majoritários na *S. polygamus* (n-heptano), o qual não foi detectado no óleo essencial, provavelmente por ter ficado encoberto pelo pico cromatográfico do solvente usado no preparo da solução.

*CAPÍTULO VI*  
*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*



1. Barwick, V. J. *Trends Anal. Chem.* **1997**, *16*, 293.
2. Adam, M.; Juklová, M.; Bajer, T.; Eisner, A.; Ventura, K. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1084*, 2.
3. Sandra, P.; Bicchi, C. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, New York, 1987.
4. Zini, C. A. Tese -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
5. Deng, C.; Xiuqin, X.; Yao, N.; Li, N.; Zhang, X. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 289.
6. Isodorov, V. A.; Vinogorova, V. T.; Rafalowski, K. *Atmos. Environ.* **2003**, *37*, 4645.
7. Zini, C. A.; Zanin, K. D.; Christensen, E.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2679.
8. Deng, X.; Peng, J.; Luo, B.; Wei, M.; Hu, W.; Du, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 950.
9. Bicchi, C.; Drigo, S.; Rubiolo, P. *J. Chromatogr. A* **2000**, *892*, 469.
10. Yang, X.; Peppard, T. L. *Sólid Phase Microextraction*, Wercinski, S. A. S.; Marcel Dedder, Inc.: New York, 1999; Chapter 6.
11. Dikshit, A.; Naqvi, A. A.; Husain, A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 1085.
12. Rosenthal, G. A.; Berenbaum, M. R. *Herbivores their interactions with secondary plant metabolites*, Academic Press, Inc.: San Diego, 1991.
13. Ferreira, A. B. H. Dicionário Aurélio Eletrônico. 1999.
14. Miller, D. R. *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32*, 794.
15. Diongue, A.; Lai, P-Y. L.; Lin, C. *Asian J. Chem.* **2007**, *19*, 2002.
16. Valterová, I.; Nehlin, G.; Borg-Karson, A-K. *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, *25*, 477.
17. Huang, J.; Schmelz, E. A.; Alborn, H.; Engelberth, J.; Tumlinson, J. H. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 439.
18. De Feo, V.; De Simone, F.; Senatore, F. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 573.
19. Moura, M. Z. D. Dissertação - Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
20. [www.arbolesornamentales.com/schinuspolygamus.htm](http://www.arbolesornamentales.com/schinuspolygamus.htm) disponível em: 18/03/2007.
21. Barroso, G. M.; Bueno, O. M. *Flora ilustrada catarinense - Compostas*, Itajaí, 2002.
22. Araújo, A. P. A.; Carneiro, M. A. A.; Fernandes, G. W. *Revta. Bras. Entomol.* **2003**, *47*, 483.

23. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; de Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 5<sup>a</sup> ed.; Porto Alegre/Florianópolis, 2003.
24. Dellacassa, E.; Moyna, P.; Nieto, A. *Aportes para el desarrollo del sector de plants medicinales y aromáticas en el Uruguay*, 1<sup>a</sup> ed.; Montevideo, 2005.
25. Scrivanti, L. R.; Zunino, M. P.; Zygadlo, J. A. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 563.
26. Nishida, N.; Tamotsu, S.; Nagata, N.; Saito, C.; Sakai, A. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 1187.
27. Ruffinengo, S.; Eguaras, M.; Floris, I.; Faverin, C.; Bailac, P.; Ponzi, M. *J. Econ. Entomol.* **2005**, *96*, 651.
28. Mukherjee, S. *Invert. Reprod. Develop.* **2003**, *43*, 125.
29. Faini, F.; Labbé, C.; Coll, J. *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 673.
30. Aharoni, A.; Jongsma, M. A.; Bouwmeester, H. J. *Plant Science* **2005**, *10*, 594.
31. Felt, E. P. *Plant galls and gall makers*, Updesh Purohit for Agrobios: Jodspur, 2001.
32. Weis, A. E.; Waton, R.; Crego, C. L. *Ann. Rev. Entomol.* **1988**, *33*, 467.
33. Araújo, A. P. A.; Paula, J. D.; Carneiro, M. A. A.; Schoederer, J. H. *Austral Ecol.* **2006**, *31*, 348.
34. Arduin, M.; Kraus, J. E. *Revta. Brasil. Bot.* **2001**, *24*, 63.
35. Valladares, G. R.; Zapata, A.; Zygadlo, J.; Banchio, E. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4059.
36. Flamini, G.; Bader, A.; Cioni, P. L.; Katbeh-Bader, A.; Morelli, I. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 572.
37. Kato, E. T. M., Akisue, G. *Revt. Lecta* **2002**, *20*, 69.
38. Queiroz, C. R. A. A., de Moraes, S. A. L., do Nascimento, E. A. *Revta. Árv.* **2002**, *26*, 485.
39. González, S.; Guerra, P. E.; Bottaro, H.; Molaes, S.; Demo, M. S.; Oliva, M. M.; Zunino, M. P.; Zygadlo, J. A. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 36.
40. Erazo, S.; Delporte, C.; Negrete, R.; García, R.; Zaldívar, M.; Iturra, G.; Caballero, E.; López, J. L.; Backhouse, N. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *107*, 395.
41. Alé, S. I.; Ferreira, F.; González, G.; Epstein, W. *Am. J. Contact Derm.* **1997**, *8*, 144.
42. López, P.; Ruffa, M. J.; Cavallaro, L.; Campos, R.; Martino, V.; Ferraro, G. *Phytomed.* **2005**, *12*, 108.

43. Viana, G. S. B.; Bandeira, M. A. M.; Matos, F. J. A. *Phytomed.* **2003**, *10*, 189.
44. Barrachina, M. D.; Bello, R.; Martínez-Cuesta, M. A.; Primo-Yúfera, E.; Esplugues, J. *Phytother. Res.* **1997**, *11*, 317.
45. Medal, J. C.; Vitorino, M. D.; Habeck, D. H.; Gillmore, J. L.; Pedrosa, J. H.; Sousa, L. P. *Biol. Control* **1999**, *14*, 60.
46. Mandich, L.; Bittner, M.; Silva, M.; Barros, C. *Revta. Latinoam. Quim.* **1984**, *15*, 80.
47. <http://conserveonline.org/docs/2001/2001/06/schpol01.pdf> disponível em: 18/02/2007.
48. Barroso, G. M. *Rodriguésia* **1976**, *28*, 273.
49. Budel, J. M.; Duarte, M. R.; Santos, C. A. M.; Farago, P. V. *Acta Farm. Bonaerense* **2004**, *23*, 477.
50. Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G. *Quím. Nova* **2005**, *28*, 85.
51. Abad, M. J.; Bermejo, P. *ARKIVOC* **2007**, *7*, 76.
52. Feresin, G. E.; Tapia, A.; Gimenez, A.; Ravelo, A. G.; Zacchino, S.; Sortino, M.; Schmeda-Hirschmann, G. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 73.
53. Park, Y. K.; Paredes-Guzman, J. F.; Aguiar, C. L.; Alencar, S. M.; Fujiwara, F. Y. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *24*, 1100.
54. Moreira, F. P. M.; Coutinho, V.; Montanher, A. B. P.; Caro, M. S. B.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G. *Quím. Nova* **2003**, *26*, 309.
55. Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2502.
56. Moreira, F. P. M.; Branco, A.; Pizzolatti, M. G.; Morais, A. A.; Monache, F. D. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 321.
57. Zdero, C.; Bohlmann, F.; Solomon, J. C.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 531.
58. Bohlmann, F.; Banerjee, S.; Jakupovic, J.; Grenz, M.; Misra, L. N.; Schmeda-Hirschmann, G.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1985**, *23*, 511.
59. Loayza, I.; Abujder, D.; Aranda, R.; Jakupovic, J.; Collin, G.; Deslauriers, H.; Jean, F. I. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 381.
60. Ferracini, V. L.; Paraíba, L. C.; Leitão Filho, H. F.; Silva, A. G. *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 355.
61. Queiroga, C. L.; Fukai, A.; Marsaioli, A. J. *J. Braz. Chem. Soc.* **1990**, *1*, 105.
62. Cassel, E.; Frizzo, C. D.; Vanderlinde, R.; Atti-Serafini, L.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *39*, 4803.

63. Vargas, R. M. F.; Cassel, E.; Gomes, G. M. F.; Longhi, L. G. S.; Atti-Serafini, L.; Atti-Santos, A. C. *Braz. J. Chem. Eng.* **2006**, *23*, 375.
64. Céspedes, C. L.; Uchoa, A.; Salazar, J. R.; Perich, F.; Pardo, F. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2283.
65. Leitão, D. P. S.; Silva Filho, A. A.; Polizello, A. C. M.; Bastos, J. K.; Spadaro, A. C. C. *Biol. Pharm. Bull* **2004**, *27*, 1834.
66. Feresin, G. E.; Tapia, A.; López, S. N.; Zacchino, S. A. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *78*, 103.
67. Jarvis, B. B.; Midiwo, J. O. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 736.
68. Cifuentes, D. A.; Borkowski, E. J.; Sosa, M. E.; Gianello, J. C.; Giordano, O. S.; Tonn, C. E. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 899.
69. Levine, R. L. *Free Radical Biol. Med.* **2007**, *32*, 790.
70. Queiroga, C. L.; Ferracini, V. L.; Marsaioli, A. J. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1097.
71. Oliveira, S. Q.; Barbon, G. Gosmann G.; Bordignon, S. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2006**, *29*, 2609.
72. Sülsen, V.; Güida, C.; Coussio, J.; Paveto, C.; Muschietti, L.; Martino, V. *Parasitol Res* **2006**, *98*, 370.
73. Oliveira, S. Q.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J. C. F.; Schenkel, E. P.; Gossmann, G. *Acta Farm. Bonaerense* **2004**, *23*, 365.
74. Harborne, J. B. *Introduction to Ecological Biochemistry*, 4<sup>th</sup> ed.; Academic Press Inc.: London, 1993.
75. Hay, R. K. M.; Waterman, P. G. *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*, Longman Scientific & Technical: New York, 1993.
76. Dicke, M.; Sabelis, M. W.; Takabayashi, J.; Bruin, J.; Posthumus, M. A. *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 3091.
77. Schultz, J. C. *Plant signals in interactions with other organisms*, Schultz, J. C.; Raskin, I., Eds.; 11 ed.; American Society of Plant Physiologists: Rockville, 1993.
78. James, D. G. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 481.
79. Santos, A. S.; Alves, S. M.; Figueirêdo, F. J. C.; da Rocha Neto, O. G. Descrição de sistemas e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [CT99 - ISSN 1517-2244], 2004.
80. Murray, A. P.; Frontera, M. A.; Tomas, M. A.; Mulet, M. C. *Z. Naturforschung* **2005**, *60*, 25.

81. Demirci, B.; Demirci, F.; Baser, K. H. C. *Flavour Fragr.J.* **2005**, *20*, 395.
82. Wongpornchai, S.; Sriseadka, T.; Choonvisase, S. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 457.
83. Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martinez, J. R. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1025*, 93.
84. Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I. *Food Chem.* **2005**, *91*, 63.
85. Marongiu, B.; Porcedda, A. P. S.; Casu, R.; Pierucci, P. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 554.
86. Özel, M. Z.; Gögüs, F.; Lewis, A. C. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *566*, 172.
87. Deng, C.; Yao, N.; Wang, B.; Zhang, X. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1103*, 15.
88. Wannaz, E. D.; Zygadlo, J. A.; Pignata, M. L. *Sci. Total Environ.* **2003**, *305*, 177.
89. Bernhard, R. A.; Shibamoto, T.; Yamaguchi, K.; White, E. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 463.
90. Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 459.
91. Collins, C. H.; de Aquino Neto, F. R.; da Silva, J. R. P. *Quím. Nova* **1988**, *11*, 443.
92. Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*, Wiley - WCH, Inc.: New York, 1997.
93. Norin, T.; Smedman, L. A. *Acta Chem. Scand.* **1971**, *25*, 2010.
94. Demyttenaere, J. C. R.; Vanoverschelde, J.; Kimpe, N. D. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1027*, 137.
95. Mani, V. *Applications of Solid Phase Microextraction*, Pawliszyn, J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1999; Chapter 5.
96. Deng, C.; Wang, A.; Shen, S.; Fu, D.; Chen, J.; Zhang, X. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 326.
97. Pellati, F.; Benvenuti, S.; Yoshizaki, F.; Bertelli, D.; Rossi, M. C. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1087*, 265.
98. Koziel, J.; Jia, M.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5178.
99. Sigma-Aldrich. T499102 - Sample Prep Made Easy. 1999.
100. Sigma-Aldrich. T705002A - Solid Phase Microextraction (SPME) Metal Fiber Assemblies. 2005.
101. Ceva-Antunes, P. M. N.; Bizzo, H. R.; Silva, A. S.; Carvalho, C. P. S.; Antunes, O. A. C. *LWT* **2006**, *39*, 436.
102. Page, B. D.; Lacroix, G. *J. Chromatogr. A* **2000**, *873*, 79.



103. Giuseppe, Z.; Manuela, G.; Marta, B.; Vincenzo, G. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1071*, 247.
104. Supelco. How to choose the proper SPME fiber. T499102, 2000.
105. Jirovetz, L.; Smith, D.; Buchbauer, G. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4643.
106. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Shahabi, M. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* **2002**, *5*, 111.
107. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Stoyanova, A.; Balinova, A.; Guangjiun, Z.; Xihan, M. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 7.
108. Mazida, M. M.; Salleh, M. M.; Osman, H. *J. Food Compos. Anal.* **2005**, *18*, 427.
109. Shafi, M. P.; Rosamma, M. K.; Jirovetz, L.; Höferl, M.; Buchbauer, G. *Recent Res. Develop. Agric. Food Chem.* **2001**, *5*, 154.
110. Deng, C.; Li, N.; Zhang, X. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1059*, 149.
111. Song, G.; Deng, C.; Wu, D.; Hu, Y. *Chromatographia* **2004**, *59*, 343.
112. Zini, C. A.; Augusto, F.; Christensen, E.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7199.
113. Ammon, D. G.; Barton, A. F. M.; Clarke, D. A.; Tjandra, J. *Analyst* **1985**, *110*, 917.
114. Adams, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Illinois, 2001.
115. Lanças, F. M. *Cromatografia em fase gasosa*, São Carlos, 1993.
116. Bendimerad, N.; Bendiab, S. A. T. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2947.
117. Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I.; Maccioni, S.; Baldini, R. *Food Chem.* **2004**, *85*, 599.
118. Weyerstahl, P.; Marschall-Weyerstahl, H.; Christiansen, C.; Oguntimein, B. O.; Adeoye, A. O. *Planta Med.* **1998**, *6*, 546.
119. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2003**, *62*, 55.
120. Shirey, R. E. *Solid Phase Microextraction*, Wercinski, S. A. S., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1999; Chapter 3.
121. Sidisky, L. M. Comunicação pessoal.
122. Shao, Y.; Marriot, P.; Shellie, R.; Hügel, H. *Flavour Fragr J.* **2003**, *18*, 5.
123. Wyllie, S. G.; Merry, K.-A.; Leach, D. N. *Gas Chromatography-Olfactometry*, Leland, J. V.; Schieberle, P. S.; Buettner, A. Acree, T. E., Eds.; Washington, 2001; Chapter 8.

124. Dickens, J. C. *Chem. Senses* **1990**, *15*, 311.
125. Todd, J. L.; Baker, T. C. *Naturwissenschaften* **1993**, *80*, 183.
126. Wibe, A.; Borg-Karson, A. K.; Norin, T.; Mustaparta, H. *J. Comp. Physiol. A* **1997**, *180*, 585.
127. Hansson, B. S.; Larsson, M. C.; Leal, W. S. *Physiol. Entomol.* **1999**, *24*, 121.
128. Jonsson, M.; Anderson, P. *Physiol. Entomol.* **1999**, *24*, 385.
129. Schütz, S.; Weissbecker, B.; Hummel, H. E.; Apel, K.-H.; Schmitz, H.; Bleckmann, H. *Nature* **1999**, *398*, 298.
130. Buttery, R. G.; Ling, L. C. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 772.
131. Oliveira, S. Q.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J. C. F.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 1029.
132. Knudsen, J. T.; Tollsten, L.; Bergström, L. G. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 253.
133. Liang-Feng, Z.; Bi-yao, L.; You-jiao, L. *Acta Botan. Sinica* **1984**, *26*, 189.
134. Tatsuka, K.; Suekane, S.; Sakai, Y.; Sumitani, H. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 2176.
135. McGraw, G. W.; Hemingway, R. W.; Ingram Jr., L. L.; Canady, C. S.; McGraw, W. B. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 4029.
136. Azzouz, M. A.; Reineccius, G. A.; Moshonas, M. G. *J. Food Sci.* **1976**, *41*, 324.
137. Flamini, G.; Tebano, M.; Cioni, P. L.; Bagci, Y.; Dural, H.; Ertugrul, K.; Uysal, T.; Savran, A. *Pl. Syst. Evol.* **2006**, *261*, 217.
138. Toyota, M.; Koyama, H.; Mizutani, M.; Asakawa, Y. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1347.
139. Bertoli, A.; Pistelli, L.; Morelli, I.; Fraternali, D.; Giamperi, L.; Ricci, D. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 522.
140. Slater, C. A.; Watkins, W. T. *J. Sci. Food Agric.* **1964**, *15*, 657.
141. Prates, H. T.; Santos, J. P.; Waquil, J. M.; Fabris, J. D.; Oliveira, A. B.; Foster, J. E. *J. Stored Prod. Res* **1998**, *34*, 243.
142. Tooker, J. F.; Crumrin, A. L.; Hanks, L. M. *Chemoecology* **2005**, *15*, 85.
143. Fagundes, M.; Neves, F. S.; Fernandes, G. W. *Ecol. Entomol.* **2005**, *30*, 28.
144. Tooker, J. F.; Hanks, L. M. *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 473.
145. Tooker, J. F.; Koenig, W. A.; Hanks, L. M. *PNAS* **2002**, *99*, 15486.
146. Hanula, J. L.; Berisford C.W.; DeBarr, G. L. *J. Chem. Ecol.* **1985**, *11*, 943.
147. Powell, J. S.; Raffa, K. F. *J. Entomol. Sci.* **2003**, *38*, 415.

148. Sandstrom, P.; Welch, W. H.; Blomquist, G. J.; Tittiger, C. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *36*, 835.
149. Lee, S.; Tsao, R.; Peterson, C.; Coats, J. R. *J. Econ. Entomol.* **1997**, *90*, 883.
150. Harborne, J. B.; Tomas-Barberan, F. A. *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, Cleredon Press Oxford: Oxford, 1991.
151. Röse, U. S. R.; Manukian, A.; Heath, R. R.; Tumlinson, J. H. *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 487.
152. Tambe, Y.; Tsujiuchi, H.; Honda, G.; Ikeshiro, Y.; Tanaka, S. *Planta Med.* **1996**, *62*, 469.
153. Hedin, P. A.; McKibben, G. H.; Dollar, D. A. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3673.
154. Langenheim, J. H.; Foster, C. E.; McGeinley, R. B. *Biochem. Syst. Ecol.* **1980**, *8*, 385.

*ANEXOS*



*ANEXO A*  
*FIGURAS*



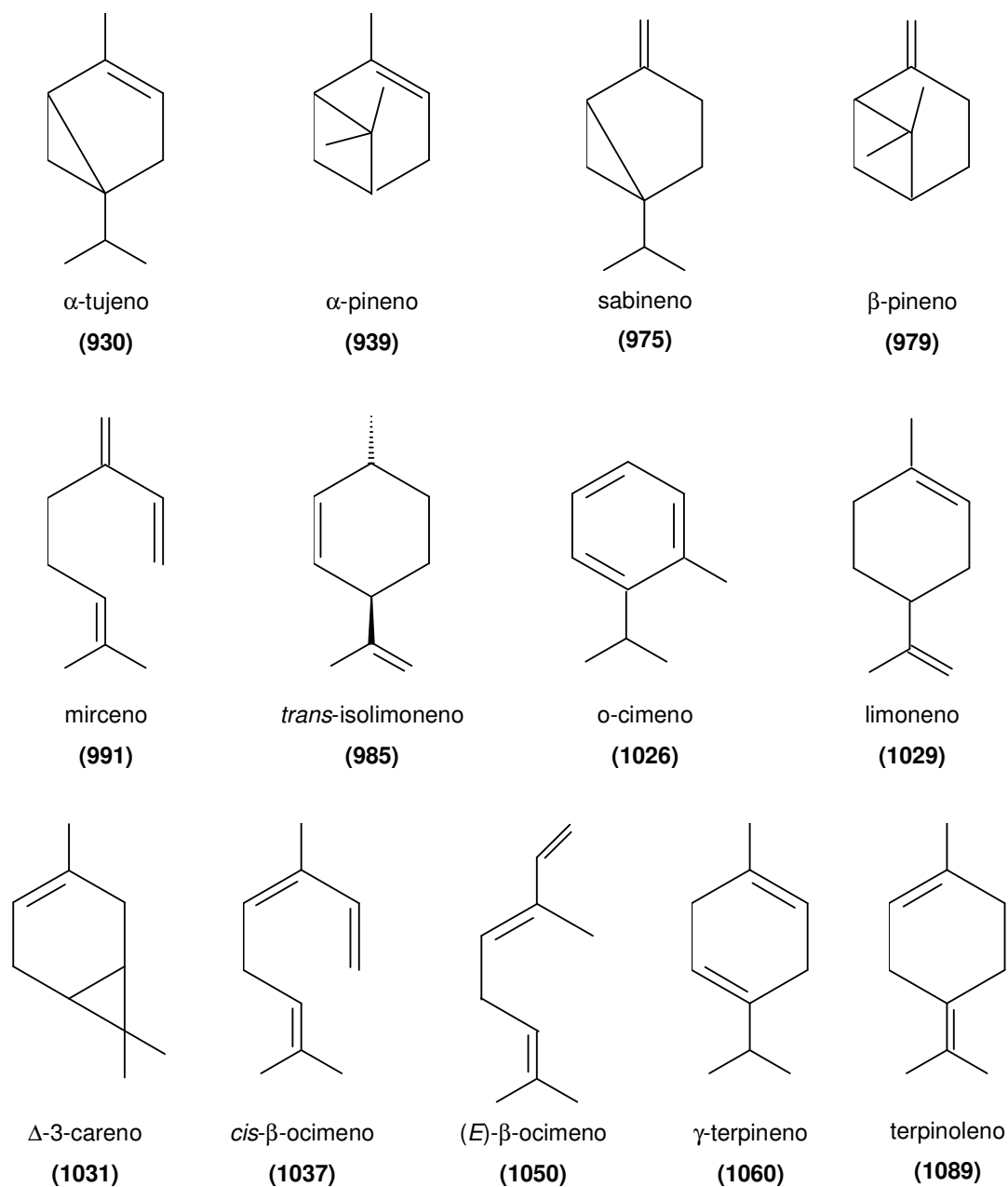


Figura A1. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos monoterpênicos e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e *headspace* (HS-SPME) da *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

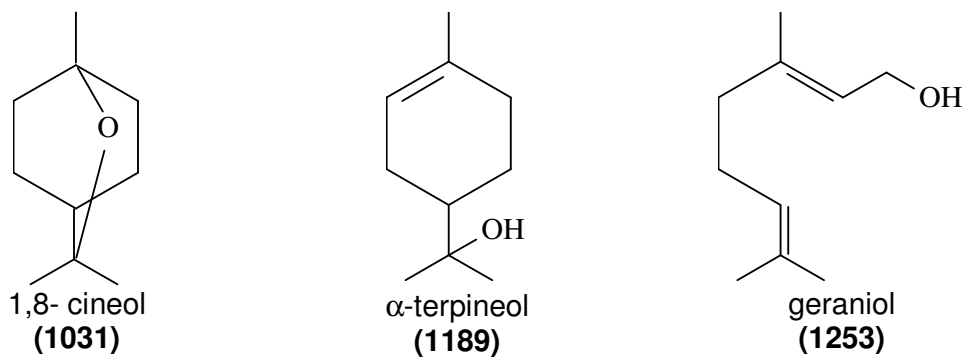


Figura A2. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos monoterpênicos oxigenados e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e *headspace* (HS-SPME) de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

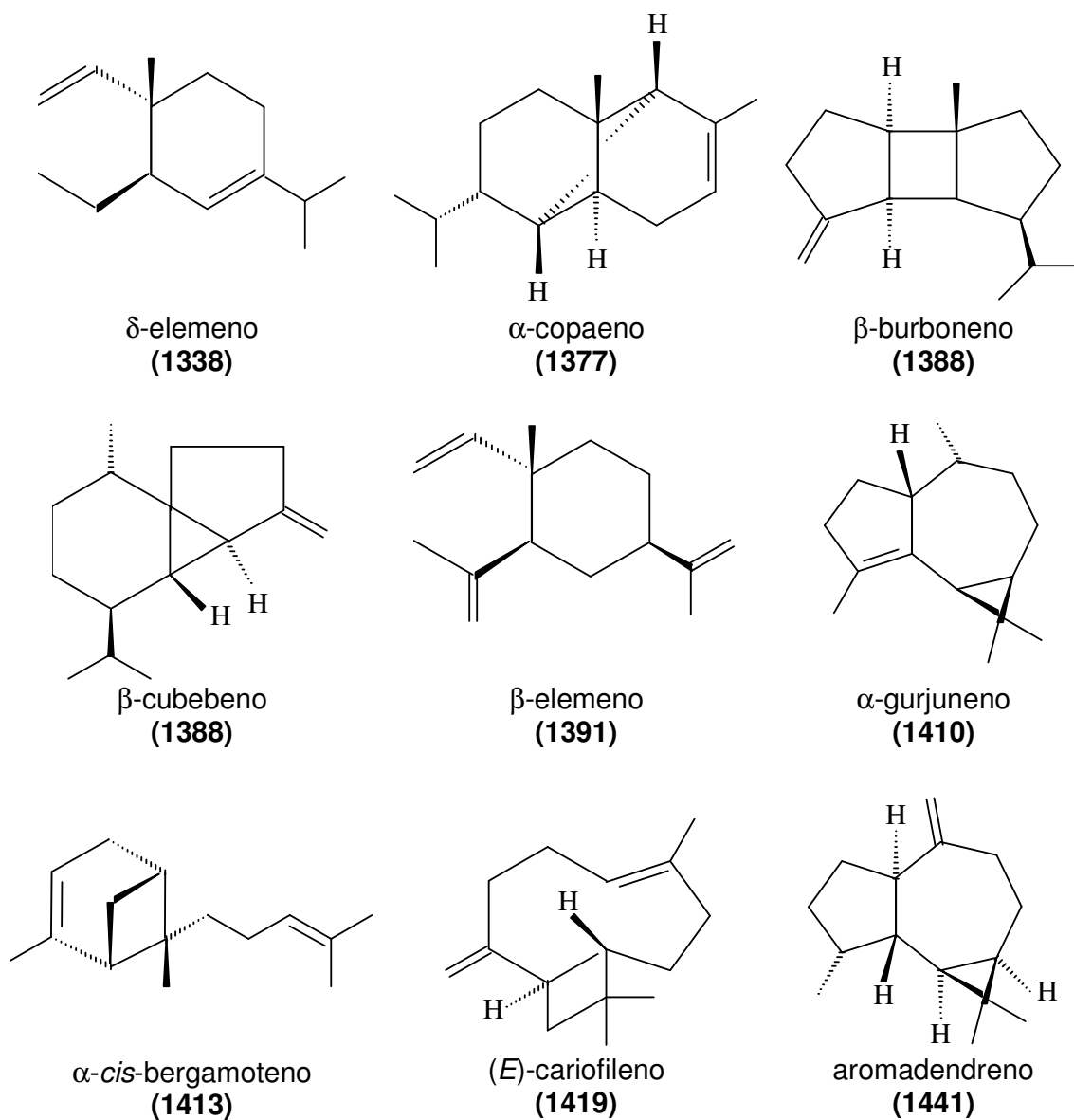


Figura A3. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e *headspace* (HS-SPME) de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.



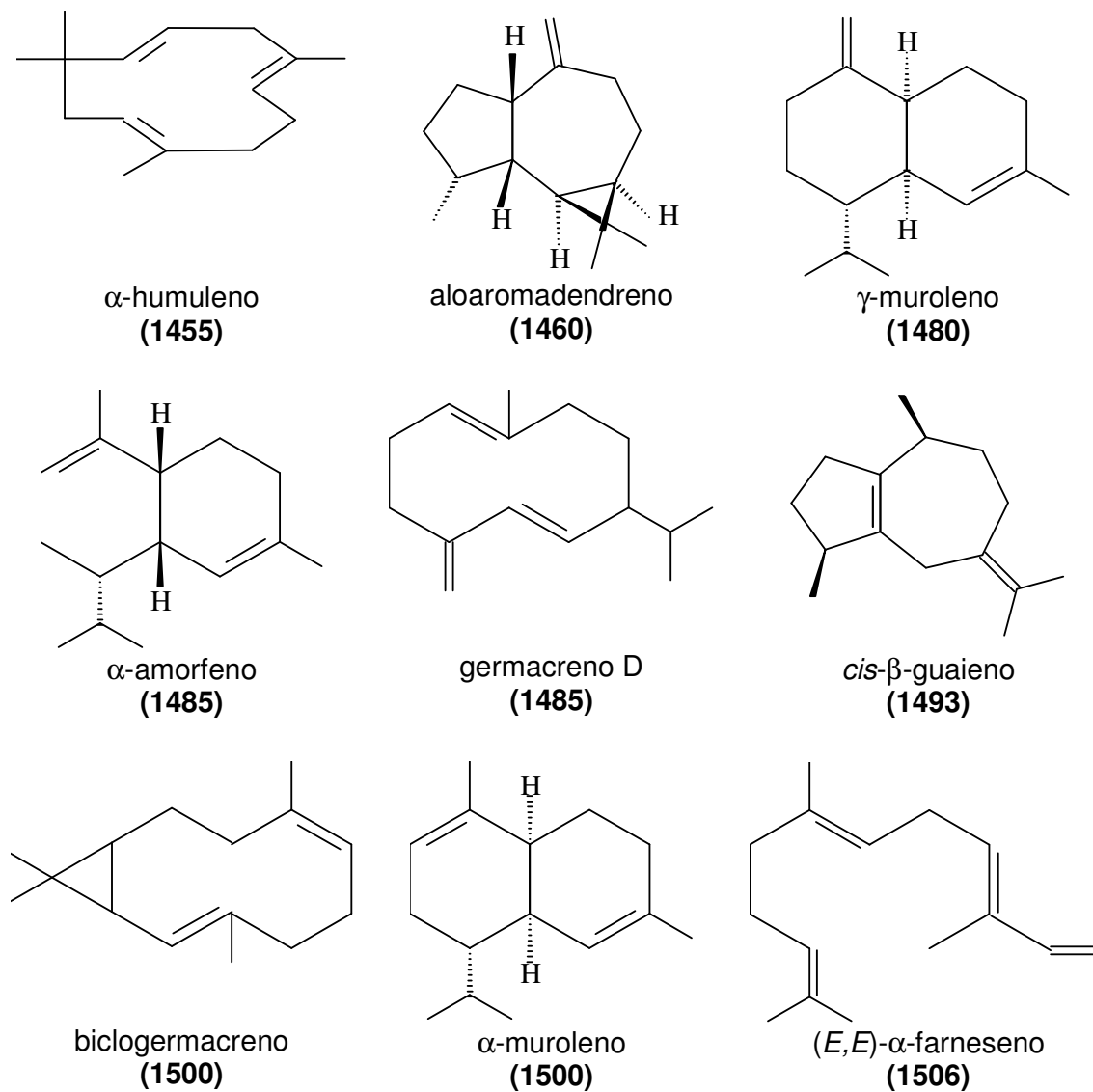
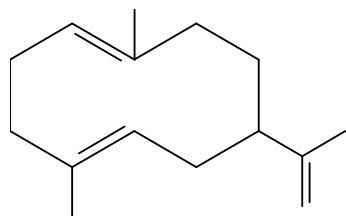
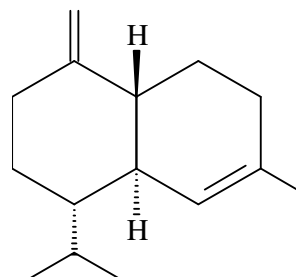


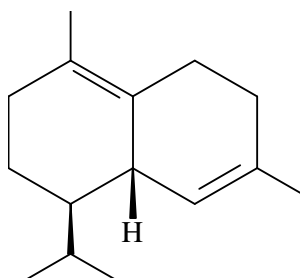
Figura A4. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e *headspace* (HS-SPME) de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.



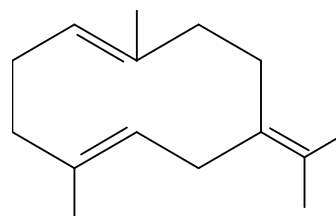
germacreno A  
(1509)



$\gamma$ -cadineno  
(1514)



$\delta$ -cadineno  
(1523)



germacreno B  
(1561)

Figura A5. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e *headspace* (HS-SPME) de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

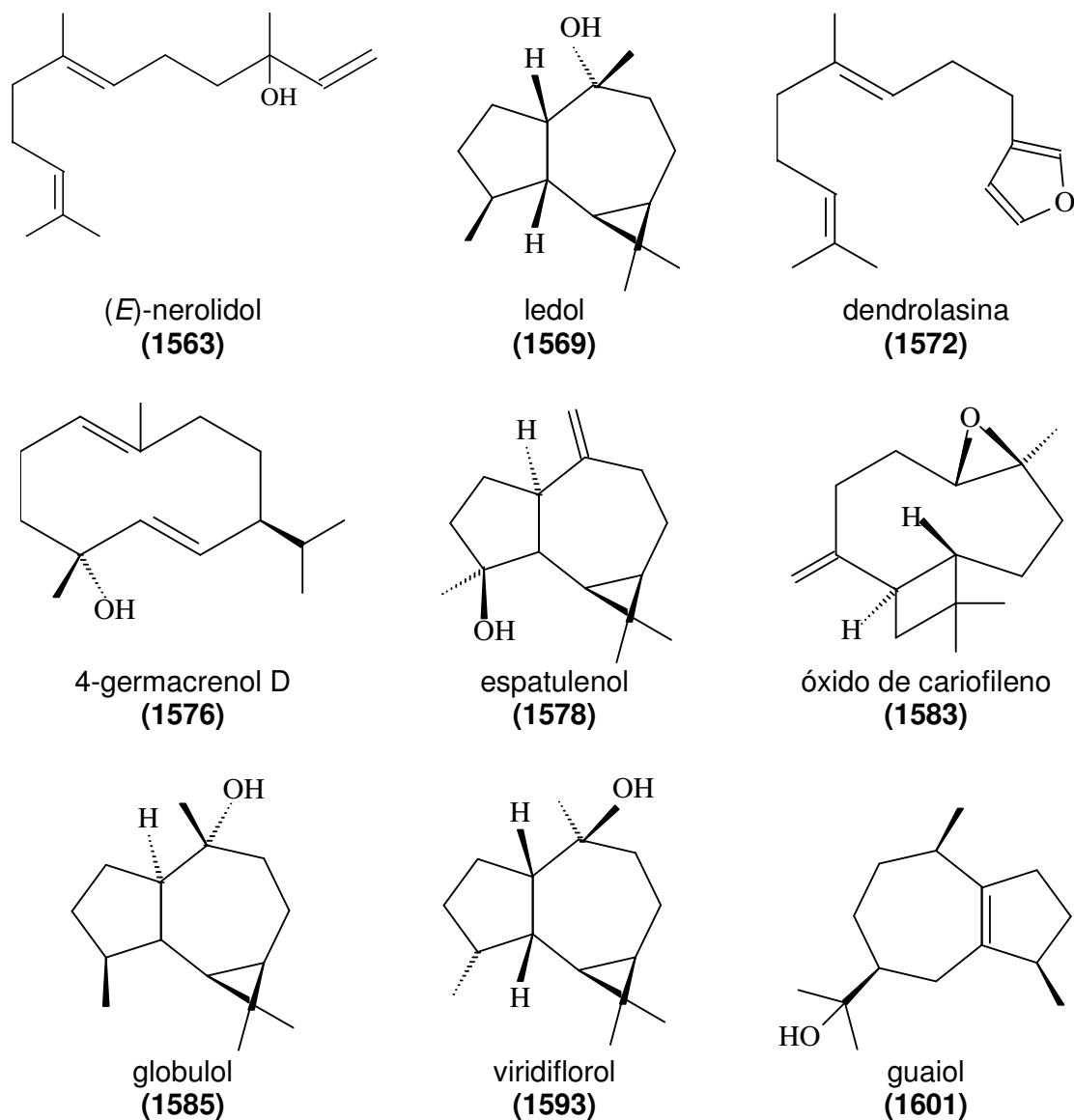


Figura A6. Fórmulas estruturais de alguns sesquiterpenos oxigenados e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e *headspace* (HS-SPME) de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

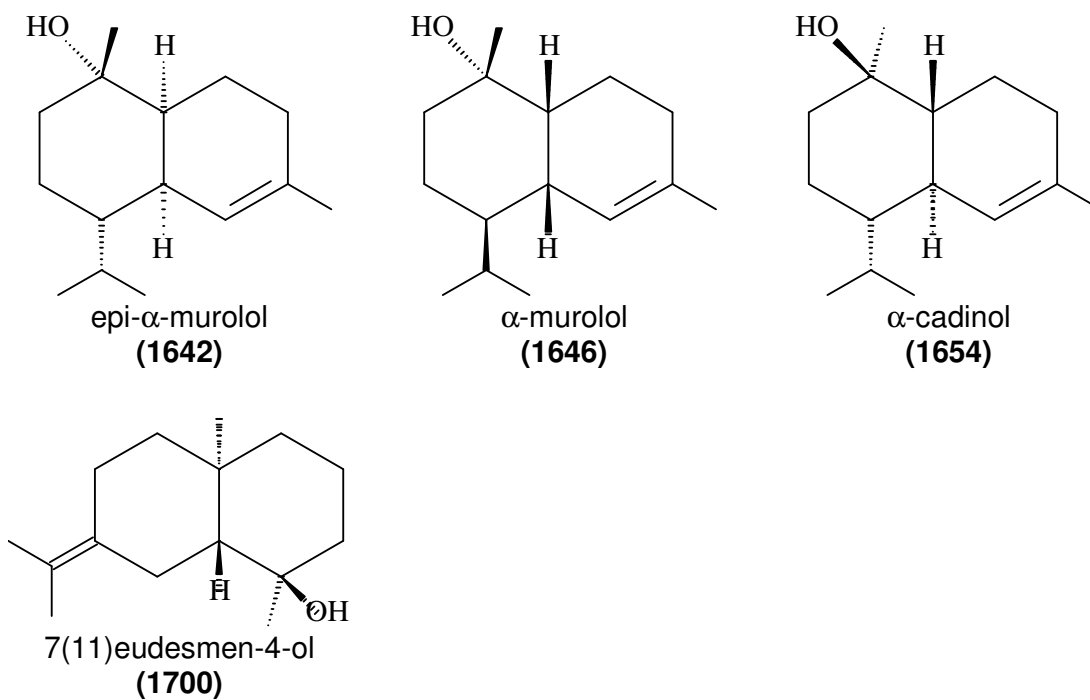


Figura A7. Fórmulas estruturais de alguns sesquiterpenos oxigenados e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e *headspace* (HS-SPME) de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

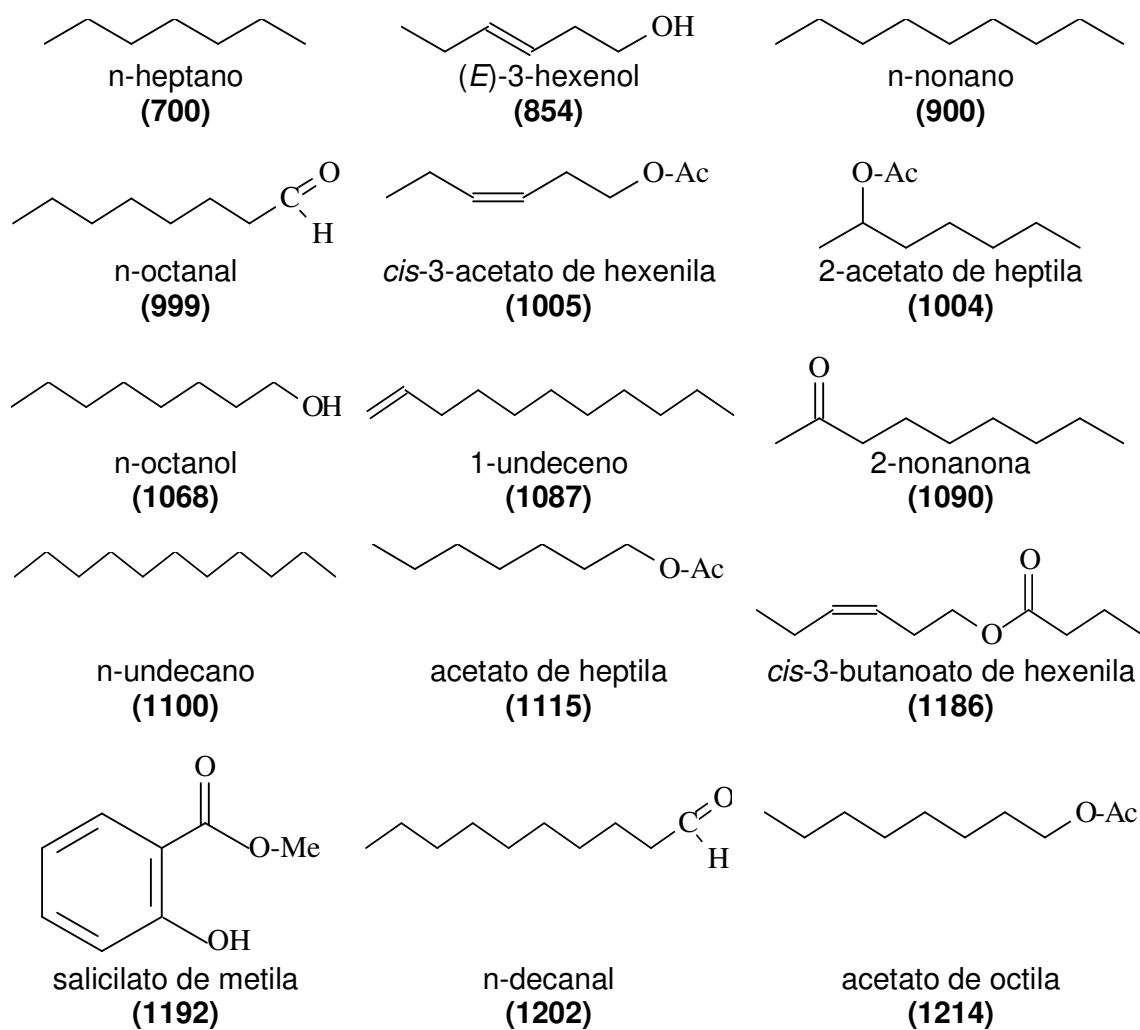


Figura A8. Fórmulas estruturais de compostos de vários grupos funcionais e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e *headspace* (HS-SPME) de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

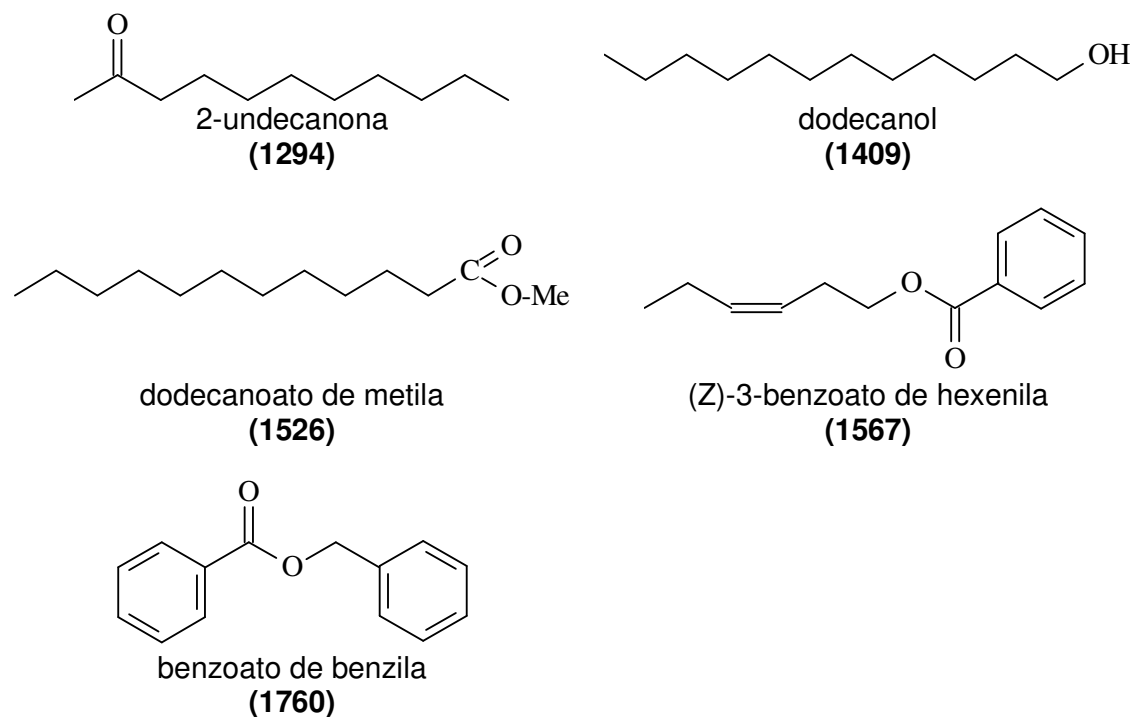


Figura A9. Fórmulas estruturais de compostos de vários grupos funcionais e seus respectivos índices de retenção de compostos presentes no óleo essencial (HD) e *headspace* (HS-SPME) de *Schinus polygamus* e *Baccharis spicata*.

*ANEXO B*  
*PRODUÇÃO CIENTÍFICA*



## 1 TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Damasceno, F.D.; Nicolli, K.P.; Soares, G.L.G.; Caramão, E.B.; Zini, C.A. Analysis of Volatile Compounds of Leaves and Galls of *Schinus polygamus* and *Baccharis spicata* by Headspace Solid phase micro extraction. Submetido em 16/08/2006.

## 2 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

**2.1 Iniciação Científica em Relatos** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul de 16 a 20 de abril de 2007. Apresentação oral do resumo do trabalho de iniciação científica: Estudo de Compostos Voláteis de *Schinus polygamus* através do uso de Hidrodestilação e Micro Extração em Fase Sólida no Modo Headspace. Nicolli, K.P.; Damasceno, F.C. ; Zini, C.A.

**2.2 14º ENQA** – Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, Paraíba de 07 a 11 de outubro de 2007. Apresentação de pôster do trabalho: Estudo das Substâncias Voláteis Presentes na *Schinus polygamus* (Anacardiaceae) Infestada por Galhas Foliáres utilizando Microextração em Fase Sólida no Modo Headspace. Damasceno, F.C.; Nicolli, K.P.; Soares, G. L. G; Caramão, E. B.; Zini, C.A.  
Resumo publicado nos anais do Encontro



**2.3 14º ENQA** – Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, Paraíba de 07 a 11 de outubro de 2007. Apresentação de pôster do trabalho: Microextração em Fase Sólida no Modo Headspace como Ferramenta na Determinação dos Compostos Voláteis Presentes em Folhas e Galhas de *Baccharis spicata* (Asteraceae). Damasceno, F.C.; Nicolli, K.P.; Soares, G. L. G; Caramão, E. B.; Zini, C.A.

Resumo publicado nos anais do Encontro

**2.4 XIX SIC** – Salão de Iniciação Científica, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul de 21 a 26 de outubro de 2007. Apresentação oral e pôster do trabalho: Damasceno, F.C.; Nicolli, K.P; Zini, C.A.

Resumo publicado nos anais do Encontro

### 3. CÓPIA DO ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

## **Analysis of Volatile Compounds of Leaves and Galls of *Schinus polygamus* and *Baccharis spicata* by Headspace Solid phase micro extraction**

FLAVIANA CARDOSO DAMASCENO<sup>1</sup>, KARINE PRIMIERI NICOLLI<sup>1</sup>, GERALDO LUIZ GONÇALVES SOARES<sup>2</sup>, ELINA BASTOS CARAMÃO, CLÁUDIA ALCARAZ ZINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil  
Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica (LAAO), Instituto de Química (IQ), <sup>2</sup>Instituto de Biociências (IB)

To whom correspondence should be addressed (cazini@iq.ufrgs.br)

Phone 55 51 33 08 72 17,

Fax 55 51 33 37 04 42

Short title: galls and leaves volatiles of *S. polygamus* and *B. spicata* by HS-SPME

Keywords: headspace solid phase microextraction, galls, *Schinus polygamus*, *Baccharis spicata*, essential oils.

## Abstract

HS-SPME is presented as an efficient tool to access differences and similarities in volatiles composition that might have been caused by insect-plant interaction, using leaves and galls of *Schinus polygamus* and *Baccharis spicata*. Method development involved testing nine SPME coatings and different extraction times, resulting in the choice of the triple layer DVB-CAR-PDMS. Some compounds were detected only in the headspace of plant tissue, such as for example n-heptane in *S. polygamus* and 1-undecene in *B. spicata*, even though n-heptane was also detected in minor amounts in the essential oil obtained by hydrodistillation. Some other components were present only in one specific vegetable tissue such as  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, myrcene,  $\alpha$ -bergamotene, and  $\gamma$ -cadinene in galls. The concentration of some other terpenoids was higher in galls or leaves of both plants. *B. spicata* essential oil was for the first time reported, and had spathulenol (34.3 %) as its major component, while n-nonane was the most abundant compound in *S. polygamus* essential oil. Qualitative and quantitative differences between distinct plant tissues and also between hydrodistilled oil and headspace chromatographic profile of the same sample confirmed that HS-SPME is a convenient analytical tool to provide information closer to that of *in vivo* plant on possible allelochemicals of different plant tissues involved in the insect-plant interaction.

## **INTRODUCTION**

An extraction technique should be chosen according to the type of required analytical information. Investigations related to volatile infochemical compounds emitted by plants aim to access the composition as close as possible to that one of the plant *in vivo*. For this purpose, different techniques are employed: distillation (Valladares et al., 2002; Flamini et al., 2004), solvent extraction, static or dynamic headspace (Valterová et al., 1997), solid phase microextraction (SPME) (Diongue et al., 2007), stir-bar sorptive extraction (SBSE) (Bicchi et al., 2005), and supercritical fluid extraction (Tapia et al., 2007). Hydrodistillation presents some drawbacks, as it exposes the vegetal material to boiling water and different pHs, providing conditions to structural changes in infochemical compounds (Sandra and Bicchi, 1987). Conventional headspace techniques are usually employed as they allow the use of amenable temperatures, although low sensitivity or the use of additional devices and time consuming procedures are known disadvantages of these techniques. Regarding SBSE, the only one polymeric film commercially available is PDMS, hindering extraction of polar analytes. (Quintana et al., 2007; Bicchi et al., 2005) HS-SPME has been extensively applied in the study of fresh plant volatile compounds, as it overcomes some of the challenges posed by this type of extraction, providing sensitivity, selectivity, fastness, absence of solvent, and lower extraction temperatures (Zini et al., 2003; Zini et al., 2002; Ceva et al., 2006).

Plant tissues may show chemical and morphological changes following insect attack (Valladares et al., 2002; Araújo et al., 2003). Herbivory may imply the emission and/or production of volatile compounds (allelochemicals) which repulse or attract other species (Tooker and Hanks, 2004; Huang et al., 2005; James, 2005). Allelochemicals play important ecological roles, serving as a defense against herbivores and pathogens, as attractants for pollinators and for fruit-dispersing animals or as allelopathic agents (Rosenthal and Berenbaum, 1991; De Feo et al., 2002). Galls are abnormal vegetal growth resulting from the action of an inductor organism (Moura, 2000). They are also important from other points of view, such as in the investigation of bioactive molecules in medicinal or aromatic plants (Valladares et al., 2002) and for some other useful purposes (Felt, 2001). This phenomenon may be followed by qualitative and quantitative alterations in volatiles composition (Flamini et al., 2004; Valladares et al., 2002; Tooker et al., 2002). Even though there

are many studies on galls morphology and insect-allelochemicals behavior (Araújo et al., 2003; Tooker and Hanks, 2004; James, 2005), studies on volatile oil composition changes on galls and healthy tissue samples of infested plants are rare in the literature (Flamini et al., 2004; Valladares et al., 2002).

*Schinus polygamus* (Anacardiaceae) (Erazo et al., 2006) and *Baccharis spicata* (Asteraceae) (Barroso and Bueno, 2002) are Brazilian native species, which present leaf gall induced by two unidentified psyllids (Psylloidea, Hemiptera) species (Valladares et al., 2002; Flamini et al., 2004). The leaves volatile composition of Brazilian *B. spicata* and of *S. polygamus* has not yet been reported in the scientific literature, neither the volatile composition of their galls.

Former works of this group have shown that SPME is a convenient tool for the study of volatile plant components *in situ* and *ex-situ*, providing information on a vast range of compounds that may be associated to plant-organism or plant-environment interactions. In this work, we aim to investigate the potential of this extraction technique as a convenient approach to access information on the composition of volatile oil of galls and healthy leaves of *Schinus polygamus* and *Baccharis spicata* using HS-SPME as extraction technique.

## EXPERIMENTAL

### Plants

Galled and healthy leaves of *S. polygamus*, were collected from May to December 2006 in the cities of Guaíba, Viamão and Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil. Leaves and galls of *B. spicata* were collected in March 2007 in Porto Alegre city. The samples were identified by a local botanist and voucher specimens of *S. polygamus* (148777) and *B. spicata* (148798) have been deposited in the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

### Materials

The SPME fibers were provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA): 7 µm PDMS StableFlex, 30 µm PDMS, 100 µm PDMS, 85 µm PA, 60 µm CW(PEG) metal, 85 µm CAR/PDMS StableFlex, 65 µm PDMS/DVB StableFlex, 50/30

DVB/CAR/PDMS StableFlex and 50/30 DVB/CAR/PDMS metal. Prior to use, fibers were conditioned according to the supplier specifications. Bidistilled hexane was purchased from Quimex (São Paulo, Brazil), all the n-alkanes from Sigma-Aldrich (Milwaukee, USA), and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (sodium phosphate dibasic and potassium dihydrogenphosphate) from Synth (São Paulo, Brazil).

### **Hydrodistillation**

The essential oils of *S. polygamus* and *B. spicata* leaves (~150 g) were obtained by hydrodistillation, using a modified Clevenger apparatus during 5 hours. A cooling system using ethylene glycol mixed to water kept condenser temperature between  $-2\text{ }^\circ\text{C}$  and  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . The oil obtained was dried over anhydrous sodium sulphate and stored at  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  prior to use.

### **HS-SPME**

A preliminary test, using fresh leaves of *Eugenia uniflora*, was carried out to determine the most efficient SPME fiber to be adopted for this work. Half a gram of leaves were cut, and placed inside 10 mL glass SPME vials sealed with PTFE faced septum caps. Four mL of a 0.025 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer solution were added to each of the vials, which were then immediately capped and placed on a temperature controlled tray at  $30\text{ }^\circ\text{C}$  for approximately 24 hours. Headspace extraction was performed for 20 min, and then SPME fiber was immediately inserted into the injection port of the gas chromatograph and kept there at  $250\text{ }^\circ\text{C}$  for 15 min (Zini et al., 2003). The chosen SPME coating was used for the extraction of volatile compounds of 0,5 g of ungalled leaves, galls and also for the sound portion of galled leaves of *S. polygamus*. In the case of *B. spicata*, only leaves and galls were sampled, as galls dominate the whole area of the leaves. Extraction and desorption procedures were the same carried out during preliminary assay, except for the extraction time of headspace of *B. spicata*, which was adapted to 5 min.

### **Retention Indices**

Linear temperature programmed retention indices of hydrodistilled oil components (LTPRI) were calculated using the retention data of a 1 % hexanic solution of n-alkanes (C9 to C24), along with retention data of the essential oils compounds (Adams, 2001). During HS-SPME procedures, LTPRI were determined

employing retention data of three n-alkanes solutions (C9 to C12, C13 to C16 and C17 to C20), along with retention data of volatile compounds of *S. polygamus* and *B. spicata* samples. A 500  $\mu\text{L}$  of a 1 % methanolic solution of C9 to C12 n-alkanes was diluted to 2 mL of water. The same procedure was adopted to prepare the solutions of the n-paraffins C13 to C16 and C17 to C20, except that in this last one 1000  $\mu\text{L}$  was diluted to 2 mL. Headspace extraction was carried out at 30 °C during 5 min for the solution of higher molecular weight paraffins and during 1 min for the two other solutions. Desorption procedure in the injector port was the same described for leaf samples.

### **Chromatographic Analysis**

A Shimadzu Gas Chromatograph 17A coupled to a Mass Spectrometer Detector QP 5050A (GC/MSD) and a Shimadzu Gas Chromatograph 17A with a Flame Ionization Detector (GC-FID) were employed to perform all chromatographic analyses. Two capillary columns were used under the following conditions: (i) OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) with initial oven temperature of 60 °C raising at 3 °C/min until 250 °C; (ii) Supelcowax 10 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) with starting oven temperature of 40 °C raising at 3 °C/min until a final temperature of 220 °C. Injector and detector temperature were kept at 250 °C for OV 5 and at 220 °C for Supelcowax 10, while helium flow rate was 1.0 mL/min. Injections of 1 % hexanic solutions of essential oils were made in the split mode (1:10), while HS-SPME desorptions were splitless. The hexanic solutions of paraffins (C9-C24) and of essential oils were analyzed in GC-FID and GC/MSD, using both columns. The volatile compounds extracted by HS-SPME from *S. polygamus*, *B. spicata* and aqueous solutions of paraffins (C9 to C12, C13 to C16, and C17 to C20) were analyzed in GC/MSD using OV5 column. N-heptane and n-nonane were identified by co-injection of standard compounds. All the other components were tentatively identified through comparison of their LTPRI with those registered in the literature databases. Experimental mass spectra were also compared with the ones stored in MS databases (6<sup>th</sup> edition of the Wiley). Relative percentage of each component was obtained directly from chromatographic peak areas, considering the sum of all eluted peaks as a hundred percent.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Method Development

The SPME coatings 7 µm PDMS StableFlex, 30 µm PDMS, 100 µm PDMS, 85 µm PA, 60 µm CW(PEG) metal, 85 µm CAR/PDMS StableFlex, 65 µm PDMS/DVB StableFlex, 50/30 DVB/CAR/PDMS StableFlex and 50/30 DVB/CAR/PDMS metal were tested for the extraction of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora*) volatile components in order to verify which coating would be the most efficient. Brazilian cherry leaves were chosen for this preliminary experiment because it is rich in essential oil, and also because its components represent the ones usually present in essential oils, such as mono- and sesquiterpenes (Weyerstahl et al., 1998). Four compounds were chosen to represent the main classes of essential oil terpenoids: *trans*-β-ocimene representing monoterpene hydrocarbons, linalol for the oxygenated compounds, bicyclogermacrene for sesquiterpene hydrocarbons, and viridiflorol for oxygenated sesquiterpenes. The choice of the more efficient polymeric coating was based on two criteria: number of chromatographic peaks extracted from the headspace of *E. uniflora* leaves and area counts under each peak of the representative compounds. **Figure 1** shows chromatograms of HS-SPME of chopped fresh leaves of *E. uniflora* obtained with various polymeric coatings and **Figure 2** presents a graphic where normalized chromatographic peak areas show the extraction capacity of SPME fibers regarding the four representative compounds. The normalized areas were calculated as follows:  $A_N = \frac{A_x}{A_{MAX}}$ , where  $A_N$  is the normalized area,  $A_x$  is the area of any chromatographic peak and  $A_{MAX}$  is the maximum area obtained for a specific compound using various SPME coatings. The number of chromatographic peaks observed were: 16 with 7 µm PDMS StableFlex, 47 with 30 µm PDMS, 50 with 100 µm PDMS, 48 with 85 µm PA, 24 with metal 60 µm CW(PEG), 65 with 85 µm CAR/PDMS StableFlex, 84 with 65 µm PDMS/DVB StableFlex, 101 with 50/30 DVB/CAR/PDMS StableFlex, and 109 with metal 50/30 DVB/CAR/PDMS (average of three analysis). Four of these polymeric films are called StableFlex as they are more flexible, present greater stability, and less bleed than the original ones (Sigma-Aldrich, 1999). The CW-DVB is a new coating and applications of this coating are not yet registered in the scientific literature. This last coating and



DVB-CAR-PDMS metal belong to a new generation of SPME fibers, which are manufactured with a flexible and more resistant metal alloy in the needle and fiber core, minimizing breakage (Sigma-Aldrich, 2005). The highest performance was obtained with the 50/30 DVB/CAR/PDMS coating, as can be easily verified from **Figure 1** and **2**. These results confirm the already reported superior performance of 50/30 DVB/CAR/PDMS for several other applications (Mazida et al., 2005; Kalua et al., 2006). However this fiber has not yet been tested as a tool for investigation of changes in volatile compounds profile due to galls induced by herbivore-plant interaction. Its higher efficiency may be due to its triple film, which provides three distinct coatings, lending to it an intermediate polarity. The DVB (divinyl benzene) layer retains less volatile analytes, allowing the diffusion of the smaller and more polar ones to the CAR (carboxen) layer. Extraction occurs basically through adsorption and is recommended for volatile and semivolatile compounds containing 3 to 20 carbons, covering a broad range of polarity (Ceva et al., 2006). Extraction times were experimentally chosen according to the available amount of volatiles in the headspace: 30 min for *S. polygamus* and 5 min to *B. spicata*.

### Extraction and Analysis of Plant Tissues

**Table 1** and **Figure 3** shows significant differences among the headspace composition of galls, ungalled leaves, and sound parts of galled leaves of *S. polygamus*. The monoterpene  $\alpha$ -pinene was detected only in galls headspace (17.6 %), being in this case, one of the major components of the volatile mixture. Other compounds were also detected only in the galls headspace:  $\beta$ -pinene, myrcene,  $\alpha$ -bergamotene, and  $\gamma$ -cadinene. Limonene was found in higher concentrations (5.9%) in the headspace of galls than in the headspace of fresh leaves (0.1 %). HS-SPME also provided interesting comparison between the volatile compounds profile of galls and leaves of *B. spicata* (**Table 2** and **Figure 4**). Components such as  $\beta$ -pinene (40.9 %) presented a three times higher concentration in the headspace of galls than in the headspace of leaves. On the contrary, 1-undecene was 16 times more concentrated in the headspace of leaves than in the galls. Other compounds were detected only as volatiles in galls: n-heptane,  $\alpha$ -tujene,  $\gamma$ -terpinene, terpinolene,  $\alpha$ -terpineole,  $\beta$ -bourbonene,  $\alpha$ -gurjunene,  $\beta$ -gurjunene and germacrene A. A possible infochemical role of compounds such as  $\alpha$ -pinene and

$\beta$ -pinene is broadly supported in the literature by several research works, however, some other components found in this work were not yet studied regarding their allelochemical role (Tooker and Hanks, 2004). Alpha- and  $\beta$ -pinene are known as insect attractants (Miller, 2006), location olfactory cues for male wasps (Tooker and Hanks, 2004), and as allelopatic agents (Scrivanti et al., 2003). Limonene also presents insecticide properties (Prates et al., 1998), although some insects may overcome its deleterious effects through some mechanisms, such as excretion (Mukherjee, 2003). The monoterpene myrcene was found only in the galls of *S. polygamus* and was present in higher concentration in the galls of *B. spicatus*, when compared to its concentration in leaves. This compound is metabolized by the *Ips pini* beetle, resulting in an important aggregation pheromone, ipsdienol (Sandstrom et al., 2006), although it may impart negative effects to certain insects (Mukherjee, 2003). The terpenoids  $\alpha$ -terpineol and  $\alpha$ -gurjunene are also related to insect-plant interaction as the first acts as insecticide (Lee et al., 1997) and the other as insect repellent (Harborne and Tomas-Barberan, 1991). Several compounds detected only in galls headspace are present in low concentration, however it is well known that some insects are capable to respond to specific plant odours, being sensitive to the concentration of a single volatile in the order of parts per billion (Buttery and Ling, 1985).

Essential oil composition of *S. polygamus* leaves was considered atypical in comparison with the literature scientific reports related to the majority of essential oils and it was also different from the one reported in the literature to *S. polygamus*, as normally major compounds of this species are mono- and sesquiterpenes (González et al., 2004). In this work, n-nonane represented more than 77 % of the total amount of oil components. Similarity among the three investigated samples (**Table 1**) is higher than 85 %, even though there is a high number of components in these essential oils. Interestingly, another linear hydrocarbon – n-heptane (44.8 %) – was found only when HS-SPME was employed as extraction technique. N-heptane and n-nonane have already been detected in some other plants, but in low amounts, as for example in the kiwi fruit flowers of *Actinidia chinensis* (Tatsuka et al., 1990), in the Songmei flower (*Cymbidium virescens*), and also in the leaves of tropical soda apple (*Solanum viarum*) (Diongue et al., 2007). The fact that n-heptane was not detected in

the hydrodistilled oil may be due to its absence in this matrix or due to the overlapping of the solvent peak, which is an inherent inconvenience of this technique.

This is the first time the essential oil composition of *B. spicata* leaves is reported in the scientific literature, as shown in **Table 2**. A high amount of spathulenol (34.3 %) was verified in this oil, along with some other representative compounds, such as  $\beta$ -pinene (8.0 %), limonene (5.4 %), (*E*)-caryophyllene (4.4 %), and caryophyllene oxide (8.1 %). The presence of mono- and sesquiterpenes in other *Bacharis* species is reported as being dominant:  $\beta$ -caryophyllene in *B. caprariaefolia*;  $\beta$ -selinene, (*E*)-nerolidol in *B. dracunculifolia*;  $\beta$ -pinene, limonene,  $\beta$ -caryophyllene, spathulenol in *B. erioclada*;  $\delta$ -cadinene, (*E*)-nerolidol in *B. myriocephala*; spathulenol in *B. platipoda* and *B. tridentata*; and  $\beta$ -caryophyllene,  $\delta$ -cadinene in *B. vincaefolia* (Ferracini et al., 1995).

The presence of spathulenol was observed in higher amounts in the hydrodistilled oil (34.3%) than in the headspace (0.7 %). Also, some compounds eluting in the region of oxygenated sesquiterpenes were found only in the essential oil and not in the headspace of the plant. Similar results were found in a former work of this group related to eucalyptus volatile oils. (Zini et al., 2003). There are two aspects that should be taken into account. As HS-SPME is an equilibrium process, it would be expected that compounds presenting lower volatility and less affinity to the fiber coating, such as oxygenated sesquiterpenes, would perhaps not be present in the chromatographic profile or would be there in lower amounts. There is also the possibility of transformation of bicyclogermacrene to spathulenol, as the former is a component of the essential oil. The presence of minor concentrations of several other components in the headspace of the chopped plant and not in the hydrodistilled oil also corroborates this argument. However, the simple experimental setup and amenable experimental conditions provide information on the composition of the plant which is expected to be closer to the one *in vivo*. A striking difference between hydrodistillation and HS-SPME results is the presence of the unsaturated linear hydrocarbon, 1-undecene (1.1 - 17.8 %), only in the headspace of HS-SPME. This compound was already found in the hydrodistilled oil of other plants of Asteraceae family, as for example in *C. deflexa* and *C. iconiensis* (*Centaurea*), where it represents more than 84 % and 4 % of the essential oil, respectively (Flamini et al., 2006). Even though, there is no register of 1-undecene as a plant allelochemical in

the literature, 1-undecene is reported as an ant recruitment pheromone (Witte et al., 2007), and is present in higher concentration in healthy leaves than in galls. Gamma-murolene (7.0 -11.4 %) was also detected only in the headspace of galls and leaves of this plant, presenting higher concentration in leaves headspace. Zhang et al., 2003 reported murolene as one component of a sesquiterpene mixture, which played a role in the host selection process of *Thaumetopoea pityocampa* females.

Differences found in the VOC composition of galls and ungalled leaves of *S. polygamus* and *B. spicata* indicates that HS-SPME is a convenient tool to access chemical transformations that might be caused by insect-plant interaction. Qualitative differences between hydrodistilled oil and headspace chromatographic profile of the same sample also shows that HS-SPME mild temperatures provide a volatile compounds profile closer to that of *in vivo* plant. In addition to that, the fact that SPME is solventless, simple to operate, and requires low amount of vegetable tissue highlight the potential of this technique as a research tool for infochemical compounds studies, and opens new horizons for future investigations of distinct plants and various phenomena involving plant interaction triggered by environmental aspects and different organisms.

#### Acknowledgements

We are grateful to Supelco North America for providing the SPME fibers. We also thank CNPq, FAPERGS and CAPES for providing scholarships to F. C. Damasceno and K. P. Nicolli. Dr. Nelson Matzenbacher is specially acknowledged for helping with *S. polygamus* sampling.

## Reference

- Adams RP. 2001. *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation: Illinois.
- Araújo APA, Carneiro MAA, Fernandes GW. 2003. Efeito do sexo, do vigor e do tamanho da planta hospedeira sobre a distribuição de insetos indutores de galhas em *Baccharis pseudomyriocephala* Teodoro (Asteraceae). *Revt. Brasil. Entomol.* **47** : 483-490.
- Barroso GM, Bueno OM. 2002. *Flora ilustrada catarinense - Compostas*. Itajaí.
- Bicchi C, Cordero C, Liberto E, Rubiolo P, Sgorbini B, Sandra P. 2005. Impact of phase ratio, polydimethylsiloxane volume and size, and sampling temperature and time on headspace sorptive extraction recovery of some volatile compounds in the essential oil field. *J. Chromatogr. A* **1071** : 111-118.
- Buttery RG, Ling LC. 1985. Volatile components of corn roots: possible insect attractants. *J. Agric. Food Chem.* **33** : 772-774.
- Ceva PMN-A, Bizzo HR, Silva AS, Carvalho CPS, Antunes OAC. 2006. Analysis of volatile composition of siriguele (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). *LWT* **39** : 436-442.
- De Feo V, De Simone F, Senatore F. 2002. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* **61** : 573-578.
- Diongue A, Lai P-YL, Lin C. 2007. Application of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in the study of volatile chemicals from *Solanum viarum* Dunal. *Asian J. Chem.* **19** : 2002-2014.
- Erazo S, Delporte C, Negrete R, García R, Zaldívar M, Iturra G, Caballero E, López JL, Backhouse N. 2006. Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. *J. Ethnopharmacol.* In press.
- Felt EP. 2001. *Plant galls and gall makers*. Updesh Purohit for Agrobios: Jodspur.
- Ferracini, VL, Paraíba LC, Leitão Filho HF, Silva AG. 1995. Essential oil of seven Brazilian *Baccharis* species. *J. Essent. Oil Res.* **7** : 355-367.
- Flamini G, Bader A, Cioni PL, Katbeh A-B, Morelli I. 2004. Composition of the essential oil of leaves, galls, and ripe and unripe fruits of Jordanian *Pistacia palaestina* Boiss. *J. Agric. Food Chem.* **52** : 572-576.
- Flamini G, Tebano M, Cioni PL, Bagci Y, Dural H, Ertugrul K, Uysal T, Savran A. 2006. A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey. *Pl. Syst. Evol.* **261**: 217-228.
- González S, Guerra PE, Bottaro H, Molares S, Demo MS, Oliva MM, Zunino M P, Zygadlo JA. 2004. Aromatic plants from Patagonia. Part I. Antimicrobial activity and chemical composition of *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera essential oil. *Flavour Fragr. J.* **19** : 36-39.
- Harborne JB, Tomas FA-B. 1991. *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Clarendon Press Oxford: Oxford.
- Huang J, Schmelz EA, Alborn H, Engelberth J, Tumlinson JH. 2005. Phytohormones mediate volatile emissions during the interaction of compatible and incompatible

- pathogens: the role of ethylene in *Pseudomonas syringae* infected tobacco. *J. Chem. Ecol.* **31** : 439-459.
- James DG. 2005. Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. *J. Chem. Ecol.* **31** : 481-495.
- Kalua CM, Bedgood Jr. DR, Prenzler PD. 2006. Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil. *Analytica Chimica Acta* **556** : 407-414.
- Lee S, Tsao R, Peterson C, Coats JR. 1997. Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* **90** : 883-892.
- Mazida MM, Salleh MM, Osman H. 2005. Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). *J. Food Compos. Anal.* **18** : 427-437.
- Miller DR. 2006. Ethanol and (-)- $\alpha$ -pinene: attractant kairomones for some large wood-boring beetle in Southeastern USA. *J. Chem. Ecol.* **32** : 779-794.
- Moura MZD. 2000. *Alterações anatômicas e histoquímicas induzidas por galhadores em Lantana camara L. (Verbenaceae)*. Universidade Federal de Minas Gerais: Minas Gerais.
- Mukherjee S. 2003. Influence of plant allelochemicals on growth rate, nutritional physiology and mid-gut esterase activity in fifth instar larvae of *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera:Noctuidae). *Invert. Reprod. Develop.* **43** : 125-132.
- Prates HT, Santos JP, Waquil JM, Fabris JD, Oliveira AB, Foster JE. 1998. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.* **34** : 243-249.
- Quintana JBRR, Muniategui S-L, López P-M, Prada D-R. 2007. Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. In press.
- Rosenthal GA, Berenbaum MR. 1991. *Herbivores their interactions with secondary plant metabolites*. Academic Press Inc.: San Diego.
- Sandra P, Bicchi C. 1987. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*. New York.
- Sandstrom P, Welch WH, Blomquist GJ, Tittiger C. 2006. Functional expression of a bark beetle cytochrome P450 that hydroxylates myrcene to ipsdienol. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36** : 835-845.
- Scrivanti LR, Zunino MP, Zygadlo JA. 2003. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochem. Syst. Ecol.* **31** : 563-572.
- Sigma-Aldrich. 1999. T499102 - *Sample Prep Made Easy*.
- Sigma-Aldrich. 2005. T705002A - *Solid Phase Microextraction (SPME) Metal Fiber Assemblies*.
- Tapia T, Perich F, Pardo F, Palma G, Quiroz A. 2007. Identification of volatiles from differently aged red clover (*Trifolium pratense*) root extracts and behavioural

responses of clover root borer (*Hylastinus obscurus*) (Marsham) (Coleoptera: Scolytidae) to them. *Biochem. Syst. Ecol.* **35** : 61-67.

Tatsuka K, Suekane S, Sakai Y, Sumitani H. 1990. Volatile constituents of kiwi fruit flowers: simultaneous distillation and extraction versus headspace sampling. *J. Agric. Food Chem.* **38** : 2176-2180.

Tooker JF, Hanks LM. 2004. Stereochemistry of host plant monoterpenes as mate location cues for the gall wasp. *J. Chem. Ecol.* **30** : 473-477.

Tooker JF, Koenig WA, Hanks LM. 2002. Altered host plant volatiles are proxies for sex pheromones in the gall wasp *Antistrophus rufus*. *PNAS* **99** : 15486-15491.

Valladares GR, Zapata A, Zygadlo J, Banchio E. 2002. Phytochemical induction by herbivores could affect quality of essential oils from aromatic plants. *J. Agric. Food Chem.* **50** : 4059-4061.

Valterová I, Nehlin G, Borg A-K. 1997. Host plant chemistry and preferences in egg-laying *Trioza apicalis* (Homoptera, Psyllodea). *Biochem. Syst. Ecol.* **25** : 477-491.

Weyerstahl P, Marschall H-W, Christiansen C, Oguntimein BO, Adeoye AO. 1998. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta Med.* **6** : 546-549.

Witte V, Abrell L, Attygalle AB, Wu X, Meinwald J. 2007. Structure and function for Dufour gland pheromones from the crazy ant *Paratrechina longicornis*. *Chemoecology*. In press.

Zhang Q-H, Schlyter F, Battisti A, Birgersson G, Anderson P. 2003. Electrophysiological responses of *Thaumetopoea pityocampa* females to host volatiles: implications for host selection of active and inactive terpenes. *J. Pest. Science* **76** : 103-107.

Zini CA, Augusto F, Christensen E, Caramão EB, Pawliszyn J. 2002. SPME applied to the study of volatile organic compounds emitted by three species of *Eucalyptus* in Situ. *J. Agric. Food Chem.* **50** : 7199-7205.

Zini CA, Zanin KD, Christensen E, Caramão EB, Pawliszyn J. 2003. Solid-phase microextraction of volatile compounds from the chopped leaves of three species of *Eucalyptus*. *J. Agric. Food Chem.* **51** : 2679-2686.

Table I. Compounds detected in the headspace of chopped galls and ungalled leaves or in hydrodistilled oil of *Schinus polygamus* ungalled leaves.

Nº	Compounds	LTPRI OV5 <sup>a</sup>	LTPRI Lit <sup>b</sup>	LTPRI Wax <sup>c</sup>	hydrodistilled oil			HS-SPME		
					Guaíba	Viamão	P.Alegre	SL <sup>d</sup>	galls	SPGL <sup>e</sup>
<b>1</b>	<b>n-heptane</b>							<b>44,8</b>	<b>38,2</b>	<b>40,3</b>
2	ni							1,1	0,3	0,7
3	ni							0,3		
4	ni							1,2	0,1	0,4
5	ni							4,2	2,3	
<b>6</b>	<b>n-nonane</b>	<b>900</b>	<b>900</b>	<b>901</b>	<b>85,4</b>	<b>77,8</b>	<b>77,0</b>	<b>35,3</b>	<b>24,4</b>	<b>27,6</b>
7	alcohol	906					2,0			
8	alcohol	909					0,6			
9	alcohol	922					1,5			
10	$\alpha$ -pinene	933	939			0,8	0,5		17,6	
11	ni	942					0,5			
12	ni	950					0,3			
13	ni	965					0,5			
14	$\beta$ -pinene	971	979						0,2	
15	myrcene	986	991						0,4	
16	ni	989				0,3				
17	<i>trans</i> -isolimone	1000	985			0,5				
18	n-octanal	1000	999	1293	0,3		0,3			
19	( <i>Z</i> )-hexenyl acetate	1007	1005				0,4	5,7	2,6	15,9
20	( <i>o</i> )-cymene	1023	1026				0,3			
21	limonene	1027	1029		0,5		2,9	0,1	5,4	
22	$\Delta$ -3-carene	1031	1031					0,1	0,5	0,5
23	1,8-cineole	1031	1031	1206	0,1		0,5			
24	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimene	1041	1037					1,2	4,7	5,0
25	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimene	1045	1050	1252	1,2	3,4	1,2			
26	n-octanol	1069	1068		0,2					0,2
27	ketone	1070					0,2			
28	ketone	1083		1360	5,0	2,6	3,9	0,3	0,1	0,3
29	ketone	1087								0,2
30	2-nonanone	1089	1090	1393	1,2					
31	alcohol	1096			tr			0,9		1,2
32	n-undecane	1100	1100		2,1	1,4	1,4	3,5	1,8	2,5
33	ni	1115			tr		0,4			0,4
34	ni	1138								0,2
35	ni	1162								0,4
36	<i>cis</i> -3-hexenyl butanoate	1185	1186				0,2	0,3	0,1	1,9
37	methyl salicylate	1191	1192		0,1					



38	n-decanal	1202	1202	1501	0,6	0,7	0,5			
39	ni	1231					0,3	0,3		1,0
40	geraniol	1257	1253		0,2					
41	ni	1286			0,2					
42	2-undecanone	1291	1294	1602	1,1	1,2	0,8			
43	alcohol	1300						0,3		0,2
44	ni	1333								0,2
45	$\delta$ -elemene	1338	1338	1466		1,6	0,4			
46	dodecanal	1406	1409		0,3		0,2			
47	$\alpha$ -cis-bergamotene	1410	1413		0,1	0,2			0,8	
48	(E)-caryophyllene	1413	1419	1586						0,1
49	$\gamma$ -muurolene	1474	1480					0,1	0,3	0,6
50	germacrene D	1483	1485	1702	0,3	3,1	1,2			
51	cis- $\beta$ -guaiene	1492	1493			0,9				
52	ni	1493			tr					
53	bicyclogermacrene	1499	1500	1729	0,1		0,2			
54	(E,E)- $\alpha$ -farnesene	1507	1506	1749	0,6	2,5	1,0		0,1	0,2
55	ni	1509						0,3		
56	$\gamma$ -cadinene	1518	1514						0,1	
57	methyl dodecanoate	1524	1526		tr					
58	germacrene B	1560	1561			0,4				
59	(E)-nerolidol	1564	1563				0,3			
60	(Z)-3-hexenyl benzoate	1570	1567				0,2			
61	dendrolasin	1578	1572		0,2	1,1				
62	ni	1580			0,1					
63	ni	1631				1,4				
64	ni	1632					0,3			
65	ni	1634			0,1					
66	$\alpha$ -cadinol	1657	1654		tr					
67	benzyl benzoate	1763	1760		tr					
68	ni	2121			0,1					

a. LTPRI OV5. linear temperature programmed retention index in column OV5; b. LTPRI Lit. Adams'linear temperature programmed retention index (Adams 2001); c. LTPRI Wax – linear temperature programmed retention index in column Wax; d. SL. sound leaves; and SPGL – sound part of galled leaves; ni. non identified; tr. traces < 0.1%.

Table II. Compounds detected in the headspace of chopped galls and leaves or in hydrodistilled oil of *Bacharis spicata* ungalled leaves.

N <sup>o</sup>	Compounds	LTPRI OV5 <sup>a</sup>	LTPRI Lit <sup>b</sup>	LTPRI Wax <sup>c</sup>	Hydrodistillation		HS-SPME	
					Leaves	Leaves	Galls	
1	ni							0,6
2	ni						3,2	1,1
3	ni						4,7	
4	ni							0,1
5	ni						1,4	
6	n-heptane	701	700					0,2
7	ni	760					1,0	
8	ni	765						0,2
9	(E)-3-hexenol	849	854				2,7	
10	ni	863					1,0	
11	$\alpha$ -thujene	923	930					0,2
12	$\alpha$ -pinene	930	939	1016	0,7	1,6		3,0
13	sabinene	969	975				0,3	
<b>14</b>	<b><math>\beta</math>-pinene</b>	<b>973</b>	<b>979</b>	<b>1103</b>	<b>8,0</b>	<b>13,5</b>		<b>40,9</b>
<b>15</b>	<b>myrcene</b>	<b>987</b>	<b>991</b>	<b>1160</b>	<b>0,6</b>	<b>2,2</b>		<b>6,6</b>
16	(o)-cymene	1020	1026				0,4	
<b>17</b>	<b>limonene</b>	<b>1024</b>	<b>1029</b>	<b>1195</b>	<b>5,4</b>	<b>15,3</b>		<b>19,1</b>
18	trans- $\beta$ -ocimene	1043	1050				0,5	3,7
19	$\gamma$ -terpinene	1053	1060					0,1
20	terpinolene	1082	1089					0,1
21	ni	1083					0,4	
<b>22</b>	<b>1-undecene</b>	<b>1089</b>	<b>1087</b>				<b>17,8</b>	<b>1,1</b>
23	$\alpha$ -terpineol	1187	1189	1189	0,7			0,1
24	ni	1333						0,2
25	$\alpha$ -copaene	1371	1377				0,9	0,3
26	$\beta$ -bourbonene	1380	1388					0,1
27	$\beta$ -cubebene	1385	1388				0,7	0,4
28	$\beta$ -elemene	1388	1391				0,9	0,6
29	$\alpha$ -gurjunene	1405	1410					0,1
30	(E)-caryophyllene	1413	1419		4,4	12,8		6,2
31	$\beta$ -gurjunene	1426	1434					0,1
32	$\alpha$ -humulene	1448	1455	1658	2,0	2,1		1,3
33	$\gamma$ -muurolene	1475	1480				11,4	7,0
34	germacrene D	1479	1485	1699	2,8			
35	bicyclogermacrene	1493	1500	1723	2,0	2,7		5,1

36	germacrene A	1501	1509				0,2
37	ni	1502					0,2
38	$\delta$ -cadinene	1518	1523	1748	1,7	0,9	0,6
39	spathulenol	1572	1578	2124	34,3	0,7	0,2
40	caryophyllene oxide	1575	1583	1966	8,1	0,8	0,2
41	ni	1577					0,1
42	viridiflorol	1594	1593	2228	1,8		
43	ni	1604			2,0		
44	ni	1609			3,0		
45	ni	1621					0,1
46	ni	1638			3,4		
47	$\alpha$ -muurolol	1643	1646		2,4		
48	$\alpha$ -cadinol	1656	1654		4,5		
49	ni	1690			9,8		
50	ni	1734			2,4		

a. LTPRI OV5 – linear temperature programmed retention index in column OV5, b. LTPRI Lit – Adams' linear temperature programmed retention index (Adams 2001), c. LTPRI Wax – linear temperature programmed retention index in column Wax.

## Legends of the Figures

**Figure 1.** Chromatograms obtained when different SPME coatings were employed to extract the headspace of *E. uniflora* chopped leaves

**Figure 2.** SPME fibers extraction capacity for four representative terpene compounds.

**Figure 3.** Chromatograms of volatile compounds of *S. polygamus* corresponding to: (A) HS-SPME of healthy leaves, (B) HS-SPME of galls, (C) HS-SPME of sound part of galled leaves (D) fiber blank (E) hydrodistillation of sound leaves.

**Figure 4.** Chromatograms of volatile compounds of *B. spicata* corresponding to: (A) HS-SPME of healthy leaves (B) HS-SPME of galls (C) fiber blank (D) hydrodistillation of sound leaves.

Figura 1.

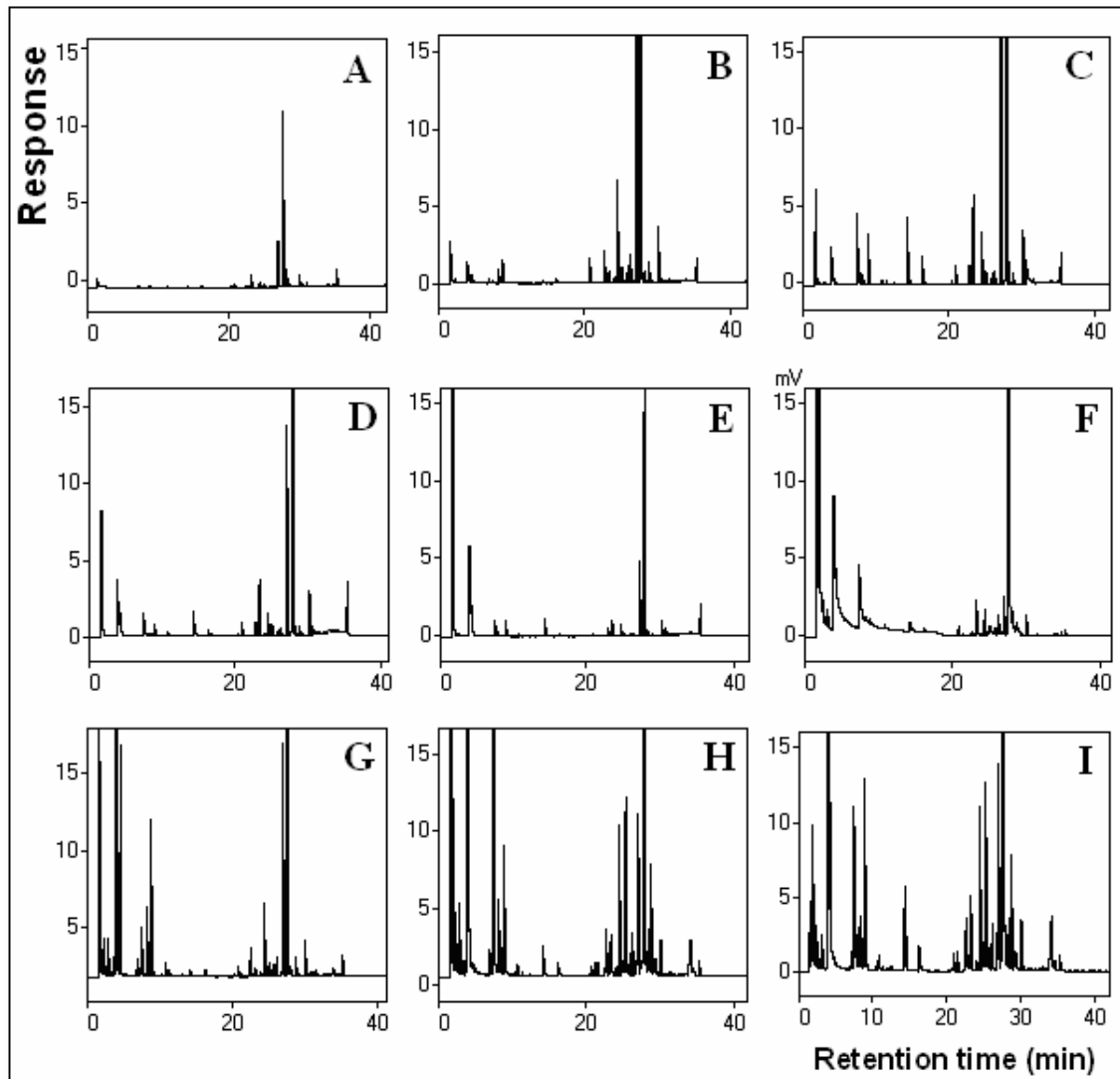


Figura 2.

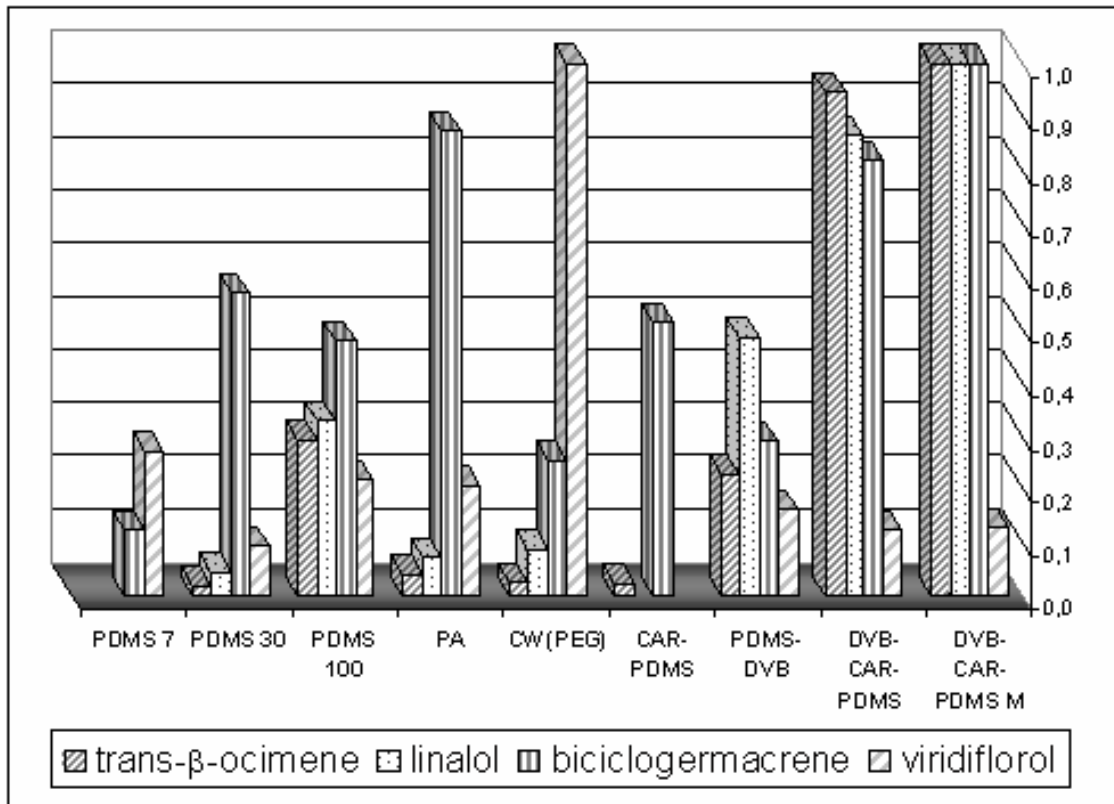


Figura 3.

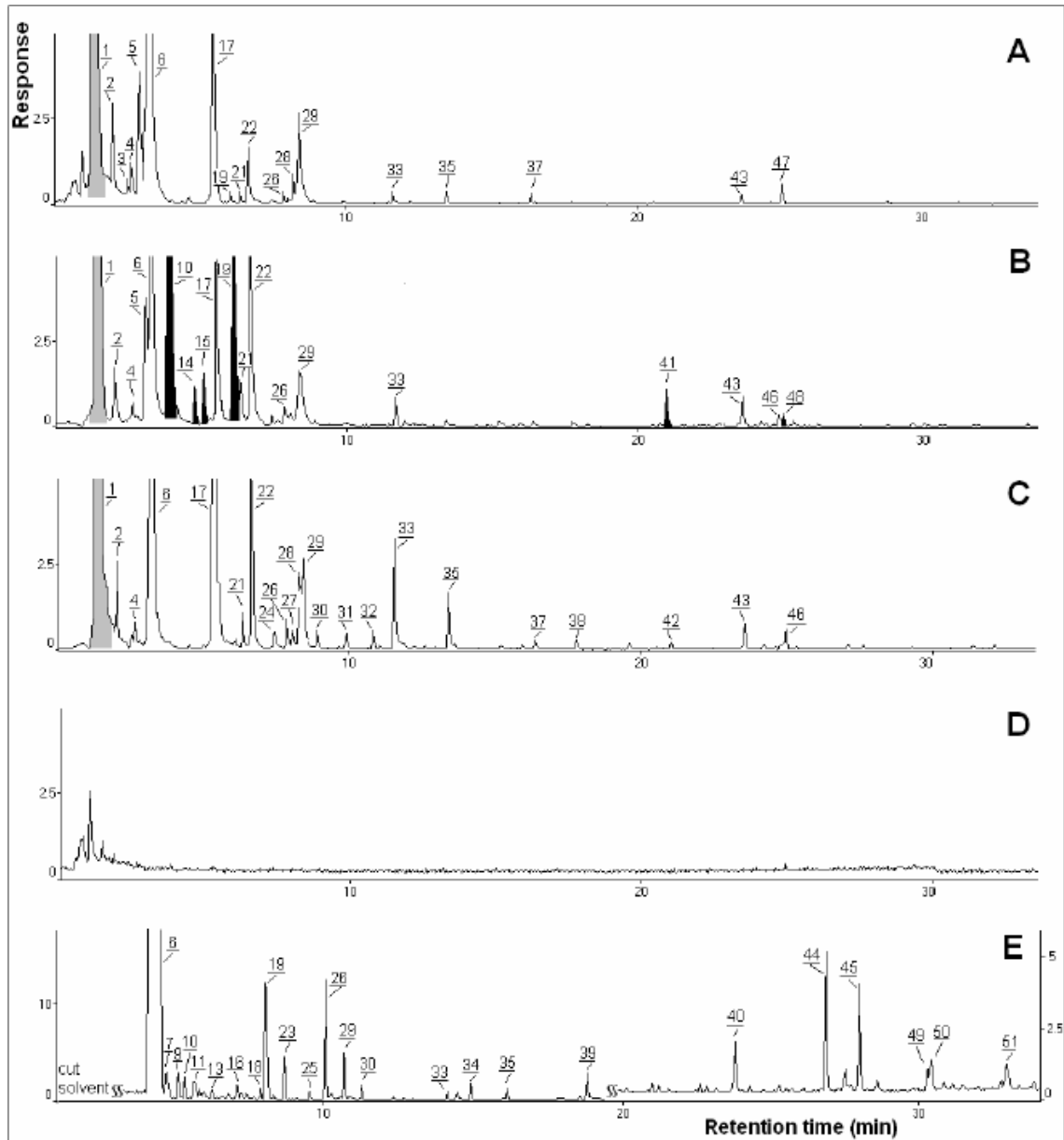


Figura 4.

