

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

***ESTUDO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE
ALGUMAS ESPÉCIES DE EUCALIPTO
ATRAVÉS DO USO DE
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO
MODO HEADSPACE (HS-SPME)***

Cláudia Alcaraz Zini

Tese para obtenção do título de Doutora em Química

Porto Alegre, agosto de 2002

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

***ESTUDO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE
ALGUMAS ESPÉCIES DE EUCALIPTO
ATRAVÉS DO USO DE
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO
MODO HEADSPACE (HS-SPME)***

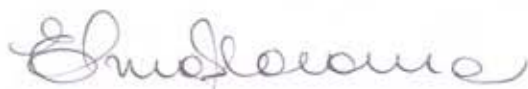
Cláudia Alcaraz Zini

Mestre em Química

Trabalho realizado no Instituto de Química da UFRGS e também no Departamento de Química da Universidade de Waterloo, dentro do Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Porto Alegre, agosto de 2002

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final, pela Orientadora e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.



Orientadora: Profa. Dra. Eulina Bastos Caramão

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando Lanças – IQSC/USP



Prof. Dr. Fabio Augusto – IQ/UNICAMP



Profa. Dr. Giane Stuart – URI/ERECHIM



Profa. Dr. Marcia Martinelli – IQ/UFRGS



Profa. Dra. Maria Goreti R. Vale – IQ/UFRGS



Prof. Dr. Jairton Dupont

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Dedicatória

Aquele em quem habita toda virtude e conhecimento.

Agradecimentos

A Jesus.

Aos meus amados pais Lúcia e Milton, pela infinita paciência e suporte a todo este trabalho e, simplesmente, por serem super pais.

Durante a realização de um trabalho como este, há muito a fazer e o apoio e a ajuda de colegas, familiares e amigos são muito valiosos. Neste caso, tive a felicidade de ser alvo do auxílio de muitas pessoas, às quais sou extremamente grata.

Neste espaço limitado, deixo registrado um pouco da minha gratidão a alguns dos que mais contribuíram para que este trabalho fosse realizado, sob o risco de esquecer alguém. E a este alguém fica também o meu agradecimento.

A Liz, Joe, Alex, May e Bentley, a família canadense que me acolheu carinhosa e cuidadosamente, com verdadeira amizade, durante toda a execução da parte experimental deste trabalho naquelas terras geladas, mas de coração aquecido.

A professora Dra. Elina Caramão, pelo seu esforço em perseguir junto comigo o que havia de melhor na área em que nos propomos a trabalhar e também pelo seu apoio e incentivo, especialmente nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Ao professor Dr. Janusz Pawliszyn, pela oportunidade que me foi concedida de trabalhar em conjunto com ele e seu grupo de pesquisa.

Ao professor Dr. Fabio Augusto, pelo conhecimento de Química Analítica que me transmitiu durante o trabalho experimental, pelas discussões técnicas sempre elucidativas e, sobretudo, pelo coleguismo e amizade.

Às minhas incansáveis amigas Denise Souza e Angelina So, por me ajudarem como ninguém faria com tanto apoio, serviço e toda a literatura que precisei.

A meus pais americanos Florence e Jim McMahon, por tanto amor.

A Benjamin Paul Smith, por ter me ensinado a trabalhar com anfíbios e também a apreciá-los. Por sua disposição incansável de trabalhar, fazer graça e cantar músicas australinas ao mesmo tempo, três turnos por "dia".

Ao eng. Teotônio Francisco de Assis por muitas aulas sobre o eucalipto e também pelo seu constante apoio a este projeto, sem o qual este trabalho não teria se concretizado.

Ao Dr. Celso Foelkel por ter sido grande incentivador deste projeto de pesquisa desde o seu início.

A Margareth Darnel, pela amizade.

A Eva Christensen, pelo trabalho que realizamos em conjunto.

A minha irmã Miriam, pelo seu apoio constante e orações. Também a Gelsa, Erasmo, ao grupo de senhoras que ora às terças-feiras, ao grupo caseiro e a todos

os meus queridos irmãos em Cristo que tanto me apoiaram nesta caminhada com muita oração e carinho.

Aos queridos amigos canadenses Elvern & Paula Bauman, Jeff & Marg Trickey por terem sido muito mais do que irmãos.

A Barbara Pawliszyn, pela sua amizade e zelo para comigo durante o tempo em que estive no Canadá.

Agradeço também:

- ❖ ao Dr. Maarten Posthumus da Universidade de Wageningen, por ter enviado os espectros de massas que precisei para identificação de alguns terpenos;
- ❖ a Heather Lord, pelo apoio técnico durante toda a execução deste trabalho e pelo auxílio concedido na escrita dos artigos publicados;
- ❖ a Lynn Hoyles, por toda a camaradagem e apoio nas grandes aventuras experimentais na estufa de plantas.
- ❖ a Pem Polky, pela amizade, pela manutenção do CG/ EMTI Saturn 4D fora do horário de trabalho e pelas muitas dicas de operação deste equipamento;
- ❖ a Dra. Eva Madey, da Universidade de Waterloo por ter auxiliado nos aspectos biológicos do desenvolvimento do método de extração de voláteis de folhas de eucalipto, além de ter prestado vários esclarecimentos sobre o óleo, as folhas de eucalipto e as relações entre as plantas e outros seres vivos;
- ❖ ao Dr. Colin Jenison, especialista em CG/ EMTI da Varian, por ter me ensinado a compreender e operar melhor o CG/ EMTI Saturn 4D;

- ❖ ao Dr. Wilfried A. König, da Universidade de Hamburg por ter me auxiliado na identificação de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos utilizando o banco de dados de CG/EM do seu próprio laboratório;
- ❖ ao Dr. Peter Dunlop, da Universidade de Adelaide, pelos esclarecimentos e sugestões feitas por correio eletrônico relativos às suas pesquisas realizadas com óleos de eucalipto e também pelo incentivo dado no início deste trabalho;
- ❖ ao Dr. Albrecht Paschke, por ter me auxiliado com a literatura consultada em língua alemã;
- ❖ a Carla Ozório, pelo auxílio na nomenclatura de plantas e outros organismos e expressões específicas da área da Biologia;
- ❖ ao Heliton de Oliveira Domingos pelo auxílio concernente às minhas dúvidas de gramática e ortografia;
- ❖ às alunas de iniciação científica Kelen Daiane Zanin e Luciana Bortolin, pelo auxílio no tratamento de alguns dados, figuras e também na revisão bibliográfica;
- ❖ aos colegas da KLABIN RIOCELL que auxiliaram na amostragem e envio de eucaliptos para o Canadá;
- ❖ a FAPERGS pelo apoio financeiro a este projeto;
- ❖ a KLABIN RIOCELL pelo suporte financeiro e especialmente ao eng. Totti por apostar neste trabalho conjunto;
- ❖ ao CNPq pela bolsa de estudos no Canadá;
- ❖ Ao NSERC ("Natural Science and Engineering Research Council"), Supelco e Varian pelo suporte financeiro a este projeto;

❖ a Iara Diniz da Dieberger Óleos Essenciais S. A., João Maia da Robertet do Brasil, Tarcísio A. Candelária da Dragoco Perfumes e Aromas, Paulo César de O. Martini da Firmenich Ltda. e à empresa Mênfis pela doação de compostos padrão.

Agradeço também a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

“A sabedoria, porém, lá do alto, é primeiramente pura, depois pacífica, indulgente, tratável, plena de misericórdia e de bons frutos, imparcial, sem fingimento.” Epístola de Tiago 3:17

SUMÁRIO

	página
DECLARAÇÃO DE AUTORIA E ORIENTAÇÃO.....	i
DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ABREVIACÕES.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
I INTRODUÇÃO.....	1
1 Objetivo geral.....	3
2 Objetivos específicos.....	3
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1 Óleos voláteis de eucalipto.....	6
1.1 Óleos medicinais.....	6
1.2 Óleos industriais.....	7
1.3 Óleos para perfumes ou sabores.....	7
2 Compostos terpenóides.....	8
3 Compostos voláteis de folhas verdes (GLV).....	11
4 Técnicas de extração de óleos voláteis.....	13
4.1 Destilação.....	13
4.2 Técnicas de extração direta.....	14
4.2.1 Extração com solvente.....	14
4.2.2 Extração com fluido supercrítico.....	15
4.2.3 Amostragem na estrutura secretora.....	16
4.3 Técnicas de headspace.....	16
4.3.1 Extração do headspace no modo estático.....	17
4.3.2 Extração do headspace no modo dinâmico.....	17
4.3.3 Microextração em fase sólida no modo headspace (HS-MEFS).....	18
4.3.3.1 Princípios básicos da SPME – Absorção.....	20
4.3.3.2 Princípios básicos da SPME – Adsorção.....	28
5 Infoquímicos de eucaliptos.....	32
6 <i>Litoria ewingi</i>	35
7 Proposta para o estudo dos compostos voláteis de folhas de três espécies de eucalipto utilizando-se HS-SPME.....	37
7.1 Análise qualitativa preliminar do óleo essencial de três espécies de eucalipto.....	37
7.2 Desenvolvimento de um método de extração e análise de voláteis de folhas picadas de eucalipto utilizando-se HS-SPME.....	37
7.3 Comparação qualitativa entre os compostos voláteis encontrados no headspace das folhas de eucalipto picadas e os compostos dos óleos hidrodestilados.....	38
7.4 Desenvolvimento de um método de extração de voláteis de eucalipto <i>in situ</i> utilizando-se HS-SPME.....	38
7.5 Desenvolvimento de um método de extração de voláteis emitidos por rãs <i>Litoria ewingi in vivo</i>	39
III PARTE EXPERIMENTAL.....	40
1 Escolha das espécies de eucalipto.....	41
2 Amostras.....	41
2.1 Hidrodestilação.....	41
2.2 HS-SPME de voláteis emitidos por folhas picadas de eucaliptos.....	42

	página
2.3 HS-SPME de voláteis emitidos por folhas de eucaliptos <i>in situ</i>	42
2.4 HS-MEFS dos compostos voláteis emitidos por rãs <i>Litoria ewingi in situ</i>	46
3 Hidrodestilação com Clevenger.....	46
4 Microextração em fase sólida aplicada a extração de voláteis de folhas de eucalipto.....	48
5 Microextração em fase sólida aplicada a extração de voláteis de folhas de eucalipto <i>in situ</i>	52
5.1 Experimentos preliminares realizados com eucaliptos <i>in situ</i>	52
5.2 Experimentos realizados com eucaliptos <i>in situ</i> utilizando-se câmara de vidro.....	53
5.3 Experimentos preliminares com <i>L. ewingi</i>	55
5.3.1 Dieta com limoneno e eucaliptol.....	57
5.3.2 Ambiente com folhas de <i>E. dunnii</i>	58
6 Análise por CG/ EMTI.....	59
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
1 Hidrodestilação com Clevenger.....	63
2 Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada a folhas de eucalipto picadas	73
2.1 Desenvolvimento do método de extração.....	73
2.1.1 Filme polimérico.....	74
2.1.2 Temperatura e perfil de extração.....	75
2.1.3 Escolha do detector e determinação de linearidade.....	81
2.1.4 Outros parâmetros.....	82
2.2 Compostos voláteis de folhas verdes (GLV).....	83
2.3 Comparação da HS-SPME com a hidrodestilação.....	87
3 Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada a folhas de eucalipto <i>in situ</i>	104
3.1 Experimentos preliminares.....	104
3.2 Experimentos realizados com eucaliptos <i>in situ</i> utilizando-se câmara de vidro.....	107
3.2.1 (<i>E</i>)- β -Ocimeno.....	116
3.2.2 β -Cariofileno e outros compostos.....	124
3.2.3 Óxido de rosa.....	130
4 Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada ao estudo de voláteis emitidos por rãs <i>Litoria ewingi</i>	132
4.1 Experimentos preliminares.....	132
4.2 Assimilação de limoneno e eucaliptol através da dieta.....	134
4.3 Assimilação de terpenos através da pele.....	137
5 Resumo dos resultados obtidos neste trabalho.....	140
5.1 Em relação à hidrodestilação e à HS-SPME aplicadas às folhas de eucalipto picadas.....	140
5.2 Em relação à aplicação da HS-SPME à amostragem de voláteis de folhas de eucaliptos <i>in situ</i> e rãs <i>in vivo</i>	143
5.3 Em relação à aplicação da HS-SPME à amostragem de voláteis de folhas de eucaliptos <i>in situ</i>	143
5.4 Em relação à aplicação da HS-SPME à amostragem de voláteis de <i>L. ewingi in vivo</i>	145
V CONCLUSÕES.....	146
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
ANEXOS.....	162
Anexo A - FIGURAS.....	163
Anexo B - PUBLICAÇÕES.....	176
1 Trabalhos publicados.....	177
2 Trabalhos submetidos a publicação.....	177
3 Trabalhos apresentados em Congressos.....	178

ÍNDICE DE TABELAS

	página
Tabela I Classificação dos terpenóides em seus principais subgrupos.....	9
Tabela II Caracterização das folhas de eucaliptos utilizadas para HS-SPME e hidrodestilação.....	44
Tabela III Condições experimentais utilizadas durante as amostragens de VOC.....	45
Tabela IV Condições operacionais para separação cromatográfica e detecção de compostos de óleos voláteis de folhas de eucaliptos e voláteis de rãs.....	61
Tabela V Rendimentos obtidos nas hidrodestilações de três espécies de eucalipto.....	64
Tabela VI Compostos encontrados no headspace de folhas picadas ou nos óleos hidrodestilados de folhas inteiras de três espécies de eucalipto.....	66
Tabela VII Dados relativos à resposta do detector de trapeamento iônico para vários compostos.....	82
Tabela VIII Diferenças qualitativas encontradas nos cromatogramas provenientes das extrações do headspace de folhas de eucalipto picadas e dos óleos hidrodestilados de folhas das mesmas árvores.....	90
Tabela IX Número de compostos de folhas de eucalipto detectados através de hidrodestilação e através de HS-SPME.....	91
Tabela X Identificação e abundâncias relativas dos VOC emitidos por folhas de <i>E. citriodora</i> , <i>E. dunni</i> , e <i>E. saligna</i> através de extrações de 1 min utilizando-se o polímero PDMS/DVB.....	109
Tabela XI Presença de (<i>Z</i>)- β -ocimeno e (<i>E</i>)- β -ocimeno no óleo das folhas de alguns eucaliptos australianos.....	119
Tabela XII Algumas plantas que emitem β -ocimeno.....	122
Tabela XIII Algumas plantas ou partes de plantas que emitem β -cariofileno.....	125
Tabela XIV Detecção de limoneno e eucaliptol nas emissões voláteis de <i>L. ewingi</i> utilizando-se a relação S/N.....	133

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1 Esboço simplificado da biossíntese dos compostos terpenóides.....	10
Figura 2 Esboço da biossíntese do aroma das folhas verdes.....	13
Figura 3 Representação esquemática do modos de operação da SPME.....	19
Figura 4 Estruturas de 2 filmes poliméricos para SPME.....	20
Figura 5 Configuração do modelo da camada limitrofe.....	27
Figura 6 Esquema representativo de um corte de filme poroso.....	30
Figura 7 Representação esquemática do Clevenger modificado utilizado para as hidrodestilações de folhas de eucalipto.....	47
Figura 8 Representação esquemática da amostragem de compostos voláteis presentes no headspace de folhas picadas de eucalipto, empregando-se SPME.....	49
Figura 9 Vista do amostrador automático Combipal.....	51
Figura 10 Técnica utilizada durante experimentos preliminares de amostragem de voláteis emitidos por folhas de eucalipto.....	53
Figura 11 Desenho representativo da câmara de vidro para a extração de voláteis de folhas de plantas <i>in situ</i>	54
Figura 12 Amostragem dos voláteis emitidos por <i>E. dunnii</i> dentro da câmara de vidro silanizado.....	54
Figura 13 Amostragem de compostos voláteis emitidos pela rã <i>L.ewingi</i> inserida em um frasco, utilizando HS-MEFS.....	57
Figura 14 Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial das folhas de <i>E. citriodora</i> obtido através de hidrodestilação com Clevenger.....	70
Figura 15 Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial das folhas de <i>E. dunnii</i> obtidos através de hidrodestilação com Clevenger.....	71
Figura 16 Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial das folhas de <i>E. saligna</i> obtidos através de hidrodestilação com Clevenger.....	72
Figura 17 Cromatogramas do íon total mostrando a comparação dos resultados obtidos após extração do headspace da mesma amostra com as fibras PDMS, PA e PDMS/DVB.....	74
Figura 18 Perfil de tempo de extração para alguns compostos voláteis do headspace de folhas de eucalipto picadas usando-se PDMS 7 μ m a 30°C.....	77
Figura 19 Perfil de tempo de extração do composto globulol a 30°C utilizando-se PDMS 7 μ m e PDMS 30 μ m.....	78
Figura 20 Perfil de tempo de extração para alguns compostos voláteis do headspace de folhas de eucalipto picadas usando-se PDMS 30 μ m a 45°C.....	79
Figura 21 Fração do cromatograma do íon total onde eluem os GLV, 28 min depois da ruptura do tecido da folha.....	85
Figura 22 Fração do cromatograma do íon total onde eluem os GLV, 3,3 h depois da ruptura do tecido da folha.....	85
Figura 23 Fração do cromatograma do íon total onde eluem os GLV, 23,8 h depois da ruptura do tecido da folha.....	86

	página
Figura 24 Fração dos cromatogramas do ion total onde eluem os C6-GLV detectados no headspace de folhas picadas de <i>E. dunnii</i> , <i>E. citriodora</i> , e <i>E. saligna</i>	86
Figura 25 Fração do cromatograma do ion total obtido por HS-SPME de folhas picadas de <i>E. dunnii</i> , salientando a região onde eluem os sesquiterpenos.....	93
Figura 26 Fração do cromatograma do ion total obtido por HS-SPME de folhas picadas de <i>E. dunnii</i> , salientando a região onde eluem 5 sesquiterpenos que não foram detectados no óleo hidrodestilado.....	93
Figura 27 Espectro de massa de composto emitido por folhas picadas de <i>E. dunnii</i> e <i>E. saligna</i> (A) comparado aos espectros de massas do DMNT (B) e perileno (C).....	96
Figura 28 Espectro de massa de composto emitido por folhas de <i>E. dunnii</i> e <i>E. saligna</i> picadas comparado aos espectros de massas do TMTT e dendrolasina.....	97
Figura 29 Espectro de massas de um composto terpenóide detectado somente através de SPME (A) comparado ao espectro de massas do TMHP (B).....	97
Figura 30 Cromatograma do ion total, salientando a presença do pico cromatográfico correspondente ao DMNT que foi detectado apenas através de HS-SPME em <i>E. dunnii</i> e <i>E. saligna</i> e 7 outros picos dos compostos oxigenados detectados no óleo hidrodestilado de <i>E. dunnii</i>	98
Figura 31 Cromatograma do ion total, salientando a presença do pico cromatográfico correspondente ao DMNT que foi detectado apenas através de HS-SPME em <i>E. dunnii</i> e <i>E. saligna</i> e 17 outros picos dos compostos oxigenados detectados no óleo hidrodestilado de <i>E. saligna</i>	98
Figura 32 Diagrama representativo da variação das áreas dos picos cromatográficos dos compostos voláteis emitidos por folhas saudáveis de <i>E. citriodora</i> após dano mecânico.....	106
Figura 33 Diagrama representativo da variação das áreas dos picos cromatográficos dos compostos voláteis emitidos por folhas de <i>E. citriodora</i> infectadas, após dano mecânico.....	106
Figura 34 Diagrama representativo das áreas obtidas para os picos cromatográficos de compostos voláteis emitidos por folhas de <i>E. citriodora</i> utilizando-se fibras recobertas com polímeros porosos.....	108
Figura 35 Perfil típico de voláteis emitidos por folhas de <i>Eucalyptus in situ</i> depois de 1 min de extração utilizando PDMS/DVB e câmara de vidro.....	110
Figura 36 Perfis circadianos para o citronelal emitido por folhas de <i>E. citriodora</i>	113
Figura 37 Perfis circadianos do β -cariofileno emitido pelas folhas de <i>E. citriodora</i>	114
Figura 38 Perfis circadianos para <i>cis</i> -óxido de rosa emitido por folhas de <i>E. citriodora</i>	115
Figura 39 Perfis circadianos de (<i>E</i>)- β -ocimeno emitido por folhas de <i>E. dunnii</i> A na estufa..	118
Figura 40 Perfis circadianos de β -cariofileno emitido por folhas danificadas de <i>E. dunnii</i> B na estufa.....	118
Figura 41 Fração do cromatograma do headspace das folhas de <i>E. dunnii</i> A <i>in situ</i> , salientando o aumento do pico cromatográfico do (<i>E</i>)- β -ocimeno depois de 300 e 600 min de amostragem.....	120
Figura 42 Fração do cromatograma do headspace das folhas de <i>E. citriodora in situ</i> , salientando o aumento dos picos cromatográficos de <i>cis</i> - e <i>trans</i> - óxido de rosa depois de 300 min.....	120
Figura 43 Diagrama das áreas do pico cromatográfico do limoneno emitido por 4 rãs <i>L. ewingi</i> , durante situação de estresse, conforme a dieta a qual foram submetidas.....	135

	página
Figura 44 Diagrama das áreas do pico cromatográfico do eucaliptol emitido por 4 rãs <i>L. ewingi</i> , durante situação de estresse, conforme a dieta a qual foram submetidas.....	135
Figura 45 Fração do cromatograma do íon total das emissões voláteis de <i>L. ewingi</i> sob estresse, apresentando a região na qual o eucaliptol elui.....	136
Figura 46 Fração do cromatograma do íon total das emissões voláteis de <i>L. ewingi</i> sob estresse, apresentando a região na qual o limoneno elui.....	136
Figure 47 (A) Cromatograma do íon total dos componentes voláteis emitidos pela rã <i>L. ewingi</i> sob estresse, após 1 mês de contato com folhas de <i>E. dunnii</i> . (B) Cromatograma do íon total do óleo essencial de <i>E. dunnii</i>	138
Figura 48 Cromatograma do íon total das emissões voláteis de <i>L. ewingi</i> em situação de estresse e de repouso.....	138
Figura A1 Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos monoterpênicos presentes em óleos de eucalipto.....	164
Figura A2 Fórmulas estruturais de alguns monoterpênicos oxigenados presentes em óleos de eucalipto.....	165
Figura A3 Fórmulas estruturais de alguns monoterpênicos oxigenados presentes em óleos de eucalipto.....	166
Figura A4 Fórmulas estruturais de alguns terpenos oxigenados presentes em óleos de eucalipto.....	167
Figura A5 Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos presentes em óleos de eucalipto.....	168
Figura A6 Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos presentes em óleos de eucalipto.....	169
Figura A7 Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos presentes em óleos de eucalipto.....	170
Figura A8 Fórmulas estruturais de alguns sesquiterpenos oxigenados presentes em óleos de eucalipto.....	171
Figura A9 Resposta do detector ITMS ao 2-careno na faixa de 5 a 500 ng.....	172
Figura A10 Resposta do detector ITMS ao eucaliptol na faixa de 5 a 500 ng.....	172
Figura A11 Resposta do detector ITMS ao dimetilestireno na faixa de 5 a 500 ng.....	173
Figura A12 Resposta do detector ITMS ao mirtenal na faixa de 5 a 500 ng.....	173
Figura A13 Resposta do detector ITMS ao acetato de linalila na faixa de 5 a 500 ng.....	174
Figura A14 Resposta do detector ITMS ao β -cariofileno na faixa de 5 a 500 ng.....	174
Figura A15 Resposta do detector ITMS ao óxido de cariofileno na faixa de 5 a 500 ng.....	175

ABREVIACOES

AR – abundância relativa

CAR/PDMS- Carboxen™/Polidimetil siloxano

DHE - extração de headspace no modo dinâmico (do inglês "dynamic headspace extraction")

DMNT - (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

E. - *Eucalyptus*

FID – detector de ionização de chama (do inglês "flame ionization detector")

GC – cromatografia gasosa (do inglês "gas chromatography")

GC/FID - cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (do inglês "gas chromatography coupled to flame ionization detector")

GC/ITMS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de aprisionamento de ins (do inglês "gas chromatography coupled to ion trap mass spectrometry")

GC/MS - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês "gas chromatography coupled to mass spectrometry")

GLV – compostos voláteis de folhas verdes (do inglês "green leaf volatiles")

HD - hidrodestilação

HS - headspace

HS-SPME – microextração em fase sólida no modo headspace (do inglês "headspace solid phase micro extraction")

LD₅₀ – dose letal para 50% da população-teste

L. ewingi – *Litoria ewingi*

LTPRI – índice de retenção com programação linear de temperatura (do inglês "linear temperature programmed retention index")

MS – espectrometria de massas (do inglês "mass spectrometry")

PA – Poliacrilato

PDMS – Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano / Divinilbenzeno

P. longispinus - *Pseudococcus longispinus*

PM – peso molecular

p/p – peso/ peso

p/v – peso/volume

rpm – rotações por minuto

SFE – extração com fluido supercrítico (do inglês "supercritical fluid extraction")

SHE – (do inglês "static headspace extraction")

S/N – sinal/ruído (do inglês "signal/noise")

SPI – injetor com purga de septo (do inglês "septum purge injector")

SPME – microextração em fase sólida (do inglês "solid phase micro extraction")

subsp. - subspécie

TIC - cromatograma de íon total (do inglês "total ion chromatogram")

TMHP – (*E,E,E*)-tetrametil-1,3,6,10,14-hexadecapentaeno

TMTT – (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno

var. – variedade

VOC – composto(s) orgânico(s) volátil(eis) (do inglês "volatile organic compound(s)")

v/v – volume/volume

RESUMO

Neste trabalho utilizou-se a técnica de HS-SPME/GC/ITMS para o estudo qualitativo dos compostos voláteis (VOC) emitidos pelas folhas de três espécies de *Eucalyptus* (*E.*): *E. citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna* tanto em laboratório como *in situ*, além do estudo da relação entre folhas de eucalipto e rãs *Litoria ewingi*. Para este fim, foram desenvolvidos métodos analíticos.

Os compostos tentativamente identificados como (*E,E*)- α -farneseno, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT), β -cariofileno, α -cariofileno, germacreno D e (*E,E,E*)-3,7,11,15-tetrametil-1,3,6,10,14-hexadecapentaeno (TMHP) foram encontrados no headspace de folhas picadas de eucalipto, sendo que os três primeiros também o foram nas emissões aéreas de *E. saligna in situ*, não tendo sido encontrados nos óleos voláteis das mesmas árvores, obtidos por hidrodestilação.

Nas amostragens *in situ*, foram observados dois tipos de perfis circadianos nas emissões voláteis, incluindo compostos como *cis*-, *trans*-óxido de rosa, *trans*- β -ocimeno, citronelal, citronelol, entre outros. O comportamento dos compostos citados sugere que os mesmos sejam semioquímicos.

Os resultados obtidos com HS-SPME (PDMS/DVB) mostraram que esta é uma ferramenta analítica relativamente simples, que preserva a vida devido ao seu caráter não invasivo, de mínima perturbação do sistema vivo sob amostragem e que, devido a sua rapidez (1 min), permite o acompanhamento de alterações rápidas provocadas por processos endógenos e/ou exógenos nos seres vivos. O monitoramento da emissão de voláteis de folhas *in situ* durante 8 a 10 h por vários dias consecutivos, e a extração dos voláteis de rãs vivas sob estresse, submetidas a diferentes condições de dieta e meio ambiente, exemplificam o potencial desta técnica, que abre novos horizontes na investigação de voláteis de seres vivos.

ABSTRACT

HS-SPME/GC/ITMS was employed to qualitatively investigate the volatile organic compounds (VOC) emitted by leaves of three species of *Eucalyptus* (*E.*): *E. citriodora*, *E. dunnii* and *E. saligna* either *in situ*, or in the laboratory, and also the relationship between *E. dunnii* and *Litoria ewingi* frogs. For these purposes, analytical methods were developed.

Compounds tentatively identified as (*E,E*)- α -farnesene, (*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (DMNT), (*E,E*)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraene (TMTT), β -caryophyllene, α -caryophyllene, germacrene-D e (*E,E,E*)-3,7,11,15-tetramethyl-1,3,6,10,14-hexadecapentaene (TMHP) were found in the headspace of chopped leaves. The three first compounds were also found in the emissions of *E. saligna in situ* and were not detected in the volatile oils obtained from the leaves of the same tree through hydrodistillation.

Two patterns of circadian profiles were found in the leaves volatile emissions *in situ* for some compounds, such as: *cis*-, *trans*-rose oxide e *trans*- β -ocimene, citronellal, citronellol, among others. The unique behaviour of these compounds suggests that they may play an infochemical role in *Eucalyptus*.

Results obtained with HS-SPME (PDMS/DVB) showed that this is a relatively simple analytical tool. Due to its non-invasive nature and speed (1 min), it allows sampling while keeping the system alive and minimally disturbed. Such characteristics provide the monitoring of fast changes in a living system resulting from endogenous and/or exogenous processes. The monitoring of VOC leaves *in situ* for 8 to 10 hours during several consecutive days, and the extraction of frog VOC under stress in different environmental and dietary conditions highlight the potential of SPME, opening a new horizon of investigation of *in vivo* VOC emissions of living beings.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* L'Herit da família das Mirtáceas é um dos mais importantes do planeta e tem sido amplamente cultivado em muitos países.¹ Pertencente a um grupo de plantas aromáticas com mais de 700 denominações entre espécies, subespécies, variedades e híbridos, o eucalipto (do grego "eu": boa, apropriada; "kalyptus": cobertura) é natural da Austrália e foi introduzido no Brasil em 1904 por Edmundo Navarro de Andrade.^{2,3}

Vários produtos são extraídos destas árvores: celulose e papel, óleos voláteis para diversos usos, tanino, madeira para construção civil, postes, dormentes, aglomerados, móveis e embalagens. O eucalipto também é utilizado para aumentar a biodiversidade das áreas, proteger contra a erosão, recuperar o nível de fertilidade da terra e recuperar áreas degradadas.

No Brasil existem aproximadamente 3 milhões de hectares de florestas plantadas de eucaliptos e no estado do Rio Grande do Sul 160 mil hectares.⁴ Embora o país possua grandes extensões de florestas de eucalipto (principalmente, espécies utilizadas na produção de celulose, como *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*), poucos estudos foram feitos até o momento sobre os óleos essenciais destas árvores.⁵⁻⁷

Além das aplicações citadas, o conhecimento da composição dos óleos essenciais de eucalipto e/ou das emissões voláteis dos mesmos em laboratório ou *in situ* também é importante para outras áreas do conhecimento, entre elas:

- na avaliação das melhores espécies para produção de óleos de maior valor agregado e/ou para melhoramento genético;⁸

- na Taxonomia para classificação das espécies;^{3,9}

- na Química Atmosférica devido ao impacto causado pelos voláteis emitidos pelas florestas na atmosfera;¹⁰

- na Ecologia Química para o estudo dos processos intra e inter espécies;^{11;12}

- na Farmácia para a investigação de novos compostos bioativos;¹³

- na agricultura e silvicultura na busca de novos herbicidas naturais;¹⁴

- na indústria dos perfumes e sabores para a melhor reprodução de fragrâncias naturais.^{15;16}

Em vista do exposto, justifica-se o presente trabalho que visa o estudo dos voláteis das folhas de algumas espécies de eucalipto, com possível interesse comercial para o Rio Grande do Sul. As técnicas de extração utilizadas são hidrodestilação (HD) e micro extração em fase sólida (SPME).

Para tanto, os seguintes objetivos foram propostos:

1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e/ou adaptar métodos para o isolamento, separação e análise dos óleos voláteis das folhas de *Eucalyptus (E.) citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna* cultivados pela empresa Klabin Riocell no Rio Grande do Sul, buscando propor um possível aproveitamento destes óleos ou a utilização das emissões voláteis das folhas de eucalipto ou ainda elucidar a interação do eucalipto com o meio ambiente e outros seres vivos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Desenvolver e/ou adaptar métodos de extração de compostos voláteis de folhas de eucalipto usando técnicas de HD e SPME, comparando-as qualitativamente;

→ Investigar a potencialidade da técnica de SPME para extração de compostos voláteis emitidos por organismos *in vivo*, usando para isto folhas de eucalipto e rãs que vivem em contato com florestas de eucalipto. Para este fim,

desenvolver e/ou adaptar um método utilizando SPME para extração dos compostos voláteis emitidos por folhas de eucalipto *in situ* e rãs *in vivo*;

→ Verificar a possibilidade de interação químico-ecológica entre os eucaliptos e as rãs utilizando o método de SPME desenvolvido;

→ Identificar os componentes principais presentes nas amostras de óleo e também no headspace de folhas de eucaliptos *in situ* e no laboratório, usando CG/EMTI;

→ Investigar o possível papel ecológico das emissões voláteis das folhas de eucaliptos *in situ* e em laboratório e dos anfíbios estudados *in vivo* à luz da literatura.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ÓLEOS VOLÁTEIS DE EUCALIPTO

O termo óleo essencial originou-se do trabalho do médico suíço Teophrastus Bombastus von Hohenheim, Paracelsus, (1493 – 1541) que criou o termo “quinta essência”, pois supunha que o princípio ativo de cada droga era a “quinta essência”, visto que a terra, o fogo, o vento e a água já haviam sido considerados como os quatro primeiros elementos. O objetivo da Farmácia seria isolar este princípio ativo.¹⁵ O termo “óleo essencial” é ainda hoje amplamente utilizado, embora sua definição remonte à Idade Média. Um termo mais adequado seria “óleos voláteis”, visto que tradicionalmente estes óleos são obtidos por processos de arraste a vapor.² Neste texto, ambos os termos serão empregados indiscriminadamente.

As plantas sintetizam os óleos voláteis e os armazenam em estruturas especializadas em secreção, tais como glândulas e dutos. A síntese pode ocorrer em órgãos como flores, frutos, folhas, raízes, cascas e madeira. Os óleos de eucalipto contêm majoritariamente compostos terpênicos (mono e sesquiterpenos). As Figuras A1 até A8 (Anexo A) mostram as fórmulas estruturais de alguns dos componentes dos óleos essenciais de eucalipto.

Os eucaliptos se dividem em três categorias de acordo com a utilização de seus óleos: óleos medicinais, óleos industriais e óleos para perfumes e sabores.¹⁵

1.1. ÓLEOS MEDICINAIS

Esta é a utilização mais nobre dos óleos de eucalipto e também representa quantidades substanciais comercializadas no mercado. Embora muitas espécies contenham eucaliptol, somente um número limitado apresenta a combinação de altos teores de eucaliptol e grandes rendimentos em óleo. No mercado, existe a

prática de misturas de óleos e de retificação. Este tipo de óleo é utilizado especialmente para problemas do trato respiratório e, embora pesquisadores marroquinos tenham verificado a eficiência do eucaliptol contra germes patogênicos, faz-se necessária uma investigação mais ampla, visto que outros pesquisadores questionam esta ação.^{17;18} Diversas pesquisas têm apontado a potencialidade destes óleos para várias outras aplicações: anti-séptico, bactericida, aceleradores de penetração cutânea,^{19;20} relaxamento muscular e mental, aumento da percepção cognitiva do indivíduo.^{21;22} Alguns componentes específicos do óleo, portadores de esqueletos moleculares como sideroxilonal, macrocarpal, euglobal, robustadial apresentam ações diversas, tais como, inibidores do vírus de Epstein-Barr, antimaláricos, antitumorais, etc.²³ O eucaliptol também pode ser utilizado com aditivo para combustível para promover a mistura álcool-gasolina ou o próprio óleo pode ser empregado em misturas álcool – óleo de eucalipto como combustível renovável.²⁴

Algumas espécies incluídas nesta classificação são: *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. radiata* subsp. *radiata* (variante eucaliptol), *E. smithii*, *E. polybractea*.

1.2. ÓLEOS INDUSTRIAIS (ou do tipo felandreno)¹⁵

Estes óleos contêm principalmente α -felandreno e piperitona. Encontram aplicação como aromatizantes, desinfetantes, sabões industriais líquidos, solventes, germicidas. Algumas espécies incluídas nesta classe: *E. dives*, *E. radiata* subsp. *radiata* (variante felandreno), *E. tereticornis*.

1.3. ÓLEOS PARA PERFUMES OU SABORES

O óleo essencial de *E. citriodora* é considerado uma das melhores fontes naturais de citronelal e citronelol, compostos que são utilizados na indústria para produção de perfumes de maior valor agregado.^{15;25} Inseticidas comerciais a base de óleo de *E. citriodora* são amplamente comercializados, embora não sejam tão eficientes como os sintéticos. Em contrapartida, *cis*- e *trans*-p-mentano-3,8-dióis são

compostos extraídos do óleo de *E. citriodora* e têm ação comparável aos inseticidas sintéticos.^{26,27} Folhas secas pulverizadas de *E. citriodora* tiveram sua ação protetora contra insetos na estocagem de trigo constatada pelo período de 5 meses.²⁸ O óleo de *E. citriodora* apresenta também atividade antifúngica,²⁹ sendo o citronelal um repelente de piolhos³⁰ e o citronelol um bactericida.³¹

Além do *E. citriodora* outras árvores pertencentes a esta classe são: *E. macarthurii*, *E. olida*, *E. staigeriana*.

2. COMPOSTOS TERPENÓIDES^{32,33}

Os terpenóides, também chamados terpenos ou isoprenóides são uma classe de produtos naturais extremamente numerosa e diversa. A designação terpeno deriva-se dos primeiros estudos do exsudado de coníferas (“terpentin” do alemão), inicialmente restrita a hidrocarbonetos e posteriormente empregada para qualquer composto isoprenóide.³³ Aparentemente, não existe unanimidade quanto às designações dos subgrupos de terpenos e, normalmente, utilizam-se os sufixos –óide ou –eno.

Os terpenos são construídos a partir de unidades C₅ e os nomes dos principais grupos estão apresentados na Tabela I. Entretanto, a Tabela I não inclui todos os subgrupos. Entre eles, os hemiterpenóides, os meroterpenóides, entre outros. Os hemiterpenóides (C₅) são gasosos e pouco numerosos na natureza (isopreno, por exemplo), sendo eventualmente perdidos nos procedimentos de preparação de amostras. Os meroterpenóides são compostos de origem biossintética mista, tais como terpenos alcalóides, quinonas terpenóides, vitaminas E, K, etc. De todos os grupos citados, consideraremos primordialmente os mono e sesquiterpenos, os quais são comuns em óleos de folhas de eucalipto. Alguns membros destes subgrupos apresentam atividade biológica.

Tabela I. Classificação dos terpenóides em seus principais subgrupos.³²

C _n	subgrupo
10	monoterpenóides
15	sesquiterpenóides
20	diterpenóides
25	sesterpenóides
30	triterpenóides
40	tetraterpenóides
10 ³ -10 ⁴	politerpenóides

Nota: C_n é número de átomos de carbono na molécula

De acordo com a regra do isopreno, nos terpenos regulares, as unidades de isopreno estão ligadas umas às outras na orientação "cabeça-cauda". A mesma regra postula que cada classe dos compostos terpenóides conhecidos é derivada de um composto pai único, que subsequenteiramente sofre alterações estruturais através de ciclizações e rearranjos do composto pai e seus derivados. A Figura 1 mostra um esboço simplificado da biossíntese dos compostos terpenóides.

Alguns monoterpenos são conhecidos por serem fitotóxicos aos tecidos das plantas, causando uma redução drástica no número de mitocôndrias intactas e nos complexos de Golgi, prejudicando a respiração e a fotossíntese e diminuindo a permeabilidade da membrana da célula. Devido a este potencial tóxico, estes compostos desempenham um papel importante na interação entre plantas superiores. Eles podem atuar na inibição da germinação de sementes, na inibição do crescimento de plantas, etc. Além disso, também mediam interações entre plantas e animais, aumentando a resistência de plantas ao ataque de herbívoros, repelindo predadores, etc.

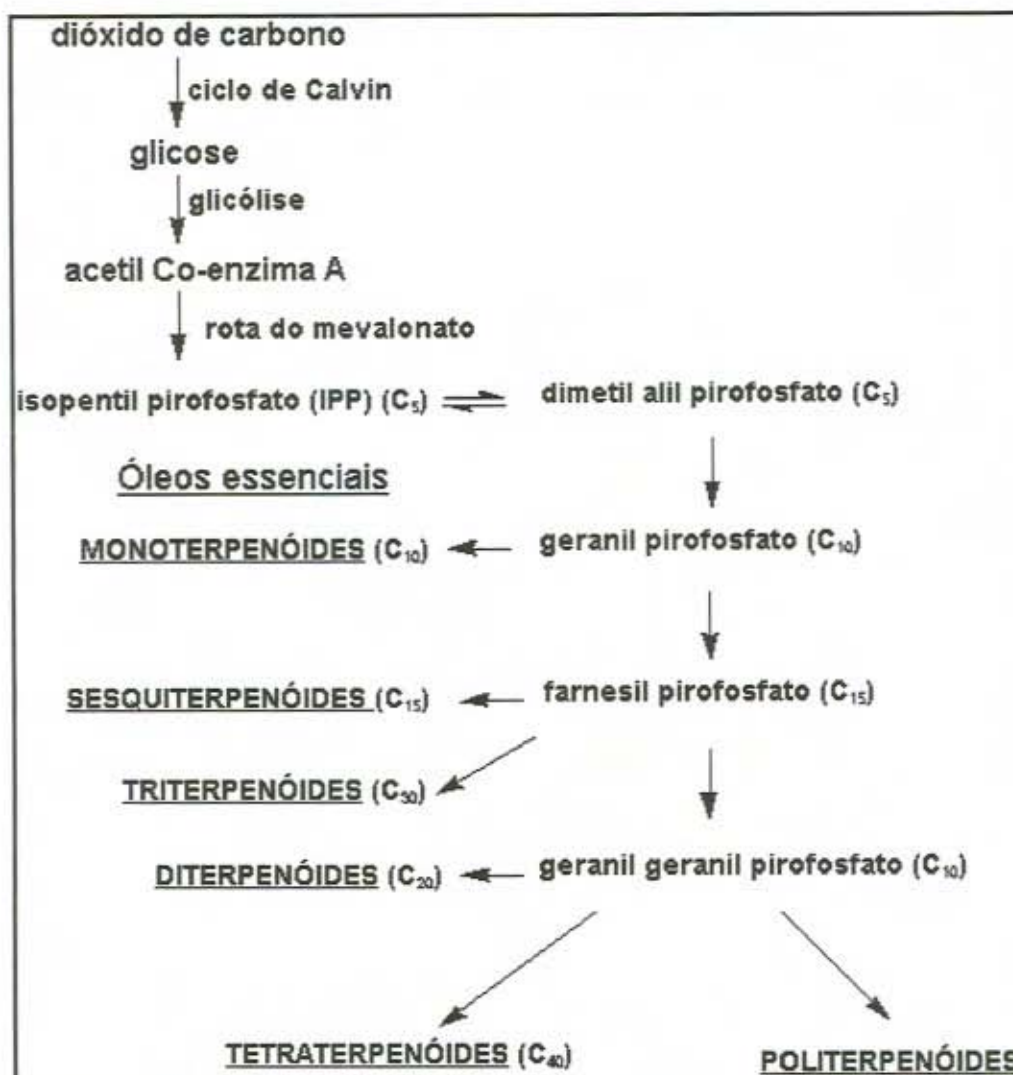


Figura 1. Esboço simplificado da biossíntese dos compostos terpenóides.

Atualmente, sabe-se que os monoterpenos apresentam várias propriedades interessantes, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, carminativa, anti-helmíntica, sedativa, expectorante, anticancerígena, entre outras. Tais propriedades têm chamado a atenção da indústria farmacêutica.

O número de sesquiterpenos de origem natural é muitíssimo maior do que o de monoterpenos, sendo os sesquiterpenos, o maior subgrupo dos compostos terpenóides, com mais de 100 esqueletos moleculares diferentes.³³ As Figuras A5 a A8 (Anexo A) apresentam alguns hidrocarbonetos sesquiterpenóides e sesquiterpenos oxigenados presentes em óleos essenciais e emissões voláteis de eucaliptos. A existência de muitos isômeros geométricos neste subgrupo torna a

separação cromatográfica e identificação destes compostos mais difícil. Os sesquiterpenos podem apresentar atividade antimicrobiana, hormonal de crescimento e toxicidade, entre outras, relativamente às plantas. Atuam também como hormônios juvenis de insetos. Os hormônios juvenis são substâncias que regulam a metamorfose, a reprodução e outras funções importantes nos insetos. Esta classe de compostos também apresenta atividade farmacológica como por exemplo antiespasmódica, antibiótica, antimicrobiana, antibacteriana, antioxidante, etc. Alguns sesquiterpenos apresentam notáveis propriedades organolépticas e são usados na indústria dos perfumes.

3. COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FOLHAS VERDES (GLV)

O aroma das folhas verdes (GLV, do inglês "green leaf volatiles") contém compostos voláteis que possuem seis carbonos na sua estrutura. Dentre os aldeídos e álcoois, dois deles são considerados contribuintes majoritários: o chamado "aldeído da folha", 2-(*E*)-hexenal e o "álcool da folha", 3-(*Z*)-hexenol. Estes compostos voláteis são biossintetizados a partir dos ácidos linoleico e linolênico através de seus respectivos hidroperóxidos, como resultado de um dano à folha verde. Esta rota biossintética é chamada de rota da lipoxigenase. Todos os produtos da oxidação destes ácidos insaturados são chamados de oxilipinas, independentemente do número de carbonos da molécula. Quatro enzimas são responsáveis por catalisar esta rota biossintética: hidrolase acil lipolítica (LAH), lipoxigenase (LOX), hidroperóxido liase (HPL) e álcool desidrogenase (ADH).³⁴⁻³⁶ Na folha, o sistema enzimático encontra-se ligado às lamelas dos cloroplastos. Além do álcool e do aldeído da folha, outros compostos como 3-(*E*)-hexenol, 2-(*E*)-hexenol, 3-(*Z*)-hexenal e 2-(*E*)-hexenal são também encontrados em folhas recém cortadas.³⁴ A presença dos GLV é bastante comum e tem sido amplamente registrada na literatura.^{37,38} Os GLV tem sido investigados como infoquímicos em várias situações, como por exemplo: reconhecimento da planta hospedeira por parte de um herbívoro

da batata (*Leptinotarsa decemlineata*),^{39,40} inibição do crescimento de fungos patogênicos por 2-(*E*)-hexenal,^{41,42} ação bactericida do 2-(*E*)-hexenal a baixas concentrações.⁴³ Além disso, hexenal e 2-(*E*)-hexenal inibem a germinação das sementes de soja, enquanto 2-(*E*)-hexenal induz ao escurecimento de flores de *Cryptomica japonica*.⁴²

A Figura 2 apresenta um esboço da biossíntese dos compostos voláteis de folhas verdes.

As técnicas comumente utilizadas para extração de GLV podem ser: headspace estático ou dinâmico,^{39,44-47} destilação a vácuo com posterior concentração por congelamento, extração líquido-líquido,^{40,47,48} extração com fluido supercrítico.⁴⁹ O emprego de SPME para monitoramento da dinâmica de liberação de compostos voláteis a partir do rompimento de tecidos que não são verdes possui alguns poucos exemplos na literatura. Um deles é o estudo dos voláteis de cebolas recém cortadas (*Allium cepa* L.), onde a SPME mostrou-se uma técnica mais conveniente e rápida do que as convencionais para investigação dos compostos que compõe o aroma desta erva bulbosa logo após o seu corte.⁴⁹ Outro artigo investiga o uso da SPME para verificar a habilidade do tecido de pepino de produzir os compostos que lhe conferem impacto ao sabor: (*E,Z*)-2,6-nonadienal e (*E*)-2-nonenal.⁵⁰

No que diz respeito à liberação de voláteis de folhas verdes, em um trabalho recente, fibras recobertas de PDMS (polidimetilsiloxano) 100 µm e PA (poliacrilato) 85 µm foram utilizadas para amostrar voláteis de um tomateiro *in vitro*. A detectabilidade de compostos polares na presença de meio de cultura foi demonstrada através do monitoramento de 3-(*Z*)-hexenal e de 3-(*Z*)-hexenol no headspace da planta por 80 min.⁵¹ Alguns dos GLV de espécies de *Brassica* tiveram seu surgimento e desaparecimento acompanhado também através do uso de SPME.⁵² Relativamente aos GLV das folhas de eucalipto, não foi encontrado nenhum estudo na literatura que utilizasse SPME como técnica de extração destes voláteis.

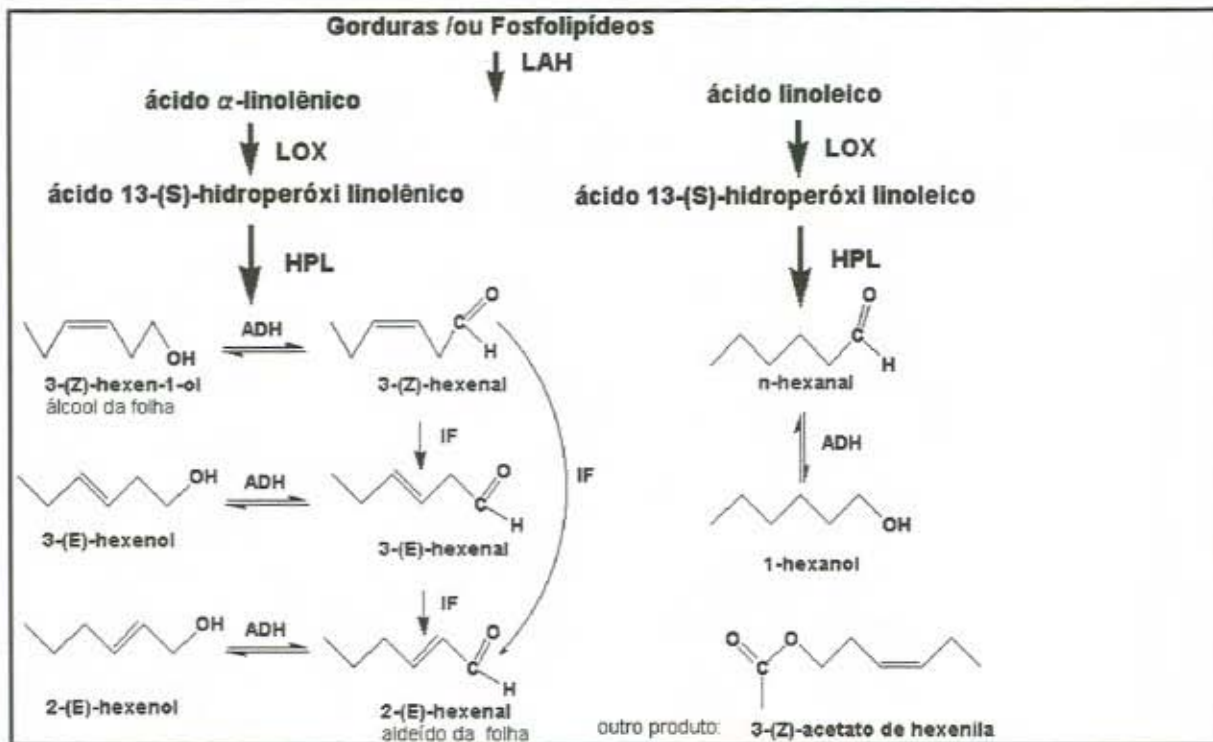


Figura 2. Esboço da biossíntese do aroma das folhas verdes. LAH: hidrolase acil lipolítica; LOX: lipoxigenase; HPL: hidroperóxido liase; ADH: álcool desidrogenase; IF: fator de isomerização. Alguns compostos foram omitidos para simplificar o esboço.³⁴⁻³⁶

4. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS VOLÁTEIS

4.1. DESTILAÇÃO

O processo é simples e, portanto, largamente utilizado isoladamente ou em combinação com outros métodos para extração de óleos essenciais de plantas. A literatura relativa aos óleos de eucalipto é pródiga em publicações sobre identificação dos constituintes destes óleos a partir da utilização da destilação e

suas variantes: hidrodestilação com Clevenger,^{53,54} destilação a vapor,^{55,56} extração – destilação simultânea, processo conhecido como método de Lickens-Nickerson.⁵⁷

Os óleos essenciais de plantas, disponíveis comercialmente, são geralmente obtidos por destilação. As alterações químicas provocadas durante o processo de extração devidas à temperatura, pH ou outros fatores são desejáveis somente quando o objetivo da extração é satisfazer um cliente já acostumado ao óleo proveniente deste tipo de processo. Contudo, a literatura mostra que, até mesmo quando se objetiva fazer comparações inter ou intra plantas, este tipo de processo é empregado.^{58,59} Entretanto, quando o objetivo é obter a composição mais próxima àquela existente na planta *in vivo*, a destilação não é o método indicado.

Boland e colaboradores¹⁵ utilizaram destilação com arraste de vapor para analisar uma grande variedade de óleos de eucalipto. A fim de contornar as dificuldades encontradas no processo de destilação, como por exemplo degradação térmica de compostos termolábeis⁶⁰ e reações induzidas pelo contato com a água a diferentes pHs, pesquisadores australianos idealizaram um aparelho de destilação a vácuo que opera a baixas temperaturas (-75 °C).⁶¹ Desde então, Bignell e colaboradores têm publicado um número considerável de artigos relatando a composição de diferentes óleos de eucaliptos australianos utilizando este equipamento de destilação a vácuo, mesmo sendo este um processo demorado (4 h apenas para a etapa de destilação).⁶²⁻⁷⁷

4.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DIRETA

4.2.1. Extração com solvente

A extração com solvente abrange um grande número de técnicas, que vão desde a simples imersão do material vegetal no solvente à temperatura ambiente até a extração em Soxhlet realizada na temperatura do ponto de ebulição do solvente.²

Resinas oleosas (do inglês "oleoresins") são extratos obtidos ao utilizar-se solventes orgânicos em matéria vegetal seca ou fresca. Extratos como estes tornam-

se quase sólidos à temperatura ambiente depois da remoção do solvente. O óleo volátil pode ser obtido a partir da destilação da resina oleosa. A extração com solvente pode também ser realizada em combinação com outras técnicas, como por exemplo, sonicação.⁷⁸ Apesar da sua simplicidade, existe uma tendência à substituição da extração com solvente por outras técnicas, devido à necessidade do emprego de solventes de alta pureza para a análise de traços e também devido aos riscos ambientais e de saúde associados à manipulação dos solventes. A perspectiva de legislação mais restritiva no tocante a resíduos de solventes em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios também é um fator agravante.^{79,80} Contudo, a principal desvantagem desta técnica é a extração de impurezas de alto peso molecular. Estas impurezas podem ser extraídas por técnica de pré-fracionamento, entretanto, em alguns casos, esta etapa pode induzir à formação de artefatos.³² Além disso, a extração com solventes tem o inconveniente de introduzir o pico do solvente na análise cromatográfica, o qual pode encobrir picos de compostos que eluem rapidamente. Caso seja necessário concentrar a amostra antes da análise cromatográfica, os compostos mais voláteis podem ser parcial ou totalmente perdidos.

4.2.2. Extração com fluido supercrítico (SFE)

A SFE é um processo que utiliza um fluido supercrítico como solvente da extração. O solvente é chamado de supercrítico porque se encontra acima de sua temperatura crítica e pressão crítica. Neste estado, comparativamente aos líquidos, o solvente apresenta coeficiente de difusão mais alto, viscosidade mais baixa, pressão de vapor mais elevada e maior densidade do que os gases. As viscosidades mais baixas e as taxas de difusão mais altas do fluido supercrítico tornam-no ideal para extração de matrizes sólidas como por exemplo tecidos de plantas. Dióxido de carbono é o solvente mais utilizado, tendo em vista sua disponibilidade em alta pureza, impacto ambiental mínimo, possibilidade de uso de baixas pressões, temperaturas próximas às do ambiente e baixo custo, embora os equipamentos utilizados para o processo de extração sejam caros.^{2,81} Uma das dificuldades para a reprodução das fragrâncias naturais é a presença de compostos termolábeis, para

os quais as temperaturas baixas da SFE com CO₂ são bastante convenientes, contudo, é importante ajustar adequadamente os parâmetros operacionais, de modo a não extrair compostos indesejáveis de alto peso molecular. Nos casos em que a extração tem por objetivo extrair frações específicas ao invés da totalidade da mistura oleosa, os co-solventes podem ser utilizados.^{79,82}

4.2.3. Amostragem na estrutura secretora

Este tipo de amostragem pode ser realizada quando a estrutura secretora que contém o óleo essencial é suficientemente grande e acessível para permitir a remoção do óleo diretamente da planta. Este método já foi aplicado ao estudo do óleo contido nas estruturas secretoras do epicarpo de frutas cítricas, nas folhas de *Tagetes patula*⁸³, nos pelos glandulares da folha de *Salvia officinalis* e nas glândulas de óleo de folhas de eucalipto.² Esta técnica envolve a perfuração da bolsa que contém o óleo com uma agulha e posterior sucção do mesmo ou isolamento das glândulas individuais portadoras de óleo e extração do mesmo com solvente apropriado.³²

4.3. TÉCNICAS DE HEADSPACE (HS)

O headspace (HS) da planta consiste na mistura gasosa que circunda a mesma e se localiza no espaço próximo a ela. Procedimentos baseados na extração do HS do material vegetal são amplamente utilizados por possibilitarem a coleta dos componentes a baixas temperaturas, minimizando alterações na composição da mistura volátil e, especialmente, por serem não invasivos, isto é, permitirem a investigação dos voláteis emitidos pela planta sem danificar demasiadamente a mesma.

4.3.1. Extração do headspace no modo estático (SHE)

A forma mais simples de investigação da composição química do headspace de uma planta é utilizar uma fração da mistura gasosa que está em contato com a mesma, introduzindo-a no equipamento de separação e análise. Embutida nesta simplicidade está a desvantagem da ausência de um passo de pré-concentração, o que em geral impossibilita a análise de componentes traço da mistura.^{33,84} Em uma variante deste método empregam-se temperaturas mais elevadas para facilitar a liberação dos compostos voláteis do material vegetal, permitindo-se degradação térmica de compostos termolábeis.³²

4.3.2. Extração do headspace no modo dinâmico (DHE)

Neste procedimento, um fluxo de gás inerte passa pela amostra e os analitos são coletados em uma região criogênica ou em adsorventes do tipo carvão ativado, sílica gel, peneira molecular, alumina e polímeros porosos como por exemplo Tenax, Porapak, Chromossorb, etc. A dessorção do meio sólido pode ocorrer através de extração com solvente, ou por dessorção térmica.^{32,33} Embora o equipamento seja mais caro e não seja conveniente para compostos termolábeis, o procedimento preferencial para análise de rotina é a dessorção térmica, visto ser mais simples, mais facilmente automatizado, apresentar melhores limites de detecção, além de não apresentar a interferência do pico do solvente.⁸⁵

Este tipo de técnica pode ser empregado para extrair voláteis de plantas vivas em laboratório ou em campo utilizando-se um recipiente de vidro^{86,87} ou sacos plásticos⁸⁸ para confinar a planta ou partes da mesma.

Vercammen e colaboradores⁸⁶ empregaram um equipamento de dessorção térmica acoplado a um GC/MS a fim de comparar a performance da DHE de tubos de Tenax TA e tubos de PDMS (polidimetilsiloxano) moído, bem como HS-SPME estático para a coleta de compostos voláteis de rosas e jasmims vivos, verificando que os tubos de PDMS foram mais eficientes no isolamento dos compostos, resultando em cromatogramas mais limpos.

A DHE seguida de dessorção térmica também pode ser empregada para voláteis de partes de plantas que foram retiradas do pé e utilizadas intactas ou mecanicamente danificadas, como por exemplo as partes aéreas das plantas medicinais *Echinacea* e folhas da pimenta japonesa (*Xanthoxylum piperitum*).^{89,90}

DHE seguida de extração com solvente também é usada para este fim, como é o caso de macerados das plantas do gênero *Brasica* e *Sinapis*.⁹¹

4.3.3. Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME) foi desenvolvida com o objetivo de facilitar a rápida preparação de amostras.^{92,93}

Belardi e Pawliszyn,⁹³ em 1989, publicaram o trabalho inicial que consistiu em imergir fibras de sílica fundida recobertas ou não com polímeros em soluções aquosas contendo analitos teste, as quais eram dessorvidas no bloco aquecido do injetor de um CG logo a seguir. Desde então, as aplicações da SPME têm se estendido a matrizes ambientais, farmacêuticas, clínicas, forensicas, alimentícias, perfumes e feromônios.^{13,92,94,95}

A SPME é baseada no fato de que os analitos presentes na amostra ou no seu headspace são sorvidos na fase extratora que é um fino filme imobilizado sobre uma fibra de sílica fundida. As fibras podem ser recobertas por fases poliméricas líquidas ou sólidas. As fases sólidas são na realidade, um sólido disperso em uma matriz polimérica líquida, contudo, a fim de simplificar o tratamento são chamadas sólidas, porosas ou mistas.

Na SPME há três formas básicas de extração: extração direta, extração no modo headspace e extração no modo indireto (ou protegida por membrana). A Figura 3 apresenta os modos de operação da SPME. Na extração direta (Figura 3A), o filme polimérico é inserido na amostra e os analitos são transportados diretamente da amostra para a fase extratora. No modo headspace, (Figura 3B) o filme polimérico é exposto à fase gasosa imediatamente acima da amostra. Este modo de operação é ideal nos casos em que os analitos são suficientemente voláteis na temperatura de extração escolhida, visto que protege a fase extratora de interação

com impurezas e permite que a amostra seja modificada (pH, força iônica etc), sem causar dano ao filme polimérico.

No modo indireto de extração (Figura 3C), a extração ocorre através de uma membrana. O objetivo principal neste caso, é proteger o filme polimérico quando a extração é realizada em matrizes "sujas".

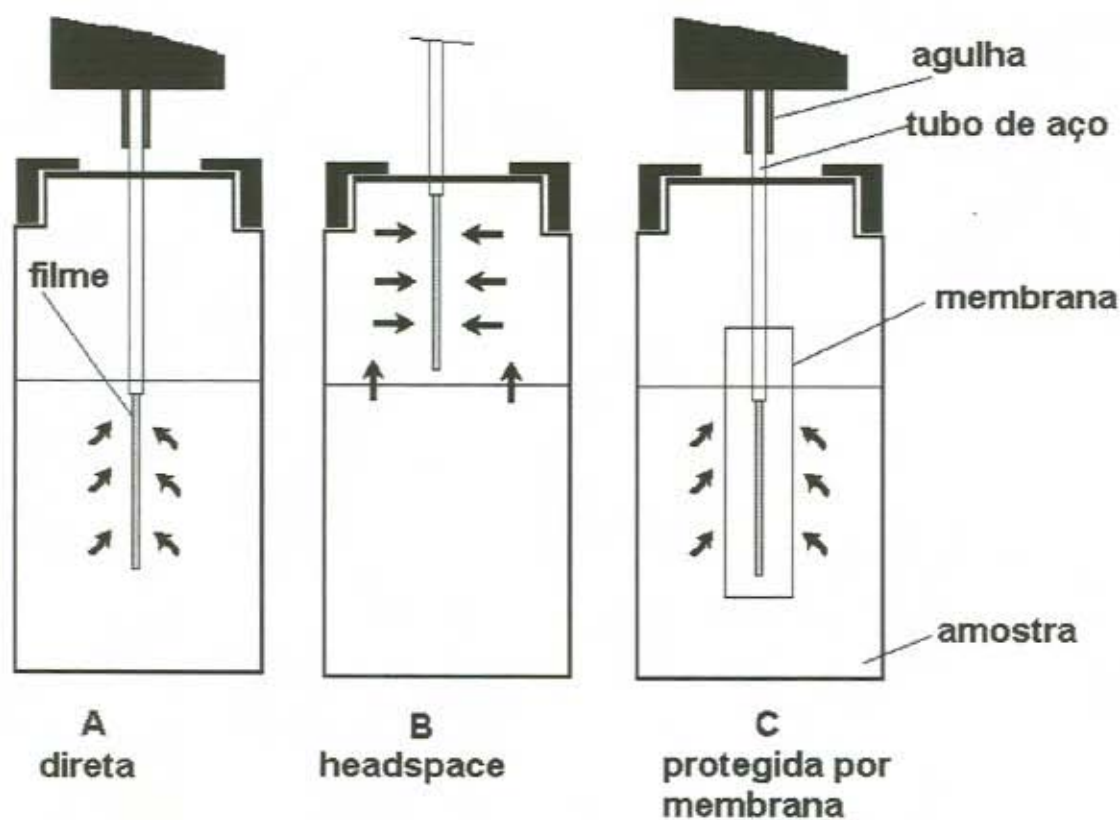


Figura 3. Representação esquemática dos modos de operação da SPME: (A) extração direta; (B) extração no modo headspace, (C) extração protegida por membrana. Nota: A representação não está em escala.

4.3.3.1. Princípios básicos da SPME – Absorção⁹²

No caso das fases poliméricas líquidas (polidimetilsiloxano – PDMS ou poliacrilato – PA), o mecanismo físico-químico responsável pela extração é a partição. A Figura 4 mostra as estruturas destes 2 materiais poliméricos utilizados nas fibras de SPME. A fundamentação teórica da SPME apoia-se em princípios termodinâmicos e de transferência de massa. A fim de simplificar relações matemáticas, a teoria assume condições ideais. De uma forma geral, esta teoria derivada de condições ideais resulta em excelentes resultados quando aplicada a matrizes simples como água potável ou ar. Entretanto, até mesmo no caso de matrizes complexas, os resultados obtidos aproximam-se dos obtidos experimentalmente.

A quantidade de analito extraída em condições de equilíbrio pode ser calculada utilizando-se princípios termodinâmicos e o tempo de extração pode ser estimado através de considerações relativas à transferência de massa.

A microextração em fase sólida é um processo de equilíbrio multifásico. Em uma situação ideal consideram-se três fases: o filme polimérico (neste caso, um polímero líquido), a fase gasosa ou headspace e uma matriz homogênea, como por exemplo a água, conforme Figura 3A.

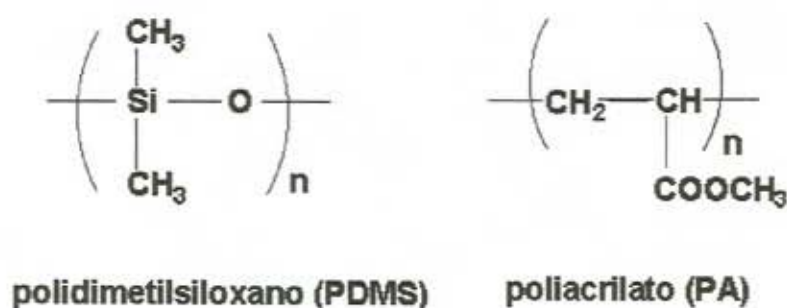


Figura 4. Estruturas de 2 filmes poliméricos para SPME.

A massa total do analito extraído está relacionada ao equilíbrio do analito entre estas três fases. Esta massa permanece constante no sistema durante o processo de extração:

$$C_0 V_a = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_a^\infty V_a \quad \text{equação (1)}$$

onde:

C_0 = concentração inicial do analito na matriz;

C_f^∞ = concentração de equilíbrio do analito no filme polimérico;

C_h^∞ = concentração de equilíbrio do analito no headspace;

C_a^∞ = concentração de equilíbrio do analito na matriz;

V_f = volume do filme polimérico;

V_h = volume do headspace;

V_a = volume da amostra.

Definindo as constantes de distribuição do filme polimérico-headspace como $K_{fh} = C_f^\infty / C_h^\infty$ e do headspace-amostra como $K_{ha} = C_h^\infty / C_a^\infty$, a massa do analito absorvida no filme polimérico, $n = C_f^\infty V_f$, pode ser expressa como:

$$n = \frac{K_{fh} K_{ha} V_f C_0 V_a}{K_{fh} K_{ha} V_f + K_{ha} V_h + V_a} \quad \text{equação (2)}$$

As expressões relativas às constantes de distribuição deveriam envolver as atividades apropriadas, contudo, as concentrações são uma aproximação razoável, considerando-se que os analitos encontram-se presentes em nível de traços na

amostra. A diferença de potencial químico do analito entre as três fases é o que impulsiona o sistema ao equilíbrio.

O potencial químico do analito no headspace, no filme polimérico e na amostra pode ser expresso como:

$$\mu_h = \mu^0(T) + RT \ln \left(\frac{p^h}{p^0} \right) \quad \text{equação (3)}$$

$$\mu_f = \mu^0(T) + RT \ln \left(\frac{p^f}{p^0} \right) \quad \text{equação (4)}$$

$$\mu_a = \mu^0(T) + RT \ln \left(\frac{p^a}{p^0} \right) \quad \text{equação (5)}$$

onde:

$\mu^0(T)$ = potencial químico do analito na pressão padrão p^0 (normalmente $p_0 = 1$ atm) e na temperatura T.

μ_f = potencial químico do analito no filme polimérico;

μ_h = potencial químico do analito no headspace;

μ_a = potencial químico do analito na matriz aquosa;

p_f = pressão de vapor do analito no filme polimérico;

p_h = pressão de vapor do analito no headspace;

p_a = pressão de vapor do analito na matriz líquida;

Quando as três fases estão em equilíbrio, os potenciais químicos do analito nas três fases são iguais:

$$\mu_f = \mu_h = \mu_a \quad \text{equação (6)}$$

Considerando-se as equações de (3) a (5), pode-se escrever:

$$p_f = p_h = p_a \quad \text{equação (7)}$$

De acordo com a lei de Henry:

$$p_f = K_F C_f^\infty \quad \text{equação (8)}$$

$$p_a = K_A C_a^\infty \quad \text{equação (9)}$$

onde:

K_F = constante de Henry do analito no filme polimérico;

K_A = constante de Henry do analito na matriz aquosa.

Supondo-se que a lei dos gases ideais $p_h V_h = n_h RT$ (onde n_h é o número de moles do analito no headspace) é válida para o analito na fase vapor no headspace,

$$p_h = C_h^\infty RT \quad \text{equação (10)}$$

pode-se facilmente relacionar as constantes de distribuição com as constantes de Henry:

$$K_{fh} = \frac{C_f^\infty}{C_h^\infty} = \frac{RT}{K_F} \quad \text{equação (11)}$$

$$K_{ha} = \frac{C_h^\infty}{C_a^\infty} = \frac{K_A}{RT} \quad \text{equação (12)}$$

Para o caso de uma SPME direta em solução aquosa, tem-se no equilíbrio: $\mu_f = \mu_a$ ou $p_f = p_a$. A constante de distribuição do analito entre o filme polimérico e a solução aquosa, K_{fa} , pode ser expressa como:

$K_{fa} = C_f^\infty / C_a^\infty = K_A / K_F$, sendo $p_f = K_F C_f^\infty$, $p_a = K_A C_a^\infty$, $p_f = p_a$, quando o equilíbrio é atingido. Com base nas equações (11) e (12):

$$K_{fa} = \frac{K_A}{K_F} = K_{fa} K_{ha} = K_{fg} K_{ga} \quad \text{equação (13)}$$

e considerando-se que a umidade do headspace é desprezível, a constante de distribuição filme-headspace, K_{fh} , pode ser substituída pela constante de distribuição filme polimérico-gás, K_{fg} e a constante de distribuição headspace-amostra, K_{ha} , pela constante de distribuição gás-amostra, K_{ga} . Desta forma, a equação (2) pode ser reescrita como segue:

$$n = \frac{K_{fa} V_f C_0 V_a}{K_{fa} V_f + K_{ha} V_h + V_a} \quad \text{equação (14)}$$

A equação mostra que, nas condições de equilíbrio, a quantidade de analito extraída é independente da localização da fibra no sistema. Esta pode estar localizada no headspace ou diretamente na amostra contanto que o volume do filme polimérico, do headspace e da amostra sejam mantidos constantes. Nos casos em que a amostra preenche totalmente o frasco (não há headspace), o termo $K_{ha} V_h$ no denominador, que está relacionado a capacidade do headspace ($C_h^s V_h$), pode ser eliminado, resultando na equação (15):

$$n = \frac{K_{fa} V_f V_a C_0}{K_{fa} V_f + V_a}, \quad \text{equação (15)}$$

De forma sucinta, a massa extraída n de um analito é proporcional a sua concentração C_0 na amostra, sendo esta a base do uso quantitativo da SPME. A extração é considerada completa quando a concentração dos analitos alcança o equilíbrio de distribuição entre a matriz da amostra e o filme polimérico da fibra. Na prática, isto significa que a quantidade amostrada é constante dentro dos limites do erro experimental, mesmo quando o tempo de extração é aumentado.

A relação $K_{fa} = K_{f1}K_{f2}K_{f3} \dots K_{fn}$ na SPME de headspace pode ser generalizada para o equilíbrio de sistemas multifásicos (matrizes heterogêneas). Se existem n fases (por exemplo, vários sólidos) presentes no sistema a ser amostrado, e, por conveniência, estas fases são numeradas de 2 até n , começando da fase mais próxima ao filme polimérico e terminando naquela mais próxima à matriz, a constante de distribuição entre o filme polimérico e a matriz ($K_{fa} = C_f^{\infty} / C_a^{\infty}$, onde C_f^{∞} e C_a^{∞} são as concentrações do analito no filme polimérico e na matriz, respectivamente) pode ser expressa como:

$$K_{fa} = K_{f1}K_{12}K_{23} \dots K_{n-1,n}K_{na} = K_{f1}K_{na} \prod_{i=2}^{n-1} K_i \quad \text{equação (16)}$$

onde $K_{f1} = C_f^{\infty} / C_1^{\infty}$, $K_{i,i+1} = C_i^{\infty} / C_{i+1}^{\infty}$ e $K_{na} = C_n^{\infty} / C_a^{\infty}$ são as constantes de distribuição do filme polimérico - 1ª fase, iésima fase - i+1ª fase e enésima fase - matriz.

$$n = \frac{K_{fa}V_fC_0V_a}{K_{fa}V_f + K_{1a}V_1 + K_{2a}V_2 + \dots + K_{na}V_n + V_a} \quad \text{equação (17)}$$

$$= \frac{K_{fa}V_fC_0V_a}{K_{fa}V_f + \sum_{i=1}^{n-1} K_{ia}V_i + V_a}$$

onde $K_{ia} = C_i^{\infty} / C_a^{\infty}$ é a constante de distribuição do analito entre a fase iésima e a matriz. A equação (17) resulta na equação (15) quando não existe fase intermediária durante a extração e transforma-se na equação (14) quando o headspace não está presente.

A cinética do processo de extração determina a velocidade da extração. A maior parte da teoria de transporte de massa está baseada na segunda lei da

difusão de Fick, a qual, em uma dimensão, pode ser expressa conforme a equação (18):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \text{equação (18)}$$

onde C é a concentração e D o coeficiente de difusão do analito. Considerando a geometria cilíndrica da fibra e o sistema de amostragem no espaço tridimensional, a equação (18) transforma-se em:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{1}{r} \left[\frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial C}{\partial r} \right) \right] \quad \text{equação (19)}$$

Descrição detalhada da teoria cinética relacionada a SPME encontra-se na literatura e não é escopo deste trabalho.⁹² Neste texto serão colocadas apenas algumas considerações práticas derivadas da cinética da extração com SPME, para auxiliar na melhor compreensão do processo de extração. A partir da teoria sabe-se que, sob condições de agitação perfeita, a velocidade do processo de absorção dos analitos no filme polimérico depende apenas da difusão do analito no mesmo. Contudo, na prática existe sempre uma camada de fluido estacionário nas imediações do filme polimérico. À medida em que o fluido se afasta da superfície do polímero, sua agitação aumenta até chegar ao movimento que corresponde a agitação no seio da solução. Esta região do fluido ao redor da fibra pode ser representada simplificada por uma região de espessura definida onde não existe convecção, enquanto o restante da solução encontra-se sob agitação. Esta camada estática próxima à fibra é designada de camada limitrofe de Prandtl. A sua espessura é determinada pelas condições de agitação e pela viscosidade do fluido. A Figura 5 mostra uma representação do modelo da camada limitrofe, para o caso em que esta camada determina o tempo de extração. O tempo necessário para atingir o equilíbrio no processo de extração é infinitamente longo. Contudo, na prática, considera-se que o tempo de equilíbrio é alcançado quando 95% da quantidade de analito foi extraída da amostra. Este tempo de equilíbrio pode ser

estimado através de relações matemáticas e é determinado experimentalmente. A fim de obter-se dados reprodutíveis, o ideal é que a extração seja realizada no equilíbrio, ou depois dele, entretanto, caso seja necessário interromper a extração antes do equilíbrio, é imprescindível reproduzir cuidadosamente as condições experimentais.

Uma abordagem mais detalhada dos princípios teóricos tanto termodinâmicos quanto cinéticos da SPME está descrita na literatura, assim como o efeito de parâmetros como temperatura, pH, adição de sal, entre outros sobre a eficiência do processo de extração.⁹⁴

A HS-SPME pode ser utilizada tanto para análise de partes da planta retiradas do pé,^{96,97} como *in situ*.⁹⁸ Algumas vantagens da SPME são: rapidez, simplicidade, sensibilidade, compatibilidade com outros sistemas analíticos e para automação, facilidade de amostragem em campo ou em áreas remotas e ausência do pico do solvente na análise cromatográfica.

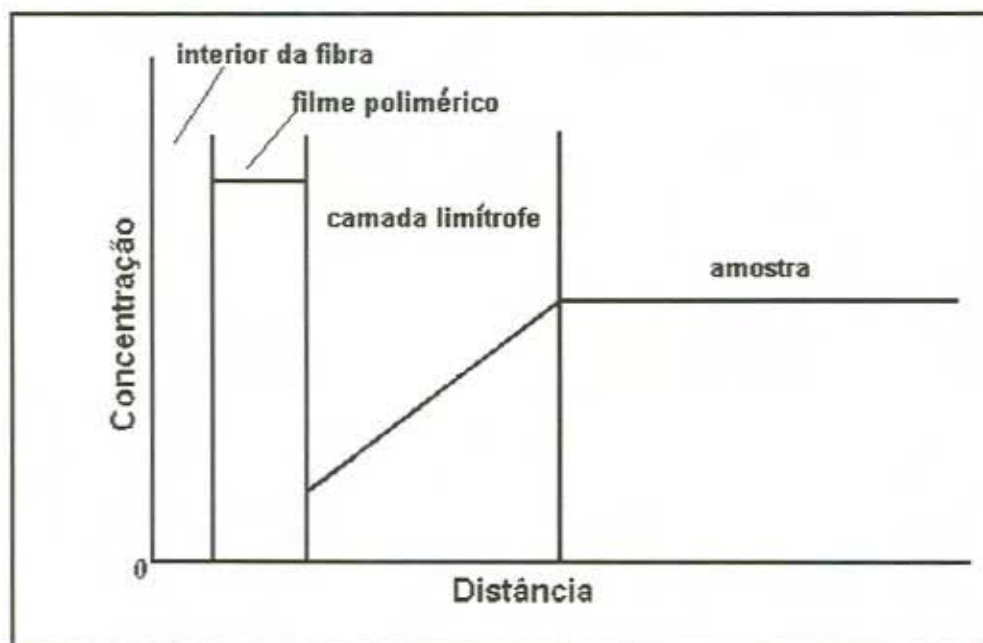


Figura 5. Configuração do modelo da camada limítrofe, apresentando as diferentes regiões consideradas no filme polimérico e na solução e a suposta concentração do analito ao longo das mesmas.

O número de trabalhos publicados usando polímeros líquidos para HS-SPME em plantas tem crescido nestes últimos anos. A maior parte destes trabalhos concentra-se no estudo de plantas secas, embora alguns poucos tenham investigado plantas frescas, no laboratório ou *in situ*. Algumas aplicações da SPME método como técnica de "screening" utilizando partes de plantas retiradas do pé ou plantas confinadas para extração de voláteis são citados a seguir: nove espécies de plantas herbáceas e subarborescentes secas;⁹⁹ flores frescas de *Momordica charantia* e *Luffa acutangula*;¹⁰⁰ rizoma seco de *Rhodiola rosea* L.;¹⁰¹ folhas, flores e botões de mil-em-rama seco (*Achillea millefolium*);¹⁰² investigação de diferenças entre flores e folhas secas de várias posições de pés de hortelã;⁹⁶ verificação da razão humuleno/cariofileno do lúpulo seco da cerveja;¹⁰³ verificação de diferentes variedades de lúpulo seco;¹⁰⁴ investigação da origem botânica da canela;¹⁰⁵ flores frescas, murchas e congeladas de *Michelia alba*;¹⁰⁶ investigação de monoterpenóides de espinhos de coníferas;¹⁰⁷ flores secas de alecrim e folhas secas de lavanda;¹⁰⁸ folhas secas de alecrim, sálvia e tomilho;¹⁰⁹ folhas frescas de *E. citriodora*, *E. nicholii*, *E. globulus*;⁹⁷ folhas frescas maceradas de várias espécies de *Brassica*;⁵² investigação de alguns terpenóides de folhas juvenis frescas de *E. brachyphylla*, *E. crucis*, *E. gunnii*, *E. kruseana*, *E. macrocarpa*, *E. orbifolia*;¹¹⁰ tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) confinado em recipiente de vidro;⁵¹ ramos de macieira recém cortados;¹¹¹ pedaços de madeira de abeto-do-norte (*Picea abies*) infestados pela larva *I. typographus*;¹¹² folhas de abeto de Fraser recém cortadas.¹¹³ Vários estudos relacionados a frutos, rizomas, raízes ou sementes comestíveis não estão incluídos neste trabalho, visto que o número de aplicações na área de alimentos é grande.

A literatura não apresenta nenhum estudo dos voláteis de folhas picadas de *E. dunnii* e *E. saligna* utilizando HS-SPME e o estudo existente sobre voláteis de *E. citriodora*, refere-se apenas a 5 folhas de uma árvore australiana.⁹⁷

4.3.3.2. Princípios básicos da SPME - Adsorção

Nas fibras recobertas com polímeros líquidos (PDMS, PA) os analitos são dissolvidos no filme polimérico, difundindo-se nele durante o processo de extração

(absorção). Quando a fibra é recoberta por um polímero sólido disperso em uma matriz polimérica líquida (fibra mista), como por exemplo Carboxen/PDMS, o processo envolve adsorção, isto é, os analitos permanecem na superfície do polímero. As fibras mistas apresentam sensibilidade muito maior do que a fibra PDMS para a extração de compostos orgânicos voláteis (VOC)¹¹⁴⁻¹¹⁶ e em curtos tempos de extração em condições de não equilíbrio, extraem quantidades maiores de VOC do que a fibra PDMS. Entretanto, competição entre os analitos pela superfície sólida porosa e efeitos de deslocamento tornam a quantificação dos analitos uma tarefa mais complexa.

A SPME baseada no princípio da partição é amplamente utilizada para quantificação de analitos em matrizes gasosas e líquidas, contudo, para matrizes sólidas, como por exemplo, plantas, a quantificação é ainda problemática.^{94,107,117}

O modelo proposto para o processo de adsorção de analitos nas fibras mistas considera a fibra um sumidouro perfeito, onde a adsorção ocorre imediatamente com a chegada das moléculas do analito na superfície. A Figura 6 ilustra o processo. Pressupõe-se que, quando a extração inicia, a concentração do analito é zero e que, durante o processo, a superfície do polímero encontra-se longe da saturação, devido ao curto período de extração e também às baixas concentrações do analito na amostra. A concentração do analito na amostra (C_g) é considerada constante, visto que o tempo de extração é curto e existe suprimento constante do analito por convecção. Quando o polímero é exposto à amostra gasosa em movimento, uma interface (camada limítrofe) de espessura δ é gerada entre o polímero e a massa de ar. Os analitos são transportados da massa de ar até a superfície idealizada do polímero através desta camada limítrofe. A difusão do analito através desta interface é, geralmente, o passo limitante da velocidade de todo o processo de adsorção. A expressão para o cálculo da massa de analito extraída é dada na equação (20):

$$n = \frac{2\pi \cdot D_g \cdot L}{\ln\left(\frac{b + \delta}{b}\right)} \cdot C_g \cdot t \quad \text{equação (20)}$$

onde:

n : massa de analito extraído durante o tempo da amostragem

D_g : coeficiente de difusão molecular do gás

L : comprimento do polímero que recobre a fibra

C_g : concentração do analito na amostra gasosa

t : tempo da amostragem

b : raio externo do polímero que recobre a fibra

δ : espessura da camada limitrofe

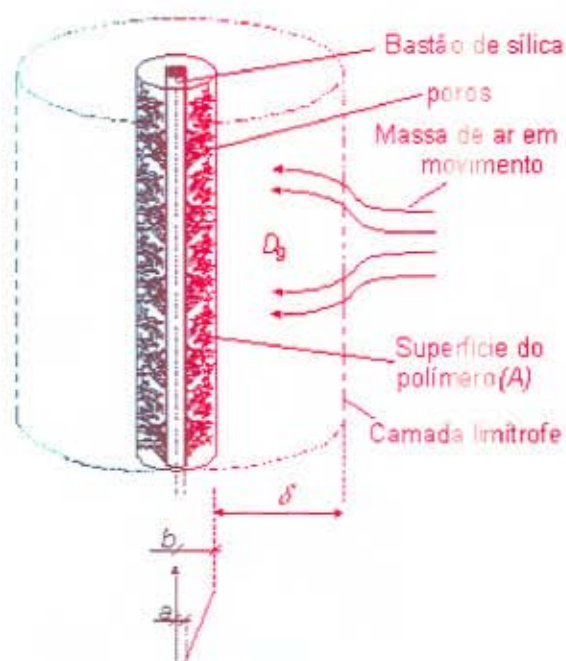


Figura 6. Esquema representativo de um corte de filme poroso.

Nota: a. diâmetro interno do filme polimérico; b. diâmetro externo do filme polimérico; δ . espessura da camada limitrofe; D_g . coeficiente de difusão molecular do gás.

A fundamentação teórica proposta para este processo está descrita de forma mais abrangente no artigo de Koziel e colaboradores.¹¹⁸ Trabalhos posteriores apresentam a aplicação deste modelo a amostras gasosas e líquidas.^{119,120}

Poucas aplicações das fibras sólidas à extração de voláteis de plantas ou de partes de plantas são encontradas na literatura, como por exemplo aroma de sementes frescas da planta alho (*Hua gabonii*)¹²¹ e aroma da fruta fresca e seca de *Tetrapleura tetraptera*.¹²² Outras aplicações podem ser citadas na área dos aromas: ácidos orgânicos do aroma de tabaco,¹²³ odores desagradáveis do óleo de hortelã,¹²⁴ estudo de possível mau odor em leite,¹²⁵ voláteis de morango¹²⁶ e de pasta de mostarda.¹²⁷ As demais aplicações encontram-se em variadas áreas: compostos fenólicos,¹²⁸ ftalatos¹²⁹ e aldeídos¹³⁰ em água, infoquímicos de insetos¹³¹⁻¹³³ e determinação de aldeídos para avaliação de atividade antioxidante,¹³⁴ entre outras.

De uma forma geral estes trabalhos realizam a extração com fibras mistas no tempo de equilíbrio ou próximo a este,¹³⁵ ao invés de optar por tempos de extração mais curtos, como foi feito no estudo de óleo de hortelã.¹²⁴

Uma das principais vantagens da HS-SPME no que tange a extração de voláteis de organismos vivos reside no fato de ela ser uma técnica não invasiva e também nos pequenos tempos de extração requeridos, permitindo a avaliação de seres vivos em várias etapas de suas vidas e/ou em distintas condições experimentais, sem a necessidade de danificá-los para a realização da extração. O perfil de emissão de VOC de organismos vivos freqüentemente é dependente do tempo e vinculado ao estado fisiológico da planta. Alguns destes compostos podem ser emitidos durante intervalos de tempo bastante curtos.¹³⁶ A maior parte dos métodos tradicionais requer longos tempos de coleta destes compostos, dificultando a sua aplicação ao monitoramento da emissão de VOC de plantas vivas.^{137,138} As fibras mistas, apresentam melhor performance do que as líquidas relativamente a compostos voláteis de uma forma geral,^{109,139} proporcionando o uso de tempos de extração extremamente curtos. Tais características tornam o uso destas fibras para extração de voláteis de plantas uma proposta interessante.

Poucos artigos são encontrados na literatura, nos quais a SPME é aplicada a plantas recém cortadas e/ou *in vitro* ou a plantas *in situ*. Dentre os trabalhos que tratam de voláteis de plantas *in situ*, temos: um estudo dos voláteis de ramos do abeto Fraser (*Abies fraseri*),¹¹³ de rosas e de jasmim⁸⁶ e de flores de *Boronia*.¹⁴⁰

Nestes artigos, foram utilizadas fibras recobertas com polímeros líquidos, majoritariamente PDMS. À exceção de um exemplo onde a fibra PDMS/DVB é utilizada para amostragem de voláteis de cipreste,¹²⁰ e deste trabalho,¹⁴¹ não há registro na literatura da aplicação de fibras sólidas porosas a voláteis de plantas *in situ*.

Este gap de conhecimento abre oportunidades para a investigação da potencialidade das fibras mistas, especialmente porque a HS-SPME apresenta características que se coadunam com a amostragem de organismos vivos.

De acordo com a literatura, os voláteis emitidos por partes que foram cortadas da planta ou por plantas danificadas podem ser bastante diferentes daqueles emitidos por uma planta intacta.^{142,143} As enzimas liberadas pela maceração de um tecido podem mudar rapidamente o perfil de compostos voláteis emitidos pela planta. Além disso, o comportamento das amostras biológicas é dinâmico, e no caso de plantas vivas pode ser alterado por fatores como condições de luminosidade, poluentes atmosféricos, temperatura ambiental e quantidade de água disponível.^{10,143,144}

Na Ecologia Química, os compostos voláteis são de grande importância devido aos múltiplos papéis que desempenham nos processos produtivos, na defesa contra predadores e na comunicação intra-espécies.¹⁴⁵ Durante a última década, o interesse em compostos infoquímicos tem crescido consideravelmente. Os sinais emitidos por organismos vivos utilizando compostos químicos são indispensáveis para a sobrevivência de muitos organismos, visto que são utilizados para transmitir informações tais como sexo, condições de reprodução, status social, parentesco, identidade, alarme, defesa, marcação de território e trilha.¹⁴⁵

5. INFOQUÍMICOS DE EUCALIPTOS

Infoquímico é um composto que, no contexto natural de relação entre dois indivíduos, leva informação que evoca no receptor uma resposta comportamental ou fisiológica. São também chamados de semioquímicos (do grego "σημειον", sinal ou marca).^{16,147} Os infoquímicos são classificados em feromônios e aleloquímicos.

O feromônio é um infoquímico que media uma interação entre dois organismos de uma mesma espécie, sendo que o benefício desta interação pode estar relacionado ao organismo emissor [(+,-)feromônio], ao receptor [(-,+)feromônio], ou a ambos [(+,+)feromônio].

O aleloquímico é um infoquímico que media uma interação entre dois organismos de espécies diferentes.

Alomônio: Aleloquímico que é pertinente à biologia de um organismo (organismo 1) e que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie (organismo 2), evoca no receptor uma resposta comportamental ou fisiológica que ajusta-se favoravelmente ao organismo 1, mas não ao organismo 2.

Cairomônio: Aleloquímico que é pertinente à biologia de um organismo (organismo 1) e que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie (organismo 2), evoca no receptor uma resposta comportamental ou fisiológica que ajusta-se favoravelmente ao organismo 2, mas não ao organismo 1.

Sinomônio: Aleloquímico que é pertinente à biologia de um organismo (organismo 1) e que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie (organismo 2), evoca no receptor uma resposta comportamental ou fisiológica que ajusta-se favoravelmente aos organismos 1 e 2.¹⁶

Estudos referentes a infoquímicos de eucaliptos são esparsos na literatura e são citados a seguir. Alguns eucaliptos são bem conhecidos por fenômenos alelopáticos (infoquímicos), como o da ausência de grama nas proximidades da árvore. Este fenômeno foi estudado por Nishimura e Mizutani, os quais verificaram uma relação entre 3,8-p-mentano-dióis extraídos do solo, as folhas de *E. citriodora* e sua idade ontogênica.¹² Muitos infoquímicos podem ser resultantes de processos de estresse biológico, químico ou físico. O di-hidroflavonol identificado como 7-metoxiaromadendrina foi encontrado na resina de *E. citriodora*, *E. tereticornis* e *E. globulus* e foi reportado como um composto de defesa de árvores enfermas destas espécies.¹⁴⁸

O caruncho do eucalipto, *Phorocantha semipunctata*, constitui-se numa das principais pragas na África, Europa e América.^{11;149} Análise do headspace de tiras de casca de árvores de *E. globulus* sadias e de outras infectadas mostraram diferenças na composição da mistura volátil composta por terpenos, indicando uma relação entre a fisiologia da planta e a composição do headspace.¹¹

Lixiviados aquosos de folhas de *E. globulus* apresentaram efeito inibitório no crescimento de 2 ervas daninhas e a possibilidade de utilizar esta atividade biológica como controle efetivo para estas ervas daninhas foi levantada pelos autores.¹⁵⁰ De acordo com Sarker e colaboradores, compostos presentes nos extratos de folhas e frutos de *E. saligna* podem influenciar a palatabilidade das folhas deste eucalipto relativamente a herbívoros.¹⁵¹ Recentemente, semioquímicos voláteis possivelmente envolvidos na seleção de árvores hospedeiras e na rejeição de árvores não hospedeiras foram identificados em *E. globulus*, *E. tereticornis* e *E. camaldulensis*.¹⁵²

6. *Litoria ewingi*

De acordo com o item anterior, estudos sobre infoquímicos de eucalipto são restritos a herbívoros. A literatura não aborda a relação do eucalipto com outros animais da cadeia alimentar. A "brown tree frog", *Litoria ewingi*, é uma das rãs mais comuns no sul da Austrália e devido à abundância de florestas de eucalipto naquele país, estes anfíbios vivem em locais onde o contato com as árvores de eucalipto é freqüente. Habitam perto de corpos d'água e escondem-se debaixo das folhas de eucalipto, no chão ou nos seus ramos. Quando perturbadas, as rãs normalmente fogem, contudo, se não for possível a fuga, elas apresentam um comportamento de defesa que inclui a emissão de um odor "verde".¹⁵³ Este odor pode variar de acordo com o local ou mesmo em diferentes períodos de amostragem.

Apesar do interesse que existe por parte da Ecologia Química em compreender o efeito das secreções voláteis no comportamento destes anfíbios e também suas interações com o meio ambiente, existem poucos estudos sobre os possíveis componentes responsáveis pelo odor destas secreções. A principal razão para isto é a dificuldade encontrada na amostragem destes compostos voláteis.¹⁵⁴

Historicamente, os semioquímicos têm sido amostrados usando-se os métodos convencionais de destilação e extração com solvente.^{155;156} Como já foi visto anteriormente, ambos são métodos destrutivos, ao mesmo tempo em que examinam a secreção presente por ocasião da morte do indivíduo, não permitindo a investigação das mudanças na assinatura química do mesmo ao longo do tempo.¹⁵⁷ Além disso, as razões entre os compostos voláteis obtidos por esses métodos geralmente não correspondem à razão dos voláteis emitidos enquanto o organismo está vivo.¹⁵⁸

O uso de extração do headspace no modo dinâmico é mais conveniente na amostragem de compostos emitidos por organismos vivos.^{155;158} Materiais adsorventes, aprisionamento criogênico e amostragem com ampolas ("canisters") seguida de dessorção térmica^{136;159} ou dessorção com solvente¹⁶⁰ são as técnicas mais empregadas para extração de voláteis. Algumas das limitações destes procedimentos já foram vistas em outros itens, entre elas produção de artefatos¹⁶¹ e retenção de água.¹⁶² Além disso, são procedimentos que demandam tempo e

trabalho intensivo, não sendo adequados para amostragem freqüente.¹⁶³ Os mesmos comentários tecidos anteriormente para a extração com solvente aplicam-se aqui, enquanto que o uso de dessorção térmica demanda investimento em equipamentos.

A técnica de SPME é uma alternativa conveniente relativamente aos métodos convencionais e tem sido aplicada recentemente a feromônios de insetos,¹⁶³⁻¹⁶⁷ quando se mostrou comparável à extração com solvente. A maior parte destes estudos utiliza SPME “de contato”, onde a fibra é friccionada na glândula ou cutícula exposta.^{163,166}

No caso das rãs, esta abordagem não é possível, pois haveria a liberação de proteínas, lipídeos e secreção mucogênica das glândulas integumentárias. Com base na literatura investigada, concluiu-se que não há estudos publicados de HS-SPME aplicada às emissões voláteis de *L. ewingi*, nem sobre a relação entre *E. dunnii* e *L. ewingi*, à exceção deste trabalho.¹⁵⁴

7. PROPOSTA PARA O ESTUDO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FOLHAS DE TRÊS ESPÉCIES DE EUCALIPTO UTILIZANDO-SE HS-SPME

7.1. ANÁLISE QUALITATIVA PRELIMINAR DO ÓLEO ESSENCIAL DE 3 ESPÉCIES DE EUCALIPTO

Várias amostras de folhas de *E. dunnii*, *E. citriodora* e *E. saligna* foram submetidas à hidrodestilação, de forma a obter-se os óleos essenciais de cada uma das espécies citadas para identificação dos compostos presentes nos mesmos através do uso de CG/ITMS. Nesta etapa, foram otimizadas as condições cromatográficas para análise destes óleos e foram investigados os rendimentos das hidrodestilações para cada espécie.

7.2. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE VOLÁTEIS DE FOLHAS PICADAS DE EUCALIPTO UTILIZANDO-SE HS-SPME

Para o desenvolvimento de um método de extração e análise do headspace de folhas de eucalipto picadas utilizando-se SPME, os seguintes parâmetros foram avaliados: temperatura, diferentes filmes poliméricos, perfil do tempo de extração, tipo de detector a ser empregado, uso de agitação, uso de amostrador automático, entre outros.

7.3. COMPARAÇÃO QUALITATIVA ENTRE OS COMPOSTOS VOLÁTEIS ENCONTRADOS NO HEADSPACE DAS FOLHAS DE EUCALIPTO PICADAS E NOS ÓLEOS HIDRODESTILADOS

Através de ambas as técnicas de extração empregadas com folhas de eucalipto (extração dos óleos essenciais através de hidrodestilação e extração dos voláteis do headspace das folhas picadas) foram obtidos compostos voláteis provenientes majoritariamente dos óleos contidos nos tricomas das folhas. Devido às diferenças inerentes a ambas as técnicas de extração, a comparação entre os resultados obtidos foi realizada com o intuito de verificar-se a presença de compostos que foram detectados apenas através de uma dos métodos. Objetivou-se com isto, melhor visualizar o potencial da técnica de HS-SPME/GC/ITMS para a detecção e identificação de compostos que porventura não sejam extraídos por técnicas convencionais e que desempenhem um provável papel biológico na folha viva.

7.4. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE VOLÁTEIS DE FOLHAS DE EUCALIPTO *in situ* UTILIZANDO-SE HS-SPME

Foi desenvolvido um método analítico para extração e análise qualitativa de voláteis emitidos por folhas de eucalipto *in situ*, utilizando-se HS-SPME e uma câmara de vidro especialmente construída para este fim. Este método foi testado em dois ambientes: na estufa de plantas e no laboratório, com o objetivo de verificar-se a possível influência da presença da luz natural, entre outros fatores, nas emissões das folhas de eucalipto e, também, de verificar a presença de compostos que desempenhem um provável papel biológico na planta viva.

7.5. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS EMITIDOS POR RÃS *Litoria ewingi*, *in vivo*.

Foi desenvolvido um método analítico para extração e análise qualitativa de voláteis emitidos por rãs *Litoria ewingi*, *in vivo*, utilizando-se diferentes filmes poliméricos no modo HS-SPME. Através do método desenvolvido, foi investigada uma possível relação ecológica entre as folhas de *E. dunnii* e as rãs *L. ewingi*, mediante a captação de compostos voláteis de eucalipto, por parte das rãs, através da dieta ou do contato dérmico com as folhas.

CAPÍTULO III
EXPERIMENTAL

1. ESCOLHA DAS ESPÉCIES DE EUCALIPTO

Três espécies de eucalipto foram selecionadas para este estudo. *E. dunnii* foi escolhido por ser uma espécie utilizada no processo de melhoramento genético e também porque o seu óleo essencial é rico tanto em monoterpenos como em sesquiterpenos, representando, portanto, tanto as espécies ricas em monoterpenóides como aquelas que contêm majoritariamente sesquiterpenos. Devido a estas características, foi utilizado em diversos experimentos genéricos, pois a composição do seu óleo propicia a observação de ambas as classes de compostos durante o processo de extração. Um exemplo disto são os experimentos realizados no desenvolvimento do método de extração de voláteis de folhas picadas. Além disso, no Brasil, esta é uma espécie em expansão em termos de plantio. *E. citriodora* foi escolhido devido ao seu alto teor em óleo essencial e *E. saligna* por ser uma espécie muito cultivada e também utilizada para fabricação de celulose no estado do Rio Grande do Sul.

2. AMOSTRAS

2.1. HIDRODESTILAÇÃO (HD)

Para os experimentos preliminares realizados no Instituto de Química da UFRGS, foram utilizadas folhas frescas dos eucaliptos de várias idades localizados nos hortos florestais da empresa Klabin Riocell S. A. Folhas adultas foram coletadas de forma aleatória por toda a extensão da copa da(s) árvore(s). Para os experimentos realizados na Universidade de Waterloo, 10 mudas de árvores de *E.*

citriodora, 10 de *E. saligna* e 5 de *E. dunnii*, foram transportadas para a Universidade de Waterloo e colocadas na estufa do Departamento de Biologia em vasos adequados. As HD foram realizadas com folhas coletadas aleatoriamente de árvore(s) cuja idade variou entre 7 a 22 meses.

2.2. HS-SPME DE VOLÁTEIS EMITIDOS POR FOLHAS PICADAS DE EUCALIPTOS

As folhas utilizadas nas HS-SPME foram coletadas sempre da mesma árvore das espécies *E. citriodora*, *E. dunnii* (duas árvores, neste caso) e *E. saligna*, da idade de 21 a 22 meses (de julho a agosto de 2000). Imediatamente após a coleta, as folhas eram picadas de acordo com o item 4 deste Capítulo. Neste mesmo período, folhas das mesmas árvores foram utilizadas para obtenção de óleos por HD para comparação qualitativa dos resultados obtidos através das duas técnicas. As folhas utilizadas são juvenis, isto é, são folhas comumente encontradas em árvores com menos de três anos de idade, dependendo isto de fatores endógenos e ambientais. Estas folhas podem estar totalmente expandidas ou parcialmente expandidas, isto é, podem ter crescido até o tamanho normal de uma folha adulta ou podem apresentar-se menores do que isto.¹⁶⁸ A Tabela II apresenta as características e o número de folhas que foi utilizado para HS-SPME e respectivas hidrodestilações.

2.3. HS-SPME DE VOLÁTEIS EMITIDOS POR FOLHAS DE EUCALIPTOS *in situ*

Nos experimentos preliminares foram utilizadas folhas de uma árvore de *E. dunnii* e duas árvores de *E. citriodora*. Para os experimentos realizados com câmara de vidro silanizado, galhos de *E. citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna* de 19 a 20 meses de idade (2ª quinzena de maio a junho de 2000) foram amostrados conforme Tabela III e item 5 deste Capítulo. Quando mais de um galho foi amostrado em uma árvore,

foram escolhidos galhos vizinhos em condição semelhante de desenvolvimento. Os galhos amostrados pesavam aproximadamente 1 g cada um. As amostragens foram feitas no laboratório e na estufa de plantas. Um medidor de luz modelo LI-189 número de série LM 1252, LI-COR, USA foi utilizado para as medidas de intensidade de luz.

Tabela II: Caracterização das folhas juvenis de eucalipto utilizadas para HS-SPME de folhas picadas e hidrodestilação.

	folhas de <i>E. citriodora</i>	descrição das folhas	folhas de <i>E. dunnii</i> A	descrição das folhas	folhas de <i>E. dunnii</i> B	descrição das folhas	folhas <i>E. saligna</i>	descrição das folhas
HD	HD1 HD2	todos os tipos todos os tipos		todos os tipos		todos os tipos		
SPME	A, B, C, D	4 totalmente expandidas e de tamanho semelhante	V, W	2 parcialmente expandidas	AH, AI, AJ, AK, AL	5 totalmente expandidas e de tamanho semelhante	AT, AU, AV	3 totalmente expandidas e de tamanho semelhante
	E	1 totalmente expandida	Y	1 totalmente expandida	AM e AN	2 parcialmente expandidas com manchas avermelhadas	AW, AX	2 parcialmente expandidas com manchas marrons
	F	1 parcialmente expandida com 2 manchas marrons	X, Z	2 totalmente expandidas e de tamanho semelhante	AO, AP, AQ, AR, AS	5 totalmente expandidas e de tamanho semelhante	AY, AZ, BA, BB, BC	5 totalmente expandidas e de tamanho semelhante
	G, H	2 parcialmente expandidas com 4 manchas marrons	AA, AB, AC, AD, AE,	5 totalmente expandidas e de tamanho semelhante			BD, BE, BF, BG, B H	5 folhas totalmente expandidas e de tamanho semelhante
	I, J, K, L, M	5 totalmente expandidas	AF, AG	2 totalmente expandidas e vizinhas				
	N	1 totalmente expandida verde claro						
	O, P	2 parcialmente expandidas com manchas						
	Q, R, S, T, U	5 totalmente expandidas e de tamanho semelhante						
TOTAL de folhas	21: 16 totalmente e 5 parcialmente expandidas com manchas		12: 10 totalmente e 2 parcialmente expandidas		12: 10 totalmente e 2 parcialmente expandidas		15: 13 totalmente e 2 parcialmente expandidas	

Tabela III. Condições experimentais utilizadas durante as amostragens de VOC de folhas juvenis de eucaliptos *in situ*.

espécies	<i>E. citriodora</i>		<i>E. saligna</i>		<i>E. dunnii A</i>		<i>E. dunnii B</i>
	danificada	não danificada	danificada	não danificada	não danificada	danificada	danificada
ESTUFA							
nº de dias de amostragem	3	-	3	-	2	1	3
ΔT (°C)	24-36	-	22-35	-	20-32	19-29	22-35
nº de folhas amostradas	3 totalmente e 3 parcialmente expandidas		7 totalmente expandidas		6 totalmente expandidas		4 totalmente expandidas
LABORATÓRIO							
nº de dias de amostragem	3	3	3	3	-	-	-
ΔT (°C)	25-26	25	24-26	24-27	-	-	-
nº de folhas amostradas	5 totalmente e 5 parcialmente expandidas		7 totalmente expandidas		-	-	-

2.4. HS-SPME DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS EMITIDOS POR RÃS *Litoria ewingi* *in situ*

Doze rãs coletadas ao longo do rio Murray em Mannum ao sul da Austrália foram transportadas via aérea, após um mês de quarentena, para o Departamento de Química da Universidade de Waterloo em Ontário, Canadá. Estes animais foram alojados em aquários de plástico (400 x 210 x 260 mm) forrados com papel toalha umedecido com água destilada/deionizada. No laboratório, o fotoperíodo foi de 16:8 claro:escuro. A temperatura do laboratório foi mantida em 23 °C. As rãs foram alimentadas com grilos fornecidos pelo Departamento de Zoologia da Universidade de Guelph em Ontário.

3. HIDRODESTILAÇÃO COM CLEVINGER

A hidrodestilação foi realizada utilizando-se um Clevenger modificado como mostra a Figura 7.^{169,170} Aproximadamente 300 g de folhas frescas e 1 L de água destilada/deionizada foram introduzidos no balão de vidro em cada extração. Uma balança eletrônica modelo FX-6000 foi usada para pesar as folhas de eucalipto.

O tempo total de extração foi de 5 horas a partir do início da ebulição. O sistema de refrigeração dos vapores foi mantido entre - 4 °C e 4 °C utilizando-se uma mistura de 15% etileno glicol e água para minimizar a perda de compostos voláteis.¹⁷¹ Um funil foi confeccionado para auxiliar a rápida entrada das folhas no balão de destilação. Ele constituiu-se em um erlenmeyer invertido onde foi adaptada uma entrada de vidro esmerilhado para encaixe no balão de vidro (boca 45/50). Uma redução de 45/50 para 24/40 foi adaptada ao conjunto para montagem do Clevenger. O óleo obtido foi seco com Na₂SO₄ anidro.

As densidades dos óleos de *E. dunnii* e *E. citriodora* foram estimadas através de uma única medida, no intervalo de temperatura de 23 °C a 25 °C, utilizando-se um picnômetro de 1 mL. O valor de densidade obtido para *E. dunnii* foi o mesmo utilizado para *E. saligna*. A umidade das folhas foi estimada através de secagem na estufa a 70 °C (± 5 °C) até peso constante.¹⁷² O pH da água contendo folhas de eucalipto ficou entre 4 e 5 ao final das hidrodestilações e foi medido com papel indicador. A estufa utilizada para secagem das folhas foi "Stabil-Therm Gravity oven" (Blue M. Electric Company, Blue Island, Illinois, EUA).

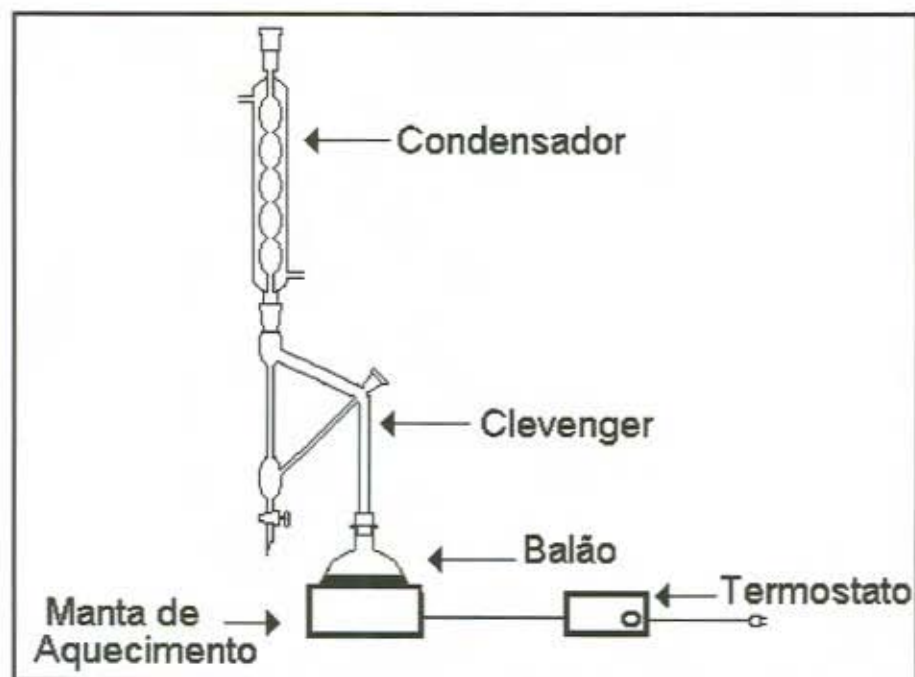


Figura 7. Representação esquemática do Clevenger modificado utilizado para as hidrodestilações de folhas de eucalipto.

4. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA APLICADA À EXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS DE FOLHAS DE EUCALIPTO PICADAS

Nos experimentos preliminares de escolha do filme polimérico e adição de solução tampão foram utilizadas 0,05 g de folhas picadas de *E. dunnii* A, frascos âmbar de 4 mL, tempo de extração de 1 min e uma temperatura de 24 °C. Os filmes poliméricos testados foram: PDMS 100 µm, 30 µm, 7 µm, PA, PDMS/DVB. O filme PDMS 7 µm foi escolhido para a realização de todo o estudo relacionado ao headspace das folhas picadas. Para verificação de possíveis diferenças qualitativas causadas pela adição de 1 mL da solução tampão de fosfato 0,025 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) às folhas, foram usadas PDMS 30 µm, 31 °C, sendo as demais condições experimentais idênticas às descritas acima.

Os 5 experimentos realizados para investigação do comportamento dos GLV foram também feitos nas condições descritas acima, havendo uma variação de temperatura entre os experimentos de 23 °C a 25 °C. O headspace foi amostrado em diferentes intervalos de tempo durante 24 h após a coleta das folhas.

O emprego de agitação foi testado tanto com frascos de 4 mL como de 10 mL. Várias velocidades foram testadas, desde 300 rpm até 1000 rpm.

Foram testadas várias quantidades de folhas picadas desde 0,05 g até 2,00 g em frascos de 10 mL e de 20 mL.

O procedimento de preparo da amostra foi o seguinte: após a coleta, as folhas foram imediatamente cortadas em pedaços de aproximadamente 5 mm², utilizando-se uma tesoura de aço inoxidável, e 0,05 g de folhas picadas foram colocadas dentro de frascos de 10 mL. A balança analítica empregada foi uma Sartorius modelo E2000D –V40. Dois mililitros de solução tampão de fosfato 0,025 M com pH 7,0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) foram adicionados à cada amostra e a seguir os frascos foram fechados com septo e tampa metálica sob pressão. O tempo necessário para todo este procedimento variou entre 20 e 30 min. Após

aproximadamente 24 h a 30 °C, a extração dos compostos voláteis presentes no headspace destas folhas foi feita por 30 min, utilizando-se PDMS 7 μm . Durante o preparo da amostra e extração, os frascos foram mantidos fora do alcance da luz através do uso de papel alumínio. A Figura 8 mostra como foram feitas as extrações dos voláteis de folhas de eucalipto utilizando-se SPME.

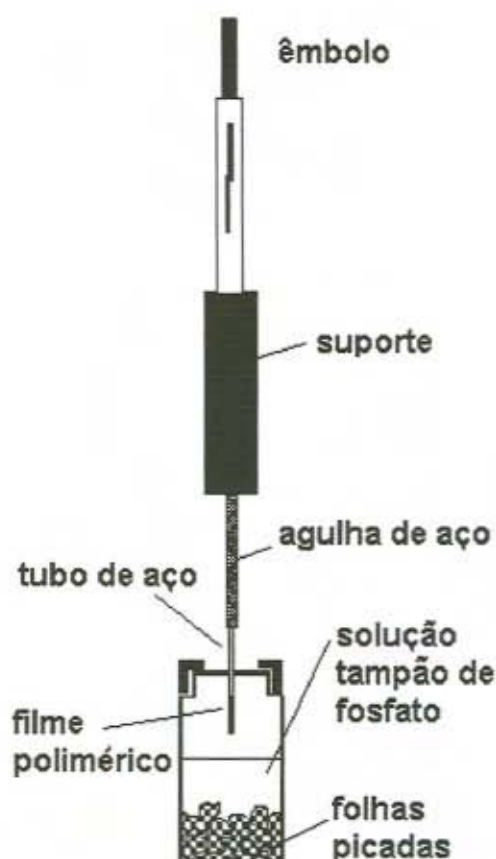


Figura 8. Representação esquemática da amostragem de compostos voláteis presentes no headspace de folhas picadas de eucalipto, empregando-se SPME.

Nota: a representação não está em escala.

O tempo de dessorção geralmente reportado na literatura para compostos semelhantes aos dos óleos de eucalipto varia entre 30 s e 5 min a uma temperatura de 200 °C e 5 min a 250 °C.^{51,103,140,173} Neste trabalho, a fibra permaneceu no bloco

do injetor por 30 min a cada análise, sendo, depois, colocada no interior de um frasco vazio de vidro de 4 mL até a extração seguinte.

Os seguintes tempos de extração foram escolhidos para verificação do perfil de extração em função do tempo (referido em outros pontos deste trabalho, resumidamente, como perfil do tempo de extração): 1, 5, 15, 30, 45 e 90 min. Duas folhas adultas da árvore A de *E. dunnii* foram preparadas conforme descrito anteriormente. As duas folhas picadas foram homogeneizadas e porções de 0,05 g foram igualmente distribuídas em 6 frascos. Este procedimento foi repetido 3 vezes utilizando-se PDMS 7 μm e outras 3 vezes usando-se folhas pulverizadas e a mesma espessura de filme polimérico. A pulverização foi feita em gral de aço inox resistente a baixas temperaturas, empregando-se nitrogênio líquido e gelo seco. Outras 3 repetições foram realizadas, utilizando-se folhas picadas de *E. dunnii* A e PDMS 30 μm .

A linearidade do detector ITMS foi verificada na faixa de 5 ng a 500 ng, utilizando-se soluções hexânicas de 1000 mg L⁻¹, 600 mg L⁻¹, 400 mg L⁻¹, 200 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹.

As análises preliminares dos voláteis extraídos do headspace das folhas das três espécies de eucalipto (*E. dunnii*, *E. citriodora* e *E. saligna*) foram feitas manualmente, e, as outras, posteriormente, utilizando-se o amostrador automático CombiPal (CTC Analytics, Basileia, Suíça – Figura 9).

Quando as extrações e as análises foram realizadas com o amostrador automático, o alcance da agulha no frasco foi de 31 mm e no injetor de 54 mm.

Para comparação qualitativa dos resultados obtidos empregando-se PDMS 30 μm e PDMS 7 μm , 5 folhas adultas da mesma árvore de *E. citriodora*, 5 folhas de *E. dunnii* A e outras 5 de *E. dunnii* B foram submetidas ao procedimento descrito. Duas amostras de cada folha foram submetidas a extração e análise utilizando-se estes dois filmes poliméricos.

Durante todas as extrações, a temperatura foi controlada através do uso de um bloco de aquecimento (Multiblock Labline Instruments Inc., USA) ou com um controlador de temperatura do robô auto-amostrador CombiPal.

A repetibilidade dos experimentos realizados com folhas picadas foi avaliada utilizando-se 2 folhas totalmente expandidas de *E. dunnii*, cujos pedaços picados foram distribuídos entre 5 frascos e submetidos ao procedimento acima descrito.

Considerando-se as áreas sob os picos cromatográficos, o desvio padrão relativo obtido para 80% dos picos foi menor do que 20%. As extrações das folhas da Tabela II foram feitas em triplicata ou duplicata. Quando o tamanho da folha era muito pequeno, (folhas parcialmente expandidas) não havendo material suficiente para 2 extrações, apenas uma foi realizada.

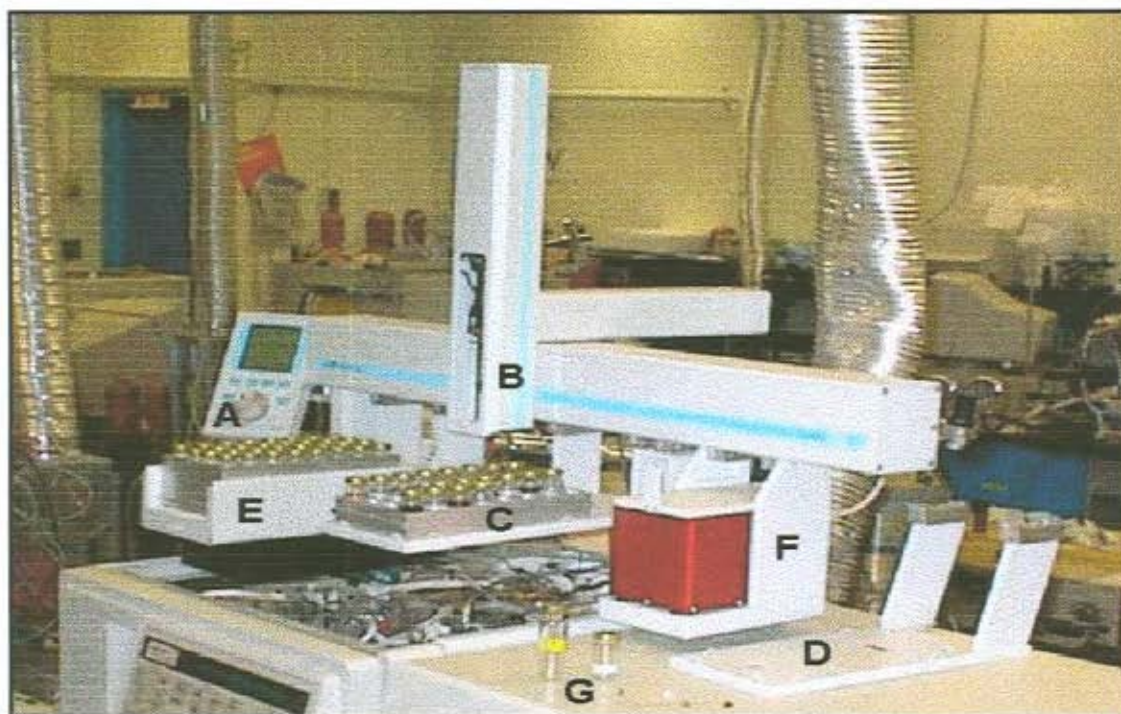


Figura 9. Vista do amostrador automático Combipal. (A) unidade de programação manual, (B) peça móvel da unidade robótica, (C) suporte para frascos de 10 mL; (D) suporte para frascos de 20 mL, (E) suporte para frascos de 10 ou 20 mL provido de resfriador Peltier, (F) unidade de controle de agitação e temperatura de extração, (G) frascos de 10 e 20 mL para extração de voláteis e dois conjuntos de fibras de SPME.

5. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA APLICADA À EXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS DE FOLHAS DE EUCALIPTO *in situ*

As fibras recobertas com PDMS/DVB 65 μm , CAR/PDMS 75 μm , PA 85 μm e PDMS 100 μm foram utilizadas nas amostragens *in situ* dos voláteis de folhas de eucalipto e das rãs *L. ewingi*. Tanto as fibras de SPME como o suporte para as mesmas foram adquiridos da Supelco (Oakville - ON, Canada). Antes da utilização, as fibras foram condicionadas de acordo com as especificações do fornecedor.

5.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES REALIZADOS COM EUCALIPTOS *in situ*

Estes experimentos foram todos realizados na estufa de plantas, sem utilização de nenhum equipamento auxiliar, conforme Figura 10. As fibras listadas anteriormente foram aproximadas o máximo possível do tecido de uma folha por intervalos de 10 min. O tempo de dessorção foi de 7 min. Cada fibra foi exposta separadamente a uma única folha e as repetições foram feitas em folhas vizinhas na mesma árvore e galho. Experimentos posteriores empregaram apenas fibras recobertas com polímeros porosos (PDMS/DVB e CAR/PDMS). Inicialmente, CAR/PDMS foi testada com folhas de *E. citriodora* utilizando-se 10 min como tempo de extração, seguindo-se o experimento, onde ambas as fibras sólidas foram expostas simultaneamente à atmosfera próxima a uma folha mecanicamente danificada (20 orifícios). O dano mecânico consistiu em vários orifícios no tecido vegetal realizados através do uso de uma agulha de aço inoxidável. Os analitos adsorvidos foram imediatamente dessorvidos e cromatografados de acordo com as condições descritas no item 6 deste Capítulo.



Figura 10. Técnica utilizada durante experimentos preliminares de amostragem de voláteis emitidos por folhas de eucalipto.

5.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS COM EUCALIPTOS *in situ* UTILIZANDO-SE CÂMARA DE VIDRO

A fim de facilitar a extração de compostos voláteis emitidos por folhas de eucalipto *in situ*, uma câmara de vidro foi desenhada e montada (Figura 11). A câmara consiste em um cilindro de vidro Pyrex (120 mm de comprimento e 60 mm de diâmetro) onde as folhas de eucalipto podem ser inseridas através de um dos orifícios terminais. Depois da introdução da folha, o orifício é selado com fita Teflon. Uma tampa redonda de vidro esmerilhado nas extremidades sela a outra extremidade da câmara através de 4 grampos de pressão distribuídos simetricamente. As bordas esmerilhadas da tampa são recobertas por fita Teflon. Esta tampa tem 5 orifícios de 5 mm de diâmetro selados com septos pré-perfurados Thermogreen LB-1, por onde a fibra de SPME é introduzida para

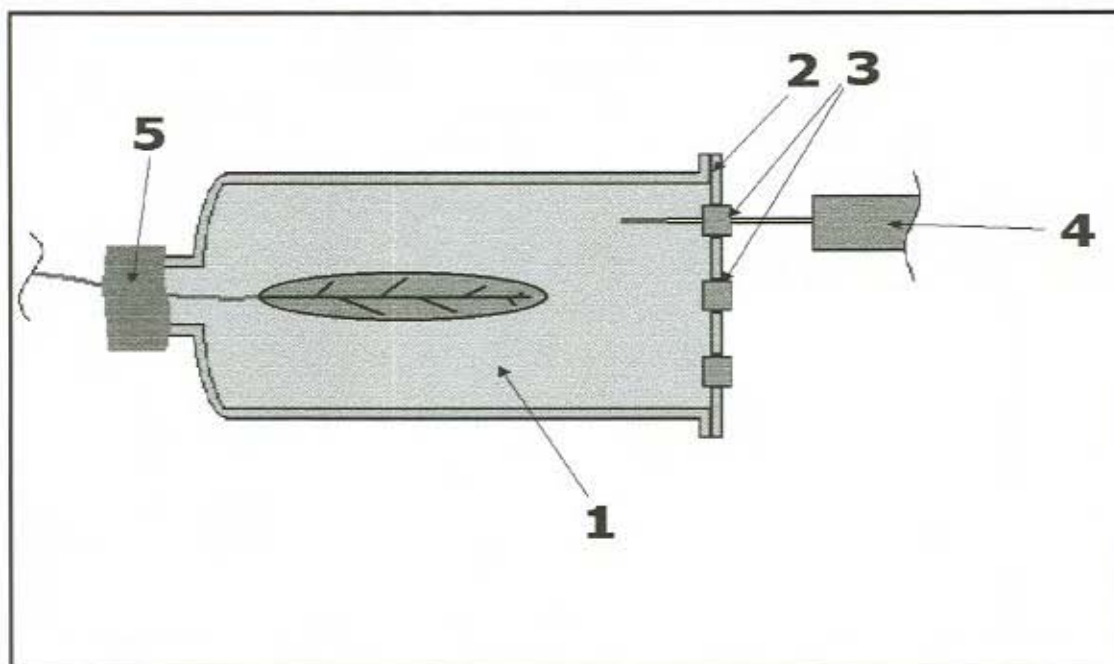


Figura 11. Desenho representativo da câmara de vidro para a extração de voláteis de folhas de plantas *in situ*. 1=corpo cilíndrico de vidro silanizado; 2=tampa de vidro silanizado; 3=orifícios para amostragem ocupados por septos de Thermogreen LB-1; 4=suporte e fibra de SPME; 5= selo de fita.



Figura 12. Amostragem dos voláteis emitidos por *E. dunnii* dentro da câmara de vidro silanizado.

amostragem do ar no interior da câmara logo acima da superfície da folha. Todas as partes da câmara de vidro foram silanizadas. A Figura 12 apresenta a amostragem sendo realizada na atmosfera ao redor de folhas de eucalipto dentro da câmara de vidro. Imediatamente após a introdução do galho de eucalipto na câmara, o ar no interior da mesma foi amostrado por 1 min usando-se PDMS/DVB. Este procedimento de amostragem foi efetuado a cada 30 min continuamente por intervalos de 8 a 10 h, mantendo-se a câmara de vidro selada. Nos casos em que houve dano mecânico, antes de selar a câmara, foram feitos 6 orifícios de aproximadamente 2 mm em 1 folha, utilizando-se uma agulha de aço inoxidável, de forma a simular as lesões causadas por insetos. Os 6 orifícios foram posicionados em 2 filas ao longo da folha. Depois de realizado o dano mecânico, a câmara foi imediatamente selada e a amostragem procedeu de forma idêntica ao descrito anteriormente.

O perfil de emissões voláteis de galhos das 3 espécies de eucalipto foi monitorado na estufa de plantas (ambiente sujeito à luz solar e às variações naturais de temperatura de 19 a 36 °C) e/ou no laboratório (ambiente provido de iluminação artificial fluorescente e temperatura controlada de 25 a 26 °C), conforme Tabela III. Diariamente, antes da introdução das folhas na câmara, foi feita a amostragem do ar no interior da câmara de maneira idêntica ao realizado nas amostragens da folha, de forma a verificar a presença de artefatos ou contaminação por analitos anteriormente amostrados. Além disso, corridas em branco da coluna cromatográfica e da fibra foram realizadas diariamente antes do início dos trabalhos. Para as amostragens feitas na estufa de plantas, o transporte das fibras até o laboratório foi feito mantendo-se as fibras em gelo seco. O intervalo de tempo entre a amostragem e a análise nunca excedeu 5 min. Nestas condições, espera-se que a perda de analitos seja insignificante.¹⁷⁴

5.3. EXPERIMENTOS PRELIMINARES COM *L. ewingi*

Cada rã (de um total de 12) foi colocada em um frasco de vidro transparente de 15 mL, no qual um gancho de aço inoxidável foi inserido para impedir o movimento do anfíbio, impedindo-o de entrar em contato com a fibra, contudo, sem

machucá-lo (Figura 13). Antes da amostragem, uma leve pressão é aplicada aos rins da rã de forma a esvaziá-los. Imediatamente após a introdução da rã no frasco, este é vigorosamente agitado por 10 a 20 segundos para estimular a liberação da secreção associada aos compostos voláteis. O headspace foi amostrado simultaneamente por 3 fibras: 1 min de amostragem para PDMS/DVB e 10 min para PDMS e CAR/PDMS. Imediatamente após a amostragem, a fibra de PDMS foi inserida no injetor e as outras duas foram armazenadas em gelo seco até o momento da análise. Antes de cada experimento, o headspace do frasco vazio foi amostrado de acordo com o mesmo procedimento utilizado para as rãs, servindo como branco. Brancos como este foram feitos também nos experimentos seguintes (itens 5.3.1 e 5.3.2 deste Capítulo).

Para verificar as emissões voláteis das rãs durante o estado de repouso, foi realizado um experimento no Departamento de Biologia Ambiental na Universidade de Adelaide, onde as rãs foram colocadas por 2 h em tubo de vidro quadrado (3 cm x 3 cm x 10 cm) fechado nas extremidades com tela de arame de aço inoxidável e colocado sobre papel toalha umedecido. Depois de um período de aclimação de 2 horas, as rãs geralmente posicionavam-se em um dos cantos do tubo. A partir daí, o tubo era virado cuidadosamente para a posição horizontal e a fibra de SPME inserida para amostragem do ar logo acima do anfíbio.

Para controle da alimentação das rãs, 3 grilos foram macerados com espátula dentro do mesmo tipo de frasco usado com as rãs e a amostragem do headspace foi feita de forma idêntica à das rãs. A alimentação dos grilos foi de farinha de cereais, alface e cenoura.

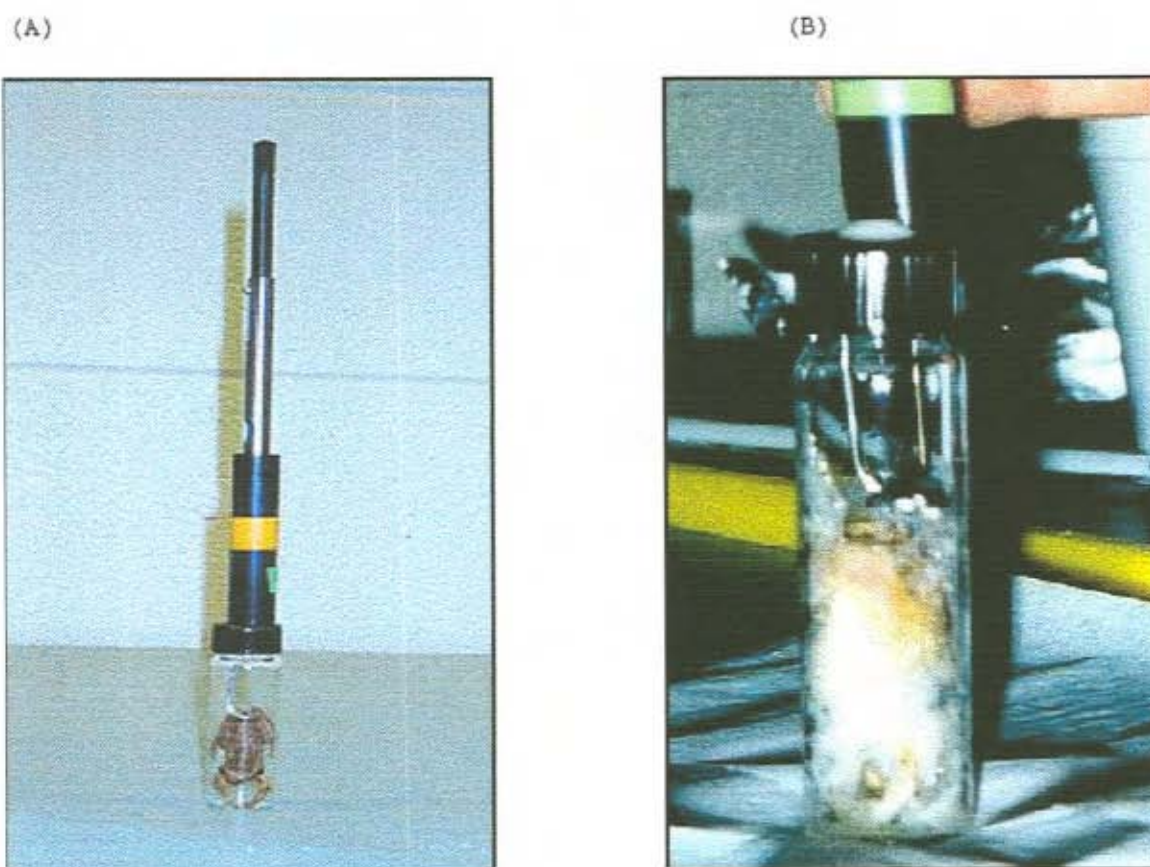


Figura 13. Amostragem de compostos voláteis emitidos pela rã *L. ewingi* inserida em um frasco, utilizando HS-SPME. (A) vista do suporte e da fibra inserida no frasco contendo a rã. (B) vista da amostragem sendo realizada após estimulação do anfíbio.

5.3.1-Dieta com limoneno e eucaliptol

Pelo período de 1 mês, 2 conjuntos de 4 rãs foram colocados cada um em uma dieta alimentar: limoneno ou eucaliptol. As rãs participantes destes experimentos foram as mesmas que haviam secretado exaustivamente no

experimento descrito no item 5.3 deste Capítulo, assegurando o esvaziamento de seus estoques glandulares. Cada conjunto de rãs foi colocado em um aquário diferente isolado um do outro. A cada 3 dias, as rãs dos respectivos tratamentos foram alimentadas com 1 a 2 grilos nos quais havia sido injetado 0,5 mL de emulsão aquosa de limoneno ($1,2 \text{ mg mL}^{-1}$) e eucaliptol ($2,1 \text{ mg mL}^{-1}$). As doses de limoneno e eucaliptol foram calculadas com base nos valores de LD_{50} oral para ratos e aos quais foi aplicado um fator de segurança de 100 para compensar diferenças entre a fisiologia de anfíbios e mamíferos.

5.3.2- Ambiente com folhas de *E. dunnii*

Outras 4 rãs provenientes do experimento descrito no item 5.3 deste Capítulo foram colocadas em um aquário contendo ramos de uma árvore de aproximadamente 1 ano de *E. dunnii* durante 1 mês. Os ramos anteriores eram substituídos por outros recém colhidos uma vez por semana por ocasião da limpeza do aquário. Um dia antes da amostragem, as folhas de eucalipto foram retiradas do aquário e este foi lavado com água, juntamente com as rãs. Antes da amostragem, as rãs foram novamente lavadas com água e deixadas em repouso por 5 min. A fim de comparar os compostos voláteis emitidos pelas rãs e aqueles existentes no óleo das folhas de *E. dunnii*, 0,5 μL de uma solução de 100 mg L^{-1} de óleo obtido por HD das folhas da mesma árvore de *E. dunnii* foi analisado nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para os voláteis das rãs.

6. ANÁLISE POR GC/FID E GC/ITMS

As análises cromatográficas foram realizadas em um GC 3400/ITMS Saturn 4D (Varian Associates, Sunnydale, CA) equipado com uma coluna HP-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Agilent, Avondale, PA, USA), injetor SPI (injetor com purga de septo), gás de arraste hélio pureza TAG (Praxair, Kitchener – ON, Canada). A Tabela IV lista as condições operacionais utilizadas na separação cromatográfica e detecção.

As condições utilizadas para as análises cromatográficas realizadas em um GC 3400 Cx/FID (Varian Associates, Sunnydale, CA), também equipado com um injetor SPI, são as mesmas descritas para as análises de óleos de eucalipto na Tabela IV, com exceção da vazão do gás de arraste nitrogênio de alta pureza que foi de 1,2 mL min⁻¹. A temperatura empregada no FID foi 250 °C.

A identificação dos compostos detectados nos óleos de eucalipto ou na atmosfera ao redor de folhas foi realizada através da comparação com os espectros de massas da biblioteca construída pela injeção de compostos padrão sob as mesmas condições de análise dos compostos desconhecidos e também através da comparação com espectros de massas das bibliotecas NIST92, NIST98 e da biblioteca que acompanha o GC/ITMS Saturn 2000 (Varian Associates, Sunnydale, CA) e dados da literatura.¹⁷⁵ Os compostos octano, acetato de citronelila e eicosano foram usados como marcadores no cromatograma, para os casos em que foi necessária a correção dos tempos de retenção.^{62,175} Para identificação dos picos majoritários e minoritários foram injetados 0,5 μ L de soluções de concentração desde 100 mg L⁻¹ até 1%, conforme a necessidade. Os reagentes foram obtidos das empresas Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO 63178 USA), Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, WI 53201). Quando necessário, as identificações foram confirmadas pelos dados de retenção dos compostos em estudo nas colunas HP-Innowax 30 m x 0,25 mm x 0,50 μ m e/ou HP-1MS 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Agilent, Avondale, PA, USA). Os demais compostos foram tentativamente identificados através do cálculo de índices de retenção com programação linear de temperatura

(LTPRI). Estes índices foram obtidos pela análise cromatográfica de uma solução hexânica contendo os hidrocarbonetos lineares desde 10 carbonos até 25 carbonos (0,5 µL de solução hexânica de 100 mg L⁻¹), juntamente com a análise dos óleos hidrodestilados das três espécies de eucalipto em estudo.¹⁷⁶ Os resultados obtidos foram comparados aos da literatura.^{1,58;99;106;177-182}

Os espectros de massas obtidos foram geralmente utilizados como TIC (do inglês "total ion chromatogram"), exceto para o caso do citronelal nas análises de voláteis de *E. citriodora in situ*, onde foram considerados apenas os íons 67, 95 e 121, devido à interferência dos picos de sangramento do filme polimérico da SPME.

Tabela IV. Condições operacionais para separação cromatográfica e detecção de compostos de óleos voláteis de folhas de eucaliptos e voláteis de rãs, utilizando-se a coluna cromatográfica HP-5MS.

Cromatografia a Gás	
programa de temperatura para óleos de eucalipto e voláteis de folhas picadas	60 °C → 5 °C/min → 280 °C
programa de temperatura para voláteis de eucalipto <i>in situ</i>	50 °C(1 min) – 1 °C/min – 60 °C – 30 °C/min – 280 °C
programa de temperatura para voláteis de rã <i>in situ</i>	40 °C(1 min) – 5 °C/min -110°C – 20 °C/min - 250°C
programa de temperatura do injetor SPI para óleos de eucalipto	60 °C → velocidade máxima → 280 °C
temperatura do injetor SPI para dessorção de fibras de SPME.	210 °C para PDMS/DVB, 260 °C para CAR/PDMS, 250 °C para PDMS, 80 °C → velocidade máxima → 250 °C para injeção óleos de eucalipto
vazão do gás de arraste	1.5 mL min ⁻¹
Espectrometria de massas de aprisionamento de íons	
temperatura da câmara de íons	150 °C
temperatura da interface	240 °C (250 °C para voláteis de rã)
faixa de massa da varredura	40 m/z a 300 m/z
freqüência da varredura	8 varreduras s ⁻¹
voltagem da fotomultiplicadora (otimizada diariamente)	1710 a 1860 V no caso dos voláteis de eucalipto <i>in situ</i> e de folhas picadas, 1600 a 1620 V no caso dos voláteis de rã.
modulação axial	4
corrente do filamento	25 µA

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. HIDRODESTILAÇÃO COM CLEVINGER

Neste trabalho, a hidrodestilação é utilizada como método convencional para comparação qualitativa entre os óleos hidrodestilados e os voláteis extraídos do headspace de folhas picadas através de HS-SPME.

Durante os primeiros experimentos foram feitas algumas tentativas para acelerar o processo de hidrodestilação (HD) e/ou minimizar a perda de compostos voláteis na etapa de introdução das folhas no balão, entre elas, maceração das folhas com nitrogênio líquido e introdução das folhas inteiras ou picadas. A opção escolhida como melhor, por tornar o processo mais simples e fácil, foi aumentar o tamanho da entrada do balão de destilação de 24/40 para 45/50, de forma a facilitar a entrada das folhas inteiras através de um funil confeccionado especialmente para este fim.

Os rendimentos obtidos em algumas hidrodestilações de folhas de *E. citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna* estão na Tabela V. Para os cálculos de rendimentos, utilizaram-se os valores de densidade estimados com picnômetro (23 °C a 25 °C), os quais se mostraram concordantes com os dados apresentados na literatura a 23 °C¹⁷¹. A densidade obtida para o óleo de *E. citriodora* foi 0,86 g mL⁻¹ e para o óleo de *E. dunnii* 0,90 g mL⁻¹. O valor encontrado na literatura para a densidade do óleo de eucalipto (sem especificar a espécie) foi de 0,91 g mL⁻¹ e para *E. citriodora* 0,90 g mL⁻¹.¹⁷¹ Os óleos obtidos nas primeiras hidrodestilações foram utilizados para identificação de compostos e verificação de rendimento do processo.

De acordo com a literatura, o rendimento dos óleos de eucalipto varia de zero a 6% sobre a massa das folhas frescas.²

Os rendimentos obtidos encontram-se dentro dos valores apresentados na literatura para *E. citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna*.^{6,15,53,54,56,180,183-194} Para este último, contudo, são encontrados dois artigos na literatura que reportam rendimentos maiores do que os obtidos experimentalmente neste trabalho, conforme Tabela V.

Tabela V - Rendimentos obtidos nas hidrodestilações de três espécies de eucalipto.^a

Óleo	HD	Experimental		referência da literatura	Literatura		Obs.
		Rendimento sob folhas frescas (%)	Rendimento sob folhas secas (%)		Rendimento sob folhas frescas (%)	Rendimento sob folhas secas (%)	
<i>E. citriodora</i>	1	0,9	1,8	188		1,05	
	2	1,3	2,8	187	1,0		
<i>E. dunnii</i>				77		1,3	
	3	1,2	—	189	0,9 – 1,5		b
	4	0,6	1,6	190	1,7		b
	5	1,0	—	77		0,6	
	6	0,7	2,1	15	0,9-2,1		
	7	1,3	1,4				
	8	0,7	1,5				
<i>E. saligna</i>	9	0,5	1,2				
	10	0,1	—	192	1,2		c
	11	0,2	—	6	0,1		d
	12	0,1	0,3	180	0,2-0,3		c
	13	0,2	0,6	193	0,1-0,2		d
	14	0,4	0,6	193	0,2-0,4		d
	15	0,2	0,6	194		1,5	e
	16	0,2	0,6	188		0,4	
			15	0,3-0,5			
			187	0,6			

Notas: a. cálculo de rendimento com base no peso das folhas e do óleo (p/p); b. rendimento calculado como p/v; c. rendimento p/p sem especificar se são folhas frescas ou secas; d. método de cálculo do rendimento não está disponível; e. rendimento sobre folhas secas, sem especificar se é p/p, p/v ou v/v.

As identificações dos compostos dos óleos das três espécies de eucalipto foram realizadas conforme descrição feita no item 5 do Capítulo 3. Nos casos em que não foi possível chegar-se a uma tentativa de identificação do composto, este foi considerado “não identificado” (ni) ou o grupo químico ao qual pertence foi listado na Tabela VI. A partir deste ponto da apresentação dos resultados, a numeração empregada para designação dos compostos de eucalipto será a que consta na Tabela VI.

Foram detectados 57 compostos no óleo de *E. citriodora*, 59 no óleo de *E. dunnii* e 58 no de *E. saligna*, os quais se encontram listados na Tabela VI em ordem de eluição na coluna cromatográfica HP-5MS. Os compostos geralmente presentes em maior abundância em *E. citriodora* foram também encontrados neste trabalho: citronelal e citronelol.¹⁵ No caso de *E. dunnii*, os picos majoritários no perfil cromatográfico confirmam as informações da literatura: eucaliptol, seguido de α -pineno, α -terpineol, globulol.^{15,77,189,190} O cromatograma da solução hexânica do óleo de *E. saligna* mostra α -pineno como componente principal, seguido de compostos como eucaliptol, γ -terpineno, α -terpineol e p-cimeno. A literatura apresenta o α -pineno como um dos componentes principais dos óleos de *E. saligna*, sendo os demais componentes destes óleos bastante variáveis.^{188,192,195}

A Figura 14 mostra o cromatograma obtido com o óleo de *E. citriodora* e as Figuras 14A e 14B ampliam a parte inicial e final do cromatograma. De forma semelhante, as Figuras 15, 15A, 15B e 16, 16A, 16B apresentam o perfil cromatográfico obtido com os óleos de *E. dunnii* e *E. saligna*, respectivamente. Os números que designam os compostos estão listados na Tabela VI. As Figuras 14 a 16 foram obtidas da injeção de 0,5 μ L de uma solução hexânica 1000 mg L⁻¹ de óleo com exceção das Figuras 15A e B onde foi feita a injeção de 0,5 μ L de uma solução hexânica 1% de óleo. Esta última solução foi empregada porque apresentou com maior clareza os picos dos compostos minoritários da mistura oleosa. A razão de ser dos compostos que estão designados por números sublinhados será discutida no item 3.3 deste Capítulo.

Tabela VI: Compostos encontrados no headspace de folhas picadas ou nos óleos hidrodestilados de folhas inteiras de três espécies de eucalipto e suas abundâncias relativas, listados por ordem de eluição na coluna cromatográfica HP-5MS.

composto	PM	dados de retenção ⁷⁵	<i>E. citriodora</i>		<i>E. dunnii A</i>		<i>E. dunnii B</i>		<i>E. saligna</i>		forma de identificação
			HD1	SPME	HD 8	SPME	HD 9	SPME	HD 16	SPME	
1 éster do ácido propanóico ou butanóico			x	xi					x		a
2 monoterpeneo	136				x	xi	x	xi			a
3 α-tujeno	136	307	x	x	x	xi	x	xi			b
4 α-pineno	136	319	x	x	+	++/+	+	++/++	++	++	b
5 canfeno	136	340			x	x	x	x	+	+	b
6 monoterpeneo ni	136				x	x	x	x			a
7 ni									x		b
8 sabineno	136	379	x	xi							
9 β-pineno	136	386	x	x	x	x	x	x	x	xi	b
10 β-mirceno	136	408	x	x	x	xi	x	xi			b
11 α-felandreno	136	435			x	xi	x		x	xi	b
12 α-terpineno	136	457									b
13 éster do ácido propanóico ou butanóico									x		a
14 éster do ácido propanóico ou butanóico									x		a
15 p-cimeno	134	471	x	x/+	x	++/+	x	+	+	++/+	b
16 limoneno	136	481	x	xi	+	+	+	+	+	+	b
17 eucaliptol	154	485	+	x	++	++	++	++	+	+	b
18 (Z)-β-ocimeno	136	498	x	x/+	+	+	+	+			b
19 (E)-β-ocimeno	136	519			x	x/+	x	x/+		x/+i	b
20 ni			x								a
21 ni			x								a
22 γ-terpineno	136	545	x	x/+	+	++/+	+	x	+	x	b
23 terpeno			x						x	x/+i	a
24 terpinoleno	136	608	x	x	x	xi	x	x	x	xi	a/b
25 p-cimeno		609			x	xi	x	x			e
26 linalol	154	632	x	x					x		c ^{1,106,179,180}
27 isovalerianato de isoamila	172	645							x		b
28 cis-óxido de rosa	154	661	x	x/+							b
29 endo fenchol	154	664			x		x		x		c ^{1,180,181}
30 DMNT						x/+		x/++		xi	a
31 canfolenal	152	692							+		c ^{1,58,180}
32 trans-óxido de rosa	154	695	x	x							b
33 trans-pinocarveol	152	724			x		+		x		c ^{1,179,180}
34 (E)-β-terpineol	154	736							x		a

35	isopulegol	154	740	+	x/+								b
36	citronelal	154	758	++	++								b
37	isoborneol	154	764							x			a
38	isopinocanfona	152	775							x			C ⁵⁸
39	pinocarvona	150	781			x		x		x			C ^{179;180}
40	borneol	154	789							+			C ^{1,58,99;180}
41	álcool monoterpênico	154		+									a
42	álcool monoterpênico	154		x									a
43	4-terpineol	154	820	x		x	xi	x	xi	x			b
44	8-p-cimeno	150	837			x		x		x			a
45	α-terpineol	154	852	x		+	x	+	x	+			b
46	monoterpeno oxigenado									x			a
47	monoterpeno oxigenado									x			a
48	<i>trans</i> -carveol	152	923			x		x		x			C ^{1;179;182}
49	citronelol	156	950	++	++								b
50	<i>cis</i> -carveol	152	953			x		x		x			C ¹⁸²
51	neral	152	980	x	xi								a
52	geranial	152	1057	x	xi								a
53	<i>cis</i> -acetato de isopuleguila ni		1067	x	xi								a
54					x								a
55	terpeno oxigenado					x		x					a
56	timol ou isômero	150	1113							x			a
57	timol ou isômero	150								x			a
58	fenol substituído	150		x									a
59	α-cubebeno	204	1267	x	xi								C ^{178;179}
60	acetato de citronelila	198	1275	x	x/+								b
61	eugenol	164	1279	x									a
62	hidrocarboneto sesquiterpênico	204	1322	x	xi	x	x	x	x	x	xi		a
63	α-copaeno	204	1334	x	xi	x	x	x	x/+	x	x/+		b
64	β-burboneno	204	1355		xi								C ^{58;99;178;179}
65	β-elemeno	204	1375		x								C ^{177;179}
66	terpeno		1118							x	xi		
67	β-cubebeno	204	1371				xi		x				C ^{99;106;181;182}
68	hidrocarboneto sesquiterpênico	204		x	xi								a
69	éster aromático			x									a
70	jasmona	164	1384	x	xi								a
71	longifoleno	204	1404			x	x	x	x				C ¹⁸²
72	α-gurjuneno	204	1421		xi	x	x/+	x	x	x	x		C ^{1;182}
73	hidrocarboneto sesquiterpênico	204				x	x	x	x				a
74	β-cariofileno	204	1442	+	++	x			x/+	x	x/+		b

75	terpeno								x	x	a	
76	hidrocarboneto sesquiterpênico	204	x	xi	x	x	x	x			a	
77	calareno	204	1475		x	x/+	x	x/+			b	
78	aromadendreno	204	1491	x	xi	+	++	+	+/+++	x	x/+	b
79	α -guaiano	204	1491	x	x	x	x	x			c ¹⁷⁷	
80	hidrocarboneto sesquiterpênico	204		x	x						a	
81	α -cariofileno	204	1527	x	x/+		xi		x	x	x	b
82	alo-aromadendreno	204	1546	x	xi	+	+	+	+	x	x/+	b
83	hidrocarboneto sesquiterpênico	204				x	x	x	x			a
84	γ -muroloeno	204	1586			x	x	x	x			c ¹⁷⁷
85	terpeno oxigenado									x		a
86	germacreno D	204	1594	x	x/+		xi		x/+			c ^{58,106,177,179}
87	hidrocarboneto sesquiterpênico	204				x	x	x	x			a
88	valenceno	204	1624			x	x	x	x			c ^{179,182}
89	hidrocarboneto sesquiterpênico	204								x	x	a
90	viridifloreno	204	1628	x	x/+	x	x	x	x	x	x/+	a
91	(<i>E,E</i>)- α -fameseno	204	1657		x/+		xi		x/+		x/+i	c ^{99,106}
92	sesquiterpeno			x								a/f
93	isobutirato de geranila		1678							x	xi	a
94	γ -cadineno	204	1676			x	x	x	x			c ^{58,99,179}
95	sesquiterpeno	202				x	x	x	x			a
96	(1 <i>S</i>), <i>cis</i> - calameneno	202	1695	x	x	x	x	x	x	x	x	c ^{58,99,177-180}
97	δ -cadineno	204	1700	x	x	x	x	x	x	x	x	c ^{58,177-180} /d
98	sesquiterpeno					x	x	x	x			a
99	hidrocarboneto sesquiterpênico	204		x	xi					x	x	a
100	hidrocarboneto sesquiterpênico	204		x	x							a
101	calacoreno	200	1792			x	x	x	xi			a
102	ssquiterpeno oxigenado		1859			x	x	x	xi			a
103	sesquiterpeno					+	+	+	+	x		a
104	sesquiterpeno					x	x	x	x	x	x	a
105	cetona ou éster terpênicos			x	x							a
106	cetona ou éster terpênicos			x	x							a
107	TMTT	218	1821				x		x/+		x/+++ i	a/c ^{1,99,179,182}
108	espatulenol	220	1825	x		x		x		x		c ^{59,179,182} a/d
109	óxido de cariofileno	220	1837	x	x/+							c ^{1,58}
110	globulol	222	1841			+	+	+	+	x	x/+	b

111	guaíol	222	1873		+	+	+	+	x	x/+	c ¹⁸²
112	β-eudesmol	222	1993		x	x	x	x	x	x	a
113	sesquiterpeno				x	x	x	x			a
114	α-eudesmol	222	2000		x	x	x	x	x	xi	c ¹⁸²
115	sesquiterpeno oxigenado				x	x	x	x			a
116	sesquiterpeno oxigenado								x	xi	a
117	sesquiterpeno			x	x	x	x				a
118	sesquiterpeno			x	x	x	x	x			a
119	sesquiterpeno				x	x	x	x			a
120	TMHP	272				x		x/+			a

Notas: Recursos utilizados para identificação dos compostos e para estimativa da contribuição de cada um, entre outras informações: **a.** espectro de massas da biblioteca NIST 98 e Saturn da Varian e dados de retenção¹⁷⁵; **b.** co-injeção com composto padrão; **c.** LTPRI: índice de retenção com programação linear de temperatura; **d.** coelui com o composto anterior; **e.** coelui com o composto anterior apenas no *E. dunnii*; **f.** coelui com o composto anterior apenas no *E. citriodora*; **g.** espectros de massa do banco de espectros de massas do Dr. M. Posthumus da Universidade de Wagenigen; **h.** ++ = área do pico corresponde usualmente a 10,0% ou mais da área total dos picos identificados; + = área do pico situa-se usualmente entre 1,0% e 10,0% da área total dos picos identificados e x = área do pico corresponde usualmente a menos de 1,0% da área total dos picos identificados; **i.** presença intermitente, mas presente no headspace de no mínimo 5 folhas diferentes; **j.** dados de retenção dos compostos listados em uma coluna J & W DB-5 (30 m x 026 mm x 0,25 μm) em segundos, retirados do livro de R. P. Adams;¹⁷⁵ célula em branco indica que o composto não foi detectado.

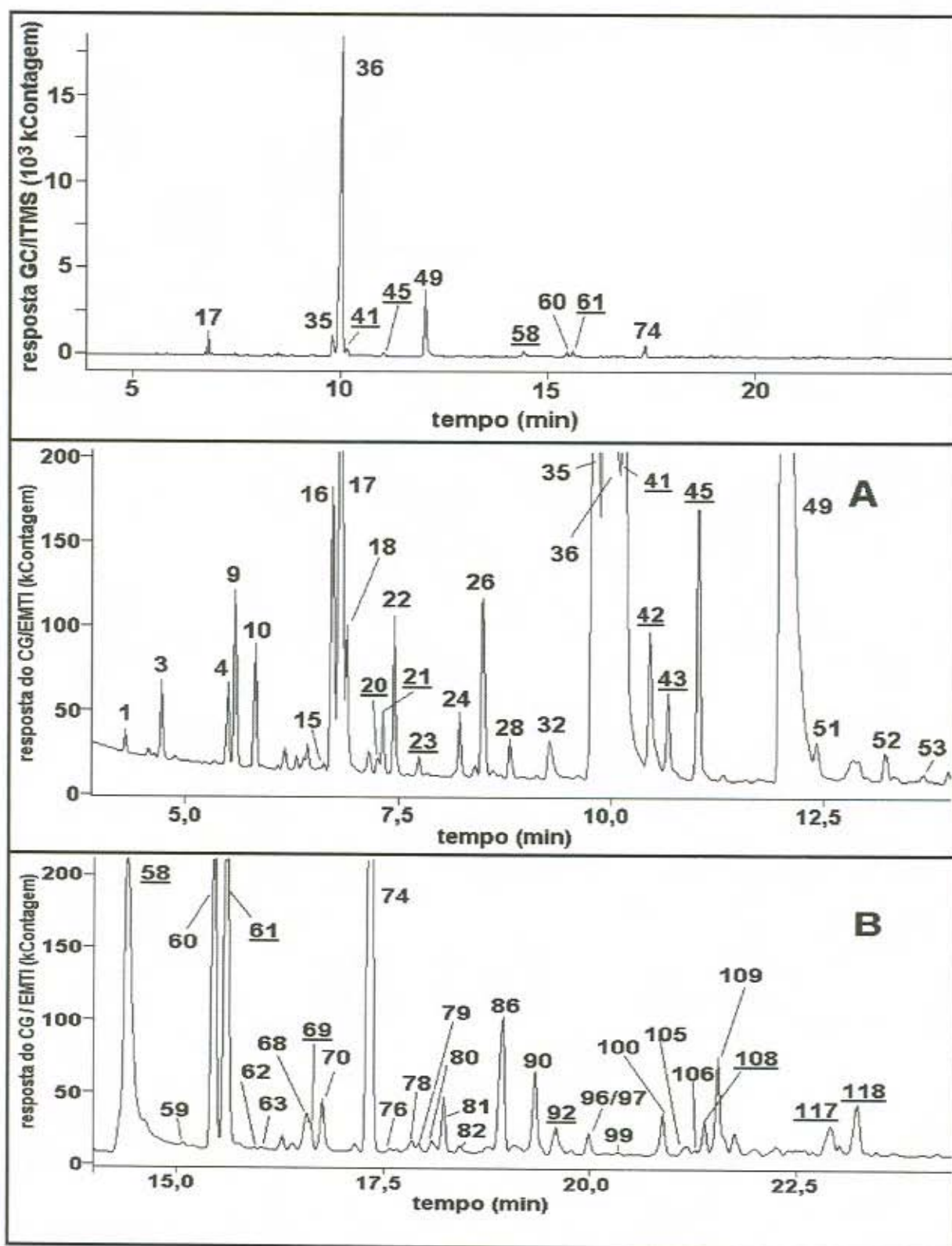


Figura 14. Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial das folhas de *E. citriodora* obtido através de hidrodestilação com Clevenger. Figuras A e B correspondem à primeira e segunda parte do cromatograma da Figura 14 ampliadas. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV e numeração de acordo com a Tabela VI.

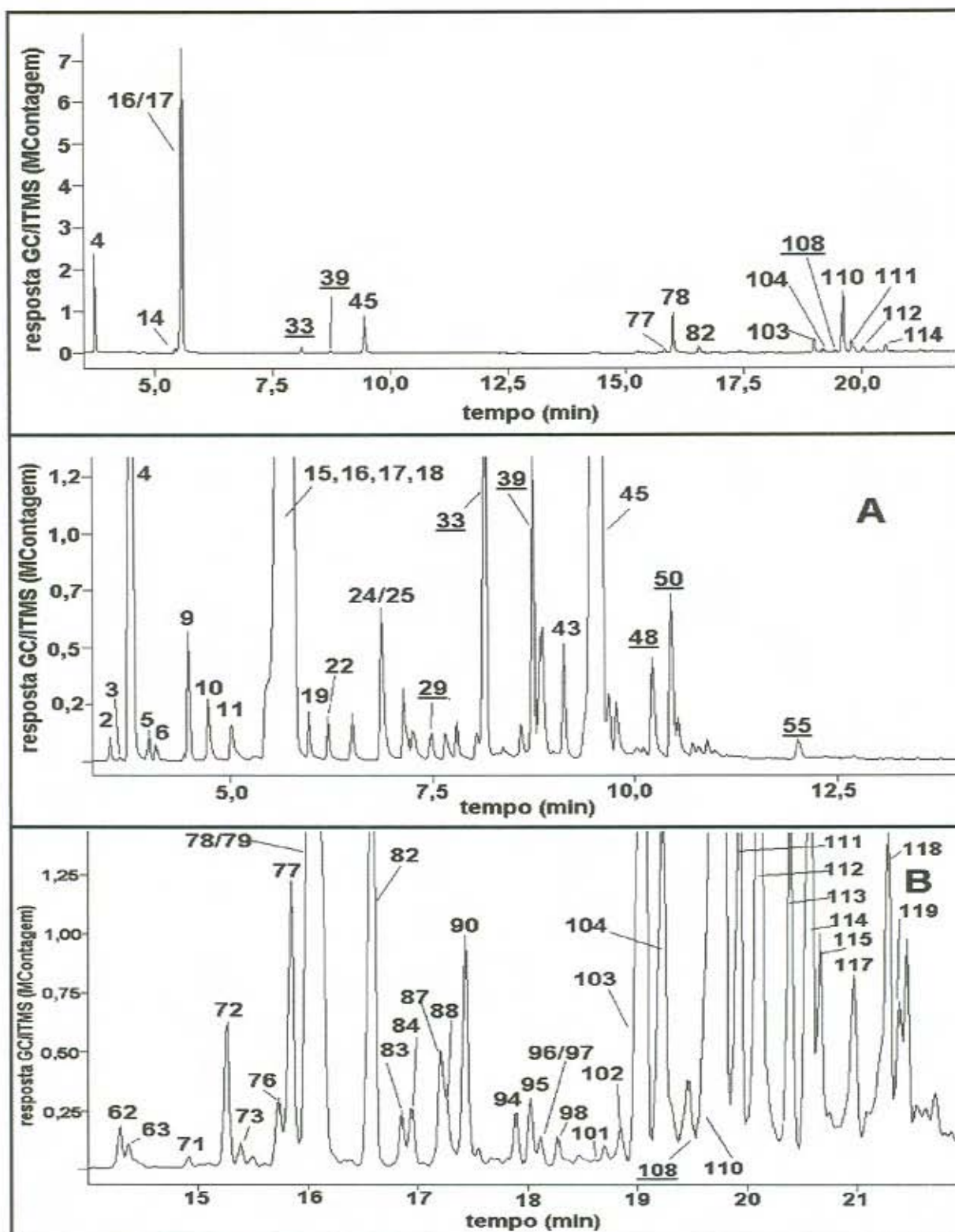


Figura 15. Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial das folhas de *E. dunnii* obtidos através de hidrodestilação com Clevenger. As Figuras A e B correspondem à primeira e segunda parte do cromatograma da Figura 15A ampliadas. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV e numeração de acordo com a Tabela VI.

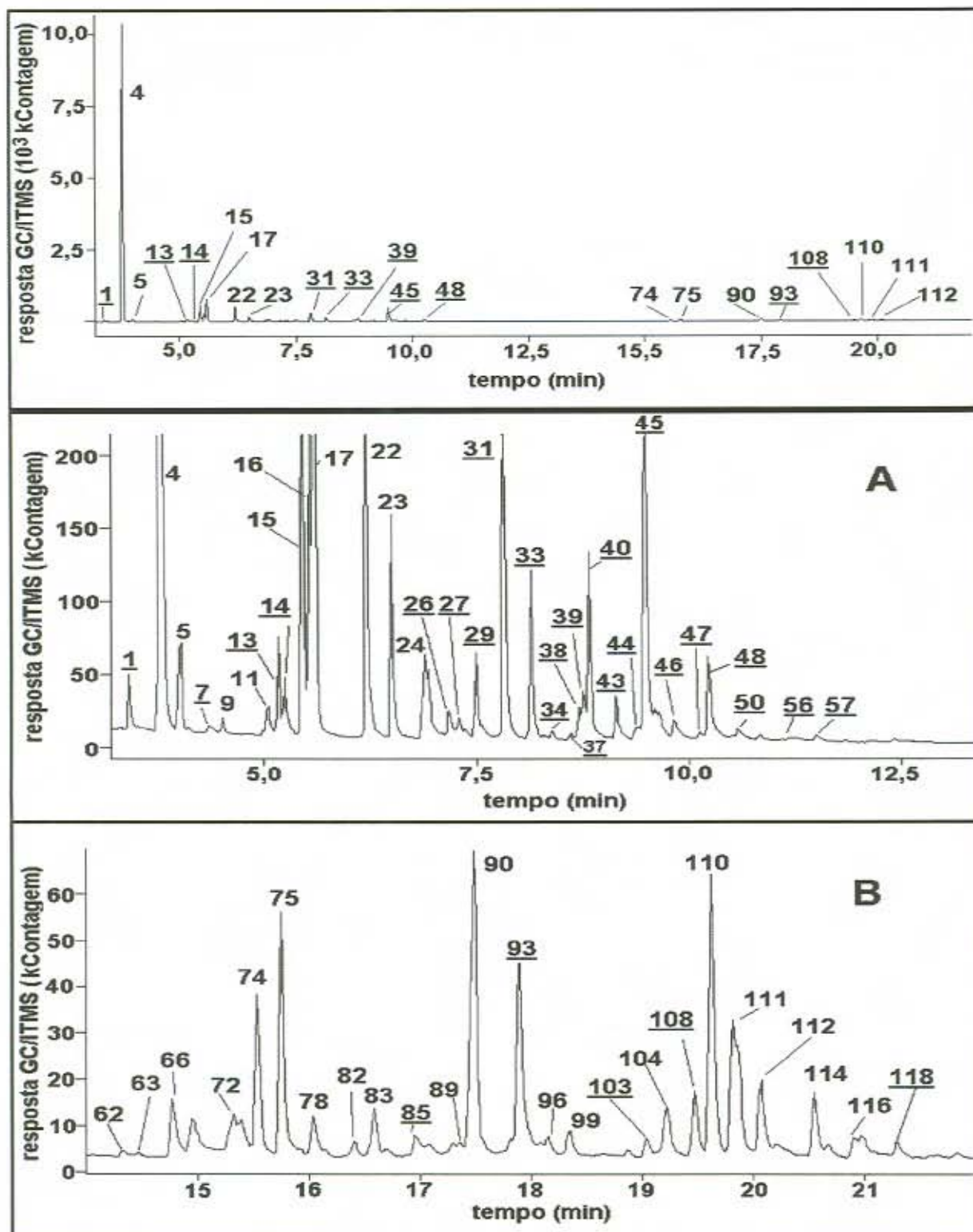


Figura 16. Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial das folhas de *E. saligna* obtidos através de hidrodestilação com Clevenger. As Figuras A e B correspondem à primeira e segunda parte do cromatograma da Figura 16 ampliadas. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV e numeração de acordo com a Tabela VI.

2. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO HEADSPACE APLICADA A FOLHAS DE EUCALIPTO PICADAS

Nesta etapa do trabalho, várias folhas de uma mesma árvore de *E. citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna* (Tabela II) foram submetidas à extração conforme procedimento descrito no item 4 do Capítulo III. O desenvolvimento do método empregado na extração e os resultados obtidos encontram-se nos itens a seguir. Para as comparações entre os resultados obtidos por HS-SPME e por hidrodestilação, foram empregadas folhas das mesmas árvores para ambas as técnicas, no mesmo período do ano (julho a agosto de 2000), a fim de evitar variações qualitativas nos óleos devidas a diferentes idades das árvores. A única exceção a esta regra ocorreu com *E. citriodora*, para o qual a hidrodestilação foi efetuada 6 meses antes dos experimentos de HS-SPME e as folhas utilizadas na hidrodestilação eram provenientes de 5 árvores diferentes (HD1), entre elas, aquela que foi usada nos experimentos de HS-SPME. Esta exceção deveu-se a problemas técnicos nos resultados obtidos com a hidrodestilação feita no mesmo período dos experimentos de HS-SPME (HD2-Tabela V).

2.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

O desenvolvimento do método abrange várias etapas: escolha do filme polimérico, escolha do modo de extração, uso ou não de agitação, emprego de sistema automatizado ou manual, escolha da técnica de separação e detecção, otimização das condições de dessorção, otimização do volume de amostra, determinação do perfil do tempo de extração, otimização das condições de extração (pH, uso de sal, temperatura), entre outras.⁹²

2.1.1. Filme polimérico

Inicialmente foram comparados três filmes poliméricos para investigar qual deles apresentaria melhor performance: PDMS 7 μm , PA 85 μm e PDMS/DVB 65 μm . Os cromatogramas da Figura 17 apresentam os resultados obtidos para a extração do headspace de folhas picadas de *E. dunnii* A, usando-se um tempo de extração de 1 min a uma temperatura de 24 °C.

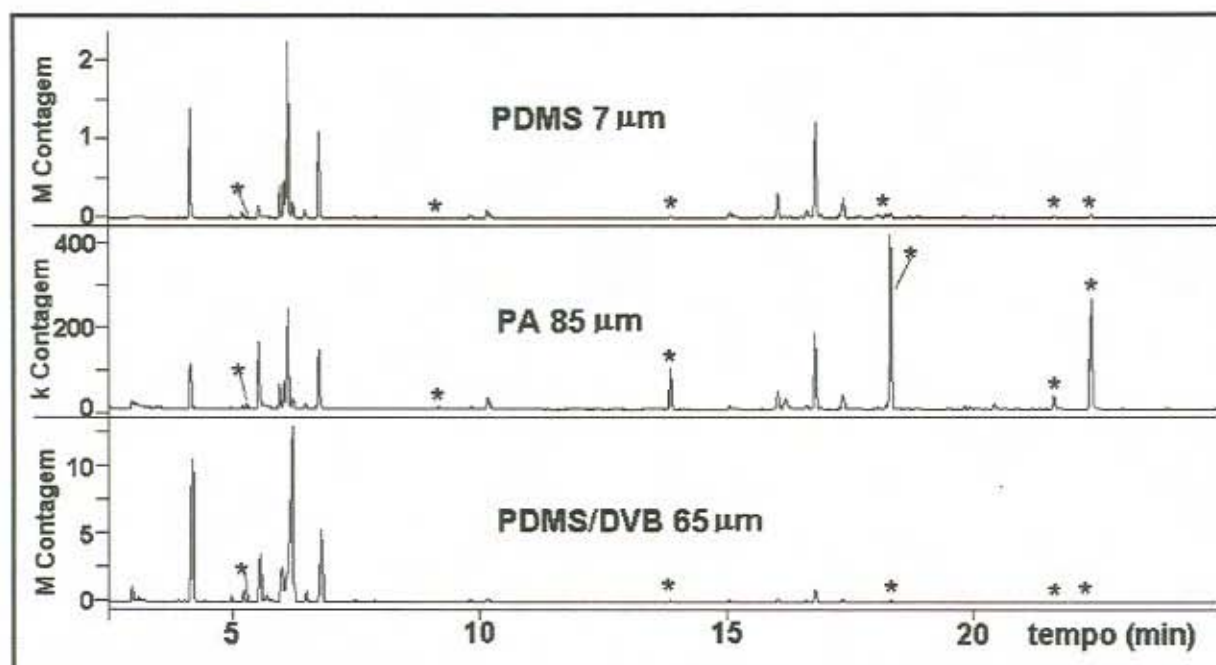


Figura 17. Cromatogramas do íon total mostrando a comparação dos resultados obtidos após extração do headspace da mesma amostra com as fibras PDMS, PA e PDMS/DVB. Condições cromatográficas citadas na Tabela IV.

* : sangramento dos filmes poliméricos.

O filme polimérico de poliácrlato foi o que apresentou a pior performance entre os três filmes testados. Comparando-se os três cromatogramas obtidos na Figura 17, verifica-se que a extração feita com PA foi a que resultou em picos com a menor abundância, sendo que na segunda metade do cromatograma predominaram os picos de sangramento do filme polimérico, o que não ocorreu com os outros dois filmes. Um dos objetivos ao testar-se a fibra de PA era o de verificar a presença de

compostos polares no headspace das folhas picadas que, eventualmente, não seriam extraídos pelo filme de PDMS, visto que o filme de PA apresenta maior afinidade por compostos polares do que o de PDMS (Figura 4).⁹² Contudo, nenhum composto foi detectado através da extração com PA, que não o tenha sido através dos outros dois filmes. Dados da literatura mostram que a mesma fibra PA empregada para extração do headspace de folhas de tomateiro, quando comparada ao desempenho da PDMS 100 μm , não apresentou nenhuma diferença qualitativa nos resultados, contudo, a resposta obtida para os compostos apolares foi menor do que aquela obtida com PDMS 100 μm usando-se 30 min como tempo de extração.⁵¹

Utilizando-se PDMS/DVB e PDMS, os mesmos compostos foram extraídos, contudo, uma quantidade maior dos compostos mais leves foi extraída por PDMS/DVB. Sabe-se através da literatura que este filme apresenta excelente desempenho para extração de compostos de baixo peso molecular.^{115,116,139} Entretanto, para extração dos compostos de peso molecular ao redor de 204 g mol^{-1} (hidrocarbonetos sesquiterpênicos), o filme de PDMS apresentou melhor resultado. Além disso, na extração com PDMS/DVB a quantidade de p-cimeno, limoneno e eucaliptol sobrecarregou a coluna cromatográfica provocando distorção do formato destes picos e superposição dos últimos dois. Por todas estas razões e também porque a fibra de PDMS é conhecida por sua robustez e durabilidade, ela foi a escolhida para as extrações do headspace de folhas de eucalipto.⁹² A escolha da espessura do filme polimérico é descrita no item seguinte.

2.1.2. Temperatura e perfil de extração

A escolha da temperatura foi feita com o intuito de obter-se um perfil cromatográfico o mais próximo possível do aroma natural das folhas picadas de eucalipto. Os compostos terpenóides presentes no óleo das folhas de eucalipto são suscetíveis a reações provocadas por temperatura, pH, luz ou presença de metais.^{32,196} Algumas destas reações podem ser citadas: a formação de α ,p-dimetilestireno, um conhecido produto da degradação de monoterpenos em óleos provenientes de destilação; a hidrólise do acetato de linalila do óleo de

lavanda devido a temperatura e baixo pH; a tendência do sabineno de transformar-se em vários compostos em meio ácido (4-terpineol, α -terpineno, γ -terpineno, terpinoleno). A presença de traços de metais no próprio material vegetal pode levar a rearranjos, conforme registra a literatura com o exemplo da isomerização da *cis*-di-hidrocarvona no isômero *trans*-, catalisada pela presença de traços de metais nas sementes que estavam sendo destiladas.^{196,197}

Segundo Koedam, temperaturas abaixo de 50 °C são consideradas relativamente baixas para processos de extração de tecidos de plantas de forma a obter-se uma composição mais próxima àquela *in vivo*.¹⁹⁶ Um exemplo de técnica de extração que também permite o uso de temperaturas amenas é a extração com fluido supercrítico (SFE), embora exija equipamentos caros para sua execução. Estudo comparativo entre hidrodestilação, destilação a vácuo e SFE de folhas de *E. varia* subsp. *varia* e *E. sparsa* mostrou que a quantidade de biciclogermacreno obtida na hidrodestilação é menor do que aquela resultante dos outros 2 métodos de extração, que utilizam condições experimentais mais brandas.² Neste caso, a temperatura utilizada na SFE foi de 40 °C. Folhas de *E. globulus* Labill. extraídas também com fluido supercrítico sob condições consideradas mais brandas do que a hidrodestilação, foram submetidas a temperatura de 50 °C.¹⁸² Até mesmo utilizando-se temperaturas mais elevadas (70 °C, 90 atm), foi possível verificar-se grandes diferenças entre o extrato obtido por SFE e hidrodestilação no caso de *Ferrulago nodosa*. O extrato obtido por destilação a vapor continha 2,3,4-trimetil-benzeno como seu principal componente, sendo este composto um produto de degradação térmica de um composto terpenóide presente na planta.¹⁹⁸ Contudo, de uma forma geral, temperaturas abaixo de 50 °C (mais comumente na faixa de 30 °C a 40 °C) são as utilizadas nas extrações em que se pretende preservar a composição "natural" da planta.^{79,199,200}

Desta forma, a temperatura de 30 °C foi escolhida visando-se evitar transformações nos compostos voláteis provocadas por temperatura e também objetivando-se obter um tempo de extração menor ou igual ao tempo utilizado para a análise cromatográfica dos VOC extraídos (44 min conforme Tabela IV).

Os tempos de extração testados foram de 1, 5, 15, 30, 45 e 90 min. A fim de simplificar a avaliação dos perfis de tempo de extração dos compostos presentes no headspace de folhas de eucalipto picadas, foram escolhidos quatro compostos

representativos da maior parte dos componentes presentes: um hidrocarboneto monoterpênico (α -pineno), um monoterpeno oxigenado (α -terpineol), um hidrocarboneto sesquiterpênico (aromadendreno) e um sesquiterpeno oxigenado (globulol). As áreas dos picos de cada composto nos cromatogramas em cada série de amostragem foram normalizadas de acordo com a equação (23):

$$A_e = \frac{A_x}{A_{1\text{min}}} \quad \text{equação (23)}$$

onde A_e é a área normalizada obtida após x minutos de extração, A_x é a área do pico após um tempo de extração de x minutos e $A_{1\text{min}}$ é a área encontrada para o pico do composto após um tempo de extração de 1 min. O procedimento experimental está descrito no item 3 do Capítulo III.

A Figura 18 mostra o perfil da extração em função do tempo (chamado “perfil do tempo de extração”)⁹² para os compostos supra citados quando se utiliza PDMS 7 μm . Resultados obtidos em repetições destes experimentos usando-se folhas picadas e folhas pulverizadas, assemelham-se a estes.

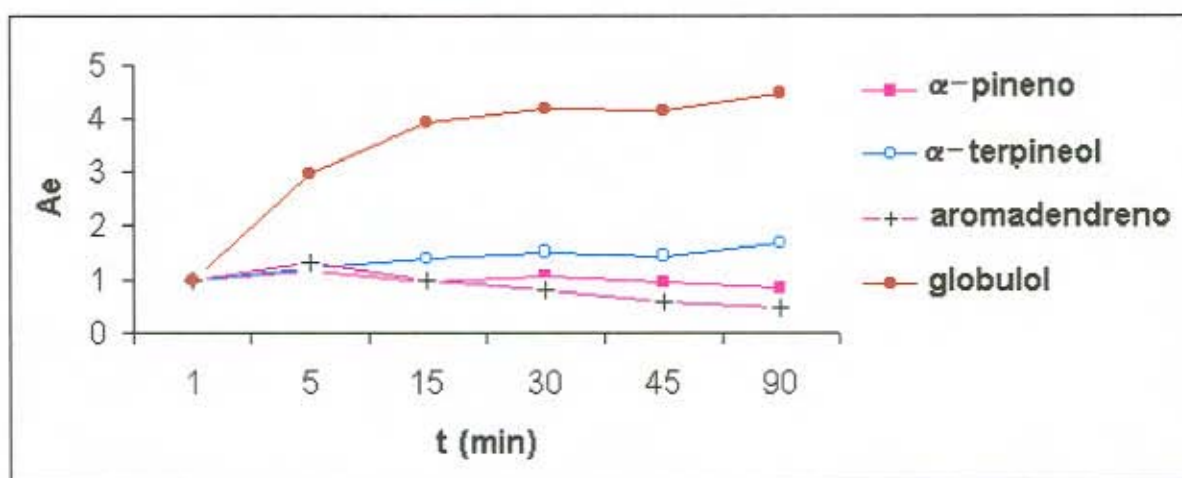


Figura 18. Perfil do tempo de extração para alguns compostos voláteis do headspace de folhas de eucalipto picadas usando-se PDMS 7 μm a 30 °C, expresso como a variação das áreas normalizadas (A_e) dos picos cromatográficos (equação 23)

A mesma investigação foi feita utilizando-se PDMS 30 μm e, para a maior parte dos compostos, o perfil do tempo de extração foi semelhante, exceto para o sesquiterpeno oxigenado globulol, conforme mostra a Figura 19.

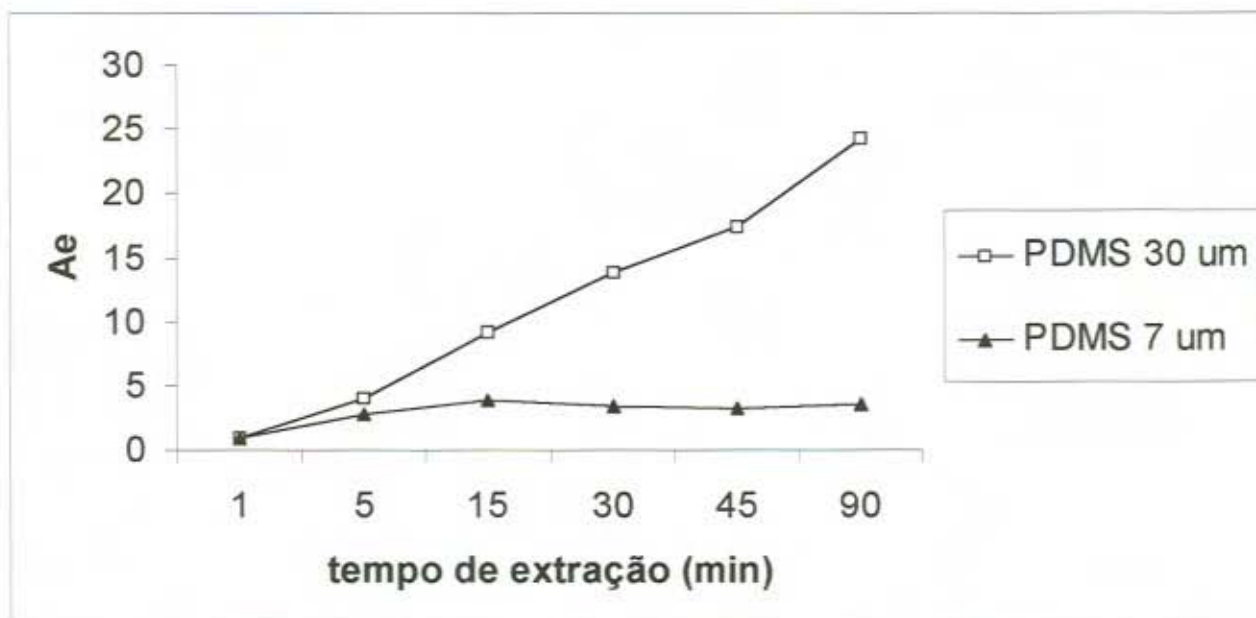


Figura 19. Perfil do tempo de extração do composto globulol a 30 °C utilizando-se PDMS 7 μm e PDMS 30 μm , expresso como a variação das áreas normalizadas (Ae) dos picos cromatográficos (equação 23).

Utilizando-se PDMS 30 μm , mesmo com um período de 90 min de extração, o composto globulol não atinge o equilíbrio a 30 °C.

Com o objetivo de verificar se seria possível diminuir o intervalo de tempo necessário para que o globulol atingisse o equilíbrio entre o headspace e o filme polimérico, uma nova tentativa foi feita com a mesma espessura de filme polimérico, aumentando-se a temperatura para 45 °C e usando-se agitação de 300 rpm. Nestas condições, o perfil do tempo de extração para os compostos representativos da mistura presente no headspace das folhas de eucalipto é apresentado na Figura 20.

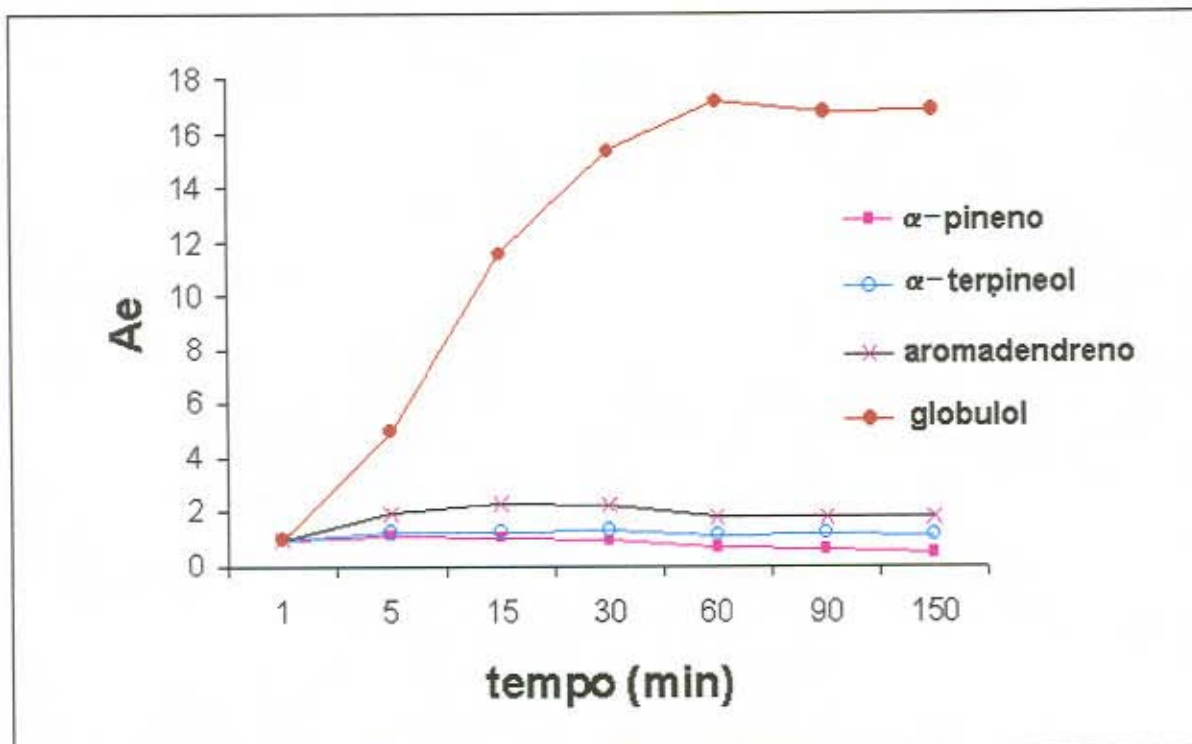


Figura 20. Perfil do tempo de extração para alguns compostos voláteis do headspace de folhas de eucalipto picadas usando-se PDMS 30 μm a 45 $^{\circ}\text{C}$ e 300 rpm, expresso como a variação das áreas normalizadas (Ae) dos picos cromatográficos (equação 23).

Como mostra a Figura 20, mesmo a 45 $^{\circ}\text{C}$ e com agitação de 300 rpm, são necessários aproximadamente 60 min a 90 min para que o globulol atinja o equilíbrio entre headspace e filme polimérico.

Um tempo tão longo tornaria o método de extração muito demorado e a opção pela mais baixa temperatura possível é uma escolha conveniente quando se trabalha com compostos voláteis e/ou termolábeis. Paralelamente a estes experimentos, foi feita uma comparação qualitativa entre o perfil de extração obtido ao utilizar-se PDMS 7 μm e aquele obtido com PDMS 30 μm , nas mesmas condições experimentais. Não foram observadas diferenças qualitativas significativas nos perfis cromatográficos das folhas Q, R, S, T, U de *E. citriodora* ao

empregar-se os dois filmes poliméricos (Tabela II). Da mesma forma as folhas AA, AB, AC, AD, AE de *E. dunnii* A e AO, AP, AQ, AR, AS de *E. dunnii* B foram submetidas a extrações com PDMS 7 μm e PDMS 30 μm , sem revelar diferenças qualitativas significantes nos resultados obtidos com ambos os filmes. Tendo em vista que o número de compostos extraídos pela fibra recoberta com PDMS 30 μm e por PDMS 7 μm foi o mesmo e que o tempo necessário para atingir o equilíbrio entre headspace e filme polimérico é menor quando se utiliza PDMS 7 μm , este foi o filme polimérico escolhido para a extração do headspace das folhas picadas das três espécies de eucalipto. O uso do filme polimérico de 100 μm foi descartado, visto que o tempo necessário para atingir o equilíbrio seria ainda maior.

Um outro fator importante na escolha da espessura de 7 μm do filme polimérico diz respeito a linearidade da resposta do detector de aprisionamento de íons usado neste trabalho. Extrações realizadas com fibras das três espessuras de filme PDMS (7 μm , 30 μm e 100 μm), conforme item 4 do Capítulo III, revelaram que a área dos picos majoritários do headspace de folhas picadas de *E. dunnii* e *E. citriodora* ficavam fora da faixa de linearidade do detector (item 2.1.3 deste Capítulo), havendo inclusive distorção da forma dos picos majoritários quando se usava PDMS 100 μm e/ou PDMS 30 μm com superposição de alguns destes picos. Embora tenha-se utilizado uma quantidade mínima de folhas durante as amostragens (0,05 g), o percentual dos componentes majoritários nos óleos de *E. dunnii* e *E. citriodora* é alto (Tabela VI) e o percentual de óleo das folhas destas espécies também é alto (Tabela II). A utilização de uma massa de folhas menor do que 0,05 g poderia acarretar em baixa reprodutibilidade das áreas dos picos cromatográficos.

Situações semelhantes a esta, onde os picos majoritários do óleo sobrecarregam a coluna, prejudicando a resolução cromatográfica já foram verificadas por outros pesquisadores durante a utilização de SPME no headspace de plantas.¹⁰⁵

Outros fatores como o sangramento dos filmes poliméricos e a menor perturbação do headspace também corroboraram na escolha do filme de 7 μm . O sangramento das fibras de 30 μm e 100 μm é bem maior do que aquele da fibra de 7 μm . O fato de a PDMS 7 μm extrair uma quantidade menor de compostos presentes no headspace, embora resulte em menor sensibilidade, tem a vantagem

de provocar uma menor perturbação no equilíbrio amostra/ headspace do sistema vivo, evitando a depleção dos compostos ao longo de amostragens sucessivas.

A maior parte dos trabalhos que utiliza SPME para análise de voláteis de plantas, emprega PDMS 100 μm .^{97,103,106,113,173} Contudo, neste caso específico julgou-se mais conveniente o uso de PDMS 7 μm , pelas vantagens já citadas, embora a escolha da espessura de 7 μm tenha como consequência um menor fator de concentração dos analitos, o que pode prejudicar a extração de compostos mais polares e/ou minoritários.^{92,109}

Os dados obtidos confirmam investigações encontradas na literatura que também mostraram que os tempos de equilíbrio de compostos terpenóides a temperaturas baixas podem ser longos quando se usa PDMS 100 μm , como por exemplo o da β -ionona (> 30 min a 19 °C \pm 0,5).¹⁴⁰ Em contrapartida, os tempos de equilíbrio para os hidrocarbonetos monoterpênicos foi estimado entre 5 a 15 min. Na extração de α -cariofileno (ou humuleno) e β -cariofileno a partir do headspace de pó de lúpulo foram necessárias 4 horas para que ambos atingissem o equilíbrio a 50 °C.¹⁰³

2.1.3. Escolha do detector e determinação de linearidade

O detector empregado preferencialmente neste trabalho foi o GC/ITMS. Pelo fato de as amostras serem complexas, contendo muitos compostos com tempos de retenção muito próximos uns dos outros, o ITMS propicia a pronta identificação destes compostos. Mesmo através do uso de índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI), o trabalho de identificação de compostos utilizando GC/FID pode ser árduo e de poucos resultados para alguns compostos que possuem LTPRI muito próximos. Visto que este trabalho objetivava verificar as diferenças qualitativas entre os resultados de duas técnicas de extração, o uso do ITMS mostrou-se bem mais conveniente. O detector FID foi empregado como apoio, quando necessário.

A linearidade da resposta do ITMS foi avaliada para 7 compostos representativos da maior parte dos componentes presentes nos óleos e headspace

de folhas de eucalipto estudados. Os compostos 2-careno e 2,5-dimetilestireno foram escolhidos para representar os hidrocarbonetos monoterpênicos e aromáticos; eucaliptol, mirtenal e acetato de linalila foram escolhidos para representar os monoterpênicos oxigenados; β -cariofileno foi o representante da classe dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos e o óxido de cariofileno foi o representante dos sesquiterpênicos oxigenados. A faixa de concentração investigada foi de 5 a 500 ng. Embora o trabalho não vise quantificar nenhum dos compostos, as quantidades relativas de um mesmo composto em diferentes experimentos são eventualmente observadas comparativamente, sob as mesmas condições de amostragem e sob as mesmas condições operacionais no GC/ITMS. Sendo assim, verificamos se a resposta do detector era linear para estes compostos representativos na faixa de concentração de trabalho. Os resultados obtidos estão na Tabela VII, onde r^2 é o coeficiente de correlação entre x (massa de cada analito introduzida no GC/ITMS) e y (área dos picos dos respectivos analitos). As Figuras A9 a A15 (Anexo A) apresentam graficamente a relação linear entre x e y para os analitos em questão.

Tabela VII. Dados relativos à resposta do espectrômetro de massas de aprisionamento de íons para vários compostos.

	r^2	desvio padrão relativo (%)
2-careno	0,9994	4-11
2,5-dimetilestireno	0,9982	3-8
eucaliptol	0,9991	1-9
mirtenal	0,9991	2-7
acetato de linalila	0,9992	1-10
β -cariofileno	0,9987	3-10
óxido de cariofileno	0,9976	3-8

2.1.4. Outros parâmetros

Como a umidade das folhas é variável entre espécies de eucalipto e entre as folhas de uma mesma árvore, uma solução tampão aquosa foi adicionada às folhas

para homogeneizar o pH da mistura aquosa de todas as amostras de folhas picadas testadas.

Para verificar se haveria alterações qualitativas no perfil cromatográfico devido à adição de solução tampão de fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$), o headspace de uma mesma amostra foi extraído inicialmente sem a adição de solução tampão e, posteriormente, com a adição da mesma. Não foi detectada nenhuma diferença qualitativa devida à adição de solução tampão.

O uso de agitação foi testado para a amostragem de headspace das folhas picadas de eucalipto. Durante estes experimentos, verificou-se que havia o risco de contato dos pedaços de folhas com a fibra de SPME, devido aos movimentos irregulares destes pedaços de folhas no frasco. Além disso, como o tempo de 30 min de extração, na ausência de agitação, havia resultado em um perfil cromatográfico semelhante ao obtido através de hidrodestilação, concluiu-se que o uso da condição estática era suficiente para a obtenção de um perfil cromatográfico representativo do headspace da amostra.

A quantidade de folhas picadas empregada nas extrações variou de 0,05 g até 2,00 g, sendo a menor massa a que proporcionou melhores resultados.

O uso do robô Combipal (item 4 do Capítulo III) conferiu rapidez ao trabalho analítico, permitindo que um número maior de extrações e análises fosse realizado, ampliando o número de folhas investigadas.

2.2. COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FOLHAS VERDES (GLV)

Na etapa preliminar do trabalho verificou-se que os compostos chamados voláteis de folhas verdes - GLV - (do inglês "green leaf volatiles") são detectados na parte inicial do cromatograma e o perfil destes compostos é dinâmico, isto é, altera-se à medida que o tempo passa.

A partir do momento em que o tecido vegetal é rompido, iniciam-se processos enzimáticos e os GLV são emitidos para a fase gasosa continuamente até que a atividade enzimática cesse. Isto gera uma situação analítica complexa, na qual, as concentrações dos analitos sofrem alterações durante a extração.⁵⁰

O registro da presença destes compostos em folhas verdes de várias espécies de plantas é abundante na literatura.^{38;40;52;201-204}

As Figuras 21, 22 e 23 apresentam o perfil cromatográfico do headspace de folhas picadas de *E. dunnii* na região onde eluem os compostos mais voláteis, em três momentos, ao longo de 24 horas, utilizando-se PDMS 7 μ m. Vinte e oito minutos depois de cortada a folha, pode-se ver os picos do hexenal, 3-(Z)-hexenol-1 e do éster 3-(Z)-acetato de hexenila. Após 3,3 h, os picos correspondentes ao álcool e ao aldeído já não são mais detectáveis e o éster antes mencionado tem seu pico diminuído em relação ao cromatograma anterior. O acetato de hexila, cujo pico aparece 3,3 h após o corte da folha, ainda pode ser visto no cromatograma após 23,8 h, juntamente com o 3-(Z)-acetato de hexenila e os monoterpenos presentes desde o início das extrações. Estes ésteres, chamados de “ésteres da folha verde”, são formados a partir da esterificação dos álcoois.⁴⁵

Em publicação recente, a SPME foi utilizada para ilustrar a detectabilidade de compostos polares em unidades amostradoras contendo meio de cultura para o cultivo de um tomateiro. Após 21 dias de cultivo *in vitro*, a planta teve suas folhas danificadas através de pinças especiais e as alterações na emissão de 3-(Z)-hexenol e 3-(Z)-hexenal foram monitoradas através de HS-SPME durante mais de 80 min.⁵¹

Frações dos cromatogramas do íon total onde eluem os GLV detectados nas três espécies de eucalipto submetidos a teste, são apresentados na Figura 24.

Durante as repetições do mesmo experimento, observou-se o aparecimento dos mesmos compostos. Contudo, a velocidade de desaparecimento do aldeído e do álcool e de aparecimento dos ésteres variou de experimento para experimento. Sabe-se que fatores ambientais como a temperatura, a radiação solar e a estação do ano influenciam a atividade enzimática.⁴⁰ No caso de folhas usadas para chá (*Thea sinensis*), a formação de 3-(Z)-hexenal e de n-hexenal aumentou durante o verão e diminuiu no outono. Não foi detectada atividade enzimática no inverno.³⁴ Os experimentos correspondentes aos cromatogramas apresentados nas Figuras 21, 22 e 23 foram realizados durante a primavera e os demais em outras estações do ano. Isto, provavelmente, é um dos fatores que explica as variações encontradas. Estes resultados preliminares indicam o potencial da SPME para o estudo da dinâmica de liberação de GLV, entre outros compostos, durante a ocorrência de processos enzimáticos nas folhas de eucalipto e também de outras plantas.

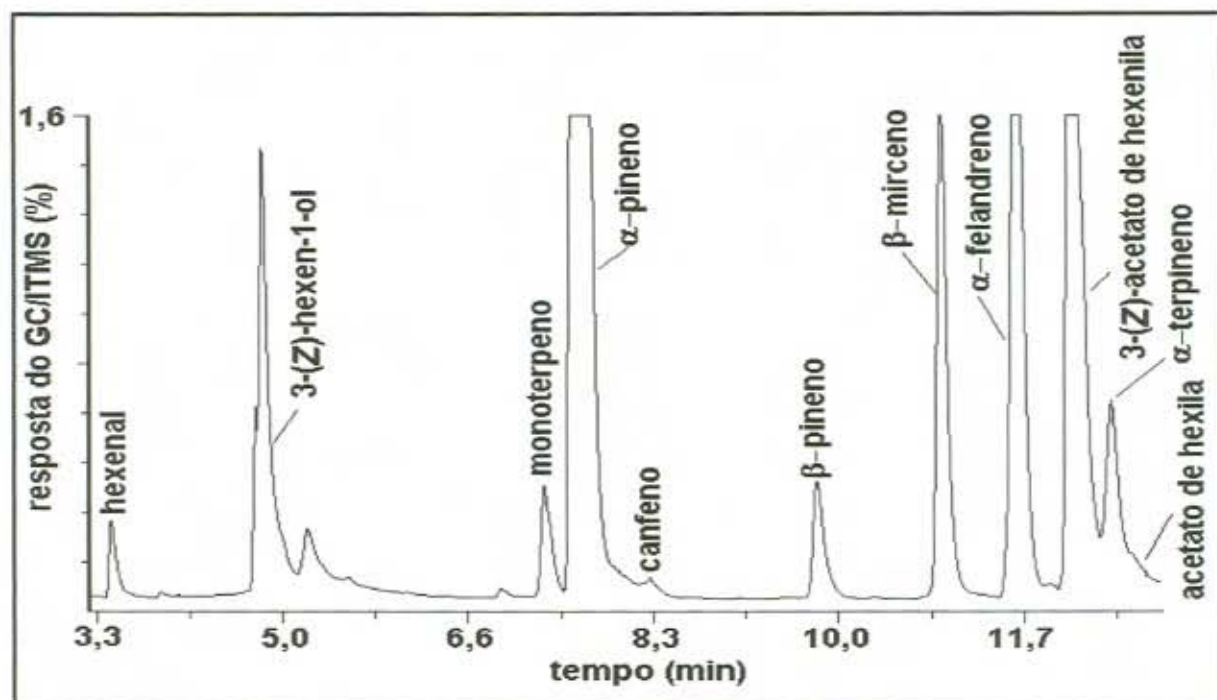


Figura 21. Fração do cromatograma do íon total onde eluem os GLV, 28 min depois da ruptura do tecido da folha. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

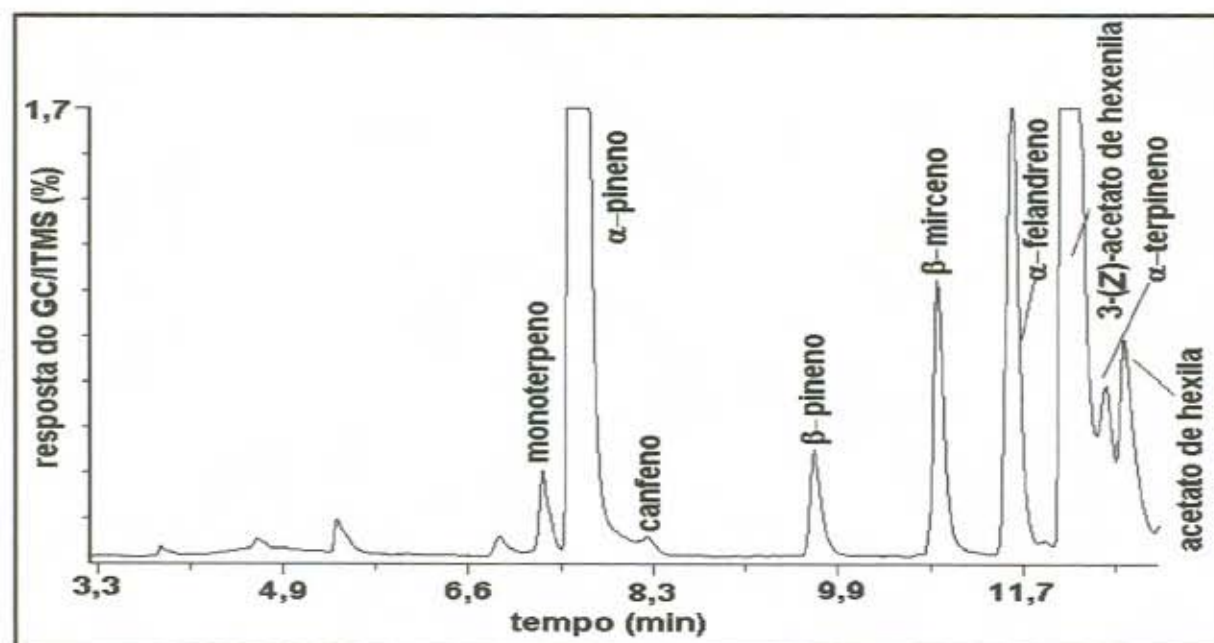


Figura 22. Fração do cromatograma do íon total onde eluem os GLV, 3,3 h depois da ruptura do tecido da folha. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

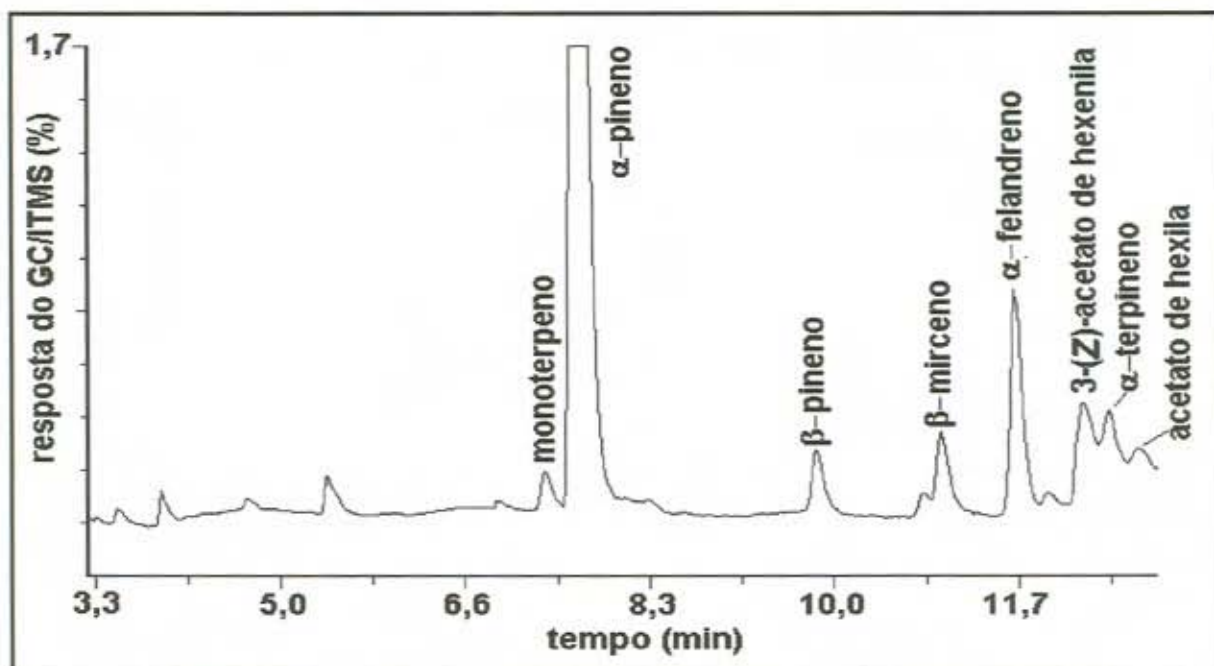


Figura 23. Fração do cromatograma do íon total onde eluem os GLV, 23,8 h depois da ruptura do tecido da folha. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

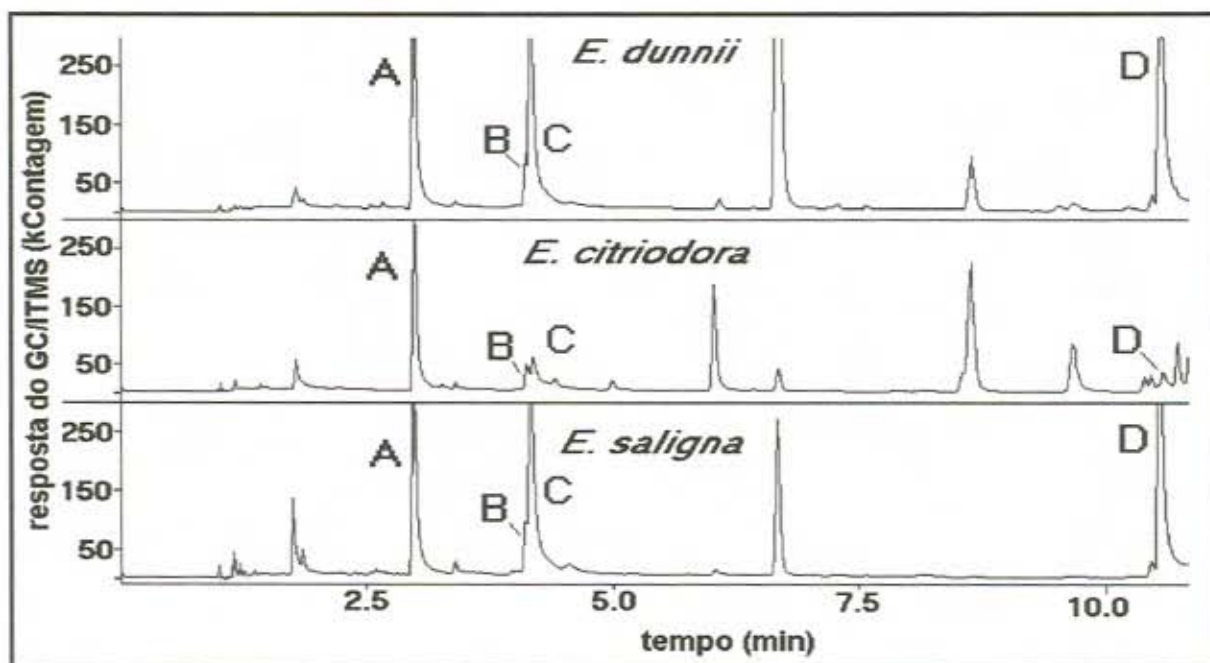


Figura 24. Fração dos cromatogramas do íon total onde eluem os C6-GLV detectados no headspace de folhas picadas de *E. dunnii*, *E. citriodora*, e *E. saligna*. A. C6- GLV; B. C6- GLV; C. 3-(Z)-hexen-1-ol; D. 3-(Z)-acetato de hexenila. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

2.3. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR HS-SPME E POR HIDRODESTILAÇÃO ^{15,53,63-73,183,186,205-213}

Foram detectados 120 compostos nos óleos hidrodestilados e no headspace de 60 folhas das três espécies de eucalipto em estudo, conforme Tabela VI, onde os compostos estão listados em ordem de eluição na coluna HP-5MS. Destes, 30 foram identificados e 43 foram tentativamente identificados, conforme item 6 do Capítulo III. Para vários compostos apenas o grupo químico mais provável foi sugerido e os restantes permaneceram não identificados. A Tabela II do Capítulo III apresenta o número e a descrição das folhas das três espécies de eucalipto que foram submetidas a HS-SPME e a hidrodestilação.

A escolha da técnica de extração deve basear-se no uso final do extrato. No caso da hidrodestilação, o óleo obtido tem sua aplicação na indústria de fragrâncias e sabores. Além disso, é um procedimento comum para o isolamento de óleos essenciais também em nível laboratorial.²¹⁴ Contudo, quando se objetiva estudos taxonômicos ou a investigação da presença de possíveis infoquímicos produzidos pela planta ou provenientes da sua interação com outros organismos, invariavelmente, deve-se evitar técnicas que provoquem alterações químicas resultantes de temperatura, pH, etc.

A hidrodestilação é conhecida como uma técnica que provoca este tipo de alterações na composição do óleo extraído.²¹⁴ Por outro lado, a HS-SPME é uma técnica de extração que pode ser realizada sob condições amenas, como pode ser verificado nos itens anteriores. Para investigar as possíveis diferenças qualitativas entre a composição do óleo hidrodestilado e a composição do headspace de folhas de eucalipto picados, folhas de *E. citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna* foram submetidas à hidrodestilação e a HS-SPME conforme descrito nos itens 3 e 4 do Capítulo III.

De uma forma geral, a literatura registra a HS-SPME como uma técnica excelente para análise qualitativa de voláteis de plantas e frutas, a qual pode trazer informações complementares às obtidas na destilação.^{96,101,215}

Qualitativamente, os resultados obtidos através da hidrodestilação refletem a composição do óleo e aqueles obtidos por HS-SPME refletem a composição dos compostos encontrados no headspace das folhas picadas, o que depende da

volatilidade destes compostos e da afinidade de cada um pelo filme polimérico, visto que a SPME é uma técnica de equilíbrio e a hidrodestilação uma técnica de extração exaustiva que emprega condições experimentais (temperatura, por exemplo) que podem resultar na produção de artefatos.^{32,196,197} Uma das abordagens mais simples e comumente empregada para apresentação dos resultados de análises de óleos essenciais provenientes de destilação é a determinação direta do percentual de cada componente da mistura, considerando-se o somatório total das áreas dos compostos como 100% e os fatores de resposta de cada classe de compostos presentes, relativos ao detector empregado. Tendo em vista que, no caso da SPME, as constantes de distribuição dos compostos investigados entre o filme e o headspace (K_{th}) são diferentes para diferentes compostos, a razão entre áreas de picos cromatográficos de compostos que apresentam fatores resposta semelhantes não representam a razão das quantidades reais destes compostos no headspace.^{92,107} Sendo assim, a abordagem de determinação direta dos percentuais de cada composto, conforme descrita para os óleos destilados, não é possível. Neste trabalho, os percentuais de área listados na Tabela VI objetivam apenas retratar o perfil cromatográfico em cada caso e propiciar a comparação entre extrações feitas pela mesma técnica, visto que o objetivo proposto é qualitativo.

Tendo em vista a dessemelhança inerente aos processos de SPME e de hidrodestilação, diferenças qualitativas entre os resultados obtidos através das duas técnicas são esperadas. Em alguns casos, entretanto, o número de compostos obtidos por ambas as técnicas é aproximadamente o mesmo,¹⁷³ em outros, o número de compostos detectado por destilação é maior do que o encontrado por HS-SPME como por exemplo na investigação de voláteis de rizomas secos de *Rhodiola rosea*.¹⁷³ Ainda em outro estudo, o número de compostos extraídos por SPME foi maior do que aquele indicado pela literatura, como no caso de folhas frescas de *E. nicholii*, *E. globulus* e *E. citriodora*.⁹⁷

Neste trabalho, 62 compostos foram detectados através de ambas as técnicas de extração utilizadas com as folhas de *E. citriodora*, 57 no óleo hidrodestilado e 48 no headspace das folhas picadas.

O total de compostos detectados tanto através de HS-SPME das folhas picadas, como de hidrodestilação de duas árvores de *E. dunnii* (árvores A e B) foi de 67 compostos. Oito destes estavam presentes apenas no headspace das folhas picadas e outros oito somente nos óleos hidrodestilados.

Um total de 62 compostos foi detectado no óleo hidrodestilado de *E. saligna* e também no headspace de suas folhas picadas. Entre estes, 27 foram detectados apenas no óleo hidrodestilado e 4 somente através de HS-SPME. Os demais foram extraídos por meio de ambas as técnicas.

A Tabela VIII mostra resumidamente as diferenças qualitativas encontradas entre o óleo hidrodestilado e o headspace das folhas picadas nas três espécies de eucalipto em estudo. A Tabela IX apresenta estas diferenças de forma numérica. Neste texto a discussão ficará restrita aqueles compostos cuja presença se repetiu em duas espécies e/ou aqueles presentes em uma só espécie, mas cuja contribuição percentual no total de compostos extraídos chegou próximo a 1% ou foi maior do que isto.

De uma forma geral, não houve variação qualitativa entre os resultados obtidos através de SPME para folhas juvenis totalmente expandidas e aquelas parcialmente expandidas em uma mesma espécie. As variações encontradas entre estas folhas foram de caráter quantitativo, pois a contribuição percentual de alguns compostos variou nos diferentes tipos de folhas. A presença intermitente de alguns compostos no headspace de diferentes folhas de uma mesma espécie, não foi levada em consideração nesta discussão, quando a contribuição das áreas destes compostos relativamente ao total de áreas do cromatograma foi menor do que 1%.

Da mesma forma, não houve variação qualitativa nos resultados obtidos através de HS-SPME, nem no óleo destilado no caso das duas árvores de *E. dunnii* investigadas. Entretanto, a contribuição de alguns compostos, mostrou-se variável, sendo alguns deles apenas encontrados através do uso de SPME, os quais apresentaram contribuição bem maior em *E. dunnii* B do que em *E. dunnii* A: (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), β -cariofileno, germacreno D, (*E,E*)- α -farneseno, (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) e (*E,E,E*)-3,7,11,15-tetrametil-1,3,6,10,14-hexadecapentaeno (TMHP). É digno de nota que foi possível verificar esta variação no headspace das folhas picadas, enquanto nos óleos destilados, o mesmo não foi constatado.

Tabela VIII. Diferenças qualitativas encontradas nos cromatogramas provenientes das extrações do headspace de folhas de eucalipto picadas e dos óleos hidrodestilados de folhas das mesmas árvores.

compostos	n ^o	<i>E. citriodora</i>		<i>E. dunnii</i>		<i>E. saligna</i>	
		HD	SPME	HD	SPME	HD	SPME
éster	1					+	
ni	7					+	
éster	13					+	
éster	14						
(<i>E</i>)- β -ocimeno	19						+
ni	20	+					
ni	21						
terpeno	23	+					
linalol	26					+	
isovalerianato de isoamila	27					+	
endo fenchol	29			+		+	
DMNT	30				+		+
canfolenal	31					+	
trans-pinocarveol	33			+		+	
(<i>E</i>)- β -terpineol	34					+	
isoborneol	37					+	
isopinocanfona	38					+	
pinocarvona	39			+		+	
borneol	40					+	
álcool monoterpênico	41	+					
álcool monoterpênico	42	+					
4-terpinenol	43	+				+	
8-p-cimenol	44			+		+	
α-terpineol	45	+				+	
monoterpeno oxigenado	46					+	
monoterpeno oxigenado	47					+	
trans-carveol	48			+		+	
cis-carveol	50			+		+	
ni	54		+				
terpeno oxigenado	55			+			
timol ou isômero	56					+	
timol ou isômero	57					+	
fenol substituído	58	+					
eugenol	61	+					
β -burboneno	64		+				
β -elemeno	65		+				
β -cubebeno	67				+		
éster aromático	69	+					
α -gurjuneno	72		+				
β -cariofileno	74				+		
α -cariofileno	81				+		
terpeno oxigenado	85					+	
germacreno D	86				+		
(<i>E,E</i>)-α-farneseno	91		+		+		+
sesquiterpeno	92	+					
sesquiterpeno	104					+	
TMTT	107				+		+
espatulenol	108	+		+		+	
sesquiterpeno	117	+					
sesquiterpeno	118	+				+	
TMHP	120				+		

Notas: A coluna designada "n^o", apresenta os números correspondentes à Tabela VI e Figuras do Anexo A; +: presença do composto; ni: não identificado; em verde e negrito: detectado nas 3 espécies de eucalipto; em azul e negrito: detectado em *E. dunnii* e *E. saligna*; em vermelho: composto detectado em *E. citriodora* e *E. saligna*.

Tabela IX. Número de compostos de folhas de eucaliptos detectados através de hidrodestilação e de HS-SPME.

	<i>E. citriodora</i>	<i>E. dunnii</i>	<i>E. saligna</i>
hidrodestilação	57	59	58
HS-SPME	48	59	35
somente por hidrodestilação	14	8	27
somente por HS-SPME	5	8	4

As folhas utilizadas nas extrações com HS-SPME apresentam características diferentes de tamanho e foram colhidas em distintas posições na árvore, propiciando variabilidade e abrangência aos resultados, conforme mostra a Tabela VI. A presença de alguns compostos é intermitente. Nos casos em que a presença intermitente conta com a ausência do respectivo composto em algumas folhas da mesma espécie e a sua presença significativa em outras folhas, esta variabilidade pode estar indicando funções biológicas destes compostos influenciadas por fatores ontogênicos e/ou exógenos. As diferenças encontradas nas análises feitas com folhas diferentes de uma mesma árvore mostram o potencial da técnica de HS-SPME para a investigação de variações entre folhas frescas *ex situ*, devidas a parâmetros ambientais ou endógenos. Sabe-se que fatores como posicionamento das folhas na árvore, idade, intensidade de luz solar, sombra, etc, podem redundar em diferenças entre os óleos das mesmas e/ou de suas emissões voláteis.¹¹⁰

Uma das conclusões da investigação dos voláteis de *Mentha sachalinensis* feito por Rohloff, é que a técnica de HS-SPME pode dar informações mais detalhadas sobre compostos terpenóides menos importantes presentes no headspace desta planta.¹⁷³ No presente trabalho, no entanto, foi possível detectar compostos diferentes daqueles encontrados através de hidrodestilação, para os quais, sugere-se uma possível função na folha de eucalipto. Estes possíveis papéis infoquímicos sugeridos têm por base a literatura consultada e o comportamento destes compostos tanto na extração do headspace das folhas picadas como das folhas *in situ*. Uma explicação provável para que o autor mencionado não tenha

encontrado diferenças qualitativas mais significativas utilizando HS-SPME é que os seus trabalhos tratam de plantas secas, enquanto este trabalho foi desenvolvido com pedaços de folhas picadas ainda vivas e folhas *in situ*.

O mesmo autor, em outro dos seus trabalhos, menciona que, comparando-se os percentuais de área dos picos obtidos por hidrodestilação e aqueles obtidos por HS-SPME, observa-se uma fração mais rica em sesquiterpenóides no cromatograma resultante da HS-SPME do que no da hidrodestilação.¹⁰² Outros pesquisadores reafirmam esta conclusão.⁹⁷ Este trabalho também confirma esta constatação, visto que foram encontrados hidrocarbonetos sesquiterpenóides através de SPME que não foram detectados no óleo destilado das mesmas árvores (Tabela VIII). A contribuição de alguns destes hidrocarbonetos é variável nas diferentes folhas investigadas, conforme mostra a Tabela VI. Como já foi mencionado anteriormente, isto pode estar indicando que a planta produz e/ou libera estes compostos em função de sua fase de desenvolvimento ou de fatores externos que possam provocar reações na planta. Entretanto, 2 compostos não identificados que eluem na região dos sesquiterpenos oxigenados, foram encontrados apenas no óleo destilado. A Figura 25 apresenta a região do cromatograma onde eluem hidrocarbonetos sesquiterpenóides de *E. dunnii* encontrados apenas através de HS-SPME e a Figura 26 amplia parte desta região do cromatograma para facilitar a visualização dos picos.

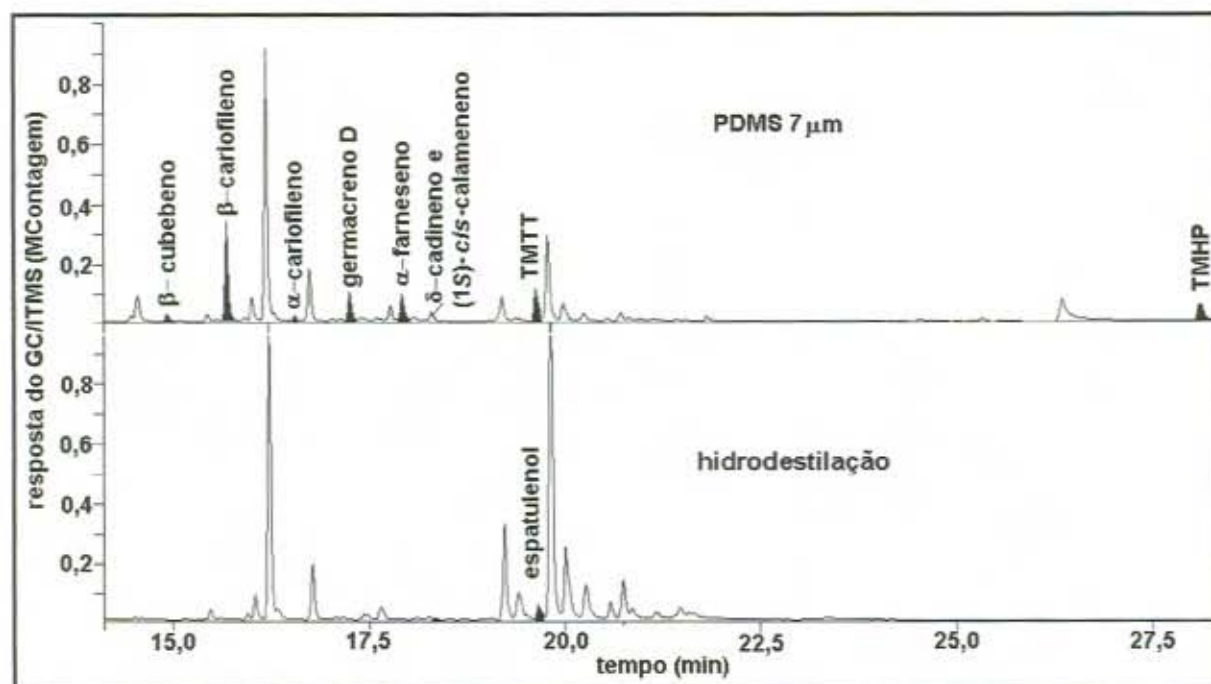


Figura 25. Fração do cromatograma do íon total obtido por HS-SPME de folhas picadas de *E. dunnii* e por hidrodestilação das folhas, salientando a região onde eluem os sesquiterpenos não detectados por hidrodestilação (picos preenchidos em preto). Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

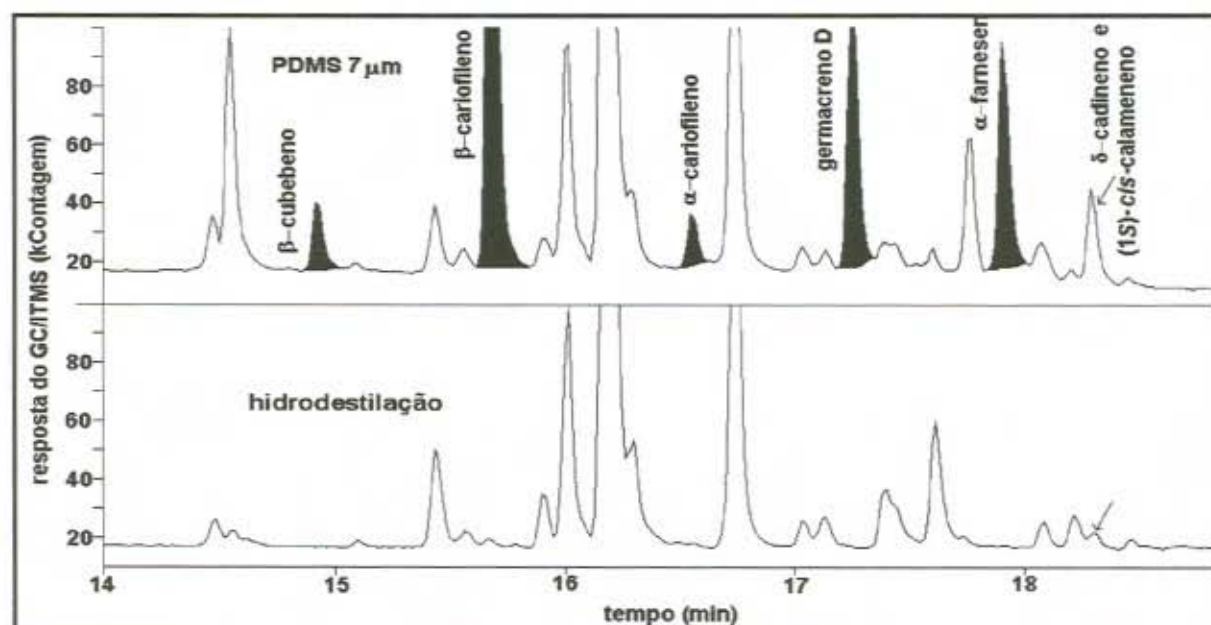


Figura 26. Fração do cromatograma do íon total obtido por HS-SPME de folhas picadas de *E. dunnii*, salientando a região onde eluem 5 sesquiterpenos (picos preenchidos em preto) que não foram detectados no óleo hidrodestilado. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

Três compostos, cujas fragmentações no espectrômetro de massas apresentam um padrão semelhante, foram encontrados apenas no headspace das folhas picadas de eucaliptos e foram tentativamente identificados como (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT - Figuras 27, 30 e 31), seu homólogo superior (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) (Figura 28) e (*E,E,E*)-3,7,11,15-tetrametil-1,3,6,10,14-hexadecapentaeno (TMHP) (Figuras 25 e 29). A identificação dos dois primeiros compostos não é tarefa fácil, pois os espectros de massas dos mesmos não estão incluídos nas bibliotecas de espectros utilizadas neste trabalho e também porque outros compostos incluídos nestas bibliotecas (perileno e dendrolasina), possuem espectros de massas semelhantes e índices de retenção (LTPRI) muito próximos na coluna cromatográfica HP-5MS.^{202;216} A dendrolasina é conhecida como feromônio de alarme da formiga *Lasius fuliginosus* Latr.,^{217;218} além de fazer parte da fragrância floral do girassol, do aroma da orquídea *Listera ovata*⁸⁴ e da fragrância das folhas de dama da noite.¹³⁷

A Figura 27 mostra a semelhança do espectro de massas do DMNT e do perileno e a Figura 28 apresenta a semelhança dos espectros de massas do TMTT e da dendrolasina. Para melhor compreensão da identificação tentativa destes compostos, são descritos a seguir os critérios empregados pelo algoritmo de pesquisa do equipamento GC/ITMS Saturn 4D na busca dos espectros de massas mais semelhantes aos desconhecidos, na biblioteca de espectros de massas:

Pureza (P): O algoritmo mede a semelhança entre os espectros de massas do composto na amostra e os espectros de massas da biblioteca NIST 98. Valores acima de 700 são considerados aceitáveis.

Conformidade (F do inglês "fit"): O algoritmo efetua uma medida que reflete quantos fragmentos do espectro de massas do composto desconhecido estão contidos nos espectros de massas da biblioteca, levando também em consideração a intensidade dos picos.

Conformidade reversa (RF do inglês "reverse fit"): O algoritmo efetua uma medida que reflete o número de fragmentos dos espectros de massas da biblioteca que estão contidos no espectro de massas do composto desconhecido, levando também em consideração a intensidade dos picos.

Os resultados obtidos através da busca automática dos espectros de massas mais semelhantes aos desconhecidos no GC/ITMS Saturn 4D foram: P 762, F: 827, RF: 808 para DMNT e P: 803, F: 890, RF: 803 para TMTT. Os mesmos

parâmetros obtidos para dendrolasina e perileno apresentaram valores. Estes resultados confirmam a identificação tentativa de DMNT e TMTT.

O terpeno identificado como DMNT foi também encontrado nas emissões gasosas de *E. saligna* e *E. dunnii* durante dois dias de amostragem *in situ* e o TMTT foi detectado no 3º dia de amostragem de folhas de *E. saligna in situ*, conforme relato no item 3.2.2 deste Capítulo. Sabe-se que estes compostos apresentam um alto impacto ecológico e as considerações feitas no item citado podem também ser estendidas aos experimentos realizados com folhas picadas, visto que a presença destes compostos no headspace das folhas de *E. dunnii* e *E. saligna* e sua ausência no óleo hidrodestilado pode estar indicando uma possível função biológica dos mesmos.²¹⁹

O espectro de massas do terceiro composto que aparece no headspace das folhas de *E. dunnii* com íon base 69 está na Figura 29, juntamente com o espectro do TMHP. Este composto terpenóide, que elui na região dos sesquiterpenos oxigenados da Figura 25, pode ser tentativamente identificado como TMHP ou isômero deste, visto que o seu espectro de massas apresentou-se semelhante ao deste composto, conforme mostra a Figura 29. Os valores de P, F e RF para este composto foram 803, 922 e 922, respectivamente. É interessante observar a semelhança estrutural entre (*E*)- β -ocimeno, (*E,E*)- α -farneseno e TMHP. A presença desta série homóloga no headspace das folhas de eucalipto picadas e/ou das folhas *in situ* pode, possivelmente, estar fornecendo informações que auxiliem no estudo da biogênese de alguns destes compostos.

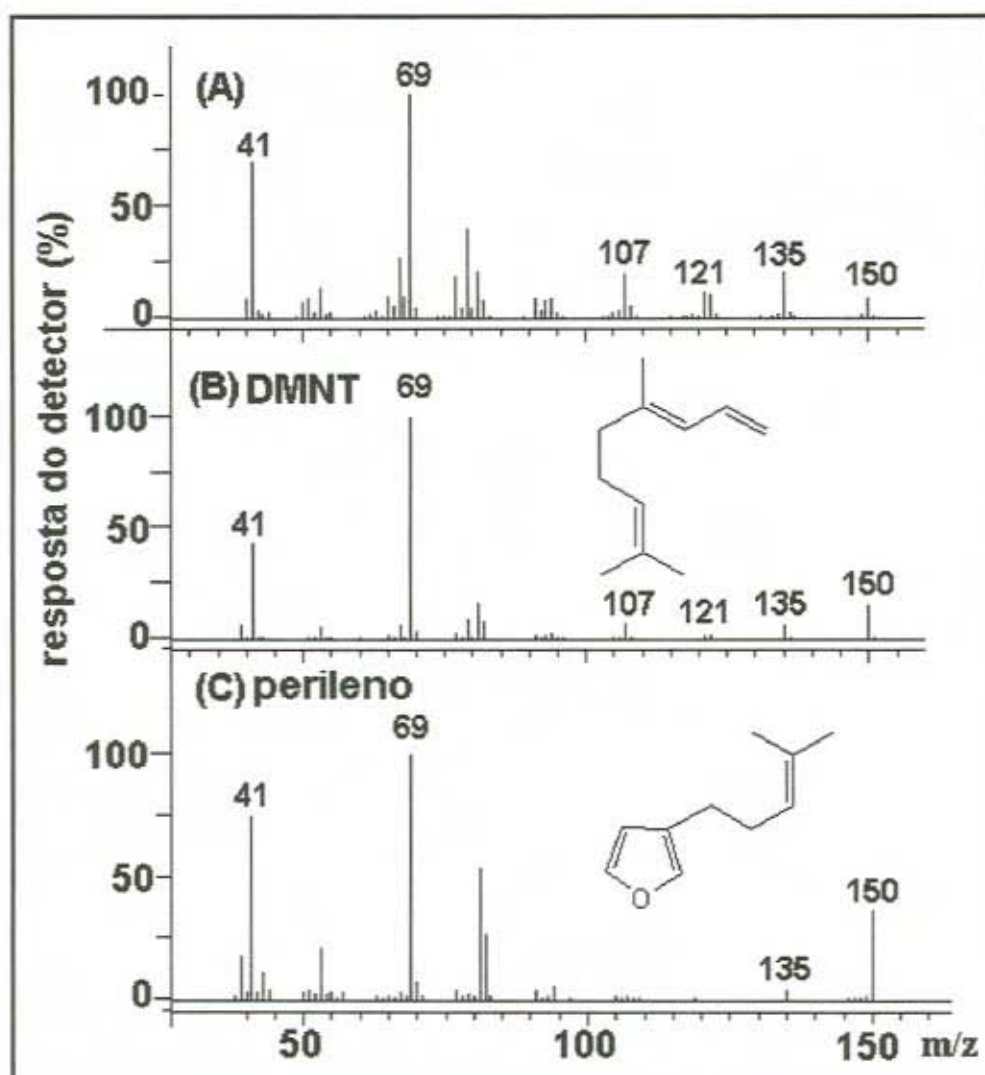


Figura 27. Espectro de massas de composto emitido por folhas picadas de *E. dunnii* e *E. saligna* (A) comparado aos espectros de massas do DMNT (B) e perileno (C). Espectros de massas do DMNT e perileno obtidos em GC/MS de quadrupolo Finnigan MAT gentilmente cedidos pelo Dr. M. A. Posthumus da Universidade de Wagenigen.

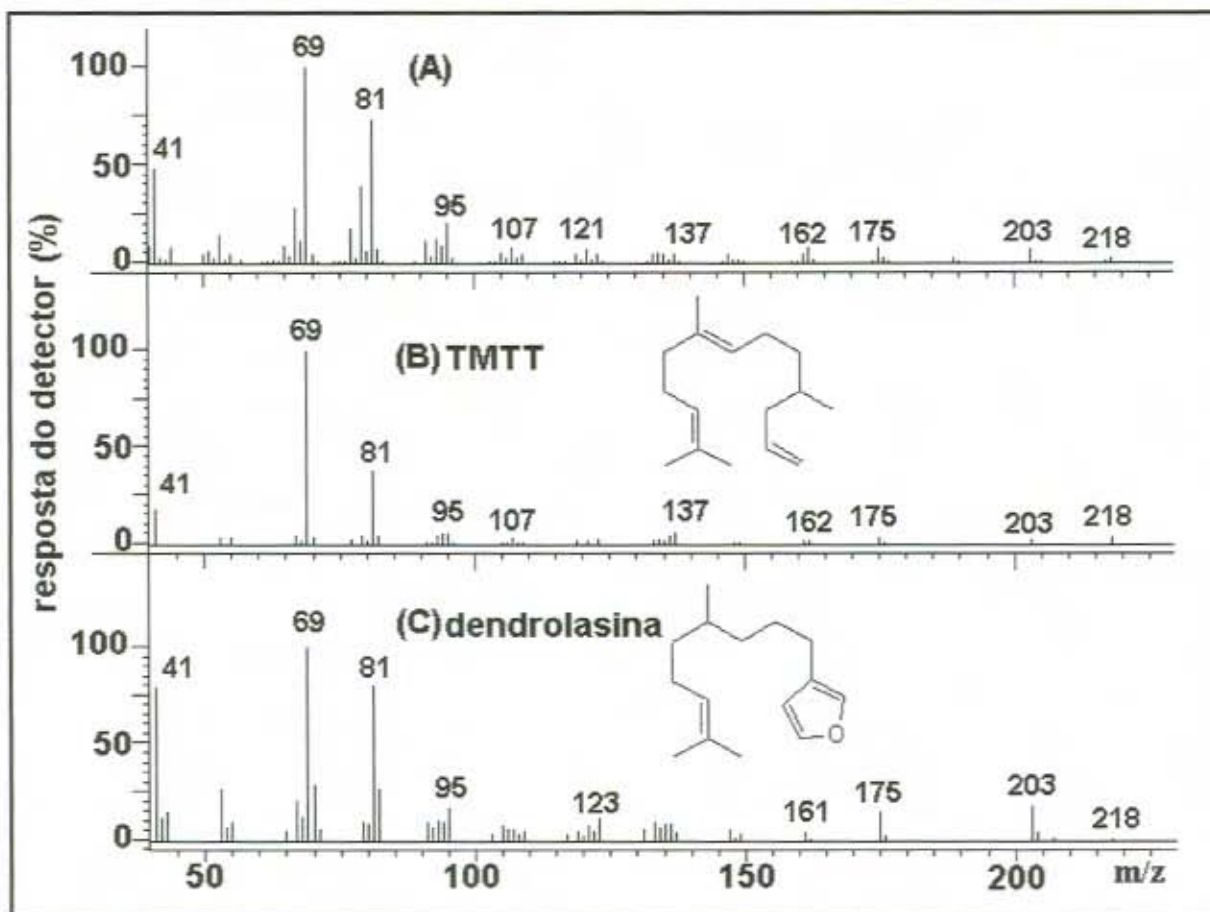


Figura 28. Espectro de massas de composto emitido por folhas de *E. dunnii* e *E. saligna* picadas (A) comparado aos espectros de massas do TMTT (B) e dendrolasina (C). Espectros de massas do TMTT e dendrolasina obtidos em GC/MS de quadrupolo Finnigan MAT, gentilmente cedidos pelo Dr. M. A. Posthumus da Universidade de Wagenigen.

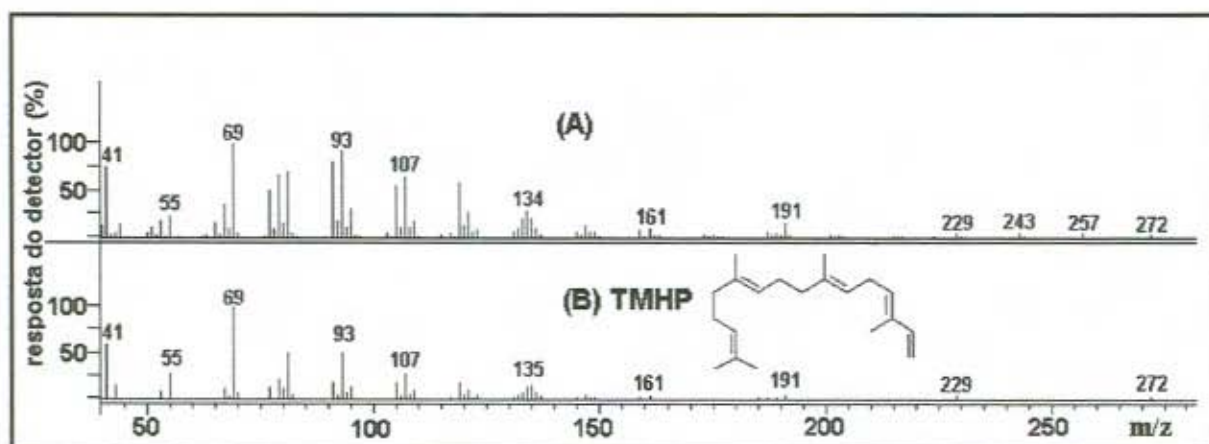


Figura 29. Espectro de massas de um composto terpenóide detectado somente através de SPME (A) comparado ao espectro de massas do TMHP (B).

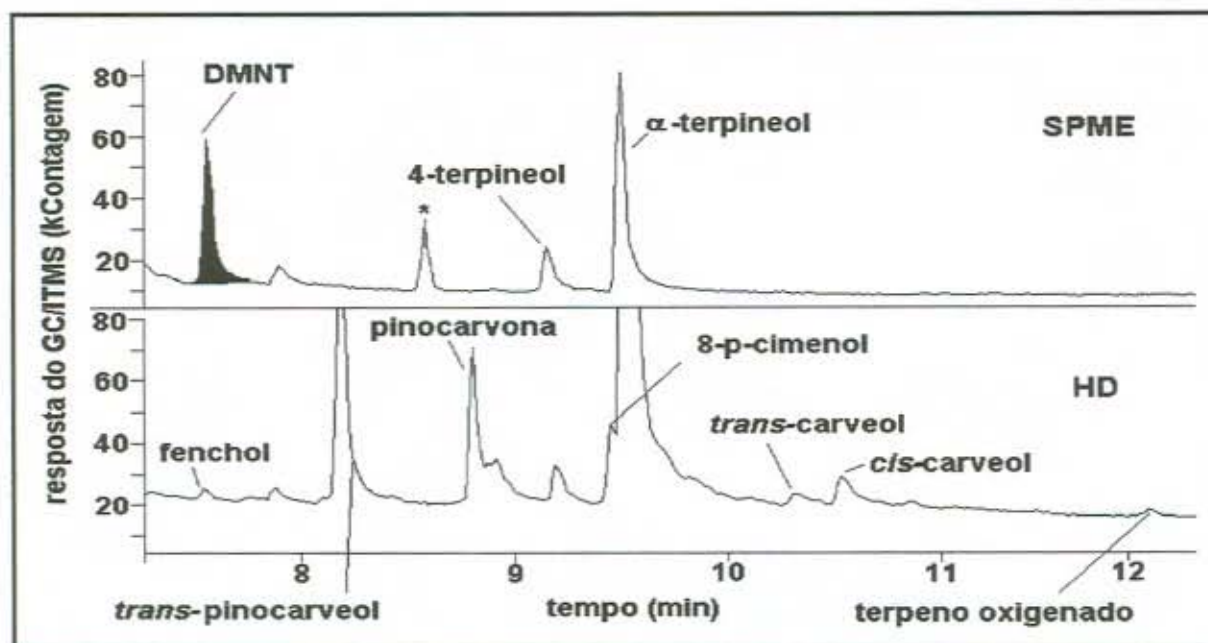


Figura 30. Cromatograma do íon total, salientando a presença do pico cromatográfico correspondente ao DMNT que foi detectado apenas através de HS-SPME em *E. dunnii* e *E. saligna* e 7 outros picos dos compostos oxigenados detectados no óleo hidrodestilado de *E. dunnii*. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

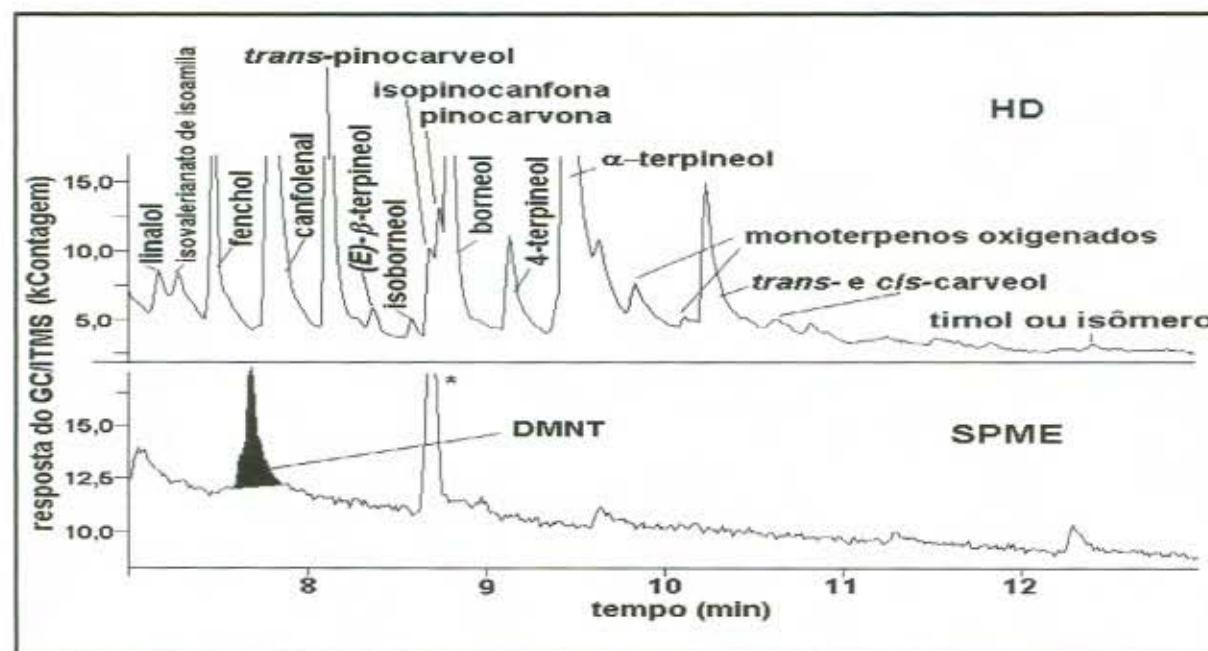


Figura 31. Cromatograma do íon total, salientando a presença do pico cromatográfico correspondente ao DMNT que foi detectado apenas através de HS-SPME em *E. dunnii* e *E. saligna* e 17 outros picos dos compostos oxigenados detectados no óleo hidrodestilado de *E. saligna*. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

O composto (*E,E*)- α -farneseno foi detectado no headspace das folhas picadas das três espécies de eucalipto, mas não o foi nos óleos hidrodestilados. A literatura consultada não registra a presença deste composto em nenhum óleo de eucalipto. O mesmo se aplica ao DMNT, TMTT e ao TMHP. Nem mesmo em extrações realizadas em condições mais amenas de folhas de *E. dunnii* e *E. saligna*, como nas destilações a vácuo a baixas temperaturas, foram encontrados (*E,E*)- α -farneseno, DMNT, TMTT e TMHP.⁶³⁻⁷³

O sesquiterpeno (*E,E*)- α -farneseno está presente na fruta e é emitido pela mesma e pelas folhas de macieiras, macieiras ácidas e pereiras.²²⁰ Investigações demonstraram que a quantidade de (*E,E*)- α -farneseno emitida por maçãs aumentou devido a uma infestação da larva da maçã, *Hoplocampa testudinea*.²²¹ Outro estudo envolvendo maçãs mostrou que as frutas infestadas são mais atrativas para a lagarta recém nascida e contêm uma quantidade maior de (*E,E*)- α -farneseno.²²⁰ Takabayashi e colaboradores reportaram um aumento na emissão de (*E,E*)- α -farneseno nas folhas de macieiras após a infestação com o ácaro *Tetrachynus urticae*.⁴⁴ De forma semelhante, quantidades maiores de (*E,E*)- α -farneseno foram emitidas por folhas de algodão devido à infestação com a larva *Spodoptera exigua* Hübner e também por nozes ("green walnut Hartley var.") que haviam sido infestadas por *Cydia pomonella*.²²² As fêmeas da mariposa *Cydia pomonella* são atraídas por baixas dosagens de (*E,E*)- α -farneseno (começando com 63,4 ng) e repelidas por altas dosagens (máximo de 12688 ng). A resposta das lagartas não difere quando distintas dosagens de ambos os isômeros [(*E,E*) e (*Z, E*)] deste sesquiterpeno são utilizadas, indicando que ambos apresentam bioatividade semelhante relativamente à *Cydia pomonella*.^{220,223} Outros estudos onde o (*E,E*)- α -farneseno é apontado na literatura como possível infoquímico podem ser citados: como atrativo emitido por fêmeas da espécie de *M. matrida* relativamente a machos e fêmeas da mesma espécie;²²⁴ na orientação de herbívoros ou polinizadores na localização da flor de *Brassica napus*, sendo ele, o único composto do aroma desta flor a elicitar uma forte resposta na antena do gorgulho *Ceutorhynchus assimilis*;²²⁵ como componente minoritário do feromônio sexual da mosca-de-frutas do Caribe contido em secreção oral de machos adultos;²²⁶ como um dos componentes dos voláteis da planta de tabaco que provoca fortes respostas na antena da lagarta-da-

maçã-do-algodoeiro *Heliopsis virescens*,²²⁷ como promotor de fortes respostas na antena da lagarta da maçã, *Cydia pomonella*,¹¹¹ na diminuição da atratividade de uma mistura de voláteis emitidos por *Adenostyles alliariae* relativamente ao herbívoro *Oreina cacaliae* quando a quantidade de (*E,E*)- α -farneseno é menor.³⁸

Ao contrário disto, espatulenol foi encontrado nos óleos hidrodestilados das três espécies, embora não tenha sido detectado no headspace das folhas de eucalipto picadas. Espatulenol é um sesquiterpeno oxigenado comum nos óleos de eucalipto e nos óleos destilados de muitas outras plantas superiores, importante para a indústria de perfumes e fragrâncias, apresentando propriedades olfativas interessantes.^{15,228} Em uma investigação dos constituintes de plantas hepáticas (*Plagiochila fruticosa* e outras), descobriu-se que o (-)-*ent*-biclogermacreno transformou-se em (-)-*ent*-espatulenol à temperatura ambiente, indicando que o (-)-*ent*-espatulenol nas plantas hepáticas é um artefato.²²⁹ À luz destes fatos, parece razoável avaliar a possibilidade de que o espatulenol presente no óleo destilado de eucalipto seja um artefato resultante do processo de destilação e, por esta razão, não teria sido encontrado no headspace das folhas picadas de eucalipto. Entretanto, não foi detectada a presença de biclogermacreno no headspace das folhas picadas de eucalipto. Em estudo dos óleos de *E. varia* subsp. *varia* Brooker e Hooper e *E. sparsa* Boomsma verificou-se que a quantidade de biclogermacreno nos óleos obtidos através de técnicas de extração mais amenas como SFE e destilação a vácuo foi maior do que a obtida através de hidrodestilação, contudo, neste caso, não foi constatada uma relação entre o aumento da quantidade de biclogermacreno e a diminuição de espatulenol.²

A literatura não apresenta biclogermacreno como componente dos óleos destilados de *E. dunnii*.^{15,77,189} Para *E. saligna* e *E. citriodora* biclogermacreno foi encontrado em apenas um trabalho publicado.¹⁹²

A presença de β -cariofileno no headspace das folhas picadas de *E. dunnii* A e B e também destas folhas *in situ*, é comentada no item 3.2.2 deste Capítulo, pois este sesquiterpeno também foi encontrado nas emissões de folhas de eucalipto *in situ*.

Quanto ao β -cubebeno, α -cariofileno e germacreno D, nenhuma das fontes de literatura anteriormente citadas menciona sua presença em óleo hidrodestilado de *E. dunnii*.

O sesquiterpeno α -cariofileno é encontrado nas emissões de várias plantas, como por exemplo: algodoeiros,³⁷ noqueira,²²² algumas espécies de *Magnolia*,²⁰³ flores de *Momordica charantia* e *Luffa acutangula*,¹⁰⁰ e folhas de *Salvia officinalis*.²³⁰

O α -cariofileno e germacreno D também já foram encontrados em plantas hospedeiras danificadas, como por exemplo, nas emissões de folhas de *Adenostyles alliariae* recém danificadas, as quais mostraram-se mais atraentes para o herbívoro *Oreina cacaliae* do que as folhas desta planta, em um outro momento, quando as quantidades de α -cariofileno e germacreno D emitidas eram menores.³⁸ Também foram encontrados nas emissões voláteis de "nasturdium" (*Tropaeolum majus* cv. Mahogeny), infestado por insetos da espécie *Pieris*.¹⁴³

O sesquiterpeno (-)germacreno D parece mascarar a atratividade do pinheiro em relação ao *Monochamus alternatus*.²³¹ Em investigação que objetiva descobrir infoquímicos relacionados à postura de ovos de *Cydia pomonella*, a antena das fêmeas deste inseto respondeu ao germacreno D.²²³ Este sesquiterpeno é encontrado nas emissões voláteis de algumas flores^{84,106}, de folhas de macieira,⁴⁴ de galhos de macieira com folhas e frutas,¹¹¹ e de nozes.²²²

A mistura de compostos voláteis emitida por folhas de macieira pertencentes a cultivares mais suscetíveis ao ataque do herbívoro *Popillia japonica* Newman continha níveis mais altos de β -cariofileno, germacreno D e (*E,E*)- α -farneseno comparativamente a cultivares mais resistentes.

Em extrações do headspace de folhas frescas de *E. globulus* e *E. nicholii*, germacreno D e α -cariofileno foram também encontrados através de HS-SPME, embora a literatura consultada não registre a presença destes compostos nos óleos destilados destas mesmas espécies australianas.⁹⁷

Todas estas informações sobre o desempenho de funções infoquímicas por parte dos terpenos encontrados no headspace de folhas picadas de eucalipto reforçam a hipótese de que estes compostos possam também desempenhar alguma função biológica no contexto do eucalipto. Contudo, como este trabalho propõe-se apenas a apresentar os resultados da aplicação da HS-SPME ao headspace das folhas picadas e *in situ*, a confirmação final da existência de uma informação química veiculada entre ou intra-organismos através destes compostos, fica além do escopo deste texto. De fato, a descoberta destes compostos através de HS-SPME traz indicativos que podem servir para estudos futuros nesta direção.

Na região do cromatograma onde eluem os monoterpenos, a presença de endo fenchol, *trans*-pinocarveol, pinocarvona, 8-p-cimenol, *trans*-carveol e *cis*-carveol foi observada no óleo hidrodestilado, mas não no headspace de *E. dunnii* e *E. saligna*, ao passo que, nesta mesma região, o DMNT foi detectado apenas no headspace das folhas picadas destas duas espécies, como já foi mencionado. As Figuras 30 e 31 apresentam a região do cromatograma onde eluem os monoterpenos oxigenados presentes nos óleos hidrodestilados de *E. dunnii* e *E. saligna*, respectivamente. Além disso, as Figuras 14 a 16 apresentam os compostos detectados apenas no óleo hidrodestilado indicados por números sublinhados. A literatura mostra que os monoterpenos oxigenados detectados no óleo de *E. saligna* e *E. dunnii* são também encontrados nos óleos de várias outras espécies de eucalipto, quando se utiliza a técnica de destilação. Nas espécies em estudo, a literatura apresenta a presença ora de alguns destes compostos, ora de outros nos óleos destilados^{15;189;192;195} e ainda em eucaliptos etíopes, nenhum deles foi detectado.¹⁸⁷

Duas hipóteses poderiam ser levantadas para explicar a não detecção destes compostos oxigenados no headspace das folhas picadas de eucalipto e a sua detecção nos óleos hidrodestilados: 1. a baixa afinidade dos monoterpenos oxigenados pelo filme de PDMS devido a polaridade destes compostos e também a capacidade restrita do filme de PDMS 7 µm;¹⁰⁹ 2. estes terpenos poderiam ser artefatos resultantes de transformações químicas que ocorreram durante o processo de hidrodestilação.^{32;196;197;232}

A hipótese mais provável parece ser a primeira, tendo em vista que resultados obtidos através da técnica mais branda de destilação a vácuo a baixas temperaturas também mostram a presença de *trans*-pinocarveol, pinocarvona e 8-p-cimenol no óleo de *E. dunnii*.⁷⁷

Outro dado interessante é que através de extrações feitas no headspace de plantas secas, utilizando-se PDMS 100 µm por 1 min a 50 °C, foram detectados *trans*-pinocarveol e pinocarvona. Nos mesmos procedimentos de extração, isopinocanfona também foi detectada, mas *trans*- e *cis*-carveol, timol e carvacrol não foram detectados por HS-SPME. Estes últimos estavam presentes no óleo destilado de *E. saligna*, mas não foram detectados por HS-SPME.

Durante os experimentos preliminares deste trabalho, os filmes poliméricos PDMS e PA foram testados utilizando-se um tempo de extração de 1 min e uma

temperatura de 24 °C. Nenhum monoterpeneo oxigenado, além do 4-terpineol e do α -terpineol, foi encontrado no headspace de folhas de *E. dunnii* a partir da extração feita com PA. Poder-se-ia esperar que, devido a maior afinidade do filme de poliacrilato por compostos polares, outros compostos oxigenados, diferentes daqueles detectados a partir do uso de PDMS, fossem encontrados. Contudo, conforme mencionado no item 2.1.1 deste Capítulo, isto não ocorreu. Pelo que indicam os resultados, o headspace daquelas folhas de *E. dunnii*, extraídas com PA e PDMS, não continham quaisquer outros terpeno oxigenados, além dos mencionados.

Ao mesmo tempo, sabe-se que a ocorrência de reações do tipo oxidação, rearranjos, hidrólise, entre outras, durante o processo de destilação, são há muito conhecidas e algumas destas transformações químicas foram mencionadas no item 2.1.2 deste Capítulo.^{32;196;197;214;233}

Tendo em vista que não foi possível chegar-se a uma conclusão final sobre as razões da não detecção destes monoterpenos oxigenados por HS-SPME, fica sugerida a posterior investigação desta questão em futuros trabalhos, através do uso simultâneo de vários filmes poliméricos (PA, PDMS/DVB, etc) no headspace de folhas de eucaliptos que contenham diversos monoterpenos oxigenados em seus óleos destilados.

Todos os compostos identificados ou tentativamente identificados no headspace de folhas picadas são hidrocarbonetos não oxigenados. A presença destes hidrocarbonetos terpenóides no headspace das folhas picadas pode estar indicando que tais compostos foram transformados durante a hidrodestilação e, por isto, não puderam ser detectados nos óleos hidrodestilados. Outra hipótese seria a produção destes compostos pelos pedaços de folhas durante o período de preparo da amostra e/ou de amostragem através de reações enzimáticas. É importante lembrar que, embora as folhas tenham sido reduzidas a pedaços, elas ainda desempenham funções biológicas de uma folha viva, como por exemplo, respiração e fotossíntese. A HS-SPME mostrou-se uma ferramenta rápida e de simples execução para a extração destes compostos, propiciando um estudo preliminar da composição do headspace de folhas vivas picadas de eucalipto *ex situ*.

3. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO HEADSPACE APLICADA A FOLHAS DE EUCALIPTO *in situ*

3.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES

Estes experimentos foram realizados com o intuito de verificar a possibilidade do uso de HS-SPME para amostragem de voláteis emitidos por uma única folha de eucalipto e também para determinar quais os parâmetros operacionais a serem utilizados na seqüência de experimentos seguintes deste trabalho, tais como tipos de filmes poliméricos a serem empregadas e tempo de extração. As quantidades de compostos voláteis extraídas pelas fibras recobertas por polímeros líquidos - PDMS 100 μm e PA – foram baixas quando comparadas às fibras sólidas. Utilizando PDMS, foi possível visualizar íons característicos de alguns terpenos nas três amostragens realizadas, contudo a relação S/N foi sempre inferior a três, enquanto ao utilizar-se PA, não foi sequer possível discriminar quaisquer picos do sinal de fundo no cromatograma. Concluiu-se, portanto, que as melhores fibras para o monitoramento de compostos voláteis de eucalipto *in situ* são as fibras sólidas. Com elas, foi possível visualizar os picos e os espectros de massas correspondentes a alguns dos terpenos emitidos pelas folhas.

No passo seguinte, a fibra recoberta por CAR/PDMS foi utilizada para amostrar os voláteis emitidos por folhas de *E. citriodora* infestada pelo inseto *Pseudococcus longispinus* e por folhas de outra árvore de *E. citriodora* saudável. Ambas as folhas foram danificadas mecanicamente antes de se proceder à extração. A extração do ar próximo à folha foi feita imediatamente após o dano mecânico, 22 min e 44 min após. Os intervalos de tempo para a amostragem foram escolhidos em função da duração da análise cromatográfica. A Figura 32 mostra um diagrama representativo das áreas obtidas para os picos cromatográficos dos compostos voláteis emitidos pelas folhas saudáveis e a Figura 33 das folhas infectadas. Estas figuras mostram que o comportamento das plantas nas duas situações é diferente. Na mistura de voláteis emitidos pelas folhas doentes, isopulegol foi detectado enquanto o mesmo não ocorreu com as folhas saudáveis. A variação nas quantidades extraídas ao longo da amostragem também foi distinta. No

caso das folhas saudáveis, a quantidade máxima de analitos é extraída imediatamente após o dano mecânico ser realizado, diminuindo abruptamente nas amostragens seguintes; ao passo que nas folhas doentes, a quantidade máxima de analitos é extraída aos 22 min depois de efetuado o dano mecânico ao tecido.

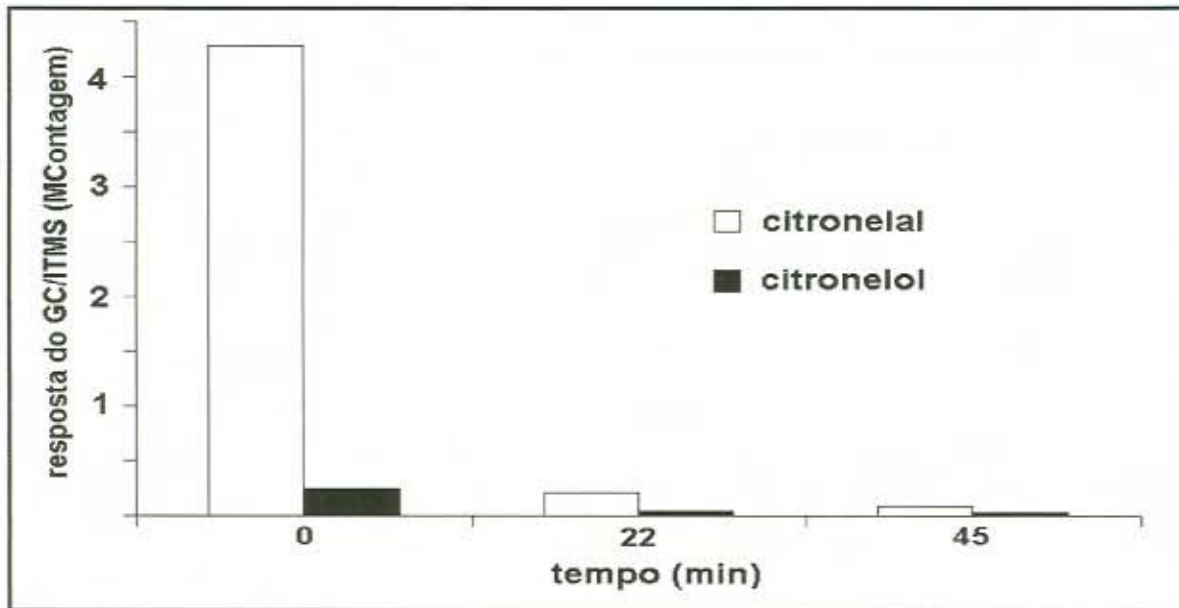


Figura 32. Diagrama representativo da variação das áreas dos picos cromatográficos dos compostos voláteis emitidos por folhas saudáveis de *E. citriodora*, após dano mecânico, utilizando-se CAR/PDMS.

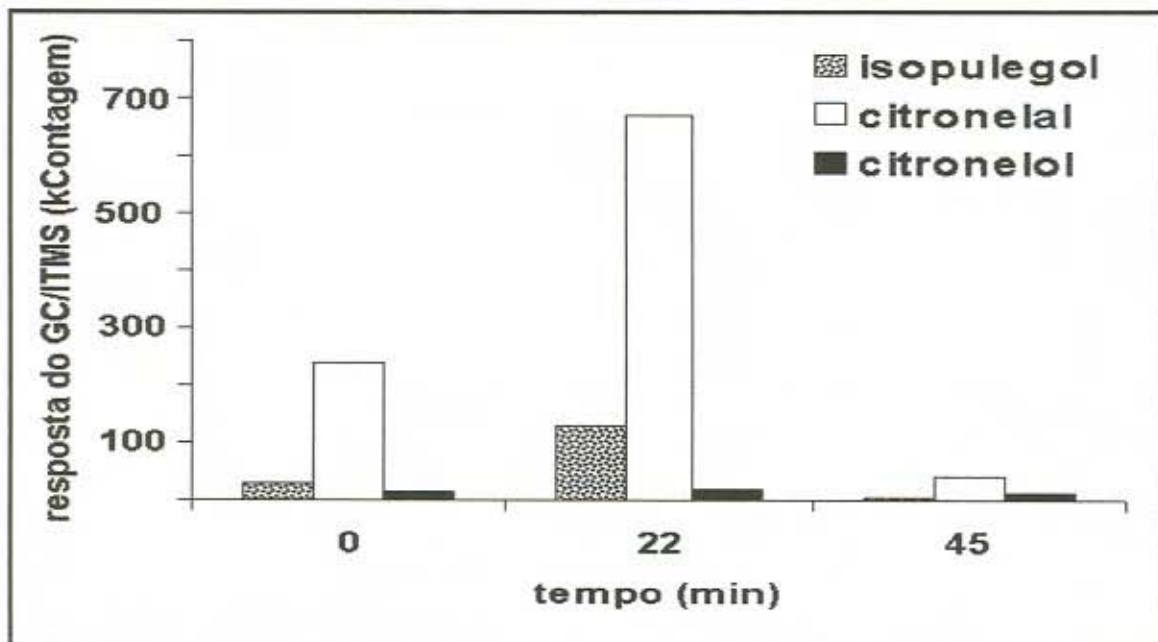


Figura 33. Diagrama representativo da variação das áreas dos picos cromatográficos dos compostos voláteis emitidos por folhas de *E. citriodora* infectadas, após dano mecânico, utilizando-se CAR/PDMS.

Na etapa seguinte, as fibras recobertas por filmes de PDMS/DVB e CAR/PDMS foram submetidas à amostragem simultânea dos voláteis de folhas mecanicamente danificadas de *E. citriodora*, conforme Figura 12, a fim de verificar a eficiência de extração das mesmas. A Figura 34 mostra claramente a eficiência superior da PDMS/DVB, visto que as áreas obtidas para os picos dos compostos citronelal, citronelol e β -cariofileno, usando-se PDMS/DVB, foram maiores do que as obtidas com CAR/PDMS. Além disso, os compostos isopulegol e acetato de citronelila só puderam ser detectados por PDMS/DVB. Estes resultados determinaram a adoção de PDMS/DVB para a investigação sistemática de voláteis emitidos por folhas de eucalipto *in situ* descrito no item 3.2 deste Capítulo.

3.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS COM EUCALIPTOS *in situ* UTILIZANDO-SE CÂMARA DE VIDRO

Já que o número de compostos detectados nas extrações realizadas em ambiente aberto foi limitado, a câmara de vidro silanizado descrita no Capítulo III item 5.2 e Figuras 11 e 12 foi utilizada no restante deste trabalho. A Tabela X lista alguns dos compostos voláteis emitidos pelas folhas de *E. citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna in situ* e identificados nestes experimentos, enquanto as Figuras 35A, 35B, 35C mostram cromatogramas representativos destes compostos.

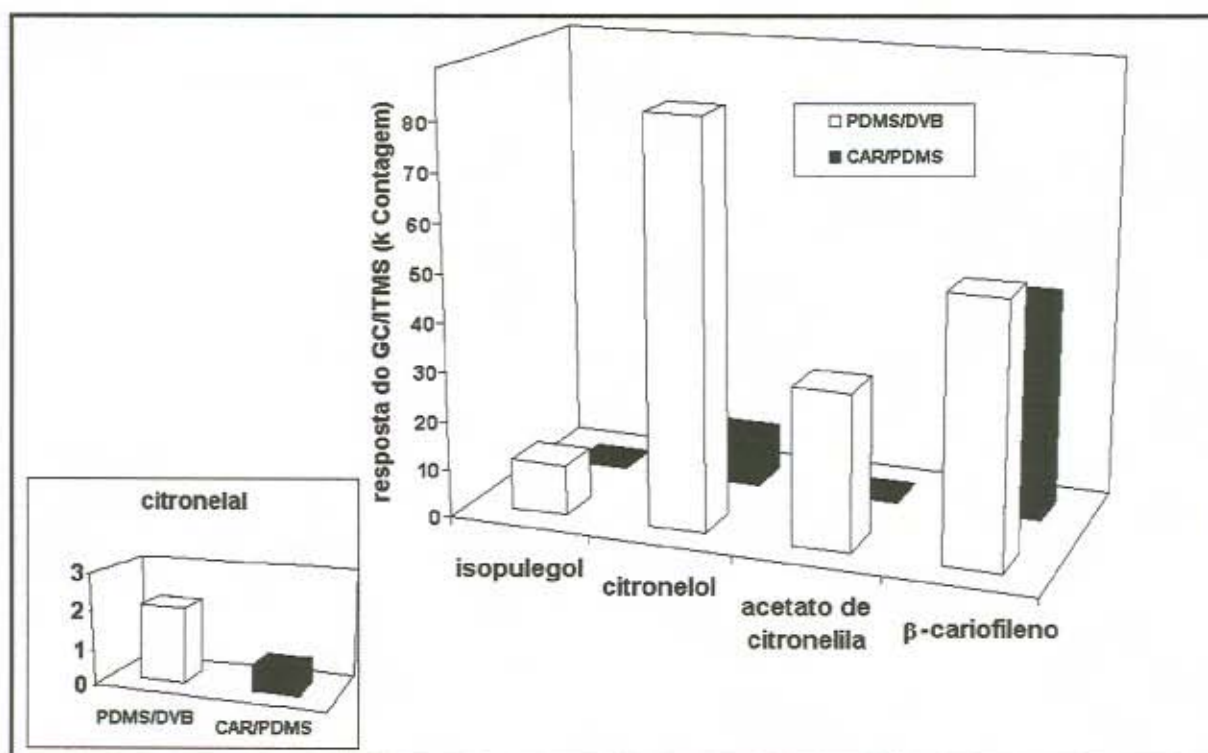


Figura 34. Diagrama representativo das áreas obtidas para os picos cromatográficos de compostos voláteis emitidos por folhas de *E. citriodora* utilizando-se fibras recobertas com polímeros porosos.

Tabela X. Identificação e abundâncias relativas (AR) dos VOC emitidos por folhas de *E. citriodora*, *E. dunnii*, e *E. saligna* através de extrações de 1 min utilizando-se o polímero PDMS/DVB.

n ^o	Composto	abundâncias relativas ^a		
		<i>E. citriodora</i>	<i>E. dunnii</i>	<i>E. saligna</i>
	isopreno ^b	++ / +	x / +	++ / +
	hexenal		x ^e	x ^e
	3-(Z)-hexenol -1		x ^e	
3	α-tujeno	x		
4	α-pineno	+	++	++
5	canfeno		x ^e	x
8	sabineno^c	x		
9	β-pineno ^c	+	x	x ^e
10	β-mirceno	x	x ^e	
11	α-felandreno		x ^e	x ^e
	3-(Z)-acetato de hexenila		x ^e	x ^e
15	p-cimeno		++ / +	++
16/17	limoneno + eucaliptol ^d	+	++	+
18	(Z)-β-ocimeno	x	x ^e	x ^e
19	(E)-β-ocimeno ^b	+ / x	x / ++	+ / ++
22	γ-terpineno		+ / x	+
24	terpinoleno			x ^f
26	linalol	+		
28	cis-óxido de rosa	+		
31	canfolenal			+ / x ^{b,f}
32	trans-óxido de rosa	+		
35	isopulegol	+ / x ^b		
36	citronelal	++		
45	α-terpineol		x ^e	x ^f
48	trans-carveol			x ^f
49	citronelol	++		
	3,7-dimetil-2,6-octadienal	x		
60	acetato de citronelila	+		
	3,7-dimetil-2,6-acetato de octadienila	x		
74	β-cariofileno	++	+ ^g	x
78	aromadendreno		+	x ^e
81	α-cariofileno	x		
110	globulol		+ / x ^e	x ^e

Notas: a. ++ = área do pico corresponde usualmente a 10,0% ou mais da área total dos picos identificados; + = área do pico situa-se usualmente entre 1,0% e 10,0% da área total dos picos identificados e x = área do pico corresponde usualmente a menos de 1,0% da área total dos picos identificados; b. abundância relativa extremamente variável de amostra para amostra; c. separação incompleta; d. substâncias que coeluem; e. presença do composto não é constante durante todo o período de amostragem; f. presente somente no laboratório; g. não está presente em *E. dunnii* B; célula em branco indica que o composto não foi detectado; nomes de compostos escritos em negrito indicam que estes foram tentativamente identificados; n^o. corresponde aos números da Tabela VI e às fórmulas estruturais presentes no Anexo A.

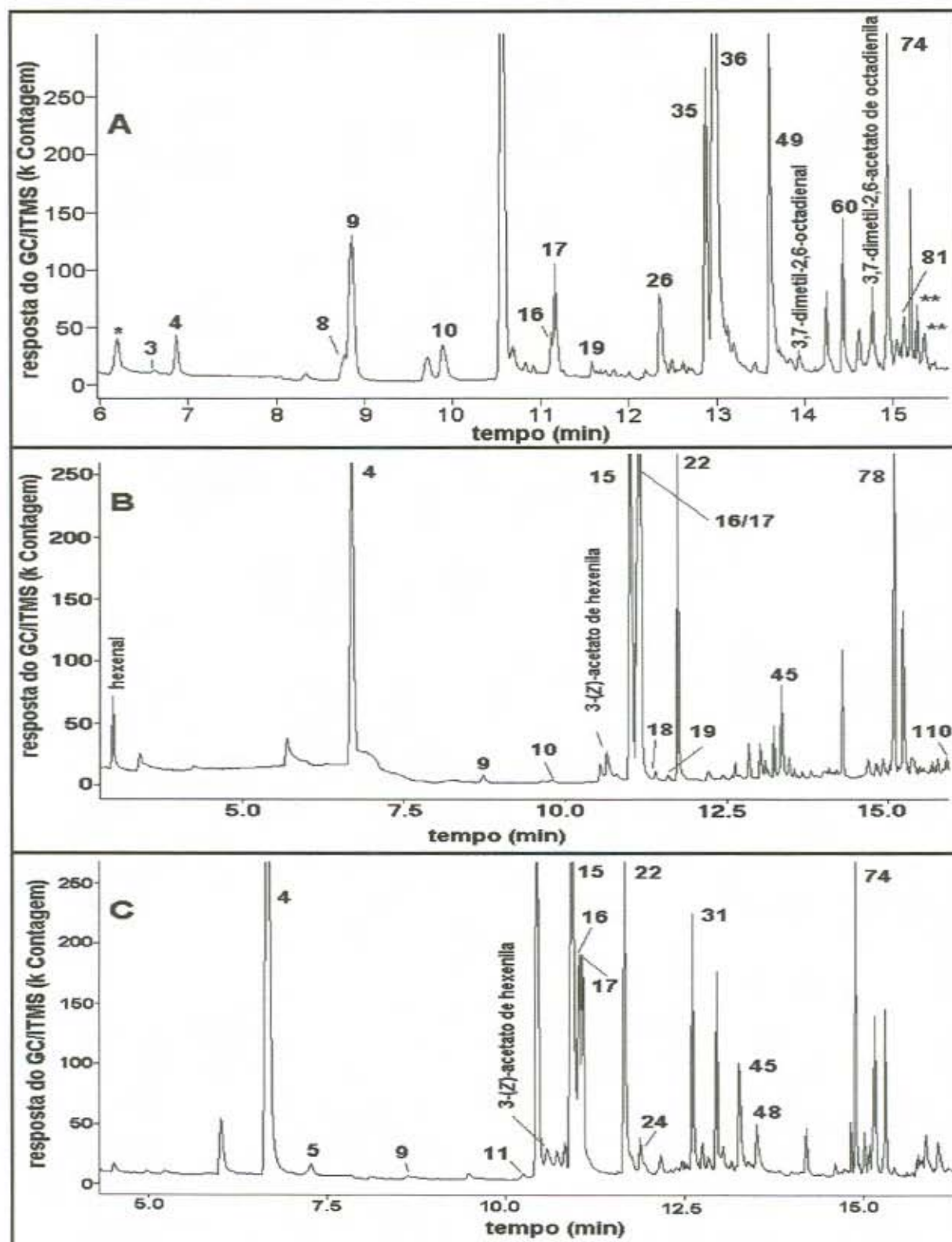


Figura 35. Perfil típico de voláteis emitidos por folhas de *Eucalyptus in situ* depois de 1 min de extração utilizando PDMS/DVB e câmara de vidro: **A.** *E. citriodora* (folha danificada, extração feita em laboratório), **B.** *E. dunnii*; (folha danificada, extração feita na estufa), **C.** *E. saligna* (folha não danificada, extração feita em laboratório). A identificação dos picos está apresentada nas Tabelas VI e X.

*: éster; **: hidrocarbonetos sesquiterpenos de PM 204.

A maioria dos compostos identificados são mono e sesquiterpenos, além de ésteres, todos estes compostos comuns em óleos de eucalipto e também, grande parte deles encontrados nos óleos de eucalipto destas mesmas árvores (item 1 deste Capítulo).¹⁵

Embora as quantidades relativas destes compostos tenham sido extremamente variáveis relativamente ao local e às condições de amostragem, dentre os VOC encontrados no headspace das folhas de *E. citriodora*, citronelal foi o composto mais abundante na grande maioria das extrações, sendo também o composto majoritário do óleo essencial da mesma árvore (item 1 deste Capítulo). Citronelol, β -cariofileno e isopreno foram encontrados em grandes quantidades na maior parte das amostras, estando os dois primeiros também presentes no óleo essencial obtido por hidrodestilação. α -Tujeno, sabineno, β -mirceno, isopulegol e α -cariofileno foram detectados em quantidades traço (S/N >3). Não foi possível determinar a identidade exata dos compostos 3,7-dimetil-2,6-octadienal e 3,7-dimetil-2,6-acetato de octadienila, sendo as possibilidades acetato de nerila/neral (isômero *Z*) ou acetato de geranila/geranial (isômero *E*). As estruturas moleculares destes compostos encontram-se nas Figuras A3 e A4 no Anexo A. Além das substâncias apresentadas na Tabela X (20 compostos) para *E. citriodora*, traços de outros 13 compostos terpenóides estiveram sistematicamente presentes na maioria das amostras. Os picos não rotulados na Figura 35 são compostos voláteis não identificados ou compostos resultantes do sangramento da coluna cromatográfica, fibra PDMS/DVB ou câmara de vidro.

Considerando-se os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados com as duas árvores de *E. dunnii*, um total de 27 compostos foi detectado no headspace das folhas destas árvores. Nesta mistura volátil, 19 compostos foram identificados, os quais constam da Tabela X. Os compostos majoritários desta mistura são eucaliptol, limoneno, (*E*)- β -ocimeno e *p*-cimeno. Os compostos que não constam da Tabela X estão presentes na forma de traços e/ou não foram identificados.

Quarenta e dois compostos foram detectados e vinte foram identificados no headspace de um ramo de *E. saligna*. Os principais compostos desta mistura de voláteis são α -pineno, (*E*)- β -ocimeno e *p*-cimeno. Outros componentes não puderam ser identificados ou foram tentativamente identificados: um éster do ácido

propanóico, DMNT (presente apenas nos experimentos realizados na estufa), (*E,E*)-farneseno, TMTT. Além destes, os seguintes compostos estavam presentes como traços: fenchol, 4-terpineol, 8-p-cimeno, quatro ésteres do ácido butanóico ou propanóico, três monoterpenos oxigenados, um composto aromático, três hidrocarbonetos sesquiterpenos e quatro sesquiterpenos oxigenados.

A fim de auxiliar e simplificar a avaliação dos perfis cromatográficos dos voláteis emitidos pelos eucaliptos, as áreas dos picos de cada composto em cada série de amostragem foram normalizadas de acordo com a equação (24):

$$A_N = \frac{A_X}{A_{MAX}} \quad \text{equação (24)}$$

onde A_N é a área normalizada, A_X é a área do pico x minutos após a folha de eucalipto ter sido selada dentro da câmara e A_{MAX} é a área máxima encontrada para o pico do composto em uma série de amostragens, no mesmo dia. Ao invés de apresentar a média das medidas para cada conjunto de 3 dias consecutivos de amostragem, as medidas circadianas foram apresentadas como linhas simples para cada um dos 3 dias de amostragem, conforme Figuras 36 e 37, demonstrando o comportamento dos compostos voláteis em dias consecutivos. As áreas normalizadas foram corrigidas nos casos em que as temperaturas ambientais variaram durante a amostragem.¹¹⁸ Alguns padrões na variação de A_N foram observados ao longo do tempo da amostragem:

(a) A concentração do composto emitido é máxima logo após o galho ter sido selado dentro da câmara de vidro e decresce durante o experimento. Exemplos deste comportamento são o citronelal e o β -cariofileno em *E. citriodora*, os quais podem ser visualizados nas Figuras 36 e 37.

(b) Os compostos *cis*-óxido de rosa, *trans*-óxido de rosa e (*E*)- β -ocimeno (Figuras 38 e 39) mostram um acréscimo gradual dos valores de A_N até 300 a 400 min de tempo de enclausuramento da folha. Quando a amostragem foi realizada na estufa de plantas a partir de folhas intactas, após atingir-se a A_N máxima, ocorria decréscimo. Em outras condições de amostragem, este valor permanece praticamente constante após atingir-se a A_N máxima.

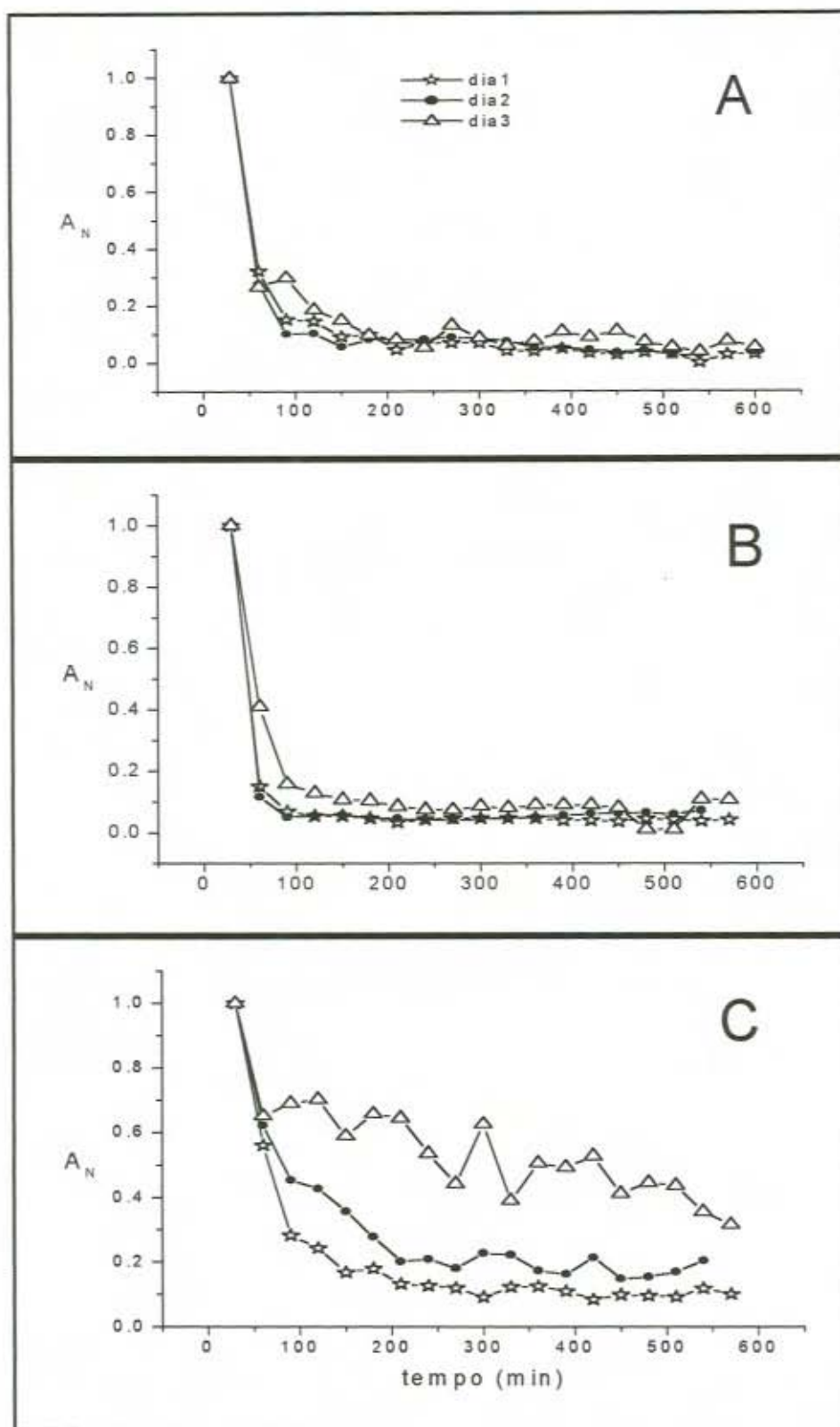


Figura 36. Perfis circadianos para o citronelal emitido por folhas de *E. citriodora*. A: estufa, folhas intactas; B: laboratório, folhas intactas; C: laboratório, folhas danificadas.

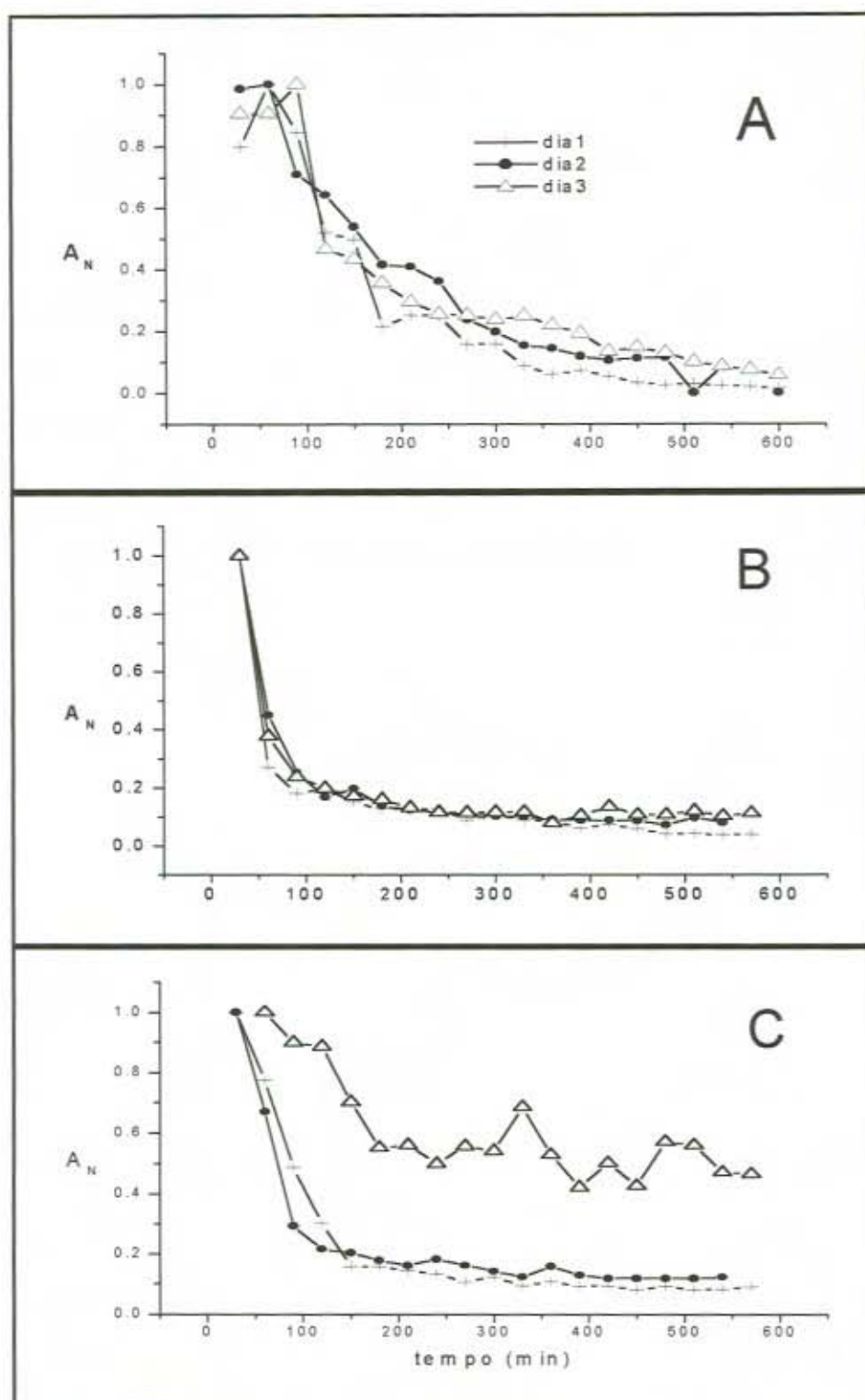


Figura 37. Perfis circadianos do β -cariofileno emitido pelas folhas de *E. citriodora*: A, estufa, folhas intactas; B, laboratório, folhas intactas, C, laboratório, folhas danificadas.

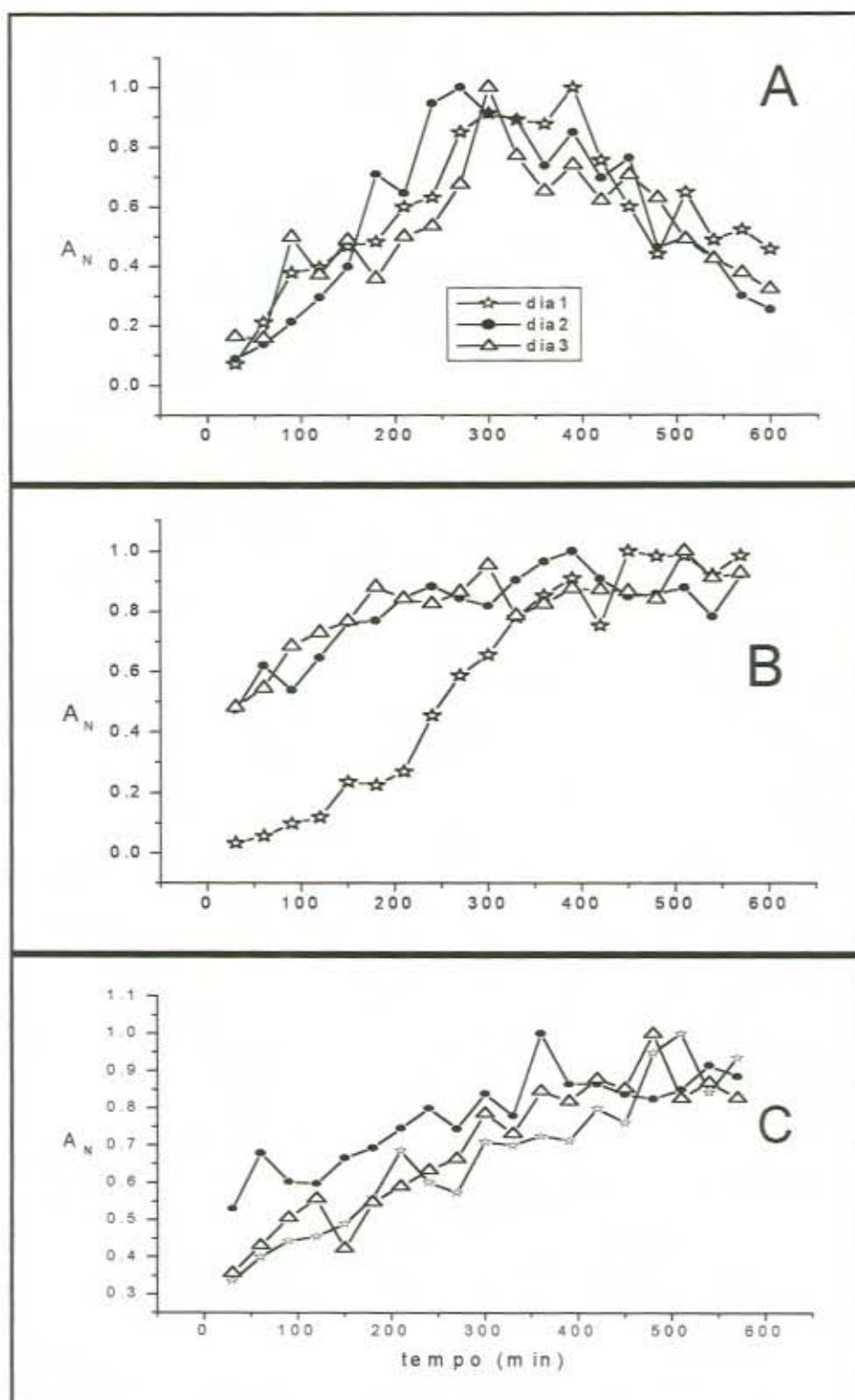


Figura 38. Perfis circadianos para *cis*-óxido de rosa emitido por folhas de *E. citriodora*. A: estufa, folhas intactas; B: laboratório, folhas intactas; C: laboratório, folhas danificadas.

3.2.1. (E)- β -Ocimeno

As três espécies de eucalipto estudadas (*E. citriodora*, *E. dunnii*, *E. saligna*) emitiram (E)- β -ocimeno de forma semelhante ao descrito em (a) (item 3.2 deste Capítulo). A Figura 39 refere-se ao *E. dunnii* A e exemplifica o perfil circadiano do (E)- β -ocimeno das árvores em estudo. O fato de ambos os isômeros do (E)- β -ocimeno terem sido detectados apenas nos experimentos realizados na estufa parece ser um indicativo de que a luz natural é um fator importante na produção e/ou emissão destes compostos. A única exceção a esta afirmação foram traços do isômero (E)-, encontrados no headspace de folhas de *E. citriodora* no 1^o dia de amostragem no laboratório. Semelhantemente, traços do isômero (Z)- foram detectados no headspace das folhas das três espécies apenas nos experimentos realizados na estufa. Estudo feito sobre as emissões de espinhos de pinheiro mostrou que a emissão de (E)- β -ocimeno é dependente da luz e que não houve emissão deste composto em condições não-fotossintéticas.²³⁴ Da mesma forma, (E)- β -ocimeno não foi encontrado no headspace de folhas de *Nicotiana attenuata* durante períodos sem luz, mesmo quando a temperatura foi elevada de forma a alcançar os valores usuais do período onde havia incidência de luz.²³⁵ Os traços destes isômeros encontrados no headspace das folhas de *E. citriodora* no 1^o dia de amostragem no laboratório podem ter sido quantidades residuais produzidas pelas folhas da árvore antes do transporte desta ao laboratório.

O período de emissão máxima de (E)- β -ocimeno para *E. dunnii* ocorreu entre 200 e 400 min; para *E. saligna*, de 420 a 540 min; para *E. citriodora* de 300 a 400 min. No caso de *E. citriodora*, o mesmo período corresponde aos valores máximos de emissão de óxido de rosa. Um padrão de emissão semelhante a este foi encontrado para (E)- β -ocimeno em algodoeiros intactos e também naqueles danificados pela lagarta *Spodoptera exigua* Hübner.³⁷ Nos perfis circadianos de (E)- β -ocimeno apresentados na Figura 39 é possível observar oscilações nas curvas, como por exemplo no 1^o dia aos 120 min, 300 min e 420 min. Variações semelhantes foram observadas nos perfis circadianos do mesmo composto nas

outras espécies de eucaliptos estudadas. Em vários casos, em curtos períodos onde houve queda na emissão de (*E*)- β -ocimeno, estas foram acompanhadas da diminuição da temperatura ambiente e/ou céu encoberto.

Referente à possibilidade de haver estoque deste composto nas glândulas de óleo das folhas, vários estudos sobre o óleo essencial de folhas de *E. citriodora* não mencionam (*Z*)- e (*E*)- β -ocimeno^{15;53;54;56;77;183-188;213;236-240}, com exceção de três.²⁴¹⁻²⁴⁴ Ambos os isômeros não foram incluídos nas emissões voláteis de mudas de *E. citriodora*,²⁴⁵ nem nos voláteis presentes no headspace de folhas da mesma espécie.⁹⁷ Neste trabalho, (*E*)- β -ocimeno não está presente no óleo de *E. citriodora* (item 2 deste Capítulo), nem no headspace das folhas de *E. citriodora* picadas (Tabela VI).

De forma geral, (*Z*)- e (*E*)- β -ocimeno são componentes minoritários de óleos de folhas de eucalipto. De cento e onze espécies de eucaliptos investigadas por Boland e colaboradores, 44 apresentaram β -ocimeno como componente minoritário do óleo.¹⁵ Como pode ser visto na Tabela XI, *E. sphaerocarpa* apresenta a maior percentagem (2,84%) de (*E*)- β -ocimeno e *E. dunnii* a maior percentagem (3,63%) de (*Z*)- β -ocimeno. Neste trabalho, (*E*)- β -ocimeno não foi detectado no óleo de *E. saligna*, mas foi encontrado nos óleos de *E. dunnii* A e B.

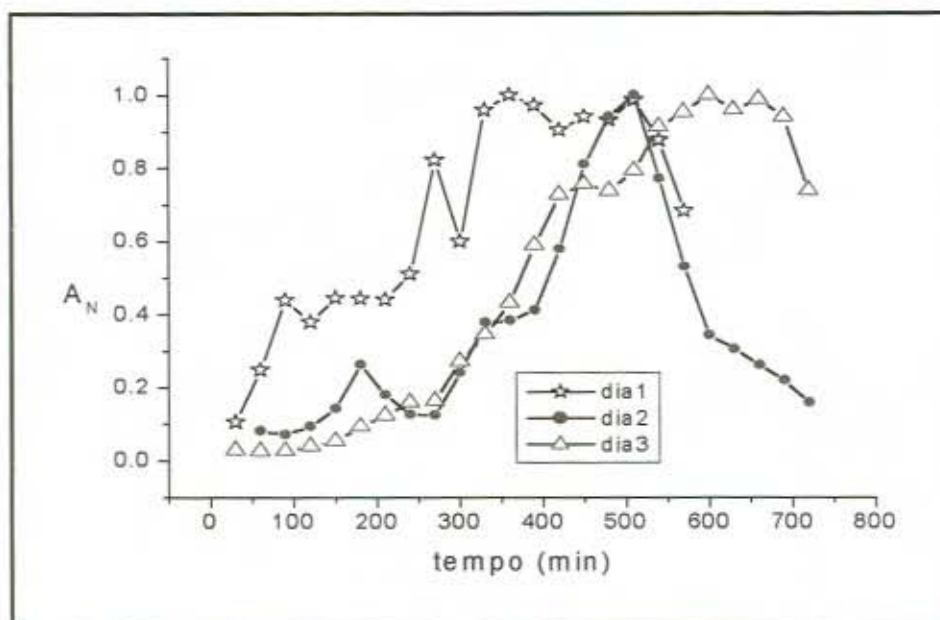


Figura 39. Perfis circadianos de (E)- β -ocimeno emitido por folhas de *E. dunnii* A na estufa: folhas intactas durante os 2 primeiros dias e folhas danificadas no 3º dia. Íon monitorado: m/z 91.

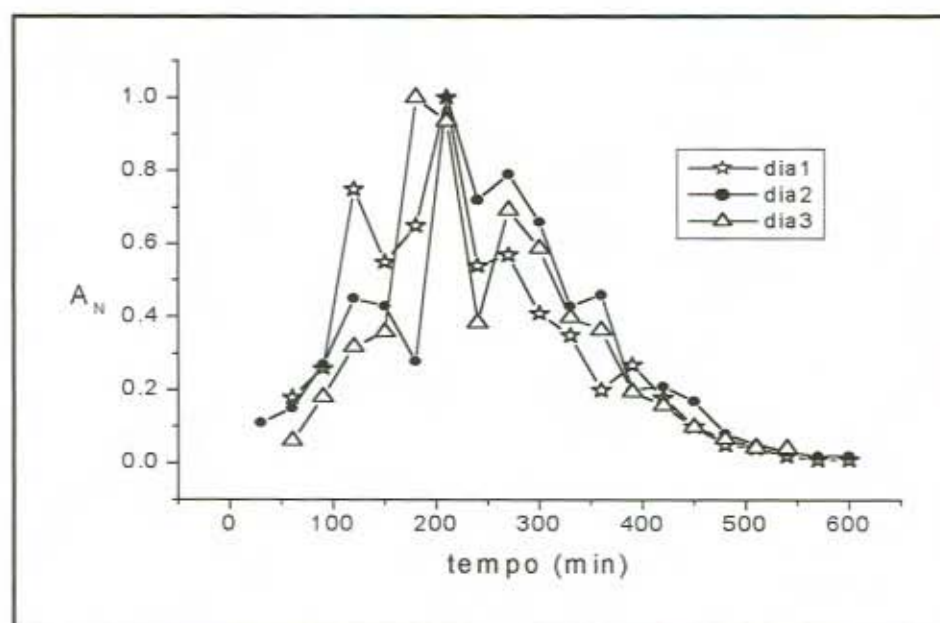


Figura 40. Perfis circadianos de β -cariofileno emitido por folhas danificadas de *E. dunnii* B na estufa, durante 3 dias. Íon monitorado: m/z 91.

Tabela XI. Presença de (Z)- β -ocimeno e (E)- β -ocimeno no óleo das folhas de alguns eucaliptos australianos.¹⁵

	espécies de eucaliptos	(E)- β -ocimeno	(Z)- β -ocimeno
1	<i>E. apodophylla</i>	0,06	-
2	<i>E. angophoroides</i>	0,03	-
3	<i>E. bauermaniana</i>	0,02	-
4	<i>E. brassiana</i>	0,13	-
5	<i>E. camaldulensis</i>	0,10	-
6	<i>E. cebra</i> , quimiotipos 1 e 2	0,02 e 0,07	-
7	<i>E. cephalocarpa</i>	0,02	-
8	<i>E. chapmaniana</i>	-	0,09
9	<i>E. clarksoniana</i>	0,05	-
10	<i>E. cloeziana</i>	0,02	-
11	<i>E. crenulata</i>	0,16	-
12	<i>E. dalrympleana</i>	0,04	-
13	<i>E. dives</i>	0,39	-
14	<i>E. dunnii</i>	1,68	3,63
15	<i>E. elata</i>	0,05	-
16	<i>E. exserta</i>	0,09	-
17	<i>E. globulus</i> subsp. <i>globulus</i>	0,05	-
18	<i>E. intermediata</i>	0,23	-
19	<i>E. intertexta</i>	0,02	-
20	<i>E. kartzoffiana</i>	0,06	-
21	<i>E. macarthurii</i>	0,41	-
22	<i>E. malacoxylon</i>	0,09	-
23	<i>E. mannifera</i> subsp. <i>maculosa</i>	<0,01	-
24	<i>E. melanophloia</i>	0,05	0,20
25	<i>E. melliodora</i>	0,02	0,02
26	<i>E. neglecta</i>	0,03	-
27	<i>E. normantonensis</i> quimiotipos 1 e 2	0,18 e <0,01	-
28	<i>E. obtusiflora</i>	<0,01	-
29	<i>E. orgadophila</i>	0,03	-
30	<i>E. pachycalyx</i>	<0,01	-
31	<i>E. parvifolia</i>	0,11	-
32	<i>E. pellita</i>	0,07	-
33	<i>E. peltata</i> subsp. <i>leichhardtii</i>	-	0,01
34	<i>E. polyanthemos</i>	0,02*	-
35	<i>E. quadrangulata</i> quimiotipo 3	0,04	-
36	<i>E. raveretiana</i>	0,04	-
37	<i>E. saligna</i>	-	<0,01
38	<i>E. saxatilis</i>	<0,01	-
39	<i>E. sideroxylon</i> subsp. <i>tricarpa</i>	0,12	-
40	<i>E. sphaerocarpa</i>	2,84	0,04
41	<i>E. staigeriana</i>	0,78	<0,01
42	<i>E. sturgissiana</i>	<0,01	-
43	<i>E. subcrenulata</i>	0,05	0,04
44	<i>E. tessellaris</i>	0,12	0,04

Notas: Os números representam as porcentagens das contagens de área dos picos cromatográficos dos isômeros de β -ocimeno relativamente à área total dos componentes dos óleos de cada espécie. As análises foram realizadas utilizando-se GC/MS. * isômero não especificado.

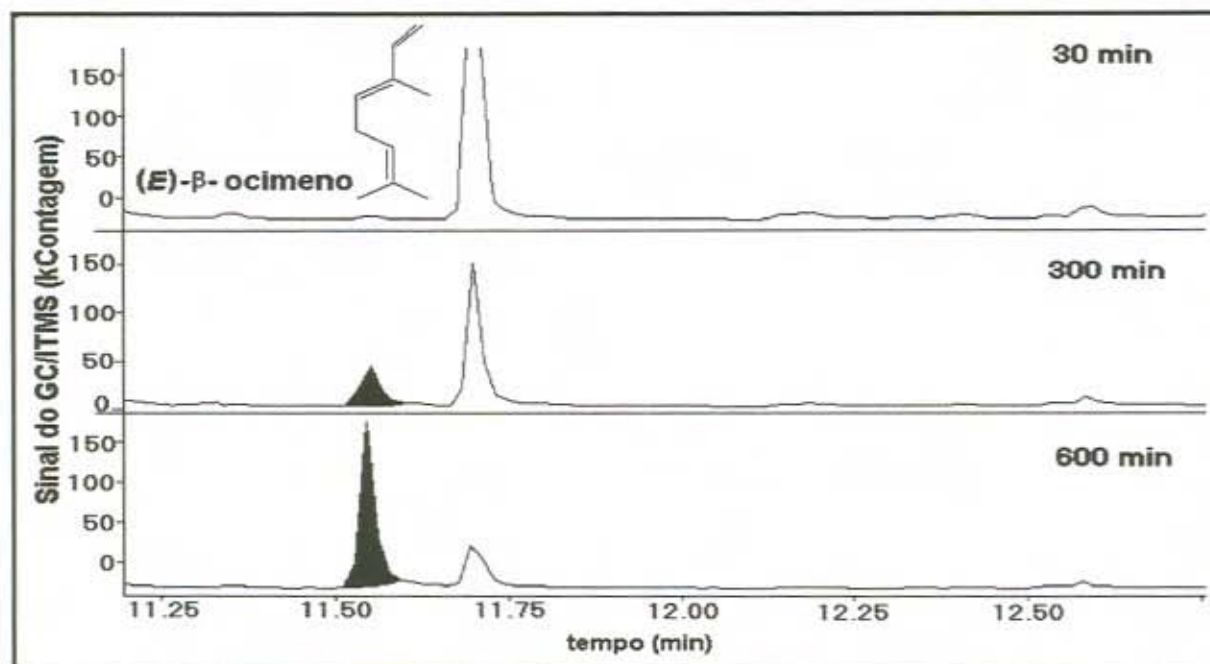


Figura 41. Fração do cromatograma do headspace das folhas de *E. dunnii* A *in situ*, salientando o aumento do pico cromatográfico do (E)-β-ocimeno depois de 300 e 600 min de amostragem. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

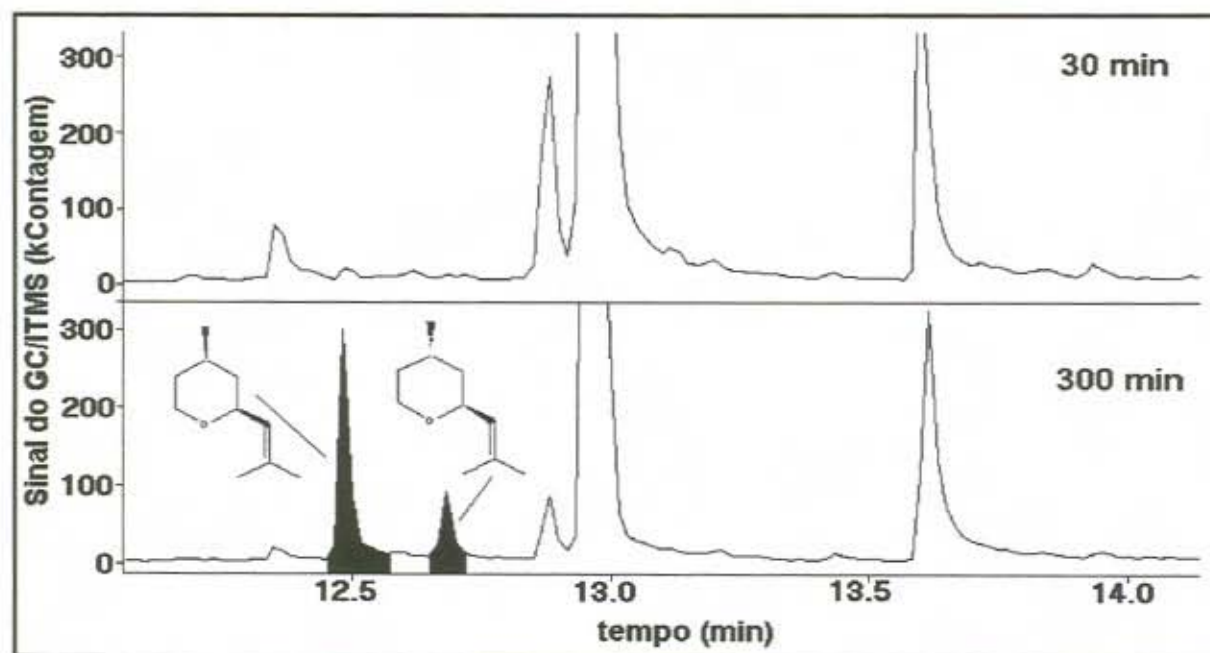


Figura 42. Fração do cromatograma do headspace das folhas de *E. citriodora* *in situ*, salientando o aumento dos picos cromatográficos de *cis*- e *trans*- óxido de rosa depois de 300 min, comparado-os aos mesmos após 30 min de amostragem. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

Dados a respeito dos óleos essenciais das folhas de *E. dunnii*^{15;77;190} e *E. saligna*^{6;15;180;187;188;192;194;195} não são abundantes na literatura. Dentre estes, apenas um dos trabalhos anteriormente citados¹⁵ e uma pesquisa concernente a eucaliptos algerianos¹⁹² mencionam a presença de (Z)- e (E)- β -ocimeno em *E. dunnii* e *E. saligna* respectivamente. Neste trabalho, (E)- β -ocimeno está presente no headspace das folhas picadas de *E. dunnii* A e *E. dunnii* B, ao passo que em *E. saligna* sua presença é intermitente (Tabela VI). Contudo, (E)- β -ocimeno foi encontrado nas emissões de *E. camaldulensis* e *E. maculata*,²⁴⁵ e *E. globulus*,^{132;246} ainda que Street e colaboradores¹³² refiram-se a ambos os isômeros como tentativamente identificados e Evans e colaboradores não definam qual dos isômeros foi detectado.²⁴⁶ Em trabalho recente, verificou-se que (E)- β -ocimeno é um dos principais componentes na atmosfera de florestas portuguesas de *E. globulus*.²⁴⁷

A ocorrência de ocimeno como VOC de plantas é muito comum e pode ser verificada na Tabela XII. Este composto é conhecido por suas múltiplas interações ecológicas, tais como defesa indireta de plantas (atrativo de predadores e parasitóides de herbívoros), ou atrativo de polinizadores.²⁴⁸ A sua presença é comum também nos aromas das flores.⁸⁴ Algumas plantas emitem (E)- β -ocimeno depois de terem sido atacadas por herbívoros.^{68;202;249} No caso de folhas retiradas de um pé de feijão-lima infestado por *Tetranychus urticae*, a mistura de (E)- e (Z)- β -ocimeno emitida pelas folhas atraiu o predador *P. persimilis*. De forma semelhante, a investigação da mistura volátil emitida por diferentes cultivares de *Gerbera jamesonii* infestadas por ácaros, mostrou que alguns cultivares que emitiam quantidade menor de (E)- β -ocimeno não atraíram o predador *P. persimilis* com tanta intensidade.¹⁹¹

Tabela XII. Algumas plantas que emitem β -ocimeno.

planta	referência da literatura
folhas de pepineiro	35,250
folhas de macieira	35,44,201
folhas de pé de feijoeiro	35,202,250
folhas de algodoeiro	35,37,204,251,252
folhas de pé de milho	249,252
folhas de pé de tabaco	227,252
folhas de pé de batateiro	252,253
mostarda de folha (<i>Brassica juncea</i>)	91
<i>Brassica napus</i>	91
mostarda negra (<i>Brassica nigra</i>)	91
mostarda branca (<i>Sinapsis alba</i>)	91
faia (<i>Fagus sylvatica</i> L.)	88
<i>Solanum luteum</i>	250
flores de orquídea <i>Laelia anceps</i>	¹³⁷ e referências citadas
flores de orquídea (<i>Cypripedium parviflorum</i> Salisb.)	254
flores de <i>Nicotiana otophora</i>	¹³⁷ e referências citadas
flores e folhas de dama da noite (<i>Brugmansia candida</i>)	137
laranjeira (<i>Citrus sinensis</i> L. e <i>Citrus clementi</i>)	255,256
flores de <i>Michelia alba</i>	106
pimenta japonesa (<i>Xanthoxylum piperitum</i> DC.)	90
partes aéreas de <i>Echinacea</i> (<i>E. angustifolia</i> , <i>E. pallida</i> , <i>E. purpurea</i>)	89
espinhos de <i>Pinus pinea</i>	234
folhas danificadas e flores de 7 espécies de <i>Magnolia</i>	203
flores de <i>Luffa acutangula</i> e <i>Momordica charantia</i>	100

O mesmo isômero provocou uma resposta olfativa em um neurônio específico da lagarta-da-maçã-do-algodoeiro *Heliiothis virescens*.²²⁷ Observou-se que nozes infestadas por *Cydia pomonella* emitem maiores quantidades de (*E*)- β -ocimeno e suspeita-se que a mistura volátil emitida pela noqueira sirva de indicador para que os insetos possam localizar as nozes. Observou-se também, que os amieiros desfolhados e seus vizinhos mostraram-se mais resistentes tanto à postura de ovos como ao ataque do herbívoro *Agelastica alni*. O (*E*)- β -ocimeno faz parte da mistura volátil emitida por estas árvores.²⁵⁷

No caso de *E. dunnii* e *E. saligna*, um ramo distante do ponto de amostragem estava levemente infestado por ácaros (*Tetranychus urticae* ou ácaro-aranha de duas manchas) e na árvore de *E. citriodora* amostrada, também, em um ponto distante ao da amostragem, havia uma infestação leve do inseto *Pseudococcus longispinus*. Considerando-se tudo o que foi relatado até o momento, é razoável sugerir que (*E*)- β -ocimeno desempenhe um papel infoquímico nas árvores dos eucaliptos testados neste trabalho, embora não seja possível chegar-se a nenhuma conclusão definitiva a respeito, visto que este assunto é complexo e demanda investigações futuras, além de encontrar-se fora do escopo deste trabalho. Além disso, pelo fato de as folhas utilizadas na amostragem terem sido inspecionadas sem o auxílio de instrumentos de aumento, não se pode concluir que as folhas foram as únicas responsáveis pelas emissões voláteis ou se elas forneceram o substrato necessário para as enzimas dos ácaros/insetos, os quais subsequentemente produziram VOC.²⁰²

A maior parte dos fenômenos alelopáticos registrados na literatura relativos à árvores de eucalipto não mencionam o (*E*)- β -ocimeno e não investigam a árvore ou partes da mesma *in situ*.^{11;12;150;151} Contudo, recentemente, uma pesquisa relacionada a compostos que sinalizam a planta não hospedeira para a larva do eucalipto, apresentou o (*E*)- β -ocimeno como um possível candidato.¹⁵²

3.2.2. β -Cariofileno e outros compostos

β -Cariofileno apresentou um perfil de emissão semelhante a (a) (item 3.1 deste Capítulo) no headspace das folhas de *E. saligna* e *E. citriodora* durante os 18 dias de amostragem de VOC. Um fato interessante é que nas emissões voláteis da árvore A de *E. dunnii*, β -cariofileno não foi detectado, ao passo que na árvore B da mesma espécie este sesquiterpeno apresentou perfis circadianos semelhantes a (b), conforme Figura 40. Este sesquiterpeno foi também detectado no headspace das árvores A e B, tendo sido encontrado em maiores quantidades na árvore B. Variação no padrão de emissão do β -cariofileno pode ser vista no trabalho realizado com algodoeiros danificados por herbívoros, os quais mostraram altas emissões de β -cariofileno nas primeiras horas após o dano. No dia seguinte, verificou-se que outros sesquiterpenos foram emitidos em maior quantidade do que o β -cariofileno.³⁷

A literatura registra a presença de β -cariofileno no óleo das folhas de *E. dunnii* na forma de percentual de área variando de 0,19 a 2,8%,^{15;189} contudo, este composto não foi detectado no óleo obtido por hidrodestilação das folhas das árvores A e B de *E. dunnii*, nem em uma outra árvore da mesma espécie cultivada na Austrália, cujo óleo foi obtido através de destilação a vácuo a baixas temperaturas.⁷⁷ O mesmo sesquiterpeno está, eventualmente, presente no óleo obtido de folhas de *E. saligna* (3 artigos em um total de 6 mencionam sua presença),^{15;180;187;188;192;195} ao passo que em *E. citriodora*, o β -cariofileno é um componente comum do óleo.^{15;54;56;77;183;184;213;236;241} Neste trabalho, β -cariofileno está presente tanto no óleo hidrodestilado de *E. citriodora* como no de *E. saligna* (item 2 deste Capítulo). O mesmo sesquiterpeno foi detectado no headspace das 3 espécies de eucalipto estudadas.

A Tabela XIII apresenta várias plantas em cujas emissões voláteis, β -cariofileno está incluído. Langenheim e colaboradores²⁵⁸ sugeriram que o β -cariofileno possa ter um papel infoquímico, visto que apresenta toxicidade em relação ao herbívoro generalista *Spodoptera exigua* Hübn. Outras funções biológicas são posteriormente reportadas e/ou sugeridas pelo mesmo autor²⁴⁸ e por outros

pesquisadores, tais como: feromônio sexual para o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* B.);²⁵⁹ estimulante de comportamento combativo entre casais da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*;²⁶⁰ estimulante de resposta neuronal na lagarta da folha do algodão egípcio (*Spodoptera littoralis* B.);²⁶¹ estimulante de resposta antenal da traça fêmea *Cydia pomonella* L.¹¹¹ À vista destas várias funções infoquímicas do β -cariofileno relativamente a outros organismos e do seu comportamento diferente nas emissões voláteis de *E. dunnii* A e B comparativamente a *E. citriodora* e *E. saligna*, parece plausível sugerir que este sesquiterpeno possa desempenhar algum papel infoquímico em *E. dunnii*, entretanto, uma conclusão a este respeito demanda posterior investigação, o que se encontra além do escopo deste trabalho.

Tabela XIII. Algumas plantas ou partes de plantas que emitem β -cariofileno.

planta ou partes de plantas	referência da literatura
folhas de macieira	44;201;223
folhas de <i>Brugmansia candida</i>	137
folhas de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) danificadas	37;204;262
"nasturdium" infestado por herbívoros (<i>Tropaeolum majus</i> cv. Mahogeny)	143
ramos de carvalho (<i>Quercus robur</i>) infestados por besouros	263
batateiro (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	264
folhas de magnólia danificadas	203
folhas da árvore "manuka" (<i>Leptospermum scoparium</i>)	265
flores de <i>Michelia alba</i>	106
folhas de <i>Salvia officinalis</i>	230

Comportamento semelhante ao apresentado nas Figuras 36 e 37 também foi observado para citronelol em *E. citriodora* e para outros compostos presentes no headspace das folhas de *E. saligna* nos experimentos realizados no laboratório: α -pineno, p-cimeno, limoneno, eucaliptol, canfolenal, α -terpineol, γ -terpineno, *trans*-carveol. Nos experimentos feitos com *E. dunnii* A na estufa, este mesmo padrão de comportamento foi observado para α -pineno, p-cimeno, limoneno, eucaliptol, e γ -terpineno. Com relação às emissões voláteis de *E. dunnii* B, não foi observado nenhum padrão de comportamento claro, exceto para o β -cariofileno.

Uma rápida diminuição das emissões de monoterpenos foi observada em espinhos danificados de pinheiro²³⁴ e em coníferas danificadas.²⁶⁶ De acordo com Loreto e colaboradores,²³⁴ as causas desta diminuição não estão esclarecidas, contudo, duas hipóteses foram lançadas por estes pesquisadores para explicar o fenômeno: 1) solidificação dos terpenos à medida em que estes entram em contato com o ar a fim de fechar o tecido danificado; 2) reservatórios de terpenos esvaziados após algum tempo. No caso das folhas de eucalipto, estas hipóteses poderiam aplicar-se às emissões voláteis de folhas danificadas, mas não para aquelas que foram amostradas intactas.

Os perfis apresentados nas Figuras 36 e 37 resultam de uma combinação de processos simultâneos de produção, emissão e destruição de compostos voláteis dentro da câmara durante estes experimentos. Como já foi mencionado antes, os compostos terpenóides são metabólitos secundários biossintetizados a partir do pirofosfato de geranila produzido através da rota sintética do ácido mevalônico.²⁶⁷ Várias rotas de reações bioquímicas subseqüentes são responsáveis pela síntese de uma ampla gama de substâncias terpênicas naturais e a maior parte destes processos não é totalmente compreendida.²⁶⁸ Alterações na atividade fotossintética,²⁶⁹ na temperatura e no nível de estresse da planta¹⁰ são comumente relatadas como causadoras de alterações na produção biogênica e emissão de compostos terpênicos. Neste caso específico, o estresse devido ao enclausuramento do galho dentro da câmara de vidro (embora mínimo), o dano mecânico, a competição por espaço e luz na estufa de plantas e a sorção destes compostos na cutícula da planta²⁷⁰ são todos fatores que podem ter causado alterações deste tipo. A remoção de compostos voláteis na atmosfera pode também ocorrer por oxidação degradativa.²⁷¹

É interessante observar que o decréscimo da área normalizada de citronelal e β -cariofileno é menos pronunciado nos experimentos onde a planta foi danificada (curvas C das Figuras 36 e 37) do que nos experimentos, nos quais a planta não foi danificada (curvas A e B das Figuras 36 e 37). Sabe-se que o citronelal apresenta ação inseticida²⁷² e é também um agente bactericida eficiente.²⁷³ Estas características do citronelal podem ter contribuído para uma maior taxa de emissão deste composto, no momento em que a planta foi danificada, visando a sua utilização como defesa da planta contra agentes patogênicos que poderiam infectar a folha, após o dano mecânico.

Os chamados voláteis de folhas verdes (GLV) hexenal, 3-(Z)-hexenol, e 3-(Z)-acetato de hexenila, que já haviam sido detectados no headspace de folhas picadas de eucalipto (item 2.2 deste Capítulo) foram detectados também no headspace das folhas de *E. dunnii in situ* após dano mecânico. 3-(Z)-Hexenol foi detectado 30 min após o dano ter sido realizado e 3-(Z)-acetato de hexenila ainda estava presente no headspace depois de 1,5 h de amostragem. Estes compostos são produtos da rota biossintética da lipoxigenase e são emitidos por tecido recém cortado ou danificado e sua presença já foi comentada no item 2.2 deste Capítulo.³⁵

A síntese de isopreno está intimamente ligada à fotossíntese. A presença de luz é essencial para sua emissão.²⁶⁸ Este fato foi confirmado durante este trabalho, visto que o isopreno encontrava-se presente apenas nas amostragens realizadas na estufa.

No 1º dia de amostragem dos voláteis das folhas de *E. saligna* na estufa, outros dois compostos apareceram na forma de traços. No 2º e no 3º dia de amostragem, a emissão destes compostos aumentou. Ambos foram detectados no headspace das folhas picadas de *E. dunnii* e *E. saligna* e foram tentativamente identificados como (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMTN) e (E,E)- α -farneseno. (item 3.3 deste Capítulo). No *E. dunnii* B, o (E,E)- α -farneseno apresenta um comportamento semelhante ao descrito no *E. saligna* para o mesmo composto e, no *E. dunnii* A, este composto aparece na forma de traços. Sua presença no headspace das folhas picadas das 3 espécies de eucalipto está comentada no item 3.3 deste Capítulo. Já o DMTN aparece como traços no headspace das folhas de ambas as árvores de *E. dunnii in situ*. Um 3º composto terpenóide foi detectado apenas no 3º dia de amostragem do *E. saligna* na estufa, o qual, foi tentativamente identificado

(*E,E*)-4,8,12-dimetil-1,3,7,11-tridecatetra-eno (TMTT), também presente no headspace das folhas picadas de *E. dunnii* A e B.

Os dois homoterpenos, DMNT e seu homólogo superior TMTT contribuem para o aroma que confere uma “imagem floral branca” (do inglês “white floral image”) para as flores que exalam perfume a noite (por exemplo, Orchidaceae, Cactaceae, Magnoliaceae, Liliaceae) e também são emitidos por folhas e/ou frutos de algumas angiospermas após o ataque por herbívoros, como por exemplo folhas de feijão-lima infestadas por *T. urticae*,²⁰² folhas de milho,²⁴⁹ nozes (“green walnut Hartley var.”),²²² algodão,³⁷ “nasturdium” (*Tropeolum majus* cv. Mahogeny)¹⁴³ e gérbera (*Gerbera jamesonii*)¹⁹¹.

Em algumas plantas, as emissões destes compostos são observadas mesmo quando a planta encontra-se intacta e aumentam após o ataque do herbívoro.^{37,222} Juntamente com outros compostos voláteis, estes compostos podem agir como “chamadas de alarme”, de forma a atrair insetos que reduzam a população de herbívoros na planta hospedeira.²⁵² Estes dois compostos juntamente com β -ocimeno fazem parte de uma mistura volátil emitida por árvores desfolhadas de amieiro (*Alnus glutinosa*) que, possivelmente, torna estas árvores e suas vizinhas mais resistentes ao ataque do herbívoro *Agelastica alni*, contribuindo assim, para a comunicação interplanta.²⁵⁷ Alguns estudos reportam apenas a presença do DMNT nos voláteis de plantas, como por exemplo em algumas espécies de *Magnolia* artificialmente danificadas.²⁰³

O DMNT é conhecido por atrair predadores em plantas agrícolas.²⁰³ Em uma investigação dos compostos voláteis de algodoeiros, este composto apresentou um perfil circadiano com dois picos de emissão tanto em folhas danificadas por lagarta como por aquelas não danificadas; entretanto, nas últimas em menor quantidade. O mesmo ocorreu com o (*E,E*)- α -farneseno. Ambos os compostos só começaram a ser emitidos pela planta em maiores quantidades a partir do 3^o dia de amostragem, enquanto durante todos os três dias, as folhas foram submetidas ao ataque de larvas que haviam sido privadas de alimento antes de serem colocadas sobre as plantas.³⁷ De forma semelhante aos algodoeiros danificados, só foi possível detectar DMNT e traços de (*E,E*)- α -farneseno na atmosfera de *E. saligna* ao segundo dia de amostragem, e apenas no terceiro dia foram verificadas quantidades maiores destes compostos. Nas plantas de algodão não danificadas foram observadas quantidades

pequenas dos mesmos compostos, embora o mesmo padrão de emissão tenha sido verificado tanto nas plantas danificadas, como nas não danificadas.³⁷ Embora o dano feito às folhas de *E. saligna* tenha sido mínimo e apenas no momento inicial da amostragem, a presença e o comportamento dos mesmos compostos nas emissões voláteis do eucalipto e do algodão sugere que o mecanismo interno que acionou a emissão destes compostos voláteis em ambas as plantas possa ser semelhante. Em folhas de macieiras, o DMNT foi encontrado em maiores quantidades nos voláteis emitidos por cultivares mais resistentes.²⁰¹ Também foi encontrado em maiores quantidades em um galho de macieira contendo folhas e frutos. Estudo eletroantegráfico mostrou que a antena da lagarta da maçã *Cydia pomonella* respondeu fortemente a este composto.²²³ Em investigação recente, este composto foi sugerido como um sinalizador da árvore não hospedeira *Olea europea* (do inglês "non host cue") relativamente à lagarta de eucalipto, *Phorocantha semipunctata*.¹⁵² O comportamento singular deste terpeno relativamente aos demais compostos liberados no headspace das folhas de *E. saligna*, sua presença no headspace das folhas picadas de *E. dunnii* e *E. saligna*, seu comportamento semelhante aquele observado nas emissões de algodoeiro infestado por lagarta,³⁷ sua presença no aleloquímico das plantas de feijão-lima²⁰² e a presença de *T. urticae* tanto nos experimentos com feijão-lima como nos de *E. saligna* são fatos que corroboram para a hipótese de que este composto desempenhe um papel infoquímico no eucalipto.

As diferenças nos perfis de emissões de VOC observadas entre laboratório e estufa, entre uma espécie e outra podem ser explicadas por fatores abióticos ou bióticos característicos dos dois ambientes e também dos diferentes indivíduos submetidos à experimentação. A taxa de emissão de compostos terpenóides é conhecida por ser dependente da temperatura e também, para alguns compostos, da incidência de luz, como nos casos já mencionados do isopreno e do (*E*)- β -ocimeno.^{235,256} A intensidade da luz acompanhada de comprimentos de onda apropriados têm importância crucial para fotossíntese, crescimento e outras funções da planta. A intensidade de luz no laboratório era aproximadamente 250 a 330 vezes menor do que a da estufa e o intervalo de comprimento de onda disponível no ambiente de laboratório guardado de luz fluorescente branca fria não inclui os comprimentos de onda vermelho e vermelho distante, os quais são importantes para várias funções desempenhadas pela planta.^{144,274} A variabilidade entre indivíduos de mesma espécie é um fenômeno bem conhecido¹⁵ e pode ser estendida à

variabilidade de emissões voláteis, acrescentando-se a isto, a posição das folhas, sua idade entre outros fatores, como demonstrado por Halitschke e colaboradores.²³⁵ Neste trabalho, a variabilidade entre indivíduos pode ser observada no perfil de emissões voláteis dos *E. dunnii* A e B, ambos da mesma idade, cultivados no mesmo ambiente e nas mesmas condições ambientais.

3.2.3. Óxido de rosa

De acordo com a literatura investigada, esta é a primeira vez que os compostos *cis*- e *trans*-óxido de rosa são detectados nas emissões voláteis de eucalipto,^{15,184,245} embora estes compostos já tenham sido detectados como componentes minoritários do óleo de *E. citriodora*.^{54,56,183,185,213,236,237,239,240}

O óxido de rosa (ver fórmula estrutural dos isômeros *cis*- e *trans*- óxido de rosa na (Figura A2, números 28 e 32) ou 4-metil-2-(metil-1-propenil)-tetrahidrofurano não é um componente comum do óleo de *E. citriodora*, embora, já tenha sido encontrado neste óleo, em percentuais de 1%,¹⁸⁸ 0,05% do isômero *cis*- e 0,08% do isômero *trans*-,¹⁸⁴ e 0,4% do isômero *cis*-²³⁸ Para 111 óleos essenciais de espécies de eucaliptos australianos investigadas, nenhuma apresentou óxido de rosa na composição do óleo.¹⁵

O óxido de rosa é conhecido por emprestar notas de uma fragrância excepcional aos óleos de gerânio e rosas e é uma das fragrâncias mais importantes para a criação de perfumes de fragrância de rosas.²⁷⁵ Ele foi isolado primeiramente da rosa da Bulgária (*Rosa damascena*)²⁷⁶ e foi encontrado em *Pelargonium graveolens* L'Héritier, no aroma de "black currents", (*Ribes nigrum* L. var. Brödtorp)²⁷⁷ no óleo da flor de Hamanasu,²⁷⁸ na flor de *Convallaria*,⁸⁴ em *Melissa officinalis* L.,²⁷⁹ em óleos de *Cymbopogon*,²⁸⁰ suco de frutos de *Sambucus canadensis* (do inglês "elderberry"),²⁸¹ bebida feita da flor de *Sambucus canadensis*²⁸² e em voláteis de flores de *Michelia alba*.¹⁰⁶

No caso do *cis*- e *trans*-óxido de rosa (Figura 38) – este último presente em quantidades menores quando comparado com o isômero *cis* - o padrão de emissão pode ser uma evidência de que a emissão deste composto é menos afetada pelo enclausuramento do ramo ou que o processo de degradação atmosférica foi mais

lento. Outra hipótese plausível para o aumento da emissão dos isômeros dentro da câmara é que a sua produção e emissão estejam ligadas ao sistema de defesa da planta.

É interessante observar que ambos os isômeros deste composto foram encontrados na secreção do inseto *Aromia moschata* L., onde o isômero *cis* encontra-se em maior proporção do que o *trans* (22% para 4%), de forma semelhante ao que ocorre nas emissões da folha de *E. citriodora*. A secreção deste inseto, constitui-se em defesa para o mesmo e é descarregada no ambiente quando existe o perigo de ataque de um predador.²⁶³ Algumas folhas distantes do ponto de amostragem de voláteis na árvore de *E. citriodora* encontravam-se infectadas pelo fungo *P. longispinus*, e, portanto, é razoável lançar-se a hipótese de que a emissão do óxido de rosa seja uma resposta sistêmica da planta ao ataque do fungo. Contudo, como já mencionado anteriormente, a emissão de compostos voláteis por plantas vivas é um processo complexo e uma explicação completa dos fenômenos requer investigações posteriores e encontra-se além do escopo deste trabalho. Entretanto, o papel da HS-SPME como uma ferramenta rápida, não invasiva, isenta de solvente e relativamente simples para a extração de infoquímicos e para diagnóstico do status da saúde da planta para propósitos florestais ou agrícolas abre uma perspectiva promissora. A HS-SPME permite a amostragem da planta viva intacta *in situ*, sem a necessidade de maceração ou retirada de partes da planta, processos que podem provocar alterações durante a amostragem e preparo da amostra.^{91;137}

4. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO MODO HEADSPACE APLICADA AO ESTUDO DE VOLÁTEIS EMITIDOS POR RÃS *Litoria ewingi*

4.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES¹⁵⁴

Com o objetivo de verificar a potencialidade da técnica de HS-SPME para amostragem de compostos voláteis emitidos por organismos vivos, a "brown tree frog" (*Litoria ewingi*) foi estudada conforme descrito no item 5.3 do Capítulo III. A Tabela XIV apresenta os resultados preliminares obtidos a partir da extração simultânea do headspace da rã utilizando-se fibras recobertas com PDMS 100 μm , PDMS/DVB e CAR/PDMS. As fibras sólidas apresentaram melhor performance, sendo que a PDMS/DVB foi superior à CAR/PDMS na maioria dos casos, conforme já havia sido relatado na literatura para outros compostos voláteis.^{115,116} Em vista disto, a PDMS/DVB foi escolhida para o desenvolvimento do trabalho posterior.

Utilizando o método de Tyler, onde são feitos extratos hexânicos da mistura secreção/água, não foi possível detectar nenhum destes terpenos, contudo, com HS-SPME, limoneno e eucaliptol foram detectados e identificados.¹⁵⁴ O método de Tyler é eficiente para compostos não voláteis, como peptídeos e alcalóides, contudo é limitado para outros compostos, pois a lavagem da secreção com água torna difícil a extração de compostos insolúveis em água que se encontram presentes em baixas concentrações. Tais razões podem explicar a ausência de eucaliptol e limoneno nos extratos hexânicos da secreção de *L. ewingi*.

Tabela XIV. Detecção de limoneno e eucaliptol nas emissões voláteis de *L. ewingi* utilizando-se relação S/N.

	PDMS/DVB 65 μ m		CAR/PDMS 75 μ m		PDMS 100 μ m	
	Limoneno	Eucaliptol	Limoneno	Eucaliptol	Limoneno	Eucaliptol
Controle 1	***	***	***	***	nd	nd
Rã 1	***	***	***	***	36	7
Controle 2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rã 2	20	15	#	#	nd	nd
Controle 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rã 3	#	#	18	33	11	14
Controle 4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rã 4	280	68	60	26	84	19
Controle 5	9	nd	6	nd	tr	nd
Rã 5	280	91	65	48	67	36
Controle 6	12	nd	15	nd	10	nd
Rã 6	146	32	23	30	44	48
Controle 7	tr	nd	nd	nd	***	***
Rã 7	41	14	34	26	***	***
Controle 8	tr	nd	nd	nd	***	***
Rã 8	96	35	80	36	***	***

Notas: *** a fibra não foi testada; nd composto não detectado (S/N<3); # fibra foi danificada pela rã ; tr composto detectado em traços ($3 \leq S/N < 5$).

4.2. ASSIMILAÇÃO DE LIMONENO E EUCALIPTOL ATRAVÉS DA DIETA

As Figuras 43 e 44 mostram os resultados obtidos para os valores de área no GC/ITMS, quando os dois conjuntos de quatro rãs submetidas às dietas com limoneno e eucaliptol respectivamente foram amostradas e analisadas. A Figura 45 mostra a fração do cromatograma relativa ao pico do eucaliptol emitido por uma rã submetida à dieta com eucaliptol e na Figura 44 é possível verificar o aumento da quantidade de eucaliptol liberada por 3 das 4 rãs após a dieta à base deste composto. Todos os cromatogramas foram obtidos sob condições analíticas idênticas e por isto permitem a comparação entre áreas do mesmo composto.

As áreas dos compostos voláteis emitidos pelas quatro rãs submetidas à dieta com limoneno não se apresentam tão diferentes daquelas obtidas anteriormente sem que os anfíbios estivessem sob dieta especial (Figuras 43 e 46). Contudo, a dieta convencional dos grilos utilizados para alimentar as rãs nos experimentos preliminares incluiu, acidentalmente, pedaços de laranja, sendo esta provavelmente a razão pela qual as rãs também emitiram limoneno durante situação de estresse nos primeiros experimentos. A ação inseticida dos monoterpenos é relatada na literatura, sendo o limoneno²⁸⁴⁻²⁸⁶, e o eucaliptol²⁸⁷ conhecidos por este tipo de atividade.

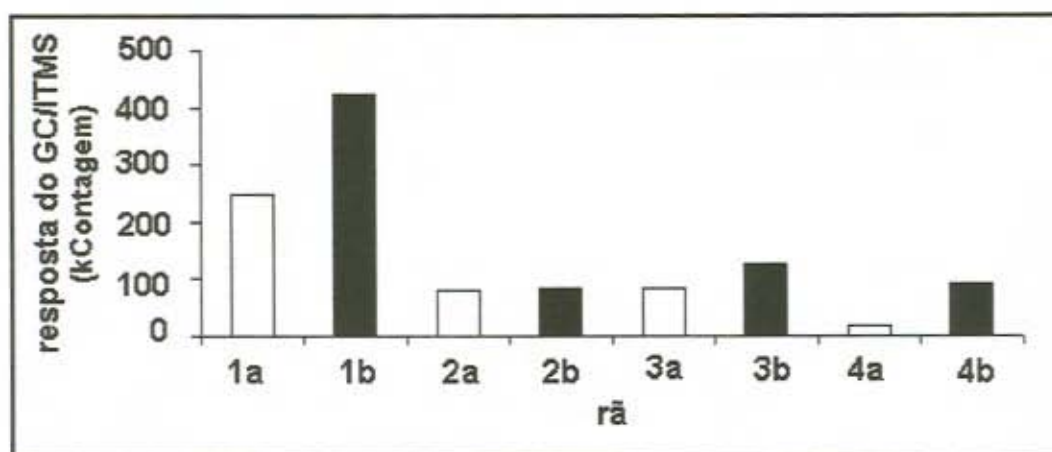


Figura 43. Diagrama das áreas do pico cromatográfico do limoneno emitido por 4 rãs *L. ewingi*, durante situação de estresse, conforme a dieta a qual foram submetidas (a) os grilos que serviram de alimento haviam recebido alimentação normal; (b) os grilos que alimentaram as rãs receberam doses de limoneno.

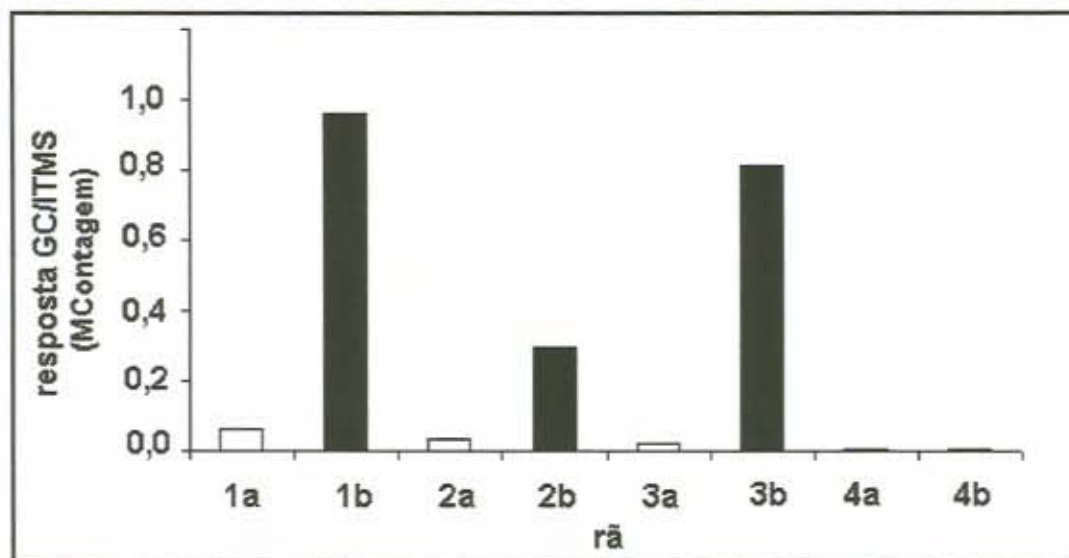


Figura 44. Diagrama das áreas do pico cromatográfico do eucaliptol emitido por 4 rãs *L. ewingi*, durante situação de estresse, conforme a dieta a qual foram submetidas (a) os grilos que serviram de alimento haviam recebido alimentação normal; (b) os grilos que alimentaram as rãs receberam doses de eucaliptol.

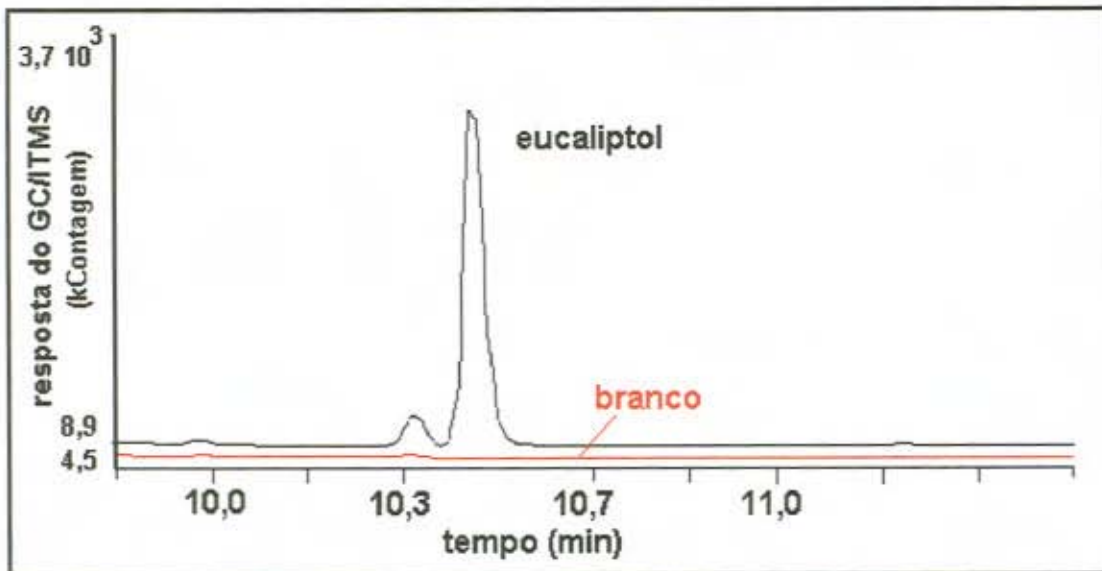


Figura 45. Fração do cromatograma do íon total das emissões voláteis de *L. ewingi* sob estresse, apresentando a região na qual o eucaliptol elui. O traço preto superior indica dieta rica em eucaliptol e o traço inferior, dieta isenta deste composto. Condições cromatográficas citadas na Tabela IV.

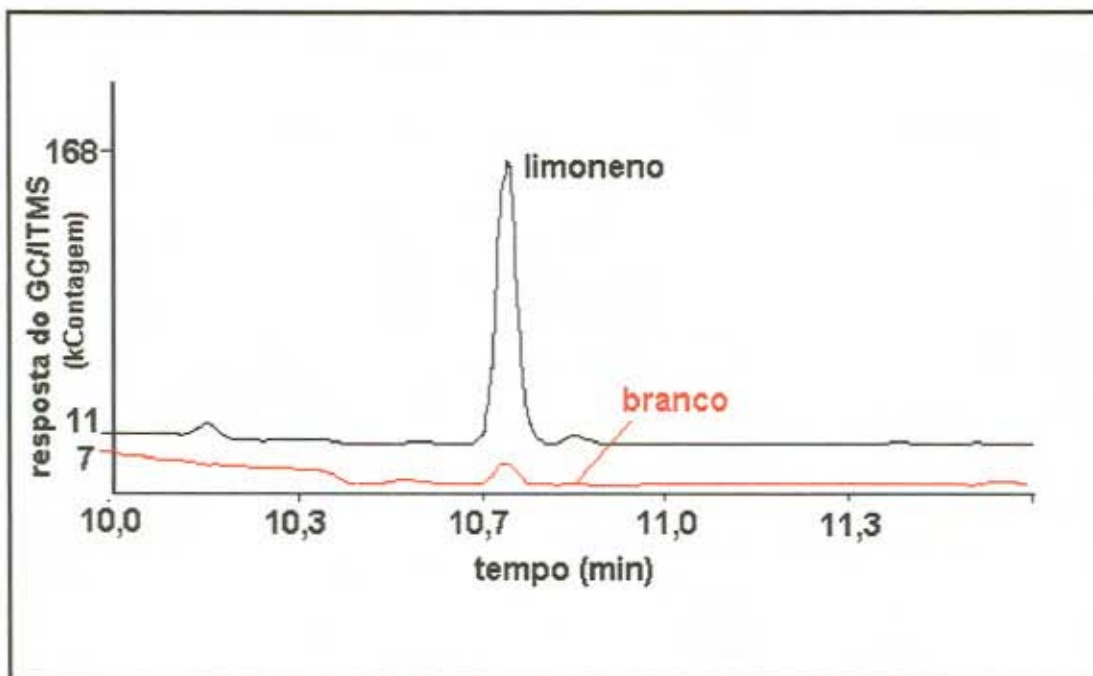


Figura 46. Fração do cromatograma do íon total das emissões voláteis de *L. ewingi* sob estresse, apresentando a região na qual o limoneno elui. O traço preto superior indica dieta rica em eucaliptol. Condições cromatográficas citadas na Tabela IV.

4.3. ASSIMILAÇÃO DE TERPENOS ATRAVÉS DA PELE

A assimilação de compostos voláteis através da derme da rã foi verificada monitorando-se o perfil cromatográfico dos compostos emitidos pelas rãs em situação de estresse, depois de 1 mês de exposição das mesmas às folhas de *E. dunnii*. A Figura 47 mostra o perfil cromatográfico dos compostos emitidos pela rã (A) e também a análise feita dos óleo das folhas de *E. dunnii* obtido por HD (B).

Não foram observadas emissões voláteis na atmosfera ao redor dos animais não estressados, indicando que os compostos adquiridos das folhas não estavam apenas aderidos à superfície da pele da rã, mas encontravam-se acumulados mais internamente nas glândulas do animal. Este experimento também mostrou que o padrão de emissão das rãs não é contínuo, mas ocorre apenas em situação de estresse. A Figura 48 mostra o cromatograma obtido a partir a amostragem do headspace das rãs em repouso e das rãs submetidas a estresse.

A HS-SPME oferece várias vantagens na amostragem de seres vivos, dentre elas, uma das mais importantes é o fato de ser uma técnica não destrutiva. Secreções glandulares são tipicamente obtidas via extração da pele das rãs. Em um trabalho citado na literatura, para algumas espécies mais do que 1000 indivíduos tiveram que ser sacrificados para que se obtivesse quantidade suficiente para possibilitar a identificação de compostos.²⁸⁸ Além disso, é bem conhecido o fato de que os compostos voláteis obtidos de glândulas isoladas ou amostras de tecido não são representativos da mistura emitida pelo organismo vivo intacto.^{158;289-291}

Com o uso da HS-SPME é possível amostrar as emissões voláteis sem machucar o animal, havendo a possibilidade ainda de efetuar amostragens repetitivas em vários estágios da vida do mesmo. Este recurso aumenta a quantidade de informação obtida durante o curso da vida de um só indivíduo.

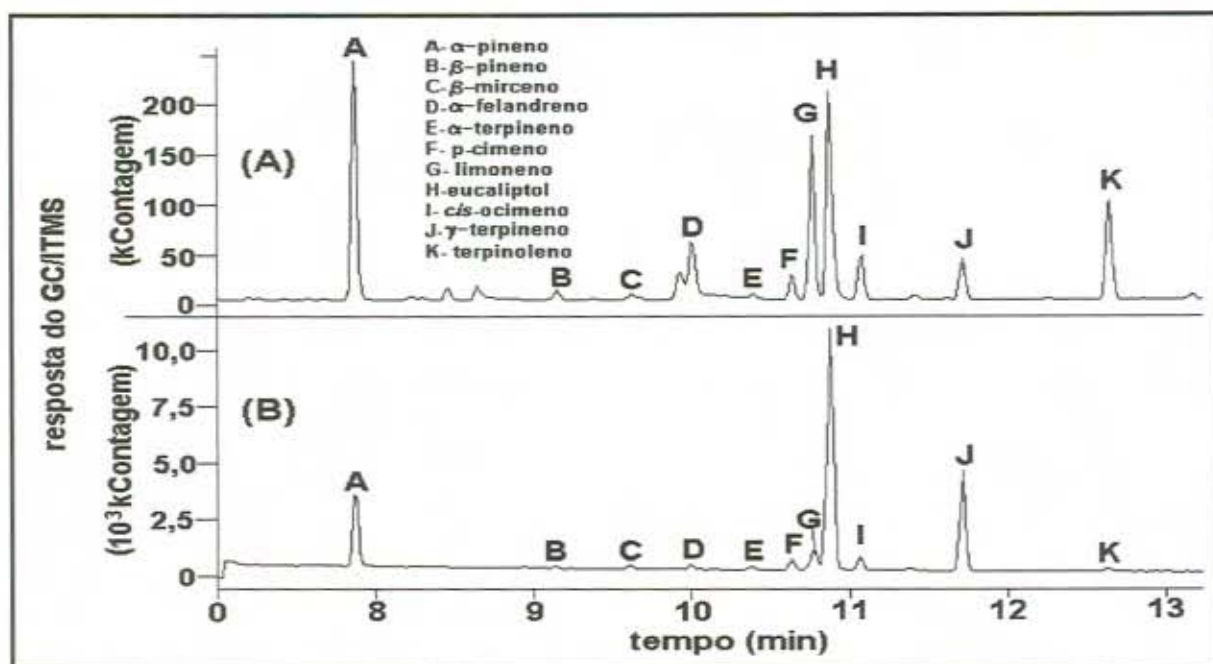


Figura 47. (A) Cromatograma do íon total dos componentes voláteis emitidos pela rã *L. ewingi* sob estresse, após 1 mês de contato com folhas de *E. dunnii*. (B) Cromatograma do íon total do óleo essencial de *E. dunnii*.

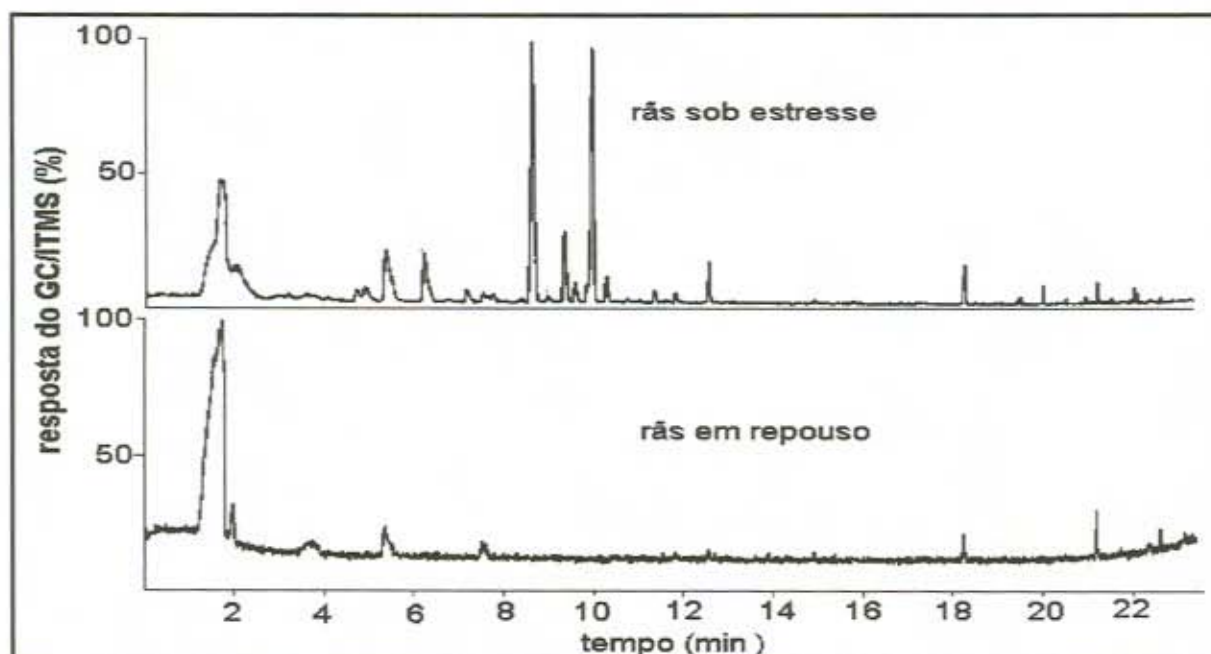


Figura 48. Cromatograma do íon total das emissões voláteis de *L. ewingi* em situação de estresse e de repouso. Os picos do cromatograma inferior correspondem à sangramento da fibra.

As secreções glandulares de rãs são misturas complexas de compostos voláteis e não voláteis. A HS-SPME limita a análise aos compostos que são suficientemente voláteis para interagir com outros organismos ou com o meio ambiente. A exclusão dos compostos não voláteis reduz o número de compostos no perfil de emissões químicas, facilitando a interpretação do cromatograma. Sabe-se também que a presença destes outros compostos no extrato pode provocar reações indesejadas,^{91,292,293} alterando a mistura de compostos voláteis emitidos pelo organismo ou mascarando a sua presença.

As diminutas dimensões da fibra e sua alta capacidade de extrair baixas concentrações de analitos possibilita a amostragem de um único indivíduo, sem perturbação do mesmo ou do seu ambiente. A fim de realizar a análise dos compostos contidos na secreção através de extração com solvente,²⁹⁴ em média, são necessárias peles de 2 animais.

Malosse¹⁶³ deixa clara esta dificuldade dos métodos convencionais, quando relata que foi necessário extrair 50 glândulas usando extração com solvente para que se chegasse a quantidade de feromônio requerida.

O fato de a utilização de fibras sólidas proporcionar uma amostragem rápida (< 1 minuto) é ideal para minimizar a desidratação da pele da rã. Devido à natureza da pele da rã e também ao seu papel como superfície respiratória, é importante mantê-la úmida. Métodos convencionais para amostragem de compostos voláteis empregam sistemas dinâmicos onde um fluxo de ar passa pelo anfíbio durante a amostragem. O estresse provocado pela dessecação resultante destes procedimentos pode alterar o perfil de emissões voláteis do animal. Alternativamente, ar umidificado pode ser usado, contudo, os adsorventes empregados para remover a umidade podem causar perda de analitos, sendo que as moléculas de água podem também competir pelo sítios no adsorvente reduzindo a quantidade de compostos voláteis coletados.¹¹⁸

Além das considerações analíticas, existem constrangimentos éticos associados à experimentação com animais. Devido ao declínio mundial da população de muitas espécies de rãs, torna-se ainda mais importante a utilização de técnicas de extração não invasivas devido ao limitado número de rãs ou ao fato de se tratarem de espécies ameaçadas ou difíceis de obter.²⁹⁵

5. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTE TRABALHO

Os principais resultados obtidos relativamente às três espécies de eucalipto estudadas (*E. dunnii*, *E. citriodora* e *E. saligna*) estão resumidos a seguir:

5.1. EM RELAÇÃO À HIDRODESTILAÇÃO E À HS-SPME APLICADAS ÀS FOLHAS DE EUCALIPTO PICADAS

5.1.1. Foram detectados 120 compostos nos óleos hidrodestilados e no headspace das folhas picadas das três espécies de eucalipto, dos quais 30 foram identificados e 43 foram tentativamente identificados. Os demais permaneceram não identificados ou foi-lhes sugerido um possível grupo químico;

5.1.2. Sessenta e dois compostos foram detectados através de ambas as técnicas de extração utilizadas com as folhas de *E. citriodora*, 57 no óleo hidrodestilado e 48 no headspace das folhas picadas;

5.1.3. O total de compostos detectados tanto através de HS-SPME das folhas picadas, como de hidrodestilação de duas árvores de *E. dunnii* (árvores A e B) foi de 67 compostos. Oito destes estavam presentes apenas no headspace das folhas picadas e outros oito somente nos óleos hidrodestilados;

5.1.4. Um total de 62 compostos foi detectado através de ambas as técnicas de extração utilizadas com as folhas de *E. saligna*, 58 no óleo hidrodestilado e 35 no headspace das folhas picadas. Entre estes, 27 compostos foram detectados apenas no óleo hidrodestilado e 4 somente através de HS-SPME;

5.1.5. Foi desenvolvido um método analítico para análise qualitativa do headspace de folhas picadas de eucalipto, o qual pode ser empregado manualmente ou com a utilização de amostrador automático, utilizando-se temperatura de 30 °C, tempo de extração de 30 min e fibra recoberta de PDMS 7 µm, o qual se mostrou eficiente na detecção de alguns compostos que não estão presentes no óleo hidrodestilado das espécies testadas;

5.1.6. Foram detectados compostos da folha verde (GLV) em folhas frescas recém picadas de *E. dunnii*, *E. saligna* e *E. citriodora*, utilizando-se o método desenvolvido para extração do headspace de folhas picadas;

5.1.7. A dinâmica de formação e desaparecimento dos compostos hexenal, 3-(Z)-hexen-1-ol, 3-(Z)-acetato de hexenila e acetato de hexila no headspace de folhas frescas picadas de *E. dunnii* foi monitorada por 24 h, utilizando-se SPME;

5.1.8. Os terpenos tentativamente identificados como (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) e (*E,E,E*)-3,7,11,15-tetrametil-1,3,6,10,14-hexadecapentaeno (TMHP) foram detectados no headspace de folhas picadas de *E. dunnii* e não o foram no óleo hidrodestilado. Os dois primeiros compostos também foram detectados no headspace das folhas picadas de *E. saligna* e na atmosfera ao redor das folhas de *E. saligna in situ*: DMNT nos dois primeiros dias de amostragem e TMTT no terceiro dia de amostragem. Traços de DMNT foram detectados no headspace das folhas de *E. dunnii in situ*;

5.1.9. (*E,E*)- α -Farneseno esteve presente no headspace das folhas picadas de todas as 3 espécies e nas emissões aéreas de *E. saligna* e *E. dunnii in situ* e não foi detectado nos óleos hidrodestilados das mesmas espécies;

5.1.10. Epatulenol não foi detectado no headspace das folhas picadas de todas as 3 espécies, tendo sido detectado no óleos hidrodestilados. Este fato, juntamente com outras evidências presentes na literatura leva à hipótese de que o espatulenol encontrado nos óleos destilados de eucalipto seja, possivelmente, um artefato;

5.1.11. Foram encontrados outros quatro terpenos utilizando-se HS-SPME em folhas cortadas de *E. dunnii*, os quais não foram detectados no óleo hidrodestilado: β -cariofileno, α -cariofileno e outros dois que foram tentativamente identificados como β -cubebeno e germacreno D;

5.1.12. A presença dos compostos (*E,E*)- α -farneseno, 3-(*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) no headspace das folhas picadas de *E. dunnii* e *E. saligna* e também na atmosfera das folhas de *E. saligna in situ*, agregada às informações da literatura sobre funções infoquímicas destes compostos em outras plantas, sugere um possível papel biológico destes compostos nas folhas vivas;

5.1.13. A presença dos compostos β -cariofileno, α -cariofileno, germacreno D, juntamente com informações da literatura sobre funções infoquímicas destes compostos em outras plantas também sugere alguma função biológica para estes compostos nas folhas picadas de eucalipto;

5.1.14. Seis compostos oxigenados foram detectados no óleo hidrodestilado de *E. dunnii* e *E. saligna*, mas não o foram no headspace das folhas picadas destas árvores, nas condições experimentais deste trabalho: endo fenchol, *trans*-pinocarveol, pinocarvona, 8-p-cimenol, *trans*-carveol, e *cis*-carveol;

5.1.15. Os rendimentos em óleo obtidos nos processos de hidrodestilação das 3 espécies, na sua maioria, confirmam os dados encontrados na literatura;

5.1.16. Os compostos majoritários no óleo de *E. citriodora* foram citronelal e citronelal e no óleo de *E. dunnii* eucaliptol, confirmando as informações existentes na literatura;

5.1.17. O composto principal do óleo de *E. saligna* foi o α -pineno, confirmando dados encontrados em algumas fontes da literatura;

5.2. EM RELAÇÃO À APLICAÇÃO DA HS-SPME À AMOSTRAGEM DE VOLÁTEIS DE FOLHAS DE EUCALIPTOS *in situ* E RÃS *in vivo*

5.2.1. A HS-SPME (PDMS/DVB) é uma ferramenta analítica simples, não invasiva e rápida que permite o monitoramento de VOC liberados pela planta em curtos intervalos de tempo por longos períodos, *in situ* e também por *L. ewingi*, *in vivo*;

5.2.2. A fibra recoberta com PDMS/DVB foi a que apresentou melhor performance na extração de compostos voláteis emitidos por folhas de eucalipto *in situ* e *L. ewingi* *in vivo*, utilizando-se 1 min como tempo de extração;

5.3. EM RELAÇÃO À APLICAÇÃO DA HS-SPME À AMOSTRAGEM DE VOLÁTEIS DE FOLHAS DE EUCALIPTOS *in situ*

5.3.1. Foi desenvolvido um método analítico para monitorar compostos voláteis de folhas de eucalipto *in situ* utilizando HS-SPME e uma câmara de vidro confeccionada para este fim;

5.3.2. A aplicação da HS-SPME como ferramenta para o monitoramento de compostos voláteis emitidos por folhas de *E. citriodora*, *E. dunnii* e *E. saligna* *in situ* (estufa ou laboratório) permitiu o acompanhamento do perfil de emissão (razão entre a área máxima durante o período total de monitoramento e a área do pico cromatográfico do composto emitido em um determinado intervalo de tempo) de compostos voláteis emitidos durante intervalos de 30 min por 8 a 10 h durante vários dias consecutivos;

5.3.3. Dois padrões de emissão de voláteis foram identificados nos perfis circadianos de *E. citriodora*: a) a quantidade máxima de citronelal (também citronelol, β -cariofileno, entre outros em *E. dunnii* A) é emitida logo após o fechamento das folhas dentro da câmara com subsequente diminuição; b) a quantidade de *cis*-,

trans-óxido de rosa e (*E*)- β -ocimeno (e β -cariofileno em *E. dunnii* B) atinge um máximo após algum tempo de enclausuramento das folhas na câmara e depois diminui ou permanece aproximadamente constante. No caso do *E. citriodora* este máximo é atingido entre 300 e 400 min tanto para o óxido de rosa, como para (*E*)- β -ocimeno. Para *E. dunnii* o máximo de (*E*)- β -ocimeno fica entre 200 e 400 min e para *E. saligna* entre 420 min e 540 min. O padrão de emissão b) só foi observado na presença de luz solar;

5.3.4. Os resultados obtidos nos experimentos de amostragem de voláteis de eucaliptos *in situ* sugerem que *cis*-, *trans*-óxido de rosa, (*E*)- β -ocimeno e β -cariofileno podem ser infoquímicos utilizados como defesa durante situações de estresse;

5.3.5. Um total de 33 compostos foi detectado nas emissões aéreas de folhas de *E. citriodora in situ* utilizando-se método desenvolvido para SPME. Dentre estes, 16 compostos foram identificados, 4 foram tentativamente identificados e 13 outros compostos terpenóides foram sistematicamente detectados durante as amostragens como traços;

5.3.6. Vinte e sete compostos foram detectados nas emissões aéreas de folhas de *E. dunnii* A e B *in situ*. Dentre eles, 19 foram identificados e os demais não foram identificados;

5.3.7. Quarenta e dois compostos foram detectados nas emissões aéreas de folhas de *E. saligna in situ*. Dentre eles, 20 foram identificados, 4 foram tentativamente identificados e os demais estavam presentes na forma de traços;

5.3.8. Os compostos majoritários encontrados nas emissões aéreas de folhas de eucalipto *in situ* foram: citronelal e citronelol em *E. citriodora*; eucaliptol, (*E*)- β -ocimeno e *p*-cimeno em *E. dunnii* e α -pineno, (*E*)- β -ocimeno e *p*-cimeno em *E. saligna*;

5.3.9. Os resultados obtidos confirmam constatação já existente na literatura para algumas plantas, de que a emissão e/ou geração de (*E*)- β -ocimeno é um fenômeno dependente da presença de luz solar. O mesmo se aplica ao isopreno;

5.3.10. β -Cariofileno é emitido pelas folhas de *E. dunnii* B *in situ*, mas não pelas de *E. dunnii* A, tendo ambas sido amostradas por 3 dias;

5.4. EM RELAÇÃO À APLICAÇÃO DA HS-SPME À AMOSTRAGEM DE VOLÁTEIS DE *L. ewingi* *in vivo*

5.4.1 O método desenvolvido para extração de compostos voláteis, utilizando HS-SPME, permitiu a identificação de limoneno e eucaliptol nas emissões voláteis de *L. ewingi* *in vivo* sob estresse;

5.4.2. O método desenvolvido para extração de compostos voláteis, utilizando HS-SPME, permitiu a verificação do aumento da quantidade de eucaliptol emitido pela rã *L. ewingi*, após 1 mês de dieta rica em eucaliptol, evidenciando a possibilidade de captação deste composto através da dieta;

5.4.3. O método desenvolvido para extração de compostos voláteis, utilizando HS-SPME, permitiu a verificação da emissão de vários monoterpenos pela *L. ewingi* *in vivo*, sob estresse, após 1 mês de contato entre as rãs e folhas de *E. dunnii*, evidenciando a possibilidade de captação destes compostos através da derme da rã e a interação *E. dunnii* – *L. ewingi*.

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES

A aplicação de HS-SPME tanto na amostragem do headspace de folhas picadas como de folhas *in situ* e rãs *in vitro*, resultou na descoberta de compostos voláteis que não foram detectados nos óleos essenciais das folhas das mesmas árvores testadas, nem nos extratos de peles de rãs, obtidos por técnicas convencionais de extração. Alguns destes compostos já haviam sido encontrados nos voláteis emitidos como agentes de defesa de outras plantas. Este fato, agregado ao padrão de emissão de alguns destes compostos voláteis no headspace das folhas *in situ*, mostra que a utilização da técnica de HS-SPME para amostragem de voláteis de folhas de eucaliptos e de *L. ewingi in vivo*, abre um vasto horizonte de investigação de voláteis de plantas e animais *in vivo*, onde se visualiza a investigação futura de novos infoquímicos, de infoquímicos já conhecidos e o estudo de suas rotas de biogênese e emissão. Este desenvolvimento futuro pode auxiliar na busca de compostos bioativos que tenham papel importante como potenciais medicamentos para a saúde humana e animal e também como possíveis defensivos naturais na agricultura e silvicultura.

As principais vantagens observadas no uso da HS-SPME na amostragem de voláteis emitidos pelos organismos vivos, as quais são dificilmente obtidas por outras técnicas analíticas, são:

- ✓ proteção da vida devido ao seu caráter não-invasivo e não destrutivo, possibilitando a amostragem do indivíduo em várias etapas de sua vida, permitindo inclusive o estudo de espécies ameaçadas de extinção;
- ✓ obtenção de informações características de um sistema vivo intocado ou sob estresse;
- ✓ perturbação mínima do sistema vivo e de seu headspace devido às suas dimensões diminutas;
- ✓ pequenos tempos de amostragem e excelente capacidade de pré-concentração (1 min para filmes porosos), de forma a permitir o acompanhamento das rápidas alterações que ocorrem nos processos biológicos, mesmo quando a extração é feita com apenas um indivíduo ou parte do mesmo;
- ✓ relativa simplicidade para amostragem em campo.

Uma desvantagem observada no desenvolvimento deste trabalho na técnica SPME é a presença de sangramento das fibras durante a análise cromatográfica, o que pode dificultar a identificação de compostos cujos tempos de retenção coincidam com os picos de sangramento das fibras recobertas por filmes poliméricos.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Giamakis, A.; Kretsi, O.; Chinou, I.; Spyropoulos, C. G. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 351.
2. Milner, C. P., Trengove, R. D., Bignell, C. M., and Dunlop, P. J. *Supercritical CO₂ Extraction of the Essential Oils of Eucalypts: A Comparison With Other Methods*. Linskens, H.-F. and Jackson, J. F. [19], 141-158. 1997. Berlin, Springer-Verlag. *Modern Methods of Plant Analysis*.
3. Boland, D. J.; Brophy, J. J. *ACS Symp.Ser.* **1993**, *525*, 72.
4. Eucalipto: A Boa Cobertura Vegetal. A Palavra **49**. 15-8-2001.
5. Craveiro, A. A.; Fernandes, A. G.; C.H.S.; Matos, F. J. A.; Alencar, J. W.; Machado, M. I. L. *Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste*, Fortaleza, 1981; 1-208.
6. Assis Brasil, G. A.; Bauer, L. *Rev.Bras.Farm.* **1972**, 205.
7. Bauer, L.; Silva, G. A. A. B. *Rev.Bras.Farm.* **1971**, 283.
8. Doran, J. C.; Williams, E. R. *Commonwealth Forestry Review* **1994**, *73*, 261.
9. Dunlop, P. J.; Bignell, C. M.; Hibbert, D. B. *Aust.J.Bot.* **1997**, *45*, 1.
10. Kesselmeier, J.; Staudt, M. *J.Atmos.Chem.* **1999**, *33*, 23.
11. Mateus, E. P.; Farrall, M. H.; Paiva, M. R. *J.Microcolumn Sep.* **1995**, *7*, 641.
12. Nishimura H.; Mizutani, J. *ACS Symposium Series*; Japan, 1995; Chapter 5, pp. 74.
13. Theodoridis, G.; Koster, E. H. M.; Jong, G. J. d. *J.Chromatogr.B* **2000**, *745*, 49.
14. Kohli, R. K.; Daizy, R. B.; Singh, H. P. *Crop Protection* **1998**, *17*, 119.
15. Boland, D. J.; Brophy, J. J.; House, A. P. N. *Eucalyptus Leaf Oils – Use, Chemistry, Distillation and Marketing*, Inkata Press: Melbourne, 1991; 1-252.
16. Dicke, M.; Sabelis, M. W.; Takabayashi, J.; Bruin, J.; Posthumus, M. A. *J.Chem.Ecol.* **1990**, *16*, 3091.
17. Benouda, A.; Hassar, M.; Benjilali, B. B. *Fitoterapia* **1988**, *59*, 115.
18. Tibballs, J.; James, A. *Aust.J.Hosp.Pharm.* **1995**, *25*, 516.
19. Abdullah, D.; Ping, Q. N.; Liu, G. J. *Acta Pharmaceutica Sinica* **1996**, *31*, 214.
20. Xiong, G. L.; Quan, D.; Maibach, H. I. *J.Control.Rel.* **1996**, *42*, 289.
21. Göbel, H.; Schmidt, G.; Dworschak, M.; Stolze, H.; Heuss, D. *Phytomed.* **1995**, *2*, 93.
22. Göbel, H.; Schmidt, G.; Soyka, D. *Cephalalgia* **1994**, *14*, 228.
23. Kazuchiro, C.; Arakawa, T.; Tada, M. *Chem.Commun.* **1996**, *15*, 1763.
24. Barton, A. *West.Aust.Dept Agric.Misc.Publ.* **1989**, *9*, 21.
25. Xavier, A.; Borges, R. d. C. G.; Pires, I. E.; Cruz, C. D. *Rev.Árv.Viçosa* **1993**, *17*, 224.
26. Arias, A. R.; Schmeda-Hirschmann, G.; Falcao, A. *Phytotherapy Res.* **1992**, *6*, 64.
27. Trigg, J. K.; Hill, N. *Phytotherapy Res.* **1996**, *10*, 313.
28. Modgil, R.; Samuels, R. *Nahrung* **1998**, *42*, 304.
29. Raghavaiah, G.; Jayaramaiah, M. *Indian Perfumer* **1987**, *31*, 328.

30. Mumcuoglu, K. Y.; Galun, R.; Bach, U.; Miller, J.; Magdassi, S. *Entom.Exper.Applic.* **1996**, *78*, 309.
31. Scortichini, M.; Rossi, M. P. *J.Appl.Bacteriol.* **1991**, *71*, 109.
32. Charlwood, B. V.; Banthorpe, D. V. *Methods in Plant Biochemistry - Terpenoids*, Academic Press: New York, 1991; 1-185.
33. Schreier, P. Chromatographic Studies of Biogenesis of Plant Volatiles. 1-171. 1984. Heidelberg, Dr. Alfred Hüthing Verlag. Chromatographic Methods. Bertsch, W., Jennings, W. G., and Kaiser, R. E.
34. Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Sekiya, J. *Chem.Phys.Lipids* **1987**, *44*, 341.
35. Paré, P. W.; Tumlinson, J. H. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 325.
36. Hatanaka, A. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1201.
37. Loughrin, J. H.; Manukian, A.; Heath, R. R.; Turlings, T. C. J. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1994**, *91*, 11836.
38. Kalberer, N. M.; Turlings, T. C. J.; Rahier, M. *J.Chem.Ecol.* **2001**, *27*, 647.
39. Weissbecker, B.; Schütz, S.; Klein, A.; Hummel.H.E. *Talanta* **1997**, *44*, 2217.
40. Visser, J. H.; van Straten, S.; Maarse, H. *J.Chem.Ecol.* **1979**, *5*, 13.
41. Vaughn, S. F.; Gardner, H. W. *J.Chem.Ecol.* **1993**, *19*, 2337.
42. Grechkin, A. *Prog.Lipid Res.* **1998**, *37*, 317.
43. Croft, K. P. C.; Jüttner, F.; Slusarenko, A. J. *Plant Physiol.* **1993**, *101*, 13.
44. Takabayashi, J.; Dicke, M.; Posthumus, M. A. *Chemoecol.* **1991**, *2*, 1.
45. Ruther, J. *J.Chromatogr.A* **2000**, *890*, 313.
46. Mattiacci, L.; Dicke, M.; Posthumus, M. A. *J.Chem.Ecol.* **1994**, *20*, 2229.
47. Zhuang, H.; Hamilton-Kemp, T. R.; Andersen, R. A.; Hildebrand, D. F. *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 805.
48. Hatanaka, A.; Harada, T. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2341.
49. Järvenpää, E. P.; Zhang, Z.; Huopalahti, R.; King, J. W. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.A* **1998**, *207*, 39.
50. Palma-Harris, C.; Mcfeeters, R. F.; Fleming, H. P. *J.Agric.Food Chem.* **2001**, *48*, 4203.
51. Maes, K.; Vercammen, J.; Pham-Tuan, H.; Sandra, P.; Debergh, P. C. *Phytochem.Anal.* **2001**, *12*, 153.
52. Charron, C. S.; Sams, C. E. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* **1999**, *124*, 462.
53. Asefa, A.; Dagne, E. *Bull.Chem.Soc.Ethiop.* **1997**, *11*, 47.
54. Moudachirou, M.; Gbénou, J. D.; Chalchat, J.-C.; Chabard, J. L.; Lartigue, C. *J.Essent.Oil Res.* **1999**, *11*, 109.
55. Zrira, S. S.; Benjilali, B. B. *J.Essent.Oil Res.* **1996**, *8*, 19.
56. Chalchat, J.-C.; Garry, R.-P.; Sidibé, L.; Harama, M. *J.Essent.Oil Res.* **2000**, *12*, 695.

57. Menut, C.; Lamaty, G.; Malanda-Kiyabou, G.; Bessièrè, J.-M. *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *4*, 427.
58. Santos-Gomes, P. C.; Fernandes-Ferreira, M. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2908.
59. Lorenzo, D.; Saavedra, G.; Loayza, I.; Dellacassa, E. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 353.
60. Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 459.
61. Inman, R. B., Dunlop, P., and Jackson, J. F. *Oils and Waxes of Eucalypts Vacuum Distillation Method for Essential Oils*. [12], 195-203. 1991. Berlin, Springer Verlag. *Modern Methods of Plant Analysis*. Linskens, H.-F. and Jackson, J. F.
62. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Fookes, C. J. R. *Flavour Fragr. J.* **1997**, *12*, 177.
63. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1996**, *11*, 101.
64. Bignell, C. M.; Dunlop, P.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1996**, *11*, 145.
65. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1996**, *11*, 107.
66. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1995**, *10*, 359.
67. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1994**, *9*, 167.
68. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1994**, *9*, 309.
69. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1995**, *10*, 85.
70. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1995**, *10*, 313.
71. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1996**, *11*, 35.
72. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1996**, *11*, 43.
73. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J.; Jackson, J. F. *Flavour Fragr. J.* **1996**, *11*, 95.
74. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J. *Flavour Fragr. J.* **1997**, *12*, 269.
75. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J. *Flavour Fragr. J.* **1997**, *12*, 185.
76. Bignell, C. M.; Dunlop, P. J.; Brophy, J. J. *Flavour Fragr. J.* **1997**, *12*, 261.
77. Bignell, C. M.; Dunlop, P.; Brophy, J. J. *Flavour Fragr. J.* **1997**, *12*, 277.
78. Tena, M. T.; Valcárcel, M.; Hidalgo, P. J.; Uebera, J. L. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 521.

79. Reverchon, E. *J.Supercrit.Fluids* **1997**, *10*, 1.
80. Pino, J. A.; Garcia, J.; Martinez, M. A. *J.Essent.Oil Res.* **1999**, *11*, 191.
81. Smith, R. M.; Burford, M. D. *J.Chromatogr.* **1992**, *627*, 255.
82. Hawthorne, S. B.; Riekkola, M.-L.; Serenius, K.; Holm, Y.; Hiltunen, R.; Hartonen, K. *J.Chromatogr.* **1993**, *634*, 297.
83. Sandra, P.; Bicchi, C. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*, New York, 1987; 1.
84. Knudsen, J. T.; Tollsten, L.; Bergström, L. G. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 253.
85. Agelopoulos, N. G.; Hooper, A. M.; Maniar, S. P.; Pickett, J. A.; Wadhams, L. J. *Phytochemistry* **1999**, *25*, 1411.
86. Vercammen, J.; Sandra, P.; Baltussen, E.; Sandra, T.; David, F. *J.High Resolut.Chromatogr.* **2000**, *23*, 547.
87. Christensen, L. P.; Jakobsen, H. B.; Kristiansen, K.; Møller, J. *J.Agric.Food Chem.* **1997**, *45*, 2199.
88. Tollsten, L.; Müller, P. M. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 759.
89. Mazza, G.; Cottrell, T. *J.Agric.Food Chem.* **1999**, *47*, 3081.
90. Jiang, L.; Kubota, K. *J.Agric.Food Chem.* **2001**, *49*, 1357.
91. Tollsten, L.; Bergström, G. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 4013.
92. Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction - Theory and Practice*, Wiley-VCH: New York, 1997; 1-247.
93. Belardi, R. G.; Pawliszyn, J. *Water Pollut.Res.J.Can* **1989**, *25*, 179.
94. Pawliszyn, J. *Applications of Solid Phase Microextraction*, RSC: Cambridge, 1999; 1-655.
95. Wercinski, S. A. S. *Solid Phase Microextraction - a practical guide*, Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999; 1-257.
96. Rohloff, J. *J.Agric.Food Chem.* **1999**, *47*, 3782.
97. Betts, T. J. *Planta Med.* **2000**, *66*, 193.
98. Augusto, F.; Valente, A. L. P. *Tr.Anal.Chem.* **2001**, *21*, 428.
99. Cornu, A.; Camat A-P.; Martin, B.; Coulon, J.-B.; Lamaison, J.-L.; Berdagué, J. L. *J.Agric.Food Chem.* **2001**, *49*, 203.
100. Fernando, L. N.; Grun, I. U. *Flavour Fragr.J.* **2001**, *16*, 289.
101. Rohloff, J. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 655.
102. Rohloff, J.; Skagen, E. B.; Steen, A. H.; Iversen, T.-H. *J.Agric.Food Chem.* **2000**, *48*, 6205.
103. Field, J. A.; Nickerson, G.; James, D. D.; Heider, C. *J.Agric.Food Chem.* **1996**, *44*, 1768.
104. Kovacevic, M.; Kac, M. *J.Chromatogr.A* **2001**, *918*, 159.

105. Miller, K. G.; Poole, C. F.; Pawlowski, T. M. P. *Chromatographia* **1996**, *42*, 639.
106. Shang, C.; Hu, Y.; Deng, C.; Hu, K. *J.Chromatogr.A* **2002**, *942*, 283.
107. Schäfer, B.; Henning, P.; Engewald, W. *J.High Resolut.Chromatogr.* **1995**, *18*, 587.
108. Ligor, M.; Szumsky, M.; Buszewski, B. *International Laboratory* **2000**, *30*, 22.
109. Bicchi, C.; Drigo, S.; Rubiolo, P. *J.Chromatogr.A* **2000**, *892*, 469.
110. Wirthensohn, M. G.; Sedgley, M.; Jones, G. P. *J.Essent.Oil Res.* **2000**, *12*, 401.
111. Backman, A.-C.; Bengtsson, M.; Borg-Karlsson, A.-K.; Liblikas, I.; Witzgall, P. *J.Biosci.* **2001**, *56*, 262.
112. Pettersson, E. M. *J.Chem.Ecol.* **2001**, *27*, 2219.
113. Vereen, D. A.; McCall, J. P.; Butcher, D. J. *Microchem.J.* **2000**, *65*, 269.
114. Górecki, T.; Yu, X.; Pawliszyn, J. *Analyst* **1999**, *124*, 643.
115. Mani V. *Applications of Solid Phase Microextraction*; RSC: Cambridge, 1999; Chapter 5, pp. 57.
116. Górecki T. *Applications of Solid Phase Microextraction*; RSC: Cornwall, 1999; Chapter 7, pp. 93.
117. Matich, A. J. *Applications of Solid Phase Microextraction*, RSC: Cambridge, 1999; 349.
118. Koziel, J.; Jia, M.; Pawliszyn, J. *Anal.Chem.* **2000**, *72*, 5178.
119. Sukola, K.; Koziel, J.; Augusto, F.; Pawliszyn, J. *Anal.Chem.* **2001**, *73*, 13.
120. Augusto, F.; Koziel, J.; Pawliszyn, J. *Anal.Chem.* **2001**, *73*, 481.
121. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Ngassoum, M. B.; Geissler, M. *Eur.Food Res.Technol.* **2002**, *214*, 212.
122. Ngassoum, M. B.; Jirovetz, L.; Buchbauer, G. *Eur.Food Res.Technol.* **2001**, *213*, 18.
123. Yang, S. S.; Huang, C. B.; Smetena, I. *J.Chromatogr.A* **2002**, *942*, 33.
124. Coleman, W. M.; Lawrence, B. M.; Cole S.K. *J.Chromatogr.Sci.* **2002**, *40*, 133.
125. Marsili, R. T. *J.Agric.Food Chem.* **1999**, *47*, 648.
126. Urruty, L.; Giraudel, J.-L.; Lek, S.; Roudeillac, P.; Montury, M. *J.Agric.Food Chem.* **2002**, *50*, 3129.
127. Cai, J.; Liu, B.; Su, Q. *J.Chromatogr.A* **2001**, *930*, 1.
128. González-Toledo, E.; Prat, M. D.; Alpendurada, M. F. *J.Chromatogr.A* **2001**, *923*, 45.
129. Peñalver, A.; Pocurull, E.; Borrul, F.; Marcé, R. M. *J.Chromatogr.A* **2001**, *922*, 377.
130. Cancho, B.; Ventura, F.; Galceran, T. M. *J.Chromatogr.A* **2002**, *943*, 1.
131. Rochat, D.; Ramirez-Lucas, P.; Malosse, C.; Aldana, R.; Kakul, T.; Morin, J. P. *J.Chromatogr.A* **2000**, *885*, 433.
132. Street, R. A.; Hewitt, C. N.; Mennicken, S. *J.of Geophys.Res.* **1997**, *102*, 15,875.
133. Faldt, J.; Jonsell, M.; Nordlander, G.; Borg-Karlson, A.-K. *J.Chem.Ecol.* **1999**, *25*, 567.

134. Stashenko, E. E.; Puertas, M. A.; Martínez, J. R. *Anal.Bioanal.Chem.* **2002**, *373*, 70.
135. Perez, R. A.; Sanchez-Brunete, C.; Esteban-Duran, J. R.; Tadeo, J. L. *Int.J.EnvIRON.Anal.Chem.* **2001**, *79*, 229.
136. Agelopoulos, N. G.; Pickett, J. A. *J.Chem.Ecol.* **1998**, *24*, 1161.
137. Kite, G. C.; Leon, C. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1093.
138. Stránský; Valterová, I. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1387.
139. Tuduri L.; Desauziers, V.; Fanlo, J. L. *J.Chromatogr.Sci.* **2002**, *39*, 521.
140. MacTavish, H. S.; Davies, N. W.; Menary, R. C. *Ann.Bot.* **2000**, *82*, 347.
141. Zini, C. A.; Augusto, F.; Christensen, E.; Smith, B. P.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J. *Anal.Chem.* **2001**, *73*, 4729.
142. Takabayashi, J.; Takahashi, S.; Dicke, M.; Posthumus, M. A. *J.Chem.Ecol.* **1995**, *21*, 273.
143. Geervliet, J. B. F.; Posthumus, M. A.; Vet, L. E. M.; Dicke, M. *J.Chem.Ecol.* **1997**, *23*, 2935.
144. Sager J. C.; Mc Farlane, J. C. *Plant Growth Chamber Handbook*; Iowa, 1997; Chapter 1, pp. 1-29.
145. Dudareva, N.; Pichersky, E. *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 627.
146. Albone E. S.; Natynczuk, S. E. *Fragrance: the Psychology and Biology of Perfume*; Elsevier Science Publishers Ltd: Essex, 1992; pp. 63.
147. Law, J. H.; Regnier, F. E. *Ann.Rev.Biochem.* **1971**, *40*, 533.
148. Echeverry, F.; Quijano, J.; Montoya, R.; Uribe, C.; Salamanca, R. *Rev.Latinoamer.Quim.* **1986**, *16*, 156.
149. Schedl, V. W. *J.Pest Science* **1999**, *72*, 37.
150. Babu, R. C.; Kapoor, M. L. *J.Agron.Crop Sci.* **1997**, *179*, 123.
151. Sarker, S. D.; Bartholomew, B.; Nash, R.; Simmonds, M. S. J. *Biochem.Syst.Ecol.* **2001**, *29*, 759.
152. Barata, E. N.; Pickett, J. A.; Wadhams L.J.; Woodcock, C. M.; Mustaparta, H. *J.Chem.Ecol.* **2000**, *26*, 1877.
153. Williams, C. R.; Brodie, E. D. Jr.; Tyler, M. J.; Walker, S. J. *J.Herpetol.* **2000**, *34*, 431.
154. Smith, B. P.; Zini, C. A.; Pawliszyn, J.; Tyler, M. J.; Hayasaka, Y.; Williams, B.; Caramão, E. B. *Chem.Ecol.* **2000**, *17*, 215.
155. Jones, G. P.; Oldham, N. J. *J.Chromatogr.A* **1999**, *843*, 199.
156. Millar J. G.; Sims, J. J. *Methods in Chemical Ecology: Chemical Methods*; Kluwer Academic Publishers: Norwell, 2001; pp. 1-37.
157. Turillazzi, S.; Sledge, M.; Moneti, G. *Ethol.Ecol.Evol.* **1998**, *10*, 293.
158. Golub M. A.; Weatherston, I. *Techniques in Pheromone Research*; Springer-Verlag: New York, 1984; pp. 223.

159. Cossé, A. A.; Todd, J. L.; Millar, J. G.; Martinez, L. A.; Baker, T. C. *J.Chem.Ecol.* **1995**, *21*, 1823.
160. Finnegan, D. E.; Chambers, J. *J.Chem.Ecol.* **1993**, *19*, 971.
161. Clausen, T. P.; Wolkoff, P. *Atmos.Environ.* **1997**, *31*, 715.
162. Helmig, D.; Vierling, L. *Anal.Chem.* **1995**, *67*, 4380.
163. Malosse, C.; Ramirez-Lucas, P.; Rochat, D.; Morin, J. P. *J.High Resolut.Chromatogr.* **1995**, *18*, 669.
164. Moneti, G.; Dani, F. R.; Pieraccini, G.; Turillazzi, S. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 857.
165. Monnin, T.; Malosse, C.; Peeters, C. *J.Chem.Ecol.* **1998**, *24*, 473.
166. Frérot, B.; Malosse, C.; Cain, A.-H. *J.High Resolut.Chromatogr.* **1997**, *20*, 340.
167. Mozuraitis, R.; Borg-Karlson, A.-K.; Eiras, A.; Witzgall, P.; Kovaleski, A.; Vilela, E. F.; Unelius, C. L. "International Society of Chemical Ecology 13th Annual Meeting"; 1996.
168. Nunes, T. V.; Pio, C. A. *Chemosphere* **2001**, *3*, 239.
169. Penfold A. R. *The Essential Oils*; New York, 1950; pp. 437.
170. Mathias, A. L.; Hoffmann, A.; Marcondes, A. A. "Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components"; 1997.
171. *The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologists*; Twelfth ed.; Merck & Co., Inc.: New Jersey, 1996; p. Misc. Table 42-Misc. Table 42.
172. Ammon, D. G.; Barton, A. F. M.; Clarke, D. A.; Tjandra, J. *Analyst* **1985**, *110*, 917.
173. Rohloff, J. *J.Agric.Food Chem.* **2002**, *50*, 1543.
174. Müller L. *Applications of Solid Phase Microextraction*; RSC: Cambridge, 1999; Chapter 20, pp. 269-283.
175. Adams, R. P. *Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*, Academic Press: New York, 1989; 1-302.
176. Castello, G. *J.Chromatogr.A* **1999**, *842*, 51.
177. Elias, V. O.; Simoneit, B. R. T.; Cardoso, J. N. *J.High Resolut.Chromatogr.* **1997**, *20*, 305.
178. Milos, M.; Radonic, A. *Food Chem.* **2000**, *68*, 333.
179. Pedro, L. G.; Santos, P. A. G.; Silva, J. A.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Deans, S. G.; Looman, A.; Scheffer, J. J. C. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 245.
180. Oyedeji, A. O.; Olawore, O. N.; Ekundayo, O.; Koenig, W. A. *Flavour Fragr.J.* **1999**, *14*, 241.
181. Davies, N. W. *J.Chromatogr.* **1990**, *503*, 1.
182. Della Porta, G.; Porcedda, S.; Marongiu, B.; Reverchon, E. *Flavour Fragr.J.* **1999**, *14*, 214.

183. Sohounhloue, D. K.; Dangou, J.; Gnomhossou, B.; Garneau, F.-X.; Gagnon, H.; Jean, F.-I. *J.Essent.Oil Res.* **1996**, *8*, 111.
184. Mondello, L.; Verzera, A.; Bonaccorsi, I.; Chowdhury, J. U.; Yusef, M.; Begum, J. *J.Essent.Oil Res.* **1998**, *10*, 185.
185. Chaudhry, F. M.; Akbar S.; Amram, A.; Waheed, A.; Rashid, M. *Sci.Int.Lahore* **1994**, *6*, 373.
186. Dellacassa, E.; Menéndez, P.; Moyna, P.; Soler, E. *Flavour Fragr.J.* **1990**, *5*, 91.
187. Dagne, E.; Bisrat, D.; Alemayehu, M.; Worku, T. *J.Essent.Oil Res.* **2000**, *12*, 467.
188. Zrira, S. S.; Benjilali, B. B.; Fechtal, M. M.; Richard, H. H. *J.Essent.Oil Res.* **1992**, *4*, 259.
189. Mizrahi, I.; Traverso, J. R.; Juárez, M. A.; Bandoni, A. L.; Muschietti, L.; Baren, C. V. *J.Essent.Oil Res.* **1997**, *9*, 715.
190. Ming, L. C.; Takemura, O. S.; Marquesini, N. R.; Moreira, E. A. *Rev.Bras.Farm.* **1995**, *76*, 45.
191. Krips, O. E.; Willems, P. E. L.; Gols, R.; Posthumus, M. A.; Gort, G.; Dicke, M. *J.Chem.Ecol.* **2001**, *27*, 1355.
192. Foudil-Cherif, Y.; Meklati, B. Y.; Verzera, A.; Mondello, L.; Dugo, G. *J.Essent.Oil Res.* **2000**, *12*, 186.
193. Neves, M. T. C.; Vale, J. C. d.; Neves, A. C. *Garcia de Orta* **1966**, *14*, 431.
194. Singh, A. K.; Bhattacharya, A. K.; Singh, K.; Diwedi, B. N. *Indian Forester* **1986**, *112*, 223.
195. Kambu, K.; Phanzu, N. D.; Coune, C.; Wauters, J.-N.; Angenot, L. *Plant.Med.Phytotot.* **1982**, *XVI*, 34.
196. Koedam A. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*; Huethig Verlag: Heidelberg, 1987; Chapter 2, pp. 13-27.
197. Teisseire P. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*; Huethig Verlag: Heidelberg, 1987; Chapter 7, pp. 215-258.
198. Ruberto, G.; Biondi, D.; Renda, A. *Phytochem.Anal.* **1999**, *10*, 241.
199. Kerrola, K. *Food Rev.Int.* **1995**, *11*, 547.
200. Modey, W. K.; Mulholland, D. A.; Raynor, M. W. *Phytochem.Anal.* **1996**, *7*, 1.
201. Loughrin, J. H.; Potter, D. A.; Hamilton-Kemp, T. R.; Byers, M. E. *J.Chem.Ecol.* **1996**, *22*, 1295.
202. Dicke, M.; Van Beek, T. A.; Posthumus, M. A.; Ben Dom, N.; Van Bokhoven, H.; De Groot, AE. *J.Chem.Ecol.* **1990**, *16*, 381.
203. Azuma, H.; Thien, L. B.; Toyota, M.; Asakawa, Y.; Kawano, S. *J.Chem.Ecol.* **1997**, *23*, 2467.

204. Rodriguez-Saona, C.; Crafts-Brandner, S. J.; Steven, J.; Paré, P. W.; Henneberry, T. *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27*, 679.
205. Menut, C.; Molangui, T.; Lamaty, G. E. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1267.
206. Lassak, E. V.; Southwell, I. A. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2257.
207. Brophy, J. J.; Lassak, E. V. *Flavour Fragr. J.* **1991**, *6*, 265.
208. Ahmadouch, A.; Bellakdar, J.; Berrada, M.; Denier, C.; Pinel, R. *Fitoterapia* **1985**, *56*, 209.
209. Silvestre, A. D. J.; Cavaleiro, J. A. S.; Delmond, B.; Filliatre, C.; Bourgeois, G. *Flavour Fragr. J.* **1994**, *9*, 51.
210. Franich, R. A. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 245.
211. Cañigueral, S.; Vila, R.; Iglesias, J.; Bellakdar, J.; Idrissi, A. *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *4*, 543.
212. Scora, R. W.; Clerx, W. A. *Phyton* **1988**, *48*, 133.
213. Medici, D. D.; Pieretti, S.; Salvatore, G.; Nicoletti, M.; Rasoanaivo, P. *Flavour Fragr. J.* **1992**, *7*, 275.
214. Asfaw, N.; Storesund, H. J.; Skattebol, L.; Aasen, A. J. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 489.
215. Beaulieu, J. C.; Grimm, C. C. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1345.
216. Maurer, B.; Hauser, A.; Froidevaux, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2111.
217. Waldner, E. E.; Schlatter, Ch.; Schmid, H. *Helv. Chim. Acta* **1969**, *52*, 15.
218. Baeckström, P.; Li, L. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6533.
219. Boland, W.; Gläber, A.; Gilbert, M.; Feng, Z. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 14725.
220. Hern, A.; Dorn, S. *Entom. Exper. Applic.* **1999**, *92*, 63.
221. Boevé, J.-L.; Lengwiler, U.; Dorn, S.; Turlings, T. C. J.; Tollsten, L. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 373.
222. Buttery, R. G.; Light, D. M.; Nam, Y.; Merrill, G. B.; Roitman, J. N. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2858.
223. Bengtsson, M.; Backman, A.-C.; Liblikas, I.; Ramirez, M. I.; Borg-Karlson, A.-K.; Ansebo, L.; Anderson, P.; Lofqvist, J.; Witzgall, P. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3736.
224. Yarden, G.; Shani, A.; Leal, W. S. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 283.
225. Jakobsen, H. B.; Friis, P.; Nielsen, J. K.; Olsen, C. E. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 695.
226. Lu, F.; Teal, P. E. A. *Arc. Insect Biochem. Physiol.* **2001**, *48*, 144.
227. Rostelien, T.; Borg-Karlson, A.-K.; Mustaparta, H. *J. Comp. Physiol. A* **2000**, *186*, 833.
228. von Lier F.P.; Hesp, T. G. M.; van der Linde, L. M.; van der Weerd, A. J. A. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2109.
229. Toyota, M.; Koyama, H.; Mizutani, M.; Asakawa, Y. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1347.
230. Zabarás, D.; Wyllie, S. G. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 411.

231. Yamasaki, T.; Sato, M.; Sakogucchi, H. *Appl.Entomol.Zool.* **1997**, *32*, 423.
232. McGraw, G. W.; Heminway, R. W.; Ingram, L. L. Jr.; Canady, C. S.; McGraw, W. B. *Environ.Sci.Technol.* **2002**, *33*, 4029.
233. Boulanger, R.; Crouzet, J. *J.Agric.Food Chem.* **2001**, *49*, 5911.
234. Loreto, F.; Nascetti, P.; Graverini, A.; Mannozi, M. *Func.Ecol.* **2000**, *14*, 589.
235. Halitschke, R.; Kessler, A.; Kahl, J.; Lorenz, a.; Baldwin, I. T. *Oecologia* **2000**, *124*, 408.
236. Lawrence, B. M. *Perfumer & Flavorist* **1996**, *21*, 55.
237. Dethier, M.; Nduwimana, A.; Cordier, Y.; Menut, C.; Lamaty, G. *J.Essent.Oil Res.* **1994**, *6*, 469.
238. Panda, R.; Panda, H. *Indian Forester* **1987**, *113*, 434.
239. Mwangi, J. W.; Guantai, A. N.; Muriuki, G. *E.Afr.Agric.For.J.* **1981**, *46*, 89.
240. Kapur, K. K.; Vashist, V. N.; Atal, C. K. *Perfumery and Essential Oil Record* **1967**, *58*, 148.
241. Lawrence, B. M. *Perfumer & Flavorist* **2001**, *26*, 68.
242. Chalchat, J.-C.; Moudachirou, M.; Gbénou, J. D.; Chabard, J. L.; Lartigue, C. *Rivista Ital.EPPOS* **1997**, 642.
243. Kaul P.N.; A.K.Bhattscharya; Rajeswara, B. R.; Mallavarapu; Ramesh, S. *Parfum.Kosmet.* **1997**, *76*, 38.
244. Miranda, M.; Zayas, J. P.; Rosado, A. *Rev.Cienc.Quim.* **1983**, *14*, 211.
245. He, C.; Murray, F.; Lyons, T. *Atmos.Environ.* **2000**, *34*, 645.
246. Evans, R. C.; Tingey, D. T.; Gumpertz, M. L.; Burns, W. F. *Bot.Gaz.* **1982**, *143*, 304.
247. Pio, C. A.; Nunes, T. V.; Castro, L. M.; Lopes, D. A. *Chemosphere* **2001**, *3*, 283.
248. Langenheim, J. H. *J.Chem.Ecol.* **1994**, *20*, 1223.
249. Turlings, T. C. J.; Tumlinson, J. H.; Lewis, W. J. *Science* **1990**, *250*, 1251.
250. Takabayashi, J.; Dicke, M.; Posthumus, M. A. *J.Chem.Ecol.* **1994**, *20*, 1329.
251. Paré, P. W.; Tumlinson, J. H. *Plant Physiol.* **1997**, *114*, 1161.
252. De Moraes, C. M.; Lewis, W. J.; Paré, P. W.; Alborn, H. T.; Tumlinson, J. H. *Nature* **1998**, *393*, 570.
253. Bolter, C. J.; Dicke, M.; van Loon, J. J. A.; Visser, J. H.; Posthumus, M. A. *J.Chem.Ecol.* **1997**, *23*, 1003.
254. Bergström, G. "Proceedings of the Phytochemical Society of Europe – 31. Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids."
255. Christensen, C. S.; Hummelshoj, P.; Jensen, N. O.; Larsen, B.; Lohse, C.; Pilegaard, K.; Skov, H. *Atmos.Environ.* **2000**, *34*, 3057.
256. Hansen, U.; Seufert, G. *Phys.Chem.Earth (B)* **1999**, *42*, 681.

257. Tschardtke, T.; Thiessen, S.; Dolch, R.; Boland, W. *Biochem.Syst.Ecol.* **2001**, *29*, 1025.
258. Langenheim, J. H.; Foster, C. E.; McGinley, R. B. *Biochem.Syst.Ecol.* **1980**, *8*, 385.
259. Hedin, P. A.; McKibben, G. H.; Dollar, D. A. *J.Agric.Food Chem.* **2000**, *48*, 3673.
260. North, R. D.; Howse, P. E.; Jackson, C. W. *J.Insect Behav.* **2000**, *13*, 1.
261. Jonsson, M.; Anderson, P. *Physiol.Entomol.* **1999**, *24*, 377.
262. Röse, U. S. R.; Manukian, A.; Heath, R. R.; Tumlinson, J. H. *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 487.
263. Vrkocova, P.; Valterová, I.; Vrkoc, J.; Koutek, B. *Biochem.Syst.Ecol.* **2000**, *28*, 933.
264. Agelopoulos, N. G.; Chamberlain, K.; Pickett, J. A. *J.Chem.Ecol.* **2000**, *26*, 497.
265. Porter, N. G.; Wilkins, A. L. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 415.
266. Litvak, M. E.; Monson, R. K. *Oecologia* **1998**, *114*, 531.
267. Porter, J. W.; Spurgeon, S. L.; (editors) *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds.*, John Wiley & Sons: N. York, 2001; 558.
268. Sharkey, T. D. *Endeavour* **1996**, *20*, 74.
269. Gershenzon, J.; Croteau, R. *Recent Adv.Phytochem.* **1990**, *24*, 99.
270. Welke B.; Ettliger, K.; Riederer, M. *Environ.Sci.Technol.* **1998**, 1099.
271. Grosjean, D. *Quim.Nova* **1995**, *18*, 184.
272. Rice, P. J.; Coast, J. R. *J.Econ.Entomol.* **1994**, *87*, 1172.
273. Kim, J. M.; Marshall, M. R.; Wei, C.; Ragozzino, L. *J.Agric.Food Chem.* **1995**, *43*, 2839.
274. Anonymous. *GTE - Sylvania Engineering Bulletin* **1976**, 0-278, 1-7.
275. Wüst, M.; Rexroth, A.; Beck, T.; Mosandl, A. *Chirality* **1998**, *10*, 229.
276. Seidel, C. F.; Stoll, M. *Helv.Chim.Acta* **1959**, *42*, 1830.
277. von Sydow, E.; Karlsson, G. *Lebensm.Wiss.Technol.* **1971**, *4*, 54.
278. Nishimura, K.; Sakai, T.; Ogawa, M.; Hirose, Y. *Bull.Chem.Soc.* **1964**, *37*, 1407.
279. Tittel, G.; Wagner, H.; Bos, R. *J.Med.Plant Res.* **1982**, *46*, 91.
280. Kreis, P.; Mosandl, A. *Flavour Fragr.J.* **1994**, *9*, 257.
281. Jensen, K.; Christensen, L. P.; Hansen, M.; Jorgensen, U.; Kaack, K. *J.Sci.Food Agric.* **2001**, *81*, 237.
282. Jorgensen, U.; Hansen, M.; Christensen, L. P.; Jensen, K.; Kaack, K. *J.Agric.Food Chem.* **2000**, *48*, 2376.
283. Vidari, G.; Bernardi, M. d.; Pavan, M.; Ragozzino, L. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *41*, 4065.
284. Karr, L. L.; Drewes, C. D.; Coast, J. R. *Pestic.Biochem.Physiol.* **1990**, *36*, 175.
285. Smith, R. H. *J.Econ.Entomol.* **1965**, *58*, 509.
286. Hink, W. F.; Fee, B. J. *J.Med.Entomol.* **1986**, *23*, 400.

287. Klocke, J. A.; Darlington, M. V.; Balandrin, M. F. *J.Chem.Ecol.* **1987**, *13*, 2131.
288. Roseghini, M.; Erspamer, V.; Endean, R. *Comp.Biochem.Physiol.* **1976**, *54C*, 31.
289. Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Guntert, M.; Jennings, W. *J.Agric.Food Chem.* **1988**, *36*, 553.
290. Lorbeer, E.; Mayr, M.; Hausmann, B.; Kratzl, K. *Monatshefte fur Chemie* **1984**, *115*, 1107.
291. Teranishi, R., Buttery, R. G., and Sugisawa, H. Bioactive Volatile Compounds from Plants. 1993. Washington DC, American Chemical Society. ACS Symposium Series 525.
292. Bostock, R. M.; Stermer, B; A. *Annu.Rev.Phytopathol.* **1989**, *17*, 343.
293. Blight M. M. *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*; Plenum Press: New York, 1990; pp. 281.
294. Smith, B. P. Comunicação pessoal.
295. Tyler, M. J. *Alytes* **1991**, *9*, 34.

ANEXOS

ANEXO A. FIGURAS

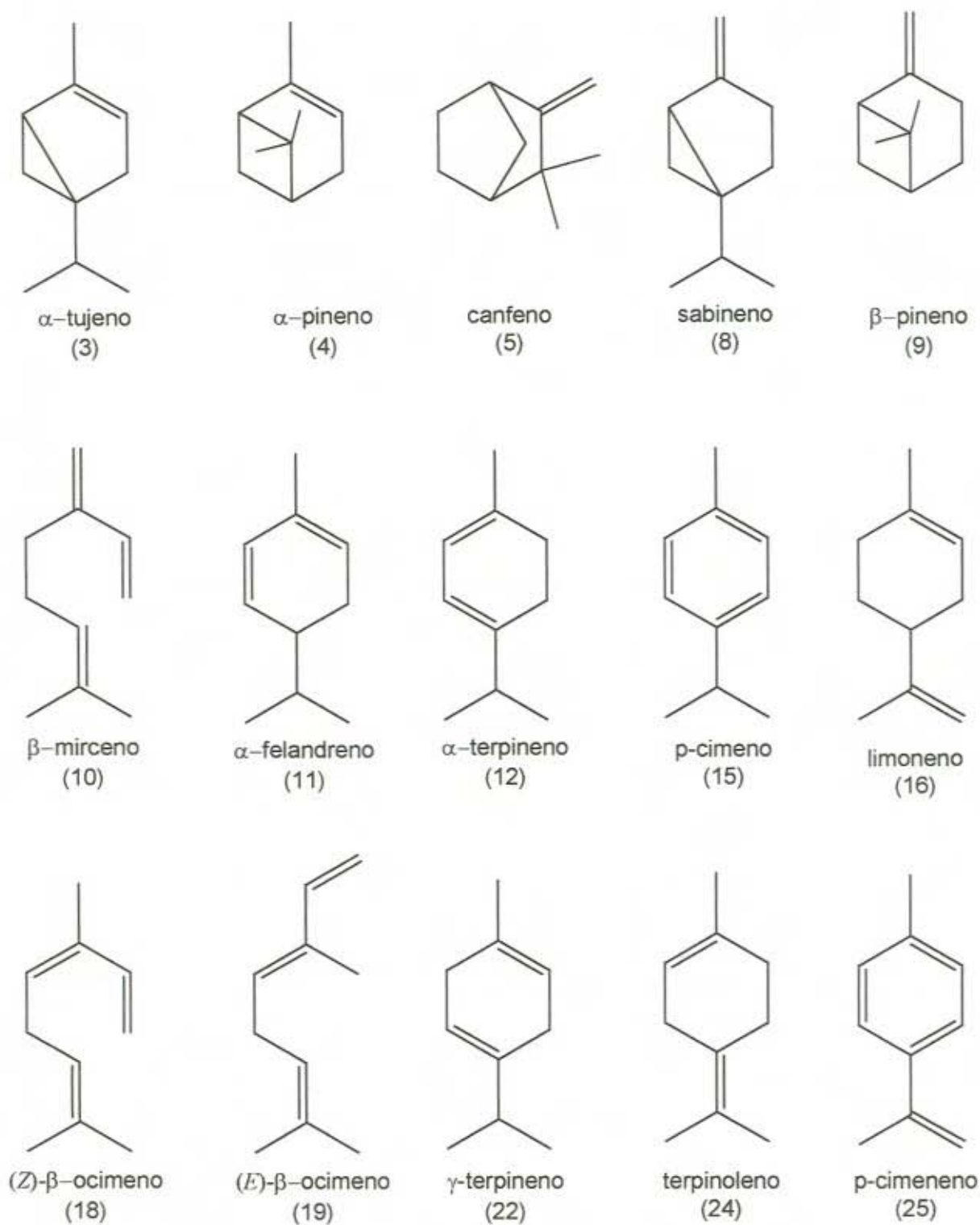


Figura A1. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos monoterpênicos presentes em óleos de eucalipto. Numeração de acordo com a Tabela VI.

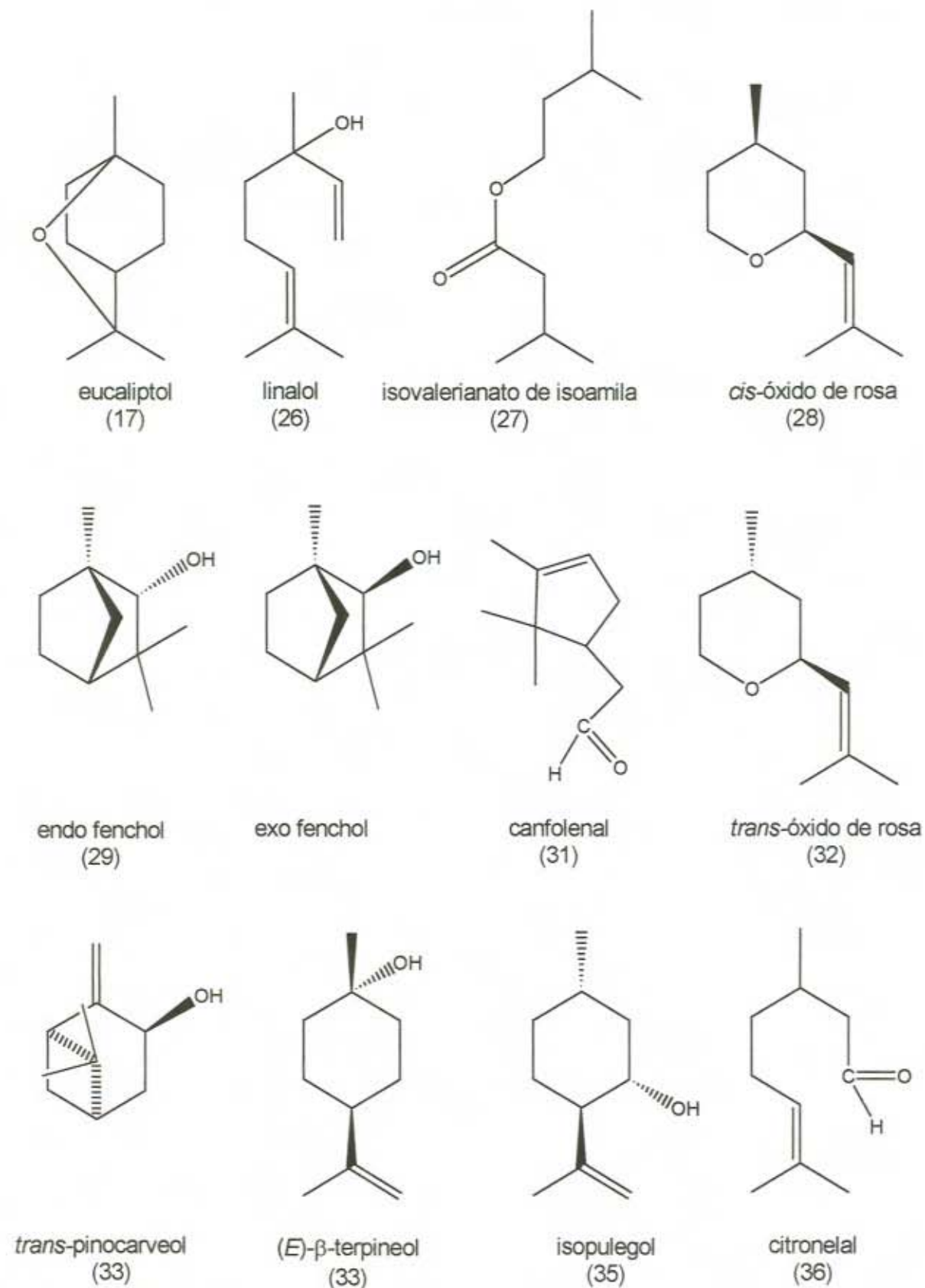


Figura A2. Fórmulas estruturais de alguns monoterpenos oxigenados presentes em óleos de eucalipto. Numeração de acordo com a Tabela VI.

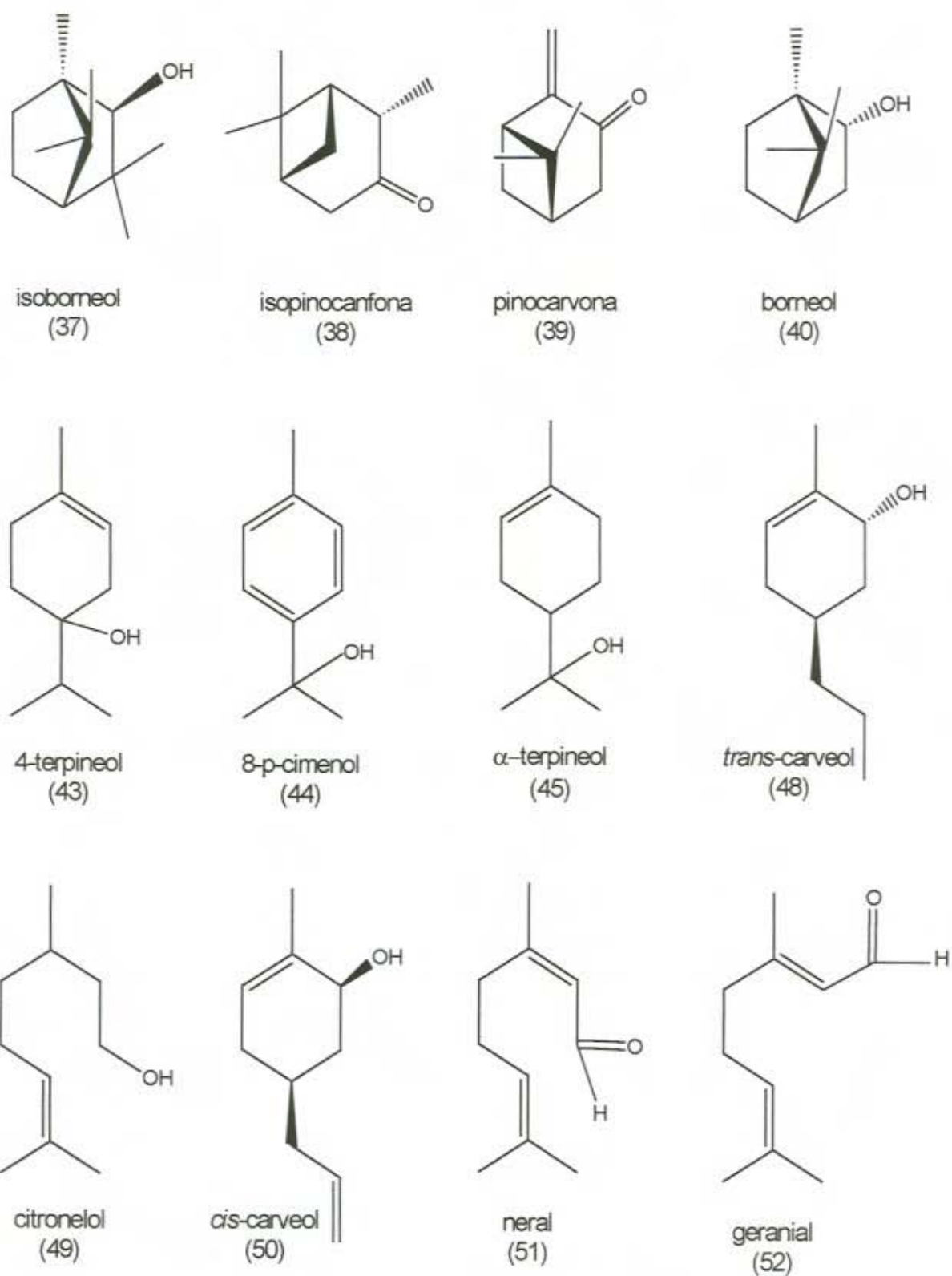


Figura A3. Fórmulas estruturais de alguns monoterpênos oxigenados presentes em óleos de eucalipto. Numeração de acordo com a Tabela VI.

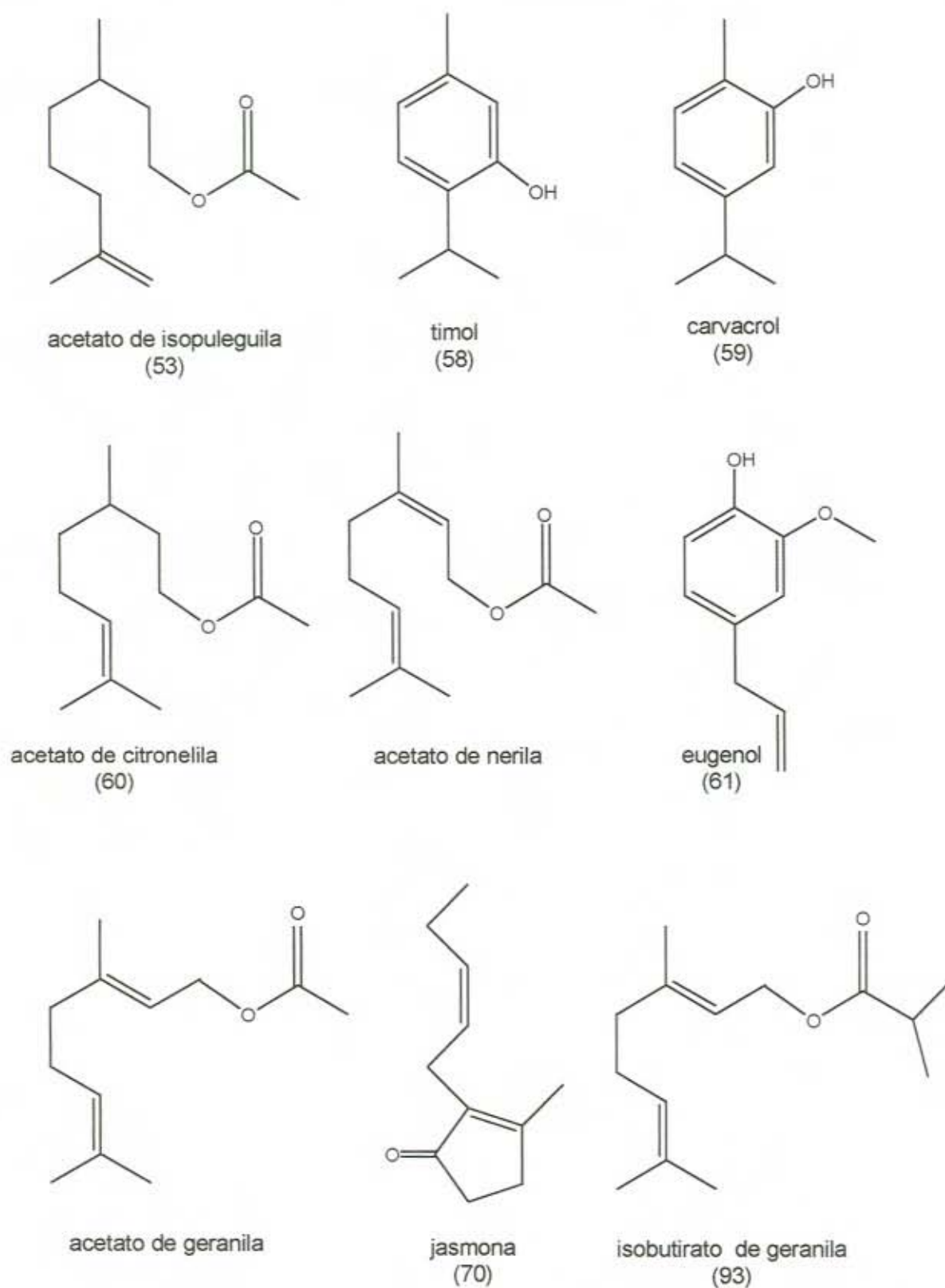
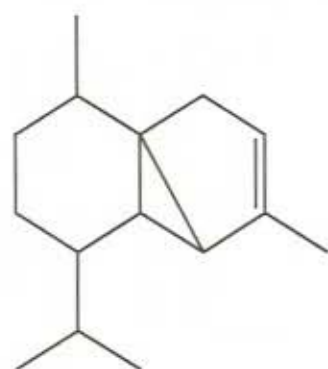
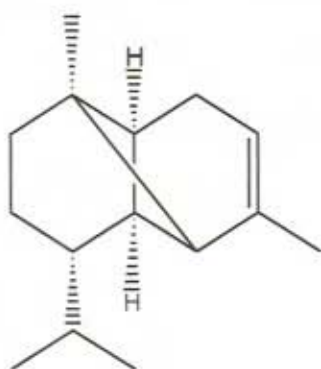


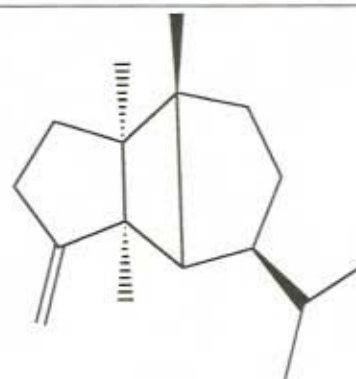
Figura A4. Fórmulas estruturais de alguns terpenos oxigenados presentes em óleos de eucalipto. Numeração de acordo com a Tabela VI.



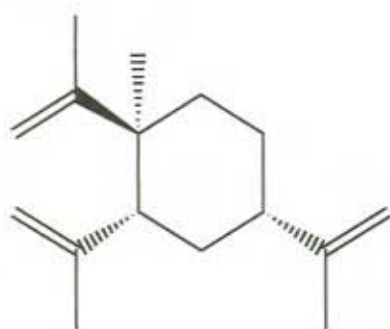
α -cubebene
(59)



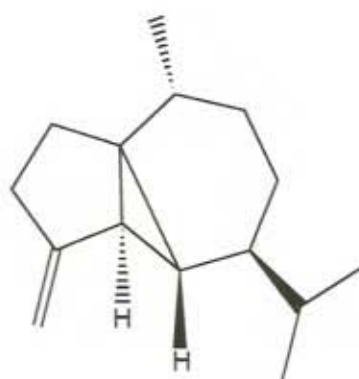
α -copaeno
(63)



β -burboneno
(64)



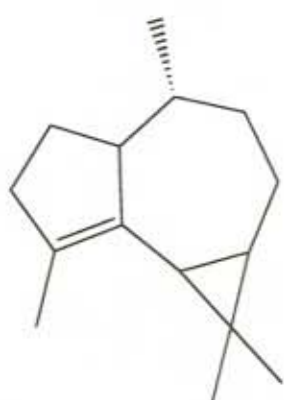
β -elemeno
(65)



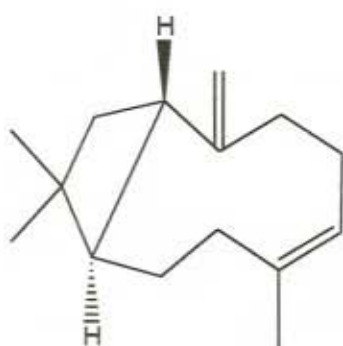
β -cubebene
(67)



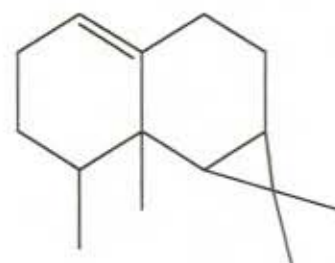
longifoleno
(71)



α -gurjuneno
(72)



β -cariofileno
(74)



β -gurjuneno
(77)

Figura A5. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos presentes em óleos de eucalipto. Numeração de acordo com a Tabela VI.

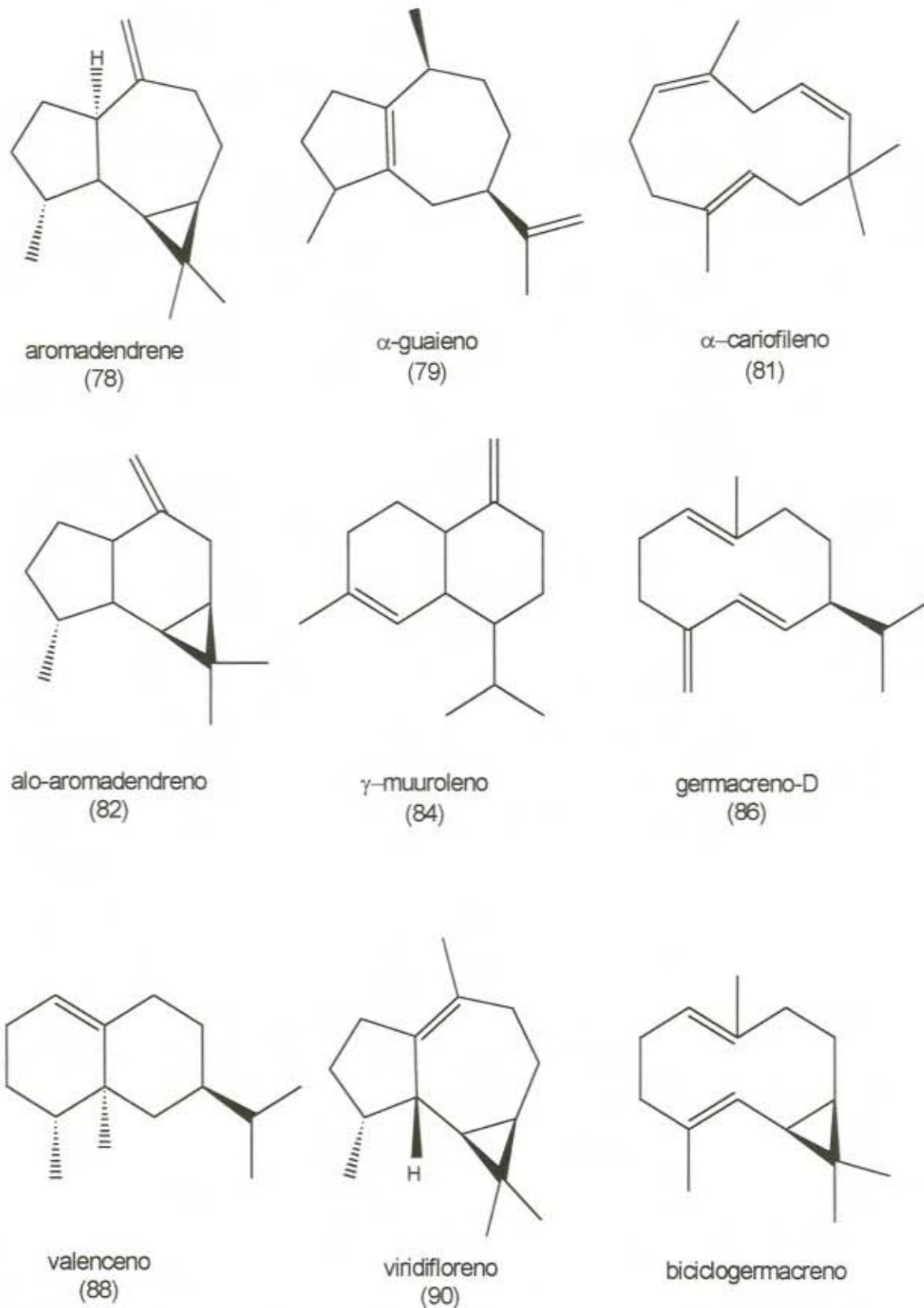


Figura A6. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos sesquiterpênicos presentes em óleos de eucalipto. Numeração de acordo com a Tabela VI.

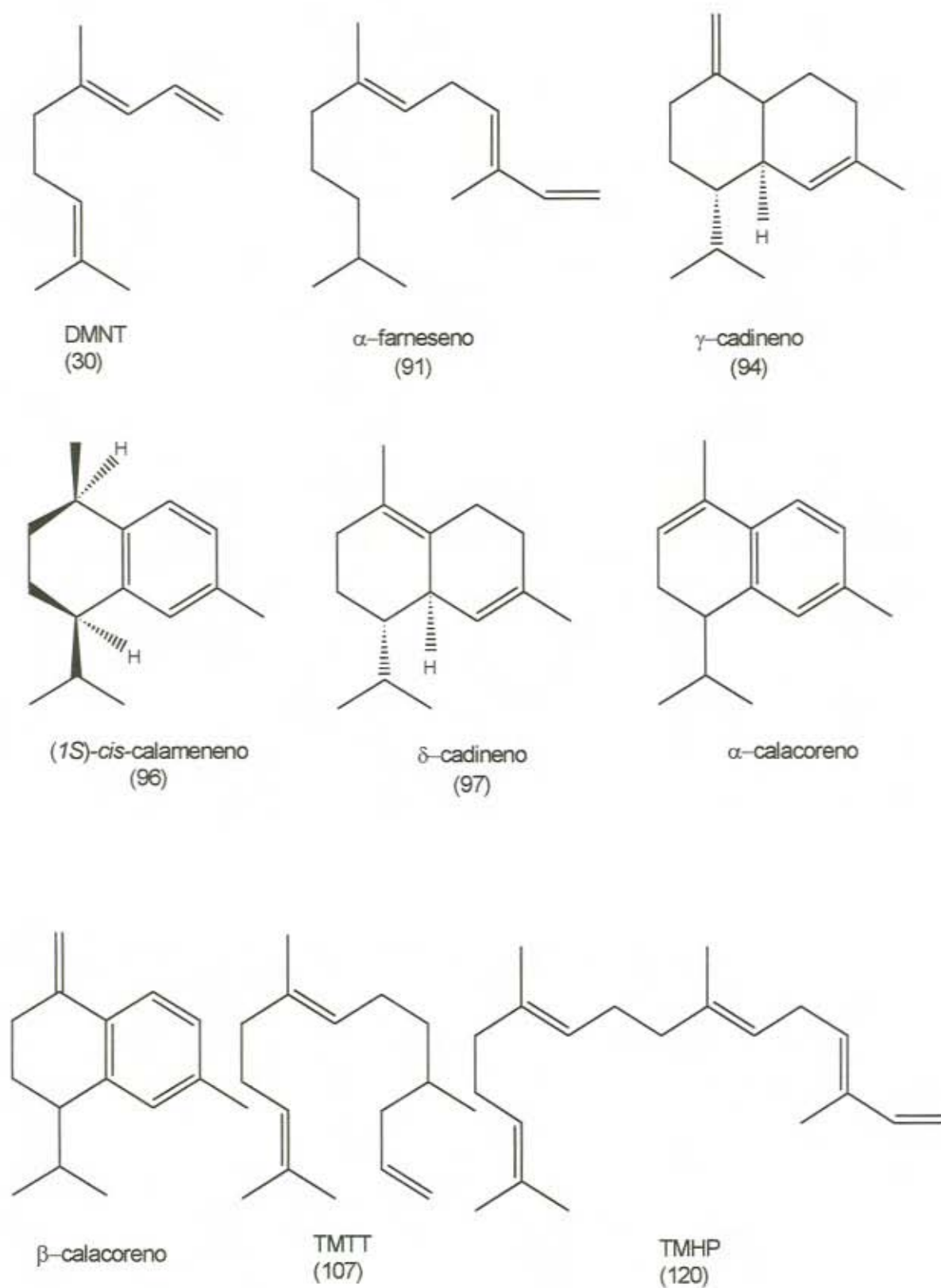


Figura A7. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos terpenóides presentes em óleos de eucalipto. Numeração de acordo com a Tabela VI.

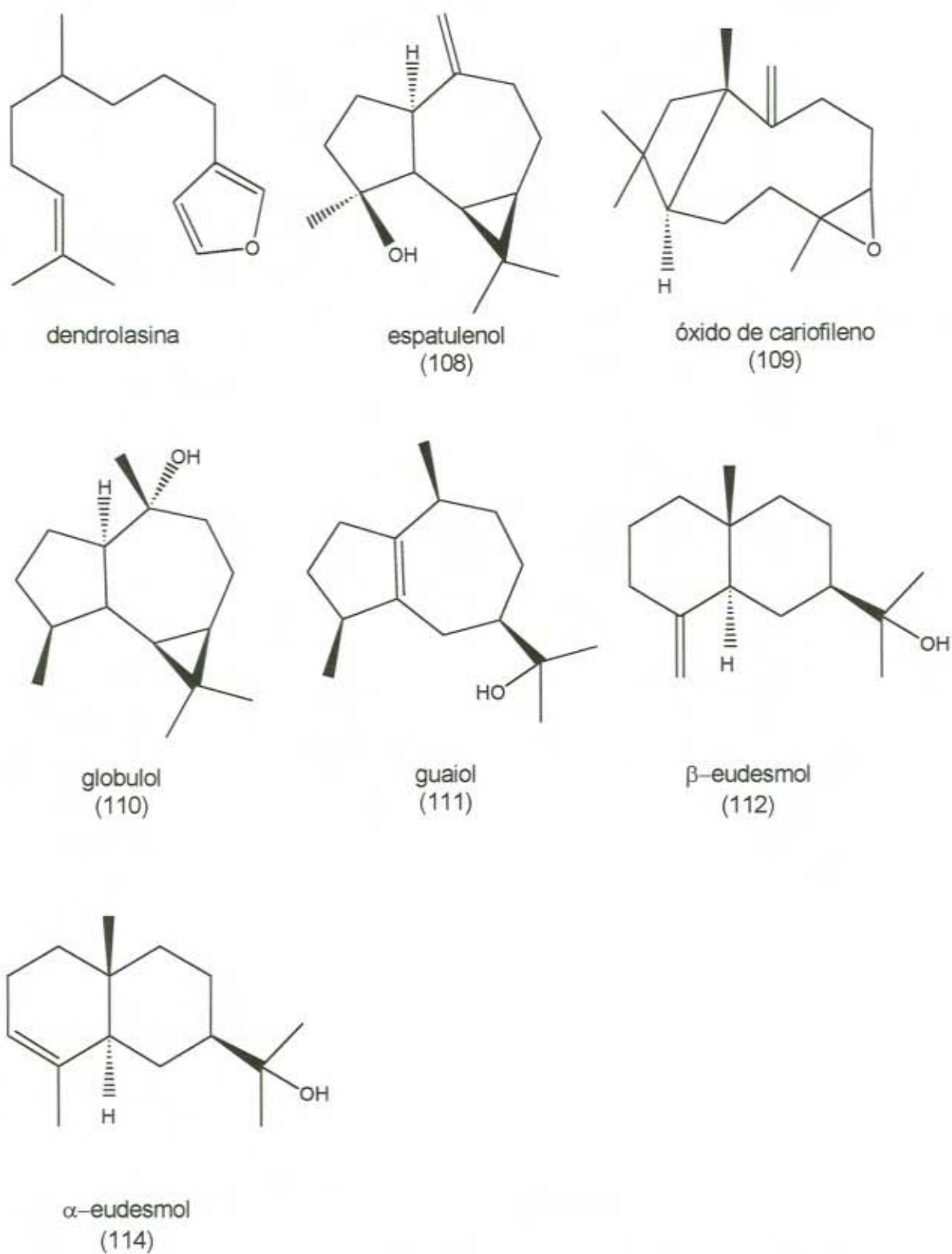


Figura A8. Fórmulas estruturais de alguns sesquiterpenos oxigenados presentes em óleos de eucalipto. Numeração de acordo com a Tabela VI.

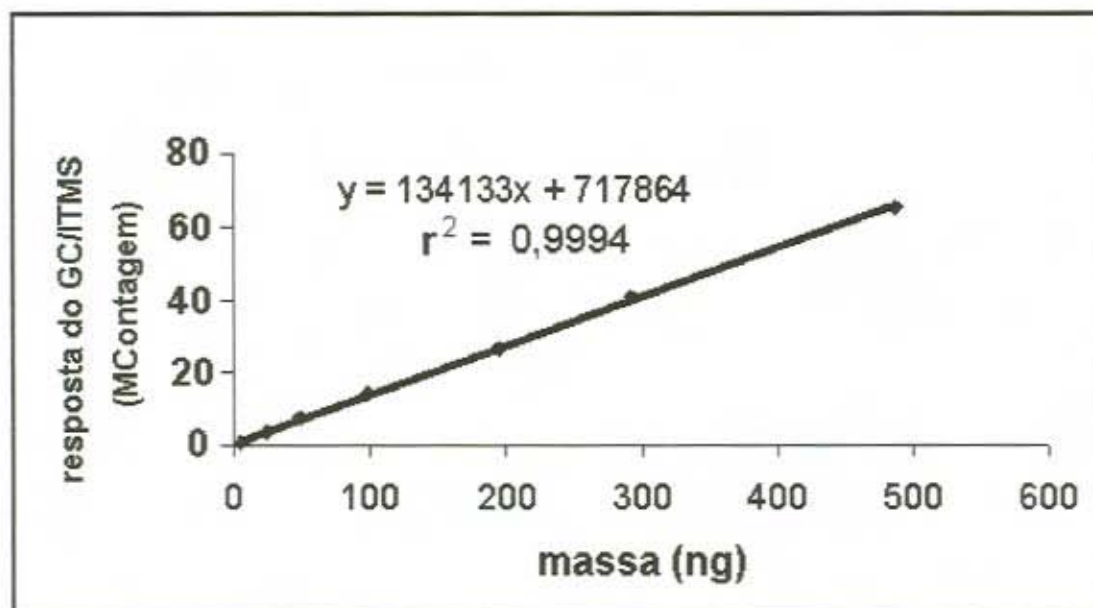


Figura A9. Resposta do detector ITMS ao 2-careno na faixa de 5 a 500 ng.

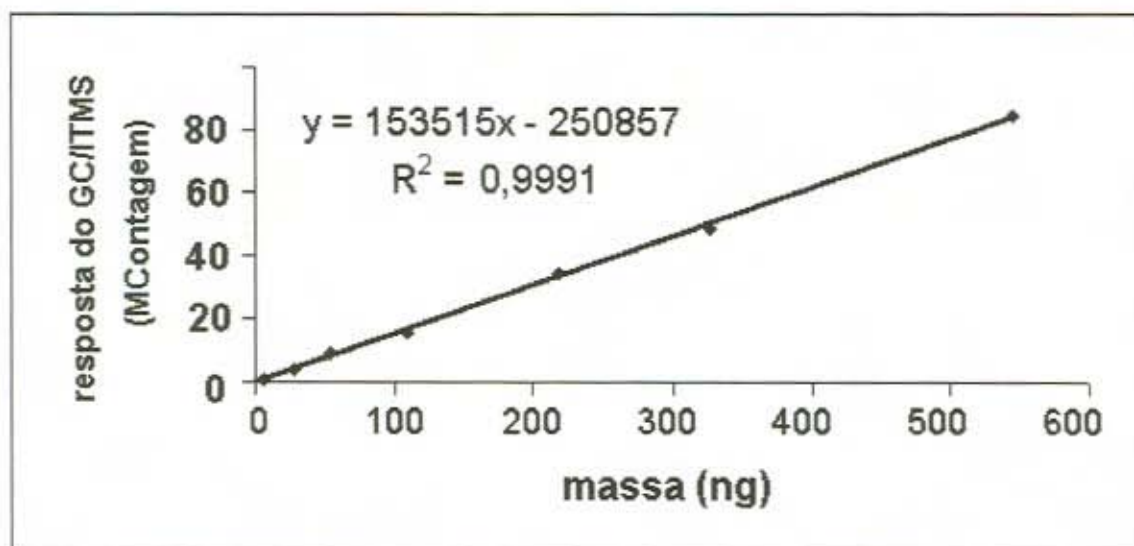


Figura A10. Resposta do detector ITMS ao eucaliptol na faixa de 5 a 500 ng.

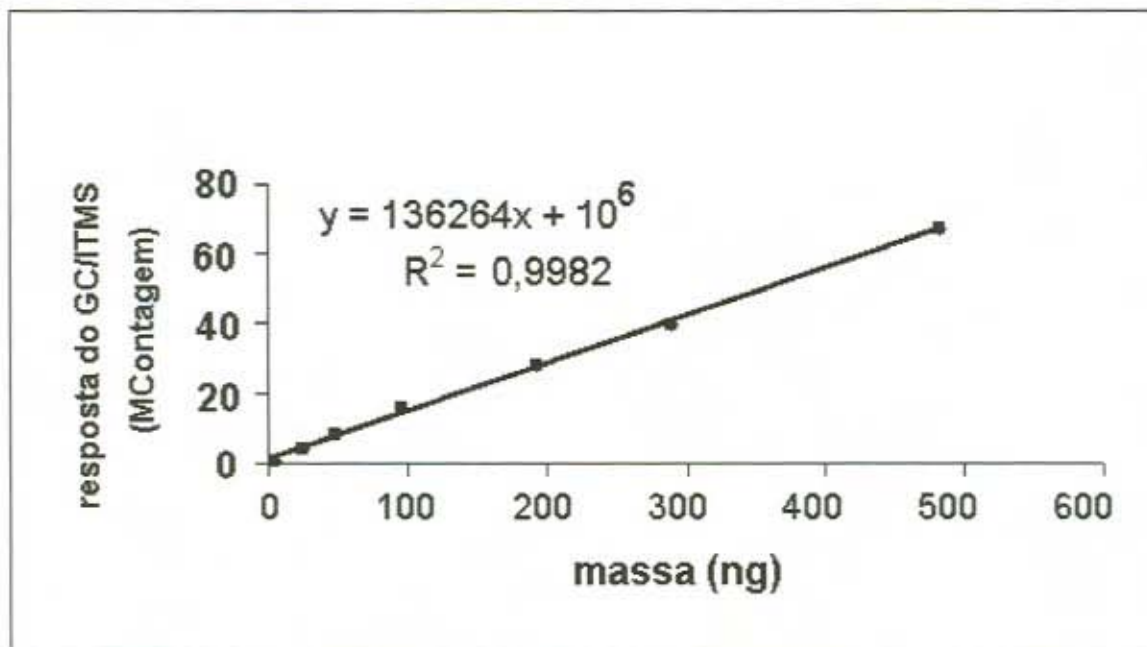


Figura A11. Resposta do detector ITMS ao dimetilestireno na faixa de 5 a 500 ng.

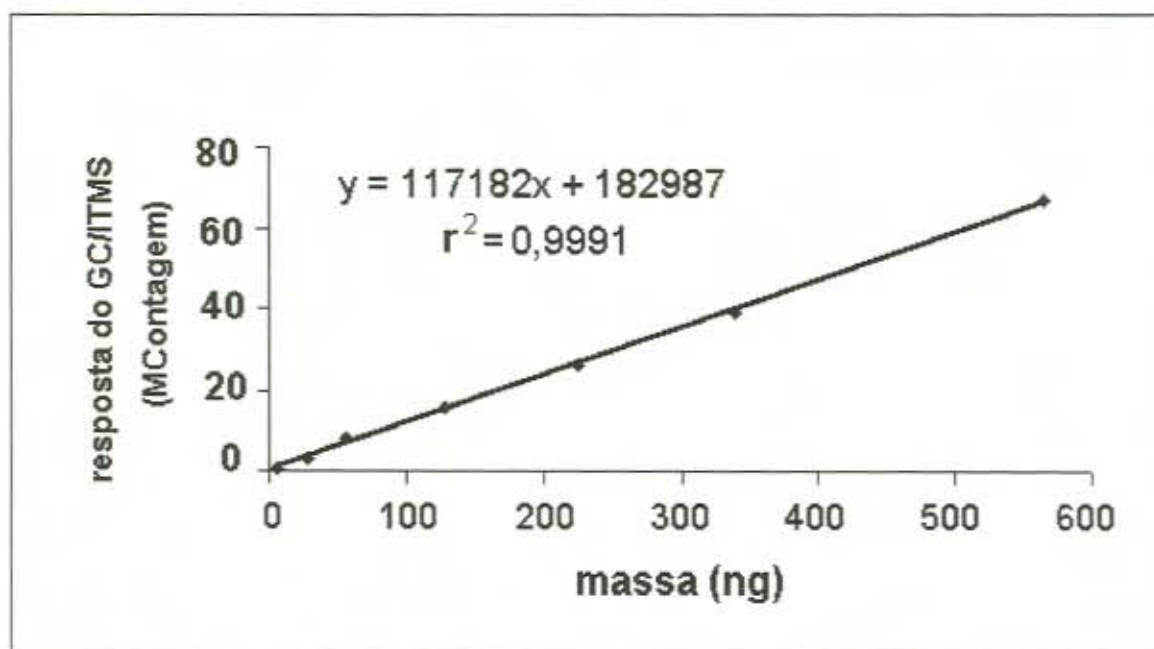


Figura A12. Resposta do detector ITMS ao mirtenal na faixa de 5 a 500 ng.

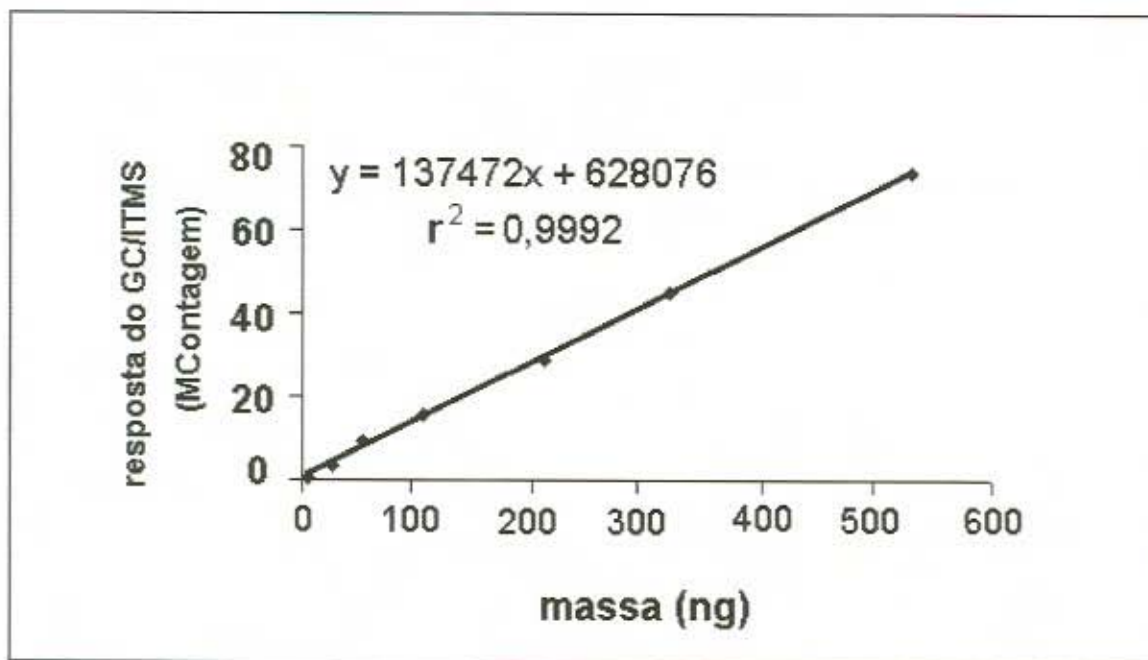


Figura A13. Resposta do detector ITMS ao acetato de linalila na faixa de 5 a 500 ng.

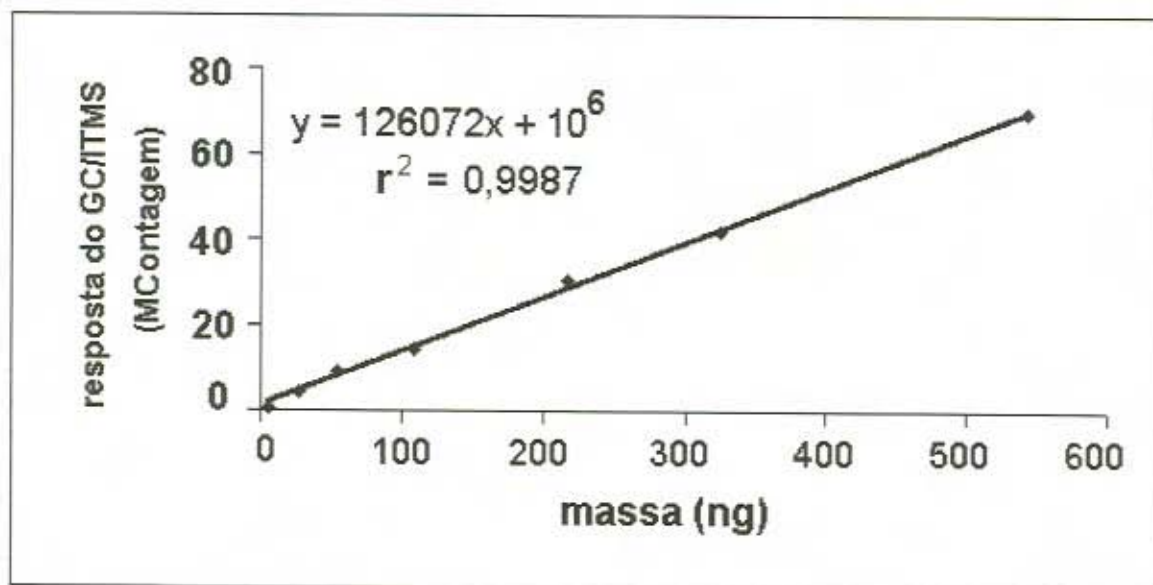


Figura A14. Resposta do detector ITMS ao β -cariofileno na faixa de 5 a 500 ng.

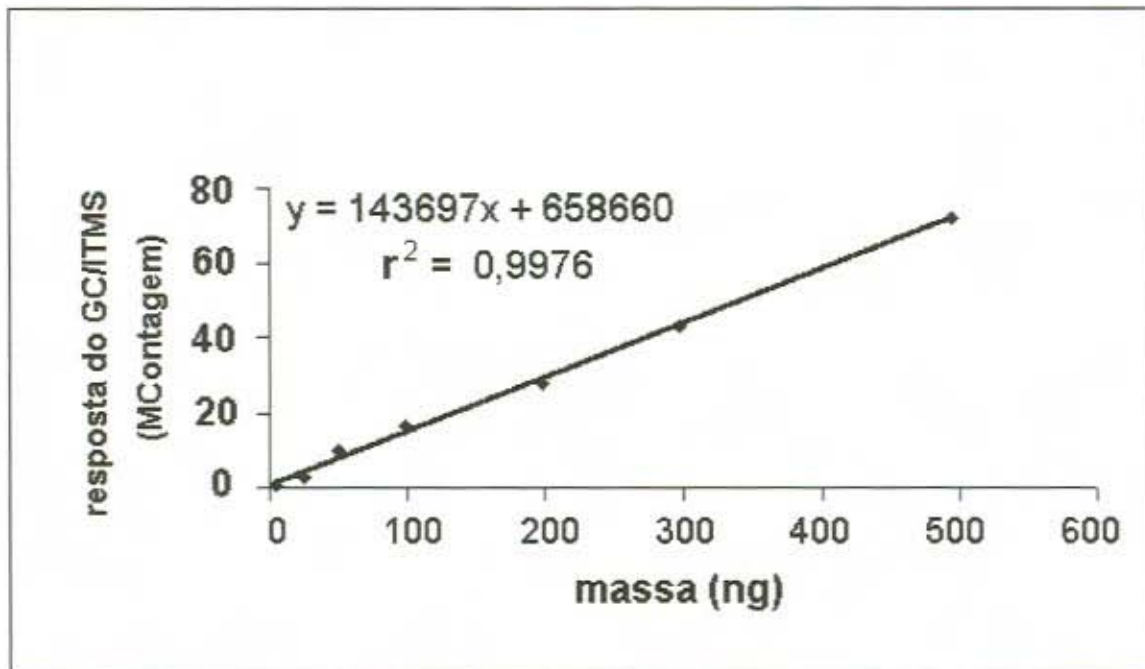


Figura A15. Resposta do detector ITMS ao óxido de cariofileno na faixa de 5 a 500 ng.

ANEXO B. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1- TRABALHOS PUBLICADOS

1.1. “The Presence of Limonene and Eucalyptol in the Skin Secretion of the Brown Tree Frog, *Litoria ewingi*.” Smith, B. P.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J.; Tyler, M. J.; Y. Hayasaka. *Chemistry and Ecology*, v. 17, p. 215-225, 2000.

1.2. “Monitoring Biogenic Volatile Compounds Emitted by *Eucalyptus citriodora* using SPME.” Zini, C. A.; Augusto, F.; Christensen E.; Smith B. P.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J. *Analytical Chemistry*, v. 73, p. 4729-4735, 2001.

1.3. “Automation of SPME/GC/MS Extraction of *Eucalyptus* Volatiles.” Zini, C. A.; Lord, H.; Assis, T. F.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J. *Journal of Chromatographic Science*, v. 40, p. 140-146, 2002.

Cópias destes trabalhos encontram-se ao final deste Anexo.

2- TRABALHOS SUBMETIDOS A PUBLICAÇÃO

“SPME Applied to the Study of Volatile Organic Compounds Emitted by Three Species of *Eucalyptus in situ*.” Zini, C. A.; Augusto, F.; Christensen, E.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J. Submetido ao *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

“Short preliminary paper” publicado nos anais do Encontro.

3. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

3.1. Riva del Garda 2002 - 25th International Symposium on Capillary Chromatography. Riva del Garda, Itália, 13 a 17 de maio de 2002. Apresentação em poster do trabalho: SPME Applied to the Study of Volatile Organic Compounds Emitted by Three Species of *Eucalyptus in situ*." Zini, C. A.; Augusto, F.; Christensen, E.; Caramão, E. B.; Pawliszyn.

3.2. 11º ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica, Campinas, São Paulo de 13 a 17 de maio de 2002. Apresentação em poster do trabalho: Quantificação Rápida por SPME com Fibras Recobertas por Sólidos Adsorventes: 2. Monitoração *in vivo* de Compostos Orgânicos Voláteis Biogênicos. Zini, C. A.; Christensen, E.; Smith, B. P.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J; Augusto, F.
Resumo publicado nos anais do Encontro.

3.3. 24th International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis, Las Vegas, Nevada, Estados Unidos, 20 a 24 de maio de 2001. Apresentação oral do trabalho: "Application of SPME to Essential Oils of *Eucalyptus*." Zini, C. A.; Augusto, F.; Christensen, E.; Assis, T. F.; Dariva, C.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J.
Resumo estendido publicado no site eletrônico [http://www.byu.edu/capillary2001/extended abstracts](http://www.byu.edu/capillary2001/extended%20abstracts).

3.4. Pittcon 2001 – Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy., Nova Orleans, Luisiana, Estados Unidos, 4 a 9 de março 2001. Apresentação oral do trabalho: "Fully Automated SPME-GC-MS Applied to the Study of Fragrance Compounds." Lord, H.; Zini, C.; Christensen, E.; Caramão E. B.; Pawliszyn, J.

3.5. Pittcon 2001 – Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Nova Orleans, Luisiana, Estados Unidos, 4 a 9 de março 2001.

Apresentação oral do trabalho: "SPME Coupled to Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography (GC x GC) Applied to the Qualitative Analysis of Three Species of *Eucalyptus* Essential Oils." Zini, C.; Ledford E.; Caramão E. B.; Pawliszyn, J.

3.6. Extech 2000 - Advances in Extraction Technologies, University of Waterloo, Waterloo, Ontário, Canadá, 1 a 3 de maio 2000.

Apresentação oral do trabalho: "Non-Destructive Sampling of Volatile Compounds in Live Frogs and *Eucalyptus* Leaves." Zini, C. A.; Smith, C. B. P.; Fabio, A.; Tyler, J. M.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J.

Livro de resumos p. 22.

3.7. CSC 2000 – 83rd Canadian Society for Chemistry – National Meeting and Exhibition, Calgary, Alberta, Canadá, 27 – 31 de maio 2000.

Apresentação oral do trabalho: "Application of SPME-GC-MS to the Characterization of Volatiles Emitted by Living Leaves of *Eucalyptus* Genre Trees." Zini, C. A.; Augusto, F. Pawliszyn, J.

Livro de resumos AN1-44.

3.8. Pittcon 2000 – Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy., Nova Orleans, Luisiana, Estados Unidos,. 12 a 17 de março 2000.

Apresentação oral do trabalho: "*Eucalyptus* Chromatographic Profiles Using Solid Phase Microextraction." Zini, C. A.; Pawliszyn, J.; Caramão, E. B.

Livro de resumos p. 648.

3.9.- Pittcon 2000 – Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Nova Orleans, Luisiana, Estados Unidos, 12 a 17 de março 2000.

O seguinte trabalho foi apresentado em poster: "

"Extraction of Essential Oil of *Eucalyptus* by Supercritical Carbon Dioxide." Zini, C. A.; Coelho, G.; Pawliszyn, J.; Caramão, E. B.

Livro de resumos 2215P.

3.10. Extech 1999 –Advances in Extraction Technologies, Waterloo, Ontário, Canadá, 26 a 28 de abril 1999.

O trabalho "Extraction of *Eucalyptus* Oil Using Solid Phase Microextraction." Zini, C. A.; Pawliszyn, J.; Haodan, Y.; Caramão, E. B.; Bortolin, L.

SOLID-PHASE MICROEXTRACTION AS A TOOL FOR STUDYING VOLATILE COMPOUNDS IN FROG SKIN

BENJAMIN P. SMITH^{a,e,*}, CLAUDIA ALCARAZ ZINI^{b,c},
JANUSZ PAWLISZYN^b, MICHAEL J. TYLER^a,
YOJI HAYASAKA^d, BRIAN WILLIAMS^e
and ELINA BASTOS CARAMAO^c

^a*Department of Environmental Biology, University of Adelaide,
South Australia, Australia;* ^b*Department of Chemistry,
University of Waterloo, Ontario, Canada;* ^c*Instituto de Química,
Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Brazil;*
^d*Australian Wine Research Institute, South Australia, Australia;*
^e*Department of Soil and Water, University of Adelaide,
South Australia, Australia*

(Received 23 June 2000; In final form 3 August 2000)

Solid-phase microextraction (SPME) is an effective technique for studying frog volatile secretions. Its primary advantage is in its application to sampling live animals. The ability to sample an organism over an extended period allows changes in an individual's chemical signature to be determined. The presence of eucalyptol in the skin secretion of Ewing's tree frog, *Litoria ewingi*, was used to assess the effectiveness of SPME in sampling frog volatiles. Rapid sample times coupled with the polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fibre provided the best signal/noise ratio for the majority of frog volatiles analysed, and importantly resulted in the least amount of stress to the animals involved.

Keywords: Solid-phase microextraction; Frog volatile secretions

*Address for correspondence: Department of Soil and Water, University of Adelaide, Adelaide, South Australia, Australia 5005. Tel.: +618 8303 7385, Fax: +618 8303 4364, e-mail: benjamin.smith@adelaide.edu.au

INTRODUCTION

Frogs produce a remarkable array of noxious, distasteful and highly toxic compounds, which on secretion from so-called granular skin glands can serve to protect the amphibian from predators (Daly, 1998). Many of these secretions are odorous and the question has been raised as to the role olfactory signals may play in a frog's defence strategy (Williams *et al.*, 2000). Despite the interest in the effect of volatile defence secretions on amphibian behaviour, few studies have sought to determine the components responsible for the odour. A primary reason for this lies in the difficulty of sampling volatile compounds and their subsequent chemical identification. The destructive nature of available sampling techniques is also a concern, particularly in light of the world's declining frog population (Tyler, 1991).

Solvent extraction and volatile trapping are the two established techniques for sampling semiochemicals (Jones and Oldham, 1999). Solvent extraction relies on the transfer of compounds to a liquid medium based on their degree of solubility. Samples may be extracted by dipping, soaking, homogenising in solvent, or by continuous extraction in a soxhlet extractor. This method is destructive and limited as it reveals the secretion present in the gland at the time of death and cannot be used to examine the changes in the chemical signature of individuals over extended periods (Turillazzi *et al.*, 1998). Furthermore, it has been shown that in insects the ratios of volatiles obtained by this technique frequently do not correspond to the ratio emitted by the live animal (Golub and Weatherston, 1984). In addition, large solvent peaks can obscure rapidly-eluted components and, if the sample is concentrated before chromatography, components more volatile than the solvent can be partially or completely lost. Disintegration of the tissue sample may also result in unwanted reactions occurring between compounds which ordinarily would not come into contact (Bostock and Stermer, 1989; Blight, 1990; Tollsten and Bergström, 1998). For example, Tollsten and Bergström (1998) showed that intact plants of a number of *Brassica* species released a different blend of volatile chemicals compared to macerated plant material.

Volatile trapping is more amenable to sample living organisms (Golub and Weatherston, 1984; Jones and Oldham, 1999). Routinely,

dynamic analysis is employed (Jones and Oldham, 1999), although static headspace analysis is used occasionally (Jakobsen, 1997). The technique involves drawing purified air over the sample and the volatiles caught in the air stream are collected by sorbent trapping on an adsorbent matrix or by cryogenic trapping. Semiochemicals can then be removed by solvent washing, soxhlet extraction (Finnegan and Chambers, 1993), or thermal desorption (Cossé *et al.*, 1995; Agelopoulos and Pickett, 1998). Such techniques, however, are labour intensive and time consuming and not usually suitable for frequent sampling (Malosse *et al.*, 1995). Solvent removal of the trapped analytes from the matrix would encounter similar problems experienced in liquid extractions, whilst the equipment used for thermal desorption is costly. Analysis of volatiles in live frogs introduces an additional problem in that the air flowing across the animal must be kept moist to minimise desiccation, a factor that is particularly important if long sampling times are employed. Additional traps to remove the moisture prior to the introduction of the sample to the instrumentation provide other sites for analyte loss, especially if the compounds of interest are low in concentration. Water molecules may also compete for sites on the adsorbent trap reducing the concentration of volatiles collected (Koziel *et al.*, 1999).

As part of our studies into the chemistry of the volatiles emitted from frogs we have investigated the use of solid phase microextraction (SPME) as an alternative to conventional sampling methods. SPME is a relatively new isolation method that has been applied to a wide range of volatile and semi-volatile organic compounds from various matrices such as air, water, and soil (Zhang and Pawliszyn, 1993). The technique has found applications in food, pesticide, and environmental fields (Pawliszyn and Smith, 1999), and has received recent attention for the sampling of insect pheromones (Malosse *et al.*, 1995; Mozuraitis, 1996; Moneti *et al.*, 1997; Monnin *et al.*, 1998). Such studies have focussed on 'contact' SPME, whereby the extracting fibre is rubbed over the exposed pheromone gland or cuticle (Malosse *et al.*, 1995; Frerot *et al.*, 1997). In the case of frogs, such a technique is ineffective due to the concurrent release of protein, lipid and mucous secretions from the frog's integumentary glands. To overcome this limitation, our study examined the use of headspace SPME and its application to the sampling of live frogs. In headspace, SPME

analytes partition between the sample, the headspace above the sample and a polymer coated fused silica fibre. They can then be thermally desorbed from the fibre to a capillary GC or HPLC column (Pawliszyn, 1997).

METHODS

The effectiveness of SPME was determined by analysing the release of eucalyptol from the skin glands of Ewing's tree frog, *Litoria ewingi* (Duméril and Bibron). Following preliminary trials employing crude hexane extractions of skin, it was observed that eucalyptol (identified using the NIST92 chemical library) was a regular (albeit trace) component of the extract. Attempts were made to absorb the secretion using three commercially available SPME fibres.

The technique was compared with the non-destructive method employed by Tyler *et al.* (1992) in which secretions are released from the frogs' skin glands during the application of an electrical stimulus to the skin surface. The secretions are then washed from the skin with water and collected for analysis. Three frogs, collected from Mannum, South Australia, Australia, were stimulated and their secretions pooled. The resultant water/secretion mixture was then extracted with an equal volume of hexane and concentrated for analysis. Analyses of the extracted secretion were performed on a Varian 3400C gas chromatograph. The gas chromatograph was fitted with a HP-5MS silicone column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) and coupled to a mass analyser (Finnigan Mat 70-TSQ mass spectrometer). The carrier gas was helium at 10 psi. Oven temperature was maintained at 40°C for 1 minute and was then programmed at 5°C minute⁻¹ to 110°C and 20°C minute⁻¹ to 250°C. The injector temperature was held constant at 250°C. Ionization for mass analysis was by electron impact at 70 eV and 220°C. Selective ion scanning mode was employed.

For SPME studies, eight individuals were collected from the same site at Mannum. The frogs were maintained in quarantine for one month before being transported to the Department of Chemistry, University of Waterloo, Ontario, Canada. The animals were housed in plastic aquaria (400 \times 210 \times 260 mm) lined with a substrate of wet newspaper. Lighting was supplied by overhead fluorescent lights and a

photoperiod of 16:8 light:dark employed. Laboratory temperature was maintained at 23°C. Frogs were fed on crickets obtained from the Department of Zoology, University of Guelph.

Three commercially available SPME fibres, 100 µm polydimethylsiloxane (PDMS), 65 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) and 75 µm polydimethylsiloxane/carboxen (CAR/PDMS), were investigated for headspace sampling of the volatile components of the secretion. Frogs were sampled by placing them in 15 ml clear glass vials, into which stainless steel wire baffles were inserted to limit the movement of the frog and prevent it from contacting the fibre (Fig. 1). Initially larger sample chambers were used; but, the volume was reduced to facilitate mass transfer of the analytes to the fibre coating, after determining that the frogs were not unduly stressed in the smaller vial, and had adequate oxygen for the entire sampling duration. Other techniques usually employed to increase mass transfer include vial

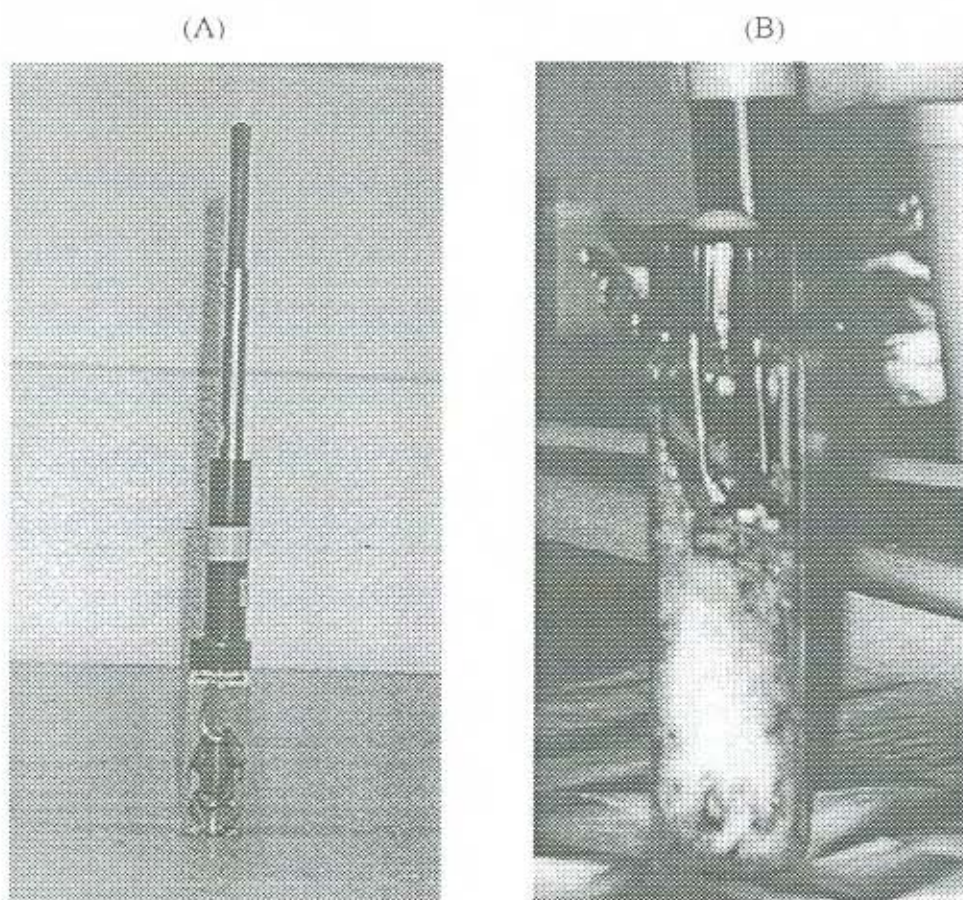


FIGURE 1 Headspace sampling of frog volatile compounds. (A) SPME fibre holder and vial with frog. (B) Close up of sample vial following frog stimulation. The foamy residue on the side of the vial is released secretion.

and/or fibre agitation or heating (Pawliszyn, 1997); both of these prove difficult when sampling volatiles from live animals.

Prior to sampling, frogs were voided of urine by applying gentle pressure to the bladder. Once the frog was enclosed in the vial, the vial was shaken vigorously for 10–20 seconds to stimulate release of its glandular secretion and the associated volatile compounds.

The headspace of the vial was then sampled at 23°C for 1 minute using the PDMS/DVB fibre and 10 minutes for both the PDMS and CAR/PDMS fibres. Sample times were based on times determined by Koziel *et al.* (1999) for fast sampling of air. Following sampling, the PDMS fibre was immediately introduced to the gas chromatograph's injector. Both the PDMS/DVB and CAR/PDMS fibre were stored on dry ice prior to analysis.

Analysis was performed on a Varian 3400C gas chromatograph coupled to an ion trap detector (Varian 4D Saturn GC/MS). The same column type and temperature programme used for the hexane extract was employed. A septum programmable temperature injector (SPI) was used and its temperature held constant at 250, 210 and 260°C for the PDMS, PDMS/DVB and CAR/PDMS fibres, respectively. A desorption time of 3 minutes was employed for both the PDMS and PDMS/DVB fibres and 5 minutes for the CAR/PDMS fibre. The mass spectrometer was operated in electron impact mode using a multiplier voltage range of 1600 to 1620 volts, axial modulation 4, filament current 25 μ A, ion trap temperature 150°C and transfer line temperature 250°C.

RESULTS

Hexane extracts of the water/secretion mix obtained by Tyler's method did not yield eucalyptol. Eucalyptol was, however, isolated *via* SPME. Co-eluting with eucalyptol was the monoterpene limonene (Fig. 2). The presence of both compounds was confirmed by comparing retention times with the retention times of standard compounds (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) under the same chromatographic conditions. Mass spectra from NIST92 and in-house libraries were also used.

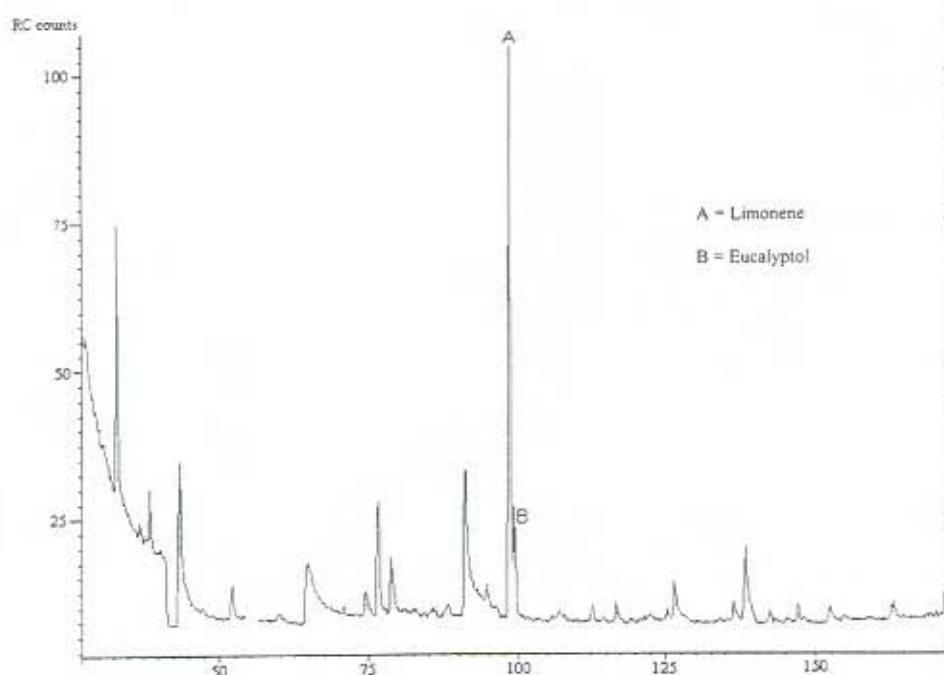


FIGURE 2 The presence of limonene and eucalyptol in the volatile profile of *L. ewingi*. Both compounds are believed to be derived from dietary sources (unpublished data), with limonene prominent in the food source of the frogs.

TABLE I Detection of limonene and eucalyptol in the volatile profile of *L. ewingi*

	<i>PDMS/DVB 65 μm</i>		<i>CAR/PDMS 75 μm</i>		<i>PDMS 100 μm</i>	
	<i>Limonene</i>	<i>Eucalyptol</i>	<i>Limonene</i>	<i>Eucalyptol</i>	<i>Limonene</i>	<i>Eucalyptol</i>
Control 1	***	***	***	***	nd	nd
Frog 1	***	***	***	***	36	7
Control 2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Frog 2	20	15	#	#	nd	nd
Control 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Frog 3	#	#	18	33	11	14
Control 4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Frog 4	280	68	60	26	84	19
Control 5	9	nd	6	nd	tr	nd
Frog 5	280	91	65	48	67	36
Control 6	12	nd	15	nd	10	nd
Frog 6	146	32	23	30	44	48
Control 7	tr	nd	nd	nd	***	***
Frog 7	41	14	34	26	***	***
Control 8	tr	nd	nd	nd	***	***
Frog 8	96	35	80	36	***	***

nd Not detected.

tr Trace ($S/N < 5$).

*** Fibre not tested.

Fibre damaged by frog.

Table I shows the detection of both compounds in 8 animals using the three fibres. It is clear, that under the described experimental conditions, the PDMS fibre did not perform as well as the PDMS/DVB or CAR/PDMS fibres. Using the PDMS/DVB fibre coupled with a short sample time provided the best signal/noise ratio for the majority of frog volatiles analysed.

DISCUSSION

Herpetologists have been forced to put on hold the identification of many amphibian and reptile volatile compounds, despite the recognition of the importance such chemicals play in an organism's life. For instance, Brodie and Formanowicz (1981) suggest the release of odorous secretions by amphibians during real or simulated predation may provide a defensive function, whilst there is a large body of literature on the effect of prey and other airborne odours on both lizards and snakes (*e.g.*, Cooper and Vitt, 1984; Cooper and Burghardt, 1990; Halpern *et al.*, 1997; Shivik, 1998; Roth *et al.*, 1999). The rate-limiting step for such studies has been the analytical technology.

Although Tyler's method is effective for the collection of nonvolatile compounds such as peptides and alkaloids, it is limited in its application because compounds in low concentration may be lost either during the collection or extraction process. Furthermore, washing the secretion from the skin with water decreases the ability to capture water-insoluble compounds, and may explain the lack of eucalyptol in hexane extracts of the *L. ewingi* secretion.

Although further studies are needed to determine the best sampling conditions (appropriate fibre coating, exposure time, desorption time and temperature), it is clear SPME provides an attractive tool to investigate volatile biological compounds. The ease with which SPME can be used (due mainly to its simple operation and lack of sample preparation steps) makes this technique attractive to both chemists and non-chemists. The primary advantage, however, lies in its application to the sampling of living organisms. Conventional methods can be destructive to both the target chemical and organism under study, and are severely limited when it comes to

studying changes in the chemical signature of an individual. With headspace SPME only those compounds volatile enough to interact with other organisms or the organism's physical environment are sampled. These compounds can then literally be taken from the frog's back and introduced directly to the analytical instrumentation, removing the risk that the compounds emitted are changed during the extraction process. As the frog is not harmed during this process, repeated sampling events can be conducted. The ability to sample the same animal at various life stages increases the amount of information that can be obtained and also provides information about any temporal variation of volatile compounds in the frog's skin.

The rapid rate with which a sample can be collected is of further advantage when sampling frogs. Due to the nature of frog skin, and its role as a respiratory surface, it is important the animal be kept moist to minimise desiccation. Standard techniques of volatile trapping usually employ dynamic systems in which air is drawn across the sample over time. Desiccation stress as a result of such methods may alter the chemical profile of the animal or, if humidified air is used, traps to remove the moisture could provide sites for analyte loss. Short sample times overcome these problems and negate the need for expensive experimental setups.

Besides the analytical shortfalls associated with conventional methods, consideration must be taken into account of the widespread decline in many frog species (Tyler, 1991). It is imperative that non-destructive techniques for the identification of volatiles be developed if we wish to continue to search nature's vast store of chemicals without plundering the environment. SPME fills this gap for volatile and semivolatile secretions and opens up what until now has been a poorly explored field of research.

Acknowledgments

This work was carried out while B.P.S. was a guest at the Department of Chemistry, University of Waterloo, Ontario, Canada. Financial support was provided by a travelling Fellowship from The Company of Biologists Ltd. to B.P.S. and through industry support from Hamilton Laboratories Pty Ltd. to M.J.T.. Special thanks goes to

A. Chugg, Singapore Airlines, for arranging the safe transport of the frogs to Canada and Riocell S.A. for supplying the eucalyptus trees.

References

- Agelopoulos, N. G. and Pickett, J. A. (1998) Headspace analysis in chemical ecology: Effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples. *Journal of Chemical Ecology*, **24**, 1161–1172.
- Blight, M. M. (1990) Techniques for isolation and characterisation of volatile semiochemicals of phytophagous insects. In: *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones* (Eds. McCafferty, A. R. and Wilson, I. D.), pp. 281–288, New York: Plenum Press.
- Bostock, R. M. and Stermer, B. A. (1989) Perspectives of wound healing in resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **27**, 343–371.
- Brodie, E. D. Jr. and Formanowicz, D. R. Jr. (1981) Palatability and antipredator behaviour of the treefrog, *Hyla versicolor*, to the shrew, *Blarina brevicauda*. *Journal of Herpetology*, **15**, 235–236.
- Cooper, W. E. Jr. and Burghardt, G. M. (1990) Vomeroolfaction and vomodor. *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 103–104.
- Cooper, W. E. Jr. and Vitt, L. J. (1984) Detection of conspecific odours by the female broad-headed skink, *Eumeces laticeps*. *Journal of Experimental Biology*, **229**, 49–54.
- Cossé, A. A., Todd, J. L., Millar, J. G., Martinez, L. A. and Baker, T. C. (1995) Electroantennographic and coupled gas chromatographic electroantennographic responses of the Mediterranean fruit fly to male-produced volatiles and mango odour. *Journal of Chemical Ecology*, **21**, 1823–1836.
- Daly, J. W. (1998) Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. *Journal of Natural Products*, **61**, 162–172.
- Finnegan, D. E. and Chambers, J. (1993) Identification of the sex pheromone of the Guernsey carpet beetle, *Anthrenus sarnicus* Mroczkowski (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Chemical Ecology*, **19**, 971–984.
- Frerot, B., Malosse, C. and Cain, A. H. (1997) Solid-phase microextraction (SPME): a new tool in pheromone identification in Lepidoptera. *Journal of High Resolution Chromatography*, **20**, 340–342.
- Golub, M. A. and Weatherston, I. (1984) Techniques for extracting and collecting sex pheromones from live insects and artificial sources. In: *Techniques in Pheromone Research* (Eds. Hummel, H. E. and Miller, T. A.), pp. 223–285, New York: Springer-Verlag.
- Halpern, M., Halpern, J., Erichsen, E. and Borghjid, S. (1997) The role of nasal chemical senses in garter snake response to airborne odour cues from prey. *Journal of Comparative Psychology*, **111**, 251–260.
- Jakobsen, H. B. (1997) The preisolation phase of *in situ* headspace analysis: Methods and perspectives. In: *Plant Volatile Analysis, Modern Methods of Plant Analysis 19* (Eds. Linskens, H. and Jackson, J.), pp. 1–22, Berlin: Springer-Verlag.
- Jones, G. R. and Oldham, N. J. (1999) Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, **843**, 199–236.
- Koziel, J., Jia, M., Khaled, A., Noah, J. and Pawliszyn, J. (1999) Field air sampling analysis with SPME device. *Chemica Acta*, **400**, 153–162.
- Malosse, C., Ramirez-Lucas, P., Rochat, D. and Morin, J.-P. (1995) Solid-phase microextraction, an alternative method for the study of airborne insect pheromones (*Metamasius hemipterus*, Coleoptera, Curculionidae). *Journal of High Resolution Chromatography*, **18**, 669–670.

- Moneti, G., Dani, F. R., Pieraccini, G. and Turillazzi, S. (1997) Solid-phase microextraction of insect epicuticular hydrocarbons for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **11**, 857–862.
- Monnin, T., Malosse, C. and Peeters, C. (1998) Solid-phase microextraction and cuticular hydrocarbon differences related to reproductive activity in queenless ant *Dinoponera quadricaps*. *Journal of Chemical Ecology*, **24**, 473–490.
- Mozuraitis, R., Borg-Karlson, A.-K., Eiras, A., Witzgall, P., Kovaleski, A., Vilela, E. F. and Unelius, C. L. (1996) Solid phase microextraction technique used for collecting volatiles released by individual signalling *Bonagota cranaodes* moths. *Abstracts of the International Society of Chemical Ecology 13th Annual Meeting*, Aug. 18–22, Prague, p. 193.
- Pawliszyn, J. and Smith, R. M. (Eds.) (1999) *Applications of Solid Phase Microextraction*. Cambridge: RSC Chromatography Monographs, New York: Springer-Verlag.
- Pawliszyn, J. (1997) *Solid Phase Microextraction, Theory and Practice*. New York: Wiley.
- Roth, E. D., May, P. G. and Farrell, T. M. (1999) Pigmy Rattlesnakes use frog-derived chemical cues to select foraging sites. *Copeia*, **3**, 772–774.
- Shivik, J. A. (1998) Brown tree snake response to visual and olfactory cues. *Journal of Wildlife Management*, **62**, 105–111.
- Tollsten, L. and Bergström, G. (1998) Headspace volatiles of whole plants and macerated plant parts of *Brassica* and *Sinapis*. *Phytochemistry*, **27**, 4013–4018.
- Turillazzi, S., Sledge, M. F. and Moneti, G. (1998) Use of a simple method for sampling cuticular hydrocarbons from live social wasps. *Ethology, Ecology and Evolution*, **10**, 293–297.
- Tyler, M. J. (1991) Declining amphibian populations – a global phenomenon? An Australian perspective. *Alytes*, **9**, 34–50.
- Tyler, M. J., Stone, D. J. M. and Bowie, J. H. (1992) A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **28**, 199–200.
- Williams, C. R., Brodie, E. D. Jr., Tyler, M. J. and Walker, S. J. (2000) Antipredator mechanisms of Australian frogs. *Journal of Herpetology*, **34**, 431–443.
- Zhang, Z. and Pawliszyn, J. (1993) Analysis of organic compounds in environmental samples using headspace solid phase microextraction. *Journal of High Resolution Chromatography*, **16**, C689–692.

Monitoring Biogenic Volatile Compounds Emitted by *Eucalyptus citriodora* Using SPME

Cláudia Alcaraz Zini,^{†,‡} Fabio Augusto,^{†,§} Eva Christensen,^{†,||} Benjamin Paul Smith,^{†,¶} Elina Bastos Caramão,[‡] and Janusz Pawliszyn^{*,†}

Department of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1, Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 90040-060 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Institute of Chemistry, State University of Campinas (Unicamp), 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil, MILJØ-KEMI, Danish Environmental Center, Lille Torbjerg Vej 24a, DK-5220, Odense SØ, Denmark, and Department of Environmental Biology, University of Adelaide, Adelaide, South Australia, Australia, 5005

A procedure to monitor BVOC emitted by living plants using SPME technique is presented. For this purpose, a glass sampling chamber was designed. This device was employed for the characterization of biogenic volatile compounds emitted by leaves of *Eucalyptus citriodora*. After extraction with SPME fibers coated with PDMS/DVB, it was possible to identify or detect 33 compounds emitted by this plant. A semiquantitative approach was applied to monitor the behavior of the emitted BVOC during 9 days. Circadian profiles of the variation in the concentration of isoprene were plotted. Using diffusion-based SPME quantitation, a recently introduced analytical approach, with extraction times as short as 15 s, it was possible to quantify subparts-per-billion amounts of isoprene emitted by this plant.

The volatile and semi-volatile substances, other than CO and CO₂, produced by plants and other live species are collectively known as biogenic volatile organic compounds (BVOC). They comprise a large number of organic substances, which includes isoprene and terpenoid compounds, alkanes, alkenes, carbonyl compounds, alcohols, and esters¹ and are typically present in the atmosphere at concentrations in the parts-per-trillion to parts-per-billion range. Isoprene and terpenoid compounds are the principal components usually found.² These volatile compounds are responsible for multiple interactions³ between plants and other organisms, such as pollinating animals⁴ and predators of herbivore creatures.⁵ In addition, because some BVOC have antipathogenic properties, they are produced and emitted by the plant as a defense against attack by herbivorous creatures.⁶

Determination of the chemical composition of the BVOC mix is essential for studies of the biological processes involved in the production, emission, and effects of such substances. Identification, characterization, and quantification of BVOC are also relevant because of their key role in atmospheric chemistry.⁷ However, this is not a trivial analytical problem. Analysis of BVOC may be conducted using macerated or cut parts of a plant or may be done in situ. The volatile fraction isolated from cut or macerated materials, even though it may provide important information about BVOC of the plant, may not reflect the real composition of the emitted mixture in vivo.⁸ Determinations of BVOC released from living plants are usually performed by enclosing the whole plant or some of its parts in glass or plastic chambers, followed by collection of the emitted organics in sorbent traps and chromatographic analysis of the sorbates.^{9,10} This general procedure has some drawbacks: for example, some materials employed as trapping material can introduce artifacts into the extracted materials,¹¹ the solvent used to elute the sorbed material may disturb the detection of low-boiling-point compounds,¹² and long sampling periods may be required to capture sufficient quantities of analytes for analysis.¹³ This work describes the application of SPME to characterization and quantification of BVOC emitted by living leaves of *Eucalyptus citriodora* using a sampling chamber specially designed for this task. SPME, a fast, simple, and sensitive preconcentration and extraction technique introduced in 1990,¹⁴ has been applied to a wide variety of in vitro analyses of metabolites and similar compounds.¹⁵ Using short extraction times and porous-polymer-coated fibers, a semiquantitative approach is applied to monitor the behavior of BVOC emitted by *E. citriodora*

* Fax: (519) 746 04 35. E-mail: janusz@uwaterloo.ca.

[†] University of Waterloo.

[‡] Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

[§] State University of Campinas.

^{||} MILJØ KEMI.

[¶] University of Adelaide.

(1) Kesselmeier, J.; Staudt, M. *J. Atmos. Chem.* **1999**, *33*, 23.

(2) Cuenters, A. B.; Hewitt, C. N.; Erikson, D.; Fall, R.; Geron, C.; Graedel, T.; Harley, P.; Klinger, L.; Lerdau, M.; McKay, W. A.; Pierce, T.; Scholes, B.; Steinbrucher, R.; Tallamraju, R.; Taylor, J.; Zimmerman, P. *J. Geophys. Res.* **1995**, *100*, 8873.

(3) Langenheim, J. H. *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 1223.

(4) Dudareva, N.; Picherski, E. *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 627.

(5) Takabayashi, J.; Dicke, M.; Posthumus, M. A. *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 1329.

(6) Gershenzon, J.; Croteau, R. In *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*; Rosenthal, G., Berenbaum, M., Eds.; Academic Press: San Diego, 1991; Vol. 1, pp 165–219.

(7) Thunis, P.; Cuvelier, C. *Atmos. Environ.* **2000**, *34*, 467.

(8) Tollsten, L.; Bergstrom, G. *Phytochem.* **1988**, *27*, 4013.

(9) Agelopoulou, N. G.; Hooper, A. M.; Maniar, S. P.; Pickett, J. A.; Wadhams, L. J. *Phytochem.* **1999**, *25*, 1411.

(10) Heath, R. R.; Manukian, A. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1209.

(11) Vercammen, J.; Sandra, P.; Baltussen, E.; Sandra, T.; David, F. *HRC – J. High Resolut. Chromatogr.* **2000**, *23*, 547.

(12) Tollsten, L.; Müller, P. M. *Phytochem.* **1996**, *43*, 759.

(13) Kite, G. C.; Leon, C. *Phytochem.* **1995**, *40*, 1093.

(14) Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145.

(15) Theodoridis, G.; Koster, E. H. M.; Jong, G. J. *J. Chromatogr. B* **2000**, *745*, 49.

Table 1. Main Operational Conditions for the Chromatographic Separation and Detection of *E. citriodora* BVOC

gas chromatograph	
column oven temp program	50 °C → 1 °C/min → 60 °C → 30 °C/min → 280 °C
SPI temp	210 °C
carrier gas	15 psi (1.5 mL/min)
ion trap temp	150 °C
transfer line temp	240 °C
ITMS detector	
mass scan range	<i>m/z</i> 40–300
scan frequency	8 scans/s
photomultiplier voltage	1710–1860 V, optimized daily
axial modulation	4
filament current	25 μA

during 9 days. Quantification of isoprene was performed without need of calibration curves,^{16,17} which is especially suitable for work with live systems, because of their dynamic characteristics.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Chemicals and SPME Materials. The SPME holder and fibers (65-μm PDMS/DVB, 75-μm Carboxen/PDMS (CAR/PDMS) and 100-μm PDMS) were purchased from Supelco (Oakville, ON, Canada). Prior to their use, fibers were conditioned according to the supplier specifications. Isoprene (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON, Canada) and carbon disulfide (BDH, Toronto, ON, Canada) were also employed.

Samples. Young (ca. 1.5-year-old; approx. height, 1.5–2.0 m) specimens of *E. citriodora* were employed as sources of BVOC. These trees were kept in appropriate pots at the Department of Biology greenhouse at the University of Waterloo. During some of the extraction procedures, the trees were transported to the laboratory.

Gas Chromatography. Chromatographic analysis was carried out on a Saturn 4D GC-ITMS system (Varian Associates, Sunnyvale, CA) fitted with a 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm HP-5MS column (Hewlett-Packard, Avondale, PA) and a septum-equipped programmable injector (SPI). Helium, TAG grade (Praxair, Kitchener, ON, Canada), was used as carrier gas. Mass spectra recorded from ITMS were generally used as TIC, except in the cases of isoprene and citronellal, in which case ions with *m/z* 53 and 67; and 67, 95, and 121, respectively, were used. Table 1 lists the operational conditions for the chromatographic separation and detection. Identification of the eluates was performed using NIST92 MS spectra base. Whenever necessary, these results were also confirmed by comparison with retention data in either a HP-Innowax 30 m × 0.25 mm × 0.50 μm or a HP-1MS 60 m × 0.25 mm × 0.25 μm column (Hewlett-Packard), as well as with a lab-built MS spectra database previously collected from chromatographic runs of pure compounds (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, and Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI) performed using the same equipment and conditions. When pure compounds were not available, comparison with retention data reported in the literature was also used to tentatively identify some of the compounds.¹⁸

Sampling Chamber. To facilitate the extraction of the BVOC emitted by live *Eucalyptus* leaves, a glass chamber was designed and assembled (Figure 1). It consisted of a Pyrex glass cylinder (120 mm wide, Ø = 60 mm), into which leaves from an *E. citriodora* tree can be inserted through a hole in one of its ends. After introduction of the leaf, this hole can be sealed using Teflon tape. A round glass lid secured by clamps closes the other end of the chamber. This lid has several 5-mm holes sealed by Thermogreen LB-1 predrilled septa (Supelco), into which a SPME fiber can be introduced to sample the air inside. A model KD0504PEB1-8 microfan (Sunonwealth Electric, Taipei, ROC), powered by a lab-made 5 V DC power supply, was also fitted to the lid. When powered, this fan produces a constant air stream in the region in front of the sampling holes. The velocity of this stream, measured using an HHF51 digital wire anemometer (Omega Engineering, Stamford, CT) was 0.5 m s⁻¹. All glass parts of the container were silanized prior use, and daily blank runs were carried out to check for the presence of artifacts and contamination from previous analyses.

Methods. Preliminary Assays. Preparatory experiments were carried out to determine some operational parameters to be adopted through this work, such as the type of SPME fiber to be employed and optimum extraction times. These experiments were performed in the greenhouse and without use of the chamber and employed three repetitions. The fibers listed above were brought as close as possible to the surface of the leaves without touching the plant tissue, and exposed for times up to 10 min. Desorption time was 7 min for all runs. Each fiber was exposed separately to a single leaf, and for replicates, neighbor leaves were selected from the same tree. Later, experiments were made with only porous-polymer-coated fibers (PDMS/DVB and CAR/DVB), in which both were simultaneously exposed to a mechanically damaged leaf. Sorbed analytes were immediately desorbed and chromatographed according to the conditions listed in the Materials Section.

Circadian BVOC Emission Profiles for *E. citriodora*. A branch of *E. citriodora* with 5 adult leaves and 5 young leaves (in the laboratory) or 3 adult leaves and 3 small leaves (in the greenhouse) was sealed in the glass sampling chamber, and the air inside the chamber was extracted for 1 min using a PDMS/DVB fiber. The chosen branches were neighbors and had fresh weight around 1 g. This procedure was performed every 30 min for continuous periods between 8 and 10 h, with the sampling container being kept sealed. The microfan and its support were removed during these experiments. In addition to assays using intact leaves, the same procedure was used to measure emission profiles from mechanically damaged leaves. In these cases, immediately before sealing the leaf inside the sampling container, 6 small holes (random number; hole diameter, roughly 2 mm) were made in the leaf surface with a stainless steel syringe needle, to simulate lesions resulting from the action of insects. The 6 holes were placed in 2 rows along the leaf. For each sample, triplicate series of emission profiles were measured as described above in consecutive days, with the plant either in the greenhouse (where it was subject to sunlight and natural temperature variations) or in the laboratory (under artificial fluorescent illumination and

(16) Koziel, J.; Jia, M.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5178.

(17) Augusto, P.; Koziel, J.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 481.

(18) Adams, R. *Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*; Academic Press: New York, 1989.

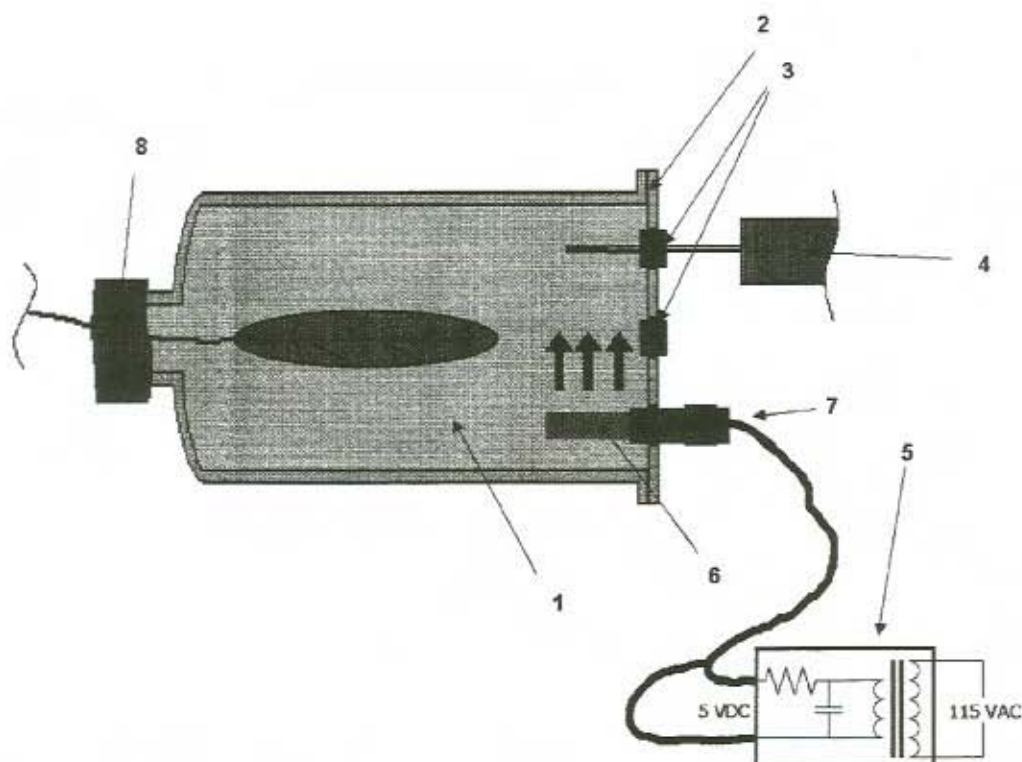


Figure 1. Glass container for live plants BVOC extraction: 1, silanized glass cylindrical body (120 mm × 60 mm); 2, silanized glass lid; 3, sampling holes topped with LB-1 silicone septa; 4, SPME holder + fiber; 5, 5 V DC power supply; 6, microfan (40 mm × 40 mm × 6 mm); 7, Teflon support for microfan; and 8 Teflon tape seal.

controlled environment temperature). Blank analyses of the fiber and of the glass chamber were run before starting each set of daily sampling. During the transportation of the fibers to the laboratory after extractions performed in the greenhouse, fibers were kept under dry ice. Time between sampling and analysis never exceeded 5 min. Under these conditions, the loss of extracted analytes is expected to be insignificant.¹⁹

Diffusion Based SPME Quantification of Isoprene Emitted from E. citriodora. These experiments were conducted in the greenhouse, using a procedure similar to that specified above. Extractions with PDMS/DVB fiber (15-s exposure time) were performed every 30 min after an undamaged leaf of *E. citriodora* was sealed inside the sampling container. During these extractions, the microfan was powered. The concentration, C , of isoprene was calculated using the diffusion-based SPME quantitative model^{16,17} defined by eq 1,

$$C = \frac{n}{2\pi D_c L t} \times \ln \left(\frac{b + \delta}{b} \right) \quad (1)$$

where n is the extracted mass of isoprene; D_c , the diffusion coefficient of isoprene in air ($8.82 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, estimated according to the literature²⁰); L and b are the length and the diameter of the SPME fiber, respectively (1.00 and 0.0120 cm, measured in the laboratory); and t is the extraction time (15 s).

(19) Müller, L. In *Applications of Solid-Phase Microextraction*; Pawliszyn, J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cornwall, 1999; pp 63–67.

The parameter δ is the thickness of the static boundary layer surrounding the fiber, estimated from

$$\delta = 9.52 \times \frac{b}{Re^{0.62} Sc^{0.38}} \quad (2)$$

In this equation, Re is the Reynolds number ($Re = 2ubv^{-1}$; u is the linear velocity of the air and v is the kinematic viscosity of air); and Sc , the Schmidt number ($Sc = \nu D_g^{-1}$).

RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary Assays. These experiments were employed to outline the procedures to be used for the rest of the work. It was determined that the best fibers for monitoring BVOC produced by *E. citriodora* were those coated with porous-polymer solid adsorbents. The amounts extracted using the liquid-polymer-coated fiber (PDMS) were lower when compared to solid-coated fibers, and most of the BVOC peaks could not be discriminated from the background signal.

During these preliminary experiments, BVOC from a leaf mechanically damaged and infested by the insect longtailed mealybug (*Pseudococcus longispinus*) were extracted with CAR/PDMS fibers. Extractions were performed immediately after mechanically damaging the leaf, 22 min after the damage, and 44

(20) Tucker, W. A.; Nelken, L. H. In *Handbook of Chemical Property Estimation Methods—Environmental Behavior of Organic Compounds*; Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H., Eds.; McGraw-Hill: New York, 1982; Chapter 17, pp 1–25.

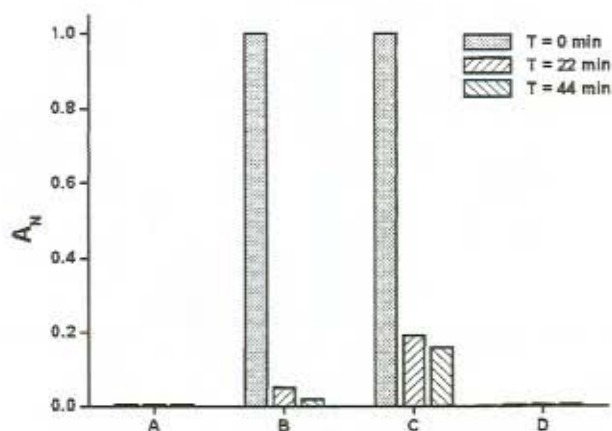


Figure 2. Normalized peak areas for selected BVOC emitted by a healthy *E. citriodora* leaf after mechanical damage (10 min CAR/PDMS extraction): A, isopulegol; B, citronellal; C, citronellol; and D, β -caryophyllene.

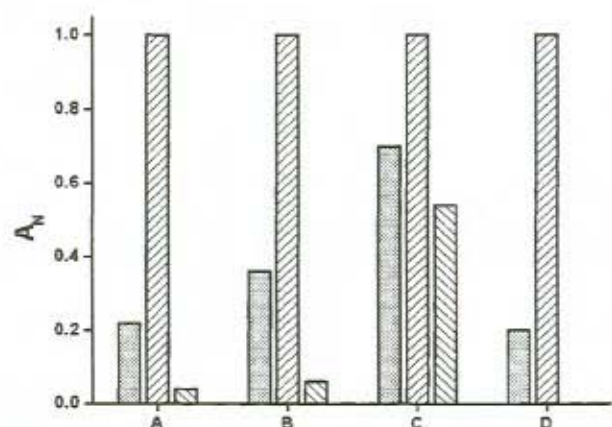


Figure 3. Normalized peak areas for selected BVOC emitted by an *E. citriodora* leaf infested with *Pseudococcus longispinus* after mechanical damage (10 min CAR/PDMS extraction): A, isopulegol; B, citronellal; C, citronellol; and D, β -caryophyllene. Legend for the bars same as Figure 2.

min after damage. Sampling time intervals were chosen according to chromatographic run length (Table 1). Figures 2 and 3 allow comparison of these results with similar extractions from a healthy leaf. Peak areas were normalized according to

$$A_N = \frac{A_X}{A_{MAX}} \quad (3)$$

where A_N is the normalized area, A_X is the peak area X min after leaf damaging, and A_{MAX} is the maximum peak area for the compound in the set. All comparisons related to BVOC are based on peak area measurements without taking into consideration response factors and are referred to as their amounts in this work. It can be seen that the emission profiles for both specimens are noticeably different. Contrary to the BVOC mix emitted from the sick leaf, isopulegol and β -caryophyllene were not detected in the extracts corresponding to the healthy leaf. In addition, the variation of the extracted amounts with the sampling time is distinct. For the healthy leaf, concentrations of the analytes are maximized right

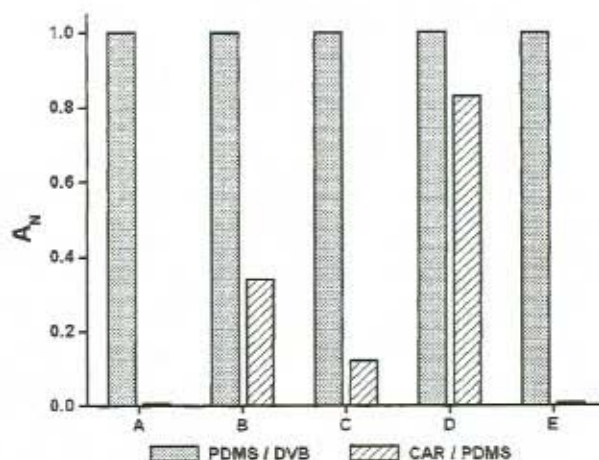


Figure 4. Normalized peak areas for selected BVOC emitted by *E. citriodora* (10 min CAR/PDMS extraction): A, isopulegol; B, citronellal; C, citronellol; D, β -caryophyllene; and E, citronellyl acetate.

after damaging the leaf, with a sharp decrease in further extractions, but for the sick leaf, the extracted quantities are maximized 22 min after leaf damage.

Among the tested porous-polymer-coated fibers, PDMS/DVB was found to be the optimal, because its extraction efficiency for *E. citriodora* volatiles was greater than with CAR/PDMS, as is seen in Figure 4, in which the peak areas of representative components of *E. citriodora* BVOC released by a damaged leaf extracted by both fibers are compared. For this comparison, CAR/PDMS areas were normalized in relation to PDMS/DVB areas using eq 4

$$A_N = \frac{A_{CAR}}{A_{PDMS}} \quad (4)$$

where A_N is the normalized area, A_{CAR} is the peak area for CAR/PDMS extractions, and A_{PDMS} is the peak area for PDMS/DVB extractions. Peak areas of citronellal, citronellol, and β -caryophyllene were higher for PDMS/DVB extractions when compared to CAR/PDMS. In addition, isopulegol and citronellyl acetate could not be detected when using CAR/PDMS. These results led to the adoption of PDMS/DVB in the systematic studies described below.

Because the number of compounds detected in extractions performed in open air conditions was limited, the glass chamber described in Figure 1 was used for the rest of the work. Table 2 lists some of the BVOC generated by *E. citriodora* and identified in these experiments, and Figure 5 shows a representative chromatogram. In the table, some compounds (shown in bold) were tentatively identified by mass spectrum and comparison with literature retention data.¹⁸ Most of the identified substances are mono- or sesquiterpenoid hydrocarbons and esters that are also frequently found in the essential oil of *Eucalyptus*.^{21,22} Although the relative amounts of these compounds were found to be extremely variable with respect to the place of sampling and

(21) *Eucalyptus Leaf Oils—Use, Chemistry, Distillation and Marketing*. Boland, D. J., Brophy, J. J., House, A. P. N., Eds.; Inkata Press: Melbourne, 1991.
 (22) Krock, K. A.; Ragunathan, N.; Wilkins, C. L. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 425.

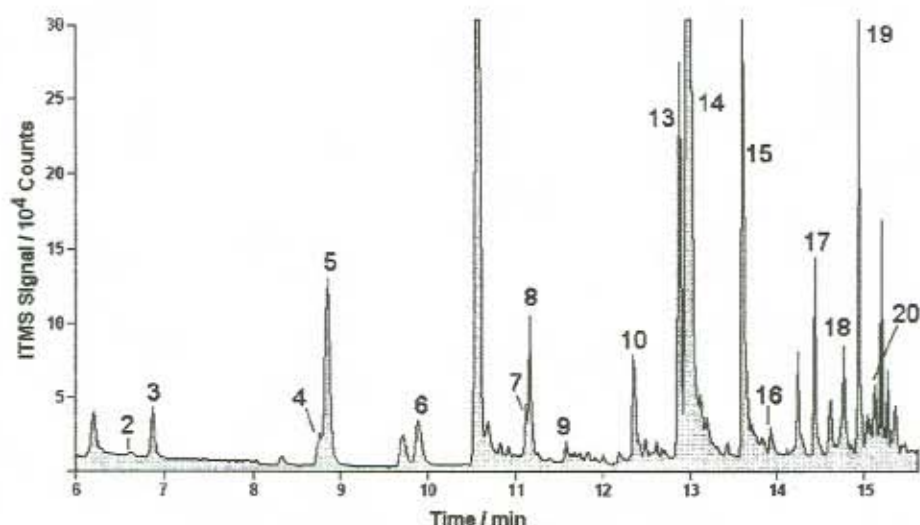


Figure 5. Typical GC-ITMS profile of *E. citriodora* BVOC after 1-min extraction with PDMS/DVB fiber (damaged leaf, extraction performed in the laboratory) using the glass chamber. For peak identification, see Table 2.

Table 2. Identification and Relative Abundances (RA) for BVOC Emitted by *E. citriodora* and Identified after 1 min Extractions with PDMS/DVB SPME Fibers

no.	compound	RA ^a
1	isoprene	++/+ ^b
2	α -thujene	x
3	α -pinene	+
4	sabinene ^d	x
5	β -pinene ^d	+
6	β -myrcene	x
7/8	limonene + 1.8-cineole ^c	+
9	(E) β -ocimene	+/ ^b x
10	linalool	+
11	<i>cis</i> -rose oxide	+
12	<i>trans</i> -rose oxide	+
13	isopulegol	+/ ^b x
14	citronellal	++
15	citronellol	++
16	3,7-dimethyl-2,6-octadienal ^c	x
17	citronellyl acetate	+
18	3,7-dimethyl-2,6-octadienal acetate ^c	x
19	β -caryophyllene	++
20	α -caryophyllene	x

^a ++, peak area usually 10.0% or more of the total area of identified peaks; +, peak area usually between 1.0 and 10.0% of the total area of identified peaks; and x, peak area usually less than 1.0% of total area of identified peaks. ^b Relative abundance extremely variable from sample to sample. ^c See text. ^d Separation incomplete. ^e Coeluting substances.

sampling conditions, for the majority of the extractions, citronellal was the most abundant compound. Citronellol, β -caryophyllene, and isoprene were also found in large amounts in most of the samples; and α -thujene, sabinene, β -myrcene, isopulegol, and α -caryophyllene were detected in trace amounts. For compounds 16 and 18, the exact identity of the isomer detected could not be determined: neral/neryl acetate (*Z* isomer) or geranial/geranyl acetate (*E* isomer) are the possibilities.

Along with the identified substances presented in Table 2, traces of 13 other nonidentified compounds were systematically present in the majority of the samples. Most of them were terpenoid compounds that are similar to those identified and listed

in Table 2. Five of the identified or detected were sesquiterpenes, such as α - and β -caryophyllene, which are not detectable in most BVOC measurements using other sampling techniques because of their high reactivity.¹ The remaining peaks in Figure 5 are either nonidentified BVOC components or compounds resulting from the PDMS/DVB fiber and chamber bleeding.

Circadian BVOC Emission Profiles for *E. citriodora*. To assist and simplify the evaluation of these profiles, for each compound and sampling series, the peak areas were normalized according to eq 3 above. Instead of showing the average of measurements in each set of 3 sampling days, circadian measurements were shown in a single line in Figures 6 and 7 to demonstrate the behavior of the BVOC in consecutive days. RSD of measurements is 7% calculated according to literature.²³ Normalized areas were corrected in the case in which environmental temperatures changed during sampling.¹⁶ Several different patterns were observed when the variation of A_N was plotted against the leaf enclosure time. For example,

i. For citronellal (Figure 6) the concentration is at a maximum at the moment of the enclosure of the leaf inside the chamber, decreasing during the experiment. Similar behavior was observed for citronellol.

ii. The profiles of *cis*-rose oxide (Figure 7) and *trans*-rose oxide show a gradual increase in the A_N values until 300–400 min after leaf enclosure. Regarding the data obtained in the greenhouse from intact leaves, after achieving a maximum, A_N decreases. For other sampling conditions, this value remains nearly constant after the maximum is reached.

The concentration profiles shown above should result from a combination of several simultaneous processes of production, emission, and destruction of the BVOC inside the sampling chamber during the assays. Terpenoid compounds are secondary metabolites biosynthesized from geranyl pyrophosphate produced through the mevalonic pathway.²⁴ Several subsequent reaction

(23) Kozel, J.; Jia, M.; Khaled, A.; Noah, J.; Pawliszyn, J. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *400*, 153.

(24) *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*; Porter, J. W., Spurgeon, S. L., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 1981; Vol. 1, p 550.

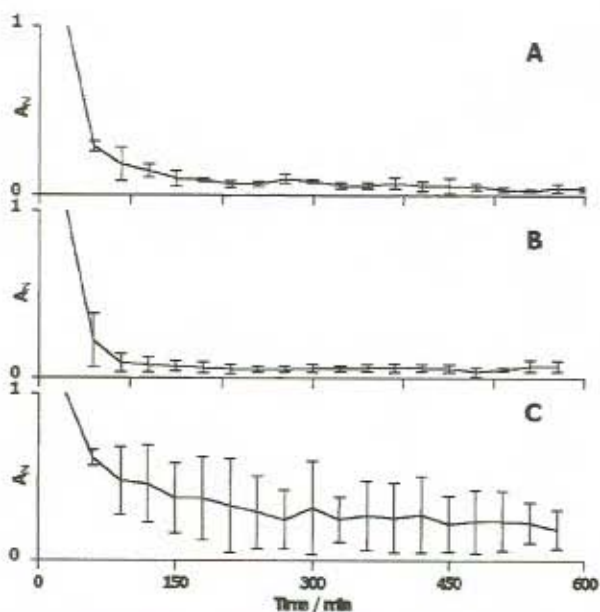


Figure 6. Circadian profiles for citronellal emitted by *E. citriodora* leaves: A, greenhouse sampling, undamaged leaves; B, laboratory sampling, undamaged leaves; and C, laboratory sampling, damaged leaves. Errors expressed as estimates of standard deviation for triplicate measurements.

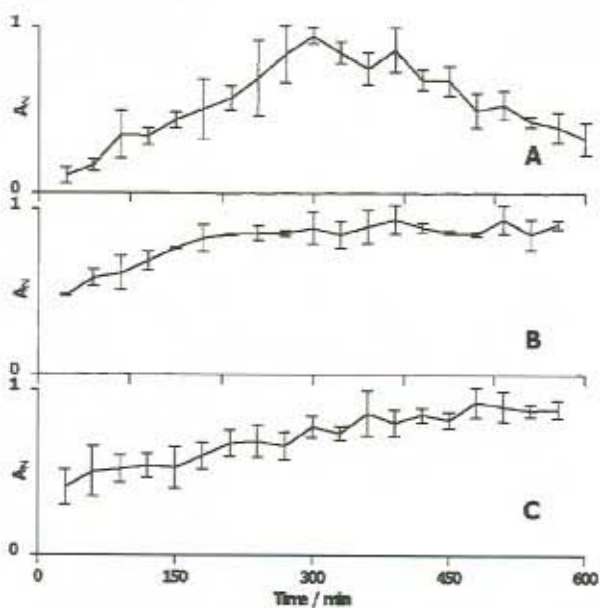


Figure 7. Circadian profiles for *cis*-rose oxide emitted by *E. citriodora* leaves: A, greenhouse sampling, undamaged leaves; B, laboratory sampling, undamaged leaves; and C, laboratory sampling, damaged leaves. Errors expressed as estimates of standard deviation for triplicate measurements.

routes are responsible for the synthesis of the broad range of natural terpenic substances, and most of those natural processes are not fully understood.²⁵ Alterations in the photosynthetic activity,²⁶ in the temperature, and plant stress¹ (which could be produced by enclosure of the leaf inside the sampler, by the

mechanical damage, or by the competition for space and light in the greenhouse) are commonly reported to cause changes in the biogenic production and emission of terpenic compounds. Removal of atmospheric BVOC can be accomplished by their oxidation by species such as O_3 , OH, and NO_3 . For example, in air containing 50 ppbv of ozone, the half-life of α -pinene (a monoterpene) is ca. 1.8 h; that of β -caryophyllene (a sesquiterpene) is ca. 36 s.²⁷ Therefore, the reduction in the citronellal concentration observed during the sampling period (Figure 6) can result from a combination of a decrease in its emission caused by both the plant stress after the enclosure of the leaf inside the chamber and its removal by oxidative degradation by atmospheric compounds. The decrease in the citronellal concentration observed for the damaged leaf experiments (part C of Figure 6) is less pronounced than those detected for assays with intact leaves (parts A and B of the same figure). Because citronellal is an effective antibacterial agent²⁸ and insecticide,²⁹ this fact can result from an increase in the emission rate of this compound as a defense against pathogenic agents that could infect the leaf after the mechanical damage.

To the knowledge of the authors, this is the first time that *cis*- and *trans*-rose oxide were detected in *Eucalyptus* volatile emissions, even though they have been detected as minor compounds in the essential oil of *E. citriodora*.^{21,30,31} For *cis*- and *trans*-rose oxide (Figure 7), the latter present in trace amounts when compared to the *cis*- isomer, the different pattern may be an indication that the emission of this compound is less affected by enclosure than citronellal. Alternatively, it could be a consequence of slower atmospheric degradation. The increase in *cis*- and *trans*-rose oxide concentration inside the chamber may result from its production by the plant as a defense substance. However, as was mentioned above, the emission of BVOC is a complex process, and a complete explanation requires further investigation. However, the role of SPME as a fast, noninvasive, solventless, relatively simple, and inexpensive tool for extraction of semiochemicals and for diagnosis of the status of a plant for agricultural or forest purposes is very promising. It allows sampling of the intact plant without need for maceration or detachment of parts of the plant, a process that may impart chemical changes during sampling/sample preparation.^{8,13}

Diffusion-Based SPME Quantification of Isoprene Emitted from *E. citriodora*. Figure 8 shows the dependence of the isoprene concentration inside the sampling chamber with the time of the day. Two maximums were observed for isoprene concentration: for the first and second sampling days, isoprene concentration peaked around 15 and 17 h; for the third day, around 16 and 18 h. Differently from most other BVOC, isoprene is not stored by the plant, and it is emitted immediately after its production.¹ Its emission is a defensive mechanism for plant protection against high temperature damage, and its emission rate is promptly affected by changes in temperature.³² Effects of changes in the intensity of light incidence are also more pronounced than those

(27) Grosjean, D. *Quim. Nova* **1995**, *18*, 184.

(28) Kim, J. M.; Marshall, M. R.; Wei, C.; Ragozzino, L. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2839.

(29) Rice, P. J.; Coats, J. R. *J. Econ. Entomol.* **1994**, *87*, 1172.

(30) Mondello, L.; Verzera, A.; Bonaccorsi, I.; Chowdhury, J. U.; Yusef, M.; Begum, J. *J. Essent. Oil Res.* **1998**, *10*, 185.

(31) He, C.; Murray, F.; Lyons, T. *Atmos. Environ.* **2000**, *34*, 645.

(32) Singaas, E. L.; Sharkey, T. D. *Plant Cell Environ.* **1998**, *21*, 1181.

(25) Sharkey, T. D. *Endeavour* **1996**, *20*, 74.

(26) Gershenzon, J.; Croteau, R. *Recent Adv. Phytochem.* **1990**, *24*, 99.

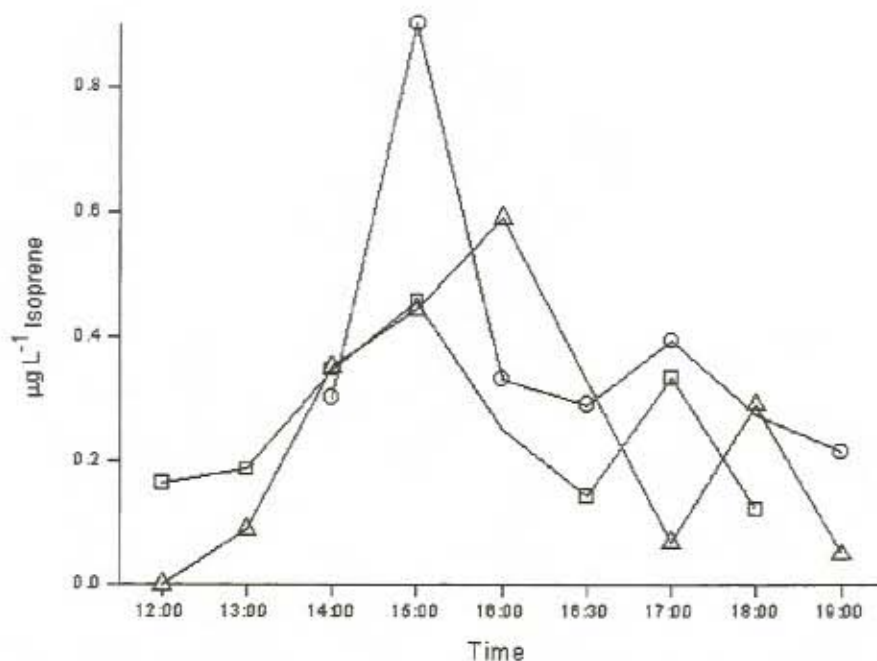


Figure 8. Dependence of isoprene concentration inside the sampling chamber with the time of the day: □, first replicate; ○, second replicate; and △, third replicate.

typical for other BVOC.³³ Therefore, the circadian variations observed in the isoprene concentration profiles can be a reflex to the variations of temperature and illumination conditions during the sampling cycles. It is interesting to note that weather on the third sampling day (overcast most of the time) was remarkably different from that of the two previous days, which may be the cause for the shift in the isoprene concentration maximums for this extraction cycle when compared to the previous replicates. All measured concentrations were on the order of hundreds of nanograms per liter, which is within the typical range for forest atmospheric environments (from parts per trillion to several parts per billion).¹

CONCLUSIONS

The results presented here address the application of SPME to qualitative analysis, as well as quantitative and semiquantitative measurements of BVOC emitted by living plants. Using short sampling times and a simple glass chamber, it was possible to detect variations in concentrations of several volatile compounds that were emitted during 9 days by using a static setup. SPME, as a result of its minute dimensions, provides a noninvasive means of sampling living plants emissions, thus allowing the monitoring of a single branch of a tree during various periods of its life, without causing any substantial harm to the plant. Under dynamic conditions, measurements of concentrations of submicrograms

per liter of isoprene were possible by employing very short extraction times (15 s) and without need of conventional (and experimentally complicated) calibration procedures with standard gas mixtures using diffusion-based SPME quantitation. Considering that changes in BVOC emission and degradation rates can be extremely rapid, depending on environmental conditions, fast SPME seems to be the ideal technique for such studies, the analytical output and sensitivity being limited only by the features of the chromatographic system. The use of a dynamic setup, short sampling times, and a chamber with temperature and humidity control may allow future studies involving the quantification of the BVOC released by living plants. Further studies are being undertaken regarding the application of SPME to the BVOC emissions of leaves of other *Eucalyptus* species. It can be foreseen that SPME will have a significant contribution as a sampling technique for living plants and similar biological systems.

ACKNOWLEDGMENT

This work was funded by NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council), Canada. The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Riocell S. A. for supporting the project and providing the trees.

Received for review March 15, 2001. Accepted June 29, 2001.

AC0103219

(33) Monson, R. K.; Guenther, A. B.; Fall, R. In *Trace Emissions from Plants*; Sharkey, T. D., Holland, E. A., Mooney, H. A., Eds.; Academic Press: San Diego, 1991; pp 185–207.

Automation of Solid-Phase Microextraction–Gas Chromatography–Mass Spectrometry Extraction of Eucalyptus Volatiles

Cláudia A. Zini^{1,2,*}, Heather Lord^{1,†}, Eva Christensen^{3,‡}, Teotônio F. de Assis^{4,§}, Elina B. Caramão², and Janusz Pawliszyn^{1,†}

¹Department of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, ON, N2L 3G1, Canada

²Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 91501 970, Brazil

³Miljø Kemi – Danish Environmental Center, Lille Tornbjerg Vej 24a, DK-5220, Odense SØ, Denmark

⁴Riocell S/A, P.O. Box 108, 92500 000 Guaíba-RS, Brazil

Abstract

Solid-phase microextraction (SPME) coupled with gas chromatography (GC)–ion-trap mass spectrometry (ITMS) is employed to analyze fragrance compounds from different species of eucalyptus trees: *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus grandis*, and hybrids of other species. The analyses are performed using an automated system for preincubation, extraction, injection, and analysis of samples. The autosampler used is a CombPAL and has much flexibility for the development of SPME methods and accommodates a variety of vial sizes. For automated fragrance analysis the 10- and 20-mL vials are the most appropriate. The chromatographic separation and identification of the analytes are performed with a Varian Saturn 4D GC–ITMS using an HP-5MS capillary column. Several compounds of eucalyptus volatiles are identified, with good reproducibility for both the peak areas and retention times. Equilibrium extraction provides maximal sensitivity but requires additional consideration for the effect of carryover. Preequilibrium extraction allows good sensitivity with minimal carryover.

Introduction

The volatile and semivolatile substances, other than CO and CO₂, produced by plants and other living species are collectively known as biogenic volatile organic compounds (BVOCs). They are comprised of a large number of organic substances, which include isoprene and terpenoid compounds, alkanes, alkenes, carbonyl compounds, alcohols, and esters (1) and are typically present in the atmosphere at concentrations in the range of parts per trillion to parts per billion. Isoprene and terpenoid compounds are the principal components found (2,3). These volatile compounds are responsible for multiple interactions

between plants and other organisms (4) such as pollinators (5) and herbivore predators (6). Also, some BVOCs are produced and emitted by plants as a defense against attack by herbivores (7).

Analysis of BVOCs may be conducted using macerated or cut parts of a plant or in situ. The volatile fraction obtained by both methods may be different and bring complementary information about the plant (8). Methods employed for the in vitro analysis of volatile compounds from fresh or dried parts of plants are distillation (steam or hydro), distillation with solvent (9,10), vacuum distillation (11), headspace (12), microwave-assisted liquid–liquid extraction (13), solvent (14), supercritical or subcritical fluid extraction (9), sorbent traps (8), or solid-phase microextraction (SPME) (15,16).

SPME is a fast, simple, and sensitive preconcentration and extraction technique introduced in 1990 (17). It has been applied to a wide variety of in vitro analyses of metabolites and similar compounds (18). Using short extraction times and porous-polymer-coated fibers a semiquantitative approach has been applied to monitor the behavior of BVOCs emitted in situ by *E. citriodora* over nine days (19), and six other *Eucalyptus* species have had the headspace of stems extracted by a polydimethylsiloxane (PDMS) fiber in situ (20). Several other studies have been conducted using SPME to extract volatile compounds from aromatic and medicinal plants. The majority have used dried parts of the plant (15,16,21), and only a few have used chopped or powdered fresh parts of the plant (22,23). The goal of this project was to develop an automated extraction method to be used for the chemometric differentiation of plants. Experiments using headspace SPME to extract the volatile compounds of chopped leaves of *Eucalyptus dunnii* (24) were the starting point to develop a method using powdered leaves for chemometric analysis.

Determination of the chemical composition of the BVOC mix is essential for studies of the biological processes involved in the production, emission, and effects of such substances. The pattern of volatiles emitted by different species of related plants

* Email: cazini@portoweb.com.br.

† Email: janusz@uwaterloo.ca.

‡ Email: evc@miljo.kemi.dk.

§ Email: TFAssis@riocell.com.br.

(or different hybrids within a species) may also be used as a type of chemical signature. Correlations with other physical characteristics of the plant may be used to identify plants with desired characteristics without the direct measurement of those characteristics. The goal of this project was to develop an SPME method for the automated characterization of eucalyptus volatiles and thus support the genetic improvement of the forest. It was hoped that eventually a correlation will be identified between a specific pattern (or patterns) of eucalyptus volatiles in seedlings and the quality of pulpwood in mature trees. Brazilian eucalyptus is used primarily as a source of pulpwood, and conventional genetic improvement requires the analysis of mature wood. If promising hybrids could be identified very early (6 mo) by the chemometric analysis of volatiles rather than waiting for mature wood formation (7 years), significant savings in time and cost could be realized. In this work, an automated method using SPME-gas chromatography (GC)-ion-trap mass spectrometry (ITMS) was developed to be used for the chemometric differentiation of eucalyptus species. Mature trees were employed in this study according to the availability of the pulp and paper industry; however, this first step opens the perspective of using seedlings in the future.

In this study, we report on the development of a method for the sample preparation and analysis of eucalyptus volatiles and the suitability of the method for routine chemometric analysis.

Experimental

For SPME analysis experiments, freshly picked leaves were sampled randomly around the tree canopies of 12 eucalyptus trees (different species and hybrids) at the Barba Negra tree farm (Guaíba, RS, Brazil) and transported to Canada in Styrofoam boxes containing ice packs. Leaves of different sizes and ages as well as different locations on the trees were selected in an attempt to account for intraplant variation in volatile emissions. Because of the proprietary nature of these plants, their specific identities are not described in detail. Immediately upon arrival, the leaves were placed in dry ice (solid CO₂) until extraction and analysis were performed. During sample preparation, leaves were first placed in liquid nitrogen. When frozen, the leaves were partially ground in a stainless steel mortar and pestle, after which dry ice was added. Leaves were further ground into a powder, during which time the nitrogen evaporated but the solid CO₂ remained. The mixture of powdered leaf and solid CO₂ was sieved through a 50-mesh (U.S.A. series) stainless steel sieve. Immediately after the CO₂ had evaporated, powdered leaf (0.05 g) was weighed into 10-mL vials stored on dry ice. Phosphate buffer was added to each vial (2 mL, pH 7.0, 50mM), whereupon it immediately froze. The temperature was kept low during sample preparation (< 4°C) in order to avoid loss of volatile compounds. Once thawed, vials were capped and placed on the temperature-controlled autosampler tray (30°C) and analysis was initiated. For these analyses, SPME and chromatography were as follows. Sample vials were pre-

heated to 30°C for at least 24 h. The SPME fiber (7- μ m PDMS) was placed in the vial headspace, and volatiles were extracted for 30 min. It was previously determined that this was sufficient for the equilibrium extraction of all compounds. Analysis was performed on a Varian (Walnut Creek, CA) 3400 GC Saturn 4D ITMS equipped with an SPI injector and an HP5-MS column (Agilent, Wilmington, DE) (30-m \times 0.25-mm, 0.25 μ m). The fiber was desorbed in the injector (250°C) for 30 min. Column oven programming was set initially at 60°C and then ramped at 5°C/min to 250°C. Helium was used as the carrier gas at 1.2 mL/min. The transfer line was held at 250°C and the ion trap at 150°C. Data collection was handled with Saturn Version 5.0 software, and data analysis was handled with Varian Saturn GC/MS Workstation Version 5.4 software. Automation of the extraction and injection was achieved with a CombiPAL autosampler (CTC Analytics, Basel, Switzerland).

Although the use of internal standards would have been desirable to correct for variation in the detector response, it was not possible to include internal standards in these preliminary investigations because it was necessary to first determine the types of compounds present in the different cases in order to make a reasonable selection of the internal standard. Also, the technical difficulties in introducing internal standards to a matrix such as the one used in this study requires additional research to be conducted in order to ensure that the inclusion of internal standards will not itself add more error to the analysis than it is eliminating. However, prior to commencing these experiments, the linearity of the detector was verified for several representative compounds over a range of concentrations, and operational parameters for the instrument were monitored throughout the experiments to ensure that there was no variation in instrument performance.

The procedure described for the analysis of the powdered leaf with the 7- μ m fiber produced acceptable precision and sensitivity, although the leaf preparation required quite a lot of time and a number of fiber bleed peaks were identified. A simplified sample preparation and SPME analysis was conducted and evaluated for sensitivity, precision, carryover, and the presence of fiber bleed peaks. In the method a *Eucalyptus dunnii* leaf (approximately 0.38 g) was cut into approximately 0.5-cm² pieces with scissors and placed in a 10-mL sample vial. Vials were capped immediately and placed on the sample tray at room temperature. The extraction method was similar to that described previously, except that a 30- μ m PDMS fiber was used with a 10-min extraction at 30°C and a 1-min desorption at 250°C. This was a preequilibrium extraction time for most compounds. The carrier gas flow was 1.0 mL/min. The shorter extraction time was intended to provide reduced carryover, and the resulting lower sensitivity was partially compensated by the thicker film. The short desorption time was intended to allow for reduced fiber bleed.

Hydrodistillation was performed in a Clevenger modified apparatus for 5 h, according to the method of Guenter et al. (25). Approximately 300 g of fresh leaves was used in 1 L of deionized water. The refrigeration system was maintained between -4°C and 4°C using a mixture of water and ethylene glycol to avoid losses of volatile compounds. The hydrodistilled oil was dried with sodium sulfate.

For all of the chromatographic results, background peaks were identified and ignored for the analysis, and preliminary identification was attempted for compounds arising from the sample. Those compounds that appeared to be eucalyptus volatiles (based on MS analysis) were identified by retention time and tracked. Positive identification was not possible for all compounds tracked.

Results and Discussion

Comparison of hydrodistillation and SPME analysis for the characterization of eucalyptus volatiles

The conventional method for the analysis of volatile fragrance compounds from plant material is hydrodistillation. Validation of the SPME method presented was carried out by comparison of compounds extracted by hydrodistillation and SPME. A comparison of the chromatographic profiles obtained by the two methods has shown that the major compounds were extracted by both methods. Chromatographic results (GC-flame ionization detection) are presented in Figure 1. The most obvious difference in the two extraction methods was the absence of the solvent peak from the SPME chromatogram. For compounds eluting after approximately 7 min, the two methods appeared to have equivalent sensitivities. For early eluting peaks, SPME appeared to have lower sensitivity, although this may be because of the very thin (7 μm) extraction film used on the SPME fiber. This fiber is primarily used for high partition coefficient compounds for which longer extraction times are required, but overloading of the column would be a problem with thicker films. Thicker film fibers are typically used for low partition coefficient com-

pounds in which sensitivity is more of a concern. If early eluting compounds are of primary concern, a thicker film fiber would be more appropriate.

Setup of automated SPME analysis

The autosampler used in this study was highly flexible and the setup was user-determined. Because of this, the configuration of this unit for general fragrance analysis was not trivial. Details of the different components that were evaluated are included in order to assist others in developing similar methods. The SPME-configured CombiPAL setup used in these experiments is shown in Figure 2. CombiPAL programming was performed using the hand-held unit mounted on the left side of the autosampler. This was sufficient for the straightforward extractions performed for these analyses. For more-complex extractions, computer control of the CombiPAL and additional programming flexibility were provided by Cycle Composer software. For extractions and injections, the SPME fiber was mounted in the robotic head unit, which also performed sample transport. Samples in 10-mL vials were loaded on the temperature-controlled sample tray (30°C) mounted to the autosampler. The unit used was similar to the one shown in Figure 2 but with shorter arms. For volatile analysis a larger headspace is often required, and this can be accommodated with 20-mL vials using a tray holder with longer arms because it is important that vial tops are aligned below the position of the head unit. For thermally labile analytes in 20-mL vials, it was found that the Peltier cooled tray shown was more appropriate. It should be noted that the extension on the top of the sample tray allowed for the cooling of the entire vial. This item and the longer arms for the Peltier cooled tray had to be obtained by custom order. The sample trays were constructed of solid alu-

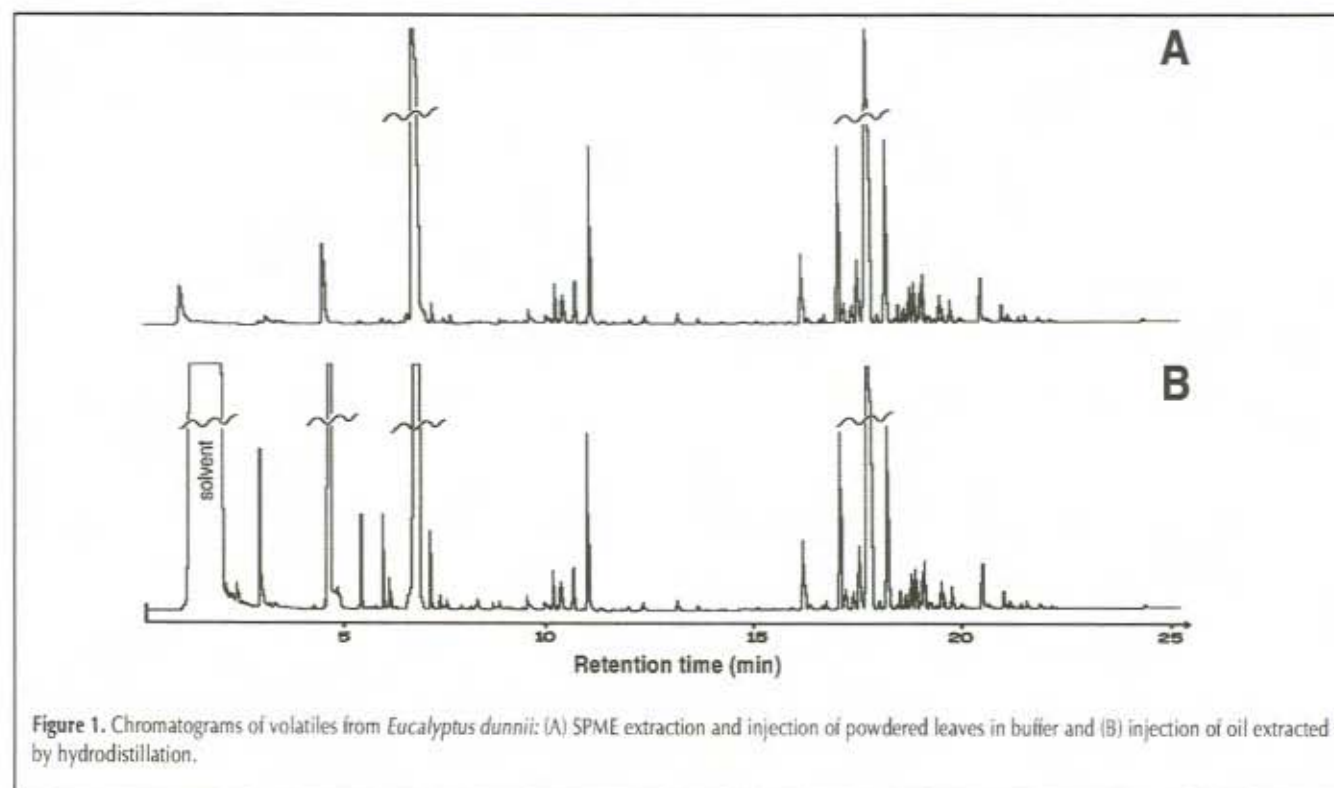


Figure 1. Chromatograms of volatiles from *Eucalyptus dunnii*: (A) SPME extraction and injection of powdered leaves in buffer and (B) injection of oil extracted by hydrodistillation.

minimum to further facilitate efficient cooling. Temperature control and sample agitation during extraction were performed in the agitation unit. Vials were transported between the sample trays and the agitation/thermal control unit by means of a magnetic holder on the robotic head and metal crimp seal caps. For volatile fragrance analysis, it is imperative that the crimp seal caps are sealed as tightly as possible. The two vial sizes and two SPME fiber assemblies (it should be noted that the springs are absent) are also shown in Figure 2. Injections were performed immediately after the extraction had completed, after which the robotic head moved the sample vial back to the sample tray and extraction of the next sample was initiated.

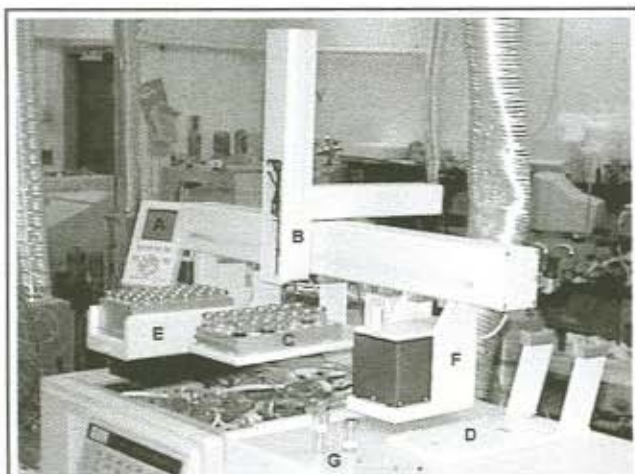


Figure 2. Setup of the CombiPAL autosampler for SPME extraction and injection of eucalyptus volatiles: (A) hand-held programming unit, (B) robotic head unit, (C) 10-mL vial tray at room temperature, (D) tray holder for 20-mL vials, (E) Peltier cooled tray holder, (F) extraction temperature control and agitation unit, (G) 10-mL and 20-mL extraction vials for volatiles and two SPME fiber assemblies (it should be noted that springs are absent).

Evaluation of the method

For chemometric analysis, the reproducibility of peak areas and retention times as well as reduction or elimination of carryover are essential. These parameters have been assessed for the method developed and will be discussed in greater detail.

Analysis of carryover and fiber bleed

With the 7- μm fiber extraction regime, sensitivity was optimized for a broad range of analytes, and carryover was minimal (within experimental error) primarily because of the long desorption time. Bleed from the fiber was observed however, and several fiber 'bleed' peaks were detected in the total ion chromatograms (as shown in Figures 3 and 4B). Although these peaks were typically small, a shorter desorption time would address the issue of bleed peaks and possibly extend fiber life.

CTC Analytics has recently introduced a fiber desorption unit for this autosampler; therefore, fiber carryover may now be eliminated in some applications by off-line thermal conditioning. This may also help to reduce the appearance of fiber bleed peaks in the traces. This unit was not available during the experiments described, but in our subsequent evaluations it has proven useful for reducing or eliminating carryover, depending on the nature of the analytes and the specific fiber used. We have not evaluated its impact on fiber bleed.

In order to analyze the impact of a shorter desorption time on carryover and bleed peaks, an alternate extraction regime was tested using a thicker phase fiber (30- μm PDMS) and shorter extraction and desorption times. With this regime, carryover was not significant and bleed peaks were minimal as compared with the extraction with the 7- μm fiber (data not shown). Sensitivity for some of the larger sesquiterpenes appeared lower; however, because the samples for these experiments were different (chopped fresh leaves in air rather than powdered, meshed leaves in buffer), a direct comparison of

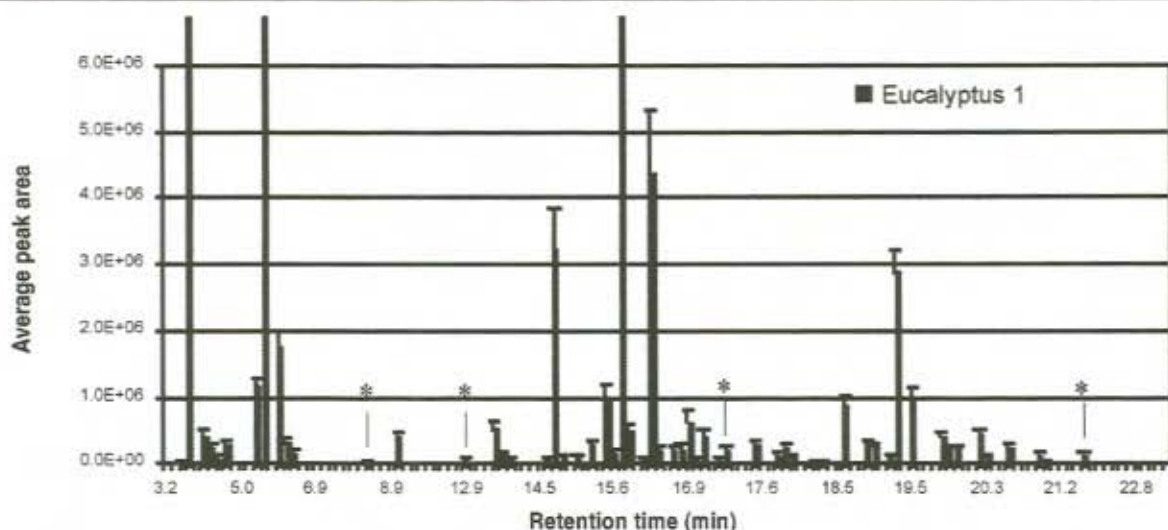


Figure 3. Histogram of average peak areas from seven replicate extractions of *Eucalyptus dunnii* 1. All chromatograms were searched for the presence of 136 compounds. The x-axis indicates peak retention time, but because of the histogram format each peak was assigned equal width thus the x-axis scale is not linear. Four bleed peaks were identified in most chromatograms, and these are indicated on the figure by asterisks. Bars for α -pinene (3.5 min), eucalyptol-limonene (5.3 min), and aromadendrene (15.7 min) are off-scale in order to enable visualization of the smaller peaks.

peak heights may not be valid. It appeared however that the proportions of different compounds between the two traces were different in that the chromatogram from the 7- μm fiber indicated that the sesquiterpenes were present in a larger proportion. Although the impact of the different sampling methods could not be ruled out as a cause of this discrepancy, it was not unexpected because the 7- μm extraction was performed at equilibrium conditions for all compounds (therefore, the overall extraction of the higher partition coefficient compounds was expected to be higher).

Reproducibility of peak areas

Peak areas for 19 compounds were recorded for seven replicate SPME injections of powdered *Eucalyptus dunnii*. Peak-area averages and standard deviations were calculated and are presented in Table I. The rows in Table I are arranged in order of peak area, but no correlation between the peak area and peak-area standard deviation was observed. Thus, there was not a systematic integration error producing a larger relative standard deviation (RSD) for smaller peak areas. Histograms of the average chromatographic results for seven replicate injections of four of the 12 eucalyptuses tested are also presented in Figure 4. Peak-area standard deviations are shown as vertical error bars in Figure 4. Peak-area precisions for the other eucalyptuses were similar to those shown in Table I, with most compounds producing an RSD percentage of less than 20%. This is considered acceptable for a biological samples analysis.

Peak areas were tracked for 20 of the major compounds in the *Eucalyptus dunnii* chromatogram using the simplified regime (chopped leaves rather than leaf powder, a thicker phase fiber, and shorter extraction and desorption times). In separate analyses of seven different leaves from one tree, peak-area standard deviation was observed to be much larger for the simplified regime than for the powdered leaf regime. In the simplified regime, the RSD percentage varied in the range of 3% to 140% with a median RSD percentage of 27% (data not shown). As is seen in Table I, for the powdered leaf regime the RSD percentage varied in the range of 3% to 30% with a median of 14%. Clearly, the simplified regime had the advantages of simplicity, minimal carryover, and fiber bleed and would be useful for a quick survey of

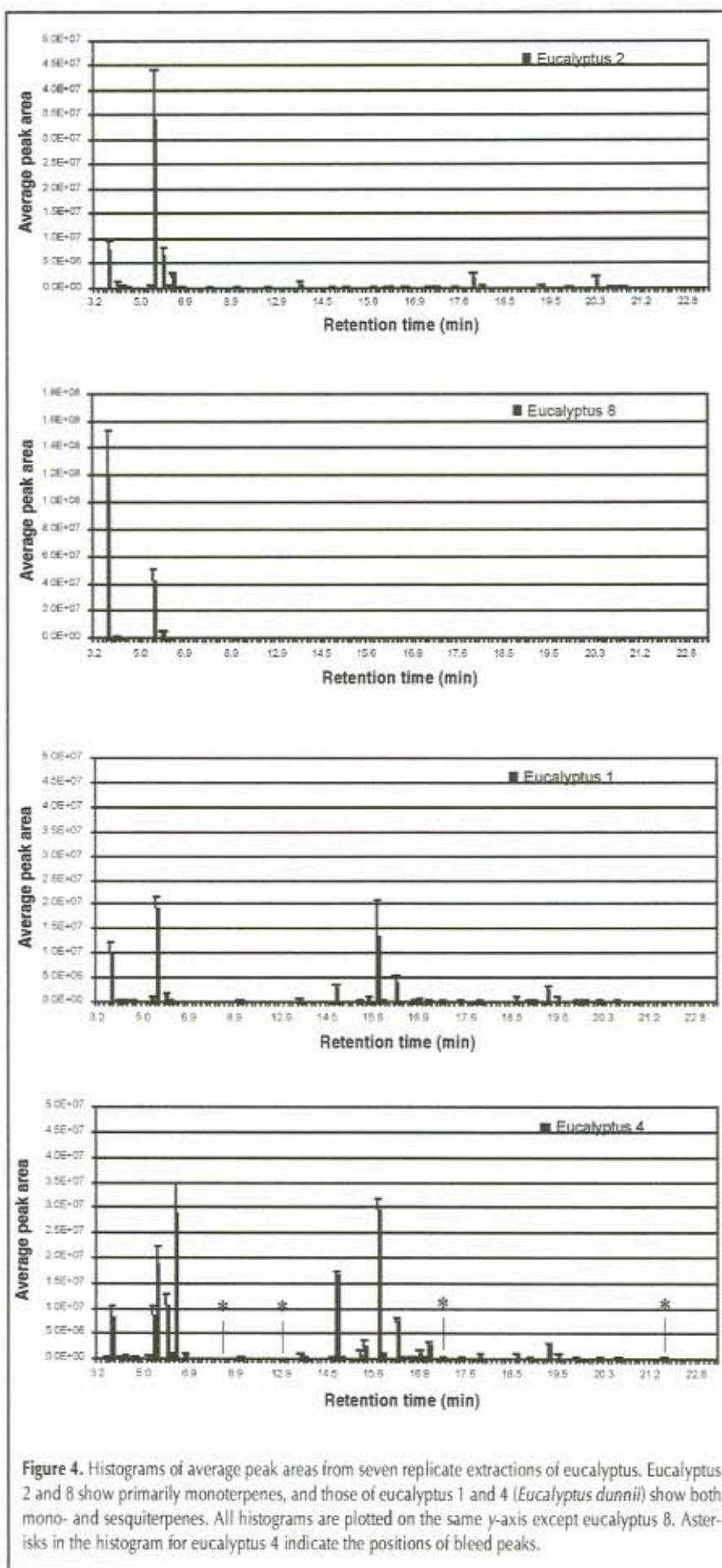


Figure 4. Histograms of average peak areas from seven replicate extractions of eucalyptus. Eucalyptus 2 and 8 show primarily monoterpenes, and those of eucalyptus 1 and 4 (*Eucalyptus dunnii*) show both mono- and sesquiterpenes. All histograms are plotted on the same y-axis except eucalyptus 8. Asterisks in the histogram for eucalyptus 4 indicate the positions of bleed peaks.

Table I. Average Peak Areas and RSD Percentage for Seven Replicate Extractions of 19 Compounds Extracted from *Eucalyptus dunnii* (Leaf Powder)*

Retention time (min)	Average peak area	% RSD
16.21	262,387	13.7
15.16	277,751	10.4
20.62	306,887	8.5
18.00	350,607	20.4
20.80	362,616	16.9
14.92	394,366	9.2
4.25	428,861	15.1
5.68	464,422	20.6
20.87	523,026	2.7
19.26	565,971	8.5
4.49	710,223	28.0
14.04	1,001,559	19.0
20.29	1,684,669	11.4
17.79	3,840,704	11.5
5.27	9,233,150	29.7
13.37	11,826,351	13.9
3.54	14,095,345	25.2
5.46	15,046,217	18.8
5.34	27,627,439	14.0

* The magnitude and range of errors shown are representative of those seen for all 136 compounds and 12 eucalyptuses. The data are arranged in order of peak area to demonstrate that there is no systematic skewing of standard deviations with peak area.

Table II. Average Retention Times, Ranges, Standard Deviations, and RSD Percentages for Seven Replicate Extractions of 19 Compounds from *Eucalyptus dunnii* (Leaf Powder)*

Average retention time (min)	Range (min)	Standard deviation (s)	% RSD
3.54	3.52–3.58	1.24	0.59
4.25	4.24–4.29	1.18	0.46
4.49	4.47–4.52	1.05	0.39
5.27	5.26–5.31	1.12	0.35
5.34	5.32–5.37	0.97	0.30
5.46	5.44–5.49	1.08	0.33
5.68	5.66–5.71	1.06	0.31
13.37	13.35–13.39	0.91	0.11
14.04	14.02–14.06	0.92	0.11
14.92	14.90–14.94	0.85	0.10
15.16	15.15–15.19	0.94	0.10
16.21	16.19–16.24	0.96	0.10
17.79	17.77–17.81	1.00	0.09
18.00	17.98–18.03	1.10	0.10
19.26	19.25–19.29	0.96	0.08
20.29	20.27–20.32	0.92	0.08
20.62	20.61–20.65	0.92	0.07
20.80	20.78–20.83	1.00	0.08
20.87	20.85–20.89	0.95	0.08

* These data were obtained early in the method development, and the retention time standard deviations for the analysis of the 12 eucalyptuses were slightly better (< 1.0 s).

samples. However, for acceptable chemometric data the more-rigorous sample preparation is required.

Reproducibility of retention times

Retention times for each of the 19 different compounds were recorded for seven SPME injections of powdered *Eucalyptus dunnii*. Retention time averages and standard deviations were calculated and are presented in Table II. For the seven replicate injections of the 12 eucalyptuses, the standard deviations ranged from 0.5 to 1 s, which was slightly better than for *Eucalyptus dunnii* (mostly approximately 1.0 s). This discrepancy likely occurred because the *Eucalyptus dunnii* experiments were performed early on in the method development with a less-optimal GC setup. In either case, the variation in retention times was acceptable for a chemometric analysis of the data.

Chromatographic data in support of chemometric analysis

A typical chromatogram for the analysis of *Eucalyptus* volatiles (7- μ m fiber) from *Eucalyptus dunnii* powdered leaves is shown in Figure 5 with several of the main components identified. As stated previously, a positive identification of all 136 compounds tracked was not possible.

Leaf powder was analyzed for each of the 12 eucalyptus trees with seven replicate samples analyzed for each plant. The averaged peak areas are shown in Figure 4 as histogram plots with the retention time on the x-axis. For each eucalyptus, 136 components were analyzed. These peaks are not all evident in Figure 4, because several compounds dominate in terms of peak area. If the y-axis is expanded, the additional compounds may be observed (shown in Figure 3). The error bars represent one standard deviation calculated for the peak areas. Data for only four of the 12 eucalyptus trees are shown because of space limitations. This set of 12 trees was chosen because of the variety of its pulp and paper properties, which includes eucalyptus trees that are considered good, average, and poor for pulp production. From the analysis of the 12 eucalyptus trees, it was noted that plants fell into two broad categories, those with both mono- and sesquiterpenes (*Eucalyptus dunnii*) and those with the predominantly earlier-eluting monoterpenes (other eucalyptuses). As can be seen in Figure 4, *Eucalyptus dunnii* (1 and 4) have both mono- and sesquiterpenes, and eucalyptus 2 and 8 have predominantly monoterpenes. It is known that pulp properties vary even between two individuals of the same species (e.g., *Eucalyptus dunnii*), thus it was important to note the difference in the volatile profiles for this species (seen in Figure 4B). For Eucalyptus 2 and 8, α -pinene and eucalyptol dominated the histogram (the difference in the y-axis scale should be noted). Even when the y-axis was expanded, sesquiterpene peaks were quite minimal (data not shown).

Conclusion

The automation of SPME extraction for eucalyptus volatiles has been demonstrated with sufficient precision in order to allow for meaningful chemometric analysis of volatile variations between different plants. While 136 com-

pounds were monitored for each of the plants tested, it was observed that the differences in the chromatographic profiles between the different plants were significant enough that the monitoring of all these compounds may not be necessary. A statistical evaluation of the data is underway and a full description of the chemometric analysis will appear in a separate publication.

Acknowledgments

This work was funded by NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council) (Ottawa, ON, Canada), Canada, Varian Associates, and Restek Corporation (Bellefonte, PA). The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Brasília, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (São Paulo, Brazil) for scholarships to C.A. Zini and financial support for the project, respectively. We also thank Riocell S.A. for providing the eucalyptus trees.

References

1. J. Kesselmeier and M. Staudt. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *J. Atmos. Chem.* **33**(1): 23–88 (1999).
2. A.B. Guenter, C.N. Hewitt, D. Erikson, R. Fall, C. Geron, T. Graedel, P. Harley, L. Klinger, M. Lerdau, W.A. McKay, T. Pierce, B. Scholes, R. Steinbrucher, R. Tallamraju, J. Taylor, and P. Zimmerman. A global model of natural volatile organic compound emissions. *J. Geophys. Res.* **100**: 8873–92 (1995).
3. J.T. Knudsen, L. Tollsten, and L.G. Bergström. Floral scents: a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochem.* **33**: 253–80 (1993).
4. J.H. Langenheim. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* **20**(6): 1223–80 (1994).
5. N. Dudareva and E. Picherski. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol.* **122**: 627–34 (2000).

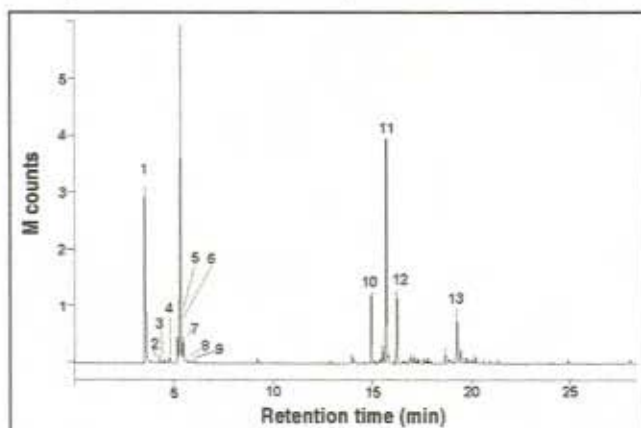


Figure 5. Typical chromatogram for the analysis of volatiles from *Eucalyptus dunnii*: 1: α -pinene, 2: β -pinene, 3: β -myrcene, 4: α -phellandrene, 5: limonene, 6: eucalyptol, 7: β -cis-*o*-cimene, 8: β -trans-*o*-cimene, 9: γ -terpinene, 10: α -gurjunene, 11: aromadendrene, 12: *allo*-aromadendrene, 13: and globulol, 13.

6. J. Takabayashi, M. Dicke, and M.A. Posthumus. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: variation caused by biotic and abiotic factors. *J. Chem. Ecol.* **20**(6): 1329–54 (1994).
7. J. Gershenzon and R. Croteau. In *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. G. Rosenthal and M. Berenbaum, Eds. Academic Press, San Diego, CA, 1991, Vol. 1, pp. 165–219.
8. L. Tollsten and G. Bergström. Headspace volatiles of whole plants and macerated plant parts of *Brassica* and *Sinapis*. *Phytochem.* **27**(12): 4013–18 (1988).
9. A. Orav, T. Kailas, and M. Liiv. Analysis of terpenoid composition of conifer needle oils by steam distillation/extraction, gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. *Chromatographia* **43**(3/4): 215–19 (1996).
10. B. Hawthorne, M.-L. Riekkola, K. Serenius, Y. Holm, R. Hiltunen, and K. Hartonen. Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. *J. Chromatogr.* **634**(2): 297–308 (1993).
11. H.F. Linskens and J.F. Jackson. "Essential Oils and Waxes". In *Modern Methods of Plant Analysis*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1991, Vol. 12, p 196.
12. H. Vuorela, R. Hiltunen, J. Pohjola, and I. Laakso. In *Progress in Essential Oil Research — Proceedings of the International Symposium on Essential Oils*. E.-J. Brunke and W. de Gruyter, Eds. 1985, p 551.
13. S.S. Chen and M. Spiro. Study of microwave extraction of essential oil constituents from plant materials. *J. Microwave Power Electromag. Ener.* **29**: 231–41 (1994).
14. G. Pauly, M. Gleizes, and B. Dagan. Identification des constituants de l'essence des aiguilles de *Pinus pinaster*. *Phytochemistry* **12**: 1395–98 (1973).
15. J. Rohloff. Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha x piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 3782–86 (1999).
16. C. Bicchì, S. Drigo, and P. Rubbiolo. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *J. Chromatogr. A* **892**: 469–85 (2000).
17. C.L. Arthur and J. Pawliszyn. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **62**: 2145–48 (1990).
18. G. Theodoridis, E.H.M. Koster, and G.J. de Jong. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B* **745**: 49–82 (2000).
19. C.A. Zini, F. Augusto, E. Christensen, B.P. Smith, E.B. Caramão, and J. Pawliszyn. Monitoring biogenic volatile compounds emitted by *Eucalyptus citriodora* using SPME. *Anal. Chem.* **73**(19): 4729–35 (2001).
20. M.G. Wirthensohn, M. Sedgley, and G.P. Jones. Epicuticular wax of juvenile *Eucalyptus* leaves and headspace analysis of leaf volatiles. *J. Essent. Oil Res.* **12**(4): 401–11 (2000).
21. J.A. Field, G. Nickerson, D.D. James, and C. Heider. Determination of essential oils in hops by headspace solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1768–72 (1996).
22. B. Schäfer, P. Hennig, and W. Engewald. Analysis of monoterpenes from conifer needles using solid phase microextraction. *J. High Resolut. Chromatogr.* **18**(9): 587–92 (1995).
23. T.J. Betts. Solid phase microextraction of volatile constituents from individual fresh *Eucalyptus* leaves of three species. *Planta Medica* **66**: 193–94 (2000).
24. C.A. Zini, F. Augusto, E. Christensen, T. Assis, C. Dariva, E. Caramão, and J. Pawliszyn. "Application of SPME to Essential Oils of *Eucalyptus*". Presented at the 24th International Symposium on Capillary Chromatography & Electrophoresis, Las Vegas, NV, May 20–24, 2001.
25. E. Guenther. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand Company Inc., Princeton, NJ, 1960, Vol. 4, p 437.

Manuscript accepted November 6, 2001.