



UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE PESQUISAS DE PRODUTOS NATURAIS

RAFAEL FERREIRA DA SILVA

Cheire as flores antes que sejam polinizadas: a química do odor floral de *Temnadenia odorifera*, uma espécie da Mata Atlântica brasileira.

RIO DE JANEIRO

2018



UFRJ

Cheire as flores antes que sejam polinizadas: a química do odor floral de *Temnadenia odorifera*, uma espécie da Mata Atlântica brasileira.

Rafael Ferreira da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Química de Produtos Naturais).

Orientadores:

Prof. Dr. Humberto Ribeiro Bizzo

Profa. Dra. Claudia Moraes de Rezende

RIO DE JANEIRO

Novembro de 2018



UFRJ

Instituto DE PESQUISAS DE PRODUTOS NATURAIS
Bloco H, CCS, 21941-902, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ.
Tel./Fax (021) 2562-6791 / 2562-6512 e-mail: posgrad@nppn.ufrj.br



“Cheire as flores antes que sejam polinizadas: a química do odor floral de *Temnadenia odorifera*, uma espécie da Mata Atlântica brasileira.”

Rafael Ferreira da Silva
(AUTOR)

PROF. HUMBERTO RIBEIRO BIZZO (ORIENTADOR)
PROF^a. CLAUDIA MORAES DE REZENDE (COORIENTADORA)

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós Graduação em Química de Produtos Naturais, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

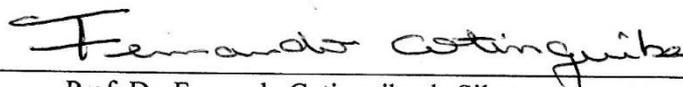
Aprovada por:



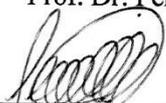
Presidente, Prof. Dr. Humberto Ribeiro Bizzo.



Prof. Dr. Roberto Carlos Campos Martins



Prof. Dr. Fernando Cotinguiba da Silva



Prof. Dr. Leandro Freitas



Prof^a. Dr^a. Thais Matsue Uekane



Prof. Dr. Leandro Maranghetti Lourenço

Rio de Janeiro
Novembro/ 2018

CIP - Catalogação na Publicação

S586c Silva, Rafael Ferreira da
Cheire as flores antes que sejam polinizadas: a química do odor floral de *Temnadenia odorifera*, uma espécie da Mata Atlântica brasileira. / Rafael Ferreira da Silva. -- Rio de Janeiro, 2018.
138 f.

Orientador: Humberto Ribeiro Bizzo.
Coorientadora: Claudia Moraes de Rezende.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, 2018.

1. Compostos Orgânicos Voláteis. 2. Aeração. 3. Euglossini. 4. Ecologia Química. I. Bizzo, Humberto Ribeiro, orient. II. Rezende, Claudia Moraes de, coorient. III. Título.

À minha querida família.

Ao meu pai, Francisco Ferreira da Silva (in memorian) – homem que enfrentou a vida com a coragem e a bravura que ela exigiu.

À minha mãe, Josefa Barbosa da Silva – mulher que soube me ensinar o significado da paciência, da resiliência e do amor incondicional sem dizer nenhuma palavra sequer;

Às minhas irmãs e irmãos, Simone, Adriana, Maria, Adeilton, Adriano e Roberto – não há nada melhor na vida do que o companheirismo.

Em especial à minha irmã Teônia (in memorian) – que sempre me fazia lembrar que eu poderia voltar para casa se algo desse errado. Sinto saudades dos telefonemas. Por você e para você!

Ao Leonardo dos Santos Pereira – não chegaria ao fim sem sua ajuda e apoio incondicionais.

Agradecimentos

Aprendi desde cedo a ser grato pelas menores coisas porque são delas que se fazem as maiores. Tive a alegria e a sorte de encontrar durante a jornada pessoas sempre muito dispostas e generosas, sem as quais dificilmente conseguiria finalizar este trabalho.

Sou muito grato a Leonardo dos Santos Pereira, que me apoiou em todas as horas duras e sempre soube me dar a calma necessária para enfrentar os momentos difíceis.

Sou muito grato aos meus orientadores, Humberto Ribeiro Bizzo e Claudia Moraes de Rezende – pela orientação de alto nível, pelas oportunidades de pesquisa e colaboração, pelo incentivo e confiança. Pela paciência. Aprendi muito com vocês.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Aromas (LAROMA/UFRJ) cuja cooperação e incentivo mútuos foram essenciais.

A Anna Tsukui – obrigado pela amizade, que se fortaleceu ao longo dos anos com a parceria de pesquisa, com os cafés de fim de tarde, com as risadas e as tristezas compartilhadas.

A Thais M. Uekane – pela generosidade em compartilhar sua experiência profissional e científica sem esperar nada em troca. Obrigado pela amizade, obrigado por tudo!

A Natália A. B. Tinoco – pela disposição generosa em ensinar aquilo que sabe, pela cooperação com as análises de açúcares e pela amizade, muito obrigado!

Ao Fábio Júnior Moreira Novaes – pelas reflexões de fim de tarde entremeadas com muitas análises cromatográficas e regadas com algumas xícaras de café.

A Carlos Adarme, colombiano cuja seriedade no trabalho científico, gentileza e visão de mundo crítica e generosa muito me ensinaram.

Agradeço as amigas Marcelly Santos e Paola E. Gama, da Embrapa Agroindústria de Alimentos que, desde o mestrado, se mostraram sempre tão solícitas e generosas. Muito obrigado!

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais e todo o seu corpo docente pela formação primorosa a mim concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Procurei sempre os melhores caminhos.

*Nas estradas que se abriam só há curvas onde as retas foram inteiramente
impossíveis.¹*

Graciliano Ramos

¹ Uma paráfrase ao texto do escritor alagoano Graciliano Ramos

RESUMO

O estudo do odor floral de uma espécie, bem como de seu recurso floral, tal como o néctar, é fundamental para o amplo entendimento das complexas interações planta-polinizador. Contudo, não há sistema de extração de voláteis comercial por *headspace* dinâmico (HSD) – principal técnica para o isolamento de odor floral para aplicações ecológicas. Dessa maneira, este estudo se concentrou em adaptar um sistema de extração por HSD e avaliação de sua reprodutibilidade por meio da análise da variação temporal do perfil volátil das flores da espécie *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). Além disso, o desenvolvimento de um novo dispositivo portátil para extração de voláteis vegetais por HSD em microescala (DP-HSD) e sua aplicação na análise qualitativa do odor floral da espécie *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae). Após adaptado e avaliado, o sistema HSD foi utilizado para analisar a variação temporal do perfil volátil floral da espécie *Temnadenia odorifera* (Apocynaceae) *in vivo* e sua relação com os tipos de insetos atraídos e comparação qualitativa da composição volátil entre antese e senescência. Para uma compreensão mais integrada, foram analisados também a composição química do néctar de *T. odorifera* por meio de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e validação do método cromatográfico, além de analisar a composição volátil emitida exclusivamente pelo néctar através de microextração em fase sólida (MEFS). O sistema de extração HSD adaptado mostrou-se robusto e sensível e ao ser aplicado às flores de *D. nobile* mostrou-se capaz de captar a variação temporal no perfil volátil floral desta espécie, que emitiu uma maior quantidade de voláteis nas primeiras horas da manhã, com diminuição progressiva de sua emissão ao longo do dia. A análise do odor floral de *D. nobile* resultou em 31 substâncias identificadas, dentre as quais 14 sesquiterpenos e 5 monoterpenos. Os principais constituintes de seu odor, que juntos correspondem entre 44 a 73% da emissão total, foram limoneno, (*E,E*)-farneseno, (*E*)-cariofileno e (*E*)- β -ocimeno. Este último composto é liberado em grandes quantidades pela manhã, mas sua liberação pela flor cessa completamente ao meio dia. Ao aplicar o DP-HSD à análise das flores de *E. denticulatum* foi possível identificar 31 compostos, em sua maioria aldeídos e álcoois alifáticos, tais como (*2E*, *6Z*)-nonadienal e (*2E*)-nonenol. Ao todo, 23 substâncias foram identificadas no odor floral de *T. odorifera* por HSD *in vivo*. O odor floral em período de antese foi composto, em grande parte, por substâncias aromáticas, como benzaldeído, álcool benzílico, álcool cinamílico e 2-feniletanol, sendo este último responsável por mais de 70% da composição volátil. A quantidade total de odor emitido pelas flores de *T. odorifera* variou significativamente ao longo da antese, sendo o período de 9 as 12h o de maior liberação de voláteis (10,2 $\mu\text{g/g}$ de flor seca). A análise de voláteis do néctar por MEFS revelou a presença de oito substâncias, dentre as quais 2-feniletanol, salicilato de metila, benzoato de etila e α -copaeno; tal resultado sugere que a espécie perfuma seu néctar com um propósito funcional. A análise da composição química volátil de *T. odorifera* no período de senescência revelou que as flores continuam a liberar voláteis, embora numa concentração baixa e em menor diversidade de voláteis quando comparada ao período de antese, 5 e 23 substâncias, respectivamente. A análise da composição dos açúcares do néctar mostrou que este é constituído majoritariamente de sacarose (**S**; 68,3-75,0%; 25,4 \pm 6,8 a 43,9 \pm 4,1 mg mL⁻¹), glicose (**G**; 14,1-12,4%; 5,1 \pm 1,0 a 7,3 \pm 0,85 mg mL⁻¹) e frutose (**F**; 12,6-17,6%; 6,3 \pm 1,2 a 7,3 \pm 0,85 mg mL⁻¹). A razão **S/(G+F)** em *T. odorifera* mostrou ter relação preditiva dos tipos de polinizadores que visitam esta espécie, em geral, abelhas Euglossini e borboletas em menor frequência. Em conclusão, o sistema HSD de baixo custo adaptado mostrou-se robusto e reprodutível e poderá ser utilizado em outros estudos. Além disso, diante do exposto, conclui-se que a avaliação química dos recursos e atrativos florais contribui para uma melhor compreensão dos mecanismos usados pelas espécies estudadas em suas relações ecológicas.

Palavras-chave: Compostos orgânicos voláteis. Aeração. Euglossini. Ecologia química.

ABSTRACT

The study of the floral scent of a species, as well as its floral resource, such as nectar, is fundamental to the broad understanding of the complex plant-pollinator interactions. However, there is no commercial headspace volatile extraction system (HSD) - the main technique for the isolation of floral scent for ecological applications. In this way, this study focused on adapting an HSD extraction system and evaluating its reproducibility by analyzing the temporal variation of the volatile profile of the flowers of *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). In addition, the development of a new portable device for extraction of plant volatiles by HSD in microscale (PD-HSD) and its application in the qualitative analysis of the floral scent of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae). After adaptation and evaluation, the HSD system was used to analyze the temporal variation of the volatile floral profile of the species *Temnadenia odorifera* (Apocynaceae) in vivo and its relation with the types of insects attracted and qualitative comparison of the volatile composition between anthesis and senescence. For a more integrated understanding, the chemical composition of the *T. odorifera* nectar was also analyzed by means of high performance liquid chromatography and the chromatographic method validation, as well as analyzing the volatile composition exclusively emitted by nectar through solid phase microextraction (MEFS). The adapted HSD extraction system was robust and sensitive and when applied to the flowers of *D. nobile* was able to capture the temporal variation in the floral volatile profile of this species, which emitted a greater amount of volatiles in the first hours of the morning, with progressive decrease of its emission throughout the day. The odor analysis of *D. nobile* resulted in 31 identified substances, among them 14 sesquiterpenes and 5 monoterpenes. The major constituents of its odor, which together account for 44-73% of the total emission, were limonene, (*E, E*)-pharnesene, (*E*)-cariophyllene and (*E*)- β -ocimene. The latter compound is released in large quantities in the morning, but its release by the flower ceases completely at noon. By applying PD-HSD to *E. denticulatum* flowers, it was possible to identify 31 compounds, most of them aldehydes and aliphatic alcohols, such as (*2E,6Z*)-nonadienal and (*2E*)-nonenol. In all, 23 substances were identified in floral scent of *T. odorifera* by HSD in vivo. The floral scent in the anthesis period was largely composed of aromatic substances such as benzaldehyde, benzyl alcohol, cinnamyl alcohol and 2-phenylethanol, the latter being responsible for more than 70% of the volatile composition. The total amount of odor emitted by the flowers of *T. odorifera* varied significantly throughout the anthesis, with the period from 9 to 12h being the highest volatile release (10.2 $\mu\text{g/g}$ dry flower). The analysis of volatiles of nectar by MEFS revealed the presence of eight substances, among which 2-phenylethanol, methyl salicylate, ethyl benzoate and α -copaene; this result suggests that the species perfumes its nectar with a functional purpose. The analysis of the volatile chemical composition of *T. odorifera* in the senescence period revealed that the flowers continue to release volatiles, albeit at a lower concentration and lower diversity of volatiles when compared to the anthesis period, 5 and 23 substances, respectively. The analysis of the sugar composition of the nectar showed that it consists mainly of sucrose (S, 68.3-75.0%, 25.4 ± 6.8 to 43.9 ± 4.1 mg mL⁻¹), glucose (G, 14.1-12.4%, 5.1 ± 1.0 to 7.3 ± 0.85 mg mL⁻¹) and fructose (F, 12.6-17.6%, 6.3 ± 1.2 to 7.3 ± 0.85 mg mL⁻¹). The S/(G + F) ratio in *T. odorifera* was shown to have a predictive relationship between the types of pollinators that visit this species, in general, Euglossini bees and less frequent butterflies. In conclusion, the low-cost HSD system proved to be robust and reproducible and could be used in other studies. In addition, we concluded that the chemical evaluation of the resources and floral attractiveness contributes to a better understanding of the mechanisms used by the species studied in their ecological relations.

Keywords: Volatile organic compounds (VOCs). Euglossini. Insect attraction. Chemical ecology.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	16
INTRODUÇÃO GERAL	20
1 AMOSTRAGEM DE VOLÁTEIS FLORAIS	21
1.1 Técnicas tradicionais de extração de voláteis de flores.....	22
2 O PROBLEMA DA EXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS FLORAIS POR TÉCNICAS INVASIVAS	29
3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO NÃO INVASIVOS	32
3.1 Microextração em fase sólida.....	32
3.2 <i>Headspace</i> dinâmico	34
4 REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA	43
1 A DIVERSIDADE QUÍMICA DO ODOR DE FLORES	44
2 A IMPORTÂNCIA RELATIVA DOS COMPOSTOS EM UM PERFIL VOLÁTIL PARA O ODOR.....	52
3 LOCALIZAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE VOLÁTEIS NOS ÓRGÃOS FLORAIS .	53
4 PRINCIPAIS ROTAS BIOSINTÉTICAS USADAS PELAS FLORES PARA A PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS.....	57
4.1 Terpenóides	57
4.2 Voláteis derivados de ácidos graxos	58
4.3 Fenilpropanóides/benzenóides	59
5 REFERÊNCIAS	62
OBJETIVO.....	68
OBJETIVO GERAL	69
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	69
CAPÍTULO 2: VARIAÇÃO TEMPORAL DO ODOR FLORAL DE DENDROBIUM NOBILE (ORCHIDACEAE) POR HEADSPACE DINÂMICO IN VIVO	770
1 INTRODUÇÃO	71
1.1 O cartucho adsorvente para captura de voláteis florais	71
1.2 <i>Dendrobium nobile</i> (Orchidaceae)	73
2 MATERIAIS E MÉTODOS	74
2.1 Material vegetal.....	74
2.2 Cartucho adsorvente para coleta de voláteis florais	74
2.3 Coleta de voláteis	76
2.4. Extração de volateis e cromatografia gasosa.....	78
2.5 Análise estatística	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79

4. CONCLUSÃO	85
5 REFERÊNCIAS	87

CAPÍTULO 3: ECOLOGIA QUÍMICA DO ODOR FLORAL E DA COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES DO NÉCTAR EM TEMNADENIA ODORIFERA (APOCYNACEAE)...91

1 INTRODUÇÃO	92
2 MATERIAIS E MÉTODOS	95
2.1 Material vegetal.....	95
2.2 Coleta de voláteis para análise da variação temporal da emissão de odor floral .	96
2.3 Coleta de voláteis de flores em senescência.....	97
2.4 Análise química do odor floral coletado	97
2.5 Cálculo do Fator de Resposta Relativo	98
2.6 Coleta de voláteis do néctar e análise cromatográfica (CG-EM).....	99
2.7 Identificação dos voláteis	100
2.8 Coleta do néctar.....	100
2.9 Análise de açúcares do néctar	101
2.10 Bioensaios comportamentais <i>in situ</i> com flores artificiais e o composto sintético majoritário de <i>T. odorifera</i>	101
2.11 Análise estatística	102
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.1 Composição e variação temporal do odor	102
3.2 Voláteis emitidos pelo néctar	104
3.3 Composição e concentração de açúcares do néctar.....	110
5 CONCLUSÃO	116
6 REFERÊNCIAS	117

CONSIDERAÇÕES FINAIS 124

APÊNDICE 1A – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS IDENTIFICADAS NO ODOR FLORAL DE <i>D. NOBILE</i> ^d	126
APÊNDICE 2A – CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES DO NÉCTAR E DOS VOLÁTEIS DE <i>TEMNADENIA ODORIFERA</i>	129
APÊNDICE 2B – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS IDENTIFICADAS NO ODOR FLORAL DE <i>T. ODORIFERA</i> NO PERÍODO DE ANTESE ^d	136
APÊNDICE 2C – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS IDENTIFICADAS NO NÉCTAR DAS FLORES DE <i>T. ODORIFERA</i> . ^d	138
APÊNDICE 2D – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS AÇÚCARES IDENTIFICADOS NO NÉCTAR DAS FLORES DE <i>T. ODORIFERA</i> COLETADAS NO PERÍODO DE ANTESE.	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Manacá - Tarsila do Amaral (1927)	16
Figura 2 Flores - Candido Portinari (1941)	20
Figura 3 Isolamento e concentração de voláteis de folha de pinho. Fonte: adaptado de Xu et al. (2005).....	23
Figura 4 - OE em evidência na parte superior de um tubo de separação do aparato tipo Clevenger. Foto: Dijalma Barbosa da Silva.	26
Figura 5 - Aparato tradicionalmente utilizado em hidrodestilação. A) Diagrama do aparato indicado pela Farmacopéia Européia (RUBIOLO et al., 2010); B). Diagrama original do aparato desenvolvido por Clevenger (1928), no qual é baseado o aparato tradicional; C) Aparato tipo Clevenger em operação. Foto: arquivo do autor	26
Figura 6 - Aparato para extração por destilação simultânea do tipo Likens-Nickerson. Fonte: Adaptado de Augusto, Lopes e Zini (2003)	28
Figura 7 - Perfil cromatográfico de uma folha de batata intacta (esquerda) e mecanicamente danificada (direita). (1) Hexanal, (2) (Z)-3-hexenal, (3) (E)-2-hexenal, (4) hexan-1-ol, (5) (Z)-3-hexen-1-ol, (6) (Z)-2-penten-1-ol, (7) (E)-2-hexen-1-ol, (8) β -cariofileno. Fonte: Agelopoulos et al. (1999)	31
Figura 8 Perfil cromatográfico (CG-EM) de folhas de <i>Xanthoxylum piperitum</i> . Modificado de Jiang e Kubota (2001 apud AUGUSTO, LOPES e ZINI 2003).....	31
Figura 9 - Isolamento de voláteis de flor de <i>Petunia hybrida</i> por MEFS in vivo. Fonte: VERDONK et al. (2003)	33
Figura 10 - Voláteis de <i>Pachira insignis</i> sendo amostrada por HSD em expedição liderada pelo químico Roman Kaiser, da empresa Givaudan. Fonte: KAISER; KRAFT (2001); KAISER (2000)	35
Figura 11 - Exemplos de sistema de coleta de voláteis por HSD. Fonte: THOLL et al. (2006).	36
Figura 12. Cândido Portinari, Vaso de Flores (1942).....	43
Figura 13. <i>The Soul of the Rose</i> , pintura de John William Waterhouse (1908)	44
Figura 14 - Substâncias representativas da faixa de massa molar encontrada nas fragrâncias florais de Angiospermas. Fonte: Elaborada pelo autor.....	45
Figura 15 - Exemplos de COVs encontrados em flores com esqueleto carbônico similar e diferentes funções orgânicas e graus de insaturação. Fonte: Elaborada pelo autor.....	46
Figura 16 - COVs representativos das onze classes/subclasses biossintéticas encontradas na fragrância de flores na natureza. Fonte: Elaborada pelo autor.	50
Figura 17. Representação esquemática de diferentes células epidérmicas responsáveis pela biossíntese de COVs em tecidos florais. Fonte: EFFMERT et al., 2006.	54
Figura 18 - Localização da biossíntese de COVs em <i>Antirrhinum majus</i> . (A) Flores de <i>A. majus</i> ; (B) Células cônicas na superfície interna das pétalas de <i>A. majus</i> responsáveis pela produção e emissão de fragrância floral. Fonte: Adaptado de BOATRIGT et al. (2004).	55
Figura 19 - <i>Cirrhaea dependens</i> . (A) Flor em visão frontal. No detalhe destacado é possível ver a protuberância do labelo em que se concentram as células responsáveis pela biossíntese de COVs. (B) Seção transversal da protuberância do labelo. (C) Detalhe do labelo.	56

Figura 20. Rotas biossintéticas das principais classes de voláteis emitidos por flores e capturados por headspace dinâmico. Fonte: Elaborada pelo autor.....	61
Figura 21 - Sistema de extração <i>headspace</i>	68
Figura 22. Orquídea <i>Dendrobium nobile</i> . Foto: Rafael F. Silva	70
Figura 23 - Cartucho adsorvente do Kaiser (2000) e utilizado como referência para o desenvolvimento do cartucho usado no presente estudo. A) cartucho adsorvente em destaque; B) etapa de eluição em destaque. 1, capilar de vidro; 2, lã de vidro; 3, Porapak Q; 4, seringa; 5, ampola de vidro para armazenamento do eluato. Fonte: NEUNER-JEHLE; ETZWEILER (1994).....	75
Figura 24 - Cartuchos desenvolvidos para este estudo. Foto: Rafael. F. Silva	76
Figura 25. Sistema de extração <i>headspace</i> usado para coleta de odor floral de <i>D. nobile</i> . Fonte: ilustração elaborada por Pereira, L. S.....	77
Figura 26 - Comparação entre o tempo de extração, o número de compostos extraídos e a quantidade de odor extraído (ng). Os valores se referem a média ± desvio padrão (DP) de triplicatas.	80
Figura 27 - Variação da composição percentual dos quatro compostos majoritários do odor floral de <i>D. nobile</i> em quatro diferentes horários num mesmo dia de amostragem. Fonte: Elaborada pelo autor.....	82
Figura 28. (a) Variação do odor floral de <i>D. nobile</i> ao longo de um período de 10 horas durante o dia; (b) comparação entre as intensidades de emissão de odor floral dos períodos da manhã e da tarde (teste <i>t Student</i> , $p < 0,05$). Fonte: Elaborada pelo autor.	83
Figura 29 - Análise por (a) PCA e (b) agrupamento dos voláteis florais de <i>D. nobile</i> em diferentes horários. Fonte: Elaborada pelo autor.....	84
Figura 30 - Variação do teor de (<i>E</i>)- β -ocimeno em flores de <i>D. nobile</i> ao longo do dia. Fonte: Elaborada pelo autor.....	85
Figura 31 - Flores de <i>Temnadenia odorifera</i> . Foto: Rafael F. Silva	91
Figura 32 - Mapa com a indicação das áreas de amostragem dos estudos realizados com <i>T. odorifera</i> . Autor: Geógrafo Leonardo S. Pereira.....	96
Figura 33 - 2-feniletanol.....	103
Figura 34 - Comparação entre a intensidade da emissão da fragrância floral de <i>T. odorifera</i> em três períodos da antese.	103
Figura 35 - Resultado dos bioensaios comportamentais considerando apenas abelhas. As colunas vermelhas representam o resultado de abordagens às flores sintéticas impregnadas com 2-feniletanol. DB: disco de papel filtro branco; DR: Disco de papel filtro avermelhado; F1: flor 1; F2: flor 2.....	113
Figura 36 - <i>Eulaema cingulata</i> coletando néctar de flor de <i>T. odorifera</i> em Restinga de Quissamã/RJ. Fonte: Rafael F. Silva.	114
Figura 37 - Resultado dos bioensaios comportamentais considerando as abordagens de todos os insetos. As colunas vermelhas representam o resultado de abordagens às flores sintéticas impregnadas com 2-feniletanol. DB: disco de papel filtro branco; DR: Disco de papel filtro avermelhado; F1: flor 1; F2: flor 2.	114
Figura 38 - Coleóptero é atraído por 2-feniletanol impregnado em flor artificial. Bioensaio de campo realizado em área de Restinga.....	115

Figura 39 - Flores de *Dendrobium nobile* submetidas à amostragem de seu headspace por HSD. 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Absoluto de flores: exemplos da literatura científica. Fonte: elaborada pelo autor.	24
Tabela 2 - Óleos essenciais de flores: exemplos da literatura científica. Fonte: elaborada pelo autor.....	27
Tabela 3 - Diferenças majoritárias no headspace de flores de <i>Jasminum grandiflorum</i> vivas e cortadas.....	30
Tabela 4 - Distribuição de COVs encontrados no headspace do odor de flores de acordo com sua origem biossintética.....	49
Tabela 5 - Odor floral por HSD com adsorção em polímero poroso: alguns exemplos da literatura. Fonte: elaborada pelo autor.....	72
Tabela 6 - Compostos voláteis emitidos pelas flores de <i>Dendrobium nobile</i> . (ng flor ⁻¹).....	81
Tabela 7 - Taxa de emissão dos compostos voláteis das flores de <i>Temnadenia odorifera</i> em diferentes horários da antese. Média ± desvio padrão; n = 5; ng g ⁻¹ de flor seca.....	106
Tabela 8 - Compostos majoritários do odor floral de <i>T. odorifera</i> que despertam respostas comportamentais ou eletroantenográficas em abelhas e borboletas.....	108
Tabela 9 - Concentração e composição de açúcares do néctar das flores de <i>T. odorifera</i>	111
Tabela 10 - Parâmetros de validação para sacarose, glicose e frutose em CLAE-RI.....	112

Apresentação



Figura 1 Manacá - Tarsila do Amaral (1927)

O presente estudo é resultado do trabalho desenvolvido ao longo do doutorado. Durante esses anos de pesquisa, foram estudados aspectos concernentes à química floral, especialmente no que diz respeito à composição química do odor e do néctar de flores e sua relação com sua ecologia química. Contudo, é importante salientar que, embora alguns aspectos da ecologia química das espécies investigadas tenham sido tratados, o tema principal que norteou os estudos que ora serão apresentados e discutidos se concentra no uso da técnica de *headspace* dinâmico para a análise da química do odor floral e sua relevância em detrimento a outras técnicas de extração.

A fim de oferecer uma melhor compreensão dos temas e experimentos abordados, esta tese de doutorado foi dividida em três capítulos, além da introdução geral, conclusão geral, perspectivas futuras e referências. Embora cada capítulo, com exceção da revisão bibliográfica, tenha se concentrado em projetos com objetivos específicos diferentes, todos eles têm como alvo principal o uso da técnica de *headspace* dinâmico para análise do odor de flores.

No primeiro capítulo pode ser encontrada uma revisão bibliográfica abrangendo o atual conhecimento científico a respeito da química do odor floral em seus vários aspectos, entre os quais a diversidade química dos compostos encontrados no odor de flores de um modo geral, principais rotas biossintéticas de produção de voláteis florais, a localização da biossíntese nas flores e a função dos voláteis florais.

No capítulo dois foi abordado em detalhes o sistema de extração de voláteis florais por *headspace* dinâmico que foi adaptado em laboratório para os estudos desenvolvidos na tese e sua aplicação no estudo do odor das flores da orquídea comercial *Dendrobium nobile* (Orchidaceae), que serviu como espécie modelo para o desenvolvimento do método de extração para flores *in situ*.

O capítulo três aborda um estudo desenvolvido com a espécie endêmica brasileira *Temnadenia odorífera* (Vell.) J. F. Morales (Apocynaceae-Apocynoideae). O estudo deste capítulo teve como objetivo a aplicação do sistema de extração por *headspace* dinâmico e apresentado no capítulo dois da tese – para estudar a ecologia química do atrativo (odor) e recurso (néctar) floral e sua relação com a atração de insetos em *T. odorífera*.

Por fim, após o capítulo três é apresentada uma conclusão geral dos assuntos investigados e as considerações finais.

Para melhor situar os que leem este documento é imprescindível falar a respeito do projeto no qual esta tese está inserida e que originou o objetivo central dos estudos que serão aqui apresentados. Iniciado em 2012, o projeto “Espécies Aromáticas do Cerrado: investigação para aproveitamento do potencial de sua biodiversidade” (AROCER) foi concebido com o propósito central de realizar uma ampla prospecção de plantas aromáticas coletadas exclusivamente no bioma Cerrado e que tivessem potencial de uso de seus óleos essenciais e extratos nas indústrias de perfumaria e cosméticos.

O projeto AROCER foi financiado pela Embrapa e coordenado pelo pesquisador Humberto Ribeiro Bizzo – da Embrapa Agroindústria de Alimentos – que contou com a colaboração de uma rede de pesquisadores de várias instituições públicas, dentre as quais a Universidade Federal do Rio de Janeiro, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (DF), da Embrapa Cerrados (DF), a Universidade de Brasília (UnB) e a Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (VIEIRA et al., 2016; CÂMARA, 2012; A LAVOURA, 2013).

Em sua fase inicial (2012-2014), o Projeto AROCER concentrou suas atividades na prospecção de plantas aromáticas com vistas a aplicação na indústria de perfumaria. Na segunda etapa do Projeto (2015-2018), além da caracterização química dos óleos essenciais e extratos das espécies aromáticas coletadas, fez-se, por meio de parcerias, a identificação de atividades biológicas dos extratos e OE coletados. Além disso, na segunda etapa, uma parceria com a principal empresa do setor de perfumaria, Givaudan, foi decisiva para que se realizasse uma avaliação olfativa das amostras coletadas durante o projeto por perfumistas profissionais em análise olfativa de fragrâncias, no que resultou na seleção de alguns óleos dentre as 350 amostras devido a seus atributos sensoriais únicos e promissores para a indústria de perfumaria (DINIZ, 2016).

Ao todo, o Projeto AROCER coletou 350 amostras de óleos essenciais provenientes de 134 espécies de plantas, pertencentes a 10 famílias botânicas. A caracterização química do óleo essencial de algumas das espécies coletadas já tem sido publicada em revistas internacionais da área (SILVA et al., 2013, 2014, 2015; MEDEIROS et al., 2015, 2016, 2019). As plantas foram coletadas em áreas de preservação ambiental de diversos parques estaduais e nacionais, como o Parque Estadual Da Serra dos Pirineus, Parque Estadual de Caldas Novas, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, além de outras áreas protegidas e reservas ecológicas. A maior parte das amostras coletadas pelo projeto consistiu em óleos essenciais de partes aéreas, folhas e

flores provenientes da extração por hidrodestilação, cujo aparato costumava ser montado em um laboratório itinerante nas sedes dos parques onde ocorriam as coletas (VIEIRA et al., 2015).

Embora a hidrodestilação tenha sido utilizada como principal técnica extrativa para obtenção das amostras de folhas e partes aéreas, fazia parte do projeto o objetivo de explorar o potencial aromático de flores do bioma Cerrado (VIEIRA et al., 2016). Contudo, para esse propósito, a hidrodestilação não é a melhor técnica para se extrair o odor de flores, devido a vários fatores. Assim, para a prospecção do odor de flores, o projeto AROCER tinha entre seus objetivos o desenvolvimento de uma metodologia de extração por *headspace* dinâmico que tornasse possível o estudo do odor de flores *in vivo*, permitindo a preservação da integridade física da planta e o fornecimento de uma amostra mais autêntica e próxima ao odor natural exalado pela flor.

Como não há disponível um aparato comercial completo para extração por *headspace* dinâmico tal como existe para hidrodestilação, uma etapa primordial desta tese foi o desenvolvimento do aparato extrativo e da metodologia. Nesse sentido, o próximo tópico abordará em que consiste a natureza peculiar da extração do odor de flores e os motivos pelos quais a extração de voláteis de flores para alguns propósitos deve ser feita por *headspace* dinâmico.

Introdução Geral



Figura 2 Flores - Candido Portinari (1941)

1 AMOSTRAGEM DE VOLÁTEIS FLORAIS

Para o estudo de voláteis, independentemente de sua origem, a extração constitui uma etapa primordial e inicial dos trabalhos. Dada a sua importância e complexidade, há um grande número de artigos de revisões que se concentram em técnicas de extração de voláteis vegetais, alguns, inclusive, focados especificamente em voláteis de flores (AUGUSTO; LOPES; ZINI, 2003; LAWRENCE, 1995; BICCHI, 2008; THOLL et al., 2006;). Por esta razão, este tópico que agora é apresentado não tem a intenção de esgotar o assunto, mas de providenciar um panorama geral das técnicas de extração comumente usadas para o estudo de voláteis vegetais e, ao expor suas características, potencialidades e limitações, tornar mais clara a razão pela qual a técnica de *headspace* dinâmico foi escolhida como técnica principal nos estudos desenvolvidos nesta tese de doutorado.

Segundo as revisões elaboradas por Stashenko e Martínez (2008) e Augusto, Lopes e Zini (2003), os vários métodos disponíveis para o isolamento da fração volátil de flores podem ser classificados em três grupos gerais:

- a. Métodos de extração por solvente orgânico;
- b. Métodos de destilação;
- c. Métodos *headspace*

A seleção da técnica de isolamento apropriada com vistas à caracterização de uma fração volátil floral depende de uma série de fatores, sendo que o propósito que se tem em mente com a caracterização pode ser considerado um dos principais fatores a ser levado em consideração na hora da escolha (WALRADT, 1982). Nesse sentido, se a intenção do pesquisador é avaliar o melhor solvente que resulte na maior concentração possível de 2-feniletanol em absoluto² de rosas ou outra flor, ele deverá lançar mão da extração por solvente orgânico, já que esse é o meio fundamental para a obtenção do absoluto de uma flor (YOUNIS et al., 2007; NEDELTCHEVA-ANTONOVA et al., 2017). Além disso, se o objetivo for a avaliação da

² O termo **absoluto** dentro da área de perfumaria e em química de produtos naturais refere-se a matéria-prima obtida a partir do seguinte processo de duas etapas: (1) as flores de uma determinada espécie são imersas em um solvente orgânico, normalmente hexano ou pentano, que, após um determinado tempo, é removido por um procedimento de destilação e resultando num extrato semisólido rico tanto em voláteis quanto de cera da flor. O produto desta etapa é chamado de **concreto**. (2) O concreto é, então, solubilizado em etanol e a mistura resultante é resfriada em baixas temperaturas (-5 a -10). Ao ser resfriada, a cera precipita e a mistura é filtrada. O extrato filtrado é submetido a destilação a vácuo para a completa retirada do etanol, no que resulta em um material semisólido muito perfumado chamado **absoluto** (HANDA, 2008). Os absolutos de flores são muito apreciados pela perfumaria mundial e costumam ter preços elevados devido ao baixo rendimento do processo de extração. Para se ter uma ideia, são necessárias seis toneladas de flor de jasmim para a obtenção de 1 kg de absoluto desta flor (CALKIN; JELLINEK, 1994).

fração volátil de flores de novas espécies para aplicação na indústria de perfumes e cosméticos, o pesquisador poderá fazer uso de métodos de destilação, no caso de flores que dispõem de material vegetal suficiente (LEONARDI et al., 2018). No entanto, se o propósito principal do pesquisador é conhecer os voláteis que estão sendo emitidos por uma flor ainda presa à planta viva, os métodos mais adequados são aqueles que permitem a amostragem do *headspace* floral *in vivo* (THOLL et al., 2006). Contudo, se a intenção do pesquisador é realizar um estudo amplo da fração volátil de uma flor, como em estudos de volatoloma³, é necessário fazer o uso de diferentes métodos de extração (BICCHI; MAFFEI, 2012).

De todo modo, a seguir serão apresentados os princípios e algumas das principais características dos três grupos de amostragem de voláteis florais disponíveis, além de se abordar alguns exemplos de estudos de cada um deles.

1.1 Técnicas tradicionais de extração de voláteis de flores

1.1.1 Métodos de extração por solvente orgânico

A extração por solvente é um procedimento de extração que visa o isolamento de uma fração volátil através da dissolução dos componentes voláteis presentes no material vegetal. As flores de uma determinada espécie são colocadas em contato direto com um solvente orgânico comumente lipofílico onde, após um determinado tempo, o extrato é filtrado e submetido à análise cromatográfica (PESSOA et al., 2010; GUILLÉN; IBARGOITIA, 1996). Os solventes rotineiramente usados são o éter de petróleo, hexano e o pentano (PESSOA et al., 2010).

Ao penetrar no material vegetal, o solvente utilizado, por ser lipofílico, solubiliza não somente a fração volátil de interesse, mas também lipídeos, ceras e pigmentos, o que constitui uma limitação da técnica já que estas substâncias são produtos indesejados nesse caso. Ademais, é comum realizar a análise cromatográfica de tais extratos em modo sem divisão de fluxo no injetor devido à baixa concentração dos voláteis presentes nos extratos (GUILLÉN; IBARGOITIA, 1996; RUSANOV et al., 2011). No entanto, a injeção cromatográfica de extratos obtidos pelo uso de solvente em modo sem divisão de fluxo e sem uma devida limpeza prévia pode diminuir a vida útil de colunas cromatográficas (XU et al., 2005).

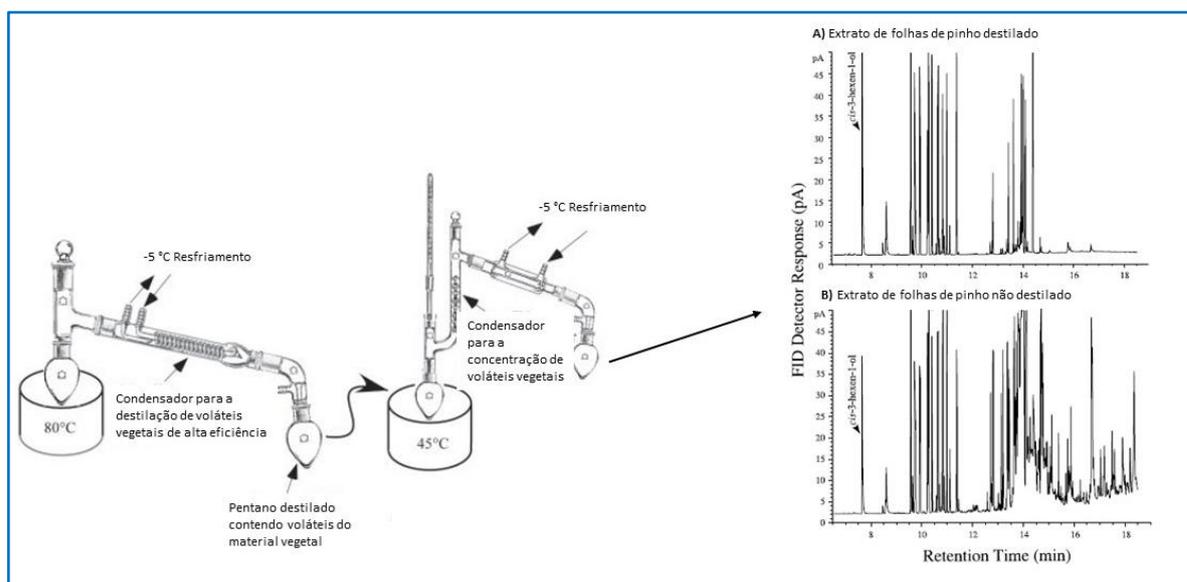
Rusanov et al. (2011) realizaram o isolamento de voláteis florais de *Rosa damascena* (cv. Svezhen) por meio do uso da imersão de 200 mg das pétalas em 400 µL de hexano à temperatura ambiente por quatro horas. Após esse período, o extrato foi centrifugado e 1 µL do

³ Uma tradução literal do termo *volatolome* em referência a metaboloma de voláteis.

sobrenadante foi analisado por cromatografia em fase gasosa (CG-EM) em modo sem divisão de fluxo. Embora os autores tenham extraído alguns dos compostos que conferem o odor característico de rosa, como o 2-feniletanol, geraniol e citronelol, houve a extração de uma grande quantidade de substâncias provenientes de cera.

Para superar o problema da baixa concentração de voláteis nesses extratos, a concentração dos extratos antes da injeção cromatográfica por meio de evaporação é uma prática rotineira, o que resulta na perda significativa de voláteis como foi demonstrado por Xu et al. (2005) ao estudar as folhas de *Arabidopsis thaliana* e outros materiais vegetais. Esses autores, realizaram a extração de folhas de pinho em duas etapas para a obtenção de um extrato concentrado e livre de lipídeos, ceras e pigmentos. Na primeira etapa, o extrato foi obtido pela imersão das folhas de pinho em *n*-pentano que, em seguida, foi submetido a destilação a 80 °C (ver destilador à esquerda da Figura 3). Com esta primeira destilação, o pentano foi limpo da cera, dos lipídeos e dos pigmentos. Em seguida, o destilado da primeira etapa foi submetido a uma segunda destilação a 45 °C, onde o destilado foi reduzido a 1 mL. Em seguida, o a amostra foi concentrada à temperatura ambiente até atingir 20 µL.

Figura 3 Isolamento e concentração de voláteis de folha de pinho. Fonte: adaptado de Xu et al. (2005)



Na parte à direita da Figura 3 há dois cromatogramas relativos ao extrato de folhas de pinho; o cromatograma **B** se refere ao extrato pentânico não destilado, enquanto que o cromatograma **A** se refere ao extrato pentânico destilado e concentrado segundo as etapas

supracitadas. Como se pode ver, após as etapas de destilação e concentração há uma perda considerável de voláteis. Assim, fica evidente que a extração de voláteis por meio de solvente orgânico tem certas desvantagens por necessitar de etapas de preparo que, embora promova a retirada de lipídeos e cera, causa perda de voláteis. Os autores demonstraram, por exemplo, que para o caso do sabineno há uma perda de cerca de 34% após as etapas de destilação e remoção do pentano.

Embora apresente algumas desvantagens, como as que foram mencionadas anteriormente, a extração por solvente é o procedimento básico por meio do qual se obtém alguns dos produtos mais utilizados pela indústria de perfumes em suas composições – o **concreto** e **absoluto** de flores (LAWRENCE, 1995). O concreto de uma flor é obtido a partir da imersão das flores em um solvente orgânico, normalmente o hexano, que é evaporado até a obtenção de um material semissólido. Quando o concreto de uma flor é submetido à dissolução em etanol e o extrato resultante resfriado, filtrado e o etanol completamente evaporado, é obtido o que é chamado de absoluto de uma flor (BABU et al., 2016). Além disso, de acordo com a norma ISO 9235:2013, o absoluto de uma flor também pode ser obtido usando o mesmo processo anteriormente descrito a uma pomada floral, a uma resina ou a um extrato de fluido supercrítico.

A Tabela 1 traz alguns exemplos de estudos cujo foco era a obtenção de absolutos de flores. Como se pode notar nessa tabela, uma importante desvantagem deste método de extração reside na necessidade de grandes quantidades de material vegetal o que, muitas vezes, pode ser impeditivo para o caso de flores de espécies raras ou ameaçadas de extinção.

Tabela 1 - Absoluto de flores: exemplos da literatura científica. Fonte: elaborada pelo autor.

Espécie	Massa	Solvente	Rendimento (%)	Referência
<i>Lavandula angustifolia</i>	500 g	hexano	0,83	Babu et al. (2016)
<i>Jasminium grandiflorum</i> L.	~350 kg	hexano	0,14	Vergheese et al. (1992)
<i>Murrarya paniculata</i>	500 g	pentano	0,62	Rout et al. (2007)
<i>Rosa centifolia</i>	20 kg	hexano	0,11	Younis et al. (2007)
<i>R. damascena</i>	20 kg	hexano	0,145	Younis et al. (2007)
<i>R. 'Gruss na Teplitz'</i>	20 kg	hexano	0,035	Younis et al. (2007)

Vergheese e Sunny (1992) avaliaram a variação sazonal da composição química do absoluto de flores de jasmim e descobriram que em junho se obtém o maior rendimento de absoluto em comparação a outros meses do ano.

1.1.2 Métodos de destilação

1.1.2.1 Hidrodestilação

Dentre os métodos de destilação utilizados para o isolamento de voláteis de flores, sem sombra de dúvida, a hidrodestilação ou arraste a vapor são os mais importantes (SCHMIDT, 2016, pg. 143). Por definição, somente o produto da extração dessas duas técnicas pode ser chamado de óleo essencial (OE). Ademais, para o caso específico de frutos cítricos, como laranja ou limão, admite-se o uso do termo óleo essencial para o produto obtido da extração realizada por meio de prensagem do epicarpo do fruto (ISO, 2013). Todos os demais produtos obtidos por qualquer outra técnica não pode, por definição, receber o nome de óleo essencial. Esse alerta é feito devido ao recorrente uso inadequado do termo óleo essencial ao se referir ao produto da extração da fração volátil de um material vegetal por microextração em fase sólida (MEFS) ou por fluido supercrítico ou mesmo por solvente orgânico (RUBIOLO et al., 2010).

Assim, Rubiolo et al. (2010) explicam que os óleos essenciais estão incluídos dentro do quadro geral da fração volátil de uma matriz vegetal. Tal fração volátil, entendida, assim, como a porção ampla de voláteis contida na planta, pode ser extraída por diferentes técnicas, mas somente quando se faz o uso de hidrodestilação ou arraste a vapor é que tal fração volátil extraída recebe o nome de óleo essencial.

Segundo Stashenko e Martínez (2008), a produção industrial de OE de flores é normalmente realizada por hidrodestilação porque o tecido floral é muito delicado para ser tratado com destilação por arraste a vapor, seja a pressões atmosféricas ou superiores. Em nível acadêmico esse método também é o mais utilizado para a extração de OE de flores (RUBIOLO et al., 2010).

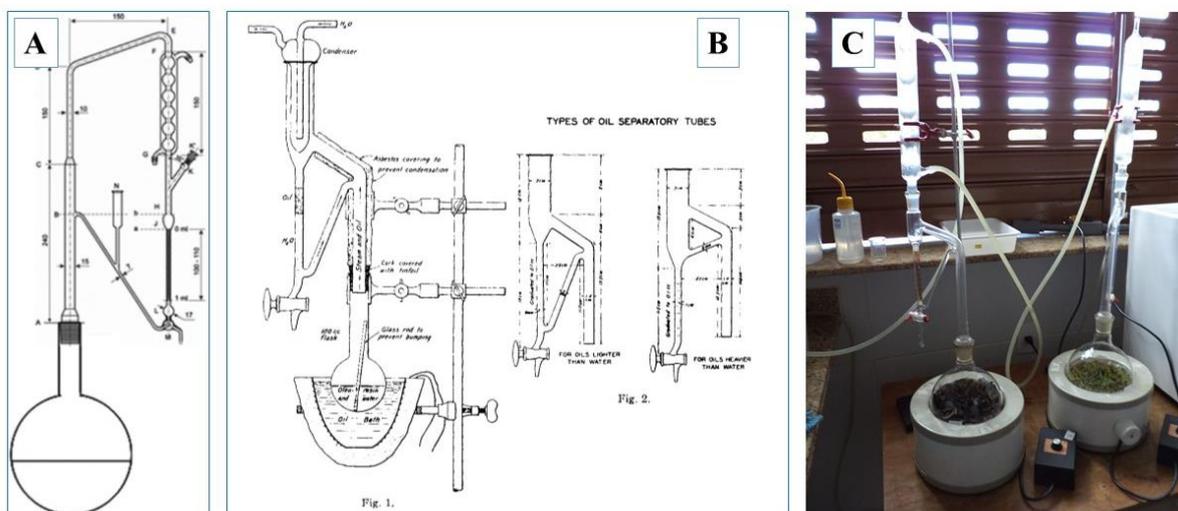
Na hidrodestilação, as flores são colocadas num balão de vidro e imersas em água. O balão é aquecido até a obtenção de uma mistura de vapor de água e voláteis florais que, em seguida, são condensados e formam duas camadas imiscíveis no tubo de separação. Ao se acumular no tubo de separação, o OE permanece sobre a água se tiver uma densidade menor do que esta, como no caso demonstrado pela Figura 4, e se posiciona sob a água se tiver uma densidade maior (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2008; PESSOA et al., 2010).

Figura 4 - OE em evidência na parte superior de um tubo de separação do aparato tipo Clevenger. Foto: Dijalma Barbosa da Silva.



Segundo Kubeczka (2016), autor de um capítulo de livro que traça um panorama histórico das pesquisas em OE, o dispositivo mais frequentemente utilizado para a extração de OE em laboratórios de pesquisa é o aparato de destilação circulatória desenvolvido por Clevenger em 1928. Na Figura 5B pode ser visto o diagrama original do aparato desenvolvido por Clevenger. Este aparato é recomendado pela Farmacopéia Européia e também pela Brasileira (European Pharmacopoeia, 2008, apud RUBIOLO et al., 2010; Farmacopeia Brasileira, 2010, pg. 198).

Figura 5 - Aparato tradicionalmente utilizado em hidrodestilação. A) Diagrama do aparato indicado pela Farmacopéia Européia (RUBIOLO et al., 2010); B) Diagrama original do aparato desenvolvido por Clevenger (1928), no qual é baseado o aparato tradicional; C) Aparato tipo Clevenger em operação. Foto: arquivo do autor



Uma vantagem importante desse método diz respeito ao baixo custo do equipamento em comparação com outros métodos e a sua fácil operação, que permite o seu uso sem que haja necessidade de treinamentos complexos. Outra vantagem importante desse método é a ausência

de solvente orgânico no produto final da extração, já que o único solvente utilizado durante o processo é a água (Ormeño; Goldstein; Niinemets, 2011). Entretanto, esse método de extração apresenta algumas desvantagens importantes, especialmente para o isolamento de voláteis de flores. Pessoa et al. (2010) apontam que devido à baixa concentração de voláteis de alguns materiais vegetais, a hidrodestilação não resulta em quantidade de OE apreciável. Além disso, segundo Ormeño, Goldstein e Niinemets (2011), esse método requer uma grande quantidade de massa de flores (~ 100g ou mais, Tabela 2) para a obtenção de massa adequada de OE. Essa limitação é particularmente importante para o caso de flores, especialmente no caso de flores cujas espécies sejam raras, que estejam ameaçadas de extinção ou que tenham baixa densidade populacional e sejam dispersas.

Em uma das coletas do Projeto AROCER, por exemplo, essa limitação mostrou-se bastante relevante. Em abril de 2012, durante uma coleta realizada na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Reserva Ecológica do IBGE, Brasília) o grupo que participava da coleta encontrou uma espécie herbácea, *Porophyllum angustissimum*, com odor interessante, aldeídico com notas de coentro. O grupo que realizava a coleta se espalhou por uma área da reserva à procura de material vegetal suficiente para o processo de hidrodestilação. Contudo, o grupo encontrou somente seis indivíduos dessa planta e não houve massa suficiente sequer para realizar duplicata de extração. Houve apenas massa suficiente para uma única extração, cujo resultado foi apresentado no *43rd International Symposium on Essential Oils*, que ocorreu em Lisboa (FERREIRA et al., 2012). Assim como no caso da espécie *P. angustissimum*, para outras espécies com comportamento disperso e com população pequena, torna-se quase inviável o isolamento da fração volátil de flores pelo método de hidrodestilação.

Tabela 2 - Óleos essenciais de flores: exemplos da literatura científica. Fonte: elaborada pelo autor

Espécie	Massa*	Tempo de extração (h)	Rendimento (%)	Referência
<i>Alpinia zerumbet</i>	200 g (s)	6	0,25 - 083	Kerdudo et al. (2016)
<i>Lavandula angustifolia</i>	2 kg (f)	3	1,2	Babu; Sharma; Singh (2016)
<i>Lavandula pedunculata</i>	100 g (f)	3	0,66	Bouazama et al. (2017)
<i>Lavandula dentata</i>	100 g (f)	3	0,58	Bouazama et al. (2017)
<i>Piper aduncum</i>	100 g (f)	2	0,42	Valadares et al. (2018)
<i>Rosa damascena</i>	100 g (f)	3	0,033	Manouchehri et al. (2018)

Legenda da Tabela 2: *(s) para massa seca e (f) para massa fresca.

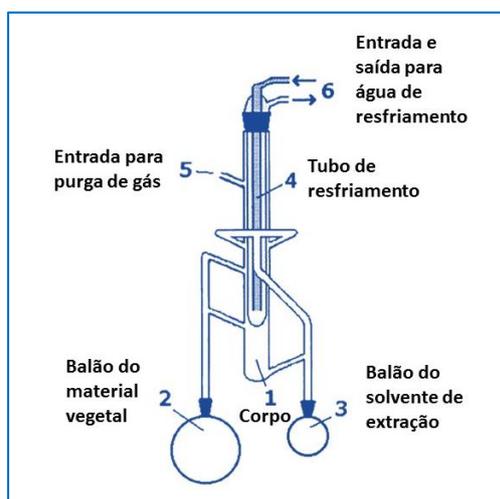
Além da aplicação na formulação de produtos da perfumaria e em cosméticos, os OEs também têm sido aplicado em diversas outras indústrias, como a alimentícia, a de licores e bebidas, a indústria farmacêutica e a de tabaco (VIEIRA et al., 2016).

1.1.2.2 Extração por destilação simultânea

A extração por destilação simultânea (SDE, do inglês *simultaneous distillation and extraction*, sigla pela qual é mais conhecida) é um outro importante método de extração de voláteis de origem vegetal, comumente utilizado para o isolamento de voláteis florais (PARLIMENT, 2002). Este método de extração foi criado por Lickens e Nickerson em 1964 (CHARENTREAU, 2001). Nesse método, as flores são colocadas no balão de vidro maior (Figura 6) juntamente com água; no segundo balão (o menor da Figura 6) é colocado um solvente orgânico. Ao aquecer os dois balões, a água vaporiza juntamente com os voláteis florais que, em seguida, condensam no corpo do extrator resfriado. Os voláteis florais são transferidos para o solvente orgânico ao encontrá-lo no condensador do extrator. Após o resfriamento, a água e o solvente enriquecido com voláteis florais são separados na parte inferior do corpo do extrator por meio da diferença de densidade e da posição relativa dos braços que levam aos balões. Tanto a água quanto o solvente enriquecido de voláteis retornam aos seus balões de origem e, em seguida, são forçados a vaporizar-se novamente, num ciclo contínuo e simultâneo (CHARENTREAU, 2001).

Figura 6 - Aparato para extração por destilação simultânea do tipo Likens-Nickerson.

Fonte: Adaptado de Augusto, Lopes e Zini (2003)



Como se pode ver, o aparato mostrado na Figura 6 é apropriado para a extração com solvente orgânico mais denso do que a água (COELHO et al., 2010), como é o caso do diclorometano cuja massa específica é 1,326 g mL⁻¹ a 20 °C (LIDE, 2006). Uma modificação no aparato de Lickens e Nickerson foi desenvolvida por Schultz et al. (1977) e permite a extração com solventes menos densos do que a água, como o hexano e o pentano cujas massas específicas são, respectivamente, 0,6594 e 0,683 g mL⁻¹ (LIDE, 2006).

Akhbari et al. (2012) avaliaram os extratos de duas espécies de *Hypericum* (*H. perforatum* e *H. scabrum*) obtidos a partir de SDE de flores e frutos contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os extratos foram obtidos por meio do uso de *n*-pentano como solvente e quatro horas de extração.

Li, Zhu e Wang (2017) utilizaram o método de SDE para estudar a variação da composição química volátil de seis cultivares da espécie de orquídea *Cymbidium sinense*. De um modo geral, os autores verificaram que a composição química das frações voláteis das flores dos cultivares apresentou diferenças significativas.

2 O PROBLEMA DA EXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS FLORAIS POR TÉCNICAS INVASIVAS

Embora os métodos de extração anteriormente apresentados sejam amplamente utilizados, seja para o estudo da fração volátil de flores ou para o isolamento de extratos e posterior aplicação em diferentes indústrias, quando o objetivo central do isolamento dos voláteis de uma flor é conhecer a sua composição química volátil mais próxima a que realmente é exalada pela planta viva e encontrada *in situ*, as técnicas tradicionais anteriormente citadas não são as mais apropriadas (MCGEE; PURZYCKI, 2002; PESSOA et al., 2010; COELHO et al., 2010, Tholl; Röse, 2006). Segundo Surburg, Guentert e Harder (1993), as técnicas tradicionais de extração não conseguem reproduzir em seus extratos resultantes um odor fidedigno ao material natural, especialmente para o caso de flores.

Uma das causas que faz com que as técnicas tradicionais de extração não forneçam um extrato com odor fidedigno ao que é naturalmente exalado pela flor se deve à etapa de processamento do material vegetal. A primeira etapa para o isolamento de voláteis florais por técnicas tradicionais, seja por destilação ou por solvente, consiste na coleta das flores (VIEIRA et al., 2015, 2016). Ao serem cortadas da planta, as flores podem produzir uma série de substâncias voláteis de defesa que não seriam exaladas junto ao seu odor natural ou podem

perder completamente alguns voláteis importantes (AGELOPOULOS et al., 1999; MOOKHERJEE et al., 1990).

Mookherjee, Trenkle e Wilson (1988, apud Mookherjee, Trenkle e Wilson, 1989) foram os primeiros pesquisadores a demonstrarem que ocorre uma mudança drástica na composição química do odor de flores após serem cortadas. Os autores compararam a composição volátil de várias espécies de flores, tais como *Narcissus tazetta*, *Rosa damascena*, *Jasminum grandiflorum*, *Freesia* sp., *Osmanthus fragrans* e outras. Todas apresentaram uma mudança drástica na composição do odor extraído de suas flores cortadas em comparação às flores vivas. A Tabela 3 mostra os dados obtidos por Mookherjee, Trenkle e Wilson (1990) ao analisar a variação do odor de flores de jasmin antes e após serem cortadas. Como se pode ver, o indol diminui de 11% para 2% e o acetato de benzila diminui de 60 para 40%. Estes dois compostos são muito representativos do odor das flores de jasmin e sua diminuição é significativa para a reconstituição do odor natural. Além disso, algumas substâncias só são capturadas em flores vivas, como *cis*-jasmona e jasmonato de metila.

Tabela 3 - Diferenças majoritárias no headspace de flores de *Jasminum grandiflorum* vivas e cortadas.

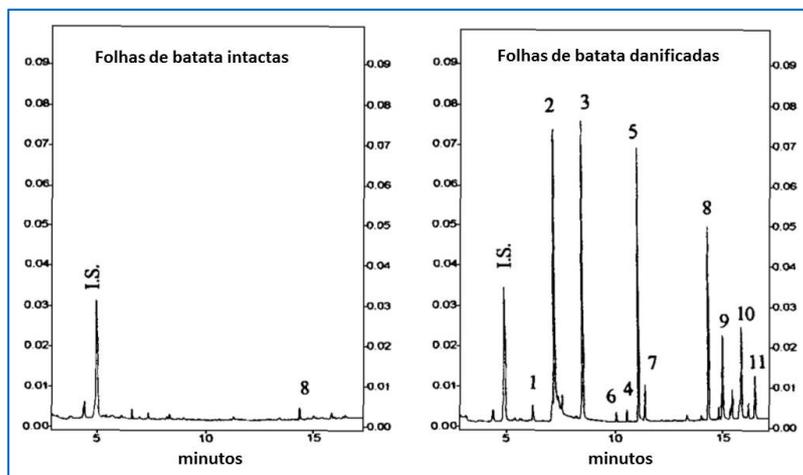
Composto	Flor viva (%)	Flor cortada (%)
6-metil-5-hepten-2-ona	0,2	-
acetato de <i>cis</i> -3-hexenila	0,2	-
álcool benzílico	-	4,0
acetato de benzila	60,0	40,0
linalol	3,0	30,0
indol	11,0	2,0
<i>cis</i> -jasmona	3,0	-
3,5-dimetil-2-etil pirazina	-	0,5
jasmonato de metila	0,3	-

Fonte: Mookherjee et al. (1990).

Agelopoulos et al. (1999) demonstraram que folhas danificadas também alteram drasticamente a composição dos voláteis exalados (Figura 7). Isso significa dizer que ao cortar as flores para submetê-las às técnicas tradicionais invasivas de extração, o próprio

processamento inicial do material vegetal introduz artefatos que não seriam isolados se o odor fosse amostrado de flores intactas.

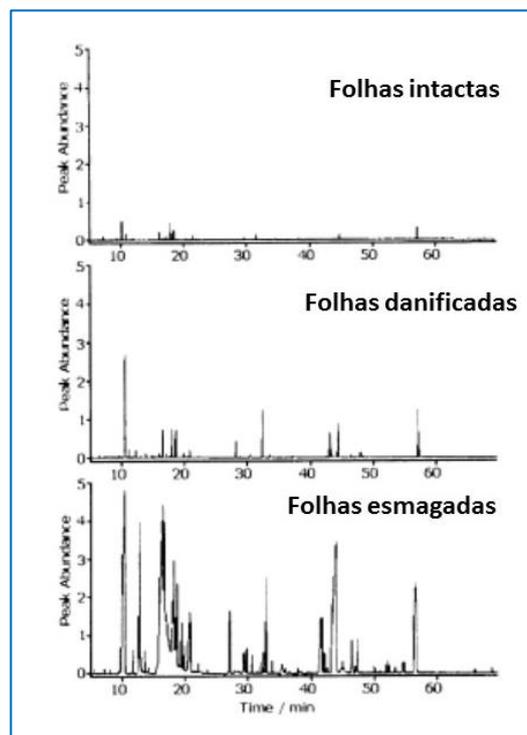
Figura 7 - Perfil cromatográfico de uma folha de batata intacta (esquerda) e mecanicamente danificada (direita). (1) Hexanal, (2) (Z)-3-hexenal, (3) (E)-2-hexenal, (4) hexan-1-ol, (5) (Z)-3-hexen-1-ol, (6) (Z)-2-penten-1-ol, (7) (E)-2-hexen-1-ol, (8) β -cariofileno. Fonte: Agelopoulos et al. (1999)



Jiang e Kubota (2001 apud AUGUSTO; LOPES; ZINI, 2003) estudaram o efeito do manuseio das folhas de *Xanthoxylum piperitum* sob a liberação de seus voláteis. Os autores fizeram a extração dos voláteis por *headspace* dinâmico com adsorção em Tenax TA e dessorção térmica.

Os autores conseguiram demonstrar que as folhas intactas liberaram 12 substâncias, enquanto que as folhas danificadas liberaram 22 substâncias, aumentando para 36 substâncias nas folhas amassadas (Figura 8). Nas folhas intactas, os compostos mais importantes são o limoneno e o (Z)-3-hexen-1-ol. Para as folhas amassadas, entretanto, altas concentrações de aldeídos C₆ dominam o cromatograma, conferindo ao odor das folhas um cheiro desagradável de grama cortada.

Figura 8 Perfil cromatográfico (CG-EM) de folhas de *Xanthoxylum piperitum*. Modificado de Jiang e Kubota (2001 apud AUGUSTO, LOPES e ZINI 2003).



Os exemplos acima citados tornam evidente a necessidade de uma técnica de extração que não cause qualquer injúria à flor durante a captura dos seus voláteis (MOOKHERJEE; TRENKLE; WILSON, 1989, 1990; SCHULTZ et al., 1977).

3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO NÃO INVASIVOS

As técnicas de extração que realizam a captura dos voláteis que são exalados pela flor e dispersos no ar ao redor da planta são chamadas de técnicas de extração *headspace* (BICCHI et al., 2008). Essas técnicas não são destrutivas e nem invasivas (OUYANG; VUCKOVIC; PAWLISZYN, 2011). Vários autores sugerem que quando comparadas às técnicas de extração por solvente ou por destilação, as técnicas *headspace* proporcionam uma composição mais realística dos voláteis emitidos pela flor e, por essa razão, têm sido os métodos de extração amplamente utilizados para o estudo do odor de flores tanto pela indústria de perfumaria quanto pelos pesquisadores que estudam a relação planta-polinizador (KAISER, 2000; THOLL et al., 2006; THOLL; RÖSE, 2006; BICCHI et al., 2008; RAGUSO; PELLMYR, 1998, ALGUSTO; LOPES; ZINI, 2003; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2008).

As técnicas *headspace* têm várias modalidades, sendo as principais: *headspace* estático, *headspace* dinâmico e microextração em fase sólida (MEFS). Contudo, as técnicas de *headspace* dinâmico e microextração em fase sólida são as duas técnicas mais amplamente utilizadas para o isolamento de voláteis florais e, por isso, serão descritas a seguir.

3.1 Microextração em fase sólida

A técnica de microextração em fase sólida (MEFS) é apontada por alguns autores como uma modalidade de *headspace* estático. Ela se baseia na sorção dos voláteis liberados pela flor em uma fase adsorvente polimérica, que recobre a agulha da seringa do equipamento extrator. A técnica de MEFS permite, em um único aparelho, o isolamento, a concentração e a introdução da amostra no cromatógrafo (KATAOKA; LORD; PAWLISZYN, 2000; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2008).

Por sua simplicidade de operação, seletividade e sensibilidade, a MEFS é amplamente utilizada como uma das principais técnicas de isolamento de voláteis florais (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2008; BARTÁK et al., 2003; CHIU et al., 2017). A MEFS também tem sido utilizada para o isolamento de voláteis de flores *in vivo*. Verdonk et al. (2003), por exemplo,

estudaram a produção de voláteis florais de *Petunia hybrida* por MEFS *in vivo* e conseguiram demonstrar que as flores desta espécie têm um padrão de emissão temporal de voláteis (Figura 9).

Figura 9 - Isolamento de voláteis de flor de *Petunia hybrida* por MEFS *in vivo*. Fonte: VERDONK et al. (2003)



Embora seja amplamente utilizada para o estudo de voláteis de flores, há uma ressalva importante que precisa ser feita em relação ao uso da MEFS, especialmente quando o objetivo é a aplicação em estudos de interação planta-polinizador ou em outros estudos de ecologia química. A quantidade de voláteis extraída pela técnica MEFS depende de uma série de fatores físico-químicos que dificultam a adequada quantificação dos voláteis emitidos por uma flor (THOIL et al., 2006; THOLL; RÖSE, 2006). Segundo Snow (2002), a dificuldade em alcançar reprodutibilidade em amostragens por MEFS tem sido relatada em alguns trabalhos.

Segundo Tholl e Röse (2006), para que os resultados da quantificação por MEFS dos voláteis de um odor floral sejam reprodutíveis, seria necessário que a fibra utilizada, ao alcançar o equilíbrio, removesse uma quantidade de analitos proporcional à concentração encontrada no *headspace* da flor. No entanto, isso é praticamente impossível pela própria natureza dos fenômenos físico-químicos envolvidos na extração por MEFS (DÓREA; GAUJAC; NAVICKIENE, 2008).

Como a volatilidade e a polaridade são diferentes para cada substância volátil e esses dois parâmetros influenciam na extração pela fibra de MEFS, o coeficiente de distribuição entre o *headspace* floral e a fibra é diferente para cada analito, o que significa dizer que cada substância volátil será extraída pela fibra numa proporção diferente da que realmente ela ocorre no *headspace* floral e, assim, uma composição química fornecida por MEFS não necessariamente reflete a composição real do *headspace* floral. Nesse sentido, a quantificação

de voláteis por MEFS envolve uma série de experimentos de calibração, muitas vezes impraticável se a matriz é muito complexa. Além disso, a calibração em MEFS ainda está em desenvolvimento (OUYANG; PAWLISZYN, 2008). Por essa razão, diversos autores apontam que a MEFS é adequada, em termos práticos, apenas para a caracterização qualitativa dos voláteis de uma flor, ou seja, ela pode ser usada para conhecermos quais voláteis uma flor emite, mas é inadequada se queremos saber qual a quantidade real de cada volátil emitido (THOLL; RÖSE, 2006).

Contudo, é importante dizer que a análise quantitativa por MEFS não é impossível, pois por meio de uma mistura de padrões adequada e curvas de calibração é possível realizar quantificação reprodutível (OUYANG; PAWLISZYN, 2008). Entretanto, Segundo Tholl et al. (2006), quando a quantificação envolve um número muito grande de substâncias, com constantes de distribuição distintas, a quantificação por MEFS é impraticável.

Segundo Tholl e Röse (2006), outra ressalva importante diz respeito à limitação da MEFS em captar variações sutis na composição. Em baixas concentrações, mudanças sutis na composição *headspace* não afetam a resposta fornecida pela MEFS. Além disso, em volumes de *headspace* maiores do que 5 mL, como é a maioria dos casos dos *headspaces* de flores, a quantidade de analitos removida por MEFS não é suficiente para causar mudança na concentração e, dessa forma, em alguns casos, não é capaz de captar o padrão temporal da emissão volátil floral.

3.2 *Headspace* dinâmico

A técnica de *headspace* dinâmico (HSD) possui características que permitem a superação de vários problemas encontrados em outras técnicas tradicionais de extração e mesmo na técnica de MEFS. A HSD é a técnica de amostragem mais frequentemente utilizada para a caracterização de voláteis de flores, especialmente em áreas de ecologia química, quando se necessita conhecer a composição química das substâncias emitidas por uma flor em suas relações ecológicas.

Nesta técnica de extração, a flor, a inflorescência, ou mesmo a planta inteira é colocada dentro de um recipiente que a isola do ambiente externo. O recipiente pode ser de polímero como um saco de polietileno ou de vidro. É conectado ao recipiente que isola a flor um cartucho preenchido de adsorvente polimérico que é responsável por capturar por adsorção os voláteis

que são emitidos pela flor. Os voláteis, dispersos no *headspace* floral, são forçados a passar pelo cartunho adsorvente por meio do uso de uma bomba de vácuo conectada ao cartucho. A bomba de vácuo é ligada ininterruptamente durante todo o período de extração e isso permite que o *headspace* floral seja continuamente amostrado e renovado. Um exemplo de aparato utilizado na captura de voláteis por HSD pode ser visto na Figura 10.

Existem comercialmente disponíveis vários adsorventes poliméricos que podem ser usados em HSD (DETTMER; ENGEWALD, 2002.). Raguso e Pellmyr (1998) avaliaram vários parâmetros que podem interferir na amostragem por HSD. Segundo os autores, para a amostragem de voláteis florais, o adsorvente Porapak Q e o solvente hexano como eluente permitem a melhor taxa de recuperação.

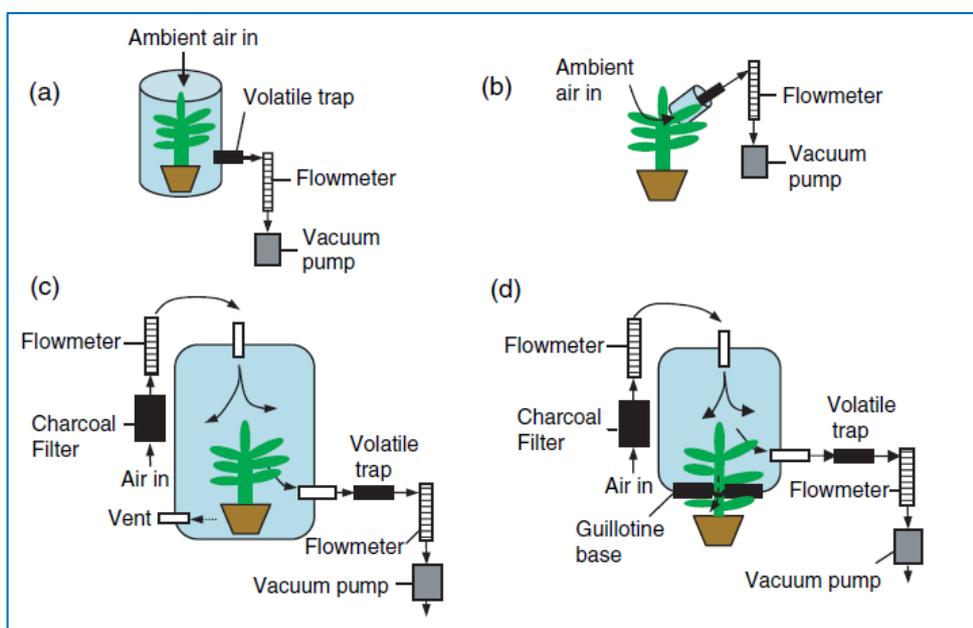
Desde o seu surgimento entre as décadas de 1970 e 1980, logo ficou claro o grande potencial da HSD em fornecer amostras mais fidedignas ao odor natural, além de possibilitar o isolamento de quantidade de amostra suficiente para determinação estrutural de novos compostos provenientes de flores. Esses fatores incentivaram o surgimento de diversos projetos de expedição por grandes indústrias de perfumaria (SCHILLING et al., 2010; MCGEE; PURZYCKI et al. 1999), como as expedições lideradas pelos químicos Roman Kaiser, da empresa *Givaudan* (Figura 10; KAISER, 2000) e Daniel Joulain, da empresa *Robertet* (JOULAIN, 2008).

Figura 10 - Voláteis de *Pachira insignis* sendo amostrada por HSD em expedição liderada pelo químico Roman Kaiser, da empresa Givaudan. Fonte: KAISER; KRAFT (2001); KAISER (2000)



Embora a HSD possua várias vantagens em relação às outras técnicas, uma ressalva importante precisa ser considerada. Diferentemente das técnicas tradicionais até aqui abordadas, como hidrodestilação, SDE ou mesmo MEFS, a técnica de HSD não possui um aparato completo comercial que possa ser adquirido para pronta aplicação no isolamento de voláteis (RAGUSO; PELLMYR, 1998; THOLL et al., 2006). Na verdade, há uma grande variedade de dispositivos que podem ser encontrados na literatura (ver Figura 11), mas todos, em maior ou menor grau foram desenvolvidos por grupos de pesquisa. A falta de uma padronização no aparato de extração em HSD é um dos fatores apontados por Raguso e Pellmyr (1998) que dificulta uma comparação adequada de perfil volátil floral por trabalhos desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisadores.

Figura 11 - Exemplos de sistema de coleta de voláteis por HSD. Fonte: THOLL et al. (2006).



Alguns pesquisadores utilizam sacos comerciais de polímero para isolar a flor, outros confeccionam câmaras de vidro apropriadas ao tamanho da inflorescência de interesse, como é o caso dos trabalhos desenvolvidos por Kaiser (2000). Além do mais, o elemento mais importante do HSD – cartucho adsorvente – só está disponível comercialmente em quantidade de massa de adsorvente muito acima (~50 mg) da que é adequada ao isolamento de voláteis florais, ou seja, entre 2 a 10 mg, conforme é recomendado por vários autores (KAISER, 2000; MCGEE; PURZYCKI, 2002). Dessa maneira, o principal desafio em estudos de caracterização de voláteis florais consiste em desenvolver a metodologia de extração por *headspace* dinâmico e o cartucho de captura de voláteis preenchido com quantidade de adsorvente em microescala.

4 REFERÊNCIAS

- A LAVOURA. Aromas do Cerrado, nº 699, p. 52-53, 2013. Disponível em: https://issuu.com/sociedadnacionaldeagricultura/docs/a_lavoura_699. Acessado em: 01/10/2018.
- AGELOPOULOS, N. G.; HOOPER, A. M.; MANIAR, S. P.; PICKETT, J. A.; WADHAMS, L. J. A novel approach for isolation of volatile chemical released by individual leaves of a plant in situ. **J. Chem. Ecol.**, v. 25, n. 6, p. 1411-1425.
- AKHBARI, M.; BATOOLI, H.; MOZDIANFARD, M. Comparative study of composition and biological activities of SDE prepared essential oils from flowers and fruits of two *Hypericum* species from central Iran, **Nat. Prod. Res.**, v. 26, n. 3, p. 193-202, 2012.
- AUGUSTO, F.; LOPES, A. L.; ZINI, C. A. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, v. 22, n. 3, p. 160-169, 2003.
- BABU, G. D. K.; SHARMA, A.; SINGH, B. Volatile composition of *Lavandula angustifolia* produced by different extraction techniques. **J. Essent. Oil Res.**, v. 28, n. 6. p. 489-500, 2016.
- BARTÁK, P.; BEDNAR, P.; CÁP, L.; ONDRÁKOVÁ, L.; STRÁNSKÝ. MEFS – A valuable tool for investigation of flower scent. **J. Sep. Sci.**, v. 26, p. 715-721, 2003.
- BICCHI, C.; MAFFEI, M. The Plant Volatilome: Methods of Analysis. In: NORMANLY, J. (Ed.) **High-Throughput Phenotyping in Plants: Methods and Protocols**. New York: Springer, 2012, p. 289-310.
- CÂMARA, J. Cheiro do campo. O Globo, Planeta Terra, 26/06/2012, p. 7-9.
- CHARENTREAU, A. Simultaneous distillation–extraction: from birth to maturity – review. **Flavour Fragr. J.**, v. 16, p. 136–148, 2001.
- CHIU, Y-T.; CHEN, H-C.; CHANG, C. The Variation of *Oncidium* Rosy Sunset Flower Volatiles with Daily Rhythm, Flowering Period, and Flower Parts. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1468-, 2017.
- COELHO, G. L. V.; MENDES, M. F.; PESSOA, F. L. P. Flavor extraction: headspace, SDE, or SFE. In: HUI, Y. H. **Handbook of fruit and vegetable flavors**. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2010. p. 211-228.
- DETTMER, K.; ENGEWALD, W. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 373, p. 490–500, 2002.
- DINIZ, F. Essências de plantas aromáticas do Cerrado podem chegar ao mercado mundial de perfumes. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/>

[/noticia/11240646/essencias-de-plantas-aromaticas-do-cerrado--podem-chegar-ao-mercado-mundial-de-perfumes. Acessado em 01/10/2018.](#)

- DÓREA, H. S.; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e Cinéticos. **Sci. Plena**. v. 4, n. 7, p. 1-7, 2008.
- Farmacopeia Brasileira. 5 ed. Vol. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 808p.
- FERREIRA, R.; REZENDE, C. M.; SANTANA, H. C. D.; VIEIRA, R. F.; ALVES, R. B. N.; BIZZO, H. R. Scents from Brazilian Cerrado: The essential oil from *Porophyllum angustissimum*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, 43, 2012, Lisboa. **Abstracts from international symposium on essential oils**. Lisboa: ISEO, 2012, p. 176. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/935340>, acesso em: 01/10/2018.
- FUMES, B. H.; SILVA, M. R.; ANDRADE, F. N.; NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, v. 71, p. 9-25, 2015.
- GUILLEN, M. D.; IBARGOITIA, M. L. Volatiles componentes obtained from the leaves of *Jasonia glutinosa*. **Food Chem.**, v. 56, n. 2., p. 155-158, 1996.
- ISO - International Organization for Standardization. ISO 9235:2013: Aromatic natural raw materials – Vocabulary. Genebra: ISO, 2013.
- JOULAIN, D. Flower Scents from the Pacific. **Chem. Biodiversity**, v. 5, p. 896-909, 2008.
- KAISER, R.; KRAFT, P. Neue und ungewöhnliche Naturstoffe faszinierender Blütendüfte. **Chem. Unserer Zeit**, v. 35, n. 1, p. 8-23, 2001.
- KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **J. Chromatogr. A.**, v. 880, p. 35-62, 2000.
- KERDUDO, A.; ELLONG, E. N.; BURGER, P.; GONNOT, V.; BOYER, L.; CHANDRE, F.; ADENET, S.; ROCHEFORT, K.; MICHEL, T.; FERNANDEZ, X. Chemical Composition, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Flowers Essential Oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.BURTT & R.M.SM. from Martinique Island. **Chem. Biodiversity**, v. 14, n. 4, p. e1600344, 2017
- LAWRENCE, B. M. The isolation of aromatic materials from natural plant products. In: DE SILVA, K. T. (ed.) **A manual on the essential oil industry**. Vienna: UNIDO, 1995, p. 57-154.

- LEONARDI, M.; GIOVANELLI, S.; AMBRYSEWSKA, K. E.; RUFFONI, B.; CERVELLI, C.; PISTELLI, L.; FLAMINI, G.; PISTELLI, L. Essential oil composition of six *Helichrysum* species grown in Italy. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 79, p. 15-20, 2018.
- LI, J.; ZHU, G-F.; WANG, Z-H. Chemical Variation in Essential Oil of *Cymbidium sinense* Flowers from Six Cultivars. **J. Essent. Oil-Bear. Plants**, v. 20 n. 2, p. 385 – 394, 2017.
- LIDE, D. R. (ed.). **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. Boca Raton, FL: Taylor and Francis, 2006. p. 2135. Disponível em: <<http://www.hbcnpnetbase.com>>. Acessado em: 01/10/2018.
- MANOUCHEHRI, R.; SAHARKHIZ, M. J.; KARAMI, A.; NIAKOUSARI, M. Extraction of essential oils from damask rose using green and conventional techniques: Microwave and ohmic assisted hydrodistillation versus hydrodistillation. **Sustainable Chem. Pharm.**, v. 8, p. 76-81, 2018.
- MCGEE, T.; PURZYCKI, K. Novel Techniques for Capturing Scents in the Rainforest Canopy: the Final Frontier. **Perfumer & Flavorist**, v. 24, p. 1-6, 1999.
- MEDEIROS, F. C. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; VIEIRA, R. F.; FERNANDES, Y. F. M.; SANTOS, M. C. S.; BIZZO, H. R. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from *Psidium laruotteanum* Cambess (Myrtaceae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 30, p. 253-257, 2018.
- MEDEIROS, F. C. M.; GOUVEIA, F. N. ; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F.; MENEZZI, C. H. S. . Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 114, p. 87-93, 2016.
- MEDEIROS, F.; MENEZZI, C. H. S.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. **J. Essent. Oil Res.**, p. 1-4, 2015.
- MOOKHERJEE, B. D.; TRENKLE R. W.; WILSON, R. A. Live vs. Dead. Part II. A Comparative Analysis of the Headspace Volatiles of Some Important Fragrance and Flavor Raw Materials. **J. Essent. Oil Res.**, v. 1, n. 2, p. 85-90, 1989.
- MOOKHERJEE, B. D.; TRENKLE, R. W.; WILSON, R. A. The chemistry of flowers, fruits and spices: live vs. dead a new dimension in fragrance research. **Pure Appl. Chem.**, v. 62, n. 7, p. 1357-1364, 1990.
- NEDELTCHEVA-ANTONOVA, D.; STOICHEVA, P.; ANTONOV, L. Chemical profiling of Bulgarian rose absolute (*Rosa damascena* Mill.) using gas chromatography–mass spectrometry and trimethylsilyl derivatives. **Ind. Crops Prod.**, v. 108, p. 36-43, 2017.

- OUYANG, G.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Nondestructive Sampling of Living Systems Using in Vivo Solid-Phase Microextraction. **Chem. Rev.**, v. 111, n. 4, p. 2784-2814.
- PARLIMENT, T. Solvent Extraction and Distillation Techniques. In: MARSILI, R. (Ed.) **Flavor, fragrance, and odor analysis**. New York: CRC Press, p. 1-24, 2001.
- PESSOA, F. L. P.; MENDES, M. F.; QUEIROZ, E. M. MELO, S. A. B. V. Extraction and distillation. In: HUI, Y. H. **Handbook of fruit and vegetable flavors**. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2010. p. 195-210.
- RAGUSO, R. A.; PELLMYR, O. Dynamic headspace analysis of floral volatiles: a comparison of methods. **Oikos**, v. 81, p. 238-254, 1998.
- ROUT, P. K.; RAO, Y. R.; SREE, A.; NAIK, S. N. Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murrarya paniculata* (Linn.) Jack flowers. *Flavour Fragr. J.*, v. 22, p. 352–357, 2007.
- RUBIOLO, P.; SGORBINI, B.; LIBERTO, E.; CORDERO, C.; BICCHI, C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. **Flavour Fragr. J.**, v. 25, p. 282–290, 2010.
- RUSANOV, K. E.; KOVACHEVA, N. M.; ATANASSOV, I. I. Comparative GC/MS Analysis of Rose Flower and Distilled Oil Volatiles of The Oil Bearing Rose *Rosa Damascena*, **Biotechnol. Biotechnol. Equip.**, v. 25, n. 1, p. 2210-2216, 2011.
- SCHILLING, B.; KAISER, R.; NATSCH, A.; GAUTSCHI. Investigation of odors in the fragrance industry. **Chemoecology**, v. 20, p. 135–147, 2010.
- SCHMIDT, E. Production of essential oils. In: Başer, K. H. C; Buchbauer, G. (eds.) **Handbook of essential oils: Science, technology and applications**, 2^a ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2016, p. 127-163.
- SCHULTZ, T. H.; FLATH, R. A.; MON, T. R.; EGGLING, S. B.; TERANISHI, R. Isolation of Volatile Components from a Model System. **J. Agric. Food Chem.**, v. 25, n. 3, p. 446-449, 1977.
- SILVA, R. F.; REZENDE, C. M.; PEREIRA, J. B.; VIEIRA, R. F.; SANTOS, M. C. S.; BIZZO, H. R. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from *Pseudobrickellia brasiliensis* (Asteraceae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 27, p. 1-4, 2015.
- SILVA, R. F.; TINOCO, N. A. B.; TSUKUI, A.; KOSCHNITZKE, C.; SILVA-BATISTA, I. C.; Rezende, C. M.; BIZZO, H. R.. FLORAL SCENT AND NECTAR SUGAR

- COMPOSITION OF *Temnadenia odorifera* (APOCYNACEAE). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, n. 2, p. 388-397, 2019. doi: 10.21577/0103-5053.20180188.
- SILVA, R. F.; UEKANE, T. M. ; REZENDE, C. M. ; BIZZO, H. R. . Floral Volatile Profile of *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) in Circadian Cycle by Dynamic Headspace In Vivo. **Rev. Virtual Quím.**, v. 8, p. S120, 2015.
- SILVA, R. F.; REZENDE, C. M.; SANTANA, H. C. D.; VIEIRA, R. F. ; BIZZO, H. R. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from the leaves of *Hyptis villosa* Pohl ex Benth (Lamiaceae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 25, p. 1-4, 2013.
- SILVA, R. F.; REZENDE, C. M.; SANTANA, H. C. D.; VIEIRA, R. F.; ALVES, R. B. N.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; SANTOS, M. C. S.; BIZZO, H. R. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Leaves and Flowers of *Lippia Stachyoides* var. *Martiana* (Verbenaceae). **Nat. Prod. J.**, v. 05, p. 1-1, 2014.
- SNOW, N. H. Head-space analysis in modern gas chromatography. **Trends In Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9/10, 2002.
- STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling flower scent for chromatographic analysis. **J. Sep. Sci.**, v. 31, p. 2022-2031, 2008.
- THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; ROSE, U. S. R.; SCHINITZLER, J-P. Practical approaches to plant volatile analysis. **Plant J.**, v. 45, p. 540-560, 2006.
- THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; RÖSE, U. S. R.; SCHINITZLER, J-P. Practical approaches to plant volatile analysis, **Plant J.**, v. 45, P. 540-560, 2006.
- VALADARES, A. C. F.; ALVES, C. C.; ALVES, J. M.; DEUS, I. P. B.; OLIVEIRA FILHO, J.; SANTOS, T. C.; DIAS, H. J.; CROTTI, E. M.; MIRANDA, M. L. D.; Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 90, n. 3, p. 2691-2699, 2018.
- VERGHESE, J.; SUNNY, T. P. Seasonal Studies on the Concrete and Absolute of Indian *Jasminium grandiflorum* L. Flowers. **Flavour Fragrance J.**, v. 7, p. 323-327, 1992.
- VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R.; MEDEIROS, F. C. M.; SILVA, R. F. Espécies Aromáticas Nativas da Região Centro-Oeste. In: VIEIRA, R. F.; CAMILO, J.; CORADIN, L. (Eds.). **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o futuro – Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente (MMA), 2016, p. 365-432.

- VIEIRA, R. F.; BIZZO, H.; ALVES, R. B. N.; SILVA, D. B.; GOMES, I. S.; SILVA, R. F.; MEDEIROS, F. C. M.; SANTANA, H.; MENEZES, C. H. S. REZENDE, C. M. Espécies aromáticas do cerrado: prospecção e coleta. **Anais do 10º simpósio de recursos genéticos para a América Latina e o Caribe**, Bento Gonçalves (RS), p. 17. 2015.
- WALRADT, J. P. Analysis of fragrance materials. In: THEIMER, E. T. **Fragrance chemistry: the Science of the sense os smell. Rumson**, New Jersey: Academic Press, 1982, p. 575-615.
- XU, N.; GRUBER, M.; WESTCOTT, N.; SOROKA, J.; PARKIN, I.; HEGEDUS, D. A Method for the Solvent Extraction of Low-boiling-point Plant Volatiles. **Phytochem. Anal.**, v. 16, 239–245, 2005.
- YOUNIS, A.; KHAN, M. A.; KHAN, A. A.; RIAZ, A.; PERVEZ, M. A. Effect of diferente extraction methods on yield and quality of essential oil from four Rosa species. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 73-76, 2007.

Capítulo 1

Revisão da literatura



Figura 12. Cândido Portinari, Vaso de Flores (1942)

*“Que não haja dúvida a respeito: a maior parte dessa forma de comunicação é constituída por **vocábulos químicos.**”*

Gottlieb; Borin; Pagotto; Zocher. *Ciência & Saúde Coletiva*, 3, 2, 97-102, 1998

1 A DIVERSIDADE QUÍMICA DO ODOR DE FLORES

Figura 13. *The Soul of the Rose*, pintura de John William Waterhouse (1908)



Há um grande número de espécies vegetais cujas flores são de extrema importância na indústria da perfumaria, pois são fontes de matéria-prima para o setor. A indústria de plantas para ornamentação é outro setor muito dependente de espécies florais. Segundo Neves e Pinto (2015 apud HUMMEL; MIGUEL, 2017), a cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais gerou no Brasil a cifra de R\$ 4,51 bilhões em 2015.

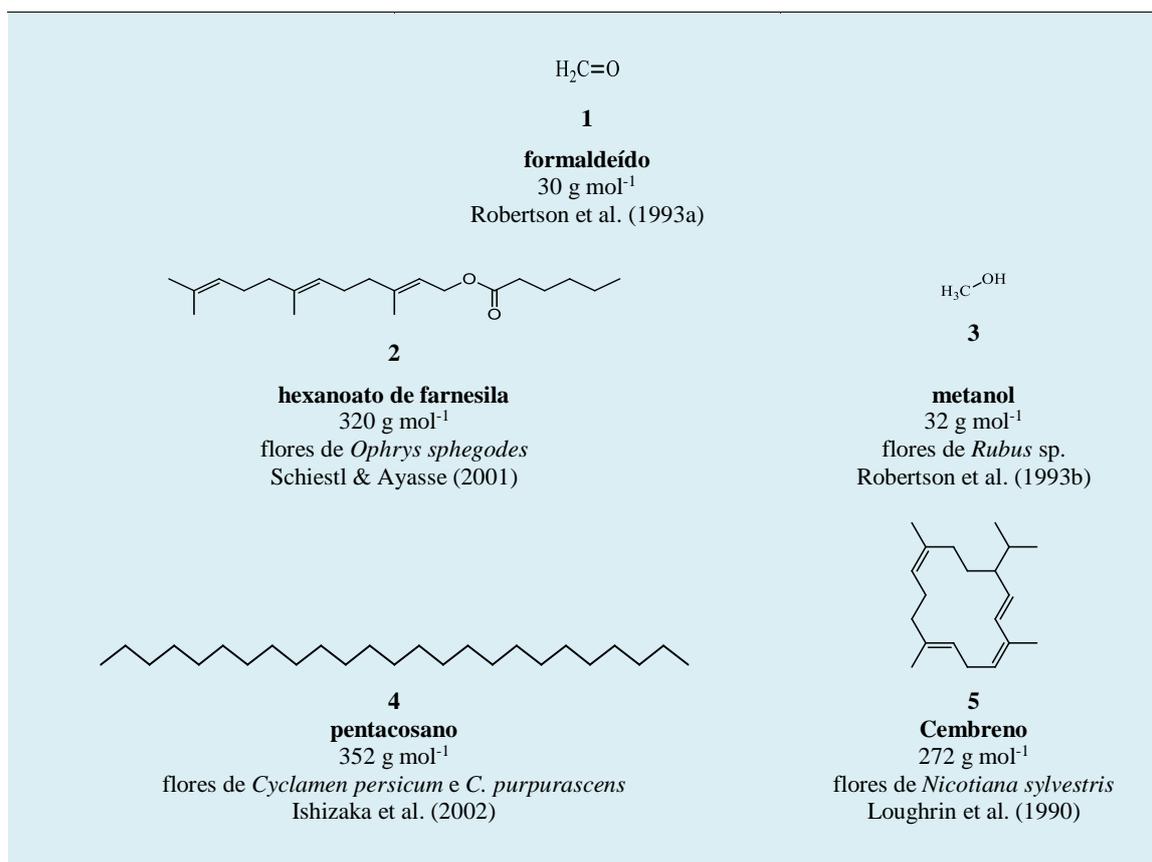
Em ambos os setores supracitados, a fragrância exalada pelas flores constitui um fator de extrema importância e, embora somente no primeiro caso a presença de odor seja imperativa, no segundo caso a presença de fragrância em flores pode contribuir positivamente para a decisão final de compra pelo consumidor.

Há uma grande quantidade de flores cujo odor é apreciado pela indústria de perfumes, muitas das quais possuem uma fragrância característica. Uma rosa tem uma natureza olfativa diferente de um cravo que, por sua vez, exala um odor muito diferente de um jasmim ou de uma dama da noite. Nessa perspectiva, alguém pode se perguntar o que faz com que haja tanta diversidade de fragrâncias entre as flores de diferentes espécies. Contudo, além dessa diferença, uma pessoa com conhecimento mais refinado sobre flores deve saber também que pode haver diferença na fragrância mesmo entre as flores de indivíduos de uma mesma espécie de planta. Além disso, uma mesma flor pode cheirar de modo diferente ao longo do dia. O que explica tamanha diversidade de fragrâncias?

Para entender o que explica a vasta diversidade de fragrâncias florais existentes na natureza, faz-se necessário primeiro entendermos do que é constituída a fragrância exalada por uma flor. As fragrâncias exaladas pelas flores de qualquer espécie são constituídas por uma mistura lipofílica de substâncias orgânicas que, devido a sua alta pressão de vapor e relativa baixa massa molecular, conseguem passar à fase gasosa e se difundir pela atmosfera até o sistema olfativo daqueles ao seu redor.

Em geral, as substâncias orgânicas que constituem as fragrâncias das flores têm massa molar que varia entre 30 e 300 g mol⁻¹; essa faixa de massa molar para os voláteis de flores é a mais citada entre os livros e artigos voltados à química do odor floral. Contudo, é possível encontrar substâncias com massa molar ainda maior no ⁴*headspace* de algumas flores, como é o caso das flores das espécies *Cyclamen persicum* e *C. purpurascens*, cujas flores emitem pentacosano (ISHIZAKA; YAMADA; SASAKI, 2002), um hidrocarboneto alifático com 25 átomos de carbono em sua estrutura e massa molar de 352 g mol⁻¹ (no máximo 1,8 % do odor, Figura 14).

Figura 14 - Substâncias representativas da faixa de massa molar encontrada nas fragrâncias florais de Angiospermas. Fonte: Elaborada pelo autor.

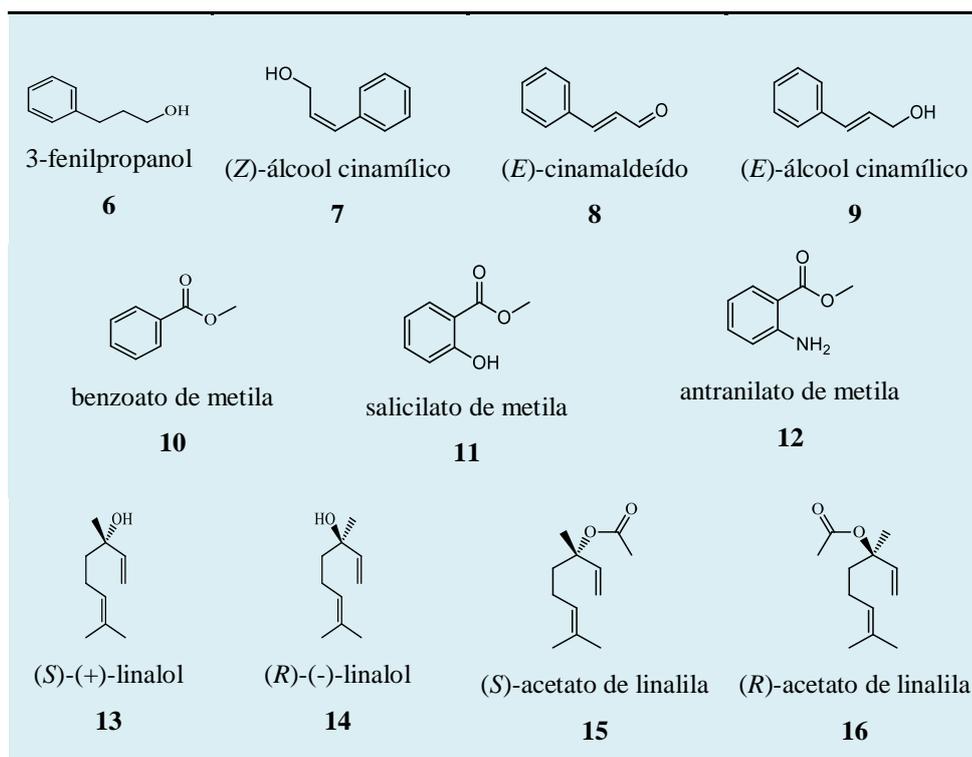


⁴ O *headspace* de uma flor pode ser definido como o ar confinado ao redor de uma flor ou o ar ao redor de uma flor enriquecido por suas emanações de odor (BICCHI; JOULAIN, 1990; THOLL et al., 2006).

Assim, é possível encontrar na fragrância das flores, de um modo geral, substâncias com pequena massa molar, assim como substâncias com massa molar relativamente grande. A Figura 14 exhibe várias substâncias orgânicas voláteis que são representativas da ampla faixa de massa molar que pode ser encontrada na fragrância das flores. Esse é um primeiro aspecto, portanto, que explica a tamanha diversidade de substâncias orgânicas voláteis encontradas nesse órgão vegetal – as flores têm a capacidade de sintetizar substâncias com esqueleto carbônico de tamanhos variados, que vão de um a quase três dezenas de carbonos.

Outro aspecto molecular que contribui para a diversidade estrutural dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) encontrados nas flores é a capacidade deste órgão sintetizar várias substâncias a partir de um mesmo (ou similar) esqueleto carbônico com grupos funcionais variados, diferentes graus de insaturação ou estados de oxidação. Por exemplo, as substâncias **6-9** (Figura 15) possuem o mesmo esqueleto carbônico, porém, **6** e **7** diferem uma da outra somente por uma insaturação; já as substâncias **7** e **9** possuem igual fórmula molecular, mas diferem uma da outra pelo padrão de substituição ao redor da ligação dupla próxima à hidroxila. Já os ésteres metílicos dos ácidos benzóico, salicílico e antranílico diferem apenas na função na posição *orto* (**10-12**).

Figura 15 - Exemplos de COVs encontrados em flores com esqueleto carbônico similar e diferentes funções orgânicas e graus de insaturação. Fonte: Elaborada pelo autor.



As flores também possuem a capacidade de sintetizar substâncias estereoisoméricas, o que aumenta ainda mais o acervo estrutural de COVs disponíveis na natureza (XU et al., 2017). Nesse sentido, há flores cujas espécies produzem apenas um único enantiômero de um determinado composto. Há também espécies que produzem misturas racêmicas e outras produzem misturas com diferentes proporções entre os enantiômeros. As flores de Ylang Ylang (*Cananga odorata*), por exemplo, emitem uma fragrância com 100 % de (*R*)-(-)-linalol (**14**), de modo similar ao que ocorre com as flores de lavandin (*Lavandula x intermedia* var. Grosso) e lavanda (*Lavandula angustifolia*), que emitem quase 100% de **14**. As flores de jasmim, por sua vez, (*Jasminum grandiflorum*) produzem grandes quantidades (84-90%) do isômero (*S*)-(+)-linalol (**8**). As flores de neroli (*Citrus aurantium* Amara) provenientes da Tunísia e do Marrocos produzem quase 100% do enantiômero (*R*)-acetato de linalila (**16**) (CASABIANCA et al., 1998).

Pelos exemplos supracitados fica claro que as flores podem apresentar seletividade na produção de alguns enantiômeros. Tal seletividade tem sido atribuída, em muitos casos, à função de atração exercida por um enantiômero seletivo em determinadas relações de planta-polinizador (RAGUSO, 2016). Um exemplo disso é o que ocorre com a espécie de traça *Mamestra brassicae* (L.), que apresenta dez vezes mais sensibilidade para o enantiômero (*R*)-(-)-linalol do que para (*S*)-(+)-linalol (ULLAND et al., 2006).

Há um equívoco recorrente na literatura científica a respeito de quais classes biossintéticas conteriam os maiores números de substâncias voláteis já identificadas no *headspace* de flores. O mais comum é encontrar trabalhos que afirmam categoricamente que os terpenos seriam a maior classe, seguida pela classe de benzenóides/fenilpropanóides. Por exemplo, em uma revisão dedicada exclusivamente a tratar da biossíntese e das funções dos COVs emitidos por flores e publicada em 2014, Muhlemann, Klempien e Dudareva (2014) afirmam que

Fenilpropanóides e benzenóides representam a segunda maior classe de COVs vegetais e são derivados exclusivamente do aminoácido aromático fenilalanina, que é sintetizado através de duas vias alternativas [ênfase e tradução nossas].

No texto dos autores Kumari, Panwar e Soni (2017) fica ainda mais explícito o equívoco a respeito da importância relativa em termos de números das classes biossintéticas de COVs florais. Em sua revisão dedicada ao odor floral de espécies ornamentais, esses autores anunciaram logo na introdução: “A maior parte dos voláteis de flores pertencem às classes de

terpenóides, benzenóides e fenilpropanóides, mas há também alguns derivados de ácidos graxos, nitrogenados e sulfurados” [tradução nossa].

Quando não há uma afirmação explícita, tais como as aludidas acima, alguns autores constroem seu texto de um modo que influencia o leitor a concluir que os benzenóides e fenilpropanóides constituem a segunda maior classe de COVs em flores. Raguso (2004), por exemplo, um importante pesquisador da área de ecologia química da polinização com formação em botânica, escreve em um capítulo de livro:

As principais classes de compostos de odor de flores são os produtos das vias biossintéticas anabólicas ou catabólicas e incluem os terpenóides C10 (mono) e C15 (sesqui), aromáticos, alifáticos de cadeia curta (C4-C18) e uma variedade de compostos contendo heteroátomos como nitrogênio, enxofre ou oxigênio [tradução nossa].

Segundo Knudsen e Gershenzon (2006), as três classes de COVs mais recorrentes em odor floral extraído por técnicas *headspace*, considerando a origem biossintética, são os terpenóides com 556 substâncias já relatadas, seguidos pelos compostos alifáticos – provenientes da degradação de ácidos graxos de membrana – com 528 substâncias e, logo após, os benzenóides/fenilpropanóides com 329 voláteis. Isto posto, depreende-se que a segunda maior classe de COVs em flores é a classe de compostos alifáticos e não a de benzenóides/fenilpropanóides. Além dessas classes, o odor de flores pode conter outras classes de compostos, o que demonstra que a fragrância floral pode ser bastante heterogênea quanto à origem biossintética de seus constituintes. As classes de compostos C5 de cadeia ramificada, compostos nitrogenados, compostos sulfurados e compostos cíclicos de origem mista são menos frequentes em odor floral (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006; KUMARI; PANWAR; SONI, 2017).

A diversidade estrutural dos COVs, emitidos especificamente por flores foi sistematicamente analisada por Knudsen et al. (2006), que realizaram uma ampla compilação de todos os artigos científicos que descrevem a composição do *headspace* de flores de famílias de Angiospermas até o ano 2006. Como resultado, os autores elaboraram um compêndio de 120 páginas, publicado no *The Botanical Review*, onde listam 1719 COVs de 900 taxa pertencentes a 90 famílias botânicas. É muito provável que o número de COVs de flores tenha aumentado desde então, contudo, o compêndio de Knudsen et al. (2006) permanece com grande relevância para aqueles que desejam conhecer a pluralidade estrutural dos COVs florais de um modo

sistemizado. O grande número de citações (543 no total⁵) deste compêndio até o momento reflete a sua relevância entre os pesquisadores da área da química floral.

A Tabela 4 sintetiza a distribuição de COVs de acordo com a sua origem biossintética (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006).

Tabela 4 - Distribuição de COVs encontrados no headspace do odor de flores de acordo com sua origem biossintética.

CLASSE QUÍMICA	Nº DE COMPOSTOS
Terpenóides	556
<i>Monoterpenos</i>	295
<i>Sesquiterpenos</i>	158
<i>Diterpenos</i>	6
<i>Terpenos irregulares</i>	97
Alifáticos	528
Benzenóides e fenilpropanóides	329
Compostos C5 de cadeia ramificada	93
Compostos nitrogenados	61
Compostos sulfurados	41
Compostos cíclicos de origem mista	111

Fonte: Adaptada de Knudsen & Gershenzon (2006).

A **Figura 16** apresenta a estrutura química de vários COVs representativos de cada uma das classes/subclasses biossintéticas encontradas em odor de flores. Os COVs de **17 a 21** são monoterpenos, uma subclasse dos terpenoides, que possui um grande número de substâncias diferentes identificadas em flores – 295 substâncias. Os COVs **22 a 26** são sesquiterpenos, subclasse dos terpenoides com 15 átomos de carbono em sua estrutura; os sesquiterpenos possuem menor diversidade de compostos em odor de flores, em comparação aos monoterpenos – até o momento foram identificadas 158 diferentes estruturas desta subclasse. Os terpenos irregulares⁶, outra subclasse de terpenoides, são ainda menos comuns em flores do que seus pares terpênicos – até o momento foram encontrados 97 destes compostos – **45-49**. Os diterpenos, por sua vez, são apenas 6 descritos em odor de flores. Juntas, estas subclasses

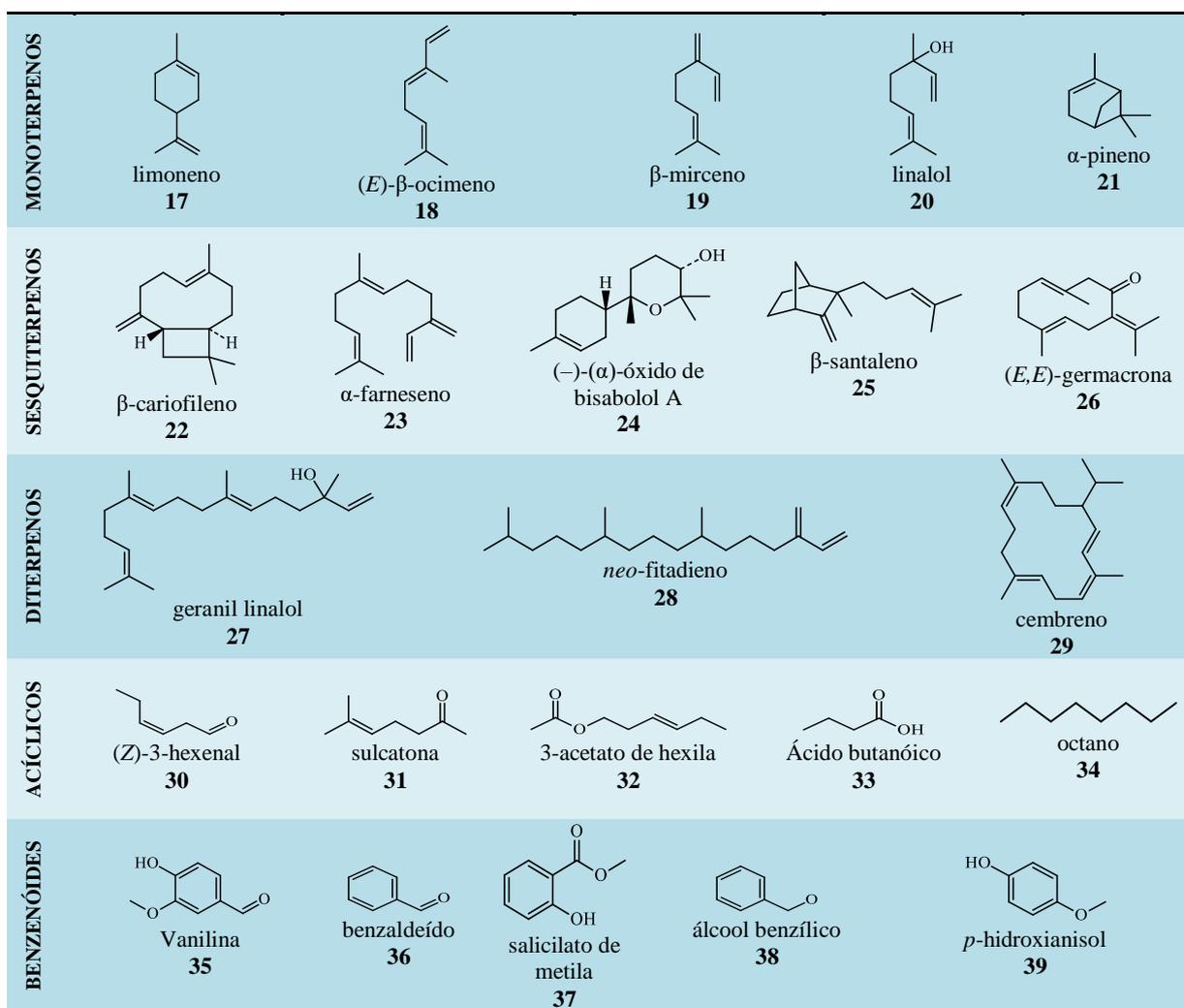
⁵ Número de citações consultado na base SCOPUS em 10 de julho de 2018

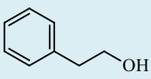
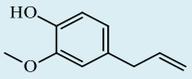
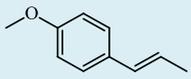
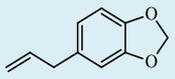
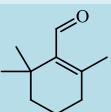
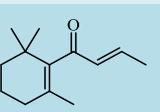
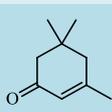
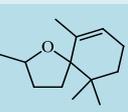
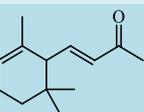
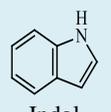
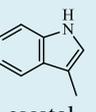
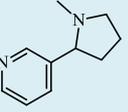
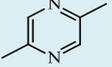
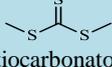
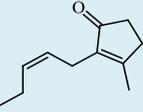
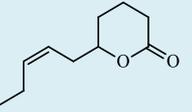
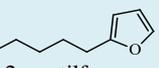
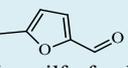
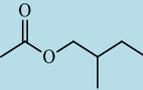
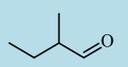
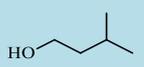
⁶ Para uma leitura mais ampla a respeito dos terpenos irregulares, consulte: Pichersky & Raguso. Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytologist*, v. 220, n. 3, p. 692-702, 2018.

formam a maior classe de compostos que são emanadas por flores (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006).

É fácil compreender a irrisória diversidade de diterpenos que são encontrados no *headspace* de flores, basta que nos lembremos da baixa pressão de vapor destes compostos (PERRING, 2006). Considerando que a função primordial do odor de flores é a atração de insetos via comunicação química, cujo meio de transporte de tal linguagem são as correntes de ar (SZYSZKA, 2014; RIFFELL et al., 2014), é imprescindível que as flores invistam seus gastos energéticos na biossíntese de compostos que possam ser facilmente volatilizados e, dessa maneira, encontrem o alvo da comunicação.

Figura 16 - COVs representativos das onze classes/subclasses biossintéticas encontradas na fragrância de flores na natureza. Fonte: Elaborada pelo autor.



FENILPROPA- NÓIDES C6-C3 e C6-C2	 2-feniletanol 40	 eugenol 41	 anetol 42	 Safrol 43	
TERPENO IRREGULAR	 β -ciclocitral 45	 (<i>E</i>)- β -damascona 46	 Isoforona 47	 teaspirano 48	 α -ionona 49
NITROGE- NADOS	 Indol 50	 escatol 51	 Nicotina 52	 Imidazol 53	 2,5-dimetilpirazina 54
SULFURADOS	 tiofeno 55	 disulfeto de dimetila 56	 tritiocarbonato de dimetila 57	 tioacetato de metila 58	 sulfóxido de metila 59
Origem mista	 <i>cis</i> -jasmona 60	 jasmin lactona 61	 2-pentilfurano 62	 5-metilfurfural 63	 3-metil- ciclopenteno 64
C5 RAMIFICADOS	 2-metilbutano 65	 3-metil-2-butanona 66	 Acetato de 2- metilbutil 67	 2-metilbutanal 68	 HO-2-metilbutanol 69

Como pode ser visto na Figura 16, os terpenoides (17-29 e 45-49) apresentam ampla gama de funções orgânicas e variados esqueletos carbônicos. Há moléculas terpênicas com esqueletos carbônicos alifáticos (18-20, 23, 27, 28) e cíclicos (17, 21, 22, 24-26, 29, 45-49); há ainda terpenos bicílicos (21, 22, 25). Ademais, podem ser encontradas entre os terpenos, uma gama imensa de funções, entre as quais éter (24), álcool (20), cetona (26), lactona (47), aldeído (35) e outras.

Os monoterpenos limoneno (17), (*E*)- β -ocimeno (18), mirceno (19) e linalol (20) ocorrem em mais de 70% do *headspace* das flores analisadas até o momento, enquanto o α -pineno ocorre em 67% delas, já o sesquiterpeno β -cariofileno (22) ocorre em 52% de todas as flores já investigadas (KNUDSEN, 2006).

Alguns exemplos de compostos da segunda maior classe de COVs em flores estão listados na Figura 16 (30-34). Costumam ser compostos de cadeia curta e podem apresentar

diversas funções orgânicas, tais como aldeído (30), cetona (31), éster (32), ácido carboxílico (33) e outras.

Alguns importantes representantes da terceira maior classe de COVs em flores, benzenóides/fenilpropanóides, podem ser vistos entre os compostos 35-44.

2 A IMPORTÂNCIA RELATIVA DOS COMPOSTOS EM UM PERFIL VOLÁTIL PARA O ODOR

Cada espécie de planta tem a capacidade de sintetizar e emitir, a partir de suas flores, um conjunto único de compostos voláteis. Certo número de substâncias voláteis, emitidas numa proporção bem definida, é o que determina o odor que uma pessoa sente ao cheirar uma determinada flor (SURBURG; GUENTERT; HARDER, 1993; DELAHUNTY; EYRES; DUFOUR, 2006). Analogamente ocorre para o caso dos insetos (RAGUSO, 2008; RIFFELL et al, 2014).

Em termos de atributos sensoriais, os óleos essenciais e outros derivados obtidos de flores e usados em perfumaria, assim como as matérias primas de outras fontes, são classificados em três categorias de acordo com a relação de importância relativa de seus constituintes para a percepção de seu odor (PETRZLLKA; EHRET, 1991):

- a) Na primeira categoria se encontram aquelas misturas cujo odor característico se deve a um ou poucos constituintes voláteis majoritários e os compostos minoritários praticamente não contribuem para o odor.
- b) A segunda categoria é composta por misturas cujo odor se deve principalmente a alguns compostos majoritários, porém, alguns compostos minoritários e em nível de traço são importantes para dar ao odor uma característica mais próxima a natural.
- c) Na terceira categoria, o odor característico de uma mistura não pode ser alcançado sem um balanço sutil entre os compostos minoritários, de nível traço e de alguns majoritários. Contudo, nesta categoria, nenhum dos compostos majoritários contribui decisivamente para o atributo sensorial da mistura.

Várias matérias primas provenientes de flores e usadas em perfumaria pertencem à primeira categoria (BALDOVINI; FILIPPI, 2017). Este é o caso do óleo essencial das flores de rosas que, independente de sua variedade, pode ter sua fragrância reconstituída a partir dos COVs 2-feniletanol, citronelol, geraniol e nerol, sendo que a introdução de seus acetatos

correspondentes torna a fragrância mais harmoniosa. Como se pode ver, com apenas quatro substâncias é possível reconstituir adequadamente o odor de uma rosa (XIAO et al., 2017, 2018; FLAMENT; DEBONNEVILLE; FURRER, 1993; MANNSCHRECK; ANGERER, 2011).

O absoluto de flor de mimosa (*Acacia dealbata*), por sua vez, pertence à terceira categoria, pois, embora o absoluto desta flor contenha 232 compostos, seu odor característico é atribuído somente aos compostos minoritários e de nível traço, enquanto os compostos majoritários não contribuem para a percepção olfativa. Além disso, o odor característico dessa flor não pode ser reconstituído com poucas substâncias voláteis, como são os casos das fragrâncias de rosas ou jasmim. O perfume de mimosa deve ser reconstituído por, pelo menos, 37 substâncias, entre as quais fenilacetaldéido, 2-feniletanol, acetato de benzila, e (*Z*)-jasmona foram os principais COVs a darem o atributo floral, enquanto os aldeídos hexanal, heptanal, nonanal, e (*E,Z*)-nona-2,6-dienal contribuem com atributos frescos e verdes para o perfume. Já vanilina, anisatos de metila e etila dão atributos doces e de anis (PERRIOT et al., 2010).

Sob um ponto de vista de comunidade, a diversidade de fragrâncias encontrada num determinado local tende a ser maior quanto maior for a diversidade vegetal, já que flores de diferentes espécies de plantas contribuem com padrões de voláteis diferentes para o odor global da comunidade. Nesse aspecto, a diversidade de voláteis de uma determinada comunidade é parte intrínseca da complexidade vegetal (RANDLKOFER et al., 2010). Além disso, variações entre cultivares, entre indivíduos de uma mesma espécie, entre espécies de um gênero e mesmo entre estágios de desenvolvimento contribuem para a complexidade de voláteis de uma comunidade e tal complexidade afeta diretamente a sua dinâmica (MEINERS, 2016; MARTIN et al., 2017).

Ainda sobre a diversidade de voláteis em flores na natureza, é preciso ter em mente que, embora tenham sido descobertos 1719 voláteis no *headspace* de flores, considerando o compêndio de Knudsen e Gershenzon (2006), o potencial combinatório desses voláteis, somado a abundância relativa entre eles, pode produzir um número imensurável de fragrâncias florais (MONTERO et al., 2016; JUNKER; PARACHNOWITSCH, 2015; KNUDSEN; GERSHENZON, 2006; KNUDSEN et al., 2006; PICHERSKY; RAGUSO, 2016).

3 LOCALIZAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE VOLÁTEIS NOS ÓRGÃOS FLORAIS

As substâncias voláteis exaladas pelas flores podem ser produzidas e emitidas em diferentes partes da própria flor a partir de estruturas glandulares denominadas genericamente como osmóforos (RAGUSO; GOTTSBERGER, 2017). Em geral, a biossíntese de COVs ocorre

nas células epidérmicas das pétalas, em sua porção mais superficial, o que facilita o processo de difusão dos voláteis e sua conseqüente liberação à atmosfera (WIDHALM et al., 2015). Além das pétalas, tem sido relatada a produção e emissão de voláteis em outras partes da flor tais como nas sépalas, anteras, estames, carpelos, nectário e outras. Têm sido relatadas na literatura células de diferentes formas em tecidos florais (EFFMERT et al., 2006); a Figura 17 exhibe a representação esquemática de células epidérmicas que são comumente relatadas.

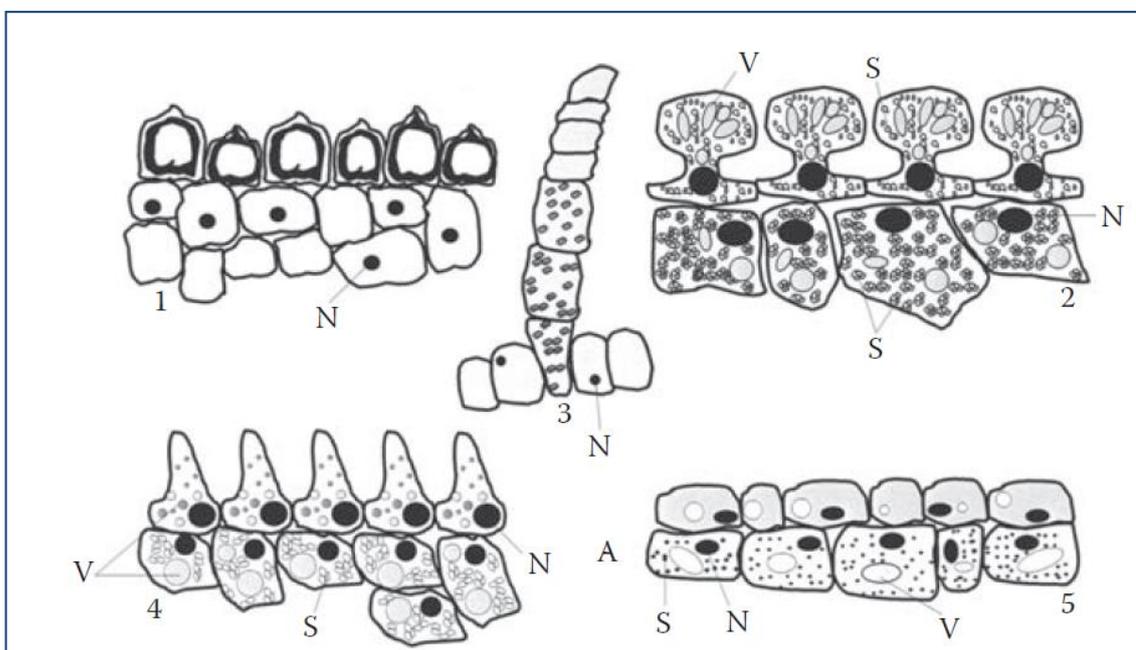
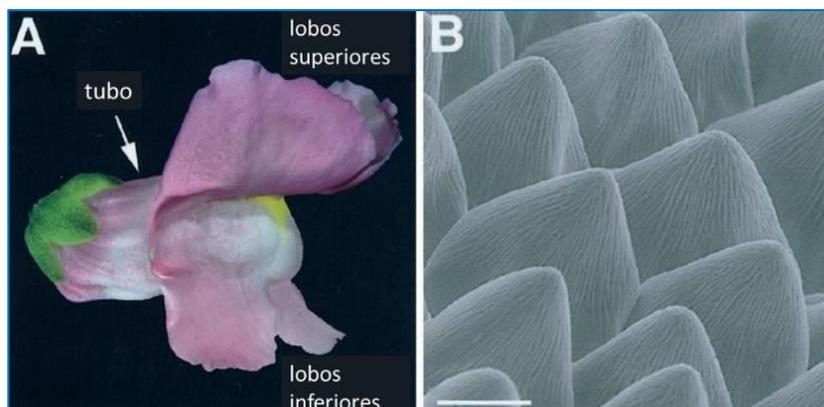


Figura 17. Representação esquemática de diferentes células epidérmicas responsáveis pela biossíntese de COVs em tecidos florais. Fonte: EFFMERT et al., 2006.

Kolosova et al. (2001) determinaram através de imunolocalização por microscopia eletrônica e de fluorescência a localização da produção de voláteis nas flores de *Antirrhinum majus* (cv Maryland True Pink). Os autores verificaram que a biossíntese de COVs nas flores desta espécie vegetal é restrita nas pétalas, mais especificamente nos lobos superiores e inferiores (*upper e lower lobes*), conforme é destacado na Figura 18A. Além disso, os autores demonstraram que as flores de *Antirrhinum majus* produzem os COVs florais em células cônicas da superfície epidérmica (Figura 18B).

Figura 18 - Localização da biossíntese de COVs em *Antirrhinum majus*. (A) Flores de *A. majus*; (B) Células cônicas na superfície interna das pétalas de *A. majus* responsáveis pela produção e emissão de fragrância floral. Fonte: Adaptado de BOATRRIGHT et al. (2004).



Do mesmo modo que nas flores de *A. majus*, a biossíntese de COVs na espécie *Petunia hybrida* (cv Mitchell) também ocorre exclusivamente na borda das pétalas de suas flores (BOATRRIGHT et al., 2004). Estes autores analisaram várias partes da flor desta espécie (sépalas, tubo, borda da pétala, estigma e estilete, estame e ovários) por meio de marcação isotópica, sequenciamento de DNA e análise por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (CL-EM) para chegar nessa conclusão.

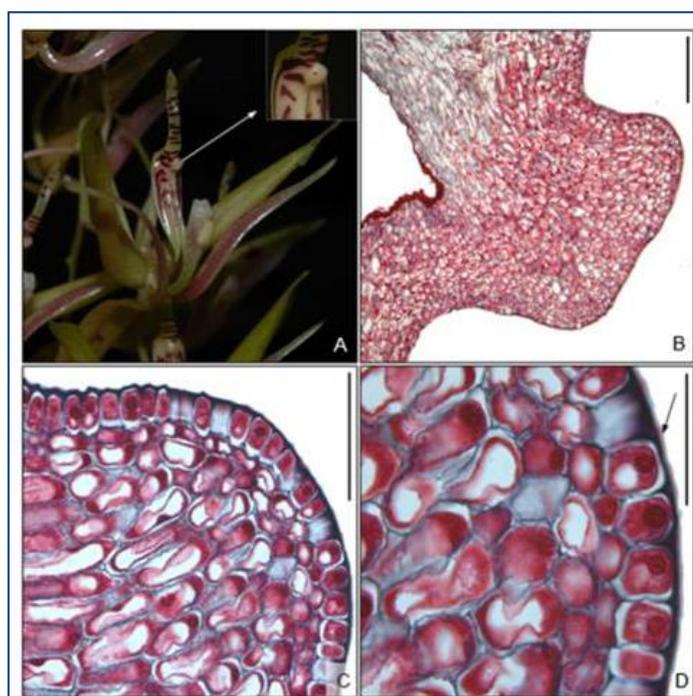
Diferentemente das flores de *P. hybrida*, que produz e emite sua fragrância exclusivamente através de suas pétalas, as flores de *Clarkia breweri*, por sua vez, produzem e emitem sua fragrância através de diferentes órgãos florais. Os principais compostos exalados por esta espécie são os monoterpenos linalol e os seus óxidos. Do total de linalol produzido e emitido pelas flores desta espécie num período de 24 h (23,37 μg), 60% é exalado pela flor a partir das pétalas, enquanto que o restante é produzido e emitido pelos órgãos florais estame e pistilo. Em contrapartida, os óxidos de linalol (forma piranóide e forma furanóide) são produzidos e emitidos quase exclusivamente por meio do órgão floral pistilo e não das pétalas. As flores de *C. concinna*, por sua vez, produzem e emitem sua fragrância (linalol e seus óxidos) apenas no pistilo, já que nenhum volátil foi detectado em outros órgãos florais (PICKERSKY et al., 1994). Em trabalho posterior, Wang et al. (1997) encontraram resultados similares para a produção e emissão de fenilpropanoides em *C. breweri*. A biossíntese de fenilpropanoides nesta espécie ocorre nos mesmos órgãos florais em que são emitidos: o estame, o estilete e o estigma, enquanto as sépalas e as folhas não produzem nem emitem fenilpropanoides.

Os estudos de Pickersky e seu grupo com as espécies *C. breweri* e *C. concinna* foram importantes para o campo da química floral devido à consolidação do conhecimento a respeito

da localização da biossíntese de COVs em flores. Seus estudos sobre a localização da atividade enzimática em tecidos florais contribuíram para consolidar o entendimento de que as flores produzem os voláteis no mesmo órgão vegetal onde ocorre a sua emissão, isto é, não é necessário produzir voláteis em um órgão floral para, em seguida, transportar para outro órgão no qual serão exalados (PICKERSKY et al., 1994; DUDAREVA et al., 1996; WANG et al., 1997).

Na espécie endêmica brasileira *Cirrhaea dependens* (Orchidaceae), as células que respondem pela produção de fragrância se encontram principalmente na protuberância cilíndrica do labelo, conforme pode ser visto na Figura 19. Neste tecido floral é possível identificar que uma única camada de células epidérmicas com forma relativamente uniforme compõe a estrutura do osmóforo nesta espécie (Figura 19C). Logo após a primeira camada de células do osmóforo, é possível ver as células parênquimas abaixo dessa camada de células especializadas na biossíntese de COVs. Outras espécies do gênero *Cirrhaea* também possuem estrutura celular do osmóforo similar à espécie *C. dependens* (PANSARIN; PANSARIN; SAZIMA, 2014).

Figura 19 - *Cirrhaea dependens*. (A) Flor em visão frontal. No detalhe destacado é possível ver a protuberância do labelo em que se concentram as células responsáveis pela biossíntese de COVs. (B) Seção transversal da protuberância do labelo. (C) Detalhe do labelo.



4 PRINCIPAIS ROTAS BIOSSINTÉTICAS USADAS PELAS FLORES PARA A PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

4.1 Terpenóides

Conforme mencionados anteriormente, levando em consideração a origem biossintética, a maior classe de COVs encontrados em *headspace* floral é a de terpenos (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006). Os terpenos são formados a partir de dois precursores comuns de cinco unidades de carbono (C₅): o difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de demetilalila (DMAPP), ambos interconversíveis. A formação dos terpenos ocorre por meio de duas rotas biossintéticas, que são compartimentalizadas na célula: a rota do ácido mevalônico (MVA) e a rota do fosfato de metileritritol (MEP). Cada rota responde majoritariamente por uma ou mais subclasses de terpenos. Nesse sentido, a rota MEP opera nos plastídeos e produz principalmente monoterpenos (C₁₀) e diterpenos (C₂₀) (DEWICK, 2009). Já a rota MVA ocorre no citosol, retículo endoplasmático e peroxissomo e produz principalmente sesquiterpenos (Figura 20).

A formação dos blocos básicos de construção dos terpenos (IPP e DMAPP) ocorre através de uma série de reações enzimáticas. Basicamente, a rota MEP começa com a condensação do D-gliceraldeído 3-fosfato com o piruvato e envolve sete reações catalisadas por enzimas; a rota MVA, por sua vez, ocorre por meio de seis reações enzimáticas e é iniciada pela condensação de três moléculas de acetil-CoA (MUHLEMANN; KLEMPIEN; DUDAREVA, 2014).

Por muito tempo acreditava-se que a formação de monoterpenos em plantas ocorria unicamente através da rota MEP no plastídeo (SUN et al., 2016). Entretanto, um estudo recente conduzido por Magnard et al. (2015) demonstrou que a formação de monoterpenos em dois cultivares de *Rosa x hybrida* (Papa meilland e Rouge Meilland) ocorre no citoplasma e não nos plastídeos, como é tradicionalmente aceito. Além disso, os autores demonstraram por meio de abordagens genéticas e transcriptômicas que, nos cultivares estudados, ao invés de enzimas terpeno sintases são as enzimas da família NUDX1 que catalisam a formação de vários monoterpenos, tais como o geraniol, nerol, citronelol, β-mirceno, (Z)-β-ocimeno, (E)-β-ocimeno e também sesquiterpenos, como (E)-α-farneseno, farnesol e farnesal.

Outra descoberta importante em relação a rotas alternativas foi realizada por Akhta et al. (2013). Estes autores demonstraram que nos tricomas de folhas de tomate os sesquiterpenos

podem ser produzidos via rota MEP nos plastídeos, ao invés de serem produzidos no citosol como é tradicionalmente aceito.

Assim, nos últimos anos tem sido demonstrado que algumas espécies de plantas podem usar rotas alternativas para produzir algumas substâncias voláteis terpênicas (BORGHI et al., 2017; MAGNARD et al., 2015; AKHTAR et al., 2013; THOLL; GERSHENZON, 2015). Algumas destas descobertas mais recentes estão sintetizadas na Figura 20, onde a cor vermelha foi usada para assinalar rotas não canônicas. A esse respeito, os autores SUN et al. (2016) fizeram uma revisão onde abordam as várias descobertas recentes sobre rotas metabólicas não canônicas. Nesta revisão é possível encontrar uma descrição mais detalhada sobre as descobertas mais recentes da biossíntese de voláteis em plantas.

4.2 Voláteis derivados de ácidos graxos

A segunda maior classe de COVs, considerando sua origem biossintética –voláteis derivados de ácidos graxos (VDAG) –, é produzida a partir da degradação de ácidos graxos insaturados C₁₈, sendo os principais substratos o ácido linoleico e o ácido linolênico (DUDAREVA et al., 2013; WASTERNAK; FEUSSNER, 2018). Em plantas, a biossíntese de ácidos graxos que servem como substratos para os VDAGs ocorre nos plastídios, enquanto que em animais e em fungos ocorre no citosol (OHLROGGE; BROWSE, 1995). Uma descrição mais detalhada de como se dá a produção de ácidos graxos, a partir da condensação do acetil-CoA com o malonil-CoA, pode ser encontrada no livro-texto intitulado *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach* (DEWICK, 2009) ou no artigo de revisão com título *Lipid Biosynthesis* de Ohlrogee e Browse (1995). O doador central de carbonos para a produção dos ácidos graxos é o malonil-CoA, contudo, antes de entrar na síntese de ácidos graxos o grupo malonil é convertido de seu grupo CoA a um grupo ACP (*acyl carrier protein* \proteína carreadora de grupo acila); de modo similar, o acetil-CoA participa da etapa de condensação com o auxílio de uma enzima ligada por uma ligação tioéster (DEWICK, 2009).

A principal rota biossintética responsável pela degradação de ácidos graxos e, dessa maneira, responsável por produzir os VDAGs, é chamada rota lipoxigenase e é comumente abreviada na literatura científica como rota LOX. Essa rota guarda esse nome devido à família de enzimas responsáveis pelo início da biossíntese e são comumente encontradas em Angiospermas. No caso de animais, essa rota pode ser catalisada por ciclo-oxigenases (COX) ou enzimas P450 (WASTERNAK; FEUSSNER, 2018).

A rota LOX é dividida em duas ramificações: ramificação 9-LOX e 13-LOX. Essa classificação é dependente da especificidade do produto formado das enzimas LOX. A

degradação de ácidos graxos por enzimas LOX é regio e estereoespecífica, já que o substrato pode ser oxigenado em seu carbono 9 ou em seu carbono 13, conforme a especificidade da enzima, e um hidrogênio H_S ou H_R é abstraído numa primeira etapa na reação catalisada por uma lipoxigenase (FEUSSNER; KÜHN; WASTEMACK, 2001; WASTERACK; FEUSSNER, 2018).

Em resumo, os ácidos linoleico e linolênico atuam como precursores de uma ampla variedade de voláteis derivados de ácidos graxos. Estes lipídeos são oxidados por uma enzima da família das lipoxigenases, que promovem oxidação no carbono 9 ou no carbono 13 do lipídeo, a depender da regioespecificidade da enzima responsável pela reação (ANDREOU; FEUSSNER, 2009). Essa oxidação regioespecífica catalisada por enzimas LOX resulta nos intermediários 9-hidroperóxidos e 13-hidroperóxidos que, por sua vez, são convertidos nos VDAGs por outras enzimas responsáveis por uma série de reações de modificações (FEUSSNER; WASTERACK, 2002).

4.3 Fenilpropanóides/benzenóides

Os fenilpropanóides/benzenóides são uma classe de COVs que pode ser dividida em três subclasses: (1) fenilpropanóides (C_6-C_3), (2) Benzenóides (C_6-C_1) e (3) compostos C_6-C_2 relacionados aos fenilpropanóides (DUDAREVA et al., 2013). Segundo Knudsen e Gershenzon (2006), esta classe constitui a terceira maior encontrada no *headspace* de flores.

Em geral, estes compostos são derivados do aminoácido aromático fenilalanina (Figura 20), que pode ser produzido a partir da via do chiquimato por duas rotas. As duas rotas ocorrem basicamente nos plastídeos. Contudo, a produção dos COVs da classe de fenilpropanóides/benzenóides por meio da fenilalanina ocorre fora dos plastídeos, no citosol e nos peroxissomos; também podem ocorrer algumas modificações estruturais nas mitocôndrias e nos vacúolos (MUHLEMANN; KLEMPEN; DUDAREVA, 2014).

Para a produção dos benzenóides (C_6-C_1), a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) promove a deaminação da fenilalanina no citosol produzindo ácido *trans*-cinâmico. Após isso, uma série de etapas promove o encurtamento da cadeia lateral via rota β -oxidativa nos peroxissomos ou via rota não oxidativa no citosol ou mesmo uma combinação dessas duas rotas (WIDHALM; DUDAREVA, 2015).

Dentre os compostos C_6-C_2 , a biossíntese mais conhecida e estudada é a do 2-feniletanol por ser muito importante para a indústria de perfumaria na reconstituição do odor de rosas. A biossíntese dos compostos dessa subclasse se dá por meio da reação catalisada pela enzima

fenilacetaldeído sintase, que promove a deaminação. Em seguida, outras etapas catalisadas por enzimas promovem a modificação estrutural produzindo vários compostos (HIRATA; OHNISHI; WATANABE, 2016).

A formação de COVs como o eugenol, com esqueleto carbônico do tipo C₆-C₃, ocorre através da etapa inicial de deaminação da fenilalanina que produz ácido *trans*-cinâmico; este, por sua vez, ao ser submetido a enzima cinamato-4-hidroxilase produz o ácido *p*-cumárico que, através de uma série de etapas enzimáticas, promove a formação de vários compostos dessa subclasse (DENG; LU, 2017).

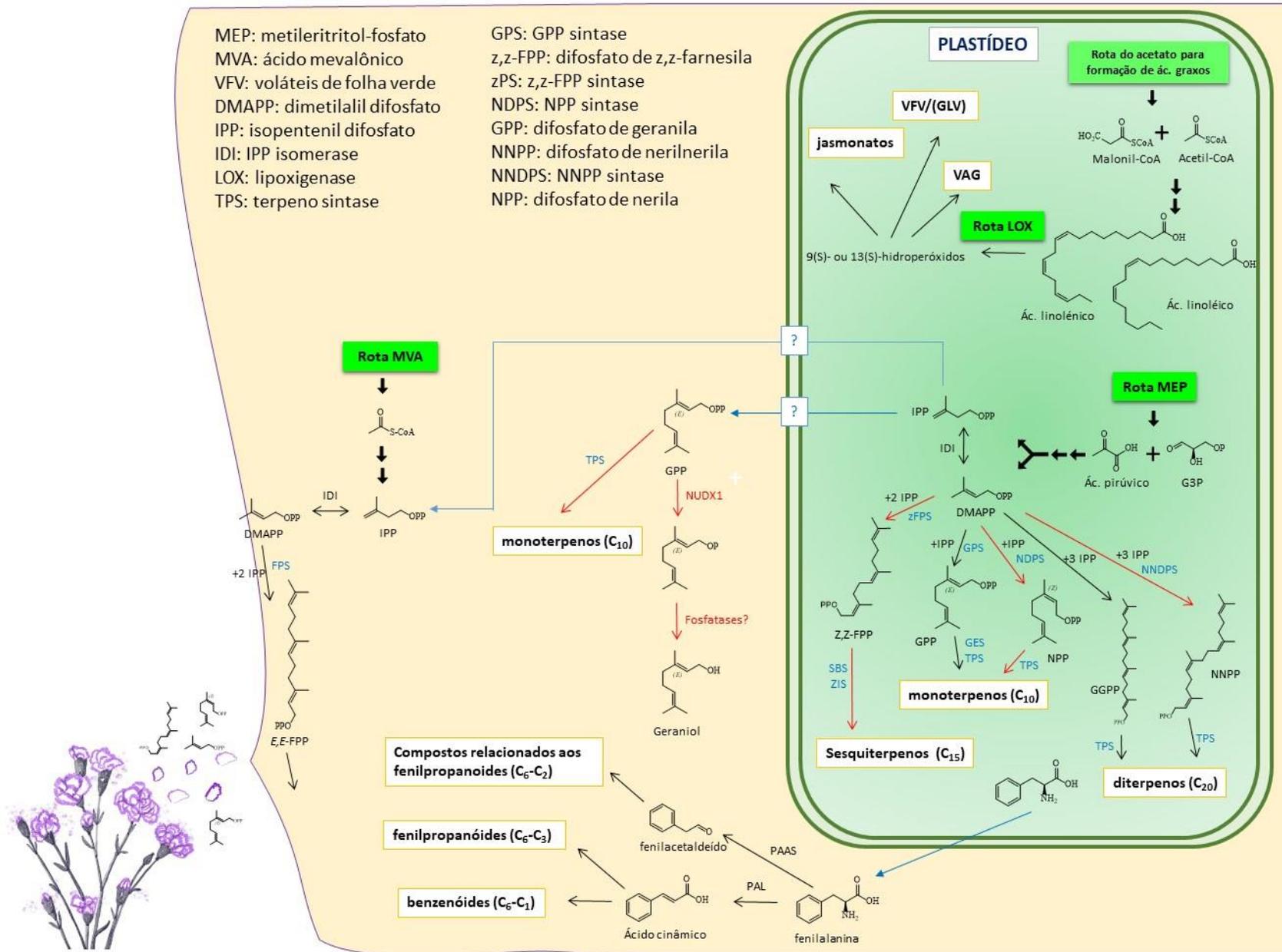


Figura 20. Rotas biossintéticas das principais classes de voláteis emitidos por flores e capturados por headspace dinâmico. Fonte: Elaborada pelo autor.

5 REFERÊNCIAS

- AKHTAR, T. A.; MATSUBA, Y.; SCHAUVINHOLD, I.; YU, G.; LEES, H. A.; KLEIN, S. E.; PICHERSKY, E. The tomato cis–prenyltransferase gene family. **Plant J.**, v. 73, p. 640-652, 2013.
- ANDREOU, A.; FEUSSNER, I. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1504-1510, 2009.
- BALDOVINI, N.; FILIPPI, J.-J. Natural fragrant raw materials. In: BUETTNER, A. **Springer Handbook of odor**, Springer, 2017, p. 39-62.
- BOATRIGHT, J.; NEGRE, F.; CHEN, X.; KISH, C. M.; WOOD, B.; PEEL, G.; ORLOVA, I.; GANG, D.; RHODES, D.; DUDAREVA, N. Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in Petunia Petal Tissue. **Plant Physiol.**, v. 135, p. 1993-2011, 2004.
- BORGHI, M.; FERNIE, A. R.; SCHIELSTL, F. P.; BOUWMEESTER, H. J. The floral advantage of looking, smelling, and tasting good: the metabolic network that produces signals for pollinators. **Trend Plant Sci.**, v. 22, n. 4, p. 338-350, 2017.
- CALKIN, R. R.; JELLINEK, J. S. **Perfumery: practice and principles**. New York: Wiley, 1994. 304 p.
- CASABIANCA, H.; GRAFF, J. B.; FAUGIER, V.; FLEIG, F.; GRENIER, C. Enantiomeric Distribution Studies of Linalool and Linalyl Acetate. A Powerful Tool for Authenticity Control of Essential Oils. **J. High Resol. Chromatogr.**, v. 21, n. 2, p. 107-112, 1998.
- DELAHUNTY, C. M.; EYRES, G.; DUFOUR, J.-P. Gas chromatography-olfactometry. **J. Sep. Sci.** v. 29, p. 2107–2125, 2006.
- DENG, Y.; LU, S. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants, **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 36, n. 4, p. 257-290, 2017.
- DUDAREVA, N.; CSKE, L.; BLANC, V. M.; PICKERSKY, E. Evolution of Floral Scent in *Clarkia*: Novel Patterns of S-Linalool Synthase Gene Expression in the *C. breweri* Flower. **Plant Cell**, v. 8, p. 1137-1148, 1996.
- DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, p. 16-32, 2013.
- DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New phytologist**, v. 198, p. 16-32, 2013.

- EFFMERT, U.; BUSS, D.; ROHRBECK, D.; PIECHULLA, B. Localization of the Synthesis and Emission of Scent Compounds within the Flower. In: DUDAREVA, N. & PICHERSKY, E. (eds.) **Biology of floral scent**. Boca Raton, Florida: Taylor e Francis, 2006, p. 105-124.
- FEUSSNER, I.; KÜHN, H.; WASTERACK, C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. **Trends Plant Sci.**, v. 6, n. 6, p. 268-273, 2001.
- FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. The lipoxygenase pathway. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 53, p. 275–297, 2002.
- FLAMENT, I.; DEBONNEVILLE, C.; FURRER, A. Volatile constituents of roses: characterization of cultivars based on the headspace analysis of living flower emissions. In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SUGISAWA, H. **Bioactive Volatile Compounds from Plants.**; Eds., American Chemical Society, Washington, 1993, p. 269-2681.
- HANDA SS, KHANUJA SPS, LONGO G, AND RAKESH DD. 2008. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. In: HANDA, S. S.; KHNUJA, S. P S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. Trieste: ICS UNIDO., 2008. 260 p.
- HILKER, M. New Synthesis: Parallels Between Biodiversity and Chemodiversity. *J. Chem. Ecol.*, v. 40, p. 225–226, 2014.
- HIRATA, H.; OHNISHI, T.; WATANABE, N. Biosynthesis of floral scent 2-phenylethanol in rose flowers. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, v. 80, n 10, p. 1865-1873, 2016.
- HUMMEL, M.; MIGUEL, L. A. P. Gerando valor na cadeia de flores de corte no mercado brasileiro. **Práticas em Contabilidade e Gestão**, v. 5, n. 1, p. 176-191, 2017.
- ISHIZAKA, H.; YAMADA, H.; SASAKI, K. Volatile compounds in the flowers of *Cyclamen persicum*, *C. purpurascens* and their hybrids. **Sci. Hortic.**, v. 94, p. 125-135, 2002.
- JUNKER, R. R.; PARACHNOWITSCH, A. L. Working Towards a Holistic View on Flower Traits—How Floral Scents Mediate Plant–Animal Interactions in Concert with Other Floral Characters. **J. Indian Inst. Sci.**, v. 95, n. 1, p. 43-67, 2015.
- JÜRGENS, A.; VILJOEN, A.M. Chemical diversity and biological functions of plant volatiles, **S. Afr. J. Bot.**, v. 76, p. 607–611, 2010.
- KAISER, R. On the scent of Orchids. In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SUGISAWA, H. **Bioactive Volatile Compounds from Plants.**; Eds., American Chemical Society, Washington, 1993, p. 240-268.

- KNUDSEN, J. T.; ERIKSSON, R.; GERSHENZON, J.; STÅHL, B. Diversity and distribution of floral scent. **Bot. Rev.**, v. 72, p. 1-120, 2006.
- KNUDSEN, J. T.; ERISSON, R.; GERSHENZON, J.; STÅHL. Diversity and Distribution of Floral Scent. **Bot. Rev.**, v. 72, n. 1, p. 1-120, 2006.
- KNUDSEN, JT & GERSHENZON, J. The chemical diversity of floral scent. In: Dudareva, N. & Pichersky, E. (eds.) **Biology of floral scent**. Boca Raton, Florida: Taylor e Francis, 2006.
- KNUDSEN, JT & GERSHENZON, J. The chemical diversity of floral scent. In: DUDAREVA, N. & PICHERSKY, E. (eds.) **Biology of floral scent**. Boca Raton, Florida: Taylor e Francis, 2006.
- KOLOSOVA, N.; SHERMAN, D.; KARLSON, D.; DUDAREVA, N. Cellular and Subcellular Localization of S-Adenosyl-L-Methionine: Benzoic Acid Carboxyl Methyltransferase, the Enzyme Responsible for Biosynthesis of the Volatile Ester Methylbenzoate in Snapdragon Flowers. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 956-964, 2001.
- KUMARI, P.; PANWAR, S.; SONI, A. Biosynthesis, Composition and Sources of Floral Scent in Ornamental Crops: A Review. **Chem. Sci. Rev. Lett.**, v. 6, n. 23, p. 1502-1509, 2017.
- LOUGHRIN, J. H.; HAMILTON-KEMP, T. R.; ANDEMEN, R. A.; HILDEBRAND, D. F. Headspace Compounds from Flowers of *Nicotiana tabacum* and Related Species. **J. Agric. Food chem.**, v. 38, n. 2, 1990.
- MAGNARD, J-L.; ROCCIA, A.; CAISSARD, J.-C.; VERGNE, P.; SUN, P.; HECQUET, R.; DUBOIS, A.; OYANT, L. H.-S.; JULLIEN, F.; NICOLÈ, F.; RAYMOND, O.; HUGUET, S.; BALTENWECK, R.; MEYER, S.; CLAUDEL, P. JEAUFFRE, J.; ROHMER, M.; FOUCHER, F.; HUGUENEY, P.; BENDAHMANE, M.; BAUDINO, S. Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses. **Science**, v. 349, n. 6243, p. 81-83, 2015.
- MANNSCHRECK, A.; ANGERER, E. The Scent of Roses and Beyond: Molecular Structures, Analysis, and Practical Applications of Odorants. **J. Chem. Educ.** V. 88, p. 1501–1506, 2011.
- MARTIN, K. R.; MORÉ, M.; HIPÓLITO, J.; CHARLEMAGNE, S.; SCHLUMPBERGER, B. O.; RAGUSO, R. A. Spatial and temporal variation in volatile composition suggests olfactory division of labor within the trap flowers of *Aristolochia gigantea*. **Flora**, v. 232, p. 153–168, 2017.

- MEINERS, T. Ecological Role of Odour Diversity. In: BLANDE, J. D.; GLINWOOD, R. (Eds.) Deciphering Chemical Language of Plant Communication. **1^a ed., Suíça: Springer**, 2016, p. 137-151.
- MONTERO, D. A. V.; MARQUES, M. O. M.; MELETT, L. M. M.; KAMPEN, M. H. V.; POLOZZI, S. C. Floral scent of brazilian *Passiflora*: five species analysed by dynamic headspace. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 88, n. 3, p. 1191-1200, 2016.
- MUHLEMANN, J. K.; KLEMPIEN, A.; DUDAREVA, N. Floral volatiles: from biosynthesis to function. **Plant, Cell Environ.**, v. 37, p. 1936–1949, 2014.
- OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 957-970, 1995.
- OMATA, A.; YOMOGIDA, K.; NAKAMURA, S.; OTA, T.; TOYODA, T.; AMANO, A.; MURAKI, S. New sulphur components of rose oil. **Flavour Fragrance J.**, v. 6, n. 2, p. 149-152, 1991.
- PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Osmophore structure and phylogeny of *Cirrhaea* (Orchidaceae, Stanhopeinae). **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 176, p. 369-383, 2014.
- PERRING, K. D. Volatility and Substantivity. In: SELL, C. (Ed.) The Chemistry of Fragrances From Perfumer to Consumer, 2^aed. Cambridge: RSC Publishing, 2006, p. 199-213.
- PERRIOT, R.; BREME, K.; MEIERHENRICH, U. J.; CARENINI, E.; FERRANDO, G.; BALDOVINI, N. Chemical Composition of French Mimosa Absolute Oil. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 1844–1849, 2010.
- PETRZILKA, M.; EHRET, C. Natural products. In: MÜLLER, P. M.; LAMPARSKY, D. (Eds.) **Perfumes: Art Science and Technology**, London: Springer Netherlands, 1991, p. 499-532.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. **Science**, v. 311, p. 807-811, 2006.
- PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A. Why do plants produce so many terpenoid compounds? **New Phytol.**, 2016. doi: 10.1111/nph.14178.
- PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A.; LEWINSOHN, E.; CROTEAU, R. Floral Scent Production in *Clarkia* (Onagraceae). I. Localization and Developmental Modulation of Monoterpene Emission and Linalool Synthase Activity. **Plant Physiol.**, v. 106, p. 1533-1540, 1994.
- RAGUSO, R. A. More lessons from linalool: insights gained from a ubiquitous floral volatile. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 32, p. 31–36, 2016.

- RAGUSO, R. A. Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 39, p. 549–69, 2008.
- RAGUSO, R. A. Why do flowers smell? The chemical ecology of fragrance-driven pollination. In: CARDÉ R. T.; MILLAR J. G. (Eds.) **Advances in Insect Chemical Ecology**, 1^a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004, p. 151-178.
- RAGUSO, R. A.; GOTTSBERGER, G. An ode to osmophores: Stefan Vogel's Seminal contributions to the study of scent. **Flora**, v. 323, p. 150-152, 2017.
- RANDLKOFER, B.; OBERMAIER, E.; HILKER, M.; MEINERS, T. Vegetation complexity—The influence of plant species diversity and plant structures on plant chemical complexity and arthropods. **Basic Appl. Ecol.**, v. 11, p. 383–395, 2010.
- RIFFELL, J. A.; SHLIZERMAN, E.; SANDERS, E.; ABRELL, L.; MEDINA, B.; HINTERWIRTH, A. J.; KUTZ, J. N. Flower discrimination by pollinators in a dynamic chemical environment. **Science**, v. 344, p. 1515, 2014.
- ROBERTSON, G. W.; GRIFFITHS, D. W.; SMITH, W. M.; BUCHER, R. D. The application of thermal desorption- gas chromatography- mass spectrometry to the analyses of flower volatiles from five varieties of oilseed rape (*Brassica napus* spp. *oleifera*). **Phytochem. Anal.**, v. 4, n. 4, p. 152-157, 1993a.
- ROBERTSON, G. W.; GRIFFITHS, D. W.; WOODFORD, J. A. T.; BIRCH, A. N. E.; WADHMAS, L. J. A comparison of the flower volatiles from hawthorn and four raspberry cultivars. **Phytochemistry**, v. 33, n. 5, p. 1047-1053, 1993b.
- SCHIESTL, F. P.; AYASSE, M. Post-pollination emission of a repellent compound in a sexually deceptive orchid: a new mechanism for maximising reproductive success? **Oecologia**, v. 126, p. 531–534, 2001.
- SUN, P.; SCHUURINK, R. C.; CAISSARD, J.-C.; HUGUENEY, P.; BAUDINO, S. My way: noncanonical biosynthesis pathways for plant volatiles. **Trends Plant Sci.** v. 21, n. 10, p. 884-894, 2016.
- SURBURG, H.; GUENTERT, M.; HARDER, H. Volatile compounds from flowers: analytical and olfactory aspects. In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SUGISAWA, H. Bioactive Volatile Compounds from Plants.; Eds., **American Chemical Society**, Washington, 1993, p. 240-268.
- SZYSZKA, P. Follow the odor. **Science**, v. 344, p. 1454, 2014.
- THOLL, D.; GERSHENZON, J. The flowering of a new scent pathway in rose. **Science**, v. 349, n. 6243, p. 28-29, 2015.

- ULLAND, S.; IAN, E.; BORG-KARLSON, A. K.; MUSTAPARTA, H. Discrimination between enantiomers of linalool by olfactory receptor neurons in the cabbage moth *Mamestra brassicae*. **Chem. Senses**, v. 31, p. 325-334, 2006.
- WANG, J.; DUDAREVA, N.; BHAKTA, S.; RAGUSO, R. A.; PICHERSKY, E. Floral Scent Production in *Clarkia breweri* (Onagraceae). II. Localization and Developmental Modulation of the Enzyme S-Adenosyl-i-Methionine:(Iso)Eugenol O-Methyltransferase and Phenylpropanoid Emission. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 213-221, 1997.
- WASTERNAK, C.; FEUSSNER, I. The Oxylin Pathways: Biochemistry and Function. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 69, p. 363-386, 2018.
- WIDHALM, J. R.; DUDAREVA, N. A families ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. **Molecular Plant**, v. 8, p. 83-97, 2015.
- WIDHALM, J. R.; JAINI, R.; MORGAN, J. A.; DUDAREVA, N. Rethinking how volatiles are released from plant cells. **Trends Plant Sci.**, v. 20, n. 9, p. 545-550, 2015.
- XIAO, Z.; LUO, J.; NIU, Y.; WU, M. Characterization of key aroma compounds from different rose essential oils using gas chromatography-mass spectrometry, gas chromatography-olfactometry and partial least squares regression. **Nat Prod Res.**, v. 32, n. 13, p. 1567-1572, 2018.
- XIAO, Z.; LI, J.; NIU, Y.; LIU, Q.; LIU, J. Verification of key odorants in rose oil by gas chromatography-olfactometry/aroma extract dilution analysis, odour activity value and aroma recombination. **Nat. Prod. Res.**, v. 31, n. 19, p. 2294-2302, 2017.
- XU, H.; BOHMAN, B.; WONG, D. C. J.; RODRIGUEZ-DELGADO, C.; SCAFFIDI, A.; FLEMATTI, G. R.; PHILLIPS, R. D.; PICHERSKY, E.; PEAKALL, R. Complex Sexual Deception in an Orchid Is Achieved by Co-opting Two Independent Biosynthetic Pathways for Pollinator Attraction. **Curr. Biol.**, v. 27, p. 1-11, 2017.

Objetivo

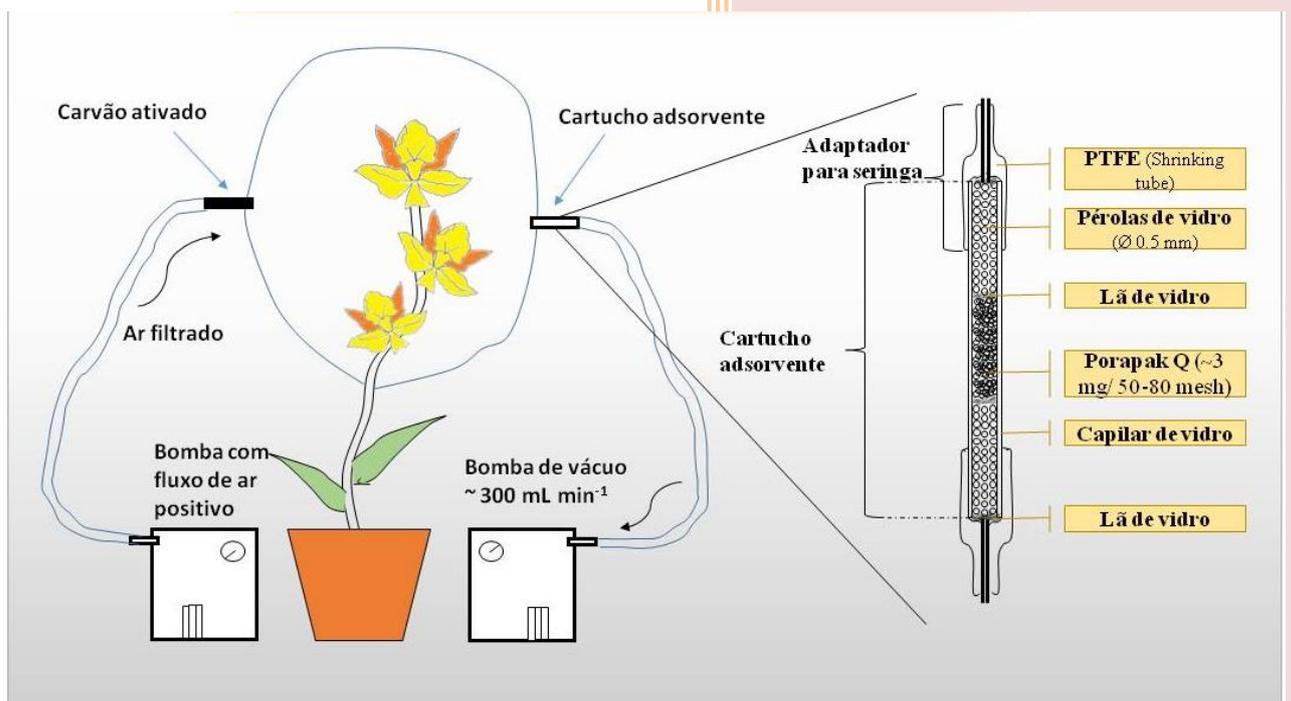


Figura 21 - Sistema de extração *headspace*.

Objetivo geral

A pesquisa teve como objetivo geral a adaptação de metodologia e teste de extração de voláteis por *headspace* dinâmico com sistema de baixo custo e o desenvolvimento de cartucho adsorvente em microescala para analisar e quantificar o odor de flores *in vivo* de diferentes espécies.

Objetivos específicos

Capítulo 2

- 1) Desenvolver um cartucho adsorvente em microescala para sistemas de *headspace* dinâmico (HSD) e adaptar um sistema de extração de baixo custo para a análise de voláteis de flores *in vivo* por HSD;
- 2) Avaliar a reprodutibilidade do sistema HSD por meio da análise quantitativa e qualitativa da variação temporal do perfil volátil das flores da espécie *Dendrobium nobile* (Orchidaceae);

Capítulo 3

- 4) Analisar quantitativamente e qualitativamente a química do odor floral da espécie *Temanadenia odorifera* (Apocynaceae) por meio de *headspace* dinâmico *in vivo* (HSD);
- 5) Analisar qualitativamente a composição volátil do odor floral da espécie *T. odorifera* por meio de microextração em fase sólida (MEFS);
- 6) Analisar qualitativamente os voláteis provenientes do néctar de *T. odorifera* por meio de MEFS e propor a sua função com relação aos mecanismos de polinização da espécie;
- 7) Comparar a composição volátil do odor floral do primeiro dia da antese e do período de senescência floral e sua relação com mecanismos de polinização;
- 8) Analisar qualitativamente e quantitativamente a composição química de açúcares do néctar de *T. odorifera* por meio de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e validação do método cromatográfico. Avaliar a relação entre a razão das concentrações entre sacarose, glicose e frutose e os tipos de polinizadores em *T. odorifera*.

Capítulo 2

Variação temporal do odor floral de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) por *headspace* dinâmico *in vivo*



Figura 22. Orquídea *Dendrobium nobile*.
Foto: Rafael F. Silva

1 INTRODUÇÃO

1.1 O cartucho adsorvente para captura de voláteis florais

No procedimento de isolamento de voláteis por adsorção, quando se usam quantidades relativamente grandes de adsorventes (50 mg ou mais) é comum realizar uma etapa de concentração do eluato (Tabela 5). No entanto, Raguso e Pellmyr (1998) demonstraram que este procedimento, normalmente realizada pela submissão do eluato a um fluxo de nitrogênio, resulta na perda de até 10% de alguns voláteis. Os autores demonstraram ainda que o percentual de perda é diferente para cada volátil. Isso significa que ao submeter um eluato à concentração o pesquisador pode provocar duas coisas importantes: (1) alterar a proporção dos voláteis capturados e, assim, distanciar o perfil volátil capturado do perfil volátil real; (2) provocar a perda completa de voláteis de nível traço a ponto de não serem detectados na análise cromatográfica e, dessa maneira, perder informações que poderiam ser valiosas.

Byers et al. (2014), ao investigar o odor de duas espécies do gênero *Mimulus* fizeram uso de cartucho adsorvente com 100 mg. Os autores relataram que foram necessárias 24 horas de extração para obter um extrato adequado para análise cromatográfica e não foi possível um tempo menor de extração. Por usar uma quantidade grande de adsorvente, estes autores concentraram em 10 vezes o eluato contendo os COVs.

Segundo Kaiser (1994, p. 219), com a diminuição do tamanho do capilar a etapa de concentração torna-se desnecessária. Outra vantagem importante resultante do uso de cartucho em microescala é a diminuição do tempo necessário à coleta. Dötterl et al. (2012), por exemplo, ao estudar o odor das flores de *Silene otites* utilizaram um cartucho de 3 mg de adsorvente e precisaram de apenas 2 minutos de coleta (Tabela 5).

Isto posto, para a análise de voláteis de flores por *headspace* dinâmico, com adsorção em polímero poroso, um dos aspectos mais importantes é, portanto, a escolha do adsorvente e suas dimensões (RAGUSO; PELLMYR, 1998; THOLL et al., 2006; KAISER, 1994). A maior parte dos estudos que fazem uso dessa técnica de extração é realizada com cartucho comercial. No entanto, os cartuchos comerciais disponíveis são confeccionados com quantidade de adsorvente superior a 50 mg, embora seja possível encontrar cartucho com adsorvente a partir de 25 mg, como são os casos das empresas SKC Inc. ou da Volatile Collection Trap LCC. Em geral, as empresas que comercializam cartuchos adsorventes são voltadas às análises de poluição atmosférica ou de poluentes de interiores, o que justifica a dimensão dos cartuchos disponíveis comercialmente.

Tabela 5 - Odor floral por HSD com adsorção em polímero poroso: alguns exemplos da literatura. Fonte: elaborada pelo autor

Espécie	Adsorvente/mg	Tempo de extração	Solvente para eluição	Concentração	Referência
<i>Hesperis matronalis</i>	Porapak Super Q/10 mg	1 h	Hexano/300 µL	a 75 µL	MAJETIC et al., (2007).
<i>Passiflora</i> spp.	Porapak Q/100 mg	1 h	Hexano/acetato de etila (1:1)/300 µL	nh	MONTERO et al. (2016)
<i>Mimulus</i> spp.	Porapak Q/100 mg	24 h	Hexano/600 µL	60 µL	BYERS et al., (2014)
<i>Yucca glauca</i>	Super Q/100 mg	5 h	3mL	75 µL	SVENSSON et al., (2011)
<i>Evodiantus funifer</i> ; <i>Ludovia lancifolia</i>	Tenax TA/25 mg + Carbopack B/40 mg	3 h	Acetona/300 µL	nr	TEICHERT et al. (2018)
<i>Datura wrightii</i> ; <i>Agave palmeri</i>	Super Q/100 mg	10 h	Hexane/600 µL	nh	RIFFELL; ALARCÓN (2013)
<i>Silene otites</i>	Tenax TA/Carbotrap (1:1)/3mg	2 min	Dessorção térmica	nh	DÖTTERL et al. (2012)
<i>Couroupita guianensis</i>	Porapak Q/2-5 mg	4 h	hexano:acetona (10:1)/ 20-60 µL	nh	KAISER (2000)

nh: não houve; **nr:** não relatado

1.2 *Dendrobium nobile* (Orchidaceae)

As espécies do gênero *Dendrobium* estão entre as orquídeas ornamentais mais difundidas comercialmente no mundo no que se refere à família Orchidaceae (XU; WANG, 2015; SILVA et al., 2016). Dentre elas está a espécie *D. nobile*, que se destaca devido a sua beleza e agradável fragrância (DE et al., 2014).

A fragrância floral desempenha um importante papel na atração de polinizadores. Paralelamente, é vista como uma fonte de matéria-prima para a perfumaria e é um importante atributo para os consumidores de plantas ornamentais, sendo um dos fatores decisivos para a compra (SCHNEPP; DUDAREVA, 2006).

Levando em consideração a importância do odor para o comércio de plantas ornamentais, estudos visando à modificação do odor de flores comerciais buscando intensificá-lo ou à produção de novas variedades perfumadas, a partir de espécies sem odor, são observados na literatura (KUEHNLE; JAYAWICKRAMA, 2007; KUANPRASERT; KUEHNLE, 1999). A modificação do odor floral de espécies ornamentais tem como uma de suas abordagens a produção de variedades geneticamente modificadas pela introdução de genes que expressam enzimas biossintéticas. Como um exemplo, a enzima *S*-linalol sintase, proveniente de *Clarkia breweri*, foi introduzida em flores de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) que passou a produzir entre 3 e 6% de linalol e 0 a 1,5% de *trans* e *cis*-óxido de linalol. Anteriormente à modificação genética, as flores de cravo não produziam monoterpenos (LAVY et al., 2002).

Estudos sobre a composição, o estágio e a variação temporal da emissão dos voláteis são de grande importância para o entendimento de sua produção (KUEHNLE; JAYAWICKRAMA, 2007) e servem de guia para recomendações de práticas de cultura das espécies florais perfumadas (KUANPRASER; KUEHNLE, 1999; TANAKA et al., 2005).

Entre as plantas comerciais, os cultivares de rosas são os mais amplamente estudados em relação às rotas metabólicas e à bioquímica envolvidas na produção e emissão de odor floral (TANAKA et al. 2005). Parte disso se deve ao grande interesse destes cultivares como fonte de matéria-prima para a indústria de perfumaria (ECKARDT, 2002). O 2-feniletanol, um importante componente do aroma das flores de *Rosa damascena* Mill., foi monitorado durante o estágio de desenvolvimento floral em diferentes genótipos da espécie. O genótipo SSG apresentou maior concentração em relação ao genótipo WSG. Além disso, a emissão de 2-feniletanol aumentou conforme os estágios de desenvolvimento floral, sendo maior no último estágio de desenvolvimento (S6) do genótipo SSG (40,6% do total de voláteis emitidos), enquanto que no genótipo WSG, o percentual de 2-feniletanol foi sempre menor. Este genótipo

demonstrou-se menos perfumado em qualquer estágio de desenvolvimento comparado ao primeiro (KARAMI, 2015). Estudos semelhantes foram realizados com a variedade *R. damascena* *semperflorens* cv. ‘Quatre, quanto à frequência da emissão de seus voláteis florais, e ficou demonstrado que a mesma apresenta um ritmo circadiano diurno de liberação de voláteis florais (PICONE et al., 2004).

Embora a fragrância seja um dos aspectos mais relevantes em espécies ornamentais do gênero *Dendrobium*, de um modo geral, há poucos trabalhos de investigação de voláteis em orquídeas pertencentes a este gênero. Em sua maioria, os estudos estão relacionados aos constituintes fixos das espécies, tais como alcaloides, fenantrenos, bifenilas e sesquiterpenos glicosilados (KIM et al., 2015; YE et al., 2002; HWANG et al., 2010; LEE et al., 1995; ZHANG et al., 2007, XU et al., 2013; ZHAO et al., 2001; ZHOU et al. 2016).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Três indivíduos de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) foram adquiridos em um centro comercial da cidade do Rio de Janeiro. Logo após serem adquiridas, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos de igual tamanho (15cm X 12cm X 10cm), onde utilizou-se como substrato uma mistura composta de 50% humus e 50% de substrato próprio para orquídea - casca de pinus, carvão mineral e vermiculita (Nutriplan, Cascavel-PR). Após o transplante, as plantas foram regadas a cada dois dias com igual volume de água por uma semana. A rega foi suspensa três dias antes dos experimentos. Não foi utilizada nenhuma espécie de adubação. As plantas permaneceram em laboratório com iluminação natural e temperatura controlada $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$. Entre os indivíduos usados no experimento, o número de flores por inflorescência variou entre 20 e 25 flores abertas.

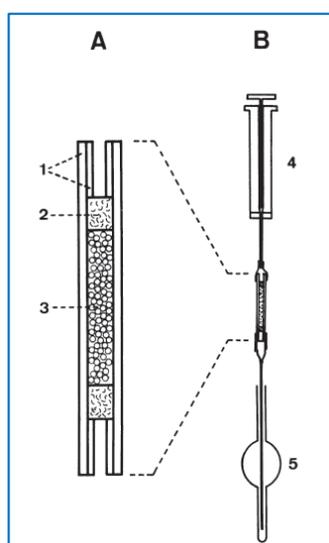
2.2 Cartucho adsorvente para coleta de voláteis florais

Para o desenvolvimento do cartucho adsorvente foram utilizados como referência os trabalhos de Kaiser (2004, 2001, 2000, 1995, 1994, 1993), um dos pioneiros no uso de cartuchos em microescala para a coleta do odor de flores. Cartuchos similares podem ser vistos na Figura 24. A diferença entre o cartucho da Figura 24 e o do referido autor consiste na inserção de pérolas de vidro nas duas extremidades do capilar. As pérolas de vidro tornam o capilar mais firme.

O cartucho de referência é constituído por um capilar de vidro de, aproximadamente, 2 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno (KAISER, 2000; Figura 23). No entanto, com o uso frequente e devido à aplicação de pressão no capilar pelo uso de bomba a vácuo, essa montagem logo mostrou necessitar de uma modificação, pois após cerca de 20 horas de uso o cartucho perdia a firmeza interna de suas camadas (adsorvente, lã de vidro e pérolas de vidro), sendo evidenciada pelo aparecimento de artefatos nos cromatogramas de análise.

Alguns dos artefatos encontrados após o uso dos capilares foram descritos por Lewis e Williams (1980) em um estudo no qual se catalogou os artefatos potenciais em Porapak Q e Tenax. Segundo esses autores, o Porapak Q (Etilvinil benzeno/divinil benzeno) quando submetido a temperaturas elevadas se degrada, produzindo uma série de hidrocarbonetos devido à fragmentação de ligações C-C existentes em sua cadeia polimérica formada por etilvinilbenzeno-divinilbenzeno. Dessa maneira, quando o capilar se desestrutura, a pressão exercida durante a eluição enriquece o eluato com adsorvente que, ao ser injetado no injetor cromatográfico em altas temperaturas, promove a degradação do polímero, produzindo os artefatos descritos por Lewis e Williams (1980) e mascarando substâncias da flor em estudo.

Figura 23 - Cartucho adsorvente do Kaiser (2000) e utilizado como referência para o desenvolvimento do cartucho usado no presente estudo. A) cartucho adsorvente em destaque; B) etapa de eluição em destaque. 1, capilar de vidro; 2, lã de vidro; 3, Porapak Q; 4, seringa; 5, ampola de vidro para armazenamento do eluato. Fonte: NEUNER-JEHLE; ETZWEILER (1994)



Dessa maneira, foram montados e testados diversos cartuchos para superar tal problema. A Figura 25 mostra alguns dos capilares montados.

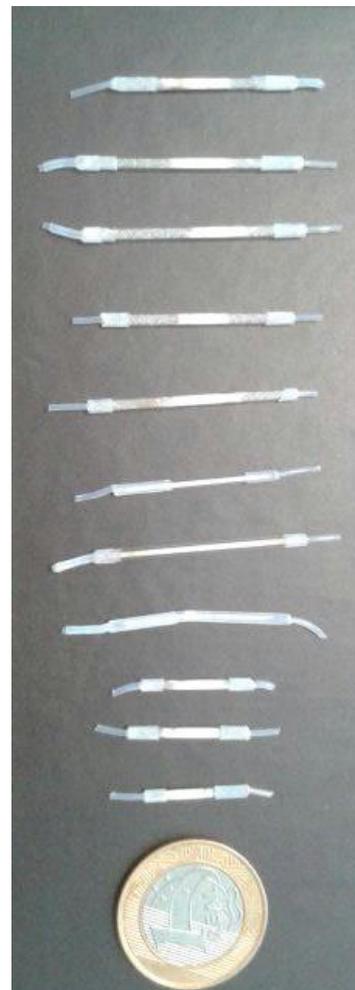
A inserção de mais uma camada de lã de vidro após as pérolas de vidro foi decisiva para a melhora da integridade e o aumento da durabilidade do cartucho. Assim, o cartucho foi montado com a seguinte ordem: borracha de PTFE, lã de vidro, pérola de vidro, lã de vidro, adsorvente, lã de vidro, pérola de vidro, lã de vidro, borracha de PTFE. O cartucho de Kaiser (2000) e de outros pesquisadores, tal como mostrado na Figura 24 e apresentado por NEUNER-JEHLE; ETZWEILER (1994) possui lã de vidro apenas na parte mais interna para delimitar o adsorvente. Já nos cartuchos utilizados neste estudo, a lã de vidro adicionada às extremidades do cartucho, logo após as perólas de vidro conferiu maior estruturação ao cartucho e durabilidade e evitou o surgimento de artefatos após o uso contínuo por muitas horas.

A reprodutibilidade dos cartuchos confeccionados pode ser observada no Apêndice 1B, Figura B2, onde, mesmo quando aplicado em diferentes indivíduos de *D. nobile*, foram obtidos cromatogramas com perfil volátil visivelmente similar.

2.3 Coleta de voláteis

O odor floral foi coletado dos três indivíduos separadamente utilizando a técnica *headspace* dinâmico, baseada em Kaiser (2000) e Raguso e Pellmyr (1998). A Figura 23 mostra o esquema que representa o sistema de extração usado nesse estudo.

Figura 24 - Cartuchos desenvolvidos para este estudo. Foto: Rafael. F. Silva



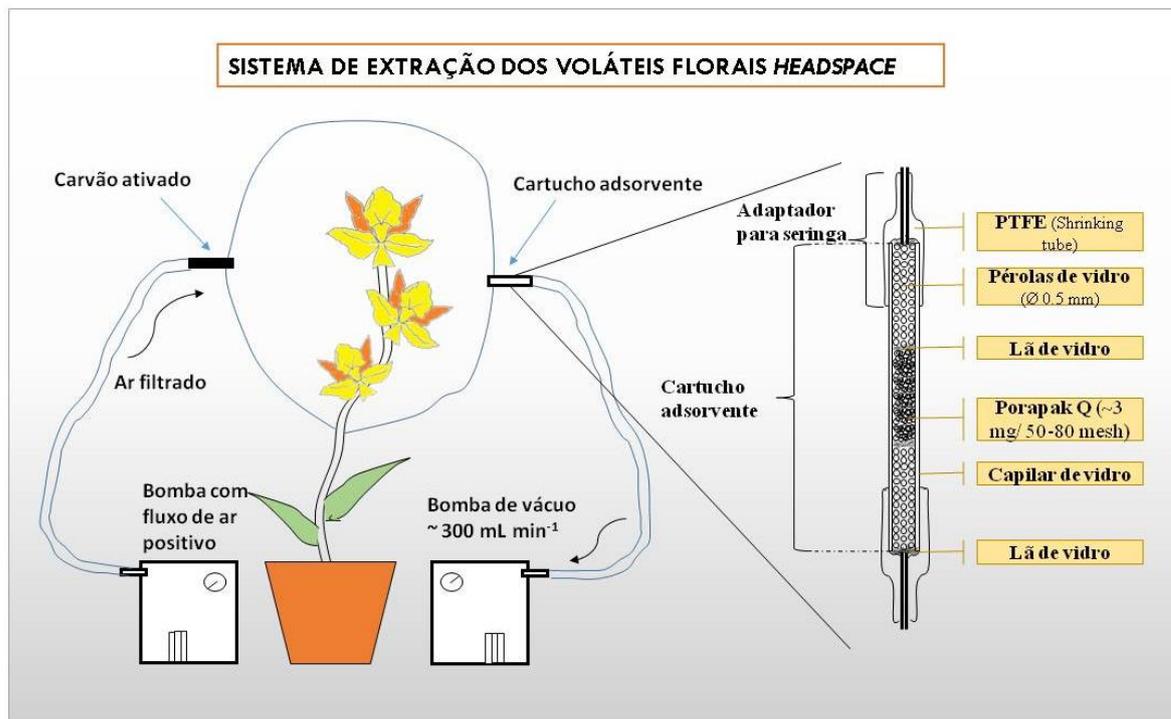


Figura 25. Sistema de extração *headspace* usado para coleta de odor floral de *D. nobile*. Fonte: ilustração elaborada por Pereira, L. S.

A inflorescência inteira da planta foi ensacada em uma sacola de polietileno (15 cm X 25 cm) para isolá-la do ambiente externo e minimizar eventuais contaminações. Os voláteis emitidos foram capturados em um cartucho consistindo de microtubo de vidro (2 cm de comprimento; 1mm de diâmetro interno), aberto nas duas extremidades, contendo 3 mg de adsorvente polimérico poroso (Porapak Q®, 80-100 mesh, Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada), limpo com 150 µL de hexano antes de cada extração, seco em estufa e empacotado no laboratório. O adsorvente foi contido nos microtubos por meio de lã de vidro e pérolas de vidro (Ø 0,5mm). Foi usado PTFE nas extremidades do cartucho para promover o encaixe da seringa (50 µL, Hamilton® Syringes) durante a eluição dos voláteis.

Os voláteis emitidos pela planta foram forçados a passar através do cartucho contendo adsorvente por meio de uma bomba de vácuo conectada ao sistema. A vazão foi ajustada a 300 mL min⁻¹, medida com rotâmetro (Omega Engineering Brasil, São Paulo). Para equilibrar a pressão, uma segunda bomba com fluxo positivo foi conectada no lado oposto à bomba de vácuo (ambas as bombas de Modelo Inalar compact, NS Group - São Paulo) contendo um cartucho com carvão ativo (30 mg).

O estudo da variação do odor floral de *D. nobile* foi realizado num único dia. As extrações dos três indivíduos foram realizadas simultaneamente. Os voláteis florais foram

coletados consecutivamente das 7 h às 16:50 h, sendo uma extração realizada a cada hora, totalizando 30 extrações de 50 min cada, sendo 10 extrações por indivíduo.

Para detectar eventuais contaminantes, foram realizadas extrações-controle, nas quais o mesmo procedimento acima descrito foi realizado, contudo, com a sacola vazia.

2.4. Extração de voláteis e cromatografia gasosa

Após cada uma das 30 extrações, o cartucho adsorvente foi eluído com 50 μL de hexano (grau de pureza para cromatografia, Tedia, Brasil) e, logo em seguida, adicionou-se ao eluato obtido uma alíquota de 2 μL de solução 0,6 mg mL^{-1} de *n*-octadecano como padrão interno. O eluato foi em seguida transferido a uma microampola, selada com maçarico e armazenada sob baixa temperatura (em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a análise.

Uma alíquota de 2 μL do eluato resultante de cada uma das 30 extrações do odor floral dos três indivíduos de *D. nobile* foi injetada, em modo sem divisão de fluxo, em um cromatógrafo a gás, Agilent modelo 6890N, equipado com uma coluna capilar com fase HP-5MS (5% fenil-metil polisiloxano; 30 m X 0,25mm X 0,25 μm), usando hidrogênio como gás carreador sob fluxo de 1 mL min^{-1} . O injetor foi mantido a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o detector de ionização por chama (DIC) mantido a $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. O forno cromatográfico teve sua temperatura variando de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (por 5 min) a $240\text{ }^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de $3\text{ }^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$. O teor de cada composto foi calculado por meio da relação entre a área absoluta do padrão interno e a área de cada substância em análise e corrigida pelo fator de resposta.

As amostras também foram analisadas por cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM), sendo utilizado um equipamento Agilent modelo 6890N equipado com um detector de massas 5973N e composto de coluna capilar com fase HP-5MS (5% fenil-metil polisiloxano; 30 m X 0,25mm X 0,25 μm). Hélio foi usado como gás carreador (1mL min^{-1}). O detector de massas foi operado em modo de ionização eletrônica (70 eV), em 3,15 varreduras/segundo, com faixa de massas de 40 a 450 u. A linha de transferência foi mantida em $260\text{ }^{\circ}\text{C}$, fonte de íons em $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o analisador (quadrupolo) a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. O programa de temperatura e as condições de injeção foram as mesmas usadas em CG-DIC.

A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação de seus espectros de massas com aqueles disponíveis na biblioteca *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, em conjunto com o seu índice de retenção linear, e comparados com dados da literatura (Adams, 2007). Os índices de retenção linear foram calculados conforme Van Den Dool e Kratz (1963),

e levaram em consideração os tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₇-C₂₆), injetados nas mesmas condições supracitadas.

2.5 Análise estatística

Para verificar se houve diferença significativa na emissão de voláteis entre os períodos da manhã e tarde foi usado teste *t* de student para avaliação das médias, obtidas a partir da soma dos dados das extrações da manhã (7-11:50 h) versus a soma dos dados obtidos das extrações do período da tarde (12-16:50 h). A determinação do melhor tempo de extração (15, 30 ou 50 min) foi realizada por meio do método de análise de variância monofatorial (ANOVA-*oneway*) com a diferença de significância de $p < 0,05$. Para realizar as comparações múltiplas de médias utilizou-se o teste de Tukey.

Além disso, realizou-se análise por agrupamento de *clusters* e análise de componentes principais. A análise estatística foi realizada no programa *Statistica7.0* (StatSoft, 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Previamente ao estudo da variação temporal do odor floral de *D. nobile*, foi avaliado o melhor tempo de extração a ser utilizado no presente estudo. Segundo Raguso e Pellmyr (1998) e Kaiser (1993), o tempo de coleta do odor floral por meio da técnica de *headspace* dinâmico é um importante parâmetro a ser levado em consideração em estudos de voláteis de flores. Segundo Kaiser (1994, 1995), cada espécie possui um ritmo próprio de liberação de voláteis, bem como uma intensidade de liberação diferente para cada composto. Assim, substâncias emitidas em baixa concentração podem não ser adequadamente detectadas sem um tempo mínimo, no qual sejam suficientemente concentradas no cartucho adsorvente (RAGUSO, 2004; RAGUSO; PELLMYR, 1998). Dessa maneira, Tholl et al. (2006) sugerem uma avaliação prévia deste parâmetro de extração de acordo com a espécie estudada.

Nesse sentido, buscou-se avaliar o melhor tempo de extração que, dentro de até 1 hora, fornecesse o maior número de informações a respeito do odor floral, como o número de substâncias detectadas e identificadas. Dentre os tempos avaliados (15, 30 e 50 min), 50 minutos mostrou-se o mais adequado por fornecer o maior número de compostos em relação aos demais tempos avaliados (Figura 24).

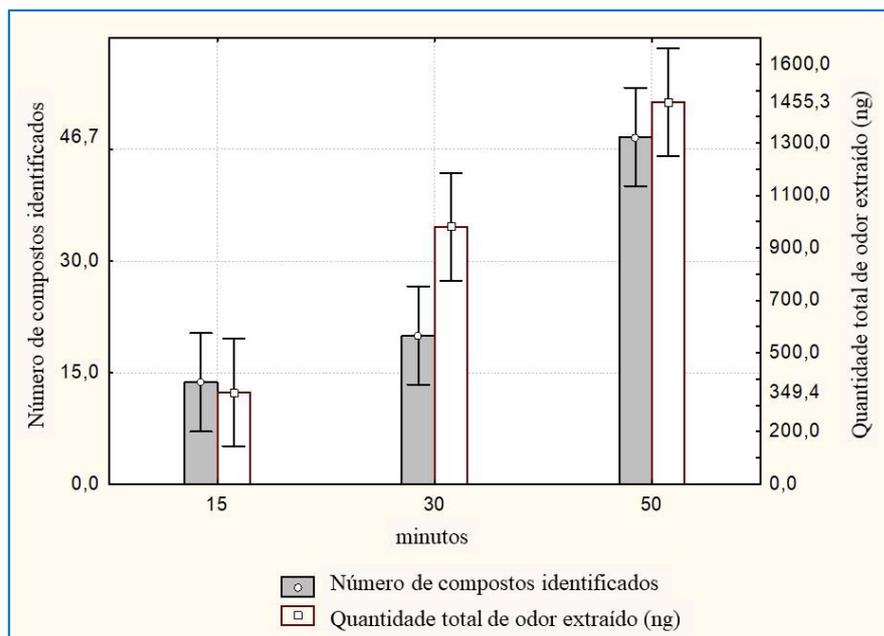


Figura 26 - Comparação entre o tempo de extração, o número de compostos extraídos e a quantidade de odor extraído (ng). Os valores se referem a média \pm desvio padrão (DP) de triplicatas.

A quantidade extraída de voláteis (em ng) foi significativamente diferente nos três tempos avaliados; o número de compostos extraído foi estatisticamente similar entre os tempos 15 e 30 min e menor do que o tempo de 50 min de extração (ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey).

Tabela 6- Compostos voláteis emitidos pelas flores de *Dendrobiumnobile*. (ng flor⁻¹).

Pico	IRL ^a	IRL ^b	Identificação	7:00 h		8:00 h		9:00 h		10:00 h		11:00 h		12:00 h		13:00 h		14:00 h		15:00 h		16:00 h		Manhã (7 às 11h)		Tarde (12 às 16)	
				Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
1	1029	1024	limoneno	188,5	79,2	240,8	39,5	194,5	113,7	179,7	134,4	153,4	53,6	207,1	58,3	179,2	42,6	146,8	34,3	124,6	54,1	95,8	29,5	956,9	82,6	753,7	55,7
2	1051	1044	(E)-β-ocimeno	608,9	596,2	448,6	490,8	208,7	225,6	109,4	155,2	11,8	11,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1387,3	384,6	-	-
3	1059	1054	(γ)-terpineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1105	1095	linalol	20,8	24,1	11,8	13,6	8,1	9,1	6,3	7,7	7,0	12,0	6,7	11,7	7,6	13,1	7,7	10,0	-	-	4,5	7,9	53,9	13,5	26,6	8,7
5	1109	1100	nonanal	14,8	18,2	13,8	13,5	4,7	8,1	4,1	7,1	3,8	6,7	2,7	4,6	2,5	4,3	-	-	-	-	-	-	41,2	11,1	5,2	2,7
6	1122	1124	2-metil-6-metileno-1,7-octadien-3-ona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1136	1128	allo-ocimeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	1173	1157	acetato de benzila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1211	1200	n-dodecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1217	1201	decanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1255	1238	cuminaldeído	9,5	3,9	7,1	3,0	4,3	4,0	5,7	2,6	3,8	3,4	2,5	2,5	4,3	1,1	3,3	3,0	1,1	2,0	1,3	2,2	30,3	3,6	12,5	2,3
12	1278	1274	3,5-dimetoxitolueno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	1383	1376	cinamato de metila	19,4	17,7	16,3	8,9	12,2	7,9	14,7	7,7	2,6	4,5	1,5	2,6	1,8	3,0	2,3	2,1	-	-	-	-	65,2	10,5	5,5	2,0
14	1397	1390	7-epi-sesquitujeno	9,2	8,0	18,6	17,8	9,2	4,4	10,6	2,4	5,9	5,1	4,8	4,2	7,8	1,6	6,1	5,4	1,9	3,3	2,2	3,8	53,4	9,0	22,8	4,0
15	1395	1388	1-tetradeceno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1408	1400	n-tetradecano	20,6	16,1	7,2	6,8	10,3	12,4	6,1	4,5	3,7	3,5	2,5	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	47,9	10,4	2,5	1,9
17	1415	1410	α-cedreno	24,3	15,2	24,6	22,2	20,2	15,6	13,8	10,9	6,3	6,6	3,7	3,9	5,9	3,8	4,1	3,9	0,9	1,6	0,8	1,4	89,2	14,6	15,5	3,4
18	1425	1417	(E)-cariofileno	101,1	61,2	107,6	81,6	88,4	58,8	57,9	56,1	22,9	24,9	12,4	13,8	14,5	7,9	10,3	6,6	3,9	2,2	1,7	3,0	377,9	59,8	42,8	8,4
19	1440	1432	(E)-α-bergamoteno	17,0	15,0	45,1	43,5	30,8	21,3	19,9	16,2	9,8	11,0	5,6	6,2	10,1	8,9	7,4	6,1	1,4	2,4	1,4	2,4	122,5	24,2	25,9	6,0
20	1459	1452	propanoato de nerila	-	-	-	-	8,7	15,1	4,1	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,8	7,3	-	-
21	1463	1454	(E)-β-farneseno	11,0	9,9	26,7	24,2	17,1	11,9	13,7	5,0	11,2	6,4	4,7	5,3	8,7	6,5	2,5	4,3	1,1	1,9	2,0	3,4	79,8	12,8	19,0	4,8
22	1484	1481	γ-curcumeno	5,5	4,8	14,5	15,8	7,7	5,7	4,9	4,3	6,0	6,3	2,4	2,4	1,4	2,4	1,2	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	38,6	8,1	5,0	1,8
23	1500	1493	α-zingibereno	3,9	3,4	10,8	10,1	3,1	2,7	1,5	2,7	1,4	2,5	1,9	1,7	0,8	1,4	-	-	-	-	-	-	20,7	5,7	2,7	1,1
24	1510	1505	(E,E)-α-farneseno	1386,4	1288,5	1344,1	1541,7	734,0	551,2	465,3	386,5	445,4	341,3	111,0	79,2	110,4	101,7	74,3	74,9	10,8	18,8	14,1	14,8	4375,2	917,1	320,7	73,2
25	1516	1514	β-curcumeno	68,9	47,0	66,2	63,0	43,4	26,9	32,0	32,6	24,6	12,1	7,6	7,8	10,0	11,1	7,7	8,0	-	-	-	-	235,2	38,7	25,3	7,4
26	1519	1514	(Z)-γ-bisaboleno	9,0	6,4	8,0	9,3	5,3	5,5	1,3	2,3	1,3	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24,9	5,9	-	-
27	1526	1522	δ-cadineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	1536	1531	(Z)-nerolidol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	1546	1542	(Z)-hidrato de sesquisabineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	1564	1561	(E)-nerolidol	36,3	46,0	50,8	58,7	32,3	20,5	8,9	15,4	17,1	14,0	7,2	7,7	6,0	8,1	3,4	5,9	-	-	-	-	145,3	33,9	16,5	5,7
31	1591	1588	1-hexadeceno	6,5	6,0	7,6	3,5	5,1	1,3	2,4	4,2	3,3	3,1	2,8	2,6	2,7	2,6	3,3	3,2	0,6	1,1	0,7	1,3	24,8	3,9	10,1	2,3
			Quantidade total	2569,5	2267,3	2478,3	2468,0	1453,5	1126,6	970,4	865,5	747,0	536,0	393,0	224,1	381,1	220,7	288,3	170,0	155,8	91,1	134,4	73,2				

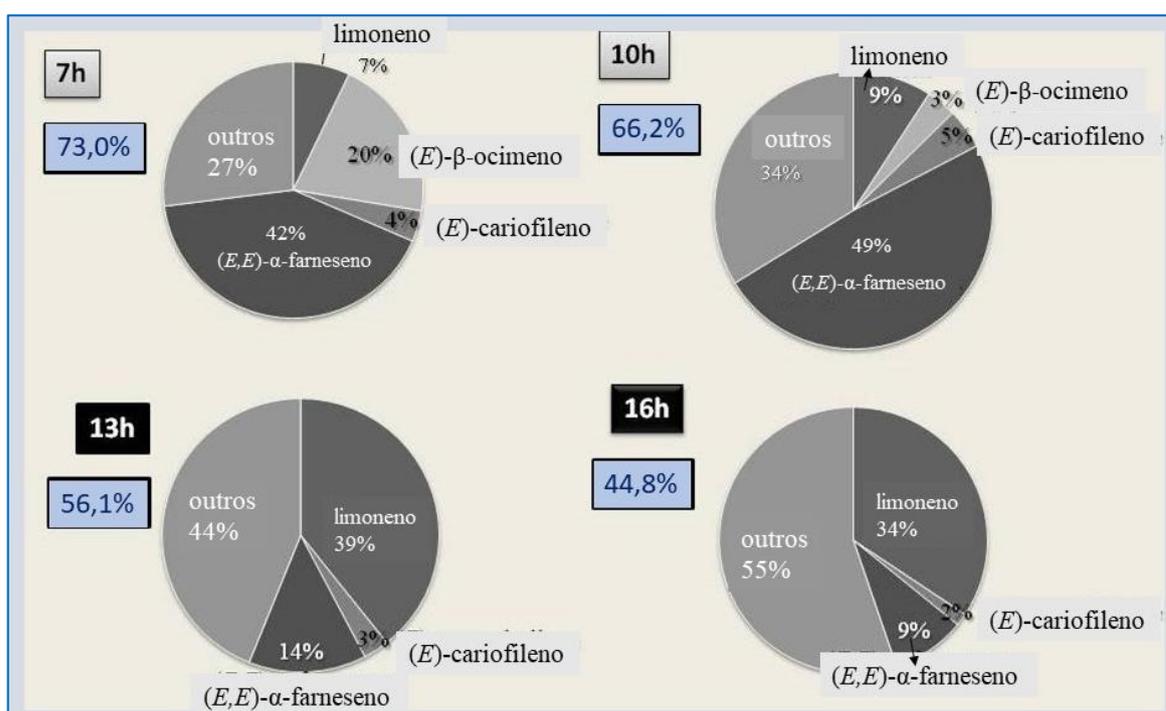
IRL^a = Índice de Retenção Linear em coluna HP-5, Experimentalmente calculado usando parafinas (C₇-C₂₆) como referência,;

IRL^b = Índice de Retenção Linear da literatura (Adams, 2007),

DP = Desvio Padrão

A avaliação do odor floral de *D. nobile* resultou em 31 substâncias identificadas, dentre as quais 11 sesquiterpenos, 3 sesquiterpenos oxigenados, 4 monoterpenos, 1 monoterpene oxigenado, 4 hidrocarbonetos alifáticos e 3 ésteres (Tabela 6). Os principais constituintes, independente do horário de coleta do odor floral, foram o limoneno, (*E*)- β -ocimeno, (*E*)-cariofileno e (*E,E*)- α -farneseno, que juntos totalizaram de 44 a 73% do total de odor emitido (Figura 25).

Figura 27 - Variação da composição percentual dos quatro compostos majoritários do odor floral de *D. nobile* em quatro diferentes horários num mesmo dia de amostragem. Fonte: Elaborada pelo autor.



Estes quatro terpenos figuram entre as substâncias mais comumente emitidas por flores. Limoneno e (*E*)- β -ocimeno, por exemplo, já foram descritas no odor floral de mais de 70% de todas as espécies vegetais já estudadas por *headspace* dinâmico (Knudsen et al., 2006). Desta maneira, o alto teor destes quatro terpenos comuns no odor floral de *D. nobile* pode indicar que esta espécie não usa sua fragrância para atração de polinizadores altamente específicos, mas sim generalistas (RAGUSO, 2004).

A análise dos voláteis florais de *D. nobile* revelou uma clara variação na taxa de emissão de seu odor ao longo do período estudado, com uma intensa emissão entre 7-8 h (manhã) e apresentando declínio gradual em sua liberação (Figura 26a).

Embora tenha havido diferença unitária entre os teores dos voláteis emitidos pelos três indivíduos, é possível verificar o mesmo padrão de emissão volátil, com uma alta concentração emitida nas primeiras horas da manhã e um perceptível declínio em seguida. A variação da intensidade de voláteis pode ocorrer por diferentes razões e, até mesmo, num mesmo indivíduo. Kaiser (1993) estudou o odor liberado pela orquídea *Epidendrum ciliare* por duas noites consecutivas e verificou variação similar na intensidade de voláteis. Contudo, assim como no caso do presente estudo, a espécie *E. ciliare* apresentou um padrão reconhecível na emissão, com pico de emissão por volta das 22h.

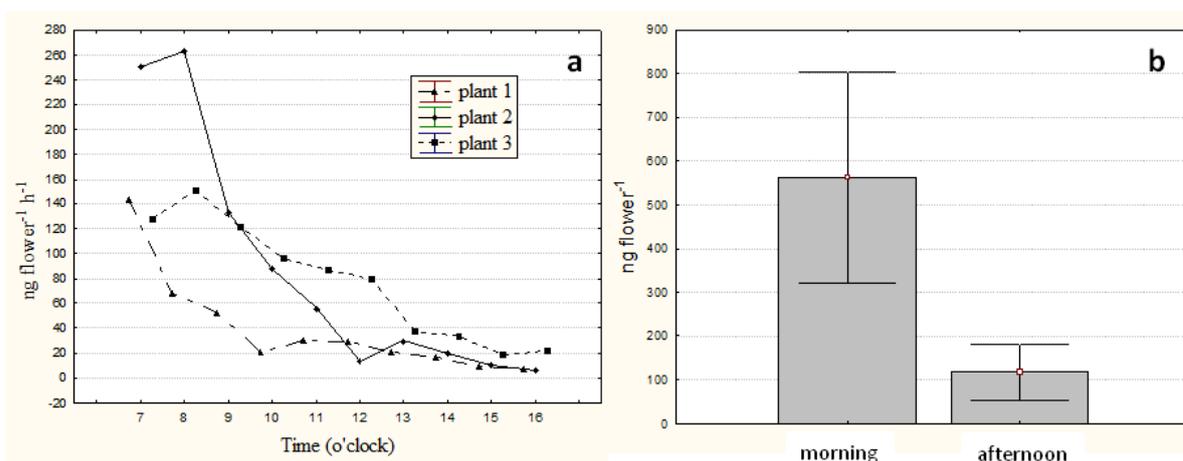


Figura 28. (a) Variação do odor floral de *D. nobile* ao longo de um período de 10 horas durante o dia; (b) comparação entre as intensidades de emissão de odor floral dos períodos da manhã e da tarde (teste *t Student*, $p < 0,05$). Fonte: Elaborada pelo autor.

Na média, a emanção de odor foi mais intensa pela manhã do que no período da tarde como pode ser visto na Figura 4b, onde se avaliou as médias por meio do teste *t student*.

A análise de componentes principais (PCA) e de agrupamento das amostras obtidas nos diferentes horários de extração demonstraram uma nítida separação entre as amostras do período da manhã em relação as da tarde (Figura 27).

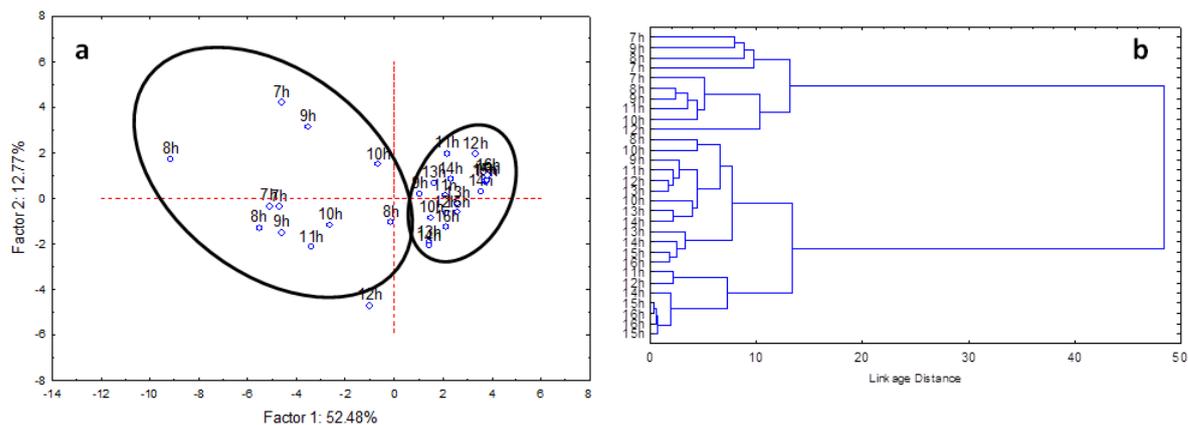


Figura 29 - Análise por (a) PCA e (b) agrupamento dos voláteis florais de *D. nobile* em diferentes horários. Fonte: Elaborada pelo autor.

A orquídea *Phalaenopsis Nobby's Pacific* estudada por Sunset Yeh et al. (2014), por meio de microextração em fase sólida (MEFS), demonstra um comportamento de emissão volátil similar à orquídea *D. nobile*, com um pico de emissão nas primeiras horas da manhã e um declínio gradual e, do mesmo modo, possui (*E,E*)- α -farneseno como um de seus principais componentes.

Para entender a variação temporal dos voláteis e seu padrão de emissão em flores é imprescindível considerar que a principal função dos voláteis emitidos por este órgão é a sua utilização como atraente de insetos polinizadores (Parachnowitsch e Manson, 2015). Nesse sentido, é bem documentado na literatura que as espécies polinizadas por insetos tendem a concentrar seus esforços energéticos de liberação volátil durante o horário no qual há atividade desses insetos (DÖTTERL et al., 2012). Assim, espécies polinizadas por certas abelhas diurnas tendem apresentar picos de emissão de voláteis florais no período da manhã (PINHEIRO et al., 2015). O padrão de emissão de *D. nobile*, portanto, sugere que esta espécie possa ser polinizada por abelhas ou outros insetos diurnos.

Curiosamente, o composto (*E*)- β -ocimeno (**65**) é emitido por suas flores apenas no horário da manhã (Figura 28). A partir das 12 h tem sua emissão completamente interrompida.

Tal comportamento pode sugerir que este composto pode ser um importante atraente desta orquídea, utilizado em seu mecanismo de atração de insetos. Este composto volátil é conhecido por ser um atraente generalista. Há relatos de outras orquídeas que emitem este monoterpene. Kaiser (2004), por exemplo, descreveu o odor floral de duas espécies do gênero *Cattleya*, *C. labiata* e *C. luteola*, que emanam (*E*)- β -ocimeno, assim como (*E,E*)- α -farneseno.

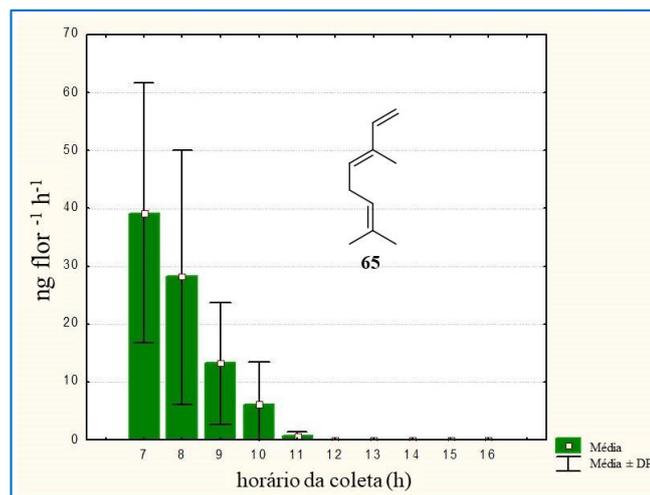


Figura 30 - Variação do teor de (*E*)-β-ocimeno em flores de *D. nobile* ao longo do dia. Fonte: Elaborada pelo autor.

O composto (*E,E*)-α-farneseno também é emanado das flores de *D. nobile* em alta concentração pela manhã (cerca de 49% da composição dos voláteis a 10 h).

O composto (*E,E*)-α-farneseno também é emanado das flores de *D. nobile* em alta concentração pela manhã (cerca de 49% da composição dos voláteis às 10 h) e foi descrito no odor floral da orquídea *Catasetum uncatum* por Pinheiro *et al.* (2015), que demonstraram que esta substância possui resposta eletrofisiológica (CG-EAD) nas antenas de três abelhas *Euglossini* (*Euglossa nanomelanotricha*, *E. carolina* e *Eulaema nigrita*). Estas abelhas possuem hábitos diurnos, coincidentes com o horário de maior liberação de odor em flores da orquídea *C. uncatum*.

4. CONCLUSÃO

Nos cartuchos utilizados neste estudo, a lã de vidro adicionada às extremidades do cartucho, logo após as perólas de vidro, conferiu maior estruturação ao cartucho e durabilidade e evitou o surgimento de artefatos após o uso contínuo por muitas horas.

Com este estudo foi possível observar que alguns parâmetros influenciam fortemente os resultados da extração, tal como o tempo de coleta dos voláteis. Nesse sentido, é de extrema importância o conhecimento da espécie a ser estudada para o adequado ajuste das condições de extração. Assim, para espécies com inflorescência contendo muitas flores e com grande intensidade de liberação de odor é possível usar um tempo mais curto de análise, enquanto que

para espécies cujas flores são isoladas ou que liberam pouca quantidade de odor é necessário aumentar o tempo de extração para a adequada concentração de voláteis.

O cartucho montado no presente estudo e o sistema de extração por HSD mostraram adequada sensibilidade, pois detectaram as variações no perfil do odor de *D. nobile* ao longo das horas de estudo.

A emissão dos voláteis florais pela espécie *D. nobile* mostrou um padrão de variação temporal bem definido, com maior predominância de produção volátil nas primeiras horas do dia (7 as 12h). Na média, os voláteis liberados pela orquídea foram muito mais pronunciados no período da manhã em comparação com a tarde.

Quatro substâncias majoritárias são liberadas pela orquídea em maior concentração: limoneno, (*E,E*)-farneseno, (*E*)-cariofileno e (*E*)- β -ocimeno. Juntas, estas substâncias correspondem de 44,8 a 73% de todo o odor liberado, independente do horário investigado. Contudo, a substância (*E*)- β -ocimeno é liberada em elevada concentração somente pela manhã, e sua liberação é cessada por completo a partir de 12h. Isso sugere que esta substância pode ter importância ecológica para esta orquídea.

5 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, 4th ed.; Allured Publ. Corp, Carol Stream, IL, 2007.
- BYERS, K. J. R. P.; BRADSHAW, H. D.; RIFFELL, J. A. Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*). **J. Exp. Biol.**, V. 217, P. 614-623, 2014.
- DE, L. C.; PATHAK, P.; RAO, A. N.; RAJEEVAN, P. K. **Commercial Orchids**. Warsaw/berlin: De Gruyter Open Ltd, 2014.
- DÖTTERL, S.; JAHREIB, K.; JHUMUR, U. S.; JÜRGENS, A. Temporal variation of flower scent in *Silene otites* (Caryophyllaceae): a species with a mixed pollination system. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 169, n. 3, p. 447–460, 2012.
- ECKARDT, N. A. A Rose by Any Other Name? **Plant Cell**, v. 14, p. 2315, 2002.
- HWANG, J. S.; LEE S. A.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; LEE, C.; KAN, S. J.; LEE, D. KIM, Y.; HONG, J. T.; LEE, M. K.; HWANG, B. Phenanthrenes from *Dendrobium nobile* and their inhibition of the LPS-induced production of nitric oxide in macrophage RAW 264.7 cells. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 20, n. 12, p. 3785-3787, 2010.
- KAISER, R. On the scent of Orchids. In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SUGISAWA, H. **Bioactive Volatile Compounds from Plants.**; Eds., American Chemical Society, Washington, 1993, p. 240-268.
- KAISER, R. Scents from Rain Forests. **Chimia**. v. 54, n. 6, p. 346-363, 2000.
- KAISER, R. TOLLSTEN, L. An introduction to the scent of cacti. **Flavour Fragr. J.**, v. 10, n. 3, p. 153-164, 1995.
- KAISER, R. Trapping, Investigation and Reconstitution of Flower Scents. In: MÜLLER, P. M. ; D. LAMPARSKY, D.; Eds.; **Perfumes: Art, Science and Technology.**, London, New York: Springer Science+Business Media, 1994, p. 213-250.
- KAISER, R. Vanishing flora - lost chemistry: the scents of endangered plants around the world. **Chem. Biodivers.** v. 1, n. 1, p. 13-27, 2004.
- KAISER, R.; KRAFT, P. Neue und ungewöhnliche Naturstoffe faszinierender Blütendüfte. **Chem. Unserer Zeit**, v. 35, n. 1, p. 8-23, 2001.
- KARAMI, A.; NIAZI, A.; KAVOOSI, G.; KHOSH-KHUI, M. ; SALEHI, H. Temporal characterization of 2-phenylethanol in strongly and weakly scented genotypes of damask rose. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2015.

- KIM, J. H.; OH, S. Y.; HAN, S.; UDDIN, G. M.; KIM, C. Y.; LEE, J. K. Anti-inflammatory effects of *Dendrobium nobile* derived phenanthrenes in LPS-stimulated murine macrophages. **Arch. Pharm. Res.** v. 38, n. 6, p. 1117-1126, 2015.
- KNUDSEN, J. T.; ERIKSSON, R.; GERSHENZON, J.; STÅHL, B. Diversity and distribution of floral scent. **Bot. Rev.**, v. 72, p. 1-120, 2006.
- KUANPRASERT, N.; KUEHNLE, A. R. Fragrance quality. **Aroideana**, v. 22, n. 1, p. 48-61, 1999
- KUEHNLE, A. R.; JAYAWICKRAMA, R. G. M. IN JANICK, J.; ED. **Plant Breeding Reviews**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007, p. 125-162.
- LAVY, M.; ZUKER, A.; LEWINSOHN, E.; LARKOV, O.; RAVID, U.; VAINSTEIN, A.; WEISS, D. Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. *Mol. Breed*, v. 9, n. 2, p. 103-111, 2002.
- LEE, Y. H.; PARK, J. D.; BAEK, N. I.; KIM, S. I.; AHN, B. Z. **Planta Med.**, v. 61, n. 2, p. 178-180, 1995.
- MAJETIC, C. J.; RAGUSO, R. A.; TONSOR, S. J.; ASHMAN, T-L. Flower color–flower scent associations in polymorphic *Hesperis matronalis* (Brassicaceae). **Phytochemistry**, v. 68, p. 865-874, 2007.
- MILET-PINHEIRO, P.; NAVARRO, D. M. A. F.; DÖTTERL, S.; CARVALHO, A. T.; PINTO, C. E.; AYASSE, M.; SCHLINDWEIN, C. Pollination biology in the dioecious orchid *Catasetum uncatum*: How does floral scent influence the behaviour of pollinators? **Phytochemistry**, v. 116, p. 149–161, 2015.
- MONTERO, D. A. V.; MARQUES, M. O. M.; MELETT, L. M. M.; KAMPEN, M. H. V.; POLOZZI, S. C. Floral scent of brazilian *Passiflora*: five species analysed by dynamic headspace. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 88, n. 3, p. 1191-1200, 2016.
- PARACHNOWITSCH, A. L.; MANSON, J. S. The chemical ecology of plant-pollinator interactions: recent advances and future directions. **Curr. Opin. Insect. Sci.**, v. 8, p. 41–46, 2015.
- PICONE, J. M.; CLERY, R. A.; WATANABE, N.; MACTAVISH, H. S; TURNBULL, C. G. N. Rhythmic emission of floral volatiles from *Rosa damascena* semperflorens cv. 'Quatre Saisons'. **Planta**, v. 219, n. 3, p. 468-478, 2004.

- RAGUSO, R. A. Why do flowers smell? The chemical ecology of fragrance-driven pollination. In: Cardé RT, Millar JG (Eds.) **Advances in Insect Chemical Ecology**, 1st edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2004b, p. 151-178.
- RAGUSO, R.A.; PELLMYR, O. Dynamic Headspace Analysis of Floral Volatiles: A Comparison of Methods. **Oikos**, v. 81, n. 2, 238-254, 1998.
- RIFFELL, J. A.; ALARCÓN, R. Multimodal Floral Signals and Moth Foraging Decisions. **Plos One**, v. 8, n. 8, 1-15, 2013.
- SCHNEPP, J.; DUDAREVA, N. Floral scent: biosynthesis, regulation and genetic modifications. In: AINSWORTH, C.; ed.; **Flowering and its Manipulation**. Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2006, p. 240-252.
- SILVA, J. A. T.; JIN, X.; DOBRÁNSZKI, J.; LU, J.; WANG, H.; ZOTZ, G.; CARDOSO, J. C.; ZENG, S. Advances in *Dendrobium* molecular research: Applications in genetic variation, identification and breeding. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 95, p. 196-216, 2016.
- STATSOFT, I., 2004. STATISTICA (data analysis software system).
- Svensson, g. p.; pellymyr, o; raguso, r. a. Pollinator attraction to volatiles from virgin and pollinated host flowers in a yucca/moth obligate mutualism. **Oikos**, v. 120, p. 1577-1583, 2011.
- TANAKA, Y.; KATSUMOT, Y.; BRUGLIERA, F.; MASON, J. Genetic engineering in floriculture. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.**, v. 80, n. 1, p. 1-24, 2005.
- TEICHERT, H.; DÖTTERL, S.; GOTTSBERGER, G. Scent emissions and floral nutrients of Carludovicoideae (Cyclanthaceae) and their importance for associated beetles. **Plant Syst. Evol.**, v. 304, n. 7, p. 831-839, 2018.
- THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; U. S. R. RÖSE, U. S. R.; SCHNITZLER, J. P. Practical approaches to plant volatile analysis. **Plant J.** 2006, v. 45, n. 4, p. 540-560.
- VAN DEN DOOL, H. ; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 2, p. 463-471, 1963.
- WILEY REGISTRY OF MASS SPECTRAL DATA, 6th edn. Wiley Interscience, New York, 1994.
- XU, H.; WANG, Z. IN LIU, Y.; WANG, Z.; ZHANG, J. *Dendrobium nobile* Lindl. 石斛 (Shihu, *Dendrobium*) Eds., **Dietary Chinese Herbs: Chemistry, Pharmacology and Clinical Evidence**. Springer-Verlag, Viena, Áustria, 2015, p. 597-604.

- XU, J.; HAN, Q. B.; LI, S. L.; CHEN, X. J.; WANG, X. N.; ZHAO, Z. Z.; CHEN, H. B.;
Chemistry, bioactivity and quality control of *Dendrobium*, a commonly used tonic
herb in traditional Chinese medicine. **Phytochem. Rev.**, v. 12, n. 2, p. 341-367, 2013.
- YE, Q.; QIN, G.; ZHAO, W. Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium
nobile*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 885-890, 2002.
- ZHANG, X.; LIU, H. W.; GAO, H.; HAN, H. Y.; WANG, N. L.; WU, H. M.; YAO, X. S.;
WANG, Z. Nine New Sesquiterpenes from *Dendrobium nobile*. **Helv. Chim. Acta**.
2007, v. 90, n. 12, p. 2386-2394.
- ZHAO, W.; YE, Q.; TAN, X.; JIANG, H.; LI, X.; CHEN, K.; KINGHORN, A. D. Three New
Sesquiterpene Glycosides from *Dendrobium nobile* with Immunomodulatory Activity.
J. Nat. Prod. 2001, v. 64, n. 9, 1196-1200.
- ZHOU, X. M.; ZHENG, C. J.; GAN, L. S.; CHEN, G. Y.; ZHANG, X. P. SONG, X. P.; LI, G.
N.; SUN, C. G. Bioactive Phenanthrene and Bibenzyl Derivatives from the Stems
of *Dendrobium nobile*. **J. Nat. Prod.**, v. 79, n. 7, p. 1791-1797, 2016.

Capítulo 3

Ecologia Química do odor floral e da composição de açúcares do néctar em *Temnadenia odorifera* (Apocynaceae).



Figura 31 - Flores de *Temnadenia odorifera*. Foto: Rafael F. Silva

Parte dos resultados deste capítulo foram publicados no *Journal of the Brazilian Chemical Society*:

Silva, R. F.; Tinoco, N. A. B.; Tsukui, A.; Koschinitzke, C.; Silva-Batista, I. C.; Rezende, C.; Bizzo, H. R. Floral Scent and Nectar Sugar Composition of *Temnadenia odorifera* (Apocynoideae, Apocynaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, n. 2, p. 388-397, 2019.

<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180188>

“Que não haja dúvida a respeito: a maior parte dessa forma de comunicação é constituída por vocábulos químicos.”

Gottlieb et al.

Ciência & Saúde Coletiva, 3, 2, 97-102, 1998

1 INTRODUÇÃO

O sucesso reprodutivo de plantas que dependem de vetores bióticos para fluxo de pólen está relacionado com a eficiência da atração de insetos (KLATT, 2013; FILELLA, 2013). A atração de insetos, para fins de polinização, envolve o uso de diferentes sinais olfativos e visuais pela flor, que, em contrapartida, oferece recursos como recompensa pelo serviço de transferência de pólen (DÖTTERL, 2014). A relação entre planta e polinizador geralmente é benéfica para ambos. Enquanto os insetos movem pólen de uma flor para outra promovendo polinização cruzada e, com isso, garantindo o sucesso reprodutivo, recebem recompensas florais pelo seu serviço (BARRETT, 2003). Os serviços são recompensados através da oferta de recursos como néctar, pólen, óleo floral e resina (AGOSTINI et al. 2014).

Considerando que a necessidade alimentar dos insetos polinizadores é a responsável pela maioria das visitas, o néctar é um dos principais alimentos disponibilizados pelas flores (HEIL, 2011). A composição química do néctar floral pode variar, mas, em geral, é uma secreção aquosa doce constituída principalmente pelos carboidratos sacarose, glicose e frutose, cuja proporção relativa determina o espectro de consumidores, já que os insetos diferem nas necessidades nutritivas (AGOSTINI et al., 2014). Borboletas e abelhas grandes, por exemplo, preferem néctar rico em sacarose (BAKER; BAKER, 1990).

Dentre os sinais sensoriais utilizados pelas flores para promover seus recursos, aspectos visuais e fragrância estão entre os mais importantes (SCHIEST; JOHNSON, 2012) embora, historicamente, os sinais visuais emitidos pelas flores (cor e morfologia, por exemplo) tenham sido supervalorizados em detrimento do odor floral (RAGUSO, 2008). No entanto, vários estudos consolidaram o entendimento de que a complexa interação planta-inseto em algumas plantas é principalmente mediada por uma combinação das pistas visuais e olfativas (RAGUSO; WILLIS, 2005; LEONARD; MASEK, 2014; CARVALHO, 2014; BURGER et al., 2010). Entretanto, o odor floral frequentemente constitui a base sobre a qual os polinizadores realizam as escolhas florais (RAGUSO, 2004b; KLATT et al., 2013).

O odor floral é constituído por uma mistura complexa de substâncias orgânicas voláteis, que pode ser liberada por diferentes partes da flor (RAGUSO, 2004B; BALAO, 2011). Terpenos, derivados de ácidos graxos e benzenoides constituem as três classes mais comuns de voláteis florais. A diversidade química dos voláteis na natureza contribui para a versatilidade desse canal de comunicação (KNUDSEN, 2006). Embora algumas flores utilizem compostos muito incomuns na atração de seus insetos polinizadores, muitas plantas emitem voláteis florais

comuns, que podem tornar as flores potencialmente atraentes para uma faixa mais ampla de insetos polinizadores além, é claro, de insetos antagonistas (DOBSON, 2006).

Diferentes estudos mostraram que as abelhas são capazes de detectar pólen e néctar através do odor e que também são capazes de detectar flores recém-visitadas (RAGUSO, 2004a; GOULSON, 1998). Além disso, tanto insetos poliléticos, quanto oligoléticos, utilizam o odor para reconhecimento de recurso floral (MILET-PINHEIRO et al., 2012; BURGER et al., 2013). Ademais, alguns estudos mostraram que as flores concentram a liberação de fragrância no período de maior frequência de visitação dos polinizadores, uma estratégia para aumentar a atratividade em horário oportuno e, ao mesmo tempo, poupar esforço energético (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2011).

Assim, tendo em vista que a relação entre planta e polinizador é baseada na emissão de compostos voláteis e na produção de recurso como recompensa (PARACHNOWITSCH; MANSON, 2015), o estudo da química do odor floral e da composição de açúcares do néctar é primordial para entender os mecanismos utilizados pelas plantas para aumentar seu sucesso reprodutivo.

No caso da família Apocynaceae, os mecanismos de polinização são conhecidos por serem complexos e distintos entre suas subfamílias, em parte devido à complexidade e diversidade de morfologias florais encontradas entre as subfamílias. A diversidade de padrões de fragrâncias florais encontrados na família Apocynaceae se soma à complexidade dos mecanismos florais. Vários avanços foram feitos para determinar possíveis associações entre o perfil volátil de uma flor e o tipo de polinizador. O conhecimento da química do odor é essencial para indicar possíveis evoluções convergentes ou divergentes (OLLERTON et al., 2018; DÖTTERL; VERECKEN, 2010).

Desde que Knudsen et al. (2006) publicaram sua extensa e sistemática compilação de compostos orgânicos voláteis extraídos exclusivamente do *headspace* floral de variadas famílias botânicas, muito progresso tem sido feito em relação ao conhecimento da química do odor floral de espécies da família Apocynaceae. No entanto, praticamente todo o esforço dedicado ao conhecimento da composição química do odor floral das espécies desta família foi direcionado para as subfamílias Asclepiadoideae e Rauvolfioideae. De todas as espécies da família Apocynaceae que tiveram seu odor floral estudado por técnicas de *headspace*, 98,2%

(55 espécies) pertencem às subfamílias Asclepiadoideae e Rauvolfioideae (HEIDUK et al., 2010, 2017; JÜRGENS et al., 2006, 2008, 2010).

Para a subfamília Apocynoideae, entretanto, a composição química do odor floral do *headspace* foi descrita até o momento para apenas uma espécie. Além disso, nenhum estudo foi encontrado relacionado à sua ecologia química. O mecanismo de polinização das espécies da família Apocynoideae é distinto da família Asclepiadoideae, bem como a descrição do odor olfativo é conhecida por ser distinta, indicando que essas subfamílias possuem diferentes padrões de fragrância. É comum, por exemplo, encontrar espécies da família Asclepiadoideae com odor levemente pútrido, fétido, parecido com urina e pungente, enquanto esse perfil de fragrância não é comumente encontrado na subfamília Apocynoideae. Jürgens et al. (2006, 2008, 2010) que estudaram mais de 40 espécies da subfamília Asclepiadoideae nos últimos 12 anos, ressaltam a importância de avançar os estudos sobre a química de fragrâncias florais para outras subfamílias e assim aumentar o conhecimento sobre a diversidade química do odor floral das Apocynaceae e suas possíveis funções dentro da relação planta-polinizador.

Temnadenia odorifera (Vell.) JF Morales pertence à subfamília Apocynoideae, e pode ser considerada como um sistema favorável para a exploração da química floral e suas possíveis funções em relação às interações planta-visitante floral, uma vez que esta espécie possui um mecanismo de polinização semelhante a outras espécies de Apocynoideae, além de ter um tempo de antese e uma quantidade de emissão volátil que permitem, com certa facilidade, estudar a química dos voláteis e do néctar com as técnicas analíticas comumente recomendadas para a área de química floral. *T. odorifera* é uma espécie endêmica da Mata Atlântica brasileira; especificamente, ela ocorre em vegetação de Restinga, um termo usado para se referir a arbustos baixos e florestas que são estabelecidas em áreas arenosas ao longo do litoral brasileiro (MORALES, 2005; ENDRESS et al., 2014).

Sobre o aspecto de sua ocorrência, é importante ressaltar que as áreas de Restinga ocorrem em bioma de Mata Atlântica que, por sua vez, é considerada área prioritária de preservação devido a sua alta concentração de plantas endêmicas e o risco que este bioma vem sofrendo pela ação antrópica; por conta destas características a Mata Atlântica é classificada como um dos mais importantes *hotspots* de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000; RIBEIRO et al., 2011). Nesse sentido, o estudo desta espécie pode contribuir com informações relevantes que reforcem a necessidade da preservação do bioma Mata Atlântica.

Como primeiro passo para o entendimento da química envolvida na ecologia da visitação floral de *T. odorifera* e para ampliar nosso conhecimento sobre a diversidade de voláteis produzidos pela subfamília Apocynoideae (Apocynaceae), este estudo teve como objetivo responder às seguintes questões: (1) Quais compostos voláteis são emitidos pelas flores e néctar desta espécie *in vivo*? (2) Qual é o padrão temporal de emissão de odores e sua relação com a visitação de insetos? (3) Qual é a composição de açúcar do néctar e sua relação com o espectro de visitantes florais?

Para abordar as questões supracitadas, realizou-se uma análise sistemática do aroma das flores de *T. odorifera* usando o *headspace* dinâmico *in situ*, analisando a composição do açúcar do néctar usando cromatografia líquida de alta eficiência. Ademais, foram realizados bioensaios comportamentais em campo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O estudo realizado com a espécie *T. odorifera* foi conduzido em duas diferentes localidades: **Área 1** – município de Quissamã, próximo à praia do Visgueiro, no estado do Rio de Janeiro (22° 11'27"S, 41° 25' 33.5" W) em uma área de vegetação de Restinga; **Área 2** – Horto botânico do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. UFRJ) com plantas cultivadas (Figura 32). As etapas que serão descritas a seguir foram desenvolvidas ora no Local 1 e ora no Local 2, ou em ambos de acordo com a logística do experimento. Em cada caso, a área do estudo será indicada.

Em cumprimento à Lei 13.123, de 20 de maio de 2015, o acesso ao patrimônio genético de *Temnadenia odorifera* foi cadastrado no SISGEN sob nº A5AA808. Uma amostra foi depositada como exsicata no herbário do Museu Nacional e está registrada sob nº R - 233.088.

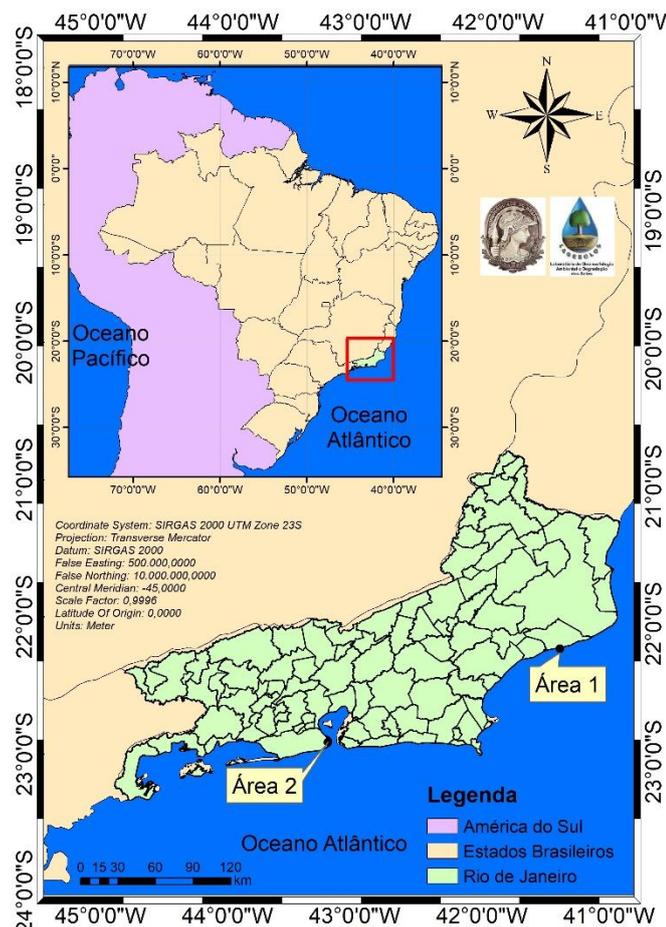


Figura 32 - Mapa com a indicação das áreas de amostragem dos estudos realizados com *T. odorifera*. Autor: Geógrafo Leonardo S. Pereira.

2.2 Coleta de voláteis para análise da variação temporal da emissão de odor floral

O odor floral foi coletado usando a técnica de *headsapce* dinâmico, baseada em Kaiser (2000) e Raguso e Pellmyr (1998). O sistema de extração utilizado no estudo foi desenvolvido no próprio laboratório (capítulo 2 desta tese).

No procedimento de extração, a inflorescência inteira contendo apenas flores em antese foi ensacada em uma sacola de polietileno (15 cm X 25 cm) para isolá-la do ambiente externo e minimizar eventuais contaminações. Os voláteis emitidos foram capturados em um cartucho, consistindo de um microtubo de vidro (2 cm de comprimento; 1 mm de diâmetro interno), aberto nas duas extremidades, contendo 3 mg de adsorvente polimérico poroso (Porapak Q[®], 80-100 mesh, Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada), limpo previamente com 150 µL de hexano antes de cada extração. O adsorvente foi contido nos microtubos por meio de lã e pérolas de vidro.

Os voláteis emitidos pela planta foram forçados a passar através do cartucho contendo adsorvente por meio de uma bomba de vácuo conectada ao sistema, com vazão de 200 mL min⁻¹, verificada com rotâmetro. Uma segunda bomba com fluxo positivo foi conectada no lado oposto à bomba de vácuo. Este ar de entrada foi filtrado com um cartucho de carvão ativo (30 mg), previamente limpo com 2 mL de hexano e seco por 30 minutos em estufa.

Após cada extração, o cartucho adsorvente foi eluído com 50 µL de hexano (Absol. 99,5%, Tedia, São Paulo, Brasil) e, logo em seguida, adicionou-se ao eluato obtido uma alíquota de 2 µL de solução de *n*-octadecano (4 mg mL⁻¹) como padrão interno. Após adição de padrão interno, o eluato foi transferido a uma microampola, selada com maçarico e armazenada sob baixa temperatura (-16 °C) até a análise.

Para detectar eventuais contaminantes, foram realizadas extrações-controle, nas quais o mesmo procedimento acima descrito foi realizado, contudo, com a sacola vazia.

O número de flores em cada dia de extração variou entre uma e três flores, conforme a disponibilidade de flores abertas. Contudo, a quantificação dos voláteis foi normalizada por massa de flor seca. As flores foram secas em estufa a 40 °C até massa constante. As inflorescências em fase de pré-antese foram ensacadas e os sacos mantidos até o início do experimento. A composição química do odor floral foi avaliada a partir da extração nos anos de 2016 e 2017, ambos no mês de janeiro.

Para avaliar a variação temporal da emissão de voláteis, o odor floral foi amostrado por 3 horas, em três períodos do dia: 9-12h, 12-15h e 15-18h. A amostragem foi repetida por 6 dias não consecutivos.

2.3 Coleta de voláteis de flores em senescência

O odor de flores de *T. odorifera* no período de senescência também foi extraído utilizando-se o mesmo procedimento acima descrito, para comparação com o perfil volátil do período de antese. A extração foi realizada a partir das 9 horas da manhã, 27 horas após o início da antese, que se deu na manhã do dia anterior.

2.4 Análise química do odor floral coletado

Uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi injetada, em modo sem divisão de fluxo, em um cromatógrafo a gás, Agilent modelo 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com uma coluna capilar com fase HP-5MS (5% fenil-metilpolisiloxano; 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm), usando hidrogênio como gás carreador sob fluxo de 1 mL min⁻¹. O injetor foi

mantido a 250 °C e o detector de ionização por chama (DIC) mantido a 280 °C. O forno cromatográfico teve sua temperatura programada de 40 °C (por 5 min) a 240 °C, a uma taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹.

A quantidade de cada composto foi calculada por meio da relação entre a área absoluta do padrão interno e a área de cada substância em análise e corrigida pelo fator de resposta da classe química à qual pertence a substância. A quantidade de cada composto foi expressa como concentração em ng g⁻¹ de flor seca, de acordo com a equação abaixo:

$$C_{VF} = [(AA_{VF} / AA_{p.i.}) \times C_{p.i.} \times FRR] / M_{flor}$$

onde C_{VF} é a concentração, expressa como ng g⁻¹ de flor seca, de um dado composto volátil sob análise, AA_{VF} é a área absoluta do sinal do volátil floral, $AA_{p.i.}$ é a área absoluta do sinal do padrão interno (*n*-octadecano) e M_{flor} é a massa em g das flores usadas na amostragem. FRR é o fator de resposta relativo da classe à qual pertence o volátil floral sob análise.

As amostras também foram analisadas por cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM), onde foi utilizado um equipamento Agilent modelo 6890N equipado com um detector de massas 5973N e uma coluna capilar com fase HP-5MS (5% fenil-metilpolisiloxano; 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm). Hélio foi usado como gás carreador (1 mL min⁻¹). O detector de massas foi operado em modo de ionização eletrônica (70 eV), com 3,15 varreduras/segundo, com faixa de massas de 40 a 450 u. A linha de transferência foi mantida em 260 °C, fonte de íons em 230 °C e o analisador (quadrupolo) a 150 °C. O programa de temperatura e as condições de injeção foram as mesmas usadas em CG-DIC.

2.5 Cálculo do Fator de Resposta Relativo

Os fatores de resposta foram calculados para 5 diferentes classes de voláteis que ocorrem no odor floral de *T. odorifera*. Para calcular o fator de resposta de uma determinada classe química, substâncias voláteis representativas (mais de duas, quando possível) foram diluídas em hexano, em quatro diferentes concentrações (0,04, 0,08, 0,16 e 0,4 mg mL⁻¹). Uma alíquota de 0,20 mg mL⁻¹ de *n*-octadecano foi adicionada em todas as soluções. As soluções obtidas foram injetadas em CG-DIC, em triplicata. Após injeção, uma curva de calibração foi construída para cada uma das substâncias representativas, baseada na razão entre área do padrão

interno e área do analito de referência VS. razão entre concentração do padrão interno e concentração do analito de referência (MAGGI et al., 2010). A fórmula usada foi

$$FRR = Cc.r./[(AAc.r./AAp.i.)] \times Cp.i.$$

Onde FRR é o Fator de Resposta Relativo de uma dada classe química, Cc.r. é a concentração do composto padrão, representativo de uma classe química (por exemplo, salicilato de metila e benzoato de etila para ésteres aromáticos), AAc.r. é a área absoluta do composto representativo, AAp.i. é a área absoluta do *n*-octadecano e Cp.i. é a sua concentração.

As substâncias representativas usadas para o cálculo do *FRR* de cada classe foram limoneno, α -pineno e γ -terpineno (monoterpenos); linalol, carvona e α -terpineol (monoterpenos oxigenados); (*E*)-cariofileno e α -humuleno (sesquiterpenos); 3-octanona e acetofenona (cetonas); (*E*)-cinamaldeído e benzaldeído (aldeídos); salicilato de metila e benzoato de etila (ésteres); decanol e 3-metil-2-decanol (alcoóis alifáticos).

2.6 Coleta de voláteis do néctar e análise cromatográfica (CG-EM)

A fim de coletar o odor proveniente exclusivamente do néctar, os voláteis foram extraídos por meio da técnica de microextração em fase sólida (MEFS). Uma fibra contendo divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS; 50/30 μ m, Supelco, Ontário) foi utilizada e ativada previamente conforme instruções do fabricante.

Para a extração, 50 μ L de néctar puro proveniente de flores do Local 1 foram transferidos para um frasco de 1,5 mL e selado com tampa contendo septo de PTFE, que por sua vez foi submetido à temperatura de 40 °C por 40 min. Após o tempo de equilíbrio, a fibra de MEFS foi exposta ao *headspace* do néctar por 30 min., tempo no qual os analitos disponíveis no *headspace* foram extraídos pela fibra. Após o tempo de extração, a fibra foi recolhida e, logo em seguida, introduzida no injetor cromatográfico por 3 min para a dessorção e análise dos analitos extraídos.

A análise foi realizada por meio de cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas com o método de análise seletiva de íons (CG-EM/SIM); os íons

programados para o modo SIM foram aqueles comuns às substâncias detectadas no *headspace* das flores de *T. odorifera* e descritas na Tabela 7. A análise dos voláteis extraídos pela fibra de MEFS foi realizada em cromatógrafo a gás modelo 7890A equipado com um detector de massas Agilent 5975C. Uma coluna capilar HP-5MS (5% fenil-metilpolisiloxano; 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) de sílica fundida foi utilizada. Gás hélio foi usado como gás de arraste com um fluxo de 1,0 mL/minuto. O detector de massas foi operado no modo ionização eletrônica (70 eV). A linha de transferência foi mantida em 260 °C, fonte de íons 230 °C e o analisador 150°C. O forno cromatográfico foi programado de 40 °C (5 min.) a 240 °C em 3 °C/min. A fibra de MEFS foi exposta no injetor a 250°C no modo sem divisão de fluxo. No injetor cromatográfico foi utilizado encamisamento de vidro (*liner*) de 0,75 mm de diâmetro interno, próprio para análises com MEFS. O procedimento de extração e análise cromatográfica foi realizado em triplicata.

2.7 Identificação dos voláteis

Em todos os casos supracitados, a identificação dos compostos voláteis foi realizada por meio da comparação de seus espectros de massas com aqueles disponíveis na biblioteca *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, em conjunto com o seu índice de retenção linear, e em comparação com a literatura. Os índices de retenção linear foram calculados conforme Van Den Dool e Kratz (1963), a partir dos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₇-C₂₆), injetados nas mesmas condições supracitadas. Além disso, a identificação de alguns compostos presentes no odor floral de *T. odorifera* foi confirmada com a injeção de padrões autênticos nas mesmas condições cromatográficas.

2.8 Coleta do néctar

O néctar foi amostrado de duas localidades: (1) flores de uma população natural localizada na Reserva Nacional da Restinga de Jurubatiba, no município de Quissamã, na comunidade da praia do Visgueiro, em janeiro de 2017 (Local 1); (2) flores de indivíduos cultivados no jardim do Horto Botânico do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, localizado no bairro de São Cristovão, na cidade do Rio de Janeiro, em janeiro de 2016 (Local 2). Em ambos os casos, o néctar foi coletado com uma seringa de 10 µL (Hamilton), transferido para um frasco de 1 mL com redutor de volume de 100 µL e armazenado em baixa temperatura (-16 °C) até a análise.

As flores provenientes de plantas nativas (Local 1) foram ensacadas no dia anterior ao início da antese para evitar o consumo de néctar por visitantes florais em forrageio. As flores cultivadas (Local 2) foram ensacadas previamente à coleta do néctar.

2.9 Análise de açúcares do néctar

A análise de açúcares do néctar foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um sistema Shimadzu CLAE LC-20AD 19777 (Kyoto, Japão) com detector de índice de refração. O preparo da amostra para injeção consistiu da diluição de alíquota de amostra de néctar de flores individuais em fase móvel, em uma razão 1:9 (10 µL de néctar em 90 µL de fase móvel), sendo a fase móvel constituída de solução H₂SO₄ (1mM), preparada em água ultra pura (Milli-Q[®] Millipore Corporation, Burlington, USA). A separação dos açúcares foi alcançada por meio da injeção de 5 µL de amostra em uma coluna Aminex HPX-87H (150 mm x 7,8 mm; 9 µm, Bio Rad, Hercules, USA), em modo isocrático. Um fluxo de 0,7 mL min⁻¹ de fase móvel (H₂SO₄ 1mM) e 7 min de corrida total foram suficientes para a separação.

O método acima descrito foi validado quanto à precisão, reprodutibilidade, seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. Para verificar a seletividade, o efeito matriz foi investigado para a sacarose, glicose e frutose por meio da comparação de suas curvas em solução aquosa e em matriz (solução aquosa de néctar). Após a determinação de efeito matriz, a linearidade foi avaliada por meio do teste de Grubb e homocedasticidade pelo teste de Cochran.

As curvas de calibração foram construídas por meio da injeção de soluções aquosas dos açúcares nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40 mg mL⁻¹ para a sacarose e 1, 5, 10, 15 e 20 mg mL⁻¹ para as hexoses. As injeções foram realizadas em triplicata.

A acurácia foi determinada por meio da recuperação dos açúcares e a precisão por meio da repetibilidade. LOQ e LOD foram determinados por meio da injeção dos açúcares até que a razão sinal/ruído fosse igual a 3 e 10, respectivamente (TINOCO et al., 2016; DUARTE-DELGADO et al., 2015).

2.10 Bioensaios comportamentais *in situ* com flores artificiais e o composto sintético majoritário de *T. odorifera*

Para avaliar se o composto majoritário (2-feniletanol) presente no odor floral de *T. odorifera* possui função atrativa aos insetos visitantes, foram realizados bioensaios comportamentais em uma área de Restinga do município de Quissamã (área 1, Figura 32). Foram realizados três diferentes bioensaios de dupla escolha no período de 9 a 12 de janeiro de 2017, de 6 às 10h.

No bioensaio 1 foi usado um disco circular de papel de filtro analítico, no bioensaio 2 foi usado um disco circular colorido de um tom próximo à flor natural. Nestes bioensaios, foi adicionada a cada 20 min uma alíquota de solução de 2-feniletanol equivalente ao que é liberada por 15 flores por hora. No bioensaio 3 foi adicionada à flor artificial 3 µL de padrão puro de 2-feniletanol a cada 20 min. Em cada bioensaio, foram usadas flores artificiais perfumadas com o composto sintético e flores artificiais controle, nas quais eram adicionadas apenas o mesmo volume de solvente que foi usado para a diluição do composto teste. A plataforma de pouso das flores artificiais usadas nos bioensaios tinha o tamanho da corola da flor natural.

Considerando que a busca e a escolha de flores por insetos são processos complexos e envolvem várias etapas, procuramos na observação das flores durante os bioensaios contabilizar como resposta comportamental positiva tanto abordagens quanto pousos. Sendo a *abordagem* o ato de um inseto se aproximar da flor sintética a uma distância, por volta, de 5 cm por, pelo menos, 2 segundos, mas não efetivar pouso; e *pouso* o ato de um inseto efetivar aterrissagem após uma abordagem (MILET-PINHEIRO *et al.* 2012; LARUE; RAGUSO; JUNKER, 2016).

2.11 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software Statistica 7.0 (Statsoft, América do Sul), aplicando a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para diferenças entre médias com 5% de nível de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição e variação temporal do odor

No odor das flores da espécie *T. odorifera* foram identificados um total de 23 compostos voláteis, incluindo monoterpenos (6), monoterpenos oxigenados (2), sesquiterpeno (1) e fenilpropanoides e benzenoides (11). Os compostos estão listados na Tabela 7 em ordem de eluição. Independentemente do período de antese, a fragrância floral foi dominada por alguns compostos, e apenas onze deles (fenilpropanoides/benzenoides) compreenderam entre 66,2 e 83,0% da fragrância floral. Os perfis do odor floral diferiram significativamente entre os diferentes períodos de antese investigados. Os períodos avaliados foram selecionados para estudo em função do conhecimento prévio a respeito do início da antese, de sua duração e da frequência de visitação dos insetos às flores de *T. odorifera* (KOSCHNIZTKE; SILVA; ALVES, 2011). A taxa absoluta de emissão de odor floral foi maior durante o período compreendido entre 9 e 12h. Além disso, 2-feniletanol (Figura 33) e o álcool (*E*)-cinamílico

foram emitidos em taxas maiores do que outros compostos somados em qualquer hora da antese. O Apêndice 2B traz as estruturas químicas das substâncias presentes no odor das flores de *T. odorifera*.

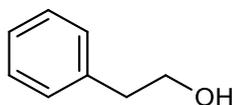


Figura 33 - 2-feniletanol.

A análise da composição química volátil de *T. odorifera* no período de senescência revelou que as flores continuam a liberar voláteis, embora numa concentração baixa e em menor diversidade comparada ao período de antese (Tabela 7).

A quantidade total de odor emitido pelas flores variou significativamente ($F_{2,12} = 78,944$, $p = 1,24 \times 10^{-7}$) ao longo da antese. Quando as médias das emissões dos três períodos investigados foram comparadas, verificou-se diferença significativa (Teste de Tukey–Kramer, $p < 0,05$) entre os três períodos da antese (Figura 34).

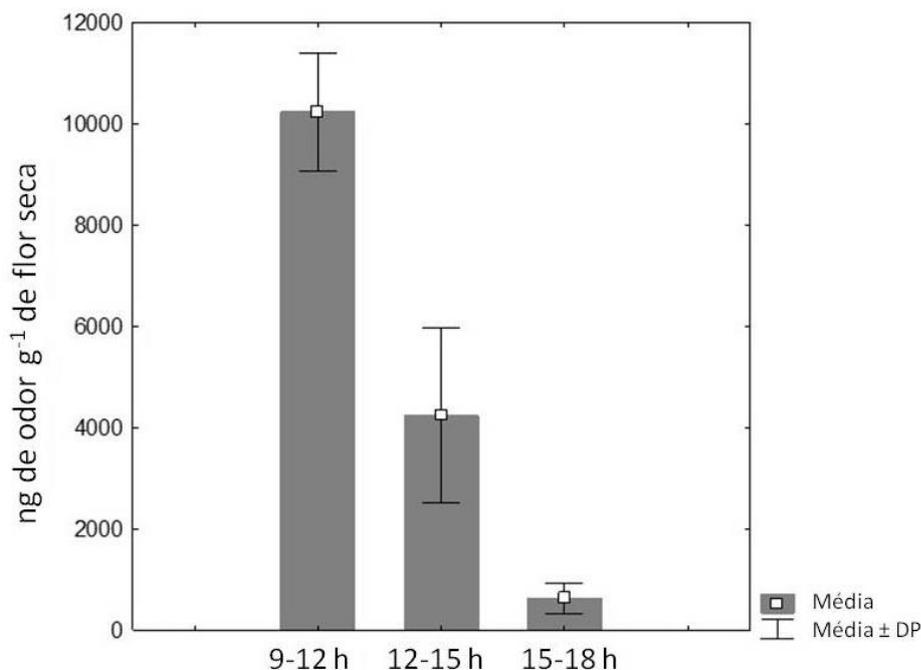


Figura 34 - Comparação entre a intensidade da emissão da fragrância floral de *T. odorifera* em três períodos da antese.

3.2 Voláteis emitidos pelo néctar

Oito substâncias voláteis foram detectadas no néctar de *T. odorifera*. Os compostos estão listados na Tabela 7. Os voláteis do néctar estão presentes em baixa concentração, em nível traço, já que não foram detectados por análise de varredura total de íons (modo SCAN; CG-EM) e apenas no modo de análise seletiva de íons (modo SIM; CG-EM), modo de análise cromatográfica comumente empregada em análise de traços, por ser mais sensível. Os compostos encontrados foram dois terpenos, dois alcoóis aromáticos, dois ésteres aromáticos e um aldeído aromático, sendo, respectivamente, *p*-cimeno, limoneno, α -copaeno, álcool benzílico, 2-feniletanol, benzoato de etila, salicilato de metila e fenilacetaldéido acetaldéido benzênico.

Os néctares florais são constituídos por uma solução aquosa de açúcares, sendo os mais frequentes a sacarose, a glicose e a frutose. Além destes açúcares, pode ser encontrado com frequência um amplo espectro de outros metabólitos minoritários, como aminoácidos, lipídeos e compostos orgânicos voláteis. Estes últimos, no entanto, são frequentemente negligenciados em estudos de química do néctar. Raguso (2004) verificou, por exemplo, que de 127 estudos dedicados à química do néctar entre os anos de 1993 e 2003, apenas um abordava diretamente a análise de odor do néctar. Contudo, alguns estudos vêm demonstrando a importância de considerar o estudo dos néctares perfumados em alguns contextos de polinização (KESSLER; BALDWIN, 2006; PARACHNOWITSCH *et al.*, 2013; HOWELL; ALARCÓN, 2007).

No presente estudo, das oito substâncias detectadas no néctar de *T. odorifera*, cinco foram encontradas também no odor floral e três foram encontradas exclusivamente no néctar (benzoato de etila, salicilato de metila e α -copaeno), o que sugere que estas últimas tenham sido secretadas diretamente no néctar. Uma possível explicação de estas substâncias estarem presentes apenas no néctar poderia ser uma estratégia de diferenciação espacial para servir como guia de néctar aos seus polinizadores, tal como foi sugerido por Dötterl e Jürgens (2005) para o caso da diferença espacial da fragrância floral da espécie *Silene latifolia*. Resultado similar foi encontrado por Balao *et al.* (2011) ao estudar o odor do néctar e outras partes florais de *Dianthus inoxianus*. A respeito disto, é importante considerar que as substâncias salicilato de metila e benzoato de etila, encontradas unicamente no néctar de *T. odorifera*, mas não em seu odor floral, são conhecidas por sua atratividade de abelhas (Dötterl e Vereecken 2010; Schiestl e Roubik 2003), sendo inclusive usadas como isca para captura em estudos entomológicos (Ferreira *et al.* 2011). No caso de *T. odorifera*, a espécie é visitada mais frequentemente por abelhas *Euglossini* como observado por Koschnitzke, Silva e Alves (2011).

Além disso, a presença de odor no néctar pode servir para os insetos como um sinal honesto da presença de recurso, o que diminui o tempo de procura e evita pousos desnecessários. Howell e Alarcón (2007) demonstraram que abelhas do gênero *Osmia* são capazes de detectar diretamente a presença de néctar em flores de *Penstemon caesius* através de sinais olfativos, evitando visitar flores cujo néctar foi esgotado.

Contudo, o odor no néctar pode apresentar outras funções ecológicas, tais como agentes antimicrobianos, além de poder servir também como repelente a insetos que não são polinizadores efetivos (RAGUSO, 2004a). Kessler e Baldwin (2006), por exemplo, encontraram 16 substâncias voláteis no néctar de *Nicotiana attenuata* e, após serem submetidas a bioensaios comportamentais com três grupos de visitantes florais, observaram que as substâncias detectadas no néctar apresentaram influência comportamental diferente conforme o visitante em estudo. Assim, enquanto limoneno, linalol e ésteres aromáticos se mostraram repelentes às espécies de beija-flor *Archilochus alexandri* e *Selasphorus rufus*, alcoóis aromáticos se mostraram atraentes. Já os ésteres aromáticos benzoato de metila, benzoato de etila e salicilato de metila influenciaram atrativamente o comportamento da espécie de mariposa *Manduca sexta*.

Como já mencionado, apenas três substâncias foram encontradas exclusivamente no néctar de *T. odorifera*, o que pode levar a um questionamento sobre a origem das demais substâncias. A hipótese mais simples, segundo Raguso (2004), que explica como o néctar se torna perfumado, reside no fato de que voláteis liberados por tecidos florais próximos ao néctar podem ser parcialmente solubilizados no meio aquoso. Para o caso da espécie *T. odorifera*, essa hipótese é especialmente plausível quando se considera que as cinco substâncias voláteis encontradas tanto no néctar quanto no odor floral são de natureza solúvel em solução aquosa, como demonstrado por Weidenhamer *et al.* (1993). Entretanto, uma possível solubilização não intencional não excluiria a possibilidade dos visitantes florais de *T. odorifera* fazerem uso do odor encontrado no néctar para diferenciar flores que contenham recurso daquelas que estão esgotadas, já que abelhas, por exemplo, apresentam capacidade de aprender diferentes padrões de odor e fazer uso da aprendizagem para reconhecimento e localização de recurso floral (BURGER *et al.*, 2010, MILET-PINHEIRO, 2012, KOMISCHKE *et al.*, 2002).

Tabela 7 - Taxa de emissão dos compostos voláteis das flores de *Temnadenia odorifera* em diferentes horários da antese. Média ± desvio padrão; n = 5; ng g⁻¹ de flor seca.

	Composto Quantidade total (ng/g de flor seca)	LRI ^a	LRI ^b	9 à 12 h ^d 10232,7	12 à 15 h ^d 5085,7	15to18 h ^d 620,2	^e Senescência	^f Nectar
1	α-pineno ^c	933	932	396,9 ± 83,0	189,5 ± 116,0	64,2 ± 33,9		
2	benzaldeído ^c	960	952	21,0 ± 12,0				
3	β-pineno	974	974	685,4 ± 177,6	178,5 ± 126,5			
4	mirceno	992	988	10,5 ± 9,9	7,6 ± 9,3			
5	n-decano	1002	1000	7,2 ± 6,8	18,2 ± 19,5			
6	p-cimeno ^c	1024	1020	27,6 ± 25,5	29,5 ± 45,5		nq	nq
7	limoneno ^c	1026	1024	54,2 ± 12,9	167,6 ± 243,8	2,0 ± 2,2	nq	nq
8	álcool benzílico ^c	1035	1026	224,0 ± 82,7	97,7 ± 78,5	1,2 ± 0,5		nq
9	2-fenilacetaldeído	1042	1036	193,1 ± 58,1	233,1 ± 383,0	28,2 ± 16,9		nq
10	(E)-β-ocimeno	1049	1044	211,6 ± 92,0	97,5 ± 141,7	26,2 ± 15,8	nq	
11	γ-terpineno	1057	1054	nq	nq			
12	acetofenona	1065	1059	nq				
13	linalol ^c	1096	1095	67,8 ± 38,2	99,0	9,5 ± 9,9		
14	nonanal ^c	1100	1100	125,3 ± 132,4	163,7 ± 196,2	107,5 ± 56,6		
15	2-feniletanol ^c	1110	1106	5110,3 ± 1194,9	1836,7 ± 502,5	219,3 ± 112,9		nq
16	cânfora	1138	1141	20,1 ± 12,9	26,9 ± 17,9			
17	(Z)-cinamaldeído	1217	1217	19,9 ± 24,4	32,3 ± 39,3			
18	3-fenilpropanol	1230	1231	nq	nq			
19	(Z)-álcool cinamílico	1261	1259	48,2 ± 15,7	10,3 ± 6,4			
20	(E)-cinamaldeído ^c	1268	1267	118,1 ± 78,4	145,4 ± 212,1	162,0 ± 73,2		
21	3-fenilpropanoato de metila	1274	1277	nq				
22	indol	1287	1290				nq	
23	(E)-álcool cinamílico ^c	1308	1303	2762,5 ± 545,5	1406,6 ± 716,3			
24	(E,E)-α-farneseno	1505	1505	128,9 ± 57,6	139,7 ± 98,8			
25	benzoato de etila	1165	1169					nq
26	salicilato de metila	1187	1190					nq
27	α-copaeno	1371	1374				nq	nq

Tabela 7. Taxa de emissão dos compostos voláteis das flores de *Temnadenia odorifera* em diferentes horários da antese. Média ± desvio padrão; n = 5; ng g⁻¹ de flor seca. (continuação)

IRL^a = Índice de Retenção Linear experimental; IRL^b = Índice de Retenção Linear da literatura (Adams 2017);

nq = composto identificado, mas não quantificado; ^cIdentificação confirmada com injeção de padrão; ^dn = 6; ^ea extração foi realizada um dia após o início da antese; ^fOs voláteis foram extraídos por MEFS do néctar do Local 1,

A quantidade total de odor emitido pelas flores de *T. odorifera* diminui significativamente ao longo da antese, com maior liberação de manhã. Resultados similares foram encontrados por outros autores que estudaram a interação planta-inseto em espécies polinizadas preferencialmente por abelhas (MILET-PINHEIRO et al., 2015, MILET-PINHEIRO; SCHLINDWEIN, 2009), como é o caso da *T. odorifera*, mais frequentemente visitada por abelhas *Euglossini* no período da manhã (KOSCHNIZTKE; SILVA; ALVES, 2013).

A maior emissão de odor floral por *T. odorifera* pela manhã coincide com o período do dia de maior visitação de insetos, 6 às 10h, caindo drasticamente após as 11h (KOSCHNIZTKE; SILVA, 2013). Segundo Dressler (1982), no período da manhã as abelhas *Euglossini* estão mais ativas, quando partem, geralmente, em busca de recursos, como fragrância ou néctar. Assim, a convergência entre a maior emissão de odor com o período de maior atividade de polinizadores seria uma estratégia para concentrar recursos energéticos quando a frequência de visitação às flores é alta. Este mecanismo foi sugerido também por autores que estudaram outros sistemas (MILET-PINHEIRO et al., 2015, FILELLA et al., 2013).

O odor floral de *T. odorifera* foi dominado por terpenos e fenilpropanoides/benzenoides. Compostos dessas classes são comuns entre plantas polinizadas por abelhas e borboletas (DOBSON, 2006), como é o caso da *T. odorifera*. Entre os voláteis emitidos por *T. odorifera*, vários são comprovadamente conhecidos por desencadear resposta comportamental positiva em abelhas *Euglossini* (DÖTTERL; VEREECKEN, 2010). Especificamente os compostos mirceno, limoneno, linalol, salicilato de metila e (*E,E*)- α -farneseno são detectados pelas antenas da abelha *Eulaema nigrita*, polinizador mais eficiente de *T. odorifera*, quando submetidas à detecção por eletroantenografia (CG-EAD) (MILET-PINHEIRO et al., 2015). Isto sugere que a espécie *T. odorifera* tem usado estas substâncias para atração desta espécie de abelha. É importante salientar que o salicilato de metila foi encontrado apenas no néctar das flores de *T. odorifera*, podendo, assim, ser usado como um sinal honesto de recurso.

Além das abelhas, *T. odorifera* é, com menor frequência, visitada por borboletas, e o 2-feniletanol é um dos compostos mais recorrentes em plantas polinizadas por borboletas e um marcador importante, despertando uma resposta eletrofisiológica em antenas de borboletas de várias espécies, como em *Inachis io*, *Aglais urticae* e *Gonepteryx rhamni*. O composto 2-feniletanol está presente em grande proporção no odor floral de *T. odorifera* em todos os períodos da antese investigada, o que pode ser considerado um sinal de atração para esse tipo de inseto.

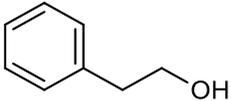
No entanto, embora esse composto seja comumente associado à atração por borboletas, Kobayashi et al. (2012) demonstraram as respostas eletrofisiológicas do *Apis mellifera* a esse composto. Além disso, o 2-feniletanol é muito comum em várias espécies do gênero *Gongora* (Orchidaceae), que é reconhecido e polinizado por abelhas Euglossini. No entanto, pelo que sabemos, não foram encontrados estudos eletrofisiológicos associando a este composto com as abelhas *Euglossini* estudos.

O segundo composto mais abundante no odor floral de *T. odorifera*, álcool (E)-cinamílico, também provocou respostas eletrofisiológicas em borboletas – *Inachis io*, *Aglais urticae* e *Gonepteryx rhamni*.

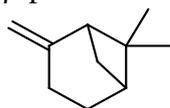
Além de abelhas, a espécie *T. odorifera* é frequentemente visitada por borboletas. Em relação a este tipo de visitante, é importante considerar que, segundo Andersson et al. (2002), o composto 2-feniletanol é um dos mais recorrentes em plantas polinizadas por borboletas, sendo, portanto, um importante marcador. A substância 2-feniletanol é o composto presente em maior proporção no odor floral em qualquer período da antese investigado, o que pode ser considerado um sinal de atração para este tipo de polinizador.

Como se pode observar na Tabela 8, várias substâncias que perfazem o odor floral de *T. odorifera* já foram descritas em outros estudos como desencadeadoras de respostas eletroantegráficas em diferentes espécies de abelhas e de borboletas.

Tabela 8 - Compostos majoritários do odor floral de *T. odorifera* que despertam respostas comportamentais ou eletroantegráficas em abelhas e borboletas.

Composto	Espécies de abelha ou borboleta	Referência
2-feniletanol 	<i>Gonepteryx rhamni</i> ^{bo} <i>Inachis io</i> ^{bo} , <i>Aglais urticae</i> ^{bo} , <i>Apis mellifera</i> L. ^{ab} <i>Chelostoma rapunculi</i> ^{ab} <i>Euglossa cognata</i> ^{ab} <i>Euglossa imperialis</i> ^{ab} <i>Euglossa tridentata</i> ^{ab} <i>Bombus terrestris</i> ^{ab} <i>Andrena vaga</i> ^{ab}	ANDERSSON, 2003 SWANSON <i>et al.</i> 2009 KOBAYASHI <i>et al.</i> 2012 MILET-PINHEIRO <i>et al.</i> 2013 ELTZ <i>et al.</i> , 2005 DÖTTERL & VEREECKEN, 2010

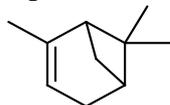
β -pineno



Bombus vosnesenskii^{ab}
Euglossa cognata^{ab}
Euglossa imperialis^{ab}
Euglossa tridentata^{ab}
Bombus terrestris^{ab}
Euglossa cybelia^{ab}

BYERS *et al.* 2014
ELTZ *et al.*, 2005
SCHIESTL & ROUBIK, 2003

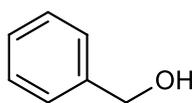
α -pineno



Apis mellifera^{ab}
Bombus vosnesenskii^{ab}
Euglossa cognata^{ab}
Euglossa imperialis^{ab}
Euglossa tridentata^{ab}
Bombus terrestris^{ab}
Euglossa cybelia^{ab}

KOBAYASHI *et al.*, 2012
BYERS *et al.* 2014
ELTZ *et al.*, 2005

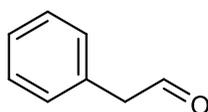
álcool benzílico



Gonepteryx rhamni^{bo}
Inachis io^{bo},
Aglais urticae^{bo},
Apis mellifera^{ab}
Apis mellifera L.^{ab}

ANDERSSON, 2003
SWANSON *et al.*, 2009.
DÖTTERL & VEREECKEN,
2010

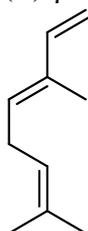
fenilacetaldéido



Gonepteryx rhamni^{bo}
Inachis io^{bo},
Aglais urticae^{bo},
Apis mellifera^{ab}
Chelostoma rapunculi^{ab}

ANDERSSON, 2003
MILET-PINHEIRO *et al.* 2013

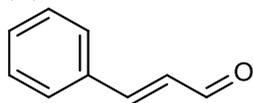
(*E*)- β -ocimeno



Chelostoma rapunculi^{ab}
Bombus vosnesenskii^{ab}
Euglossa cognata^{ab}
Euglossa imperialis^{ab}
Euglossa tridentata^{ab}
Bombus terrestris^{ab}

MILET-PINHEIRO *et al.* 2013
BYERS *et al.* 2014
ELTZ *et al.*, 2005

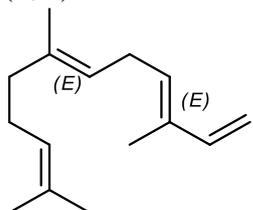
(*E*)-cinamaldeído



Peponapis pruinosa^{ab}

DÖTTERL & VEREECKEN,
2010

(*E,E*)- α -farneseno



Eulaema nigrita^{ab}
Euglossa nanomelanotricha^{ab}
Euglossa carolina^{ab}
Andrena vaga^{ab}

MILET-PINHEIRO *et al.*, 2015
DÖTTERL & VEREECKEN,
2010

^{ab}indica espécie de abelha

^{bo}indica espécie de borboleta

3.3 Composição e concentração de açúcares do néctar

A concentração e composição de carboidratos do néctar estão apresentadas na Tabela 9. Os três carboidratos mais comuns em néctar floral (LOTZ, 2006; BAKER; BAKER, 1983) foram identificados no néctar de *T. odorifera*, sacarose, glicose e frutose. O néctar foi dominado por sacarose em ambos os anos investigados, com uma concentração percentual média variando de 68,3 a 75,0% (25,4 a 43,9 mg mL⁻¹) do total de carboidratos (Tabela 9). As concentrações percentuais das hexoses glicose e frutose variaram, respectivamente, entre 14,1 a 12,4% e 12,6% a 17,6% (5,1 a 7,3 mg mL⁻¹ e 6,3 a 7,3 mg mL⁻¹, respectivamente). A razão entre as concentrações do dissacarídeo e a soma das hexoses ($r = \text{sacarose}/\text{glicose} + \text{frutose}$; $r = \text{S}/\text{G}+\text{F}$) variou entre 2,3 e 3,04 em média (Tabela 9).

Os resultados dos parâmetros de validação avaliados estão dispostos na Tabela 10. O método de análise mostrou-se adequado à quantificação de sacarose, glicose e frutose.

As flores de *T. odorifera* apresentaram um néctar dominado por sacarose em ambos os locais de coleta. Contudo, a concentração em mg mL⁻¹ deste dissacarídeo variou entre 25,4 a 43,9, em média (One-way-anova, Tukey-Kramer test, $p < 0,05$). Já as concentrações das hexoses não apresentaram diferença significativa entre as flores dos locais investigados (One-way-anova, Tukey-Kramer test, $p < 0,05$). Embora as concentrações de sacarose tenham variado significativamente entre as flores, em ambos os locais investigados, as concentrações foram muito altas, acima de 68,3 %, em comparação às somas de todos os carboidratos presentes no néctar. Além disso, a razão entre a concentração do dissacarídeo e a soma das hexoses ($r = \text{sacarose}/\text{glicose}+\text{frutose}$; $r = \text{S}/\text{G}+\text{F}$) se mostrou estatisticamente igual nas flores dos locais investigados (one-way-anova, Tukey-Kramer test, $p > 0,05$).

A razão entre os carboidratos do néctar ($r = \text{S}/\text{G}+\text{F}$) tem sido correlacionada às necessidades fisiológicas inerentes a cada grupo de polinizador (LOTZ; SCHONDUBE, 2006). Assim, de acordo com Baker e Baker (1982, 1990), néctares dominados por sacarose, ou seja, que apresentam $r > 0,999$, tem sido uma constante em flores polinizadas por borboletas, beija-flores e abelhas grandes, como é o caso da espécie *T. odorifera*. De acordo com Koschnitzke, Silva e Alves (2011), a espécie *T. odorifera* é visitada mais frequentemente pelas abelhas *Eulaema nigrita*, *E. cingulata* e *Euglossa cordata*, sendo esta última considerada polinizadora efetiva, por deixar pólen na região estigmática após o farrageio. Além destes visitantes, as autoras observaram visitas de espécies de beija-flor e borboletas.

Esses resultados estão de acordo com estudos desenvolvidos em outras espécies polinizadas por beija-flores e abelhas, como foi o caso descrito por Torres e Galetto (1998), onde verificou-se que a espécie *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae) apresenta néctar dominado por sacarose ($r = 1,4$ a $2,9$) e é mais frequentemente visitado por estes dois grupos de polinizadores.

A correlação entre néctar dominado por sacarose e polinização por abelhas e beija-flores também foi encontrada por Perret et al. (2001), onde 42 de 45 espécies do gênero *Sinningia* polinizadas por esses dois grupos de polinizadores apresentaram néctar dominado por sacarose, em detrimento às hexoses. Outras famílias com espécies polinizadas por abelhas de língua longa também apresentam néctar dominado por sacarose, como é o caso da família Iridaceae (GOLDBLATT; MANNING; BERNHARDT, 2001).

Tabela 9 - Concentração e composição de açúcares do néctar das flores de *T. odorifera*.

	n	Concentração (mg mL ⁻¹)			Concentração %			Razão
		Sacarose	Glicose	Frutose	Sacarose	Glicose	Frutose	S/(G+F)
		25,4 ±	5,1 ±	6,3 ±	68,3 ±	14,1 ±	17,6 ±	2,30 ±
2016	11	6,8b	1,0c	1,2c	7,2	3,1	4,2	0,65d
		43,9 ±	7,3	7,3		12,4 ±	12,6 ±	3,04 ±
2017	5	4,1a	±0,85c	±0,85c	75 ± 2,4	1,2	1,2	0,36d

Média ± desvio padrão

one-way ANOVA, $F_{5, 147}=360$ $p < 0,05$

Letras diferentes indicam valores estatisticamente significativos através do teste Tukey.

Tabela 10 - Parâmetros de validação para sacarose, glicose e frutose em CLAE-RI.

Parâmetro	Sacarose	Glicose	Frutose
Linearidade			
Níveis de concentração (mg mL ⁻¹)	1, 5, 10, 20, 40	1, 5, 10, 15, 20	1, 5, 10, 15, 20
Coefficiente de correlação (r)	0,9996	0,9975	0,9975
	Homocedasticidad	Homocedasticidad	Homocedasticidad
Teste de Cochran	e C _{cal} = 0,55 C _{tab} = 0,68	e C _{cal} = 0,52 C _{tab} = 0,68	e C _{cal} = 0,61 C _{tab} = 0,68
Efeito matriz	Presente t _{cal} = 2,71 t _{tab} = 2,05	Ausente t _{cal} = 1,30 t _{tab} = 2,05	Ausente t _{cal} = 1,30 t _{tab} = 2,05
LDQ (ng mL ⁻¹)	1,0	0,6	0,6
LDD (ng mL ⁻¹)	0,3	0,2	0,2
Exatidão			
Média da recuperação (%)	81,99	89,91	86,3
Precisão			
Reprodutibilidade (%)	0,07-1,09	0,03-0,805	0,05-0,873

LDQ = Limite de quantificação; **LDD** = Limite de detecção

3.4 Bioensaios comportamentais *in situ* com flores artificiais e o composto sintético majoritário de *T. odorifera*

A Figura 35 sintetiza os resultados alcançados com os bioensaios comportamentais realizados em vegetação de Restinga do município de Quissamã. Nas flores artificiais controle, nas quais foi colocado apenas solvente, não houve abordagem ou pouso de nenhum inseto. Em contraste, as flores artificiais impregnadas com 2-feniletanol (composto majoritário nas flores de *T. odorifera*) foram abordadas por insetos visitantes. Como demonstra o gráfico da Figura 35, o bioensaio da flor sintética F2 recebeu 7 abordagens de abelhas, das quais 3 abordagens de *Eulaema cingulata* (Figura 36), 1 de *Eulaema nigrita* e 3 de *Euglossa cordata*.

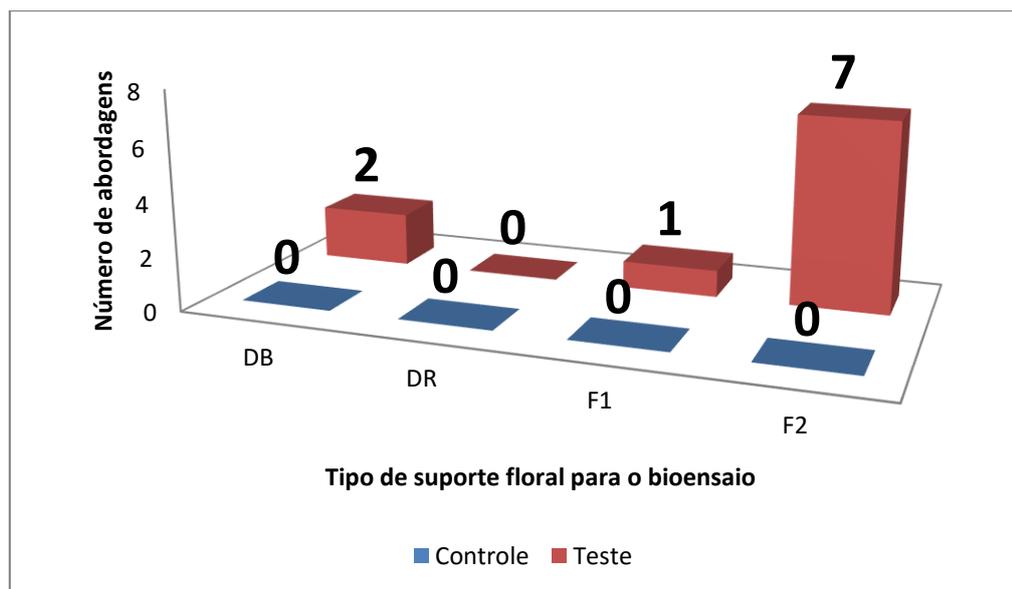


Figura 35 - Resultado dos bioensaios comportamentais considerando apenas abelhas. As colunas vermelhas representam o resultado de abordagens às flores sintéticas impregnadas com 2-feniletanol. DB: disco de papel filtro branco; DR: Disco de papel filtro avermelhado; F1: flor 1; F2: flor 2.

Além de abordagens de abelhas, as flores artificiais também receberam abordagens de outros tipos de insetos, tais como moscas e coleópteros (besouros). O gráfico da Figura 37 mostra o número de abordagens considerando todos os insetos: abelhas, moscas, coleópteros e outros himenópteros (vespas). A Figura 38 mostra um coleóptero pousado na flor artificial usada em bioensaio de área de Restinga.



Figura 36 - *Eulaema cingulata* coletando néctar de flor de *T. odorifera* em Restinga de Quissamã/RJ. Fonte: Rafael F. Silva.

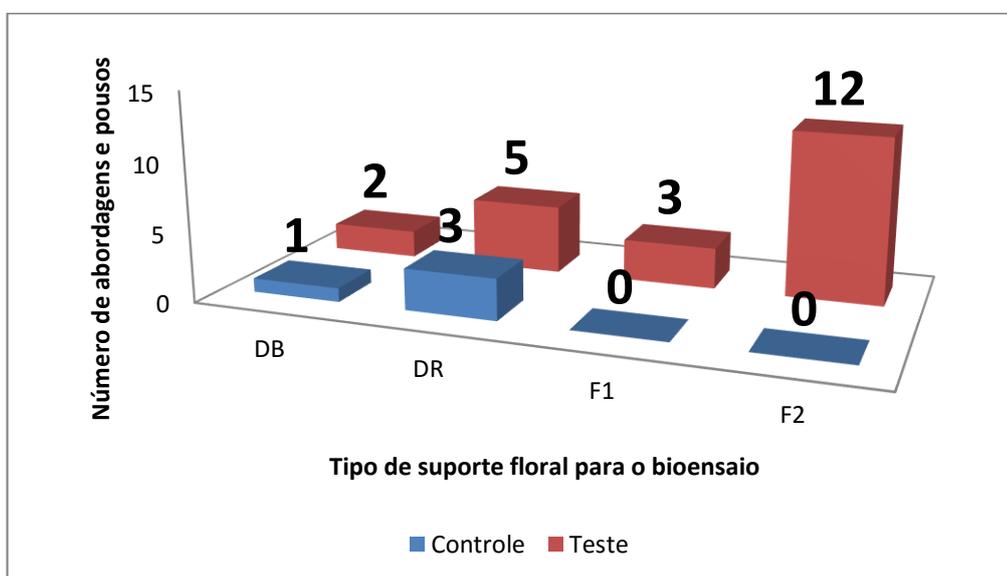


Figura 37 - Resultado dos bioensaios comportamentais considerando as abordagens de todos os insetos. As colunas vermelhas representam o resultado de abordagens às flores sintéticas impregnadas com 2-feniletanol. DB: disco de papel filtro branco; DR: Disco de papel filtro avermelhado; F1: flor 1; F2: flor 2.



Figura 38 - Coleóptero é atraído por 2-feniletanol impregnado em flor artificial. Bioensaio de campo realizado em área de Restinga.

Algumas revisões têm alertado para o entendimento de que o odor floral pode ter várias funções dentro das relações ecológicas de uma espécie. Portanto, a emissão de odor por uma flor não necessariamente estará associada à atração de polinizadores. Por exemplo, as flores de uma espécie podem liberar compostos voláteis com o objetivo de repelir herbívoros ou mesmo inibir insetos pilhadores⁷. E mesmo quando os compostos voláteis servem para atração, os insetos polinizadores podem usar o odor floral para orientação de longa distância, de curta distância, para diferenciar a qualidade e/ou a quantidade de recursos, para identificar flores em antese das flores de senescência, além de poder servir para outras funções. Enfim, como se pode notar, a questão pode ser bastante complexa a depender do sistema que está sendo investigado (PICHESKY; GERSHENZON, 2002; MUHLEMANN *et al.*, 2014). Quando se estuda a química do odor floral, é importante ter a consciência de tal complexidade em mente.

Nessa perspectiva, não é aconselhável fazer afirmações contundentes sobre a função dos compostos encontrados no odor de uma flor, a menos que se faça bioensaios comportamentais para testar as hipóteses levantadas (RAGUSO, 2006). Foi partindo dessa lógica que sentimos a necessidade de realizar um estudo comportamental com o composto majoritário encontrado no odor floral de *T. odorifera*.

O bioensaio de dupla escolha foi conduzido no município de Quissamã, numa área de Restinga. No bioensaio F2 (Figura 37), foram registradas doze abordagens ou pousos de

⁷ Os insetos visitantes que acessam o néctar de flores por via ilegítima sem promover polinização. Para mais detalhes, veja: PINHEIRO *et al.* Polinização por abelhas. In RECH *et al.* (Org.). Biologia da polinização. p. 214.

diversos insetos. Contudo, o número de abordagens por insetos que realmente visitam as flores *T. odorifera* foi um pouco menor: sete abordagens, sendo todas de abelhas (Figura 35). De modo mais detalhado, foram registradas três abordagens de *Eulaema cingulata*, uma de *Eulaema nigrita* e três de *Euglossa cordata*. É importante destacar que estas espécies de abelhas são visitantes habituais de *T. odorifera*, conforme foi descrito por Koschnitzke, Silva e Alves (2011). Portanto, podemos concluir que a substância 2-feniletanol atua efetivamente na atração de visitantes florais e do polinizador de *T. odorifera*, a abelha *Eulaema nigrita* – que realizou uma abordagem e é considerada polinizadora efetiva das flores de *T. odorifera* por depositar pólen na região estigmática.

5 CONCLUSÃO

A análise da composição química do atrativo e recurso floral disponíveis em *T. odorifera* (voláteis e néctar, respectivamente) forneceu um entendimento mais amplo dos mecanismos responsáveis pelas interações planta-polinizador. A razão entre dissacarídeo e hexoses do néctar floral, por exemplo, demonstra forte relação com a predição de seus insetos visitantes. Além disso, o perfil volátil de *T. odorifera* está de acordo com os polinizadores desta espécie (abelhas *Euglossini*). Há uma diferença considerável de perfil volátil entre flores em período de antese e senescência, indicando uma concentração de esforços energéticos da espécie durante a antese. As substâncias Salicilato de metila, benzoato de etila e α -copaeno foram encontradas apenas no néctar, sugerindo seu uso como sinal honesto de recurso. Esta é a primeira pesquisa que descreve a química dos voláteis e do néctar de uma espécie do gênero *Temnadenia*.

Os resultados dos bioensaios comportamentais sugerem que a substância 2-feniletanol, liberada pelas flores de *T. odorifera* em alta concentração, é utilizada pelas suas abelhas polinizadoras como um sinal de localização das flores.

6 REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, K.; LOPES, A.V.; MACHADO, I. C.; Recursos florais. In: Rech A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P.E.; MACHADO, I. C. (Ed) **Biologia da Polinização**, 1st ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. p. 129-150.
- ANDERSSON S.; NILSSON, L. A.; GROTH, I.; BERGSTRÖM, G. Floral scents in butterfly-pollinated plants: possible convergence in chemical composition. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 129–153, 2002.
- ANDERSSON, S. Antennal responses to floral scents in the butterflies *Inachis io*, *Aglais urticae* (Nymphalidae), and *Gonepteryx rhamni* (Pieridae). **Chemoecology**, v. 13, p. 13–20, 2003.
- BAKER, H. G.; BAKER I. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. **Isr J Bot**, v. 39, n.1-2, p. 157-166, 1990.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. In M. H. Niteki (Ed.). **Biochemical aspects of evolutionary biology**. Chicago: University of Chicago Press, 1982. p. 131–171.
- BALAO, F.; HERRERA, J.; TALAVERA, S.; DÖTTERL, S. Spatial and temporal patterns of floral scent emission in *Dianthus inoxianus* and electroantennographic responses of its hawkmoth pollinator. **Phytochemistry**, v. 72, p. 601–609, 2011.
- BARRETT, S. C. H. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing–selfing paradigm and beyond. **Philos. Trans. R. Soc., B**, v. 358, p. 991–1004, 2003.
- BURGER, H.; AYASSE, M.; DÖTTERL, S.; KREISSL, S.; GALIZIA, C. G. Perception of floral volatiles involved in host-plant finding behaviour: comparison of a bee specialist and generalist. **J. Comp. Physiol., A**, v. 199, p. 751–761, 2013.
- BURGER, H.; DÖTTERL, S.; AYASSE, M. Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. **Functional Ecology**, v. 24, p. 1234–1240, 2010.
- Byers, k. j. r. p.; Bradshaw, h. d.; Riffell, j. a. Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*). **J. Exp. Biol.**, v. 217, p. 614-623, 2014.
- CARVALHO, A. T.; DÖTTERL, S.; SCHLINDWEIN, C. An Aromatic Volatile Attracts Oligolectic bee Pollinators in an Interdependent bee-Plant Relationship. **J. Chem. Ecol.** v. 40, p. 1126–1134, 2014.

- DOBSON, H. E. M. Relationship between Floral Fragrance Composition and Type of Pollinator. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (eds.) **Biology of floral scent**. Boca Raton, Florida: Taylor and Francis, 2006, p. 147-198.
- DÖTTERL, S.; GLÜCK, U.; JÜRGENS, A.; WOODRING, J.; AAS, G. Floral Reward, Advertisement and Attractiveness to Honey Bees in Dioecious *Salix caprea*. **Plos One** v. 9, 2014.
- DÖTTERL, S.; JÜRGENS, A. Spatial fragrance patterns in flowers of *Silene latifolia*: Lilac compounds as olfactory nectar guides? **Pl. Syst. Evol.** v. 255, p. 99–109, 2005.
- DÖTTERL, S.; VEREECKEN, N. J. The chemical ecology and evolution of bee–flower interactions: a review and perspectives. **Can. J. Zool.**, v. 88, p. 668–697, 2010.
- DRESSLER, R. L. Biology of the orchid bees (Euglossini). **Ann. Rev. Ecol. Syst.** v. 13, p. 373-94, 1982.
- DUARTE-DELGADO, D.; NARVAEZ-CUENCA, C. E.; RESTREPO-SANCHEZ, L. P.; KUSHALAPPA, A.; MOSQUERA-VASQUEZ, T. Development and validation of a liquid chromatographic method to quantify sucrose, glucose, and fructose in tubers of *Solanum tuberosum* Group Phureja. **J. Chromatogr. B**, v. 975, p. 18–23, 2015.
- ELTZ, T.; LUNAU, K. Antennal response to fragrance compounds in male orchid bees. **Chemoecology**, v. 15, p. 135–138, 2005.
- ENDRESS, M. E.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. An updated classification for Apocynaceae, **Phytotaxa**, v. 159, n. 3, p. 175–194, 2014.
- FERREIRA, M. G.; PINHO, O. C.; BALESTIERI, J. B. P.; FACCENDA, O. Fauna and Stratification of Male Orchid Bees (Hymenoptera: Apidae) and their Preference for Odor Baits in a Forest Fragment. **Neotrop. Entomol.**, v. 40, p. 639-646, 2011.
- FILELLA, I.; PRIMANTE, C.; LLUSIÀ, J.; GONZÁLEZ, A. M. M.; SECO, R.; FARRÉ-ARMENGOL, G.; RODRIGO, A.; BOSCH, J.; PEÑUELAS, J. Floral advertisement scent in a changing plant-pollinators market. **Sci. Rep.**, v. 3, n. 3434, p. 1-6, 2013.
- GOLDBLATT, P.; MANNING, J. C.; BERNHARDT, P. Radiation of Pollination Systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae) in Southern Africa. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 88, p. 713-734, 2001.
- GOULSON, D.; HAWSON, S. A.; STOUT, J. C. Foraging bumblebees avoid flowers already visited by conspecifics or by other bumblebee species. **Anim. Behav.**, v. 55, p. 199–206, 1998

- HEIDUK, A.; BRAKE, I.; TOLASCH, T.; FRANK, J.; JÜRGENS, A.; MEVE, U.; DÖTTERL, S. Scent chemistry and pollinator attraction in the deceptive trap flowers of *Ceropegia dolichophylla*. **S. Afr. J. Bot.**, v. 76, n. 4, p. 762-769, 2010.
- HEIDUK, A.; BRAKE, I.; TSCHIRNHAUS, M. V.; HAENNI, J. P.; MILLER, R.; HASH, J., PRIETO-BENITEZ, S.; JÜRGENS, A.; JOHNSON, S. D.; SCHULZ, S.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U.; DÖTTERL, S. Floral scent and pollinators of *Ceropegia* trap flowers. **Flora**, v. 232, p. 169-182, 2017.
- HEIL, M. Nectar: generation, regulation and ecological functions. **Trends Plant Sci.**, v. 16, p. 191-200, 2011.
- HOWELL, A. D.; ALARCÓN, R. *Osmia* bees (Hymenoptera: Megachilidae) can detect nectar-rewarding flowers using olfactory cues. **Anim. Behav.** v. 74, p. 199-205, 2007.
- JÜRGENS, A.; DÖTTERL, S.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. Chemical diversity of floral volatiles in Asclepiadoideae-Asclepiadeae (Apocynaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 36, n. 11, p. 842-852, 2008.
- JÜRGENS, A.; DÖTTERL, S.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. Floral scent composition in early diverging taxa of Asclepiadoideae, and Secamonoideae (Apocynaceae). **S. Afr. J. Bot.** v. 76, 749-761, 2010.
- JÜRGENS, A.; DÖTTERL, S.; MEVE, U. The chemical nature of fetid floral odours in stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae) **New Phytol.**, v. 172, p. 452-468, 2006.
- KESSLER, D.; BALDWIN, I. T. Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuate*. **The Plant Journal**, v. 49, p. 840–854, 2006.
- KLATT, B. K.; BURMEISTER, C.; WESTPHAL, C.; TSCHARNTKE, T.; VON FRAGSTEIN, M. Flower Volatiles, Crop Varieties and Bee Responses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72724, 2013.
- KNUDSEN, J. T.; ERIKSSON, R.; GERSHENZON, J.; STÅHL, B. Diversity and distribution of floral scent. **Bot. Rev.**, v. 72, p. 1-120, 2006.
- KNUDSEN, JT & GERSHENZON, J. The chemical diversity of floral scent. In: Dudareva, N. & Pichersky, E. (eds.) **Biology of floral scent**. Boca Raton, Florida: Taylor e Francis, 2006.

- KOBAYASHI, K.; ARAI, M.; TANAKA, A.; MATSUYAMA, S.; HONDA, H.; OHSAWA, R. Variation in floral scent compounds recognized by honeybees in Brassicaceae crop species. **Breeding Science**, v. 62, p. 293–302, 2012.
- KOMISCHKE, B. M.; GUIRFA, M.; LACHNIT, H.; MALUN, D. Successive olfactory reversal learning in honeybees. **Learn. Mem.**, v. 9, p. 122–129, 2002.
- KOSCHNITZKE, C.; SILVA, I. C. ALVES, V. Biologia Floral de *Temnadenia odorifera* (Vell.) J. F. Morales. **Resumo: X Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço, MG.**, 2011. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/xceb/resumos/636.pdf>> Acessado em Junho de 2017.
- KOSCHNITZKE, C.; SILVA, I. C. Dinâmica da produção de néctar em *Temnadenia odorifera* (Apocynaceae). Anais do 64º Congresso Nacional de Botânica, 10 a 15 de novembro: Belo Horizonte/MG., 2013. Disponível em: <<https://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/64CNBot/resumo-ins18951-id5069.pdf>> Acessado em Junho de 2017.
- LARUE, A.C.; RAGUSO, R. A.; JUNKER, R. R. Experimental manipulation of floral scent bouquets restructures flower–visitor interactions in the field. **J. Anim. Ecol.**, v. 85, p. 396–408, 2016.
- LEONARD, A. S.; MASEK, P. J. Multisensory integration of colors and scents: insights from bees and flowers. **Comp Physiol, A.**, v. 200, p. 463–474, 2014.
- LOTZ, C. N.; SCHONDUBE, J. E. Sugar Preferences in Nectar- and Fruit-Eating Birds: Behavioral Patterns and Physiological Causes. **Biotropica**, v. 38, p. 3-15, 2006.
- MAGGI, F.; PAPA, F.; CRISTALLI, G.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S.; GIULIANI, C. Histochemical localization of secretion and composition of the essential oil in *Melittis melissophyllum* L. subsp. *Melissophyllum* from Central Italy. **Flavour Fragr. J.** v. 25, p. 63–70, 2010.
- MILET-PINHEIRO, P., AYASSE, M.; SCHLINDWEIN, C.; DOBSON, H. E. M.; DÖTTERL, S. Host location by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee: innate and learned behavior. **Behav. Ecol.** v. 23, n. 3, p. 531-538. 2012.
- MILET-PINHEIRO, P.; AYASSE, M.; DOBSON, H. E. M.; SCHLINDWEIN, C.; FRANCKE, W.; DÖTTERL, S. The Chemical Basis of Host-Plant Recognition in a Specialized Bee Pollinator. **J. Chem. Ecol.** v. 39, p. 1347–1360, 2013.
- MILET-PINHEIRO, P.; NAVARRO, D. M. A. F.; DOTTERL, S.; CARVALHO, A. T.; PINTO, C. E.; AYASSE, M.; SCHLINDWEIN, C. Pollination biology in the dioecious

- orchid *Catasetum uncatum*: How does floral scent influence the behaviour of pollinators? **Phytochemistry**, v. 116, p. 149–161, 2015.
- MILET-PINHEIRO, P.; SCHLINDWEIN, C. Pollination in *Jacaranda rugosa* (Bignoniaceae): Euglossini pollinators, nectar robbers and low fruit set. **Plant Biol.**, v. 11, p. 131–141, 2009.
- MORALES, J. F. Estudios en las Apocynaceae Neotropicales XIII: revisión del género *Temnadenia* (Apocynoideae, Echiteae). **Candollea**, v. 60, n. 1, p. 207-231, 2005.
- MOVAFEGHI, A.; ABEDINI, M.; FATHIAZAD, F.; ALIASGHARPOUR, M.; OMIDI, Y. Floral nectar composition of *Peganum harmala* L. **Nat. Prod. Res.** v. 23, p. 301-308, 2009.
- MUHLEMANN, J. K.; KLEMPIEN, A.; DUDAREVA, N. Floral volatiles: from biosynthesis to function. **Plant, Cell Environ.**, v. 37, p. 1936–1949, 2014.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G; DA FONSECA, G.A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- OLLERTON, J.; LIEDE-SCHUMANN, S.; ENDRESS, M.; et al. The diversity and evolution of pollination systems in large plant clades: Apocynaceae as a case study. **Annals of Botany**, p. 1-15, 2018. doi: 10.1093/aob/mcy127.
- PACINI, E.; NEPI, M.; VESPRINI, J. Nectar biodiversity: a short review. **Plant Syst. Evol.**, v. 238, p. 7, 2003.
- PARACHNOWITSCH, A. L.; BURDON, R. C. F.; RAGUSO, R. A.; KESSLER, A. Natural selection on floral volatile production in *Penstemon digitalis* Highlighting the role of linalool. **Plant Signaling Behav.**, v. 8, n. 1, p. e22704137-e22704140, 2013.
- PARACHNOWITSCH, A. L.; MANSON, J. S. The chemical ecology of plant-pollinator interactions: recent advances and future directions. **Curr. Opin. Insect. Sci.**, v. 8, p. 41–46, 2015.
- PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 5, p. 237–243, 2002.
- RAGUSO, R. A. Start making scents: the challenge of integrating chemistry into pollination ecology. **Entomol. Exp. Appl.** v. 128, p. 196–207, 2008.
- RAGUSO, R. A. Why Are Some Floral Nectars Scented? **Ecology**, v. 85, p. 1486-1494, 2004a.
- RAGUSO, R. A. Why do flowers smell? The chemical ecology of fragrance-driven pollination. In: Cardé RT, Millar JG (Eds.) **Advances in Insect Chemical Ecology**, 1st edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2004b, p. 151-178.

- RAGUSO, R. A.; WILLIS, M. A. Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by wild hawkmoths, *Manduca sexta*. **Anim. Behav.** 69:407–418, 2005.
- RAGUSO, R. Behavioral Responses to Floral Scent: Experimental Manipulations and the Interplay of Sensory Modalities. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (eds.) **Biology of floral scent**. Boca Raton, Florida: Taylor and Francis, 2006, p. 297-318.
- RIBEIRO, M. C.; MARTENSEN, A. C.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M.; SCARANO, F.; FORTIN, M. J. The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. **Biodiversity Hotspots: Distribution and Protection of Conservation Priority Areas**. Heidelberg: Springer, 2011, p. 405-434.
- RODRIGUEZ-SAONA, C.; PARRA, L.; QUIROZ, A.; ISAACS, R. Variation in highbush blueberry floral volatile profiles as a function of pollination status, cultivar, time of day and flower part: implications for flower visitation by bees. **Ann. Bot.**, v. 107, p. 1377–1390, 2011.
- SAKAI, S. A review of brood-site pollination mutualisms: plants providing breeding sites for their pollinators, **J. Plant Res.**, v. 115, n. 3, p. 161-168, 2002.
- SCHIESTL, F. P.; JOHNSON, S. D. Pollinator-mediated evolution of floral signals. **Trends Ecol. Evol.** v. 28, p. 307-315, 2013.
- SCHIESTL, F. P.; ROUBIK, D. W. Odor compound detection in male Euglossini bees. **J. Chem. Ecol.** v. 29, p. 253-257, 2003.
- SCHIESTL, F. P.; ROUBIK, D. W. ODOR COMPOUND DETECTION IN MALE EUGLOSSINI BEES. **J. Chem. Ecol.**, v. 29, n. 1, p. 253-257, 2003.
- SWANSON, J. A. I.; TORTO, B.; KESLLS, S. A.; MESCE, K. A.; TUMLINSON, J. H.; SPIVAK, M. Odorants that Induce Hygienic Behavior in Honeybees: Identification of Volatile Compounds in Chalkbrood-Infected Honeybee Larvae. **J. Chem. Ecol.** v. 35, p. 1108–1116, 2009.
- TINOCO, N. A. B.; UEKANE, T. M.; TSUKUI, A.; AGUIAR, P. F.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; REZENDE, C. M. Generation of Volatile Compounds from Carotenoids of *Dunaliella bardawil* Algae by Water Bath Heating and Microwave Irradiation. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 27, p. 1452-1458, 2016.
- TORRES C, GALETTO L. Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** v. 127, p. 207-223, 1998.

Considerações finais



Figura 39 - Flores de *Dendrobium nobile* submetidas à amostragem de seu headspace por HSD.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente tese, a técnica de *headspace* dinâmico foi empregada para o estudo dos voláteis das flores de diferentes espécies *in vivo*. Inicialmente foi desenvolvido o sistema de extração e o cartucho adsorvente, parte indispensável e crítica do sistema. O sucesso do sistema de extração e do cartucho desenvolvidos foi demonstrado por meio da caracterização da variação temporal da emissão do odor da espécie *Dendrobium nobile* (Orchidaceae).

A modificação realizada nos cartuchos adsorventes utilizados conferiu maior estruturação e durabilidade ao mesmo, bem como evitou o surgimento de artefatos após o uso contínuo por muitas horas, tornando-o adequado ao estudo da caracterização da variação temporal de emissão de odor, questão importante para o adequado entendimento de alguns sistemas de polinização.

A partir do desenvolvimento do sistema de extração foi possível demonstrar que as flores de *D. nobile* mostraram um padrão de variação temporal bem definido, com maior predominância de produção de volátil nas primeiras horas do dia (7 as 12 h). Na média, os voláteis liberados pela orquídea foram mais pronunciados no período da manhã, em comparação com os da tarde. No odor desta orquídea foram identificadas 31 substâncias, das quais quatro em maior concentração em qualquer horário de amostragem: limoneno, (*E,E*)-farneseno, (*E*)-cariofileno e (*E*)- β -ocimeno. Estas juntas corresponderam entre 44,8 e 73% de todo o odor liberado.

O sucesso no desenvolvimento do sistema de extração possibilitou a sua aplicação em outras espécies *in vivo*, como foi o caso da espécie *Temnadenia odorifera*, cujas flores foram amostradas fora do laboratório, no Horto Botânico do Museu Nacional (UFRJ), demonstrando sua robustez.

Ao todo, 22 substâncias foram identificadas no odor floral de *T. odorifera* por HSD *in vivo*. O odor floral em período de antese foi composto, em grande parte, por substâncias aromáticas, como benzaldeído, álcool benzílico, álcool cinamílico e 2-feniletanol, sendo este último responsável por mais de 70% da composição volátil. A análise de voláteis do néctar por MEFS revelou a presença de 2-feniletanol, limoneno, álcool benzílico, salicilato de metila e α -copaeno, o que permite sugerir que esta espécie perfuma seu néctar com o objetivo de fornecer um guia de néctar para seus visitantes. Contudo, essa hipótese precisará ser confirmada em estudos futuros realizados por meio de bioensaios comportamentais.

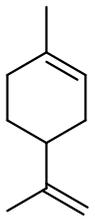
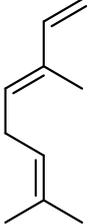
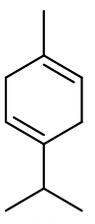
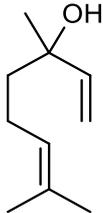
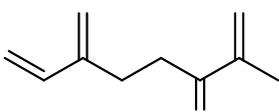
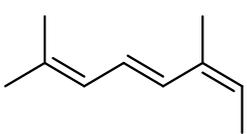
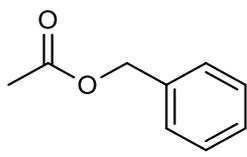
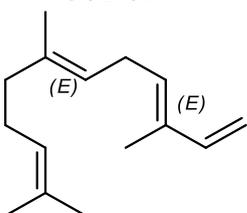
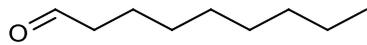
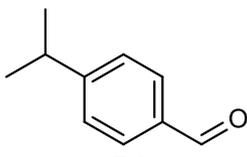
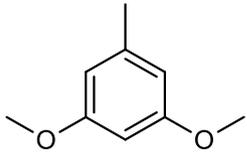
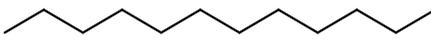
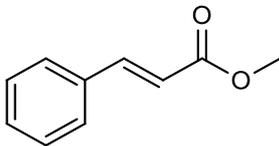
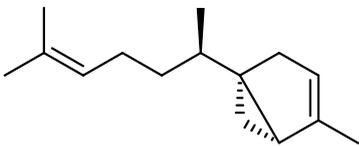
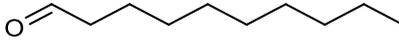
A análise da composição química volátil de *T. odorifera* no período de senescência revelou que as flores continuam a liberar voláteis, embora numa concentração baixa e em menor diversidade de voláteis comparada ao período de antese, 5 e 22 substâncias, respectivamente. A análise da composição dos açúcares do néctar (n = 11) mostrou este ser constituído majoritariamente de sacarose (S; 69,1%; 25,4±6,8 mg mL⁻¹), glicose (G; 13,8%; 5,1±1,0 mg mL⁻¹) e frutose (F; 17,1%; 6,3±1,2 mg mL⁻¹). A razão S/(G+F) em *T. odorifera* mostrou ter relação preditiva dos tipos de polinizadores que visitam esta espécie.

Assim, os resultados alcançados nesta tese contribuíram para demonstrar que a caracterização da química do atrativo e do recurso floral podem ajudar a melhorar o entendimento dos mecanismos utilizados pelas espécies investigadas em suas relações ecológicas.

Como foi discutido, a caracterização do perfil volátil de flores é uma etapa das mais importantes para diferentes áreas do conhecimento, especialmente para os estudos voltados à ecologia química. Para os estudos dessa área, o odor de flores precisa ser amostrado por *headspace* dinâmico. Contudo, os grupos de pesquisa no Brasil que dominam esta técnica são dedicados, na maioria dos casos, às questões relacionadas a pragas na agricultura. Praticamente não há grupos de pesquisa no Brasil voltados ao estudo dos voláteis florais e sua aplicação ao entendimento das complexas relações entre insetos visitantes e a planta. No exterior, por outro lado, há algumas décadas, biólogos e químicos realizam pesquisas interdisciplinares na interface entre química e biologia da polinização, no Brasil os estudos de ecologia química da polinização são raros.

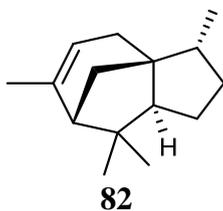
Por fim, espera-se que a presente tese possa servir como referência para pesquisadores das áreas de ecologia química e de biologia floral e possa servir como fonte de inspiração para trabalhos voltados a interface entre química e biologia da polinização.

APÊNDICE 1A – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS IDENTIFICADAS NO ODOR FLORAL DE *D. NOBILE*^d

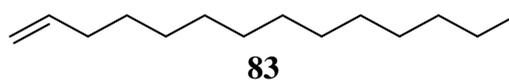
<p>limoneno 138-86-3</p>  <p>12</p>	<p>(<i>E</i>)-β-ocimeno 3779-61-1</p>  <p>13</p>	<p>γ-terpineno 99-85-4</p>  <p>70</p>
<p>linalol 78-70-6</p>  <p>14</p>	<p>2-metil-6-metileno-1,7-octadien-3-ona 41702-60-7</p>  <p>71</p>	<p><i>allo</i>-ocimeno 7216-56-0</p>  <p>72</p>
<p>acetato de benzila 140-11-4</p>  <p>73</p>	<p>(<i>E,E</i>)-α-farneseno 502-61-4</p>  <p>74</p>	<p>nonanal 124-19-6</p>  <p>75</p>
<p>cuminaldeído 122-03-2</p>  <p>76</p>	<p>3,5-dimetoxitolueno 4179-19-5</p>  <p>77</p>	<p><i>n</i>-dodecano 112-40-3</p>  <p>78</p>
<p>cinamato de metila 103-26-4</p>  <p>79</p>	<p>7-<i>epi</i>-sesquitujeno 159407-35-9</p>  <p>80</p>	<p>decanal 112-31-2</p>  <p>81</p>

Continuação...

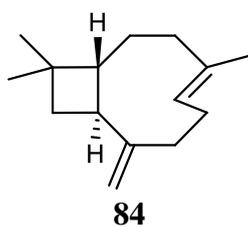
α -cedreno
469-61-4



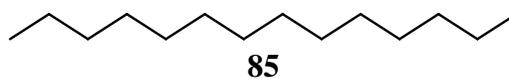
1-tetradeceno
1120-36-1



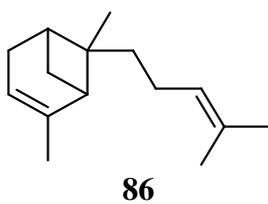
(*E*)-cariofileno
87-44-5



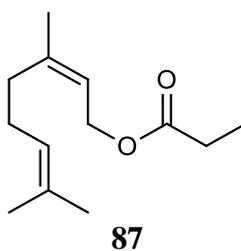
n-tetradecano
629-59-4



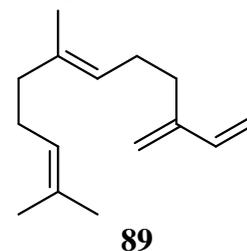
(*E*)- α -bergamoteno
13474-59-4



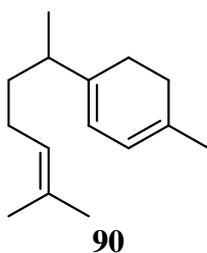
Propanoato de nerila
105-91-9



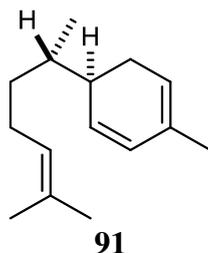
(*E*)- β -farneseno
18794-84-8



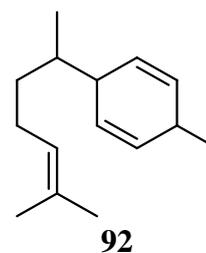
γ -curcumeno
28976-683



α -zingibereno
495-60-3



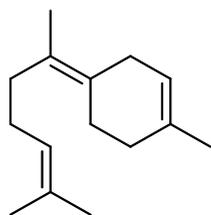
β -curcumeno
28976-67-2



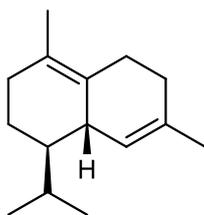
(*Z*)- γ -bisaboleno
13062-00-5

δ -cadineno
483-76-1

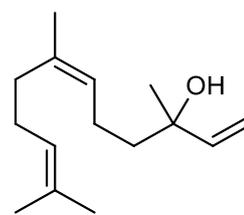
(*Z*)-nerolidol
142-50-7



93

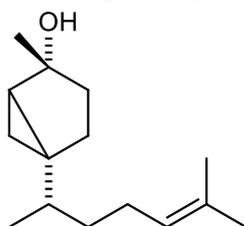


94



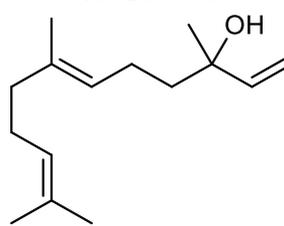
95

(*Z*)-sesquisabineno
58319-05-4



96

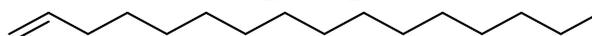
(*E*)-nerolidol
40716-66-3



97

1-hexadeceno

629-73-2



98

^anome comum

^bnúmero de registro CAS

^ccomposto majoritário do odor floral

^dAs estruturas aqui expostas foram conferidas de acordo com o livro Adams (2007) e a base de dados do National Institute of Standards and Technology (NIST Livro de Química na WEB, SRD69), disponível no site: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>>

APÊNDICE 2A – CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES DO NÉCTAR E DOS VOLÁTEIS DE *TEMNADENIA ODORIFERA*

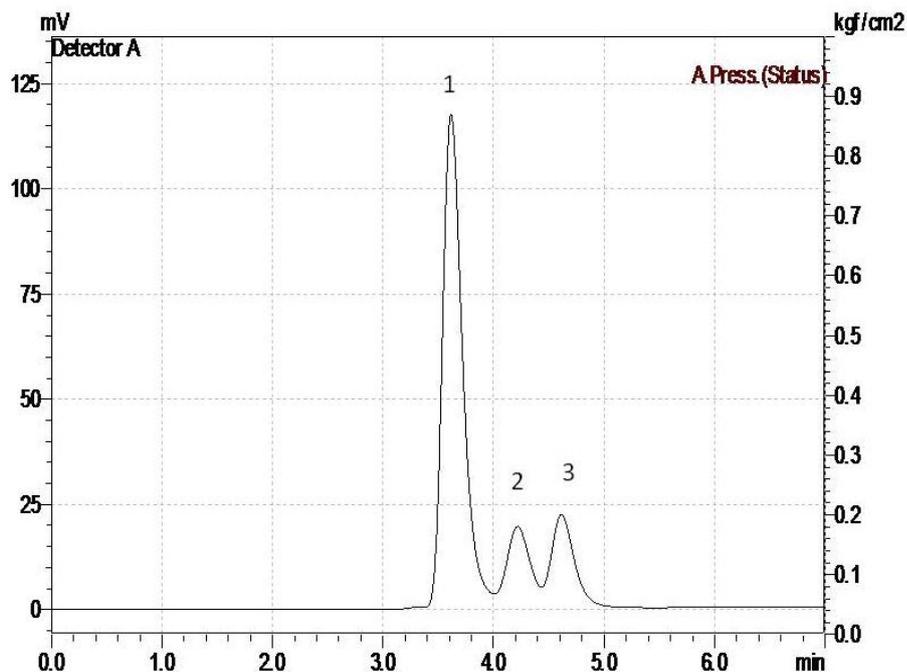


Figura A1. Cromatograma da amostra de néctar 1 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor do Área 2. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

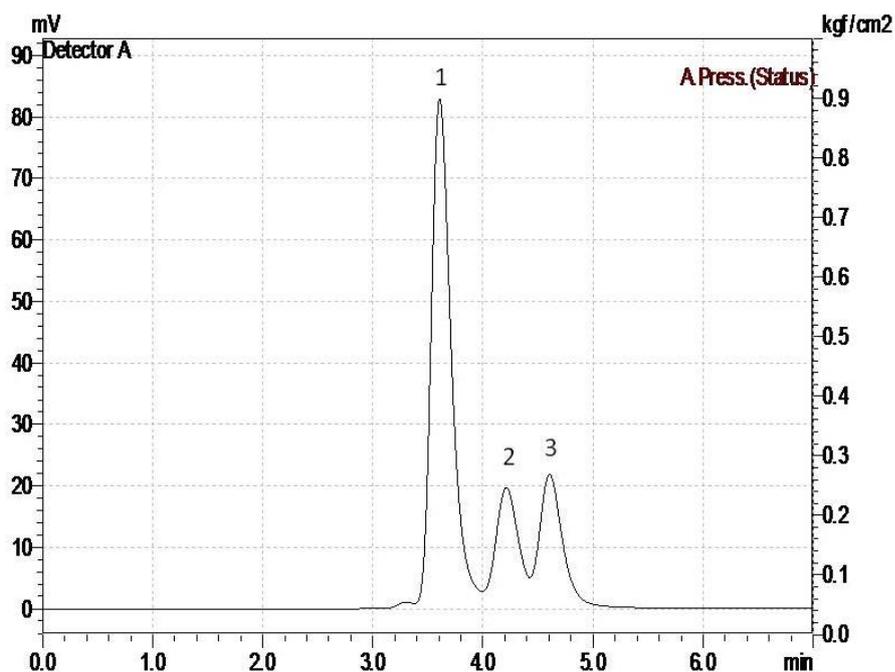


Figura A2. Cromatograma da amostra de néctar 2 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor do Área 2. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

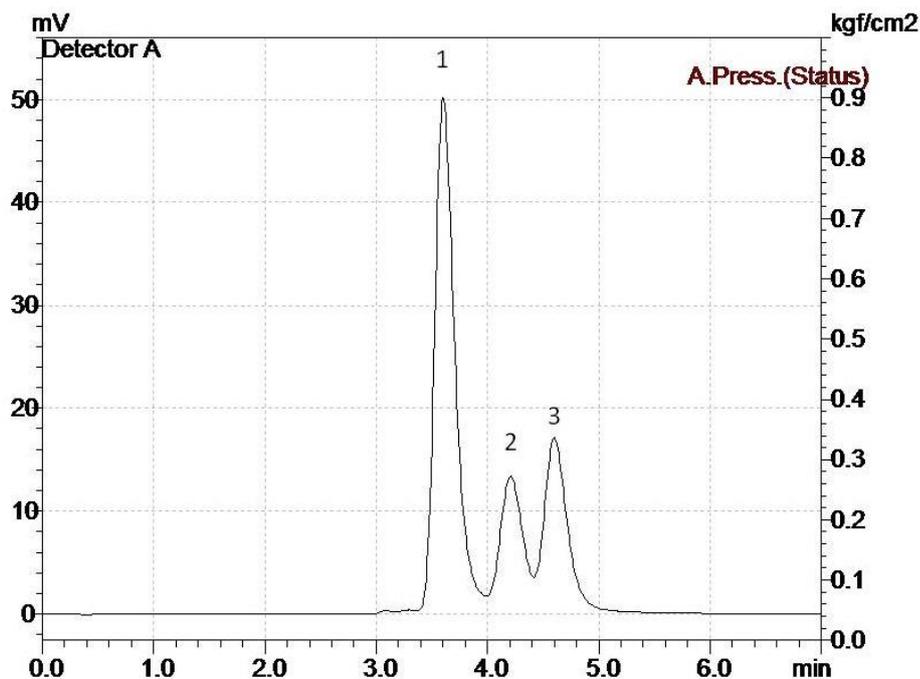


Figura A3. Cromatograma da amostra de néctar 3 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor do Área 2. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

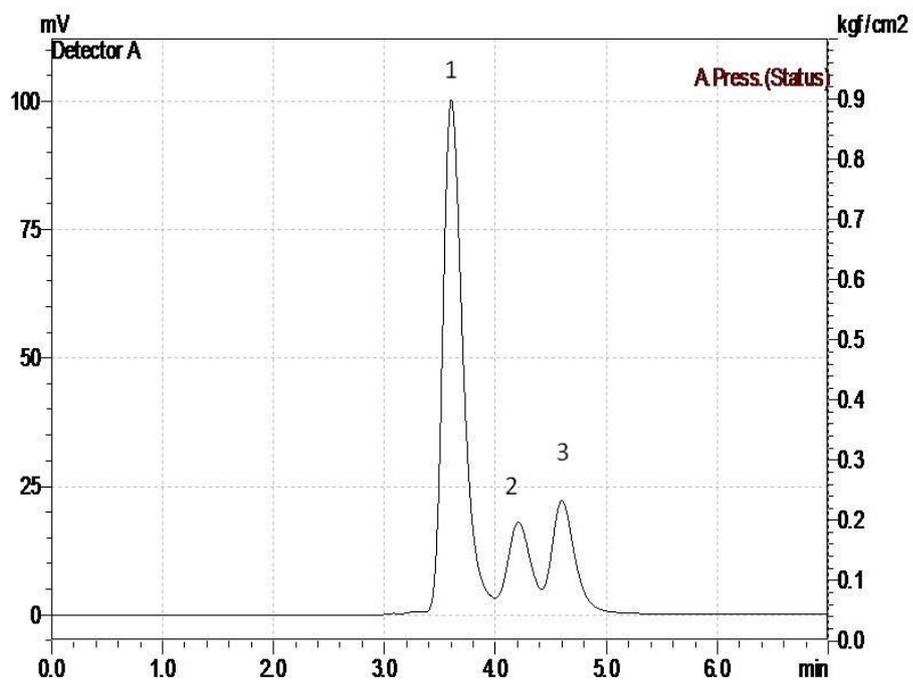


Figura A4. Cromatograma da amostra de néctar 4 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor do Área 2. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

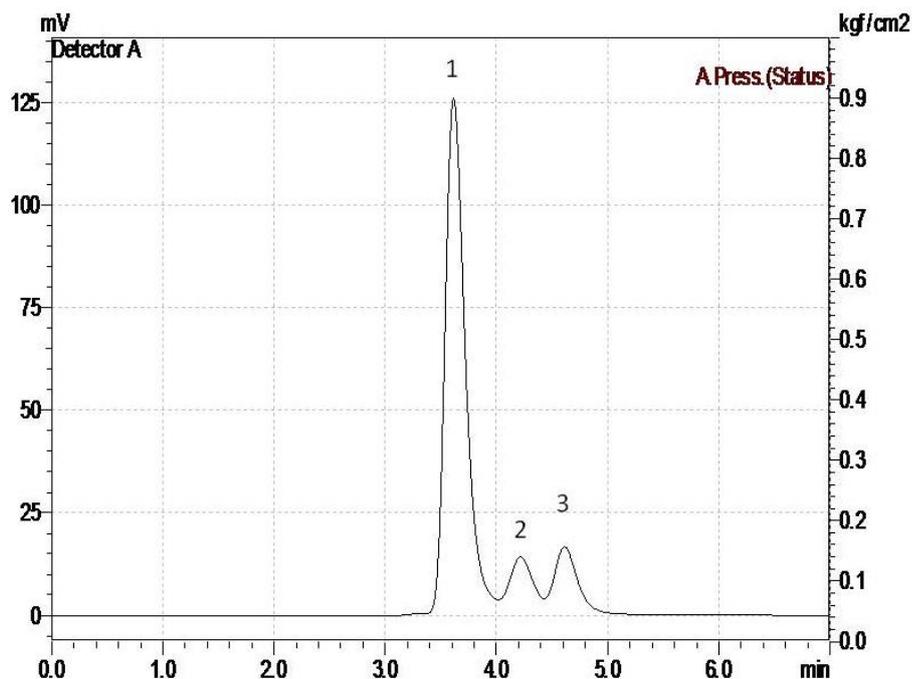


Figura A5. Cromatograma da amostra de néctar 5 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor do Área 2. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

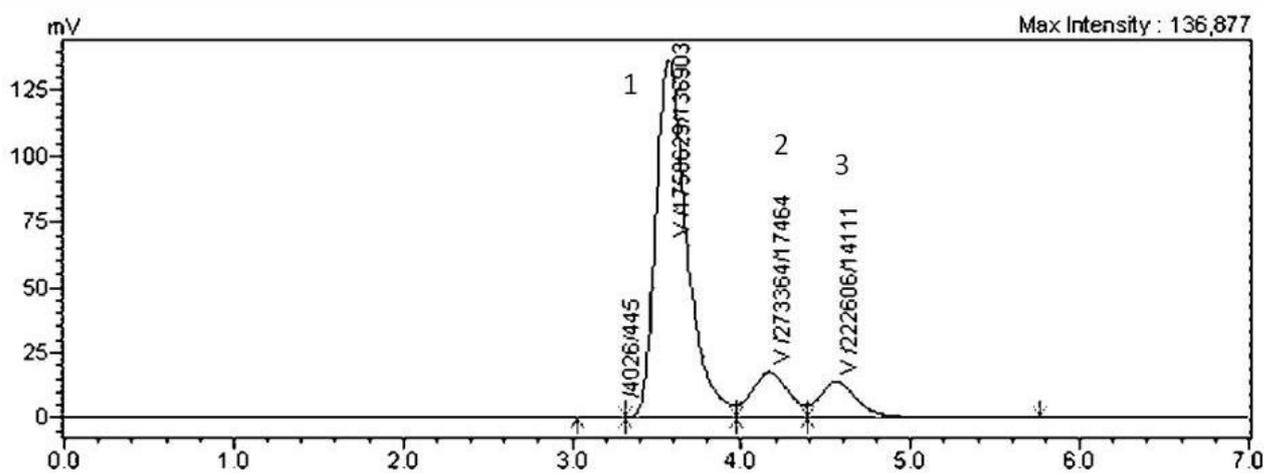


Figura A6. Cromatograma da amostra de néctar 1 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor da Área 2. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

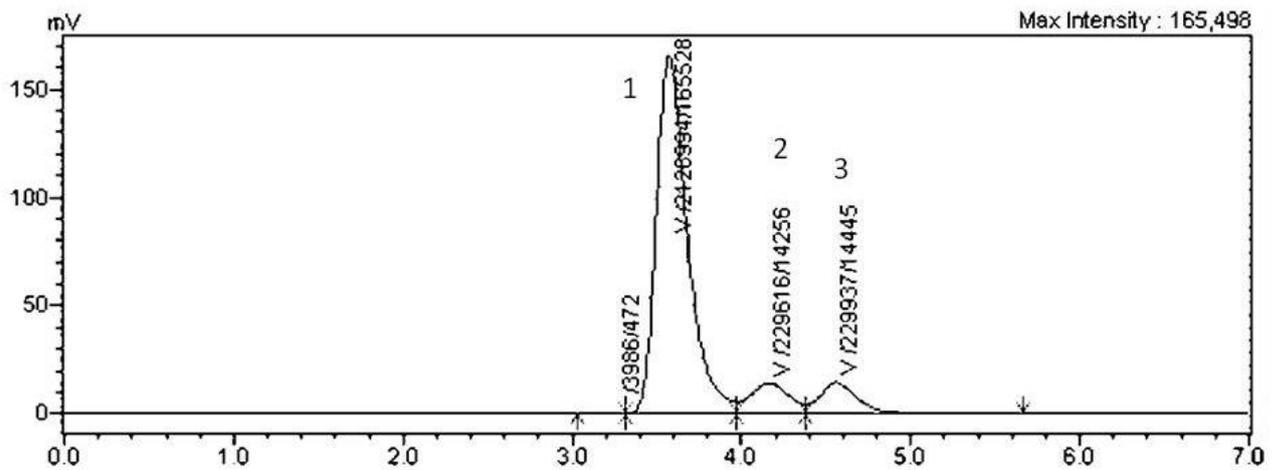


Figura A7. Cromatograma da amostra de néctar 2 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor da Área 1. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

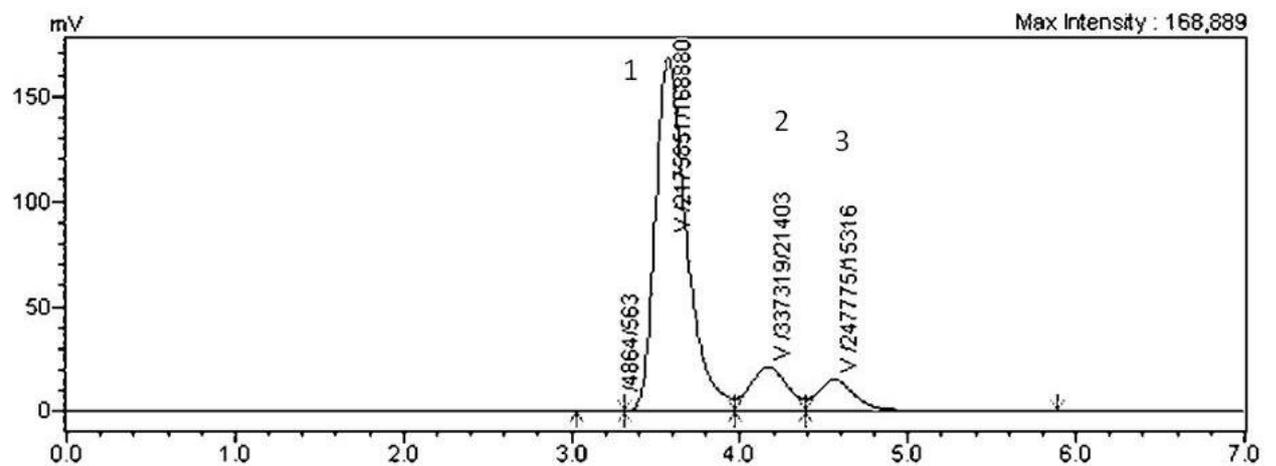


Figura A8. Cromatograma da amostra de néctar 3 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor da Área 1. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

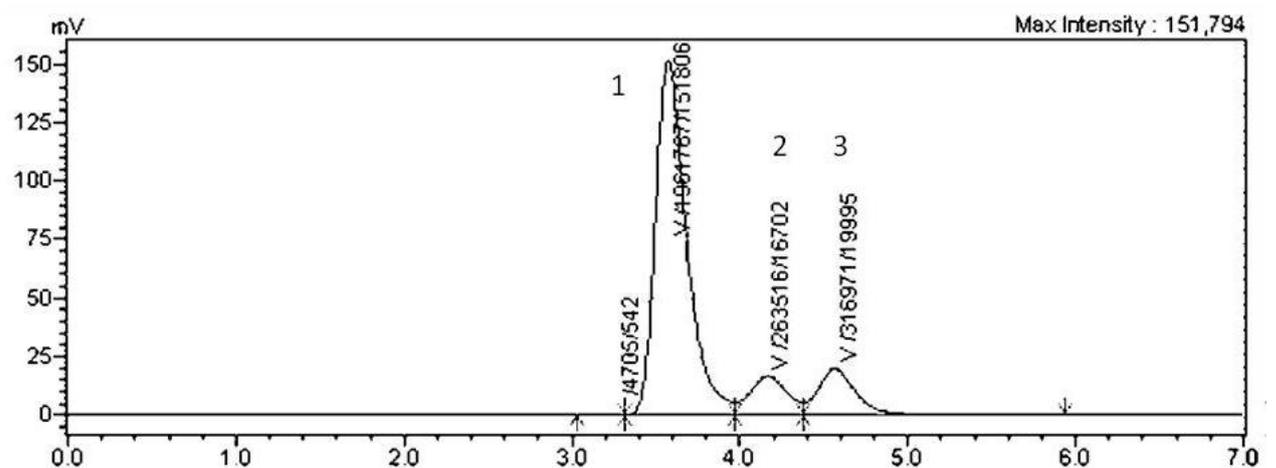


Figura A9. Cromatograma da amostra de néctar 4 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor da Área 1. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

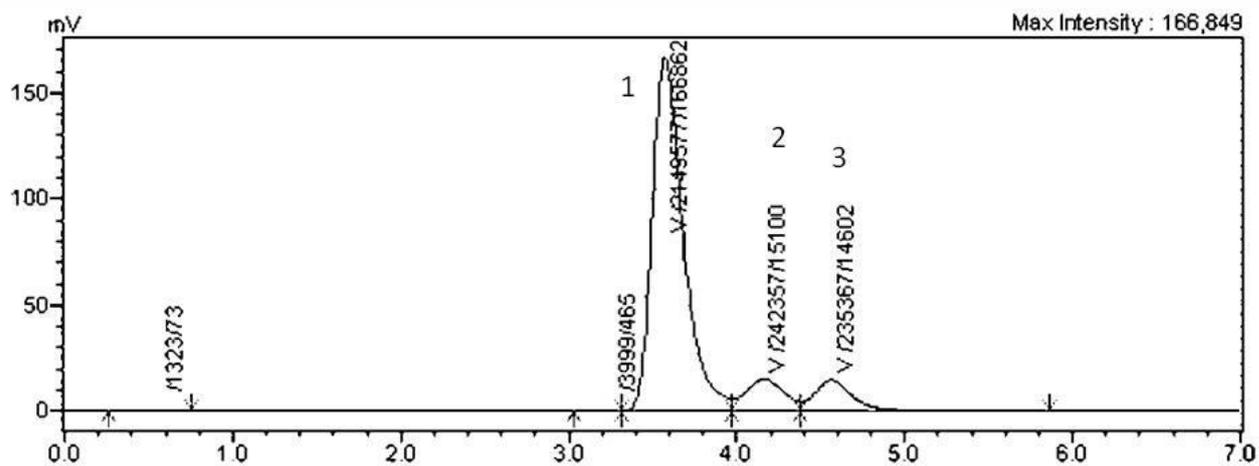


Figure A10. Cromatograma da amostra de néctar 5 da flor de *T. odorifera*. Néctar da flor da Área 1. Sacarose (1), glicose (2) e frutose (3).

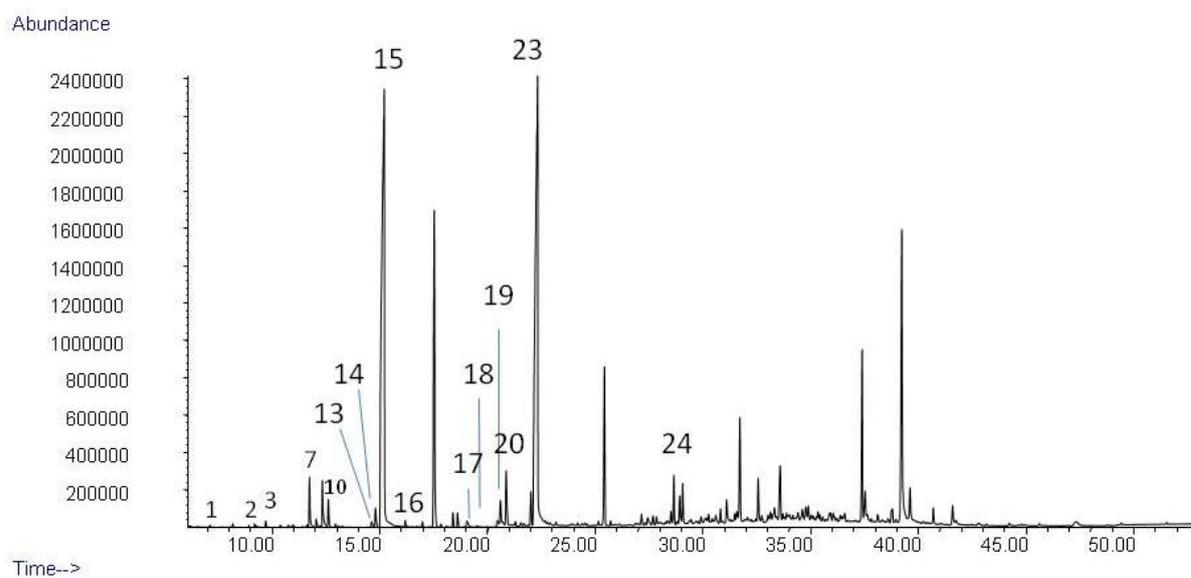


Figura A11. Cromatograma de íons totais (TIC) de voláteis da flor da *T. odorifera*. TIC da amostra da flor 1, coletada na Área 2 entre 9 às 12h. A numeração refere-se à Tabela 7.

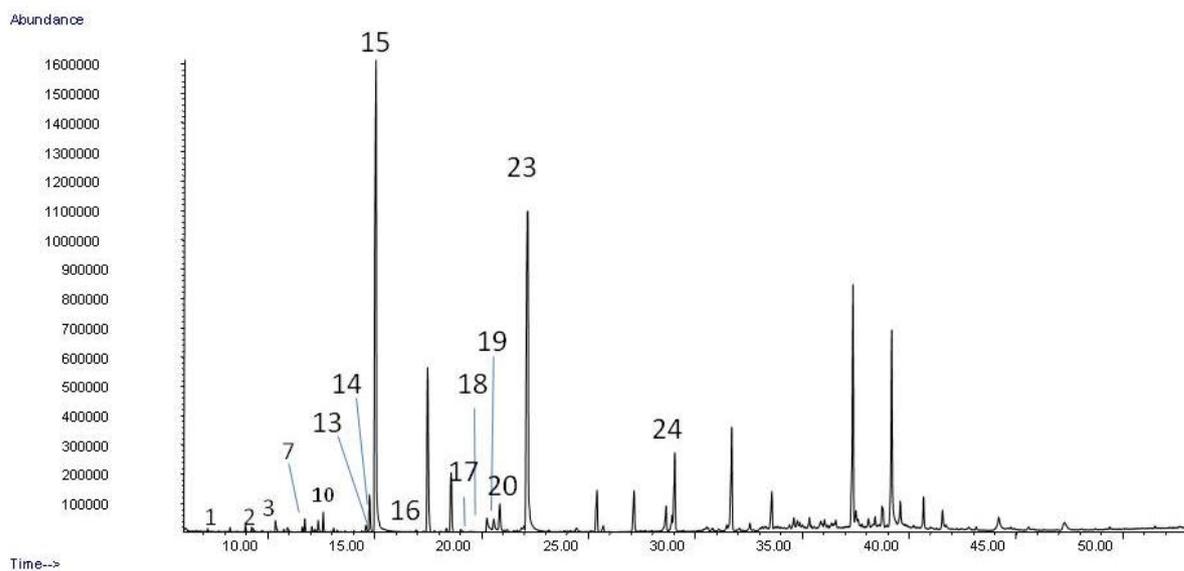


Figura A12. Cromatograma de íons totais (TIC) de voláteis da flor da *T. odorifera*. TIC da amostra da flor 1, coletada na Área 2 entre 9 às 12h. A numeração refere-se à Tabela 7.

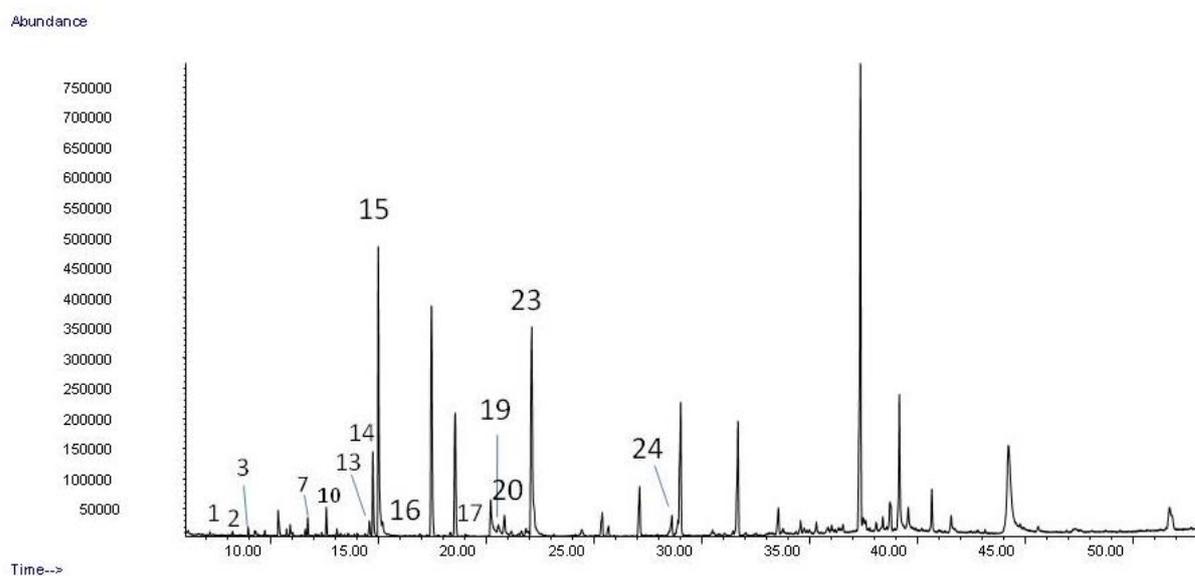


Figura A13. Cromatograma de íons totais (TIC) de voláteis da flor da *T. odorifera*. TIC da amostra da flor 1, coletada na Área 2 entre 9 às 12h. A numeração refere-se à Tabela 7.

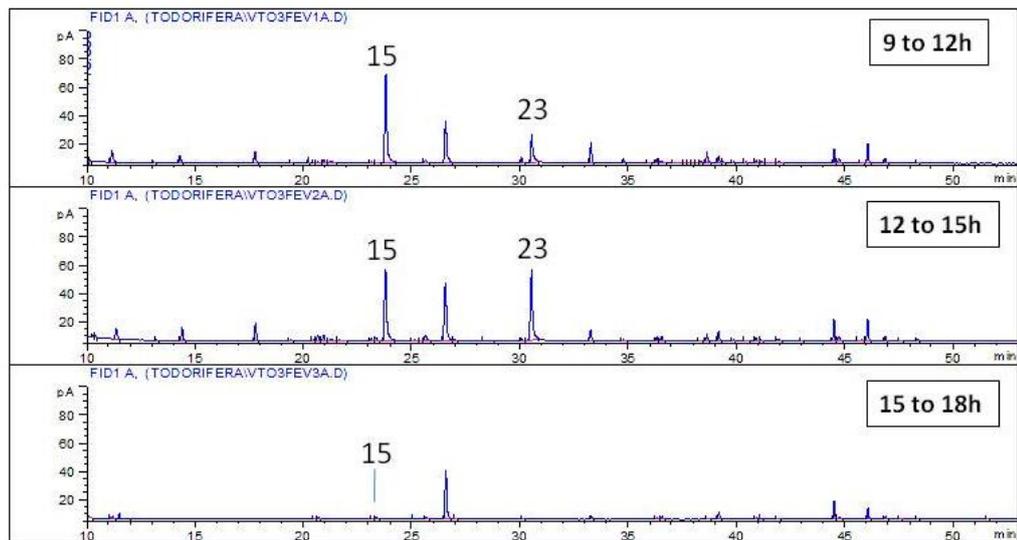


Figura A14. Cromatograma de íons totais (TIC) de voláteis da flor da *T. odorifera*. TIC da amostra da flor 1, coletada na Área 2 entre 9 a 12h. A numeração refere-se à Tabela 6.

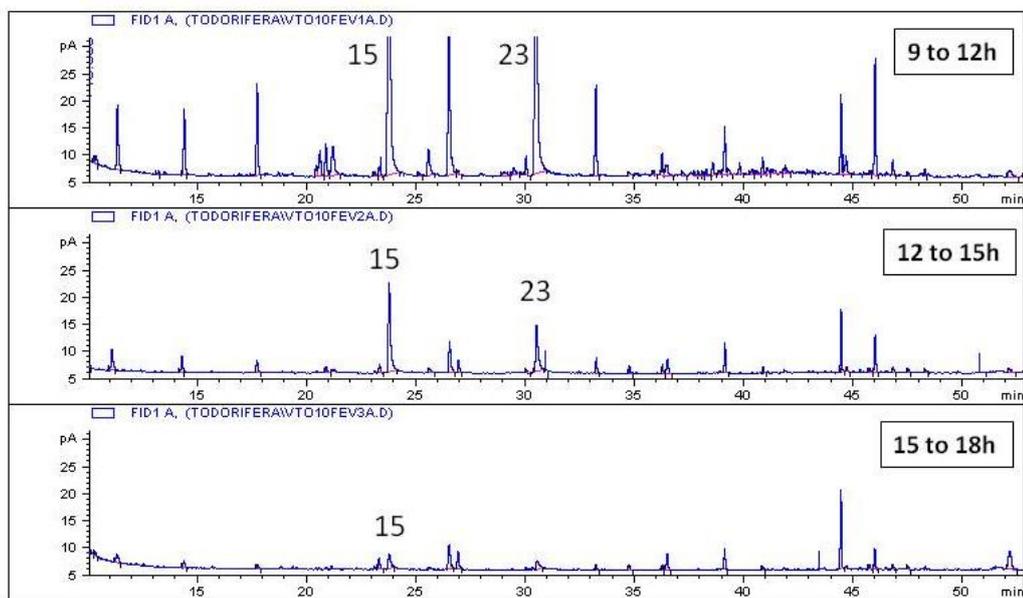
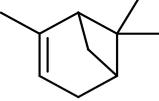
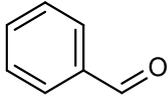
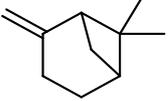
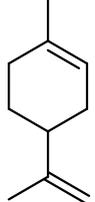
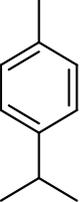
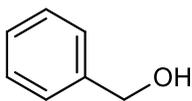
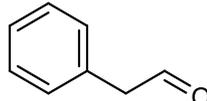
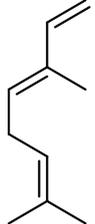
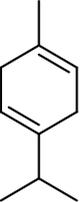
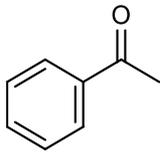
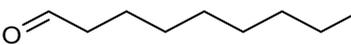
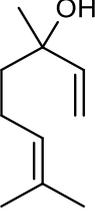
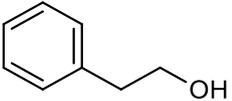
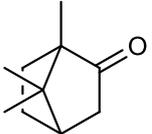
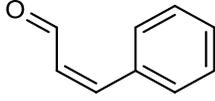
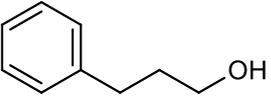
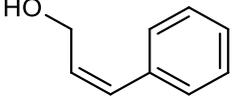
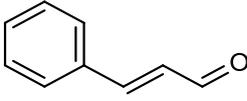
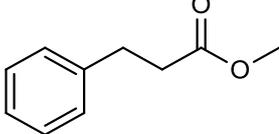


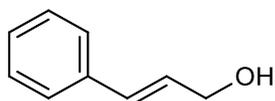
Figura A15. Cromatograma de íons totais (TIC) de voláteis da flor da *T. odorifera*. TIC da amostra da flor 1, coletada na Área 2 entre 9 a 12h. A numeração refere-se à Tabela 6.

APÊNDICE 2B – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS IDENTIFICADAS NO ODOR FLORAL DE *T. ODORIFERA* NO PERÍODO DE ANTESE^d

<p>α-pineno^a 280-56-8^b</p> 	<p>benzaldeído 100-52-7</p> 	<p>β-pineno 127-91-3</p> 	<p><i>n</i>-decano 124-18-5</p> 
<p>limoneno 138-86-3</p> 	<p><i>p</i>-cimeno 99-87-6</p> 	<p>álcool benzílico 100-51-6</p> 	<p>fenilacetaldéido 122-78-1</p> 
<p>(<i>E</i>)-β-ocimeno 3779-61-1</p> 	<p>γ-terpineno 99-85-4</p> 	<p>acetofenona 98-86-2</p> 	<p>nonanal 124-19-6</p> 
<p>linalol 78-70-6</p> 	<p>2-feniletanol^c 60-12-8</p> 	<p>cânfora 76-22-2</p> 	<p>(<i>Z</i>)-cinamaldeído 57194-69-1</p> 
<p>3-fenilpropanol 122-97-4</p> 	<p>(<i>Z</i>)-álcool cinâmico 4510-34-3</p> 	<p>(<i>E</i>)-cinamaldeído 14371-10-9</p> 	<p>3-fenilpropanoato de metila 103-25-3</p> 

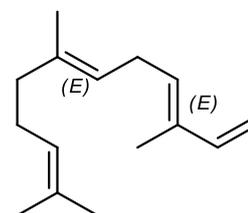
Continuação...

**(E)-álcool
cinâmico^c**
4407-36-7



(E,E)- α -farneseno

502-61-4



^anome comum

^bnúmero de registro CAS

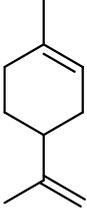
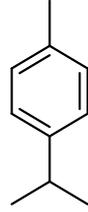
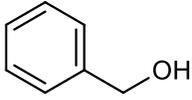
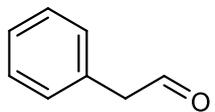
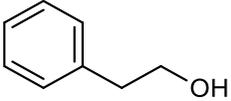
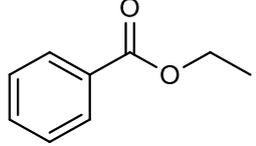
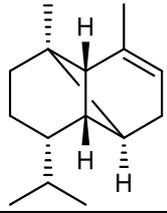
^ccomposto majoritário do odor floral

^dAs estruturas aqui expostas foram conferidas de acordo com o livro Adams (2007) e a base de dados do

National Institute of Standards and Technology (NIST Livro de Química na WEB, SRD69), disponível no site:

<https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>

APÊNDICE 2C – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS IDENTIFICADAS NO NÉCTAR DAS FLORES DE *T. ODORIFERA*.^d

limoneno ^a 138-86-3 ^b	<i>p</i> -cimeno 99-87-6	álcool benzílico 100-51-6	fenilacetaldeído 122-78-1
			
2-feniletanol 60-12-8	benzoato de etila 93-89-0	salicilato de metila 119-36-8	α -copaeno 3856-25-5
			

^anome comum

^bnúmero de registro CAS

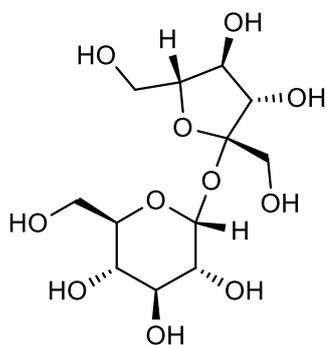
^dAs estruturas aqui expostas foram conferidas de acordo com o livro Adams (2007) e a base de dados do

National Institute of Standards and Technology (NIST Livro de Química na WEB, SRD69), disponível no site:

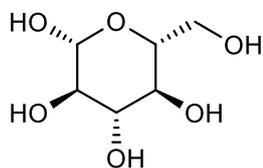
<https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>

APÊNDICE 2D – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS AÇÚCARES IDENTIFICADOS NO NÉCTAR DAS FLORES DE *T. ODORIFERA* COLETADAS NO PERÍODO DE ANTESE.

sacarose



glicose



frutose

