



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SUELEN PEREIRA MAGALHÃES

**ESTUDO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FLORES DE
SOJA (*Glycine max* L. Merrill) POR MICROEXTRAÇÃO EM
FASE SÓLIDA COMBINADA À CROMATOGRÁFIA GASOSA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (SPME-CG-
EM)**

SUELEN PEREIRA MAGALHÃES

**ESTUDO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FLORES DE
SOJA (*Glycine max* L. Merrill) POR MICROEXTRAÇÃO EM
FASE SÓLIDA COMBINADA À CROMATOGRAFIA GASOSA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (SPME-CG-
EM)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Química da Universidade Estadual
de Londrina como pré requisito na obtenção do
título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik

Coorientadora: Dra. Clara Beatriz Hoffmann
Campo

Londrina
2019

SUELEN PEREIRA MAGALHÃES

**ESTUDO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FLORES DE SOJA
(*Glycine max* L. Merrill) POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
COMBINADA À CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS (SPME-CG-EM)**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina como pré requisito na obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Evandro Bona
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Londrina, 23 de maio de 2019.

Dedico este trabalho a minha família,
Pai (Valdeci), Mãe (Rosangela), irmãos
(Stephanie e Enrique) e avós (Maria e
Aldizio) por todo amor e apoio
incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik, por toda paciência, compreensão e orientação neste trabalho.

À minha coorientadora Dra. Clara Beatriz Hoffmann Campo por todos os ensinamentos e pela oportunidade de fazer parte da equipe de ecologia química Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

À banca examinadora deste trabalho, Dra. Suzana Lucy Nixdorf e Dr. Evandro Bona, por disporem de tempo e energia para avaliarem e contribuírem nesse exame de dissertação.

Aos professores e ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

À Fundação Eliseu Alves, À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Londrina (Embrapa) e à Bayer pela bolsa de estudos concedida.

Ao Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas (LAMM) e à Profa. Elizabete Ono pelas análises cromatográficas. A Cristina, técnica de laboratório do LAMM-UEL, por sempre me auxiliar nas análises e me motivar para o trabalho.

Ao Jurandir, técnico do Laboratório de Análise Cromatográfica e Ambiental da Universidade Estadual de Londrina (LACA-UEL), sempre solícito quando precisei.

A Dona Neiva, técnica do laboratório de Ecologia Química, por todo o apoio.

Aos meus pais Rosângela e Valdeci por todo incentivo para uma boa formação acadêmica e pessoal. Aos meus irmãos Stephanie e Enrique e aos meus avós Maria e Aldízio por sempre acreditarem em mim.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Química e LabFitobio que contribuíram para o desenvolvimento e término deste trabalho: Deivid Metzker, Gustavo Cotrim, Camila Poliseli, Anna Ferrari, Giselle Lopes, George Azevedo, Elisângela Rosa. Em especial ao meu amigo José Perez que esteve presente em todas as etapas deste trabalho auxiliando e orientando.

Aos meus excelentes amigos: Rejane Stubs, Luís Morozini, Gisele Garcia, Beatriz Benuto, Neilton de Liz, Tamires Scupinari e Isabel Schlichting.

A todas(os) que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desta pesquisa meu mais singelo... Obrigada!

“Devemos buscar uma oportunidade em cada dificuldade em vez de ficarmos paralisados pensando nas dificuldades existentes em cada oportunidade.”

Walter E. Cole

MAGALHAES, Suelen Pereira. **Estudo dos compostos voláteis de flores de soja (*Glycine max* I. Merrill) por microextração em fase sólida combinada à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (SPME-CG-EM).** 2019. 67 f. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, 2019.

RESUMO

A composição química e a intensidade dos voláteis emitidos por plantas estão intimamente relacionadas às suas condições fisiológicas. Compostos orgânicos voláteis (COV) liberados pelas flores são um dos principais atrativos de plantas para polinizadores, e assim, o objetivo deste estudo foi **definir um método adequado para extração e análise de compostos orgânicos voláteis emitidos pelas flores de soja**. A otimização das técnicas de *headspace* estático (HS) e microextração em fase sólida (SPME) em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi utilizada para analisar os COV produzidos pelas flores de soja. Nos experimentos, três fibras de SPME com diferentes polaridades como polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano / divinilbenzeno (PDMS/ DVB) e divinilbenzeno / carboxeno / polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) foram testados com flores de 'BRS 399' e duas fibras de SPME (PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS) com flores de 'DONMARIO 6563'. Em geral, a técnica SPME com as fibras PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS apresentaram maior quantidade de compostos extraídos de ambas as cultivares. Após o uso dessas técnicas (fibras PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS), foram detectados 57 compostos da cultivar DONMARIO 6563. Alguns compostos voláteis observados em flores foram relatados anteriormente em outras estruturas de soja (folhas, sementes e óleo). Consequentemente, o método desenvolvido tem uma contribuição inovadora, considerando a identificação de voláteis liberados exclusivamente por flores de soja, e essa conquista potencialmente permitirá realizar novos estudos para melhor compreensão da interação entre flores de soja e polinizadores.

Palavras chave: Flores de soja. SPME CG-EM. Compostos orgânicos voláteis. Metabolismo secundário.

MAGALHAES, Suelen Pereira. **Study of the volatile compounds of soybean flowers (*Glycine max* I.Merrill) by microextraction at the solid phase combined with gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME-CG-EM).** 2019. 67 p. Dissertation presented to the Master's Program in Chemistry at the State University of Londrina, 2019.

ABSTRACT

The chemical composition and intensity of the volatiles emitted by plants are closely related to their physiological conditions. Volatile organic compounds (VOC) released by flowers are one of the main attractions of plants for pollinators, and thus, the objective of this study was to define a suitable method for extraction and analysis of volatile organic compounds emitted by soybean flowers. The optimization of the static headspace (HS) and solid phase microextraction (SPME) techniques were performed and gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (GC-MS) was used to analyze VOC produced by soybean flowers. In the experiments, three SPME fibers with different polarities as polydimethylsiloxane(PDMS), polydimethyl siloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) and divinylbenzene/carboxene/ polydimethylsiloxane (DVB/CAR/ PDMS) were tested with flowers of 'BRS 399' and two SPME fibers (PDMS/DVB and DVB/CAR/PDMS) with flowers of 'DONMARIO 6563'. In general, the SPME technique with PDMS/DVB and DVB/CAR/PDMS fibers presented a greater amount of compounds extracted from both cultivars. After using these technique (PDMS/DVB and DVB/CAR/PDMS fibers), 57 compounds were detected from DONMARIO 6563 cultivar. Some volatiles compounds observed in flowers here were previously reported in other soybean structures (leaves, seeds and oil). Consequently, the method developed has an innovative contribution, considering the identification of volatiles released exclusively by soybean flowers, and this achievement potentially will allow performing further studies for better understanding the interaction between soybean flowers and pollinators.

Key words: Soybean flowers. SPME CG-EM. Volatile organic compounds. Secondary metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Flor de soja comparada à ponta de uma lapiseira	11
Figura 2	– Desenho esquemático da morfologia da flor de soja	11
Figura 3	– Emissão de voláteis por plantas.....	17
Figura 4	– Alguns métodos de análise por <i>headspace</i>	20
Figura 5	– Frasco de vial de <i>headspace</i> contendo uma amostra líquida	21
Figura 6	– Sistema de HS dinâmico	22
Figura 7	– Exemplos de sistemas dinâmicos de coleta de espaço	24
Figura 8	– Comparação de injeção líquida, <i>headspace</i> estático e SPME	25
Figura 9	– <i>Headspace</i> estático com microextração em fase sólida (SPME)	26
Figura 10	– Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CG	26
Figura 11	– SPME introduzido no cromatógrafo a gás.....	27
Figura 12	– Flores de soja em frascos de <i>headspace</i>	31
Figura 13	– Sistema de absorção por SPME	33
Figura 14	– Comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja da cultivar BRS 399, com diferentes tempos de incubação. Cromatograma 1 – em preto, tempo de 30 minutos de incubação. Cromatograma 2- em rosa, tempo de 60 minutos de incubação, a temperatura de 50°C	35
Figura 15	– Comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja da cultivar BRS 399, com diferentes tempos de incubação. Cromatograma 1 – em preto, tempo de 30 minutos de incubação. Cromatograma 2- em rosa, tempo de 60 minutos de incubação, a temperatura de 80°C	36
Figura 16	– Comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja da cultivar BRS 399, em diferentes condições. Cromatograma 1 – em preto, tempo de 30 minutos de incubação, a temperatura de 50°C. Cromatograma 2- em rosa, tempo de 60 minutos de incubação, a temperatura de 50°C. Cromatograma 3 – em azul, tempo de 30 minutos de incubação, a temperatura de 80°C. Cromatograma 4- em vermelho, tempo de 60 minutos de incubação, a temperatura de 80°C	37
Figura 17	– Perfil cromatográfico de flores de soja, da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra DVB/CAR/PDMS	39

Figura 18 – Ampliação do perfil cromatográfico de flores de soja (entre 8,0 a 24,0 min), da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra DVB/CAR/PDMS	40
Figura 19 – Perfil cromatográfico de flores de soja, da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra PDMS/DVB.....	43
Figura 20 – Ampliação do perfil cromatográfico de flores de soja (entre 9,0 a 27,0 min), da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra PDMS/DVB	44
Figura 21 – Perfil cromatográfico de flores de soja, da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra PDMS	47
Figura 22 – Ampliação do perfil cromatográfico de flores de soja (entre 9,0 a 27,5 min), da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra PDMS.....	48
Figura 23 – Comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja, da cultivar BRS 399, com diferentes fibras. Cromatograma 1 – em preto, fibra DVB/CAR/PDMS. Cromatograma 2- em rosa, fibra PDMS/DVB. Cromatograma 3 – em azul, fibra PDMS.....	51
Figura 24 – Ampliação da comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja, da cultivar BRS 399, com diferentes fibras. Cromatograma 1 – em preto, fibra DVB/CAR/PDMS. Cromatograma 2- em rosa, fibra PDMS/DVB. Cromatograma 3 – em azul, fibra PDMS.....	52
Figura 25 – Comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja, da cultivar DONMARIO 6563, em diferentes fibras. Cromatograma 1 – em preto, fibra DVB/CAR/PDMS. Cromatograma 2- em rosa, fibra PDMS/DVB..	57
Figura 26 – Ampliação da comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja (entre 10,0 a 23,0min), da cultivar DONMARIO 6563, em diferentes fibras. Cromatograma 1 – em preto, fibra DVB/CAR/PDMS. Cromatograma 2- em rosa, fibra PDMS/DVB.....	58
Figura 27 – Perfil cromatográfico da mistura de padrões, obtido por CG-EM, em fibra PDMS/DVB	61
Figura 28 – Comparação do perfil cromatográfico de flores de soja, da cultivar BRS 399, obtidos por CG-EM, em fibra PDMS/DVB em relação a mistura de padrões.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Compostos voláteis encontrados na soja.....	14
Tabela 2	– Adsorventes mais utilizados na extração de compostos voláteis de flores	23
Tabela 3	– Algumas características das fibras de SPME utilizadas em flores	28
Tabela 4	– Condições de análise por <i>headspace</i> (°C/min), tempo de retenção na coluna, área do pico e identificação de compostos florais de soja.....	38
Tabela 5	– Identificação de compostos nas flores de soja roxa (cultivar BRS 399) por extração da fibra DVB/CAR/PDMS (50/30 µm) pela técnica SPME	41
Tabela 6	– Identificação de compostos nas flores de soja roxa (cultivar BRS 399) por extração da fibra PDMS/DVB (65 µm) pela técnica SPME.	45
Tabela 7	– Identificação de compostos nas flores de soja roxa (cultivar BRS 399) por extração da fibra PDMS (100 µm) pela técnica SPME	49
Tabela 8	– Identificação de compostos das flores de soja roxa, cultivar BRS 399, usando as fibras DVB/CARPDMS, PDMS/DVB e PDMS.....	53
Tabela 9	– Identificação de compostos das flores de soja branca, cultivar DONMARIO 6563, usando as fibras DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB..	58
Tabela 10	– Estimativa da concentração de compostos presentes nas flores de soja, BRS 399, através de extração por fibra PDMS/DVB	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano
HS	<i>Headspace</i>
IK	Índice de Retenção de Kovats
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/ DVB	Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno
SPME	<i>Solid Phase MicroExtraction</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	SOJA (GLYCINE MAX)	10
1.2	FLOR DA SOJA	10
1.3	COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS	12
1.4	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE FLORES	16
1.4.1	Métodos Extrativos Baseados No Uso De Solventes	17
1.4.2	Enfleurage	18
1.4.3	Métodos Headspace	19
1.4.4	Headspace Estático	20
1.4.5	Headspace Dinâmico	21
1.4.6	Microextração Em Fase Sólida (SPME)	24
1.5	CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	28
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	CULTIVO DAS PLANTAS	30
3.2	HEADSPACE (AUTOINJETOR)	30
3.2.1	Coleta De Flores	30
3.2.2	Procedimento	30
3.2.3	Análise Por Cromatografia A Gás Acoplada À Espectrometria De Massas	31
3.3	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)	32
3.3.1	Preparo Do Material	32
3.3.2	Procedimento SPME	32
3.3.3	Análise Por Cromatografia A Gás Acoplada À Espectrometria De Massas	33
3.3.4	Identificação Dos COVs	34
3.3.5	Análises Por CG-EM Usando Padrão	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	ANÁLISES POR HEADSPACE (AUTOINJETOR)	35

4.1.1	Otimização Do Método	35
4.2	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA- SPME	39
4.2.1	Uso Das Fibras SPME Em Flores Da Cultivar BRS 399.....	39
4.2.2	Uso Das Fibras SPME Em Flores Da Cultivar DONMARIO 6563	57
4.2.3	Identificação Dos Compostos Das Flores De Soja Usando Uma Mistura De Padrões	60
5	CONCLUSÃO	63
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 SOJA (*GLYCINE MAX*)

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América (EUA), com produção de 116.996 milhões de toneladas (CONAB 2019) e 119.518 milhões de toneladas (USDA – United States Department of Agriculture – maio/18), respectivamente. A soja (*Glycine max*) representa a principal oleaginosa produzida e consumida em nível mundial. Assim, atualmente, essa cultura vem sendo amplamente cultivada em função do desenvolvimento expressivo de *commodities* (SILVA et al., 2011).

O primeiro cultivo da soja ocorreu em 1914 (Santa Rosa, RS), porém a cultura só obteve importância econômica no final dos anos 40. A produção foi multiplicada 4,4 vezes na década seguinte (34.429 t em 1950 e 151.574 t em 1959) e 5,1 vezes nos anos 60 (205.744 t em 1960 e 1.056.607 t em 1969), indicando a possibilidade da cultura se tornar uma grande economia para o Brasil (DALL'AGNOL, 2016).

Segundo a Conab (2019), estima-se que a safra brasileira de 2018/2019 de soja obterá uma projeção de 1,7% na área de plantio e redução de 0,4% na produção, atingindo 118,8 milhões de toneladas.

A soja foi a grande responsável por promover a agricultura empresarial brasileira, apoiar o desenvolvimento da indústria nacional de maquinário agrícola e sua ampla utilização no processo produtivo. Além disso, sua produtividade ampliou e modernizou o sistema de transporte e armazenagem (DALL'AGNOL, 2016). Como oleaginosa, tem papel mundialmente fundamental possuindo utilização na alimentação humana e animal. Essa também é utilizada na produção de biocombustíveis, lubrificantes, tintas, vernizes e plásticos, e outros (Embrapa, 2005; Sedyama, 2009).

1.2 FLOR DA SOJA

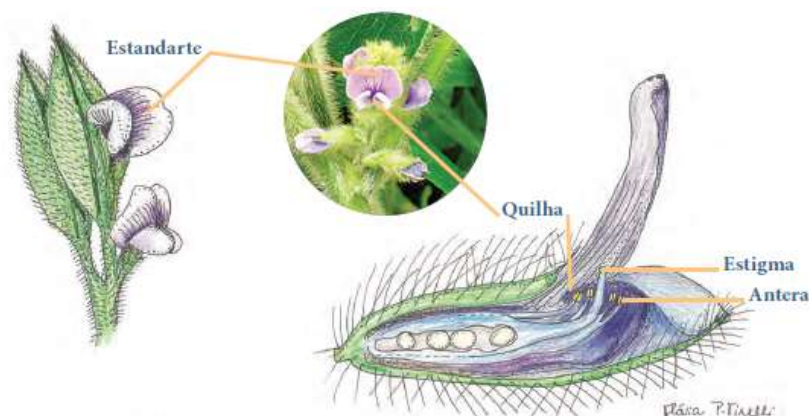
As flores da soja podem ser encontradas nas colorações brancas púrpuras ou roxas. As flores se desenvolvem em inflorescências conhecidas como racemos, que apresentam tamanho pequeno, medindo aproximadamente

0,5 cm de dimensão (Figura 1). Cada flor de soja possui cinco pétalas, sendo a maior delas chamada de estandarte, enquanto as demais, localizadas lateralmente, são as asas. Na Figura 2 apresentam-se as duas pétalas anteriores nas quais são chamadas quilhas, envolvendo e protegendo os órgãos sexuais, masculino e feminino, da planta (FREE, 1993; DELAPLANE *et al.* 2000). O ovário possui de três a cinco óvulos, que depois da fecundação se transformam no legume (vagem), que poderá ter de uma até cinco sementes.

Figura 1. Flor de soja comparada à ponta de uma lapiseira.



Figura 2. Desenho esquemático da morfologia da flor de soja.



Fonte: Witter *et al.*, 2014.

1.3 COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Os polinizadores podem ser atraídos pelos compostos orgânicos voláteis (COV) distribuídos pelas flores, como também pela coloração do conjunto floral. Segundo Riffel *et al.* (2015) os polinizadores encontram suas plantas hospedeiras com maior eficiência, quando combinam os sinais químicos olfativos com os estímulos visuais. As pétalas detêm células epidérmicas papilhosas, as quais frequentemente estão associadas ao aumento da superfície de emissão dos COV, absorção e reflexão da luz, no qual interferem na intensidade de suas cores e brilho (ENDRESS, 1996).

No Brasil, em experimentos utilizando a cultivar de soja Conquista, Ribeiro e Couto (2002) observaram que as plantas expostas à visitação dos insetos produziram maior número de sementes viáveis, em relação às plantas com exclusão de insetos. No Paraná, estudos demonstraram que a cultivar de soja “BRS 133”, com visitas de abelhas aumentou em 61,38% e 57,78 % o número de vagens e de sementes em comparação ao tratamento sem abelhas (CHIARI *et al.*, 2005). Além disso, a produtividade dos grãos de soja também aumentou com a presença de abelhas polinizadoras (CHIARI *et al.*, 2008; TOLEDO *et al.*, 2011).

Os COV presentes em plantas são intensamente encontrados na natureza, em geral apresentam baixa massa molecular (< 300 Da), o que lhes permite a rápida volatilização e a liberação por praticamente todos os tecidos vegetais (DUDAREVA *et al.* 2008). Esses compostos são uma mistura complexa de moléculas originárias de diversas rotas bioquímicas do metabolismo secundário, como fenilpropanoídeos, ácidos graxos, isoprenoídeos, compostos nitrogenados e de cadeia cíclica (KNUDSEN *et al.* 2006).

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

de sementes, sendo, por exemplo, este processo responsável pelo sucesso evolutivo das fanerógamas (RIFFEL *et al.* 2015).

Várias outras publicações relatam a emissão de COV pela soja após a ocorrência de herbivoria causada por insetos ou quando as plantas são infectadas por patógenos ou mecanicamente danificadas (FANG; RAMASAMY, 2015). O *cis*-3-hexenol, acetato de *cis*-hexenila e acetato de hexila detectados em folhas de plantas foram considerados bons biomarcadores para evidenciar a diferença entre plantas infectadas ou não por patógenos. Em soja infectada pelo fungo causador da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizii*) foi observado que o volátil (*E, E*) α -farnesene diminuiu a sua concentração com o aumento da infecção (BRITO JÚNIOR, 2013). Sendo assim, esse fenômeno tem potencial para indicar, ou seja, funcionar como um marcador da ocorrência da doença, mesmo antes do aparecimento dos sintomas de infecção, que começa a ocorrer a partir de três semanas após o início da infecção.

Há estudos que analisaram apenas os voláteis de soja, sem herbivoria, através da técnica de microextração em fase sólida (SPME). Boué e colaboradores (2003) analisaram os compostos de sementes de soja e identificaram os seguintes compostos: 3-hexanona, (E)-2-hexenal, 1-hexanol, 3-octanona, (E)-2-octenal, etanol, hexanal, (E)-2-heptenal e 1-octen-3-ol. Também foram estudados voláteis extraídos de óleo de soja e milho por Steenson e colaboradores (2002), através da mesma técnica (SPME), obtendo-se: pentano, pentanal, hexanal, 2-butanona, heptanal, 2-heptenal, 2-pentilfurano, 2,4-heptadienal, 2-octenal, nonanal, 2-nonenal, 2-decenal e 2,4-decanial (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos voláteis encontrados na soja.

Nº	Compostos	Steenon <i>et al</i> (2002)- OS	Boué <i>et al</i> (2003)-SS	Boué <i>et al</i> (2005)-SS	Cai <i>et al</i> (2015)-FS
1	1-penteno-3-ol				*
2	Benzaldeído		*		*
3	Ciclopropeno, 3,3-dietil				*
4	Fenol				*
5	gama, hexalactona				*
6	(E) -2-heptenal	*	*	*	
7	(E) -2-hexenal		*	*	*
8	(E) -2-nonenal		*	*	
9	(E) -2-octenal		*	*	
10	(E) -4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrieno				*
11	(E, E) - 2,4-nonadienal		*	*	
12	(E, E) -2,4 octadienal		*		
13	(E, E) -2,4-decadienal		*		
14	(E, E) -2,4-heptadienal	*	*	*	
15	(E, E) -2,4-hexadienal		*		*
16	(E, E) -3,5-octadien-2-ona		*		
17	(E, Z) -2,4-decadienal		*		
18	(E, Z) -2,4-heptadienal		*		
19	(E, Z) -2,4-nonadienal		*		
20	(E, Z) -2,6-nonadienal		*		
21	1 pentanol		*	*	
22	1 penten-3-ona			*	
23	1,3-pentadieno			*	
24	1,3-Pentadieno, 2-metil				*
25	1-Butanol - acetato				*
26	1-Butanol, 2-metil				*
27	1-Butanol, 3-metil				*
28	1-hexanol		*	*	
29	1-nonen-4-ol		*		
30	1-octen-3-ol		*	*	*
31	2 [5H] -furanona, 5-etil				*
32	2 [5H] -furanona, 5-etil- [R]				*
33	2,6-nonadien-1-ol		*		
34	2-butanona	*			
35	2-butenal		*		
36	2-ciclohexeno-1,4-diona				*
37	2-Clohexeno-1, 4-dione				*
38	2-etil-1-hexanol		*		
39	2-etilfuran		*		
40	2-heptanona		*		
41	2-heptanona			*	
42	2-heptenal	*			
43	2-Metil-3-feniltiopropeno				*
44	2-metil-3-octanona		*		
45	2-pentil furano	*	*	*	
46	2-Propanol, 2-metil				*
47	3,4-diidropirano		*		*
48	3-heptanona			*	
49	3-hexanol		*		
50	3-hexanona		*		
51	3-hexen-1-ol				*

Nº	Compostos	Steenon <i>et al</i> (2002)- OS	Boué <i>et al</i> (2003)-SS	Boué <i>et al</i> (2005)-SS	Cai <i>et al</i> (2015)-FS
52	3-hidroxi-2-metil pirona		*		
53	3-octanol		*		*
54	3-octanona		*	*	*
55	3-octen-2-one		*		
56	5-Etil-1, 3-di-hidro-1, 3-diiminoisoindole				*
57	acetaldeído		*		
58	acetato de etilo		*		
59	acetato de metilo		*		
60	Ácido acético				*
61	Ácido acético, éster metílico				*
62	Ácido butanóico, éster 2-metil-metílico				*
63	Ácido malônico bis- (2-trimetilsilanil-etil ester)				*
64	alfa -Copaene				*
65	alfa, farneseno				*
66	Anisato de metilo				*
67	a-terpineno		*		
68	Benzeno, isocianato				*
69	Benzenometanol				*
70	beta-elemene				*
71	Butanal, 2-metil				*
72	Butanodinitrilo, 2,3-dimetil				*
73	Ciclobutanona, 2, 2-dimetil				*
74	cicloproano, propilo				
75	cis-3-hexen-1-ol				*
76	cis-ocimeno				*
77	di-hidro-5-pentil- (3H) -furanona		*		
78	Dodecanamina, n, n-dimetil				*
79	E) -2-decenal	*	*		
80	E-2-Metil-2-butenoato				*
81	Éster metílico benzoico				*
82	Éster metílico do ácido 2-oxo-hexanóico				*
83	etanol		*		
84	Etanol benzeno				*
85	fenilacetaldeído		*		
86	gama, heptalactona				*
87	heptanal	*	*	*	
88	hexanal	*	*	*	*
89	hexanoato de metila		*		
90	Indole				*
91	Ionol				*
92	Linalool				*
93	Morfolina, 4-octadecil				*
94	Morfolinaetanamina				*
95	nonanal	*	*	*	
96	Oct-1-en-3-one				*
97	octanal		*	*	
98	p-cimeno		*		
99	pentanal	*	*	*	

Nº	Compostos	Steenon <i>et al</i> (2002)- OS	Boué <i>et al</i> (2003)-SS	Boué <i>et al</i> (2005)-SS	Cai <i>et al</i> (2015)-FS
100	pentano	*		*	100
101	Penten-3-one				*
102	Propano, 1-cloro-2-metil				*
103	Propanonitrilo, 2-metil				*
104	sabinene		*		
105	Salicilato de Metila				*
106	t, 2,4-decadienal	*			
107	t, c-2,4-decadienal	*			
108	t-2-nonenal	*			
109	t-2-octenal	*			
110	Tiofeno, 2-pentil				*
111	trans-2-Metil-1, 3-pentadieno				*
112	trans-cariofileno				*
113	Trimetilsilanol				*
114	y-butirolactona		*		

*identificados

SS: sementes de soja

OS: óleo de soja

FS: folhas de soja

Embora estudos relatem a ocorrência de emissão de COV em folhas (MEAGHER *et al*, 2010), vagens de soja (MICHEREFF *et al.*, 2011; 2013), sementes (BOUÉ *et al*, 2003) e até mesmo no óleo da soja (STEENSON *et al*, 2002), até o momento não foi encontrado na literatura relatos de voláteis em flores de soja. Possivelmente, a maior limitação para esses estudos seja o tamanho reduzido das flores da leguminosa em relação às demais partes da planta.

1.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE FLORES

O odor de flores, dependente do tipo de composto volátil presente, pode ser estudado através da sua obtenção ou extração, etapa anterior à análise cromatográfica. Há vários estudos dedicados exclusivamente a métodos de extração geralmente aplicados a análise de compostos voláteis emitidos por flores (MCGEE; PURZYCKI, 2002; THOLL *et al*, 2006; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2008).

Todos os métodos para análise de voláteis de planta têm em comum identificar o perfil químico de misturas voláteis emitidas por uma planta. Entretanto, a escolha de qual sistema utilizar gera muitas dúvidas. O primeiro questionamento a ser respondido aborda se os voláteis analisados serão de

plantas cultivadas em condições laboratoriais ou em seu habitat natural. Para a coleta destes compostos em populações naturais é necessário utilizar sistemas portáteis e simplificados. Uma das soluções é o estudo ser realizado no laboratório através de coleta de amostras assistida por computadores e dispositivos adicionais, sendo assim possível reduzir contaminantes, controlar a temperatura e intensidade de luz, como também a umidade (Figura 3) (THOLL *et al*, 2006).

Figura 3. Emissão de voláteis por plantas.



Fonte: Thol *et al*, 2006.

Os voláteis são mais convenientemente coletados *in situ* a partir de plantas inteiras. No entanto, geralmente é necessário amostras de COV a partir de partes ou órgãos de plantas, por exemplo, para distinguir voláteis de tecidos vegetais e reprodutivos, ou mesmo, determinar emissões de COV induzidas por estresses abióticos. Neste caso, os voláteis são amostrados a partir de partes de plantas destacadas ou *in situ* em órgãos de plantas (THOLL *et al*, 2006).

1.4.1 Métodos extrativos baseados no uso de solventes

O método mais antigo para extração de compostos voláteis de flores utiliza solventes. Geralmente, para o uso destes métodos as flores são cortadas fornecendo uma extração exaustiva de compostos voláteis dos seus tecidos (PESSOA *et al.*, 2010). Podem ser utilizados diferentes solventes, sendo eles líquidos orgânicos, fluídos supercríticos e líquidos superaquecidos (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2008; PESSOA *et al.*, 2010). A preferência para extração de voláteis utiliza solventes apolares, tais como éter de petróleo,

pentano ou diclorometano. Entretanto, solventes não polares extraem outros compostos lipofílicos, além de apenas os voláteis florais (PESSOA *et al.*, 2010).

O método funciona através da extração dos componentes presentes no tecido da flor por dissolução em um solvente, processo comumente chamado de extração sólido-líquido. Geralmente, as flores a serem extraídas são inseridas em um extrator, no qual terá contato direto com um solvente puro. Assim, o solvente penetra no material vegetativo da flor e dissolve os compostos voláteis, tanto como ceras e corantes que também estão presentes nas pétalas. O último passo é a evaporação do solvente em um evaporador apropriado, como o *clevenger* (PESSOA *et al.*, 2010).

Na indústria a produção de óleos voláteis de flores é realizada por hidrodestilação, pelo fato dos tecidos das flores serem muito delicados. Nesta técnica as flores são imersas em água e utiliza-se calor para a obtenção da mistura dos voláteis das flores juntamente com o vapor de água, sob condensação, formando uma fase heterogênea (PESSOA *et al.*, 2010). Radoias e Bosilcov (2013) realizaram um estudo dos voláteis das flores de *Solandra maxima*, espécie aromática do Caribe, através do uso da hidrodestilação. A extração ocorreu durante 4 horas e os autores obtiveram linalol (17%), salicilato de metila (11,4 %), carcavrol (11,5 %) e salicilato de benzila (4,1%).

1.4.2 Enfleurage

O enfleurage é uma técnica muito tradicional na perfumaria utilizada para aumentar o rendimento da extração de óleos essenciais, tendo seu uso em algumas flores, tais como jasmim e o nardo. Nesta técnica as pétalas das flores são expostas, uma por uma, em uma tela coberta de gordura animal. Essas permanecem nesta condição por horas, obtendo um maior aproveitamento dos voláteis das flores, que ainda continuam produzindo metabolitos mesmo depois de cortadas. Após esta etapa, ocorre a extração do óleo através da gordura com o uso de solventes. Posteriormente é realizada uma destilação (PAIBON *et al.*, 2011; JOULAIN, 1987).

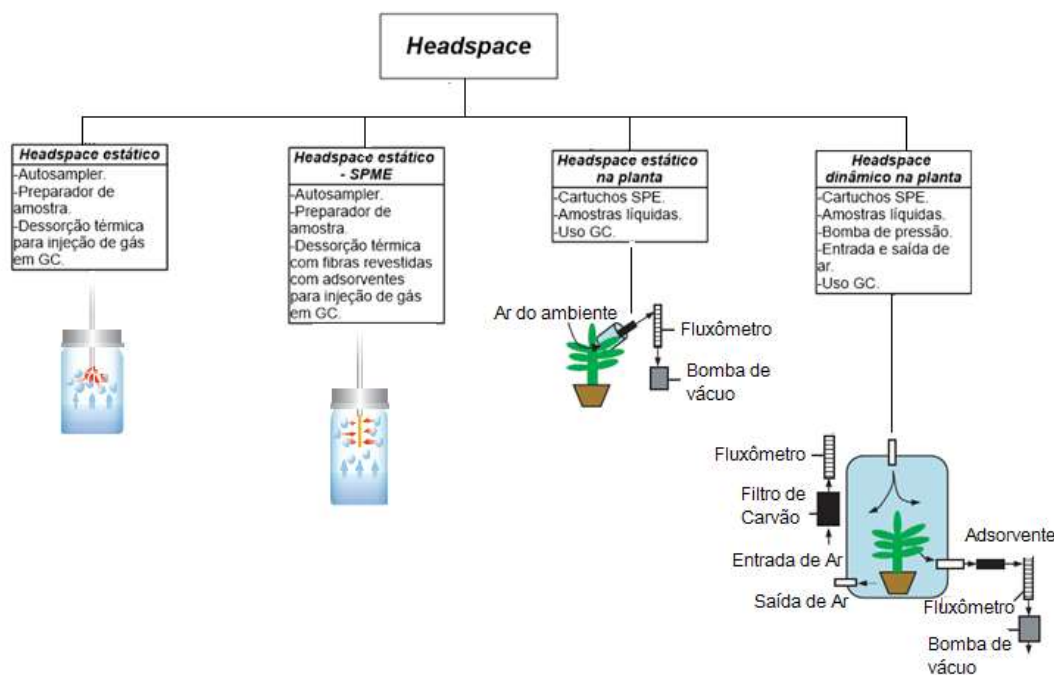
1.4.3 Métodos *headspace*

As técnicas desenvolvidas nas análises por *headspace* fornecem um perfil volátil mais representativo de plantas vivas do que o tradicional método de extração de solvente ou destilação a vapor. Portanto, esta técnica possui uma visão mais realista do perfil volátil emitido pela planta e detectado pelo inseto, tornando possível entender melhor a relação química ecológica (THOLL *et al*, 2006).

De maneira geral, os materiais utilizados para as coletas de *headspace* necessitam ser inertes, evitando assim a contaminação do sistema e interferindo na análise dos voláteis. Os materiais mais comumente usados são: vidro, metal e plásticos especiais, como o Teflon, embora este possa não ser totalmente inerte (MILLAR; SIMS, 1998).

Na literatura encontram-se diversos métodos da análise por *headspace*, os principais estão apresentados no fluxograma da Figura 4.

Figura 4. Alguns métodos de análise por *headspace*.



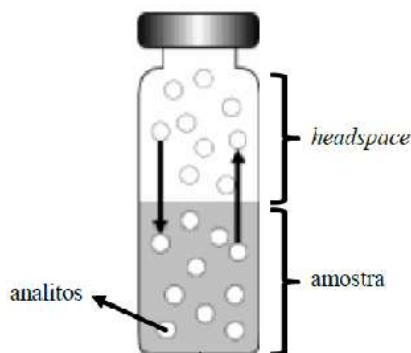
Fonte: Imagem adaptada (Kolb; Leslie, 2006; Tholl, 2006).

1.4.4 *Headspace* estático

Para a análise em *headspace* estático, a planta ou suas partes são isoladas em um recipiente e os voláteis são coletados por uma seringa (Figura 5) ou adsorvente. O ar que envolve a planta permanece “estático”, não havendo a sua circulação na câmara. Os voláteis são concentrados na matriz adsorvente sem as impurezas de uma corrente de ar contínua que pode impedir a detecção de COV abundantes, de massa molar baixa. Este método é vantajoso para a coleta de compostos orgânicos voláteis de pouca emissão pelas plantas (THOLL *et al*, 2006). As técnicas de extração a gás são bastante semelhantes às de extração líquida. As amostras podem ser analisadas por um único passo de extração e, para esse fim, a amostra original (líquido ou sólido) é inserida em um frasco fechado. Os voláteis se vaporizam parcialmente da amostra para a fase gasosa acima, e voltam novamente para o frasco. Após um período, o sistema chega a um equilíbrio, onde a concentração do analito volátil na fase gasosa permanece constante (constante da lei de Henry). Ao injetar no CG uma alíquota da fase gasosa, analisam-se os compostos voláteis

sem interferência da matriz não volátil. Portanto, esse sistema é conhecido como *headspace* estático ou *headspace* em equilíbrio (KOLB; LESLIE, 2006).

Figura 5. Frasco de vial de *headspace* contendo uma amostra líquida. Sendo V_G volume da fase gasosa, V_S volume da amostra líquida.

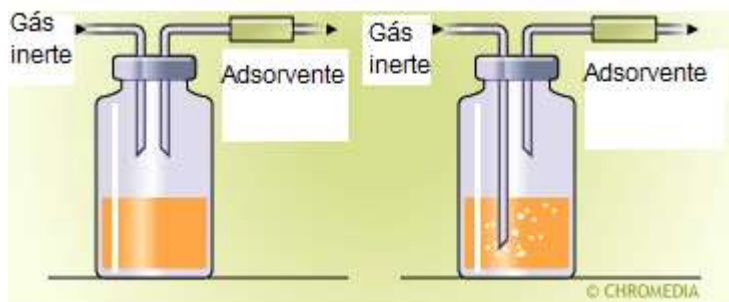


Fonte: Kolb; Leslie, 2006.

1.4.5 *Headspace* dinâmico

No método de *headspace* dinâmico, um fluxo de ar contínuo flui através do recipiente da amostra que atua como um gás transportador. Enquanto, os analitos são concentrados em adsorventes, o gás transportador circula através de um dispositivo de pressão, permitindo a coleta de quantidades de voláteis suficientes para a detecção. Para evitar a contaminação proveniente do ambiente externo, o ar de entrada é filtrado, por exemplo, com carvão ativado (THOLL *et al.*, 2006) (Figura 6).

Figura 6. Sistema de HS dinâmico.



Fonte: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Chromedia/01Gas_Chromotography_\(GC\)/Gas_Chromotography%3A_In_Practice/02Gas_Chromatography%3A_Injection_techniques_and_principles/20Headspace_analysis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Chromedia/01Gas_Chromotography_(GC)/Gas_Chromotography%3A_In_Practice/02Gas_Chromatography%3A_Injection_techniques_and_principles/20Headspace_analysis).

Geralmente, em análise de *headspace* dinâmico antes da análise em cromatografia gasosa, os voláteis são concentrados em uma matriz adsorvente. Existe um grande número de adsorventes de diferentes materiais. A Tabela 2 fornece uma visão geral das matrizes mais comumente utilizadas, incluindo adsorventes à base de carbono e polímeros orgânicos (THOLL *et al.*, 2006).

Tabela 2. Adsorventes mais utilizados na extração de compostos voláteis de flores.

Adsorvente	Composição	Área superficial específica (m ² g ⁻¹)	Temperatura máxima (°C)
Tenax GC	Poli(2,6-difenil- <i>p</i> -fenilenóxido)	19–30	450
Tenax TA	Poli(2,6-difenil- <i>p</i> -fenilenóxido)	35	300
Porapak Q	Etilvinilbenzeno/divinilbenzeno	500–600	250
Carvão ativado	93,7 % de carbono	1070	220

Fonte: Silva (2013).

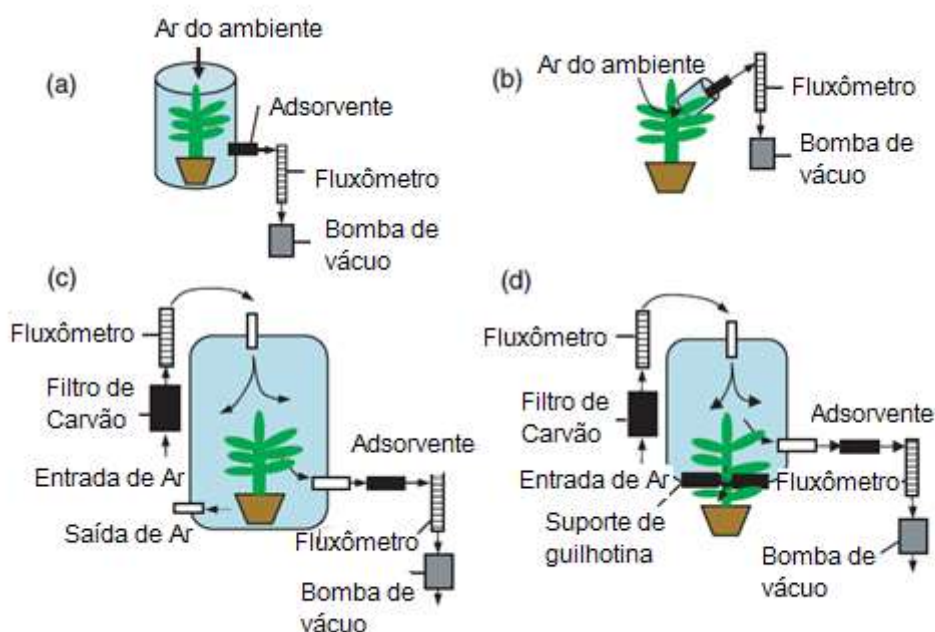
Durante a análise de voláteis utilizando *headspace* dinâmico, o ar que contém os compostos passa pelo adsorvente a uma vazão específica durante o processo de amostragem. Assim, os analitos concentrados podem ser eluídos da matriz adsorvente com solventes puros ou misturas de baixo ponto de ebulição de solventes orgânicos. Para análise semiquantitativa, o solvente pode conter uma quantidade de um ou dois compostos padrão (por exemplo, 1-bromodecano e *n*-octano). Materiais adsorventes com alta estabilidade térmica tais como Tenax, podem ser empregados na dessorção térmica de COV, como uma alternativa à extração de solvente. Na dessorção térmica, os voláteis são liberados diretamente do adsorvente sob altas temperaturas e, geralmente, são concentrados antes da separação por cromatografia gasosa (THOLL *et al.*, 2006).

Existem várias formas para coletar voláteis em sistema de *headspace*. Uma delas é através de uma câmara de coleta por *headspace*, onde a planta é condicionada em um recipiente fechado por um fluxo de ar, regulado por um medidor, onde os voláteis são coletados através de armadilha de adsorvente (Figura 7a). Outra forma é por meio de uma armadilha adsorvente que é diretamente, e propositalmente, posicionada ao lado de um órgão da planta (como a folha) sem qualquer outro invólucro da planta dentro das câmaras abertas (Figura 7b) (THOLL *et al.*, 2006).

Em outro modelo de sistema de coleta, o ar pressurizado entra no topo da câmara de coleta regulada por um medidor de fluxo. O ar de entrada é purificado passando por um filtro de carvão inserido atrás, ou na frente, do medidor de fluxo. Posteriormente, os voláteis são coletados por uma armadilha

adsorvente no lado inferior da câmara a uma taxa definida e controlada (Figura 7c). Um último sistema (Figura 7d), também seguindo um sistema de *headspace* dinâmico, mas modificado para coletar COV de apenas algumas partes de uma planta através de lâminas, estes são semelhantes a guilhotinas revestidas com teflon, que fecham a base da câmara ao redor do caule da planta permitindo assim a captura de voláteis da parte superior da planta (KUNERT *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2003; DEGENHARDT; GERSHENZON, 2000).

Figura 7. Exemplos de sistemas dinâmicos de coleta *headspace*.



Fonte: Tholl *et al.* (2006).

1.4.6 Microextração em fase sólida (SPME)

Um avanço importante na análise de *headspace* estático foi o desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME) (Figura 8), um método rápido e simples para coleta de voláteis em limites de detecção de ppb (partes por bilhão). A SPME é uma técnica baseada em adsorção, ou absorção, e dessorção de substâncias voláteis de uma fibra revestida com diferentes tipos de adsorventes/absorventes. A fibra está inserida na agulha da seringa, onde os voláteis podem ser adsorvidos/absorvidos, *headspace* estático, através do perfuro do septo, empurrando o êmbolo e expondo a fibra

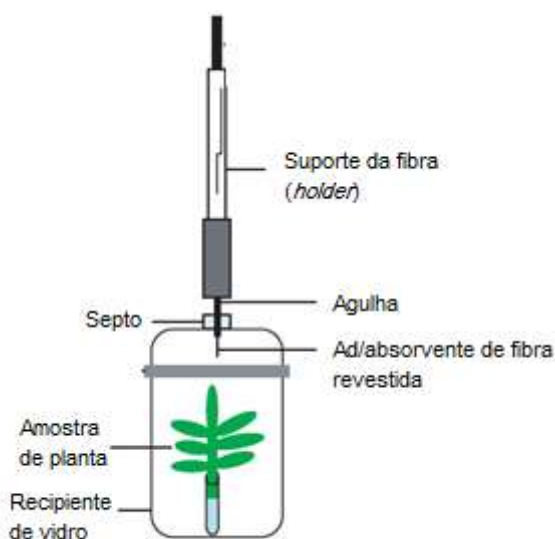
(Figura 9 e 10). Após o equilíbrio entre a fibra e a amostra volátil (alguns minutos à meia hora), a fibra é retraída na agulha e pode ser transferida para um cromatógrafo de gás para dessorção (Figura 11). Uma das vantagens da técnica é a reutilização da fibra. A dessorção térmica dos COV da fibra elimina a necessidade de solvente, evitando-se assim a contaminação por impurezas. Entretanto, não há repetitividade em SPME, uma vez que, ao destruir toda a amostra para realizar a injeção, não há possibilidade de uma nova injeção da amostra (THOLL *et al.*, 2006).

Figura 8. Comparação de injeção líquida, *headspace* estático e SPME.



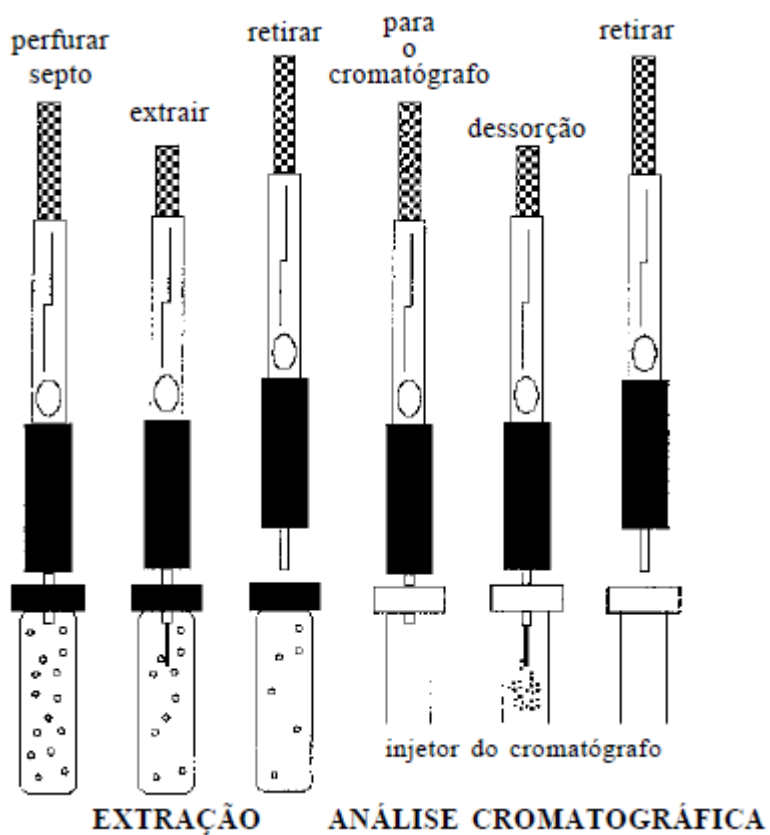
Fonte: <https://www.shimadzu.com/an/gcms/aoc-6000/2.html>.

Figura 9. *Headspace* estático com microextração em fase sólida (SPME).



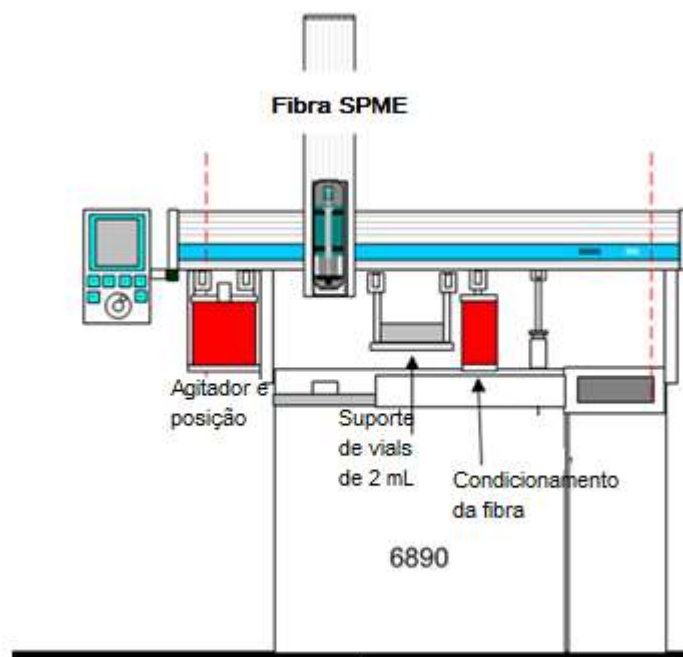
Fonte: Thol *et al.*, 2006.

Figura 10. Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CG.



Fonte: Valente, 2000.

Figura 11. SPME introduzido no cromátografo a gás.



Fonte: SPME-GC. Crédito: http://leapwiki.com/mediawiki/index.php/EPA_Method_8272.

A Tabela 3 mostra as diferentes fibras que podem ser usadas em SPME, utilizando compostos de diferentes polaridades, diferentes espessuras dos revestimentos das fibras, para análise dos compostos voláteis e semi-voláteis (Tabela 3). Enquanto revestimentos mais finos podem garantir uma rápida difusão e liberação de compostos semivoláteis, revestimentos mais espessos podem reter melhor os compostos mais voláteis até a dessorção térmica. Para captura de voláteis em maiores quantidades podem ser utilizadas barras de extração sortiva, que são revestidos com os mesmos adsorventes que a fibras de SPME. Esta barra é colocada no *headspace* estático da amostra de planta, na qual os voláteis sorvidos serão liberados pela dessorção térmica após a transferência da barra do bloco do injetor aquecido do cromátografo a gás (Bicchi *et al.*, 2000).

Tabela 3. Algumas características das fibras de SPME utilizadas em flores.

Fase estacionária	Espessura (µm)	Ligação química**	Volume (µL)	Uso recomendado	Interação	Polaridade
PDMS	7	Sim	0,026	COSV semi-polares	Absorção	Apolar
	30	Não	0,132	COSV apolares		
	100	Não	0,612	COV		
PDMS/DVB	65	Parcialmente entrecruzada	0,357	Voláteis polares	Adsorção	Mista
	60	Parcialmente entrecruzada	0,415	CLAE		
CAR/PDMS	75	Parcialmente entrecruzada	0,436	COV nível traço	Adsorção	Mista
CW/DVB	65	Parcialmente entrecruzada	0,357	Compostos polares	Adsorção	Polar
Stableflex	50/30	Altamente entrecruzada	0,70/0,14	-	Adsorção	
DVB/CAR/PDMS	50/30	Altamente entrecruzada	~1,40/0,28*	Voláteis e substâncias de PM ¹ entre 40 e 275	Adsorção	Mista
Stableflex						
CW/PEG	60	Parcialmente entrecruzada	0,330	Compostos polares	Adsorção	Mista
PA	85	Parcialmente entrecruzada	0,616	COSV polares	Absorção	Polar

PDMS - Polidimetilsiloxano

DVB - Divinilbenzeno

CAR - Carboxeno

*Comprimento da fibra 2 cm. **Ligação química entre a fase de extração e a fibra de sílica fundida.

Fonte: Parreira e Cardeal, 2005.

Para este trabalho foram selecionados as fibras polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) e divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) para a identificação de diferentes classes de compostos voláteis das flores de soja (*Glycine max* L. Merrill) por microextração em fase sólida.

1.5 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Os COV de plantas concentrados em matrizes adsorventes são rotineiramente analisados pela técnica de cromatografia a gás. (DEWULF; VAN LANGENHOVE, 2002; HANDLEY; ADLARD, 2005; LOCKWOOD, 2001; MARRIOTT *et al.*, 2001; MERFORT, 2002).

Para fins analíticos, os voláteis são comumente separados em colunas capilares de sílica fundida com diferentes fases estacionárias, tais como os polidimetilsiloxano não polares (como exemplo DB-1, DB-5, Cpsil 5, RTX-5), e o polietileno mais polar polímeros de glicol, incluindo Carbowax 20 M, DB-Wax e HP-20M (THOLL *et al.*, 2006).

Os compostos que saem da coluna CG são ionizados por impacto de elétrons (EI). O número total de íons obtidos está correlacionado aos cromatogramas que fornecem informações de tempo de retenção de cada composto e seu espectro de massas (consistindo de uma fragmentação característica de íons). Os limites de detecção dos espectrômetros de massa são na ordem de alcance de picogramas para o modo de varredura completo, sendo equipamentos altamente sensíveis (THOLL *et al.*, 2006).

Para a identificação de compostos na análise em CG-EM, sugestões das estruturas químicas similares podem ser obtidas em bibliotecas de espectros de massas, como a base de dados NIST (*Nacional Institute of Standards and Technology*). (THOLL *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O estudo propõe definir um método adequado para extração e análise de compostos orgânicos voláteis emitidos pelas flores de soja (*Glycine max* L. Merrill) empregando a técnica de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), visando auxiliar o entendimento do complexo sistema de interação de plantas de soja e os polinizadores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência de diferentes métodos de extração por *headspace* e SPME para análise de flores de soja;
- Avaliar a eficiência da extração por SPME usando os 3 tipos diferentes de fibras: DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), PDMS/DVB (65 µm) e PDMS (100 µm);
- Otimizar o método de extração com o melhor desempenho para análise de flores de soja por CG-EM;
- Encontrar o perfil químico aromático da cultivar roxa (BRS 399) e branca (DONMARIO 6563), empregando a extração proposta utilizando CG-EM;

- Propor a identidade dos compostos voláteis da flor de soja de acordo com a base de dados NIST e o índice de retenção de Kovats (IK).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO DAS PLANTAS

As flores de soja (*Glycine max* L. Merrill), da cultivar BRS 399 (roxa), utilizadas nos estudos foram provenientes do campo e da casa de vegetação, localizados na Embrapa Soja em Londrina-PR (latitude 23° 11'S, longitude 51° 11'W, a altitude de 566 m).

3.2 HEADSPACE (AUTOINJETOR)

3.2.1 Coleta de flores

As flores de soja (*Glycine max* L. Merrill), da cultivar BRS 399 (roxa), coletadas em casa de vegetação, foram submetidas às variações nas condições de extração dos compostos voláteis como a temperatura de incubação no modo *headspace* (autoinjetor) (50°C e 80°C) e tempo de incubação (30 min e 60 min), com 2,0 g de massa fresca de flor, utilizando 2,0 mL de volume de injeção.

3.2.2 Procedimento

Para cada teste, 2,0 g de flores frescas foram inseridas no frasco de *headspace* de 20 mL, separadamente (Figura 12), este foi selado com um septo de silicone/PTFE. O frasco com a amostra foi mantido no forno em quatro condições: 50°C por 30 min, 50°C por 60 min, 80°C por 30 min e 80°C por 60 min. Em seguida, as amostras foram injetadas em triplicata no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas. Previamente um branco para cada condição foi estabelecido, utilizando-se um *vial* vazio para cada condição testada. As flores foram coletadas na mesma data das análises (17/04/18, 18/04/18, 19/04/18 e 23/04/18), evitando-se assim, possíveis variações devido às condições de armazenamento.

Figura 12. Flores de soja em frascos de *headspace*.



3.2.3 Análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

As análises foram realizadas usando-se um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, com analisador do tipo impacto de elétrons, modelo CGMS-QP2010 Plus Shimadzu. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas (LAMM). Os compostos foram separados utilizando-se uma coluna capilar RTX 5MS (Restex), com fase de baixa polaridade, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . A amostra foi injetada no volume de 2,0 mL, modo *splitless* e como gás de arraste hélio com vazão de 1,0 mL min^{-1} . A rampa de temperatura manteve-se 1 min a 60°C, aumentada para 240°C a uma taxa de 4°C min^{-1} , mantida durante 4 min, dando um tempo total de corrida de 46 min. A temperatura de linha de transferência foi de 250°C e a do detector foi de 200°C. Os espectros de massa foram obtidos através de um sistema de varredura com o analisador de impacto de elétrons a 70 eV e intervalo de aquisição de massas de 45 a 700 μ , com início de 3,0 min até 50 min. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massas com os compostos contidos na biblioteca NIST11 (*National Institute of Standards and Technology*).

3.3 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

3.3.1 Preparo do material

As flores de soja (*Glycine max* L. Merrill), das cultivares BRS 399 (roxa) e DONMARIO 6563 (branca) plantadas no campo, foram submetidas à extração por *headspace* (autoinjeter), a 80°C de temperatura durante 60 min com 1,0 g de massa de flor, a qual foi suficiente para obtenção de resultados satisfatórios.

3.3.2 Procedimento SPME

Após o aquecimento do forno do *headspace* (80°C durante 60 min), o frasco foi retirado e inserido no suporte universal. Para a extração dos compostos voláteis utilizou-se um suporte de amostrador automático (*holder*) para três fibras diferentes de SPME: PDMS de 100 µm, PDMS/DVB de 65 µm e DVB/CAR/PDMS de 50/30 µm para as flores roxas (BRS 399). Já para as flores brancas (DONMARIO 6563) as fibras utilizadas foram: PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS. As fibras ficaram expostas à amostra durante 10 min (Figura 13). Previamente um branco foi estabelecido, utilizando-se de um frasco vazio para cada condição testada. Para a técnica de SPME os testes foram realizados em duplicata. As flores foram coletadas na mesma data das análises (22/01/19, 23/01/19 e 24/01/19), evitando-se assim, possíveis variações devido às condições de armazenamento.

Cada fibra foi condicionada previamente no forno frontal do cromatógrafo a gás durante o tempo sugerido pelo fabricante (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) (PDMS: 240°C durante 30 min; PDMS/DVB 240°C durante 60 min; DVB/CAR/PDMS: 260°C durante 60 min).

Figura 13. Sistema de partição por SPME.



3.3.3 Análise por Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

As fibras de SPME foram dessorvidas em 230°C por 2 minutos no injetor do cromatógrafo CG-EM-QP2010 Plus Shimadzu. Os compostos foram separados utilizando-se uma coluna capilar DB 5MS (Agilent), com fase de baixa polaridade, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A amostra foi injetada no modo *splitless* e o gás hélio foi empregado como gás de arraste com vazão de 1 mL min⁻¹. A fibra permaneceu no injetor por 20 min após o início de cada análise. A temperatura inicial do forno foi de 40°C, mantida por 3 min, seguida de uma rampa de temperatura, com o incremento de 10°C min⁻¹ até 60°C, e na sequência, aumentada a 3°C min⁻¹ até 150°C e 20°C min⁻¹ até 250°C durante 5 min, dando um tempo total de corrida de 40 min. A temperatura de linha de transferência foi de 250°C e do detector foi de 200°C. Os espectros de massa foram obtidos por um analisador de massas do tipo impacto de elétrons a 70 eV e intervalo de aquisição de massas de 45 a 700 u, com início de 1 min até 45 min. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massas com os contidos na biblioteca NIST11 (*National Institute of Standards and Technology*).

3.3.4 Identificação dos COVs

Os COVs foram identificados através de índice de retenção de Kovats (IK), por comparação dos seus respectivos espectros de massas com os da biblioteca NIST e com dados da literatura (ADAMS, 2007).

O *IK* foi calculado por meio da relação dos tempos de retenção (t_R) de uma série homóloga de *n*-alcanos saturados (C_8 - C_{30} , $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, *Sigma*), submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica das amostras.

Para o cálculo do índice de retenção utilizou-se da seguinte fórmula (ADAMS, 2007):

$$IK = 100n + 100 \frac{[\log tR(X) - \log tR(Pz)]}{[\log tR(Pz + 1) - \log tR(Pz)]}$$

Em que:

n = número de átomos de carbonos que antecedem o composto x (série dos n -alcanos).

$t_R(x)$ = tempo de retenção do composto x .

$t_R(P_z)$ = tempo de retenção anterior ao composto x (série dos n -alcanos).

$t_R(P_{z+1})$ = tempo de retenção posterior ao composto x (série dos n -alcanos).

3.3.5 Análises por CG-EM usando padrão

Para confirmação dos compostos identificados foi analisada por CG-EM uma amostra com uma mistura de padrões na concentração de $2,00 \mu\text{L mL}^{-1}$ contendo: hexanal, 1-octen-3-ol e 3-octanal. O teste foi realizado com a fibra PDMS/DVB, nas mesmas condições das amostras: temperatura de incubação 80°C , 60 min de tempo de incubação, volume de $80 \mu\text{L}$ e adsorção de 10 min pela fibra.

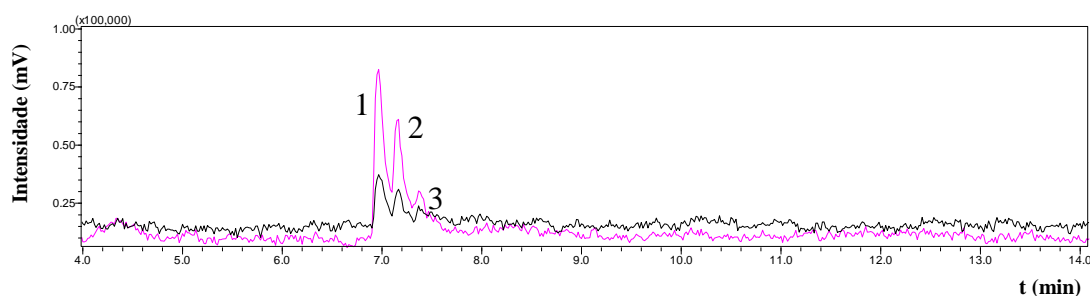
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES POR *HEADSPACE* (AUTOINJETOR)

4.1.1 Otimização do método

A fim de otimizar o procedimento de extração dos compostos voláteis das flores de soja da cultivar BRS 399 (roxa) foram iniciados os testes pelo método de *headspace*, com a variação do tempo de incubação do material vegetal (30 min e 60 min) e temperatura (50°C e 80°C). Desta forma, quatro condições foram propostas: uma primeira a 50°C por 30 min (condição A), uma segunda condição (B) a mesma temperatura (50°C) por 60 min, uma terceira a 80°C por 30 min (condição C) e a última, quarta condição (D) de 60 min a 80°C. Os cromatogramas apresentados na Figura 14 mostram as diferenças do perfil cromatográfico entre os tempos de incubação de 30 minutos (preto) e 60 min (rosa), a 50°C de temperatura. Com o aumento do tempo de incubação, observou-se uma melhora na intensidade dos picos entre os tempos de retenção de 6,9 e 7,3 min, com a separação e identificação de 3 compostos (três picos): 2-octen-1-ol, 3-octanona e 3-octanol. A identificação dos picos foi confirmada pelos dados espectrométricos, comparando os espectros de massas e a razão m/z (massa/carga) dos compostos obtidos com aqueles presentes na biblioteca NIST11 (*Mass Spectral Database*).

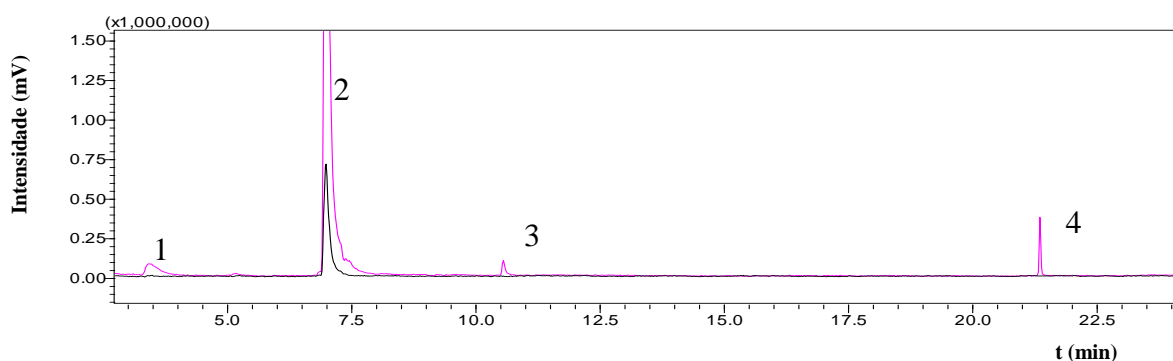
Figura 14. Perfis cromatográficos de flores de soja da cultivar BRS 399, com diferentes tempos de incubação no sistema *headspace* mantidas a temperatura de 50°C. Cromatograma 1 – em preto, tempo de 30 minutos de incubação. Cromatograma 2- em rosa, tempo de 60 minutos de incubação.



Na próxima etapa, variou-se o tempo de incubação do material vegetal com um aumento da temperatura. Os cromatogramas mostrados na

Figura 15 apresentam diferenças entre os tempos de incubação de 30 min (preto) e 60 min (em rosa), a 80°C, observa-se um aumento do pico 2 previamente identificado e também o aparecimento de três picos: 3,41 min, 10,55 min e 21,35 min, após a incubação por 60 min a 80°C.

Figura 15. Perfis cromatográficos de flores de soja da cultivar BRS 399 em diferentes tempos de incubação no sistema *headspace* mantidas a temperatura de 80°C. Cromatograma 1 – em preto, tempo de 30 minutos de incubação. Cromatograma 2- em rosa, tempo de 60 minutos de incubação.



A Figura 16 mostra a comparação dos cromatogramas obtidos com diferentes tempos de incubação (30 e 60 min) e temperaturas (50 e 80°C), observando-se um aumento de intensidade de sinal e de números de picos dependendo da condição analítica para os perfis cromatográficos. Independentemente do tempo de incubação, a 80°C a intensidade dos picos foram superiores ao sinal obtido a 50°C. Portanto, de acordo com as condições (A, B, C e D) aplicadas nas análises obteve-se uma variação do número e intensidade dos picos correspondentes aos compostos orgânicos voláteis apresentados na Tabela 4. O tempo de exposição das flores de soja na condição de incubação de *headspace* (60 min) aumentou a emissão de voláteis, confirmada pelo número de substâncias detectadas por CG-EM. No entanto, quando a temperatura aumentou (80°C), a volatilização de um maior número de compostos foi registrada no cromatograma. Assim, a condição do tempo de incubação do material vegetal por 60 minutos com a temperatura a 80°C foram selecionados para continuação dos ensaios.

Figura 16. Comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja da cultivar BRS 399, em diferentes condições. Cromatograma 1 – em preto, tempo de 30 minutos de incubação, a temperatura de 50°C. Cromatograma 2- em rosa, tempo de 60 minutos de incubação, a temperatura de 50°C. Cromatograma 3 – em azul, tempo de 30 minutos de incubação, a temperatura de 80°C. Cromatograma 4- em vermelho, tempo de 60 minutos de incubação, a temperatura de 80°C.

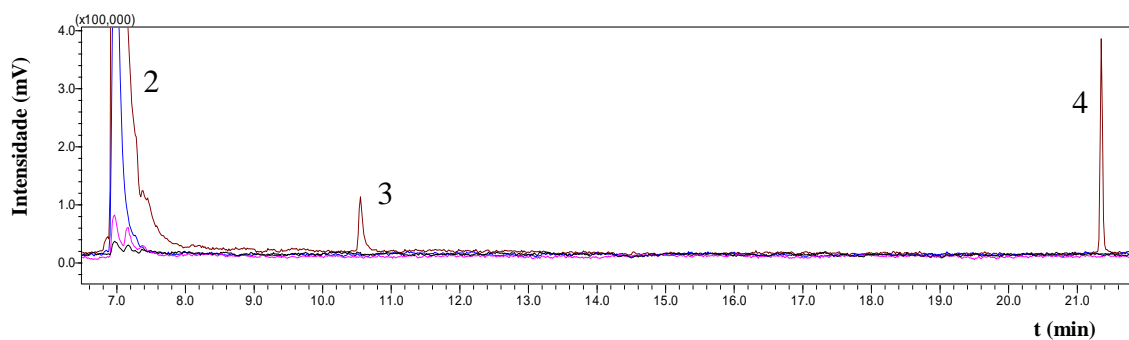


Tabela 4. Parâmetros para análise por *headspace*, tempo de retenção na coluna, área do pico e identificação de compostos florais de soja.

Condição	Picos	t_R (min) ¹	Área	Altura	Composto ²	P(%) ³	Fórmula	MM ⁴ (g mol ⁻¹)	m/z ⁵ em ordem decrescente de abundância relativa
A (50 °C / 30 min)	1	6,96	219816	26264	2-octen-1-ol, (E)	87	C ₈ H ₁₆ O	128	57-55-54-70
	2	7,16	129403	19910	3-octanona	91	C ₈ H ₁₆ O	128	57-72-71
B (50 °C / 30 min)	1	6,96	576920	76181	2-octen-1-ol, (E)	88	C ₈ H ₁₆ O	128	57-55-54-70
	2	7,15	409384	54719	3-octanona	95	C ₈ H ₁₆ O	128	57-72-71-99
	3	7,37	309366	23889	3-octanol	84	C ₈ H ₁₈ O	130	59-55-83-56
C (80 °C / 30 min)	1	6,97	6099838	711817	2-octen-1-ol, (E)	90	C ₈ H ₁₆ O	128	57-54-55-67
	1	3,41	1331589	71590	hexanal	88	C ₆ H ₁₂ O	100	56-57-55-85
D (80 °C / 60 min)	2	6,98	31370895	3442620	2-octen-1-ol, (E)	89	C ₈ H ₁₆ O	128	57-54-55-67
	3	10,55	408360	93213	nonanal	96	C ₉ H ₁₈ O	142	57-56-55-70
	4	21,35	609920	372405	heptadecano, 2,6,10,15-tetrametil	96	C ₂₁ H ₄₄	296	57-71-85-55

¹ tempo de retenção (min); ² base de dados NIST 11; ³ porcentagem de probabilidade pela biblioteca do massas; ⁴ MM – massa molar; ⁵ m/z – massa carga.

4.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA- SPME

4.2.1 Uso das fibras SPME em flores da cultivar BRS 399

Após a otimização das condições de análise por *headspace*, foi testado um segundo método de extração, por microextração em fase sólida (SPME), a fim de se obter a técnica e o método mais eficiente para identificação dos compostos voláteis das flores de soja. Devido à sensibilidade da técnica, utilizou-se apenas 1,00 g de massa de flores, a qual foi suficiente para as análises em SPME. A melhor condição utilizada no método para análise por *headspace* usando um autoinjeter foram: tempo de incubação de 60 min com temperatura a 80°C.

Com o objetivo de identificar as diferentes classes de compostos voláteis da flor de soja roxa (BRS 399), foram testadas neste trabalho três tipos de fibras diferentes de SPME: PDMS de 100 µm, PDMS/DVB de 65 µm e DVB/CAR/PDMS de 50/30 µm. As fibras apresentadas no estudo possuem dois tipos de polaridade: apolar (PDMS) e mista (PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS).

As Figuras 17 e 18 apresentam os cromatogramas obtidos por CG-EM com a fibra DVB/CAR/PDMS. A Tabela 5 mostra a identificação dos compostos encontrados nas flores de soja roxa, usando a fibra DVB/CAR/PDMS, bem como, informações estruturais de acordo com a literatura e a biblioteca NIST11 (*Mass Spectral Database*).

Figura 17. Perfil cromatográfico de flores de soja, da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, utilizando extração empregando a fibra DVB/CAR/PDMS.

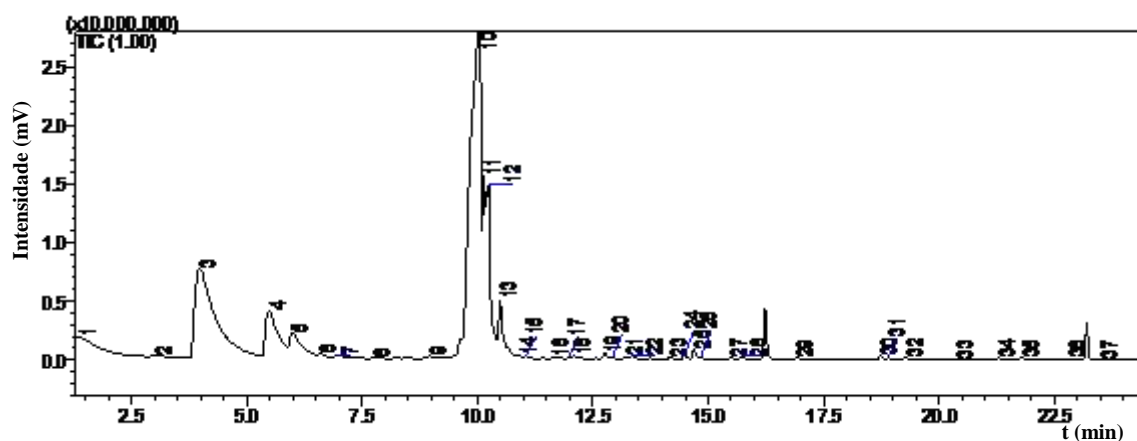


Figura 18. Ampliação do perfil cromatográfico de flores de soja (entre 8,0 a 24,0 min), da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, utilizando extração empregando a fibra DVB/CAR/PDMS.

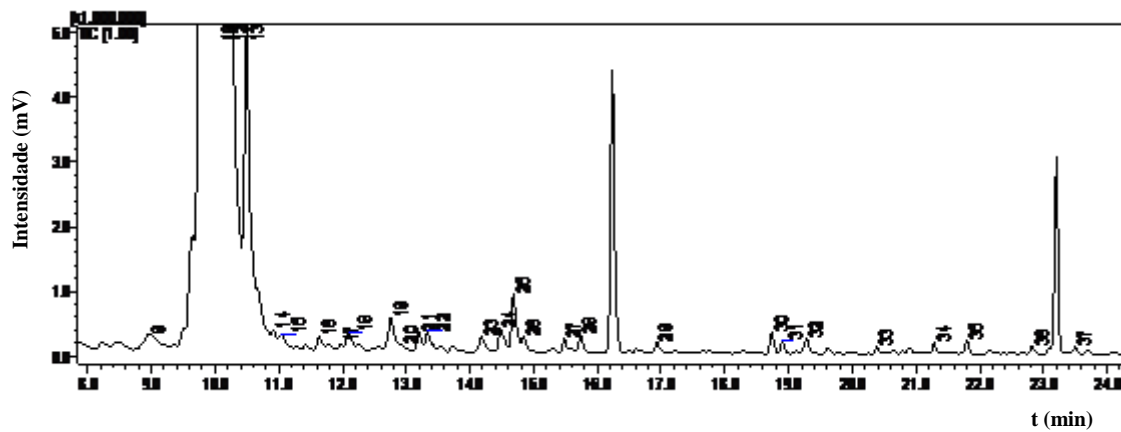


Tabela 5. Identificação de compostos nas flores de soja roxa (cultivar BRS 399) por extração da fibra DVB/CAR/PDMS (50/30 μm) pela técnica SPME.

Picos	t_R (min) ¹	Área	Composto ²	P(%) ³	Fórmula	MM ⁴ (g mol ⁻¹)	m/z ⁵ em ordem decrecente de abundância relativa	IKcal ⁶	IKlit ⁷
1	1,37	52651077	Furano, 2-etil	97	C ₆ H ₈ O	96	81-53-96-39	-	703
2	3,02	2454559	2-penteno-1-ol, (Z)	91	C ₅ H ₁₀ O	86	57-55-70-68	-	689
3	3,97	240423016	Hexanal	97	C ₆ H ₁₂ O	100	56-57-45-72	-	801
4	5,49	76513786	2-Hexenal	96	C ₆ H ₁₀ O	98	55-69-83-57	-	855
5	5,99	40248687	1-hexanol	97	C ₆ H ₁₄ O	102	56-55-69-57	-	870
6	6,60	4953396	Ciclo-hexanol, 4- (1- metiletil)	76	C ₉ H ₁₈ O	142	81-58-82-53	826	-
7	6,98	3664930	Heptanal	90	C ₇ H ₁₄ O	114	55-70-57-68	850	903
8	7,76	2088913	Ácido hexanóico, éster metílico	97	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	74-87-59-99	895	927
9	8,96	3862472	4-Benzoiloxi-1- morfolinociclohexeno	82	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287	77-106-105-51	943	-
10	10,06	470503749	2-Octen-1-ol, (E)	90	C ₈ H ₁₆ O	128	56-72-55-85	981	1060
11	10,14	54005974	3-Octanona	96	C ₈ H ₁₆ O	128	57-99-72-71	983	983
12	10,24	106427298	Furano, 2-pentil	97	C ₉ H ₁₄ O	138	81-82-53-138	987	988
13	10,50	44219742	3-octanal	90	C ₉ H ₁₂ O	136	68-107-79-136	995	982
14	10,92	241957	2,4-Heptadienal, (E, E)	93	C ₇ H ₁₀ O	110	81-53-110-67	1009	1007
15	11,04	465162	Ácido acético, éster hexílico	89	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	56-55-61-84	1013	1009
16	11,63	1216624	1,3-hexadieno, 3-etil-2- metil	90	C ₉ H ₁₆	124	67-95-124-55	1032	-
17	11,97	440489	3-Octen-2-one	88	C ₈ H ₁₄ O	126	55-111-97-69	1043	1030
18	12,10	1826442	Benzeneacetaldeído	81	C ₈ H ₈ O	120	91-92-120-81	1047	1052
19	12,76	3549591	2-Octenal, (E)	92	C ₈ H ₁₄ O	126	55-57-70-83	1067	1064
20	12,92	681143	Octano, 5-etil-2-metil	91	C ₁₁ H ₂₄	156	57-71-85-56	1072	-
21	13,20	1674342	3,5-Octadien-2-one	94	C ₈ H ₁₂ O	124	95-81-79-124	1080	-

(-) não encontrado; ¹ tempo de retenção (min); ² base de dados NIST 11; ³ porcentagem de probabilidade pela biblioteca do massas; ⁴ MM – massa molar; ⁵ m/z – massa carga; ⁶ índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ⁷ Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Picos	t _R (min) ¹	Área	Composto ²	P(%) ³	Fórmula	MM ⁴ (g mol ⁻¹)	m/z ⁵ em ordem decrecente de abundância relativa	IKcal ⁶	IKlit ⁷
22	13,33	1817377	1-Octanol	94	C ₈ H ₁₈ O	130	56-55-70-69	1083	998
23	14,17	1916028	1-Nonen-4-ol	82	C ₉ H ₁₈ O	142	55-83-95-45	1109	1109
24	14,48	2428063	Biciclo [3.1.1] heptano, 6,6-dimetil-2-metileno-, (1S) -	90	C ₁₇ H ₂₃ NO ₂	273	93-43-41-80	1122	1082
25	14,68	4957399	Nonanal	92	C ₉ H ₁₈ O	142	57-56-55-70	1129	1100
26	14,84	1500573	2,4-Octadienal, (E, E)	87	C ₈ H ₁₂ O	124	81-54-67-53	1135	1102
27	15,48	1022699	Ácido octanóico, éster metílico	96	C ₉ H ₁₈ O ₂	158	74-87-55-57	1159	1119
28	15,74	1455900	1-Undecene, 2-methyl	82	C ₁₂ H ₂₄	168	56-85-125-69	1168	-
29	16,93	882050	2-Nonenal, (Z)	90	C ₉ H ₁₆ O	140	55-70-83-57	1214	1149
30	18,73	1488277	Tridecano	96	C ₁₃ H ₂₈	184	57-71-85-56	1298	1300
31	18,90	862249	Decanal	94	C ₁₀ H ₂₀ O	156	57-55-56-82	1308	1201
32	19,28	1444511	4-t-Butil-2- (1-metil-2- nitroetil) ciclo-hexanona	81	C ₁₃ H ₂₃ NO ₃	241	57-41-55-83	1331	-
33	20,39	515156	Tetradecano	95	C ₁₄ H ₃₀	198	57-71-85-70	1394	1400
34	21,28	862203	2,4-Dimetildodecano	93	C ₁₄ H ₃₀	198	57-85-71-84	1454	-
35	21,80	951917	Pentadecano	94	C ₁₅ H ₃₂	212	57-71-85-55	1489	1500
36	22,82	558044	1-decanol, 2-hexil	91	C ₁₆ H ₃₄ O	242	57-69-85-71	1565	-
37	23,50	635099	2-isopropil-5-metil-1- heptanol	89	C ₁₁ H ₂₄ O	172	57-69-85-55	1618	-

(-) não encontrado; ¹ tempo de retenção (min); ² base de dados NIST 11; ³ porcentagem de probabilidade pela biblioteca do massas; ⁴ MM – massa molar; ⁵ m/z – massa carga; ⁶ índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ⁷ Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

A extração de compostos das flores do cultivar BRS 399, através da fibra DVB/CAR/PDMS, gerou um total de 37 compostos voláteis, obtendo-se uma alta similaridade, de acordo com a base de dados da biblioteca de massas (NIST 11). Além do tempo de retenção e a comparação de espectros de massas, a Tabela 5 apresenta os índices de retenção de Kovats (IK) calculados em comparação aos valores encontrados na literatura (Adams, 2007) como é o caso dos seguintes compostos: 3-octanona; furano, 2-pentil; 2,4-heptadienal, (E, E); ácido acético, éster hexílico; 2-octenal, (E); 1-nonen-4-ol, tridecano e tetradecano.

A importância do uso dos valores de IK acentua-se ainda mais neste estudo devido ao alto número de compostos encontrados, 37. Além disso, a utilização do IK aumenta a confiabilidade de identificação destes compostos.

As Figuras 19 e 20 apresentam os cromatogramas obtidos por CG-EM pela fibra PDMS/DVB. A Tabela 6 mostra a identificação dos compostos encontrados nas flores de soja roxa, usando a fibra PDMS/DVB, bem como, informações estruturais de acordo com a literatura e a biblioteca NIST11 (*Mass Spectral Database*).

Figura 19. Perfil cromatográfico de flores de soja, da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra PDMS/DVB.

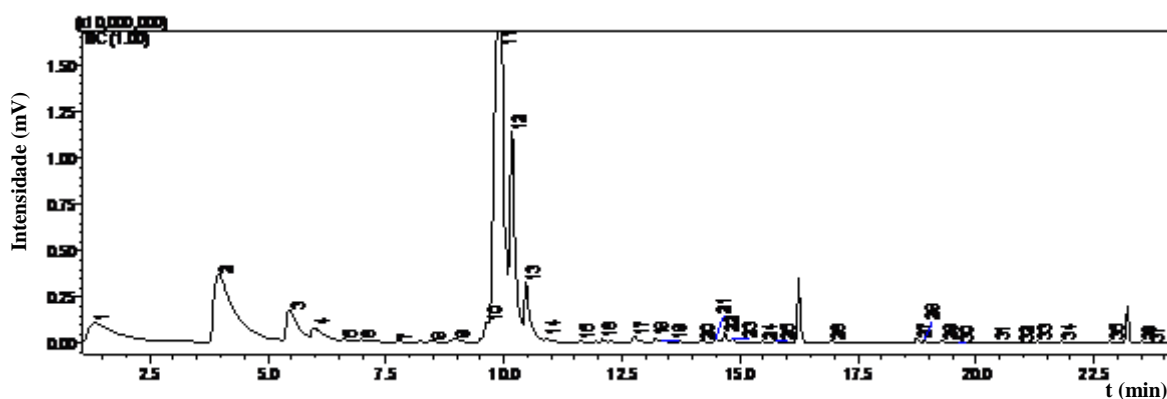


Figura 20. Ampliação do perfil cromatográfico de flores de soja (entre 9,0 a 27,0 min), da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra PDMS/DVB.

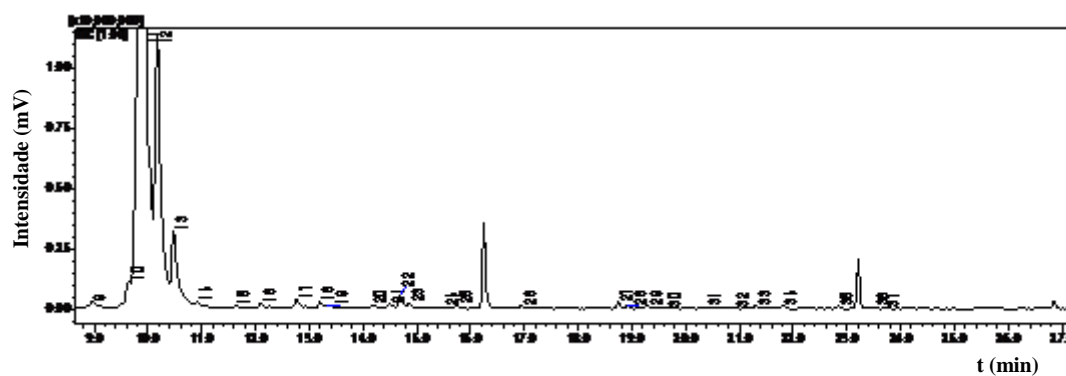


Tabela 6. Identificação de compostos nas flores de soja roxa (cultivar BRS 399) por extração da fibra PDMS/DVB (65 μ m) pela técnica SPME.

Picos	t_R (min) ¹	Área	Composto ²	P(%) ³	Fórmula	MM ⁴ (g mol ⁻¹)	m/z ⁵ em ordem decrecente de abundância relativa	IKcal ⁶	IKlit ⁷
1	1,33	34113030	Furano, 2-etil	97	C ₆ H ₈ O	96	81-96-53-82	-	703
2	3,97	114320693	Hexanal	98	C ₆ H ₁₂ O	100	56-57-45-72	-	801
3	5,48	30797810	2-Hexenal	97	C ₆ H ₁₀ O	98	55-69-83-57	-	855
4	5,98	14599204	1-hexanol	98	C ₆ H ₁₄ O	102	56-55-69-57	-	870
5	6,61	2279373	Furan 2-n-butilo	81	C ₈ H ₁₂ O	124	81-58-82-53	-	-
6	6,98	2222981	Heptanal	86	C ₇ H ₁₄ O	114	55-70-57-68	850	903
7	7,75	1013956	Ácido hexanóico, éster metílico	97	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	74-87-59-99	894	927
8	8,45	1224638	5-hexen-2-ona, 5-metil- 3-metileno	85	C ₈ H ₁₂ O	124	81-79-124-53	924	-
9	8,95	3052901	Benzaldeído	88	C ₇ H ₆ O	106	77-106-105-51	943	960
10	9,64	8417689	1-Octen-3-one	92	C ₈ H ₁₄ O	126	55-70-97-83	967	972
11	9,95	272889232	1-octen-3-ol	94	C ₈ H ₁₆ O	128	57-72-55-54	977	974
12	10,17	91614177	Furano, 2-pentil	98	C ₉ H ₁₄ O	138	81-82-53-138	984	988
13	10,47	30194737	3-octanal	90	C ₉ H ₁₂ O	136	68-79-107-136	994	982
14	10,91	599733	2,4-Heptadienal, (E, E)	94	C ₇ H ₁₀ O	110	81-53-110-79	1008	1007
15	11,63	611628	1,3-hexadieno, 3-etil-2- metil	91	C ₉ H ₁₆	124	67-95-124-55	1032	-
16	12,09	1322652	Benzeneacetaldéido	86	C ₈ H ₈ O	120	91-92-120-65	1047	1052
17	12,76	2331001	2-Octenal, (E)	93	C ₈ H ₁₄ O	126	55-57-70-83	1067	1064
18	13,20	1388384	3,5-Octadien-2-one	94	C ₈ H ₁₂ O	124	95-81-79-124	1080	-
19	13,33	732188	1-Octanol	92	C ₈ H ₁₈ O	130	56-55-70-69	1083	998
20	14,17	1261785	1-Nonen-4-ol	79	C ₁₀ H ₁₈ O	154	43-55-83-111	1109	1109
21	14,49	1424803	Biciclo [3.1.1] heptano, 6,6-dimetil-2-metileno-, (1S) -	91	C ₁₇ H ₂₃ NO ₂	273	93-55-71-69	1122	1082

(-) não encontrado; ¹ tempo de retenção (min); ² base de dados NIST 11; ³ porcentagem de probabilidade pela biblioteca do massas; ⁴ MM – massa molar; ⁵ m/z – massa carga; ⁶ índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ⁷ Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Picos	t _R (min) ¹	Área	Composto ²	P(%) ³	Fórmula	MM ⁴ (g mol ⁻¹)	m/z ⁵ em ordem decrecente de abundância relativa	IKcal ⁶	IKlit ⁷
22	14,69	2902102	Nonanal	88	C ₉ H ₁₈ O	142	57-56-55-70	1129	1100
23	14,85	1195239	2,4-Octadienal, (E, E)	92	C ₈ H ₁₂ O	124	81-54-67-53	1136	1102
24	15,49	371994	Ácido octanóico, éster metílico	95	C ₉ H ₁₈ O ₂	158	74-87-55-57	1159	1119
25	15,74	946478	Nonano, 2,8-dimetil-4-metileno	81	C ₁₂ H ₂₄	168	56-85-125-69	1169	-
26	16,94	693835	2-Nonenal, (Z)	91	C ₉ H ₁₆ O	140	55-70-83-57	1215	1149
27	18,74	1267029	Tridecano	96	C ₁₂ H ₂₆	170	57-71-85-56	1299	1300
28	18,91	634465	Decanal	94	C ₁₀ H ₂₀ O	156	57-55-56-82	1306	1201
29	19,29	1134519	4-t-Butil-2- (1-metil-2-nitroetil) ciclo-hexanona	80	C ₁₁ H ₂₀	152	57-71-81-137	1331	-
30	19,63	398350	Dodecano, 4-metil	91	C ₁₃ H ₂₈	184	57-71-85-70	1337	-
31	20,40	431212	Tetradecano	96	C ₁₄ H ₃₀	198	57-71-85-70	1394	1400
32	20,91	381787	Dodecano, 4,6-dimetil	93	C ₁₄ H ₃₀	198	57-71-85-56	1429	-
33	21,29	563661	2,4-Dimetildodecano	93	C ₁₃ H ₂₈	184	57-85-71-84	1455	-
34	21,81	791258	Pentadecano	94	C ₁₅ H ₃₂	212	57-71-85-55	1490	1500
35	22,83	453690	1-decanol, 2-hexil	92	C ₁₆ H ₃₄ O	242	57-69-71-85	1566	-
36	23,51	597134	2-isopropil-5-metil-1-heptanol	88	C ₁₁ H ₂₄ O	172	57-69-85-55	1619	-
37	23,70	377500	Heptadecano	94	C ₁₇ H ₃₆	240	57-71-85-55	1635	1700

(-) não encontrado; ¹ tempo de retenção (min); ² base de dados NIST 11; ³ porcentagem de probabilidade pela biblioteca do massas; ⁴ MM – massa molar; ⁵ m/z – massa carga; ⁶ índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ⁷ índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Com a extração de compostos voláteis usando a fibra PDMS/DVB, na cultivar BRS 399, obteve-se um total de 37 compostos voláteis, obtendo-se uma alta similaridade, de acordo com a base de dados da biblioteca de massas (NIST 11). Além do tempo de retenção e a comparação de espectros de massas, a Tabela 6 apresenta os índices de retenção de Kovats (IK) calculados em comparação aos valores encontrados na literatura (Adams, 2007) como é o caso dos seguintes compostos: 1-octen-3-ol; furano, 2-pentil; 2,4-heptadienal, (E, E); 2-octenal, (E); 1-nonen-4-ol; tridecano; tetradecano e pentadecano.

Já os cromatogramas obtidos por CG-EM para a extração de compostos voláteis das flores de soja, usando a fibra PDMS, são apresentados nas Figuras 21 e 22. A Tabela 7 mostra a identificação dos compostos encontrados nas flores de soja roxa, usando a fibra PDMS, bem como, informações estruturais de acordo com a literatura e a biblioteca NIST11 (*Mass Spectral Database*).

Figura 21. Perfil cromatográfico de flores de soja, da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra PDMS.

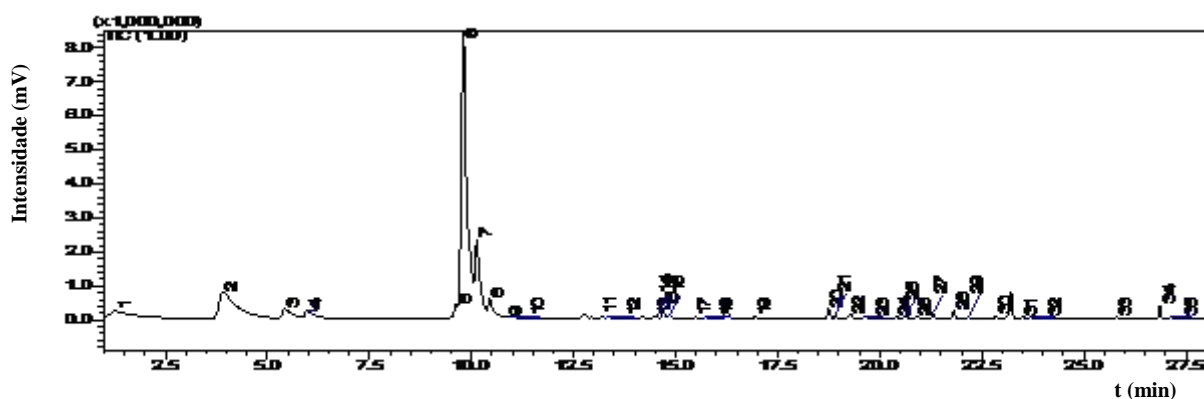


Figura 22. Ampliação do perfil cromatográfico de flores de soja (entre 9,0 a 27,5 min), da cultivar BRS 399, obtido por CG-EM, por extração da fibra PDMS.

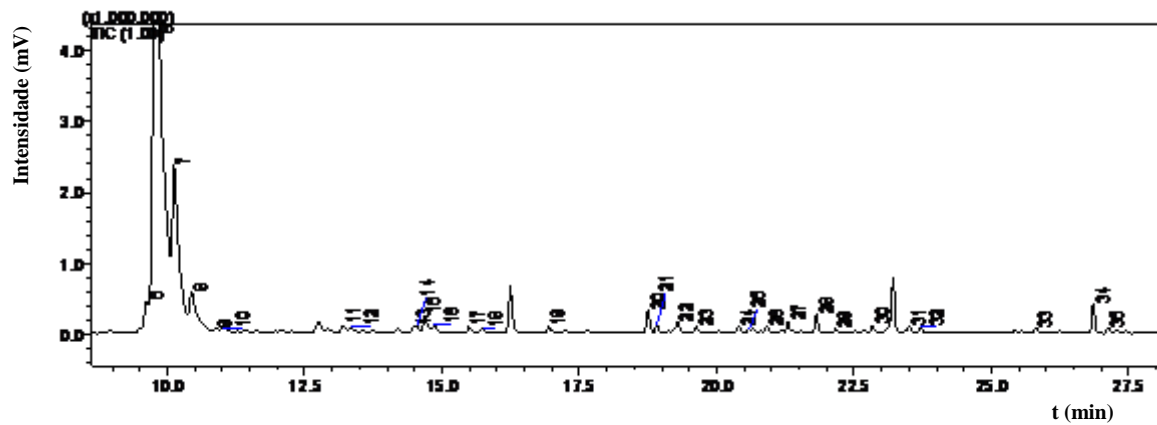


Tabela 7. Identificação de compostos nas flores de soja roxa (cultivar BRS 399) por extração da fibra PDMS (100 µm) pela técnica SPME.

Picos	t_R (min) ¹	Área	Composto ²	P(%) ³	Fórmula	MM ⁴ (g mol ⁻¹)	m/z ⁵ em ordem decrecente de abundância relativa	IKcal ⁶	IKlit ⁷
1	1,28	4165002	Furano, 2-etil	96	C ₆ H ₈ O	96	81-96-53-82	-	703
2	3,92	24733895	Hexanal	98	C ₆ H ₁₂ O	100	56-57-45-72	-	801
3	5,42	5128682	2-Hexenal, (E)	97	C ₆ H ₁₀ O	98	55-69-83-57	-	855
4	5,97	4016348	1-hexanol	97	C ₆ H ₁₄ O	102	56-55-69-57	-	870
5	9,62	2668011	1-Octen-3-one	93	C ₈ H ₁₄ O	126	55-70-97-83	966	972
6	9,80	81847920	1-octen-3-ol	98	C ₈ H ₁₆ O	128	57-72-55-54	972	974
7	10,12	20980127	Furano, 2-pentil	97	C ₉ H ₁₄ O	138	81-82-53-138	983	988
8	10,44	6180376	3-octanal	89	C ₉ H ₁₂ O	136	68-79-107-136	993	982
9	10,88	392502	2,4-Heptadienal, (E, E)	91	C ₇ H ₁₀ O	110	81-53-79-110	1007	1007
10	11,03	677518	Ácido acético, éster hexílico	81	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	56-57-55-84	1012	1009
11	13,20	661817	3,5-Octadien-2-one, (E, E)	94	C ₈ H ₁₂ O	124	95-81-79-124	1080	-
12	13,33	536137	1-Octanol	94	C ₈ H ₁₈ O	130	56-55-70-69	1083	998
13	14,49	454190	Biciclo [3.1.1] heptano, 6,6-dimetil-2-metileno-, (1S) -	90	C ₁₀ H ₁₆	136	93-91-69-80	1122	1082
14	14,54	404877	Undecano, 4,7-dimetil	93	C ₁₃ H ₂₈	184	57-71-85-84	1124	-
15	14,69	1401922	Nonanal	87	C ₉ H ₁₈ O	142	57-56-55	1129	1100
16	14,85	680065	2,4-Octadienal, (E, E)	87	C ₈ H ₁₄	110	81-54-67-99	1136	1102
17	15,49	427165	Ácido octanóico, éster metílico	96	C ₉ H ₁₈ O ₂	158	74-87-43-41	1160	1119
18	15,74	469079	1-Undeceno, 2-methyl	81	C ₁₂ H ₂₄	168	56-85-125-57	1169	-
19	16,94	465454	2-Nonenal, (Z)	91	C ₉ H ₁₆ O	140	55-70-83-57	1215	1149
20	18,75	1453540	Tridecano	96	C ₁₃ H ₂₈	184	57-71-85-56	1299	1300
21	18,91	506434	Decanal	94	C ₁₀ H ₂₀ O	156	41-43-57-29	1309	1201
22	19,29	1052227	4-t-Butil-2- (1-metil-2-nitroetil) ciclo-hexanona	81	C ₁₃ H ₂₃ NO ₃	241	57-41-55-83	1331	-
23	19,63	391191	Dodecano, 4-metil-	93	C ₁₃ H ₂₈	184	57-71-85-70	1351	-
24	20,40	485513	Tetradecano	97	C ₁₄ H ₃₀	198	57-71-85-70	1395	1400

(-) não encontrado; ¹ tempo de retenção (min); ² base de dados NIST 11; ³ porcentagem de probabilidade pela biblioteca do massas; ⁴ MM – massa molar; ⁵ m/z – massa carga; ⁶ índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ⁷ Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Picos	t_R (min) ¹	Área	Composto ²	P(%) ³	Fórmula	MM ⁴ (g mol ⁻¹)	m/z ⁵ em ordem decrecente de abundância relativa	IKcal ⁶	IKlit ⁷
25	20,59	278425	Benzeno, 1,3-bis (1,1-dimetiletil)	85	C ₁₄ H ₂₂	190	175-57-190-176	1407	-
26	20,91	452339	Dodecano, 4,6-dimetil	95	C ₁₅ H ₃₂	212	57-71-85-56	1429	-
27	21,30	836664	2,4-Dimetildodecano	94	C ₁₄ H ₃₀	198	57-85-71-84	1455	-
28	21,81	1079478	Pentadecano	94	C ₁₅ H ₃₂	212	57-71-85-55	1490	1500
29	22,17	303351	Nonadecano	93	C ₁₉ H ₄₀	268	57-71-85-84	1516	-
30	22,84	534318	1-decanol, 2-hexil	91	C ₁₆ H ₃₄ O	242	57-69-71-85	1567	-
31	23,51	615231	2-isopropil-5-metil-1-heptanol	89	C ₁₁ H ₂₄ O	172	57-69-85-55	1619	-
32	23,71	415275	Heptadecano	93	C ₁₇ H ₃₆	240	57-71-85-55	1636	1700
33	25,81	408788	3-ciclohexeno-1-carboxaldeído, 1,3,4-trimetil	85	C ₁₀ H ₁₆ O	152	95-67-81-109	1802	-
34	27,13	382995	Dodecanal	95	C ₁₂ H ₂₄ O	184	57-55-82-56	1928	-
35	29,18	401911	Pentadecano, 7-metil	94	C ₁₆ H ₃₄	226	57-71-85-55	2083	-

(-) não encontrado; ¹ tempo de retenção (min); ² base de dados NIST 11; ³ porcentagem de probabilidade pela biblioteca de massas; ⁴ MM – massa molar; ⁵ m/z – massa carga; ⁶ índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ⁷ Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Para a extração de compostos voláteis da cultivar BRS 399, usando a fibra PDMS, foram obtidos um total de 35 compostos voláteis, obtendo-se uma alta similaridade, de acordo com a base de dados da biblioteca de massas (NIST 11). Além do tempo de retenção e a comparação de espectros de massas, a Tabela 7 apresenta os índices de retenção de Kovats (IK) calculados em comparação aos valores encontrados na literatura (Adams, 2007) como é o caso dos seguintes compostos: 1-octen-3-ol; furano, 2-pentil; 2,4-heptadienal, (E, E); 2-octenal, (E); Ácido acético, éster hexílico; tridecano; tetradecano e pentadecano.

Para a comparação da eficiência da extração usando as fibras estudadas, as Figuras 23 e 24 apresentam os perfis cromatográficos, obtidos por CG-EM, com os três tipos de fibras (DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB e PDMS). E na Tabela 8 apresenta-se uma comparação dos compostos identificados pelas análises com os três diferentes tipos de fibras por SPME, como também, os valores calculados dos índices de retenção de Kovats (IK) em relação à literatura.

Figura 23. Comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja, da cultivar BRS 399, com diferentes fibras. Cromatograma 1 – em preto, fibra DVB/CAR/PDMS. Cromatograma 2- em rosa, fibra PDMS/DVB. Cromatograma 3 – em azul, fibra PDMS.

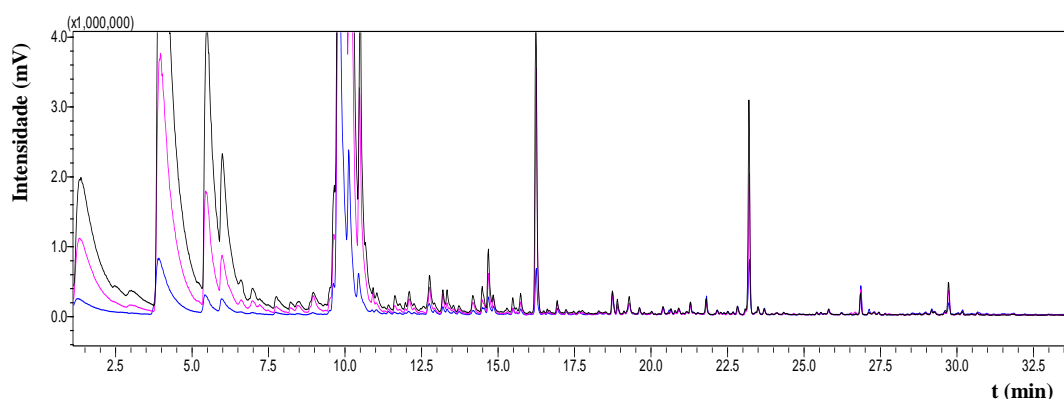


Figura 24. Ampliação da comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja, da cultivar BRS 399, com diferentes fibras. Cromatograma 1 – em preto, fibra DVB/CAR/PDMS. Cromatograma 2- em rosa, fibra PDMS/DVB. Cromatograma 3 – em azul, fibra PDMS.

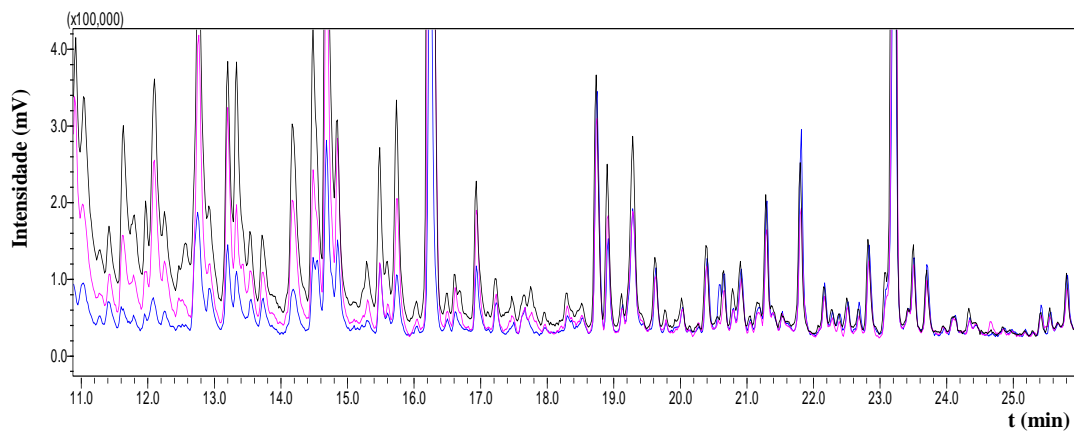


Tabela 8. Identificação de compostos das flores de soja roxa, cultivar BRS 399, usando as fibras DVB/CARPDMS, PDMS/DVB e PDMS.

Pico	t _R (min) ¹	Composto	Fibras			Identificação	
			DVB/CAR/PDMS	PDMS/DVB	PDMS	IKcal ²	IKlit ³
1	1,37	Furano, 2-etil	x	x	x	-	703
2	3,02	2-penteno-1-ol, (Z)	x	-	-	-	689
3	3,97	Hexanal	x	x	x	-	801
4	5,49	2-Hexenal	x	x	x	-	855
5	5,99	1-hexanol	x	x	x	-	870
6	6,60	Ciclo-hexanol, 4- (1-metiletil)	x	-	-	826	-
7	6,61	Furan 2-n-butilo	-	x	-	-	-
8	6,98	Heptanal	x	x	-	850	903
9	7,76	Ácido hexanóico, éster metílico	x	x	-	895	927
10	8,45	5-hexen-2-ona, 5-metil-3-metileno	-	x	-	924	-
11	8,96	4-Benzoiloxi-1-morfolinociclohexeno	x	-	-	943	-
12	8,95	Benzaldeído	-	x	-	943	960
13	9,64	1-Octen-3-one	-	x	x	967	972
14	9,95	1-octen-3-ol	-	x	x	977	974
15	10,06	2-Octen-1-ol, (E)	x	-	-	981	1060
16	10,14	3-Octanona	x	-	-	983	983
17	10,24	Furano, 2-pentil	x	x	x	987	988
18	10,50	trans-2- (2-pentenil) furano	x	x	x	995	-
19	10,92	2,4-Heptadienal, (E, E)	x	x	x	1009	1007

(x) detectado/identificado; (-) não detectado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ³Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Pico	t _R (min) ¹	Composto	Fibras			Identificação	
			DVB/CAR/PDMS	PDMS/DVB	PDMS	IKcal ²	IKlit ³
20	11,04	Ácido acético, éster hexílico	x	-	x	1013	1009
21	11,63	1,3-hexadieno, 3-etil-2-metil	x	x	-	1032	-
22	11,97	3-Octen-2-one	x	-	-	1043	1030
23	12,10	Benzeneacetaldeído	x	x	-	1047	1052
24	12,76	2-Octenal, (E)	x	x	-	1067	1064
25	12,92	Octano, 5-etil-2-metil	x	-	-	1072	-
26	13,20	3,5-Octadien-2-one	x	x	x	1080	-
27	13,33	1-Octanol	x	x	x	1083	998
28	14,17	1-Nonen-4-ol	x	x	-	1109	1109
29	14,48	Biciclo [3.1.1] heptano, 6,6-dimetil-2-metileno-, (1S) -	x	x	x	1122	1082
30	14,54	Undecane, 4,7-dimetil	-	-	x	1124	-
31	14,68	Nonanal	x	x	x	1129	1100
32	14,84	2,4-Octadienal, (E, E)	x	x	x	1135	1102
33	15,48	Ácido octanóico, éster metílico	x	x	x	1159	1119
34	15,74	1-Undecene, 2-methyl	x	-	x	1168	-
35	15,74	Nonano, 2,8-dimetil-4-metileno	-	x	-	1169	-
36	16,93	2-Nonenal, (Z)	x	x	x	1214	1149
37	18,73	Tridecano	x	x	x	1298	1300
38	18,90	Decanal	x	x	x	1308	1201
39	19,29	4-t-Butil-2- (1-metil-2-nitroetil) ciclo-hexanona	x	x	x	1331	-

(x) detectado/identificado; (-) não detectado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ³ Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Pico	t _R (min) ¹	Composto	Fibras			Identificação	
			DVB/CAR/PDMS	PDMS/DVB	PDMS	IKcal ²	IKlit ³
40	19,63	Dodecano, 4-metil	-	x	x	1429	-
41	20,39	Tetradecano	x	x	x	1394	1400
42	20,59	Benzeno, 1,3-bis (1,1-dimetiletil)	-	-	x	1407	-
43	20,91	Dodecano, 4,6-dimetil	-	x	x	1429	-
44	21,28	2,4-Dimetildodecano	x	x	x	1454	-
45	21,80	Pentadecano	x	x	x	1489	1500
46	22,17	Nonadecano	-	-	x	1516	-
47	22,82	1-decanol, 2-hexil	x	x	x	1565	-
48	23,50	2-isopropil-5-metil-1-heptanol	x	x	x	1618	-
49	23,70	Heptadecano	-	x	x	1635	1700
50	25,81	3-ciclohexeno-1-carboxaldeído, 1,3,4-trimetil	-	-	x	1802	-
51	27,13	Dodecanal	-	-	x	1928	-
52	29,18	Pentadecano, 7-metil	-	-	x	2083	-
Total de compostos			37	37	35		

(x) detectado/identificado; (-) não detectado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ³ Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Através das análises por SPME, utilizando três tipos de fibras (DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB e PDMS) foram identificados um total de 52 compostos voláteis para a flor de soja roxa (BRS 399).

As fibras DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB obtiveram o mesmo número de compostos extraídos (37 compostos). Embora os resultados tenham apresentados compostos exclusivos para cada tipo de fibra (como exemplo, 2-penteno-1-ol, (Z) - DVB/CAR/PDMS e furan 2-n-butilo - PDMS/DVB), em sua grande maioria as fibras extraíram compostos similares, como: furano, 2-etil, hexanal, heptanal, benzeneacetaldeído, entre outros. Essa similaridade de ambas as fibras deve-se a mesma polaridade apresentada (mista), como também, o mesmo tipo de interação de adsorção.

Além disso, estas fibras (DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB) obtiveram um número maior de compostos extraídos em relação à fibra PDMS, 35 compostos, isto se deve, possivelmente, ao fato de as fibras porosas (fase heterogênea - DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB) serem mais abrangentes do que as fibras homogêneas PDMS, apesar das fibras heterogêneas apresentarem competição entre os analitos devido ao número limitado de sítios de adsorção, ou seja, analitos com maior afinidade pela fibra podem substituir os de menor afinidade.

Observa-se também que na análise com a fibra PDMS foram identificados 6 compostos que só foram extraídos por esta fase estacionária: undecano,4,7-dimetil, benzeno, 1,3-bis(1,1-dimetiletil), nonadecano, 3-ciclohexeno-1-carboxaldeído, 1,3,4-trimetil,dodecanal e pentadecano,7-metil, todos com alta correlação com o IK. Já na análise com a fibra DVB/CAR/PDMS, observou-se que 6 compostos foram extraídos unicamente por esta fase: 2-penteno-1-ol, (Z),ciclo-hexanol, 4-(1-metiletil), 4-benzoiloxi-1-morfolinociclohexeno, 2-octen-1-ol, (E), 3-octanona, 3-octen-2-one, octano, 5-etil-2-metil. E usando a fibra PDMS/DVB, 3 compostos foram extraídos exclusivamente por esta fase: furan 2-n-butilo, 5-hexen-2-ona, 5-metil-3-metileno, nonano, 2,8-dimetil-4-metileno. Além disso, 23 compostos foram comuns aos 3 tipos de fibras utilizados, sendo em sua maioria compostos que obtiveram valores de IK próximos aos encontrados da literatura (Adams, 2007):

furano, 2-pentil, 2,4-heptadienal, (E, E), 1-nonen-4-ol, tridecano, tetradecano, pentadecano.

De acordo com a Tabela 1 (compostos voláteis encontrados na soja) foram encontrados 20 compostos em flores de soja roxa, BRS 399, já identificados em semente, óleo e folhas de soja, sendo estes: furano, 2-etil, hexanal, 2-hexenal, 1-hexanol, heptanal, benzaldeído, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-ona, 3-octanona, furano, 2-pentil, 2,4-heptadienal (E,E), 3-octen-2-ona, benzenoacetaldeído, 2-octenal, (E), 3,5-octadien-2-ona, 1-octanol, 1-nonen-4-ol, nonanal, 2,4-octadienal, (E,E) e 2-nonenal, (Z).

4.2.2 Uso das fibras SPME em flores da cultivar DONMARIO 6563

Com o objetivo de identificar as diferentes classes de compostos voláteis presentes nas flores de soja branca (DONMARIO 6563), foram testadas para este genótipo dois tipos de fibras diferentes de SPME: PDMS/DVB de 65 μm e DVB/CAR/PDMS de 50/30 μm .

As Figuras 25 e 26 apresentam os perfis cromatográficos, a fim de comparar a eficiência da extração usando os dois tipos de fibras (DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB), analisadas por CG-EM. A Tabela 9 apresenta uma comparação dos compostos identificados pelas análises com os dois diferentes tipos de fibras por SPME.

Figura 25. Comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja, da cultivar DONMARIO 6563, em diferentes fibras. Cromatograma 1 – em preto, fibra DVB/CAR/PDMS. Cromatograma 2- em rosa, fibra PDMS/DVB.

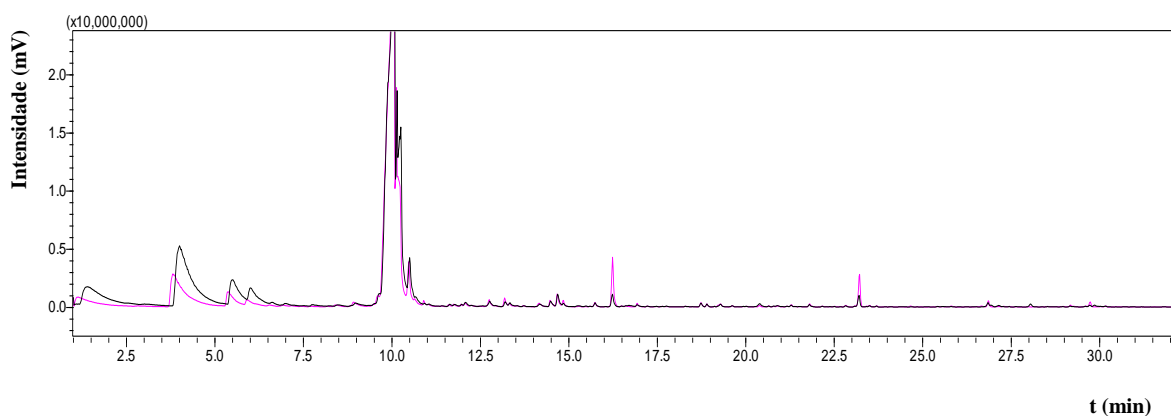


Figura 26. Ampliação da comparação dos perfis cromatográficos de flores de soja (entre 10,0 a 23,0min), da cultivar DONMARIO 6563, em diferentes fibras. Cromatograma 1 – em preto, fibra DVB/CAR/PDMS. Cromatograma 2- em rosa, fibra PDMS/DVB.

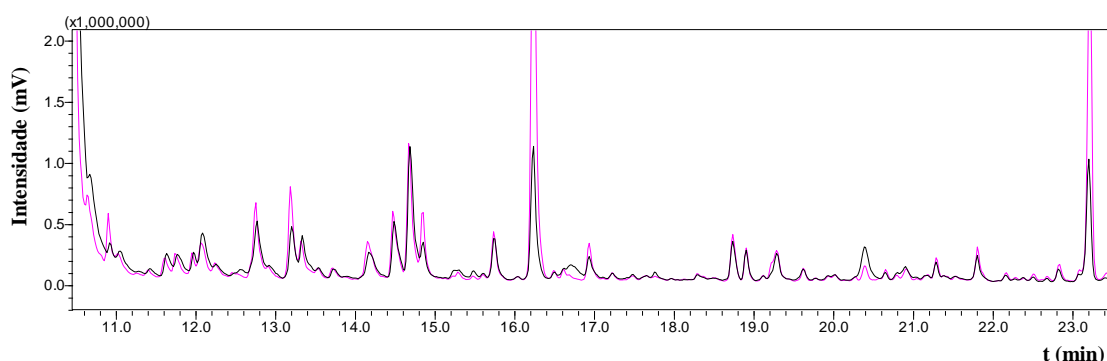


Tabela 9. Identificação de compostos das flores de soja branca, cultivar DONMARIO 6563, usando as fibras DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB.

Pico	t_R (min) ¹	Composto	Fibras		Identificação	
			DVB/CAR/PDMS	PDMS/DVB	IKcal ²	IKlit ³
1	1,41	Furano, 2-etil	x	x	-	702
2	4,00	Hexanal	x	x	-	801
3	5,50	2-Hexenal, (E)	x	x	-	-
4	6,00	1-hexanol	x	x	-	797
5	6,63	Furan 2-n-butilo	x	x	826	-
6	7,00	Heptanal	x	x	848	901
7	7,16	2,4-Hexadienal, (E, E)	-	x	858	907
8	7,76	Ácido hexanóico, éster metílico	x	-	894	921
9	8,50	Ciclohexanona, 3-etenil	x	x	923	945
10	8,97	Benzaldeído	x	x	940	952
11	9,38	4-penteno-1-ol, 2-metileno	x	-	954	-
12	9,61	1-decen-3-one	-	x	963	-
13	10,07	2-Octen-1-ol, (E)	x	-	979	972
14	10,25	Furano, 2-pentil	x	x	985	984
15	10,50	3-octanal	x	x	994	-
16	10,67	Octanal	x	x	1000	998
17	10,92	2,4-Heptadienal, (E, E)	x	-	1008	1005
18	11,04	Ácido acético, éster hexílico	x	x	1011	1007
19	11,40	Octano, 3,3-dimetil	-	x	1022	930
20	11,63	1,3-hexadieno, 3-etil-2-metil	x	x	1030	-
21	11,77	Álcool benzílico	x	x	1034	1026
22	11,97	3-Octen-2-one	x	x	1040	1030
23	12,08	3-ciclohexen-1-ona, 3,5,5-trimetil	x	x	1043	1046

(x) detectado/identificado; (-) não detectado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ³ Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Pico	t _R (min) ¹	Composto	Fibras		Identificação	
			DVB/CAR/PDMS	PDMS/DVB	IKcal ²	IKlit ³
24	12,25	2-Octen-1-ol, (Z)	x	x	1048	1060
25	12,76	2-Octenal, (E)	x	x	1064	1064
26	12,90	Dodecano, 4,6-dimetil	-	x	1068	-
27	12,92	Nonano, 5- (2-metilpropil)	x	-	1069	-
28	13,20	3,5-Octadien-2-ona, (E,E)	x	x	1077	-
29	13,33	1-Octanol	x	x	1082	998
30	13,54	Ciclopropano, 1- (2-metilbutil) -1- (1-metilpropil)	x	x	1088	-
31	13,72	1-Octanol, 2-butil	x	x	1093	-
32	14,17	Biciclo [3.1.1] heptano, 2,6,6-trimetil	x	-	1109	982
33	14,49	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil-, 2-aminobenzoato	x	x	1120	2217
34	14,69	Nonanal	x	x	1128	1100
35	14,85	2,4-Octadienal, (E, E)	x	x	1134	1102
36	15,29	Furano, 3-pentil	x	-	1150	-
37	15,74	Nonano, 2,8-dimetil-4-metileno	x	x	1167	-
38	16,49	1-ciclohexeno-1-acetaldeído, a, 2-dimetil	-	x	1194	-
39	16,61	2,6-Nonadienal, (E, Z)	-	x	1199	1150
40	16,93	2-Nonenal, (E)	x	x	1214	1157
41	18,73	Dodecano	x	x	1298	1200
42	18,90	Decanal	x	x	1308	1201
43	19,29	5-t-butil-ciclohepteno	x	x	1330	-
44	19,62	Dodecano, 4-metil	x	x	1349	-
45	20,39	Tetradecano	x	x	1394	1400
46	20,90	Dodecano, 2,6,10-trimetil	x	x	1427	-
47	21,28	Undecano, 2,4-dimetil	x	x	1453	-
48	21,80	Heptadecano	x	-	1489	-
49	22,82	1-decanol, 2-hexil	x	x	1565	-
50	23,42	2,4-decadienal	-	x	1611	-
51	23,49	2-isopropil-5-metil-1-heptanol	x	x	1617	-
52	23,70	Hexadecano	-	x	1634	1600
53	25,81	3-ciclohexeno-1-carboxaldeído, 1,3,4-trimetil	-	x	1803	-
54	26,84	Tridecano	x	-	1905	-
55	28,04	Fenol, 3,5-bis (1,1-dimetiletil)	x	-	2002	-
56	29,16	Heptadecano, 2,6,10,15-tetrametil	x	x	2082	-
57	38,28	2-Pentadecanona, 6,10,14-trimetil	-	x	2490	-
Total de compostos			47	47		

(x) detectado/identificado; (-) não detectado; ¹ tempo de retenção (min); ² Índice de retenção de Kovats calculado de acordo com a série de *n*-alcanos; ³ Índice de Kovats na literatura (ADAMS, 2007).

Através das análises por SPME, utilizando dois tipos de fibras (DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB) foram identificados um total de 57 compostos voláteis para a flor de soja branca (DONMARIO 6563).

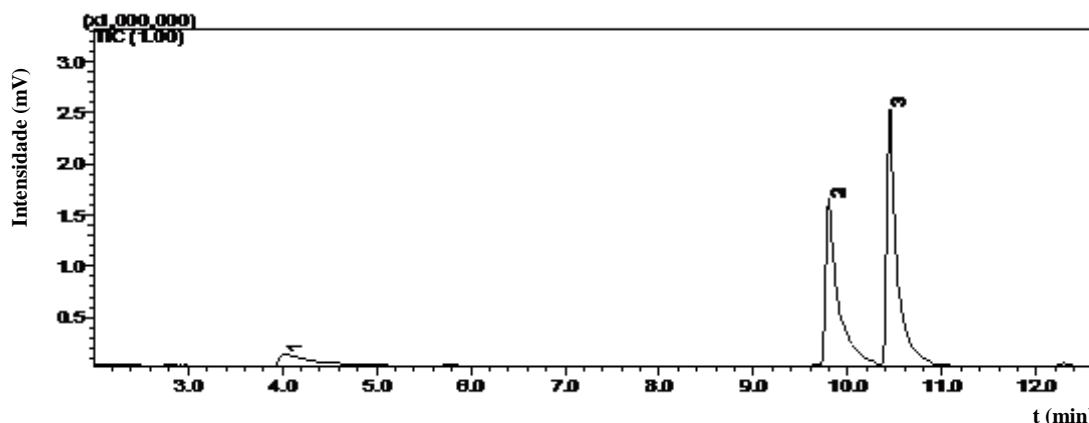
As fibras DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB obtiveram o mesmo número de compostos extraídos por suas fibras (47 compostos). Embora os resultados tenham apresentados compostos exclusivos para cada tipo de fibra, como exemplo: ácido hexanóico, éster metílico para DVB/CAR/PDMS e octano, 3,3 dimetil para PDMS/DVB. Em grande maioria as fibras extraíram compostos similares, como: furano, 2-etil, hexanal, heptanal, benzaldeído, entre outros. Essa similaridade de ambas as fibras deve-se a mesma polaridade apresentada (mista), como também, o mesmo tipo de interação de adsorção.

De acordo com a Tabela 1 (compostos voláteis encontrados na soja) foram encontrados 19 compostos na flor branca, DONMARIO 6563, já identificados em semente, óleo e folhas de soja, sendo estes: furano, 2-etil, hexanal, 2-hexenal, 1-hexanol, heptanal, benzaldeído, 3-Octen-2-one, Furano, 2-pentil, 2,4-Heptadienal,(E, E), 3-Octen-2-ona, 2-Octenal,(E), 3,5-Octadien-2-ona, octanal, nonanal, 2,4-Octadienal,(E, E), 2-Nonenal, (Z), 2,6-Nonadienal, (E, Z), 2-Nonenal, (E) e 2,4-decadienal.

4.2.3 Identificação dos compostos das flores de soja usando uma mistura de padrões

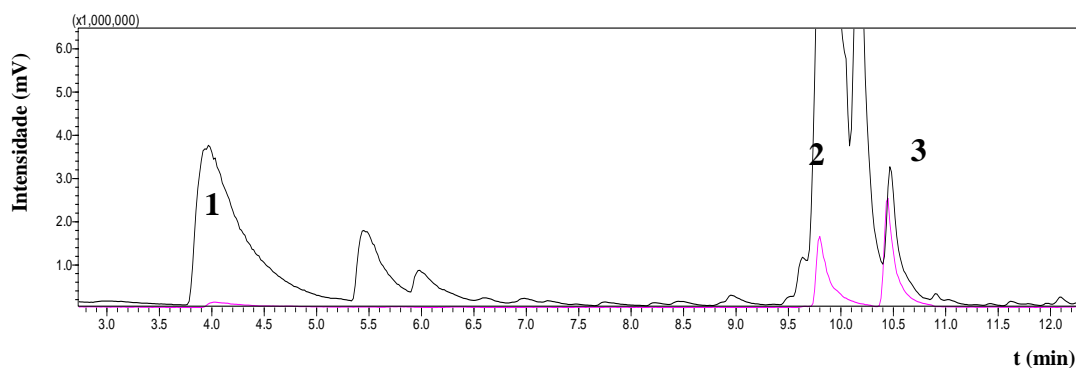
Para confirmação dos compostos voláteis identificados nas flores de soja foi realizada uma análise com uma mistura de padrões na concentração de $2,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ contendo: hexanal, 1-octen-3-ol e 3-octanal. O teste foi realizado com a fibra PDMS/DVB, na mesma temperatura de incubação $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ com 60 min de tempo de incubação, com volume de $80 \mu\text{L}$ e adsorção de 10 min. Na Figura 27 apresenta-se o cromatograma obtido com essa amostra de padrões.

Figura 27. Perfil cromatográfico da mistura de padrões, obtido por CG-EM, em fibra PDMS/DVB.



A Figura 28 mostra a comparação do perfil cromatográfico entre a amostra com mistura de padrões e os metabólitos extraídos da flor roxa (BRS 399) usando a fibra PDMS/DVB. Os picos apresentam tempo de retenção semelhante e a mesma m/z dos compostos: hexanal (1), 1-octen-3-ol (2) e 3-octanal (3), confirmando assim, a identificação destes compostos.

Figura 28. Comparação do perfil cromatográfico de flores de soja, da cultivar BRS 399, obtidos por CG-EM, em fibra PDMS/DVB em relação à mistura de padrões.



Através desta análise de padrões, obtida por CG-EM, confirma-se os compostos hexanal (1), 1-octen-3-ol (2) e 3-octanal (3) presentes nas flores de soja, da cultivar BRS 399, através da extração por SPME pela fibra PDMS/DVB na cultivar BRS 399.

Além disso, com o valor da área de cada composto obtido pela mistura de padrões, obteve-se uma estimativa da quantidade de cada composto em $\mu\text{L mL}^{-1}$ presente em 1 g de flor de soja, BRS 399, através da

adsorção pela fibra PDMS/DVB. Para o composto hexanal (1) obteve-se uma concentração de $91,57 \mu\text{L mL}^{-1}$, para o composto 1-octen-3-ol (2) concentração de $35,71 \mu\text{L mL}^{-1}$ e 3-octanol (3) de $3,08 \mu\text{L mL}^{-1}$ em 1 g de flores de soja (Tabela 10).

Tabela 10. Estimativa da concentração de compostos presentes nas flores de soja, BRS 399, através de extração por fibra PDMS/DVB.

Picos	Composto	Área		Concentração em $\mu\text{L mL}^{-1}$ em 1 g de flor
		Padrão "mix"	BRS 399	
1	Hexanal	2496836	114320693	91,57
2	1-Octen-3-ol	15283067	272889232	35,71
3	3-Octanol	19585633	30194737	3,08

5 CONCLUSÃO

O foco do presente trabalho visa definir um método adequado para extração dos compostos orgânicos voláteis emitidos por flores de soja (*Glycine max* L. Merrill), analisados por meio da técnica de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Embora na literatura encontram-se análises de voláteis em folhas, sementes e óleo de soja, até o momento não há relatos sobre os voláteis emitidos, apenas, pelas suas flores.

Nesse estudo foi possível identificar, pela primeira vez, compostos voláteis presentes nas flores de soja, tanto pela técnica de *headspace* estático (autoinjeter), como também, pela técnica de microextração em fase sólida.

A técnica de SPME apresentou-se mais eficiente em relação ao *headspace*, definida pela presença de mais de 37 compostos voláteis em flores roxas (BRS 399) e 57 compostos em flores brancas (DONMARIO 6563), enquanto que com a técnica de *headspace* obteve-se a identificação de apenas 4 compostos, utilizando as mesmas condições (60 min a 80°C). Além disso, a técnica de SPME necessitou apenas de 1,0 g de massa de flores, metade da massa utilizada por *headspace*.

A técnica de microextração em fase sólida também permitiu uma variabilidade de uso de adsorventes, ou absorventes, que possibilitaram a identificação de um número maior de compostos, entretanto, as melhores fibras para extração dos compostos voláteis foram a DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB.

Desse modo, o estudo dos compostos voláteis de flores de soja (*Glycine max* L. Merril) contribuiu para o conhecimento químico das flores de soja, e conseqüentemente, um melhor entendimento de metabólitos secundários produzidos pelas mesmas.

A partir dos métodos desenvolvidos, novos trabalhos voltados à ecologia química dos compostos identificados serão realizados para o entendimento do complexo sistema de interação de flores de soja com os polinizadores.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4^aed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804p.2007.
- BICCHI, C., CORDERO, C., IORI, C., RUBIOLO, P. AND SANDRA, P. Headspace sorptive extraction (HSSE) in the headspace analysis of aromatic and medicinal plants. **J. High Res. Chromatogr.** v. 23, p. 539–546, 2000.
- BOUÉ, S.M. et al. Identification of volatile compounds in soybean at various developmental stages using solid phase microextraction. **J. Agric. Food Chem**, v. 51, n.17, jul. p. 4873-4876. 2003.
- BOUÉ, S. M., SHIH, B. Y., CARTER-WIENTJES, C. H., CLEVELAND T. E. Effect of Soybean Lipoxygenase on Volatile Generation and Inhibition of *Aspergillus flavus* Mycelial Growth. **J. Agric. Food Chem.** V. 53, p. 4778–4783, 2005.
- BRITO JÚNIOR, S.L. **Ferrugem asiática da soja: Identificação de um composto volátil associado ao patossistema hospedeiro (*Glycine max*) e o estudo da interação incompatível com *Phaseolus lunatus***. 87 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- CAI, L., KOZIEL, J., O'NEAL, M. Studying plant–insect interactions with solid phase microextraction: screening for airborne volatile emissions response of soybeans to the soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae). **Chromatography**, v. 2, n. 2, p. 265-276, 2015.
- CHEN, F., THOLL, D., D'AURIA, J.C., FAROOQ, A., PICHERSKY, E., GERSHENZON, J. Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. **Plant Cell**, v. 15, p. 481–494, 2003.
- CHIARI, W. C.; TOLEDO, V. A. A.; TAKASUSUKI, M.C.C.R.; OLIVEIRA, J.B.; SAKAGUTI, E.S.; ATTENCIA, V.M.; COSTA, F.M.; MITSUI, M.H. Pollination of soybean (*Glycine max* L. Merrill) by honeybees (*Apis mellifera* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 31-36, 2005.
- CHIARI, W. C.; ATTENCIA, V. M.; FRITZEN, A. E. T.; TOLEDO, V. A.A.; TAKASUSUKI, M. C. C. R.; TORAL, F. L. B. T.; PAIVA, G. J. Avaliação de diferentes modelos de colméias para abelhas jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 24, p. 881-887, 2008.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 4^o Levantamento - Safra 2018/19. Janeiro de 2019. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 11 fev 2019.
- DALL'AGNOL, A. **A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições**. 1.ed. Brasília: Embrapa, 2016.

- DEGENHARDT, J., GERSHENZON, J. Demonstration and characterization of (E)-nerolidol synthase from maize: a herbivore- inducible terpene synthase participating in (3E)-4,8-dimethyl- 1,3,7-nonatriene biosynthesis. **Planta**, v. 210, p. 815–822, 2000.
- DELAPLANE, K. S., MAYER, D. R., MAYER, D. F. **Crop pollination by bees**. Cabi, 2000.
- DEWULF, J., VAN LANGENHOVE, H. Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography. **Trends Anal. Chem.** v. 21, p. 637–646, 2002.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 181-189, 2008.
- EMBRAPA: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA Tecnologias de produção de soja-Região Central do Brasil. **Sistema de Produção 6**. Embrapa. Londrina: 2005.
- ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, 1996.
- FANG, Y., RAMASAMY, R. P. Current and prospective methods for plant disease detection. **Biosensors**, v. 5, n. 3, p. 537-561, Ago. 2015.
- FREE, J. B. Insect pollination of crops. 2. ed., **London: Academic Press**, 684p, 1993.
- HANDLEY, A. J., ADLARD, E. R. **Gas Chromatographic Techniques and Applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.
- JOULAIN, D. The composition of the headspace from fragrant flowers: Further results. **Flavour Fragrance J.** 2, 149-155, 1987.
- KOLB, B., LESLI, S. Theoretical background of HS-GC and its applications. **Static Headspace – Gas Chromatography: Theory and Practice**. 2.ed. Canada: Wiley, p, 19-25, 2006.
- KUNERT, G., OTTO, S., ROSE, U.S.R., GERSHENZON, J. WEISSER, W. Alarm pheromone mediates production of winged dispersal morphs in aphids. **Ecol. Lett.** 8, 596–603, 2005.
- KNUDSEN, J. T., ERIKSSON, R., GERSHENZON, J., STAHL, B. Diversity and distribution of floral scent. **T. Botanical R.** v. 72, n. 1, p. 1-120, 2006.
- LOCKWOOD, G. B. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. **J. Chromatogr. A.** v. 936, p. 23–31, 2001.
- MARRIOTT, P. J., SHELLIE, R. CORNWELL, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **J. Chromatogr. A.** 936, p. 1–22, 2001.

MCGEE, T.; PURZYCKI, K. L. Headspace Techniques for the Reconstitution of Flower Scents and Identification of New Aroma Chemicals. In: MARSILI, R. (edit.). **Flavour, Fragrance and odor analysis**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 249-276, 2002.

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

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **J. Chromatogr. A**, v. 967, p. 115–130, 2002.

MICHEREFF, M. F. F., LAUMANN, R. A., BORGES, M., MICHEREFF-FILHO, M., DINIZ, I. R.; NETO, A. L. F., MORAES, M. C. B. Volatiles mediating a plant herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. **J. Chem. Ecol.** v. 37: 3, 273-285, Fev. 2011.

MICHEREFF, M. F. F., LAUMANN, R. A., BORGES, M., MICHEREFF-FILHO, M., DINIZ, I. R.; NETO, A. L. F., MORAES, M. C. B. Influence of volatile compounds from herbivore-damaged soybean plants on searching behavior of the egg parasitoid *Telenomus podisi*. **Ento. Experim. et applicata**, v. 147, n. 1, p. 9-17, 2013.

MILLAR, J. G. SIMS, J. J. Preparation, cleanup, and preliminar fractionation of extracts. In *Methods in Chemical Ecology* (Millar, J.G. and Haynes, K.F., eds). Boston: **Kluwer Acad. Pub.** pp. 1–37, 1998.

PAIBON, W., YIMNOI C.-A., TEMBAB, N., BOONLUE, W., JAMPACHAISRI, K., NUENGCHAMNONG, N., WARANUCH, N.; INGGANINAN, K. Comparison and evaluation of volatile oils from three different extraction methods for some Thai fragrant flowers. **Internat. J. of Cosmetic Science**, v. 33, p. 150–156, 2011.

PARREIRA, F. V.; CARDEAL, Z. L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 28, nº4, p. 646-654, 2005.

PESSOA, F. L.P., MENDES, M. F., QUEIROZ, E. M., MELO, S. A. B. V. (2010). Extraction and Distillation. In: Hui, Y. H. (ed.). **Handbook of fruit and vegetable flavors**. New Jersey: Wiley ed., p. 195-210.

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

RADOIAS, G., BOSILCOV, A. Composition of the essential oil from the flowers of *Solandra maxima* (Sessé & Moc.) P.S. Green. **Flavour Fragr. J.**, v. 28, n. 6, p. 389-392, 2013.

RIBEIRO, A. de M.F.; NOGUEIRA-COUTO, R.H. **Polinização entomófila de soja (*Glycine max.*)**, cultivar Conquista. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., Campo Grande, 2002. Anais... Campo Grande, MS, p.26, 2002.

RIFFEL, A., COSTA, J. G. da. Os Voláteis de Plantas e o seu Potencial para a Agricultura. Aracaju, Se: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 48 p. (**Documentos 201**), 2015.

STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, J. R. Sampling flower scent for chromatographic analysis. **J. Sep. Sci.** v. 31, p. 2022 – 2031, 2008.

SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenas, v. 306, p. 314, 2009.

SILVA, A. C., LIMA, E. P. C., BATISTA, H. R. A importância da soja para o agronegócio brasileiro: uma análise sob o enfoque da produção, emprego e exportação. **Encontro de economia catarinense**, 2011.

SILVA, R. F. **Aromas de Cerrado: Estudo da Composição Química Volátil de Plantas Aromáticas do Cerrado**. 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

STEENSON, D.F., LEE, J.H., MIN, D.B. Solid Phase Microextraction of volatile soybean oil and corn oil compounds. **JFS: Food Chemistry and Toxicology**, v.67, n.1, 2002.

THOLL, D. BOLAND, W., HANSEL, A., LORETO, F., RÖSE, U.S.R., SCHNITZLER J.-P. Practical approaches to plant volatile analysis, **The Plant Journal**, v. 45, p. 540-560. 2006.

TOLEDO, V. A. A.; CHAMBÓ, E. D.; HALK, A.L.; FAQUINELLO, P.; PARPINELLI, R. S.; OSTROWSKI, K.R.; CASAGRANDE, A.P.B.; TAKASUSUKI, M. C.C. **Biologia floral e polinização em girassol** (*Helianthus annuus* L.) por abelhas africanizadas. CEP, v. 85960, p. 000, 2011.

WITTER, S., NUNES, P., BLOCHTEIN, B., LISBOA, B., FONSECA, V. **As abelhas e a agricultura**. 1. Ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2014. 143 p.

VALENTE, A. L. P., AUGUSTO, F. Microextração por Fase Solida. **Química Nova**. v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.