

Estudo exploratório de coleta e análise de compostos orgânicos voláteis de flores de soja

MAGALHÃES, S.P.¹; COTRIM, G.S.²; AQUINO, M.³; NUNES, E.O.³; NIXDORF, S.L.⁴; HOFFMANN-CAMPO, C.B.³

¹Universidade Estadual de Londrina-UEL, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, suelen.magga@gmail.com; ²Centro Universitário Filadélfia-UNIFIL, Bolsista I.C.; ³Laboratório de Ecologia Química, Embrapa Soja, ⁴Departamento de Química, UEL

Introdução

A soja representa a principal oleaginosa produzida e consumida ao nível mundial. Atualmente, essa cultura vem sendo amplamente cultivada em função do desenvolvimento expressivo de *commodities* agrícolas (SILVA et al., 2011). A planta de soja é considerada autógama e cleistogâmica, ou seja, realiza a autopolinização. Contudo, a polinização cruzada na cultura também pode ocorrer e, neste caso, é mediada pelos polinizadores, em especial as abelhas, destacando-se a espécie *Apis mellifera* frequentemente encontrada visitando flores de soja (GAZZONI, 2017).

As flores necessitam atrair os visitantes florais, polinizadores, para que o processo de polinização aconteça e, para que ocorra à interação, os

sinais enviados pelas plantas devem ser reconhecidos pelos animais (CHITTKA et al., 2006). A maioria das flores polinizadas por animais utiliza o néctar e o pólen como o principal recurso para atrair o visitante (WESTERKAMP, 1996). Estudos realizados por Klein et al. (2007) descreveram que 87,5% plantas dependem da polinização e, destas, 75% são culturas agrícolas, sendo as abelhas reconhecidas como os principais agentes polinizadores (OLLERTON et al., 2011).

Os compostos orgânicos voláteis (COV's) presentes em plantas são intensamente encontrados na natureza, em geral, apresentando baixo peso molecular (< 300 Da), peculiaridade que lhes permite a rápida volatilização e a liberação por praticamente todos os tecidos vegetais (DUDAREVA et al., 2008). São uma mistura complexa de moléculas originárias de diversas rotas bioquímicas do metabolismo secundário, como fenilpropanoides, ácidos graxos, isoprenoides, compostos nitrogenados e de cadeia cíclica (KNUDSEN et al., 2006).

A composição química dos voláteis emitidos pelas plantas e sua intensidade, estão intimamente relacionadas à sua condição fisiológica, como também, aos processos de defesa do vegetal contra fitófagos e/ou patógeno, sendo ainda responsáveis pela atração de polinizadores (PICHERSKY et al., 2002). Muitas espécies de plantas sintetizam diversos compostos orgânicos voláteis nos tecidos florais e frutos, os quais atraem polinizadores e dispersores de sementes, sendo este processo responsável pelo sucesso evolutivo das fanerógamas (RIFFEL et al., 2015).

Os polinizadores podem ser atraídos pelos COV's distribuídos pelas flores, como também pela coloração do conjunto floral. Riffel et al. (2015) descrevem que os polinizadores encontram suas plantas hospedeiras com maior eficiência, quando combinam os sinais químicos olfativos com os estímulos visuais. As pétalas detêm células epidérmicas papilhosas, no qual frequentemente estão associadas ao aumento da superfície de emissão dos COV's, absorção e reflexão da luz, no qual interferem na intensidade de suas cores e brilho (ENDRESS, 1996). Dentre diversos exemplos desse processo, temos como exemplo o

cambuci (*Campomanesia phae*). Essa árvore frutífera nativa do bioma Mata Atlântica emite voláteis noturnos com função atrativa de espécies de abelhas com hábitos crepusculares, como *Megalopta* sp. No estudo realizado por Cordeiro (2015), observou-se que 1-octanol é o principal responsável pela interação planta-polinizador.

Knudsen et al. (2006), utilizando a técnica de captura *headspace*, apresentaram uma lista de 1719 compostos químicos o que evidencia a complexidade de moléculas envolvidas nas flores. A técnica utilizada pelos autores consistiu em fixar os COV's liberados pelas flores em um determinado adsorvente, como carvão ativado ou resinas e, posteriormente, analisá-las por meio de técnicas cromatográficas.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo exploratório sobre o desenvolvimento de técnicas de coleta e análise de compostos orgânicos voláteis emitidos por flores de soja, que poderá propiciar o entendimento do complexo sistema de interações entre a planta de soja e os polinizadores.

Material e Métodos

Obtenção e preparo das amostras

Para o preparo do material de adsorção, cartuchos tipo seringa preenchidos com o adsorvente Carboxen 569 (20-45 mesh) foram lavados, utilizando-se 5 mL de hexano e 5 mL de éter etílico bidestilado. Em sequência, os cartuchos foram colocados para secagem a vácuo por um período de 24 horas. Após a secagem, os cartuchos foram mantidos em estufa a 60°C durante 4 horas em fluxo de nitrogênio.

Coleta dos COV'S

No processo de coleta foram selecionadas em casa-de-vegetação, a cultivar TMG 7262 RR (*Glycine max*) e a PI 595817 (*Glycine falcata*) no estágio reprodutivo e por apresentarem maior quantidade de flores. Essas foram isoladas com placas de Petri (acrílico) com entrada e saída, respeitando as ramificações da soja. Foram colocados cartuchos Carboxen 569 (20-45 mesh) na entrada (filtração do ar) e saída (sequestro

e concentração dos COV's), mantidos por 45, 90 e 135 min, sendo então retirados. Placas de Petri sem plantas foram mantidas por 135 min e consideradas como branco. Para a coleta de COV's foi acoplada, ao cartucho de saída, uma bomba de vácuo portátil ECO *Vacuum Sealer* com vazão de 480 mL min^{-1} , o tempo de coleta foi de apenas 30 segundos para cada tomada de amostra.

Ao final, os cartuchos foram removidos e envolvidos em *Parafilm*, devidamente identificados e armazenados em caixa térmica sob refrigeração. Os cartuchos foram enviados para o Laboratório de Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE, para análise cromatográfica das amostras.

Análise por cromatografia gasosa

As amostras eluídas em solvente hexano foram analisadas no cromatógrafo a gás Modelo 7890B GC System, Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Espanha, acoplado ao espectrômetro de massa Modelo 5977A MSD Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Espanha. Os compostos foram separados utilizando uma coluna capilar DB 5MS (30 m x $250 \mu\text{m}$ x $0,25 \mu\text{m}$), Agilent J&W GC Columns, Santa Clara, CA, EUA.

As amostras foram injetadas no modo *splitless* e o gás de arraste foi o Hélio com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura do injetor foi de 240°C e a temperatura de transição GC de 280°C . Foi utilizada a seguinte programação: temperatura inicial de 4 min a 40°C , elevando para 80°C a uma taxa de $2,5^\circ\text{C min}^{-1}$, em seguida, 110°C a uma taxa de 5°C min^{-1} , com posterior aumento para 220°C a uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, sendo mantida nessa temperatura até o fim da corrida que totalizou um tempo de 45 min. Os espectros de massa foram obtidos utilizando um sistema de analisador quadrupolar com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massa com os espectros de padrões contidos na biblioteca NIST 2.0 do *National Institute of Standards and Technology* (NIST 2012), Gaithersburg, Md, EUA.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os COV's detectados nas flores de soja, sequestrados por Carboxen 569 (20-45 mesh) através da técnica *headspace* dinâmico, por meio de uma análise cromatográfica gasosa acoplada ao espectrômetro de massa de alta resolução. De maneira geral, as amostras que apresentaram maiores quantidades de COV's foram as de TMG 7262 RR, nos tempos de 45 e 90 min; as amostras coletadas de PI 595817 apresentaram perfil cromatográfico similar ao branco.

Os compostos do grupo dos alcanos lineares, heptacosane e hexacosane, foram detectadas nas amostras de flores de soja TMG 7262 RR de 90 min (Tabela 1). Esses compostos voláteis também ocorrem em flores de girassol-mexicano *Tithonia diversifolia* (MORONKOLA et al., 2007) e em cardo-estrelado *Centaurea calcitrapa* (SENATORE et al., 2006), ambas pertencentes à família botânica Asteracea.

O ethylbenzene foi detectado em uma amostras da cultivar de soja TMG 7262 RR aos 90 min. Esse hidrocarboneto monoaromático é um dos principais compostos emitidos na queima de combustíveis fósseis, podendo ainda ser detectado, por meio de *headspace* estático e análise por GC-FID, em solos e água de atmosferas contaminadas por derivados de petróleo (MELQUIADES et al., 2006). Entretanto, não foi possível determinar a sua origem em nossa amostra.

Os resultados indicam que a substância mais abundante identificada nas coletas foi o estragole (Figura 1, Tabela 1). Esse composto orgânico natural também conhecido como metilchavicol, pertencente ao grupo dos terpenoides e amplamente utilizado na produção de fragrâncias. Essa substância tem sido considerada majoritária em óleos essenciais de folhas de alfavaca-anis (*Ocimum selloi*) (COSTA, 2010), bem como, em extratos de folhas de manjerição (*Ocimum basilicum*) (LEE et al., 2005).

Em flores de soja PI 595817 foi detectado 1s,4R,7R,11R-1,3,4,7-Tetramethyltricyclo[5.3.1.0(4,11)] undec-2-en-8-one, nas análises

realizadas no tempo de 90 min. Esse composto foi também identificado entre os 48 COV's obtidos pela técnica de *headspace*, em amostras de óleos vegetais extraídos de sementes de *Boerhavia elegans* (Al-farga et al., 2015).

Nesta pesquisa foram avaliados voláteis das flores de soja, ao nosso juízo, poucos compostos foram detectados por cromatografia gasosa, possivelmente, em função da inadequação do método de coleta, desde a utilização da bomba a vácuo até o de *headspace*. Estudos comprovam a ocorrência de emissão de voláteis após herbivoria por insetos em folhas (MEAGHER et al, 2010) e em vagens de soja (MICHEREFF et al., 2011). Entretanto, até o momento não foi encontrado na literatura relatos de estudos de voláteis em flores de soja. Além disso, nenhum dos COV's descritos na literatura encontrados em plantas da soja, foram detectados através do método empregado na coleta de voláteis de flores de soja, possivelmente, por serem relacionados ao sistema de defesa e estudos de indução. Dessa forma, as substâncias encontradas (Tabela 1) deverão ser investigadas mais intensamente, além disso, os parâmetros de coleta devem ser mais bem estudados e definidos para aperfeiçoamento do processo, considerando o tamanho diminuto, a morfologia da flor de soja e as dificuldades advindas destas características.

Conclusão

Pesquisas adicionais já estão sendo realizadas para ampliar o número e concentração de COV's detectados em flores de soja, considerando a dificuldade e os fatores que influenciam na coleta, observados no decorrer dos ensaios. Assim, para o estudo de voláteis em flores de soja, necessita-se do aprimoramento de técnicas de *headspace* e a utilização de outras técnicas, como fluxo de ar e a realização de testes com diferentes tipos de adsorventes e eluentes.

Referências

- AL-FARGA, A.; ZHANG, H.; SIDDEEG, A; CHAMBA, M. V. M.; NABIL, Q. A. Physicochemical properties, phenolic acids and volatile compounds of oil extracted from dry alhydwan (*Boerhavia elegana* Choisy) seeds. **Grasas y Aceites**, v. 66, n. 3, p. 90, 2015.
- CHITTKA, L.; RAINE, N. E. Recognition of flowers by pollinators. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 4, p. 428-435, 2006.
- CORDEIRO, G. D. **Fenologia reprodutiva, polinização e voláteis florais do Cambuci (*Campomanesia phae* (O. Berg) Landrun 1984 – Myrtaceae)**. 2015. 89 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- COSTA, L. C. D. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; GUIMARÃES, R. M. Qualidade fisiológica de sementes de *Ocimum selloi benth* sob condições de luz, temperatura e tempo de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 675-680, maio 2010.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 181-189, 2008.
- ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 582 p.
- GAZZONI, D. L. **Soja e abelhas**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 151 p.
- KLEIN, A. M.; VAISSIERE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences**, v. 274, p. 303-313, 2007.
- KNUDSEN, J. T.; ERIKSSON, R.; GERSHENZON, J.; STAHL, B. Diversity and distribution of floral scent. **The Botanical Review**, v. 72, n. 1, p. 1-120, 2006.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

MEAGHER, R. L.; LANDOLT, P.J. Binary floral lure attractive to velvetbean caterpillar adults (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 93, n. 1, p. 73-79, 2010.

MELQUIADES, R. A.; LOBO, I.; GUEDES, C. L. B.; PINTO, J. P. Análise de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em solos por headspace e cromatografia gasosa/detector de ionização de chama. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 27, n. 2, p. 113-120, 2006.

MICHEREFF, M. F. F.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M.; MICHEREFF-FILHO, M.; DINIZ, I. R.; NETO, A. L. F.; MORAES, M. C. B. Volatiles mediating a plant herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 3, p. 273-285, 2011.

MORONKOLA, D. O.; OGUNWANDE, I. A.; WALKER, T. M.; SETZER, W. N.; OYEWOLE, I.O. Identification of the main volatile compounds in the leaf and flower of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 1, p. 63-66, 2007.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321-326, 2011.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.

RIFFEL, A.; COSTA, J. G. da. **Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 48 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 201).

SENATORE, F.; LANDOLFI, S.; CELIK, S.; BRUNO, M. Volatile components of *Centaurea calcitrapa* L. and *Centaurea sphaerocephala* L. ssp. *sphaerocephala*, two Asteraceae growing wild in Sicily. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 2, p. 282-285, 2006.

SILVA, A. C. da; LIMA, E. P. C.; BATISTA, H. R. A importância da soja para o agronegócio brasileiro: uma análise sob o enfoque da produção, emprego e exportação. In: ENCONTRO DE ECONOMIA CATARINENSE, 5., 2011, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UNESC, 2011.

WESTERKAMP, C. H. Pollen in bee-flower relations some considerations on melittophily. **Botanica Acta**, v. 109, n. 4, p. 325-332, 1996.

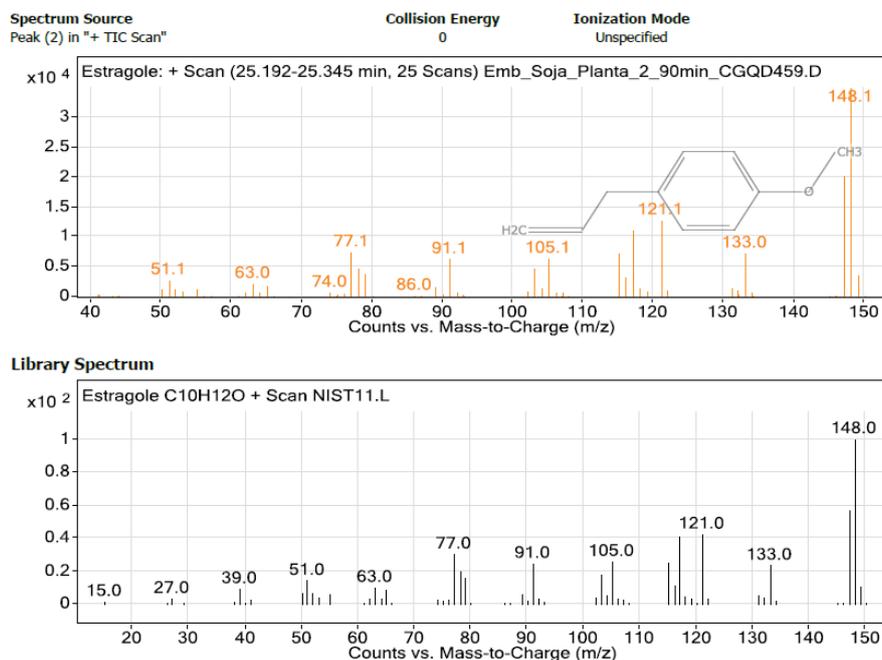


Figura 1. Espectro de massas do composto Estragole detectado em flores da cultivar TMG 7262 RR.

Tabela 1. Constituintes químicos detectados nos cromatogramas de GC-MS de flores de soja.

Substâncias	TMG 7262 RR			PI595817		
	Minuto					
	45	90	135	45	90	135
2,4-Pentanedione, ion(1-), lithium	+	ND	ND	ND	+	ND
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-4-isopropylcyclohexa-2,5-dien-1-one	+	ND	ND	ND	ND	ND
Heptacosane	+	ND	ND	ND	ND	ND
Hexacosane	+	ND	ND	ND	ND	ND
Hentriacontane	+	+	ND	ND	ND	ND
Ethylbenzene	ND	+	ND	ND	ND	ND
Estragole (Metilchavicol)	ND	+	+	ND	+	ND
Oxalic acid, butyl propyl ester	ND	ND	+	ND	ND	ND
1s,4R,7R,11R-1,3,4,7-Tetramethyltricyclo[5.3.1.0(4,11)] undec-2-en-8-one	ND	ND	ND	ND	+	ND

+ detectado à presença do composto (qualitativo) ND não detectado nas condições de trabalho estabelecidas