



PUCRS

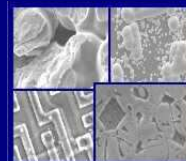
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia

Faculdade de Física

Faculdade de Química



PGETEMA

ESTUDO COMPARATIVO DE EXTRATOS VOLÁTEIS DE EUCALIPTOS GENETICAMENTE MODIFICADOS E NÃO GENETICAMENTE MODIFICADOS

ALINE MACHADO LUCAS

ENGENHEIRA QUÍMICA

ORIENTADOR: PROF. DR. Eduardo Cassel

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. Leandro Astarita

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Trabalho vinculado ao Projeto "CDA Eucalyptus"

**Porto Alegre
Fevereiro, 2011**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que tornaram possível a realização deste trabalho, em especial meus orientadores, professor Eduardo Cassel e professor Leandro Astarita, ao LOPE, ao Laboratório de Biotecnologia de PUCRS, ao professor Giancarlo Pasquali e a empresa Suzano Papel e Celulose pela disponibilidade em ceder o material utilizado.

Também agradeço aos meus colegas de laboratório, em especial a Giulia, Vanessa e Cristiane que me ajudaram em diversas atividades durante o mestrado.

Finalmente agradeço à minha família por todo o apoio, moral e financeiro, que me deram durante estes dois anos de estudo e em toda a minha vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
SUMÁRIO	3
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE QUADROS	8
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. Gênero <i>Eucalyptus</i>	16
3.2. Organismos Geneticamente Modificados	18
3.2.1. Manipulação genética na indústria de papel e celulose.....	19
3.3. Óleos essenciais (OE).....	20
3.3.1. Terpenos.....	21
3.3.2. Extração de óleos essenciais	22
3.3.2.1. Destilação por arraste a vapor.....	22
3.3.2.2. Enfloração	23
3.3.2.3. Extração com solventes orgânicos.....	24
3.3.2.4. Prensagem.....	24
3.3.2.5. Extração com fluido supercrítico	24
3.4. Cromatografia gasosa	25
3.4.1. Cromatografia gasosa / Espectrometria de massa	27
3.5. Fungos fitopatogênicos em <i>Eucalyptus</i>	28
3.6. Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Eucalyptus</i>	29
3.7. Métodos de determinação de atividade antimicrobiana	30

3.8. Análise estatística	31
3.8.1. Análise de componentes principais	31
4. METODOLOGIA	33
4.1. Coleta das folhas.....	33
4.2. Extração do óleo	36
4.3. Cálculo do rendimento e densidade do óleo	37
4.4. Análise cromatográfica.....	38
4.5. Determinação da atividade antifúngica.....	39
4.6. Análise estatística	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1. Coleta 01 – Primavera	43
5.1.1. Rendimento	43
5.1.2. Análise cromatográfica	43
5.1.3. Análise estatística	46
5.1.4. Ação antifúngica	50
5.2. Coleta 02 – Verão	50
5.2.1. Rendimento	50
5.2.2. Análises Cromatográficas	52
5.2.3. Análise estatística	56
5.2.4. Ação antifúngica	59
6. CONCLUSÕES	62
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO 1	70
ANEXO 2	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Número de espécies de eucaliptos publicadas por ano (Coppen, 2002).	16
Figura 3.2 – Estrutura de alguns terpenos típicos: (A1, A2, A3, A4) Monoterpenos; (B1, B2) Sesquiterpenos; (C1) Diterpeno; (D1) Triterpeno; (E1) Tetraterpeno. (Marriott et al, 2001).	22
Figura 3.4 – Montagem do equipamento de extração por arraste a vapor em escala laboratorial. CA: caldeira (balão com resistência imersa); VE: vaso de extração; BT: banho termostático; CL: clevenger.	23
Figura 3.5 – Funcionamento básico de um cromatógrafo gasoso – [1] cilindro de gás de arraste, [2] e [3] controladores de fluxo de gás, [4] sistema de injeção de amostra, [5] forno para aquecimento da coluna, [6] coluna cromatográfica, [7] detector, [8] sistema de aquisição de dados (McNair e Miller, 2009).	26
Figura 4.1 – Sistema de amostragem das plantas.	34
Figura 4.2 – Unidade laboratorial de destilação por arraste a vapor.	37
Figura 4.3 - Representação da bioautografia indireta (Adaptado de: Pereira, 2010)	41
Figura 5.1 - Comportamento de variação dos compostos para a coleta 01	48
Figura 5.2 - Comportamento de variação entre os eventos para a coleta 01	48
Figura 5.3 – Dendograma para a coleta 01. O eixo y representa os tratamentos genéticos mais o controle e o eixo x representa a distância euclidiana entre os agrupamentos.	49
Figura 5.4 – Curvas de extração para os tratamentos genéticos e o controle da segunda coleta. Os números abaixo do eixo dos minutos significa a triplicata a que cada curva pertence.	51
Figura 5.5 – Rendimento final para cada tratamento genético com o respectivo desvio padrão.	51
Figura 5.6 - Comportamento de variação dos compostos para a coleta 02	57
Figura 5.7 - Comportamento de variação entre os eventos para a coleta 02.	58

- Figura 5.8 – Dendograma para a coleta 02. O eixo y representa os tratamentos genéticos mais o controle e o eixo x representa a distância euclidiana entre os agrupamentos.59
- Figura 5.9 – Resultado da bioautografia para um tratamento genético representando a inibição de crescimento ao fungo *Ceratosystis fimbriata*. As regiões onde não aparecem pontos pretos são as zonas em que houve inibição de crescimento.61
- Figura 5.10 – Resultado da bioautografia para um tratamento genético representando a inibição de crescimento ao fungo *Botrytis cinerea*. As regiões claras são as zonas em que houve inibição de crescimento.61
- Figura 5.11 – Resultado da bioautografia para um tratamento genético representando a inibição de crescimento ao fungo *Quambalaria eucalypti*. As regiões com “manchas” amareladas são as zonas em que houve inibição de crescimento.61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1 – Nomenclatura de terpenos de acordo com a cadeia carbônica e unidades de isopreno (Marriott, 2001).21
- Tabela 5.1 – Composição química do óleo essencial dos eucaliptos para a primeira coleta. Os valores são dados em percentual em área em função dos componentes identificados no óleo essencial para cada evento transgênico mais o controle. As análises foram realizadas por CG e CG/EM.44
- Tabela 5.2 – Composição química do óleo essencial dos eucaliptos para a primeira coleta. Os valores são dados em percentual de área em função dos componentes identificados no óleo essencial para cada tratamento genético mais o controle. As análises foram realizadas por CG e CG/EM.52
- Tabela 5.3 – Componentes do óleo essencial dos eucaliptos que foram identificados apenas na coleta 01.....55
- Tabela 5.4 – Componentes do óleo essencial dos eucaliptos que foram identificados apenas na coleta 02.....55

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 – Identificação das amostras de acordo com o evento genético e os números gerados aleatoriamente. *Amostras coletadas apenas no verão.	34
Quadro 4.2 – Amostras coletas na coleta 01 com suas respectivas identificações. .	35
Quadro 4.3 - Amostras coletas na coleta 02 com suas respectivas identificações...	36
Quadro 5.1 – Ação antifúngica do óleo essencial dos 08 tratamentos genéticos mais o controle. Óleo Essencial [OE]; Fração do cromatograma [F]; Apresentou ação inibitória [+]......	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

OGM	Organismo geneticamente modificado
GM	Geneticamente modificado
OE	Óleos Essenciais
CG	Cromatografia gasosa
EM	Espectrometria de massa
EI	<i>Electron impact</i>
FID	<i>Flame ionization detector</i>
CG/EM	Cromatografia gasosa/espectrometria de massa
eV	Elétron volt
u	Unidade de massa
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
PIB	Produto interno bruto
m	Massa
mm	Milímetro
µm	Micrometro
h	Hora
min	Minuto
V	Volume
L	Litro
mL	Mililitro
g	Grama
ppm	Parte por milhão
ppb	Parte por bilhão
°C	Grau Celsius
d	Densidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
PCA	<i>Principal component analysis</i>
CQB	Certificado de qualidade em biossegurança

RESUMO

LUCAS, Aline Machado. **Estudo comparativo de extratos voláteis de eucaliptos geneticamente modificados e não geneticamente modificados**. Porto Alegre. 2011. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O gênero *Eucalyptus* possui centenas de espécies. Os múltiplos usos em que essas são empregadas fazem desse gênero um dos mais valiosos e amplamente utilizados no mundo. O melhoramento genético dessas plantas vem sendo estudado, principalmente pela indústria papelreira, com o intuito de se obter árvores com crescimento mais rápido, maior quantidade de celulose, menor teor de lignina e resistência a doenças e intempéries.

O presente trabalho teve por objetivo estudar os óleos essenciais que foram extraídos por arraste a vapor de eucaliptos geneticamente modificados e não geneticamente modificados da espécie híbrida *E. grandis* versus *E. urophylla* aplicadas na produção de papel. Entre as variáveis de interesse neste estudo, associadas aos compostos voláteis, encontram-se a composição química, o rendimento e a ação antifúngica frente a alguns fungos patogênicos de eucaliptos.

O óleo essencial não representa um produto de interesse na indústria de papel e celulose, contudo é necessária a avaliação deste composto visando determinar a existência de equivalência entre plantas geneticamente modificadas e convencionais. A partir do estudo deste metabólito secundário produzido pelas plantas, busca-se fornecer subsídios que garantam a biossegurança ambiental, humana e animal.

Os resultados mostram que a composição química dos óleos essenciais não apresentou variação significativa entre os eucaliptos geneticamente modificados e seus controles isogênicos. Todos os óleos apresentaram ação antifúngica para os fungos testados. O único parâmetro que sofreu alteração foi o rendimento, porém, mais estudos devem ser feitos para verificar se esta variação está relacionada com a modificação genética sofrida pelas plantas.

Palavras-Chaves: óleos essenciais, organismos geneticamente modificados, destilação por arraste a vapor, ação antifúngica.

ABSTRACT

LUCAS, Aline Machado. **Comparative study of volatile extracts of eucalyptus genetically modified and non-genetically modified.** Porto Alegre. 2011. Master. Pos-Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The *Eucalyptus* genus has hundreds of species. The multiple uses in which they are employed, makes this genus one of the most valuable and used around the world. The genetic improvement of these plants has been studied, mainly by the papermaking industry, in order to obtain trees with a faster growth, higher quantity of cellulose, less content of lignin and resistance to diseases and weather.

This work aims to study the essential oils extracted by steam distillation of genetically modified *Eucalyptus* and non-genetically modified of the hybrid specie *Eucalyptus grandis* versus *Eucalyptus urophylla* applied to paper production. Among the variables of interest in this assignment, associated with the volatile compounds, there is chemical composition, the return and the anti-fungal against some pathogens fungi in the *Eucalyptus*.

The essential oil does not represent a product of interest for the papermaking and cellulose industry, however it is necessary the evaluation of this compound in order to determine the equivalence, or not, among the genetically modified and conventional plants. From the study of this secondary metabolic produced by the plants, it seeks to provide subsidies which can guarantee the environmental, human and animal biosafety.

The results show that the chemical composition of essential oils showed no significant differences between the genetically modified eucalyptus trees and their isogenic controls. All oils showed anti-fungal for the fungi tested. The only parameter that was altered was the yield, but more studies must be done to ascertain whether this variation is related to genetic modification suffered by the plants.

Key-words: *Eucalyptus*, essential oils, genetic improvement, steam distillation

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* compreende mais de 800 espécies distintas. Os múltiplos usos em que são empregadas essas plantas incluem madeira para construção, celulose e óleos essenciais, o que fazem deste gênero um dos mais valiosos e amplamente utilizados no mundo (Coppen, 2002).

Das espécies do gênero *Eucalyptus*, em torno de vinte produzem óleos essenciais. As mais conhecidas são *E. citriodora* e *E. globulus*. Cada espécie possui um componente majoritário e esta característica determina o uso final do óleo. As espécies ricas em citronelal, por exemplo, são utilizadas na perfumaria, desde cosméticos até como aromatizantes de produtos de limpeza (Castro et al., 2008). Espécies com maiores quantidades de eucaliptol (1,8-cineol) são utilizadas para preparações farmacêuticas no tratamento de problemas respiratórios, devido à sua ação estimulante e expectorante. Em uso tópico, o eucaliptol age como anestésico e anti-séptico (Lorenzi et al., 2008). A eficácia do óleo de *Eucalyptus* contra infecções respiratórias e sua ação anti-séptica já é comprovada e reconhecida (Silva, 2001). Estudos mostram ainda a ação inibitória de algumas espécies de *Eucalyptus* contra o crescimento de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Cândida* e *Penicillium* (Coppen, 2002) e contra bactérias, como *Staphylococcus aureus* (Estanislau et al., 2001).

Na indústria de papel, o *Eucalyptus* é utilizado para a extração de celulose. Nos últimos anos, este ramo industrial tem investido em modificações genéticas para o melhoramento da qualidade das plantas. Os principais objetivos dessas modificações para a produção de papel são obter árvores que cresçam mais rapidamente, contenham mais celulose e menos lignina, sejam resistentes ao ataque de insetos e fungos, tolerantes à seca e às baixas temperaturas (Lerayer, 2009). As espécies mais apropriadas para extração de celulose são *E. dunnii*, *E.*

globulus, *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. grandis* x *E. urophylla* (híbrido entre *E. grandis* e *E. urophylla*) (Silva, 2008).

Todo organismo geneticamente modificado (OGM) necessita ser submetido a avaliação de risco, a fim de determinar potenciais efeitos adversos do transgene e de seus derivados na saúde humana e animal, no ambiente e nos vegetais (¹RN5 - CTNBio, artigo 19). A avaliação de risco compreende submeter o OGM a procedimentos ou métodos científicos visando determinar modificações na capacidade da planta em adicionar substâncias ao solo, modificações de biodegradabilidade, diferenças de composição química e nutricional *in natura* ou após processamento e a existência de equivalência substancial entre o OGM e seu organismo parental (RN5 - CTNBio, anexos III e IV).

Neste trabalho, avaliou-se os constituintes dos óleos essenciais extraídos do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizados na indústria de papel e celulose. O objetivo é comparar a composição química de óleos essenciais extraídos de eucaliptos geneticamente modificados e de seus isogênicos convencionais, bem como avaliar a ação dos óleos essenciais como agentes antifúngicos.

Os compostos voláteis foram extraídos pelo processo de destilação por arraste a vapor e a análise da composição química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. A técnica de extração é a mais indicada e utilizada para o tipo de material vegetal, que foram folhas frescas de *Eucalyptus*. A técnica analítica é a mais apropriada e completa, se tratando de óleos

¹ RN5 – Resolução Normativa nº5 da CTNBio, de 12 de março de 2008. Dispõe sobre normas para liberação comercial de OGM e seus derivados (www.ctnbio.gov.br).

essenciais, visto que se trabalha com amostras voláteis e com grande quantidade de compostos.

As avaliações do efeito antifúngico dos óleos essenciais foram realizadas utilizando-se os organismos *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis fimbriata* e *Quambalaria eucalypti*, todos patógenos do *Eucalyptus*. O efeito fungitóxico foi avaliado utilizando-se a metodologia da bioautografia, técnica preferencial para ensaios com compostos voláteis.

Este estudo está vinculado ao projeto “Criação do CDA *Eucalyptus*: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para a Biossegurança Relativa a Plantas GM de Eucalipto”, financiado pelo CNPq/MAPA/DAS, Edital número 64/2008 e foi desenvolvido através de uma parceria do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE), da Faculdade de Engenharia da PUCRS, com o Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Biociências desta mesma universidade, sendo o mesmo autorizado pela Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Biociências e CTNBio², órgãos responsáveis por autorizar atividades com OGM's.

² A CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) é uma instância colegiada multidisciplinar, criada através da lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, cuja finalidade é prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a OGM, bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados (www.ctnbio.gov.br).

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é determinar e comparar a composição química, rendimento e ação antimicrobiana frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis fimbriata* e *Quambalaria eucalypti* dos óleos essenciais extraídos pelo processo de destilação por arraste a vapor de eucaliptos GM e não GM. De posse dos resultados experimentais de composição química dos extratos voláteis avalia-se a equivalência entre as amostras pela técnica estatística de análise de componentes principais.

2.1. Objetivos Específicos

- Extrair o óleo essencial das folhas dos eucaliptos através da técnica de destilação por arraste a vapor para todas as amostras;
- Determinar o rendimento e a curva de extração de rendimento *versus* tempo;
- Determinar a equivalência na composição química por análises cromatográficas, utilizando cromatografia gasosa acoplada a dois detectores: espectrômetro de massa (identificação) e ionização de chama (quantificação);
- Comparar estatisticamente os dados das análises cromatográficas (composição química) através da técnica de análise de componentes principais;
- Determinar a ação antifúngica pelo método da bioautografia frente aos seguintes fungos patogênicos de *Eucalyptus*: *B. cinerea*, *C. fimbriata* e *Q. eucalypti*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus*, nativo da Austrália, compreende cerca de 800 espécies e este número segue a tendência de aumento, como pode ser observado na figura 3.1, que mostra a evolução da descoberta de novas espécies desde a primeira, em 1789. A facilidade de crescimento dos eucaliptos em condições climáticas diversas em seu habitat natural e sua grande variedade genética são algumas das razões pelo sucesso da disseminação dos eucaliptos pelo mundo. Outra razão é o fato de ser uma árvore de rápido crescimento, o que possibilita um retorno financeiro em um tempo relativamente curto (Coppen, 2002).

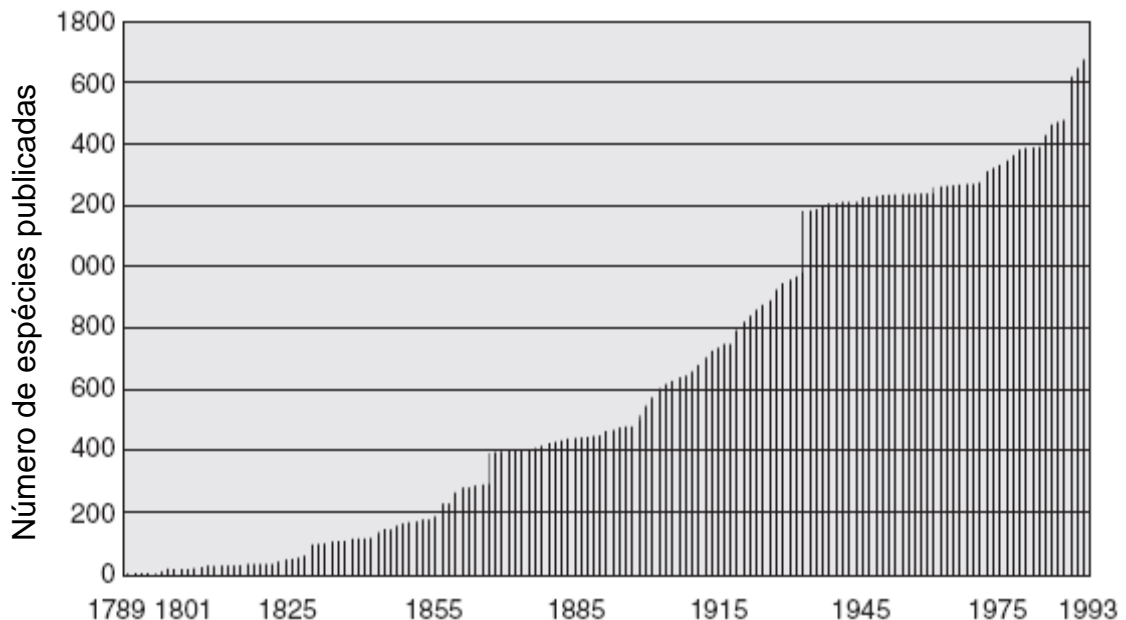


Figura 3.1 – Número de espécies de eucaliptos publicadas por ano (Coppen, 2002).

Os múltiplos usos que os eucaliptos são empregados – madeira para construção civil, extração de celulose e óleo essencial – fazem desse gênero um dos mais valiosos e utilizados mundialmente.

O óleo essencial de eucalipto é muito empregado para fins medicinais e perfumaria. Os diversos compostos voláteis presentes no seu óleo essencial possuem atividades terapêuticas para o tratamento de problemas respiratórios além de ação anti-séptica e anestésica (Silva, 2001). Pesquisas mostram que não só os componentes voláteis possuem estas características farmacológicas. Compostos não voláteis, muitos exclusivamente encontrados nos eucaliptos, têm mostrado uma aplicabilidade potencial no tratamento de AIDS e câncer, entre outros males. Estes resultados asseguram que nos próximos anos muitas pesquisas com tais compostos serão realizadas (Coppen, 2002).

Várias espécies de eucaliptos possuem uma quantidade considerável de óleo essencial, porém apenas seis delas são utilizadas para fins comerciais: *Eucalyptus globulus*, *E. exserta*, *E. polybractea*, *E. smithii*, *E. citriodora* e *E. dives*. Os componentes majoritários do óleo essencial determinam sua aplicação. Óleos essenciais ricos em eucaliptol (1,8-cineol) são empregados para fins medicinais, enquanto que os óleos ricos em citronelal são utilizados para aromatização de ambientes e produtos (Coppen, 2002). Para fins de extração de celulose e utilização da madeira, as espécies mais indicadas são: *E. alba*, *E. dunni*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla* e *E. grandis x E. urophylla* (híbrido do *E. grandis* e *E. urophylla*) (Silva, 2008).

O Brasil apresenta condições ambientais muito favoráveis ao plantio. A idade ideal para o corte de uma árvore de eucalipto para a produção de celulose é entre 06 e 07 anos. Para a indústria madeireira, a idade de corte ideal é entre 12 e 16 anos. (Silva, 2008).

O setor florestal brasileiro é reconhecido mundialmente. Este sucesso deve-se às condições climáticas e às tecnologias desenvolvidas por empresas e instituições de pesquisa no país. O segmento econômico é responsável por 3,5% do

PIB do país, envolvendo US\$ 4,8 bilhões em impostos e US\$ 6,1 bilhões em exportações. As plantações de eucalipto ocupam uma área de 3.751.867 hectares. Este montante faz parte dos 0,6% da superfície terrestre do país ocupada por florestas plantadas (Lerayer, 2009).

Uma das grandes vantagens do eucalipto é a facilidade em cruzar diferentes espécies, processo conhecido como hibridização. Um dos híbridos mais conhecidos é o *E. grandis* x *E. urophylla*. Esta união reúne as melhores características de cada espécie, como o rápido crescimento e qualidade superior da madeira do *E. grandis* e rápida adaptação e resistência a doenças do *E. urophylla* (Lerayer, 2009).

Com a evolução da eucaliptocultura no Brasil, a necessidade de árvores mais adaptadas a diferentes solos e condições climáticas ficou evidente. Além disso, é necessário agregar características de interesse social e econômico, como aumento da produtividade e resistência a pragas e a condições de estresse (Lerayer, 2009).

O próximo passo para continuar nessa crescente evolução é a geração de árvores GM, visto que esta técnica possibilita a criação de plantas com crescimento mais rápido e com características ainda mais adequadas ao beneficiamento industrial e menos impactantes ao meio ambiente.

3.2. Organismos Geneticamente Modificados

Plantas GM são organismos vegetais nos quais foram introduzidos um ou mais genes pela técnica de transformação genética. Essa técnica permite que genes sejam isolados bioquimicamente e inseridos em uma célula. A célula que recebeu o gene exógeno se multiplicará e dará origem a tecidos que regenerarão uma planta completa. Todas as células desta planta apresentarão os genes exógenos introduzidos, apresentando determinadas características de interesse agrícola e/ou florestal (Lopes, 2010).

O futuro da transformação genética é promissor, mas ainda está no início. A grande barreira está na identificação e localização de genes de interesse para a

agricultura. Além disso, devem ser estudados os efeitos que esses genes poderão causar na planta e como irão interagir com outros genes (Lopes, 2010).

Com as visíveis mudanças climáticas e o crescimento da demanda mundial de alimentos, tem sido necessário a intervenção genética em plantas, utilizadas como alimento ou não, para que estas possam ser mais produtivas, mesmo em condições ambientais desfavoráveis. Apesar da manipulação genética já estar mostrando a possibilidade de se obter plantas com características superiores, sem causar qualquer dano ao ambiente ou à saúde humana e animal, ainda é preciso romper algumas barreiras culturais para o desenvolvimento desta técnica. A sociedade em geral desconhece os benefícios da manipulação genética e baseia sua opinião em mitos e paradigmas ultrapassados (Moraes, 2008).

Assim como em qualquer cultivo de OGM, o *Eucalyptus* passa por estudos criteriosos para a identificação de possíveis riscos ao meio ambiente e à saúde humana. Neste sentido, as atividades de pesquisa envolvendo OGMs são reguladas por normas estabelecidas pela CTNBio. Todo e qualquer OGM que possua como objetivo a liberação comercial necessita ser exaustivamente avaliado quanto à biossegurança, reduzindo a probabilidade deste OGM ocasionar efeitos adversos.

3.2.1. Manipulação genética na indústria de papel e celulose

A indústria do papel no Brasil é uma das mais interessadas na pesquisa de árvores GM, utilizando especificamente espécies de *Eucalyptus*. O objetivo principal é obter árvores que cresçam mais rápido, contenham mais celulose e menos lignina, sejam resistentes ao ataque de insetos e fungos, a seca e as baixas temperaturas.

A pesquisa envolvendo a manipulação genética do *Eucalyptus* faz parte de uma segunda geração de pesquisa com plantas modificadas, sendo a primeira geração representada por plantas melhoradas para fins agrícolas. Além dos aspectos econômicos, há uma preocupação com a questão produtiva.

Os estudos de transformação genética em *Eucalyptus* buscam primeiramente uma melhora na qualidade da madeira, que deve atender as necessidades industriais ligadas à produção de papel e celulose. Para isso, levam-se em consideração dois caminhos: a redução do teor de lignina e o aumento de um tipo específico deste polímero, mais facilmente extraído no processo de polpação. Ambos os processos levam a ganhos energéticos, redução no uso de produtos químicos e melhora no rendimento em celulose da planta (Moraes, 2008)

3.3. Óleos essenciais (OE)

Óleos essenciais (OE) são substâncias extraídas de plantas, altamente voláteis e de odor agradável e intenso na maioria dos óleos. Podem ser extraídos de flores, folhas, cascas, rizomas e frutos. São formados principalmente por fenilpropanóides, que conferem suas características organolépticas e hidrocarbonetos terpênicos, sendo estes em maioria (Bizzo et al., 2009).

Em água, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada, sendo totalmente solúveis em solventes orgânicos. Apresentam sabor geralmente ácido e picante. Quando extraídos são normalmente incolores ou amarelados e em geral instáveis na presença de luz e calor, umidade e metais. São empregados principalmente em perfumaria como fragrâncias e fixadores de fragrâncias e em composições farmacêuticas (Simões et al., 2007).

A composição química dos óleos pode variar de acordo com a localização. Por exemplo, o óleo da casca da canela é rico em aldeído cinâmico, enquanto que o óleo extraído das folhas e das raízes é rico em eugenol e cânfora, respectivamente. A época da colheita, as condições climáticas e o tipo de solo também podem causar alterações na composição química do óleo extraído do mesmo órgão da planta (Simões et al., 2007).

As substâncias odoríferas em plantas também possuem funções ecológicas, como inibidores de germinação, proteção contra predadores, na atração de polinizadores entre outras. Efeitos alelopáticos têm sido estudados para *E. globulus*

e *E. camaldulensis*, que inibem o crescimento de outras plantas em um raio de 1 a 2 m. Essa característica tem sido atribuída a terpenos voláteis, como 1,8-cineol, cânfora, α -tujona e isotujona, entre outros (Simões et al. 2007).

Os fatores ambientais podem afetar a quantidade e a composição dos OE nas plantas. Dentre estes fatores estão as condições do solo, a radiação solar, a temperatura e o estresse hídrico. A parte da planta utilizada na extração do óleo, sua idade, o manejo florestal, métodos de amostragem, processos de extração e análise, além da variabilidade genética, também podem afetar as características dos OE (Castro et al., 2008).

3.3.1. Terpenos

A molécula de isopreno $[(C_5H_8)_n]$ é a peça fundamental dos OE, onde o índice n significa o número de moléculas de isopreno que formam o esqueleto dos terpenos (tabela 3.1). A grande maioria dos terpenos constituintes dos OE possui cadeias com menos de 20 átomos de carbono (Silva, 2001). A figura 3.2 ilustra alguns tipos de terpenos tipicamente encontrados em OE.

Quando os terpenos sofrem a substituição por grupos funcionais (oxigênio ligado de diferentes formas aos átomos de carbono), os mesmo passam a ser compostos terpênicos. Apesar dos OE serem chamados de “óleos”, os compostos terpênicos que os constituem têm consistência similar a dos alcoóis (Silva, 2001).

Tabela 3.1 – Nomenclatura de terpenos de acordo com a cadeia carbônica e unidades de isopreno (Marriott, 2001).

Átomos de Carbono	Unidades de Isopreno	Nomenclatura
10	2	Monoterpenos
15	3	Sequiterpenos
20	4	Diterpenos
25	5	Sesterterpenos
30	6	Triterpenos
40	8	Tetraterpenos

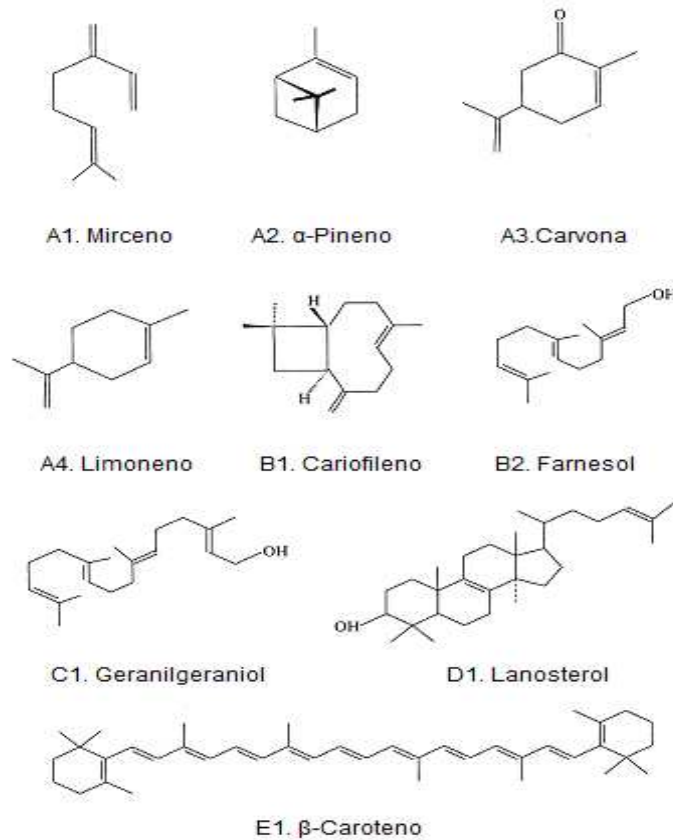


Figura 3.2 – Estrutura de alguns terpenos típicos: (A1, A2, A3, A4) Monoterpenos; (B1, B2) Sesquiterpenos; (C1) Diterpeno; (D1) Triterpeno; (E1) Tetraterpeno. (Marriott et al, 2001).

3.3.2. Extração de óleos essenciais

A extração dos OE pode ser feita por diversas técnicas, dependendo do local onde os compostos voláteis se encontram na planta. As mais utilizadas são descritas a seguir.

3.3.2.1. Destilação por arraste a vapor

É a técnica mais utilizada para a extração dos OE de plantas aromáticas e da indústria aromática, por ser um método simples e barato quando comparado a métodos modernos que utilizam fluidos supercríticos. O processo basicamente

consiste na geração de uma corrente de vapor em uma caldeira que percola o vaso de extração onde está o leito de plantas. Em seguida, a mistura água e óleo essencial na fase vapor é introduzida em um condensador onde o vapor é liquefeito. A diferença de solubilidade entre a água e o óleo essencial permite a separação destes em duas fases líquida (Cassel e Vargas, 2006). A figura 3.4 mostra um esquema de uma unidade laboratorial de extração por arraste a vapor.

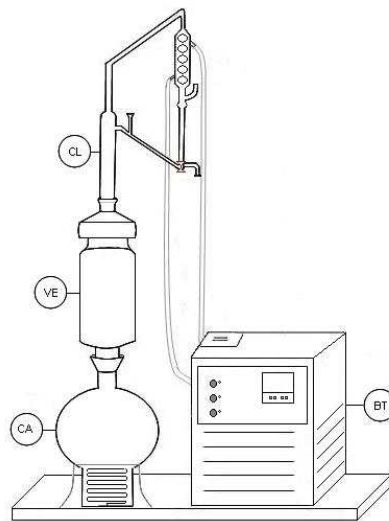


Figura 3.4 – Montagem do equipamento de extração por arraste a vapor em escala laboratorial. CA: caldeira (balão com resistência imersa); VE: vaso de extração; BT: banho termostático; CL: clewenger.

3.3.2.2. Enfloração

Esta técnica é utilizada para plantas com baixo teor de óleo e alto valor comercial. É aplicada na extração de OE de pétalas de flores. O processo consiste em depositar as pétalas sobre camadas de gordura durante um período de tempo determinado. Conforme as pétalas vão ficando esgotadas (sem óleo) estas são substituídas até a total saturação da gordura. Quando se atinge a saturação da gordura, esta é tratada com álcool que é destilado à baixa temperatura para se obter o óleo volátil de alto valor comercial (Simões et al., 2007).

3.3.2.3. **Extração com solventes orgânicos**

Quando utilizados solventes orgânicos para a extração dá-se a preferência a solventes apolares (éter, éter de petróleo ou diclorometano) que atraem outros compostos lipofílicos além do OE. Os produtos assim obtidos possuem baixo valor comercial (Simões et al., 2007).

3.3.2.4. **Prensagem**

Este método é empregado para a extração de OE de frutos cítricos. Os pericarpos destes frutos são prensados e a camada que contém o óleo é separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (Simões et al., 2007).

3.3.2.5. **Extração com fluido supercrítico**

A extração supercrítica pode ser definida como a solubilização de determinados compostos de uma matriz sólida ou líquida em um solvente nas condições supercríticas. Para tal extração, o solvente é comprimido e liquefeito e em seguida é aquecido. Após essas etapas, o solvente atinge o estado supercrítico, no qual possui viscosidade análoga a de um gás e uma capacidade de dissolução elevada como a de um líquido. Depois de efetuada a extração, o fluido retorna ao estado gasoso resultando na sua total eliminação (Simões et al, 2007). Durante a extração o solvente, no estado supercrítico, percola o leito de plantas no vaso de extração e dissolve os compostos presentes nesta matéria-prima. As plantas absorvem o solvente e os compostos extraídos dissolvem-se neste. Os compostos dissolvidos seguem para a etapa de expansão, onde se precipitarão quando o solvente passar do estado supercrítico para o estado gasoso (Cassel et al., 2008).

3.4. Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, fornecendo informações qualitativas e quantitativas sobre componentes individuais em uma amostra (Rood, 2007). Gases ou substâncias voláteis podem ser separadas utilizando esta técnica. Esta separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) (Collins et al., 2007).

A amostra é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária por um sistema de injeção. O uso de temperaturas adequadas no ponto de injeção e na coluna possibilita a vaporização das substâncias presentes na amostra que, de acordo com suas propriedades e as propriedades da composição química da fase estacionária, assim como a afinidade entre elas, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes (tempos de retenção). Com um detector apropriado na saída da coluna, essas substâncias são detectadas e quantificadas (Collins et al., 2007).

Basicamente, um cromatógrafo gasoso funciona da seguinte maneira (figura 3.5): um gás inerte (gás de arraste) flui continuamente de um cilindro [1] para a coluna [6] através de um ponto de injeção [4]. A amostra é injetada utilizando uma microseringa no ponto de injeção, devidamente aquecido para que ocorra a vaporização da amostra que será “arrastada” pelo gás de arraste através da coluna. Na análise de OE usualmente se utiliza colunas capilares de 10 a 100 m de comprimento e diâmetro interno de 0,1 a 0,75 mm. Após passar pela coluna, o gás de arraste carregando a amostra passa por um detector [7] que irá gerar um sinal elétrico, registrado em formato de picos, que será enviado a um sistema de dados [8] (Macnair e Miller, 2009).

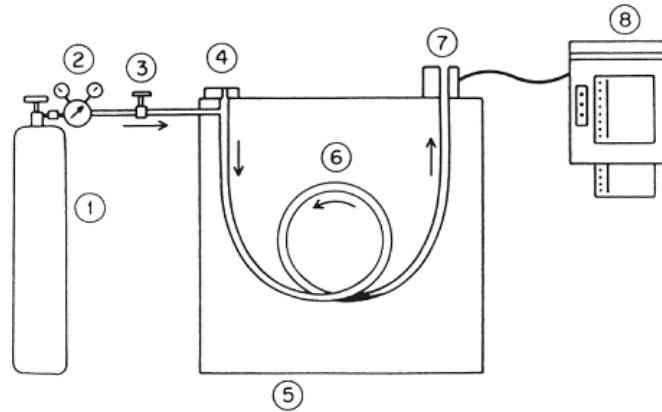


Figura 3.5 – Funcionamento básico de um cromatógrafo gasoso – [1] cilindro de gás de arraste, [2] e [3] controladores de fluxo de gás, [4] sistema de injeção de amostra, [5] forno para aquecimento da coluna, [6] coluna cromatográfica, [7] detector, [8] sistema de aquisição de dados (McNair e Miller, 2009).

Nem todos os compostos podem ser analisados por CG. É necessário que a substância seja volátil em temperaturas abaixo de 350-400°C e peso molecular de 2 a 1000 Daltons³. Também é importante que seja termicamente estável (Rood, 2007).

A CG possui uma série de vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens da técnica estão:

- A sensibilidade, detectando quantidades na ordem de ppm e até ppb;
- Não ser destrutiva, possibilitando uma mesma amostra ser utilizada em outra análise, como no caso do espectrômetro de massa;
- Requerer pequenas quantidades de amostra (Macnair and Miller, 2009).

³ Daltons: unidade de massa atômica

Desvantagens:

- Limitação para análise apenas de amostras voláteis e pesos moleculares abaixo de 1000 Daltons;
- Necessidade de outra análise para proceder a identificação do composto, visto que a única informação que a CG fornece é o tempo de retenção (Macnair e Miller, 2009).

Dependendo da fase estacionária utilizada e o método de análise, o tempo de retenção pode ser diferente para o mesmo composto. Por isso a CG sozinha pode não fornecer a identificação correta para aquele composto. Para isso, utiliza-se um índice, chamado Índice de Retenção, baseado na análise de um padrão, normalmente uma série de alcanos. O índice mais utilizado é o Índice de Kovats (Adams, 2007). Para análises com programação de temperatura, o índice mais adequado é o Índice Aritmético, também chamado de Índice Linear (Adams, 2007).

3.4.1. Cromatografia gasosa / Espectrometria de massa

Apesar das vantagens da CG, ela não é capaz de identificar os componentes da amostra, conforme dito anteriormente. Para isso, é necessário uma técnica auxiliar. O espectrômetro de massas (EM) é na verdade um detector que pode ser acoplado ao cromatógrafo gasoso. Ele requer pouca quantidade de amostra, microgramas, mas fornece dados qualitativos de compostos desconhecidos - estrutura, composição elementar e peso molecular - e suas respectivas quantidades. Esse sistema é um dos mais utilizados no mundo para diversos tipos de análises na área ambiental, petroquímica, de óleos essenciais, entre outras (McNair e Miller, 2009).

O funcionamento do EM baseia-se na ionização e quebra das moléculas. A forma mais utilizada para que ocorra a ionização é por impacto de elétrons (EI, do inglês *electron impact*). Quando a molécula no estado vapor entra no EM, ela recebe uma descarga de elétrons gerados pelo equipamento. Com essa descarga, a molécula é quebrada em diversos íons que são separados pela razão massa/carga (m/z) por campos elétricos ou magnéticos presentes no equipamento. Estes íons

passam por um detector, onde serão enviados ao sistema de aquisição de dados e comparados com um banco de dados (McNair and Miller, 2009).

3.5. Fungos fitopatogênicos em *Eucalyptus*

Vários patógenos, principalmente fungos, são causadores de doenças em *Eucalyptus*, desde o viveiro até o plantio adulto (Santos et al., 2001). Como exemplo, pode-se citar os fungos *Botrytis cinerea*, *Ceratostyis fimbriata* e *Quambalaria eucalypti*. As grandes áreas de reflorestamento, que caracterizam uma monocultura de eucalipto, podem ser um fator favorável à ocorrência de fitopatógenos (Ferreira, 2008).

O fungo *B. cinerea* é encontrado principalmente no sul e no sudeste do Brasil. A doença afeta os tecidos mais jovens da parte aérea das plantas, especialmente de mudas jovens, causando a morte do ápice ou até mesmo de toda a muda. Os sintomas são enrolamento das folhas, seguido de seca e queda das mesmas e o aparecimento de um mofo acinzentado sobre as partes afetadas (Santos et al., 2001).

O fungo *C. fimbriata* foi descrito pela primeira vez em 1890 atacando tubérculos de batata doce. Em eucaliptos este patógeno foi descoberto em 1998 quando foram observados casos no Brasil e República do Congo. Os principais sintomas são cancrios, murcha, apodrecimento de raiz e fruto, obstrução e descoloração vascular (Ferreira, 2008).

O fungo *Q. eucalypti* foi descrito pela primeira vez no início da década de 90 na África do Sul. No Brasil a primeira constatação foi nos anos 2000. Este patógeno causa o apodrecimento de estacas, provocando o anelamento de haste de mudas e minicepas, podendo incidir também em miniestacas na fase inicial de enraizamento. Nas folhas as lesões causam o escurecimento das mesmas (Ladeira, 2004).

A aplicação de fungicidas com produtos de amplo espectro nas plantas e a fumigação de substratos utilizados em viveiros de mudas são as formas mais

utilizadas para o combate a estes patógenos. Porém, devido ao alto custo e prejuízos ao meio ambiente, estes tratamentos devem ser evitados (Santos et al., 2001). Tratamentos alternativos utilizando produtos naturais e o uso de biocontrole com outros microrganismos para o combate a patógenos representam abordagens promissoras (Ladeira, 2004).

3.6. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eucalyptus*

O óleo essencial de *Eucalyptus* é conhecido popularmente por sua ação expectorante, anti-séptica e desinfetante, muito utilizado em formulações farmacêuticas e em produtos de limpeza. Este efeito é associado ao eucaliptol (1,8-cineol), sendo extraído comercialmente da espécie *E. globulus*, o qual apresenta este componente como majoritário (Coppen, 2002).

O uso potencial dos óleos essenciais de *Eucalyptus* como agentes antimicrobianos é uma prática que ainda precisa ser comprovada. A variabilidade observada nos resultados da ação antimicrobiana do óleo é um reflexo das diferentes condições, procedimentos e organismos testados experimentalmente, além da variação natural na composição de óleos de diferentes espécies de *Eucalyptus*. Misturas de óleos podem ser mais eficazes como agentes antimicrobianos, embora seja difícil determinar a combinação correta. A previsão da ação antimicrobiana baseada nos constituintes individualmente é complicada devido ao fato de poder haver sinergismo entre os diversos componentes de seus óleos essenciais (Coppen, 2002)..

Estudos indicam a ação inibitória do óleo de *E. camaldulensis* em fungos que causam doenças dermatológicas em humanos, como *Trichophyton mentagrophytes*. Em outro estudo, o óleo essencial de *E. globulus* apresentou ação antifúngica em organismos do gênero *Aspergillus*. Diversos híbridos de *Eucalyptus* ricos em pinenos, 1,8-cineol e p-cimeno apresentaram ação inibitória contra seis fungos, entre eles *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Penicillium notatum* (Coppen, 2002). Experimentos com *Staphylococcus aureus* mostraram que as espécies *E. citriodora*,

E. saligna, *E. microcorys*, *E. grandis* e *E. cloezina* impedem o crescimento dessa bactéria (Estanislau et al., 2001).

3.7. Métodos de determinação de atividade antimicrobiana

Os métodos mais utilizados para a determinação de atividade antimicrobiana são os métodos de difusão, bioautográficos e de diluição (Yunes et al., 2001). No método de difusão, o extrato ou composto a ser testado é colocado em contato com um meio de cultura inoculado previamente com o microrganismo. A forma de aplicação do extrato, como discos de papel, poços ou cilindro sobre a superfície, é que determina a variante deste método (Yunes et al., 2001). Após um determinado tempo de incubação, sendo o microrganismo sensível ao produto testado, ocorrerá a formação de halos de inibição onde houve a difusão do extrato em estudo (Pereira, 2010).

Tratando-se de OE, a difusão irregular dos compostos lipofílicos do óleo é um problema relacionado ao método de difusão. O resultado são concentrações irregulares do óleo no meio de cultura, causando a formação de regiões com atividade antimicrobiana variável (Nascimento et al., 2007). Além disso, a alta volatilidade dos óleos essenciais pode fazer com que sejam perdidos alguns compostos, dependendo da forma de aplicação do extrato.

A bioautografia é uma variante do método de difusão, pois seu princípio está baseado na difusão no meio de cultura. O extrato a ser testado é aplicado em uma placa de cromatografia em camada delgada (CCD) e eluída com uma fase móvel adequada. Os componentes do extrato são separados de acordo com sua polaridade em relação ao eluente e a placa cromatográfica. Posteriormente, a placa de CCD é recoberta com um meio de cultura inoculado com o microrganismo a ser estudado. Após o processo de incubação, verificam-se halos de inibição sobre o extrato e/ou componente do extrato identificados na placa de CCD (Pereira, 2010). Utilizando a CCD como forma de aplicação do extrato testado e a colocação do meio de cultura inoculado sobre a placa de CCD, os problemas de difusão irregular dos compostos lipofílicos do óleo e da evaporação do extrato são minimizados.

No método de diluição, uma determinada quantidade da amostra a ser testada é dissolvida em um meio de cultura. Essa mistura é diluída em diferentes concentrações e em cada diluição o microrganismo a ser testado é inoculado. A partir dessas diluições determina-se a concentração inibitória mínima que inibe o crescimento do microrganismo. A maior vantagem deste método é o fato de ser quantitativo (Yunes et al., 2001).

3.8. Análise estatística

3.8.1. Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é uma técnica estatística de análise multivariada na qual um número de variáveis correlacionadas são transformadas em um conjunto de variáveis não correlacionadas. O método data de 1901 com estudos de Karl Pearson, entretanto a metodologia de cálculo utilizada hoje foi publicada pela primeira vez por Harold Hotelling, em 1933 (Jackson, 2003).

O PCA tem por objetivo explicar a estrutura de variância-covariância de um conjunto de variáveis por meio de combinações lineares destas variáveis. Os principais objetivos desta técnica são redução e interpretação de dados, além da verificação de diferenças entre os dados. Pode revelar relações que não são previstas e, deste modo, permitir interpretações que com uma simples análise dos dados originais não se conseguiria. Devido a capacidade de redução de variáveis, esta técnica é muito utilizada para analisar grande conjuntos de dados que indicam a mesma observação ou observações diferentes (Johnson e Wichern, 2007).

Segundo Manly (2008), a análise consiste em definir um número de variáveis ($X_1, X_2, X_3, \dots, X_p$) e encontrar combinações lineares destas para produzir índices ($Z_1, Z_2, Z_3, \dots, Z_p$) que sejam não correlacionados na ordem de sua importância e que descreva a variação dos dados. A falta de correlação significa que os índices estão medindo “dimensões” diferentes dos dados e a ordem é tal que Variância (Z_1)

\geq Variância (Z_2) $\geq \dots \geq$ Variância (Z_p). Os índices Z são, então, os componentes principais. Espera-se que as variâncias da maioria dos índices sejam tão baixas a ponto de serem desprezíveis. Neste caso, a maior parte da variação no conjunto completo de dados pode ser descrita adequadamente pelos poucos componentes principais Z (Manly, 2008).

O procedimento de cálculo baseia-se na álgebra matricial, onde uma matriz simétrica $p \times p$, não singular, na qual a matriz de covariância (S) pode ser reduzida a uma matriz diagonal (L) através da pré multiplicação e pós multiplicação por uma matriz ortonormal (U). Os elementos da diagonal da matriz L são chamados de raízes características ou autovalores. As colunas da matriz U são chamadas de vetores característicos ou autovetores (Jackson, 2003).

A soma dos autovalores dos componentes principais ou fatores principais gerados resulta na variância total da amostra, enquanto que os autovetores indicam a direção dos vetores no gráfico. Geometricamente, este procedimento nada mais é do que uma rotação dos eixos originais (cada variável representa um eixo) sobre as suas médias. Os elementos do vetor característico indicam a direção do cosseno dos novos eixos (componentes principais) em relação aos eixos originais (Jackson, 2003).

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta das folhas

O material vegetal para a realização deste estudo foram folhas do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. Esses foram fornecidos pela empresa Suzano Papel e Celulose, provenientes da Fazenda Cabreúva, de propriedade da empresa, situada na Rodovia Raposo Tavares, km 228,8, no município de Itapetininga, SP, cultivados em uma área certificada pela CTNBio (CQB 166/02). As plantas em questão foram geradas pela transformação genética contendo construções transgênicas incluindo os genes de resistência à neomicina, e genes capazes de modificar a velocidade de crescimento das plantas.

A descrição detalhada das plantas encontra-se no CQB 166/02 da Suzano Papel e Celulose e no Processo de N° 01200.003375/2 005-51 da CTNBio, autorizado por aquela comissão para liberação planejada no meio ambiente.

Foram avaliados oito tratamentos (eventos) de transformação genética (plantas transgênicas com genes exógenos). Como tratamento controle, foram utilizadas três plantas convencionais apresentando o mesmo *background* genético das plantas transgênicas, ou seja, plantas isogênicas exceto pelos genes exógenos. Foram coletadas folhas de três árvores de cada tratamento (evento). Todas as amostras foram identificadas com números gerados aleatoriamente. Nenhuma das amostras foi identificada quanto a sua orientação genética. Isto significa que, durante os experimentos, não se tinha a informação de quais plantas eram transgênicas e quais não eram. A figura 4.1 abaixo mostra o sistema de amostragem citado anteriormente. O quadro 4.1 mostra os números aleatórios com que as amostras foram identificadas.

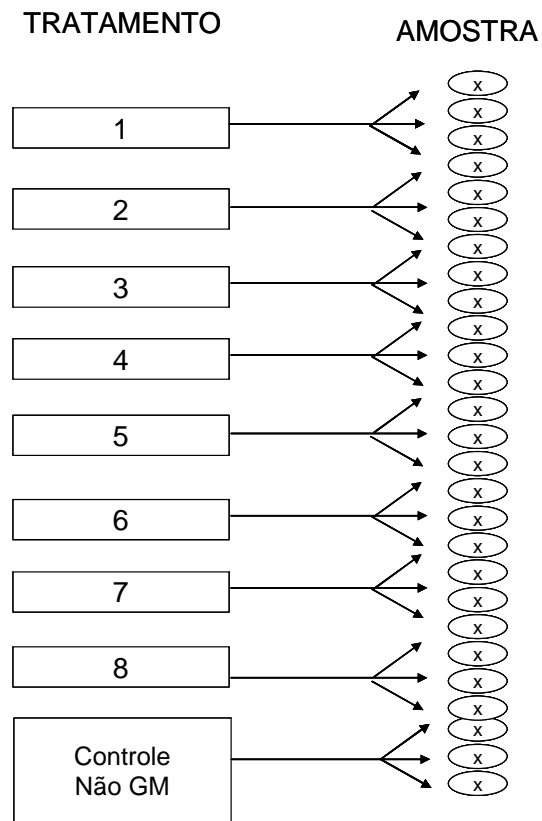


Figura 4.1 – Sistema de amostragem das plantas.

Quadro 4.1 – Identificação das amostras de acordo com o evento genético e os números gerados aleatoriamente. *Amostras coletadas apenas no verão.

TRATAMENTOS (EVENTOS TRANSGÊNICOS E CONTROLE)	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4
1	909.637	966.187	971.863	-
2	22.888	523.926	653.503	468.811
3	906.097	391.205	827.515	-
4	380.524	437.897	186.676	284.358*
5	763.916	625.183	816.620	-
6	685.242	333.984	153.351	-
7	731.689	379.669	79.437	505.962*
8	586.456	833.679	250.397	-
9	263.885	161.377	264.801	-

O material coletado, após identificado com o símbolo de risco biológico, foi transportado por via aérea para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal da PUCRS, autorizado a desenvolver pesquisas com plantas transgênicas (CQB 0136/01). Todo o material biológico, após ser analisado, foi destruído por incineração em local apropriado para este fim.

Foram realizadas duas coletas, a primeira na primavera de 2009 e a segunda no verão de 2010. O Laboratório de Biotecnologia Vegetal da PUCRS foi o responsável pela coleta do material em ambas as estações. A importância das coletas em diferentes estações do ano é verificar a diferença de composição e/ou quantidade percentual dos compostos devido às diferenças climáticas.

Na primeira coleta, denominada coleta 01, foram coletadas dos 08 eventos transgênicos e do controle, 28 amostras. Deste número, apenas 25 puderam ser utilizadas devido à massa insuficiente das demais para a realização dos experimentos. O quadro 4.2 mostra as amostras coletadas com as suas respectivas identificações.

Quadro 4.2 – Amostras coletas na coleta 01 com suas respectivas identificações.

TRATAMENTOS (EVENTOS TRANSGÊNICOS E CONTROLE)	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4
1	909.637	-	971.863	-
2	-	-	653.503	468.811
3	906.097	391.205	827.515	-
4	380.524	437.897	186.676	-
5	763.916	625.183	816.620	-
6	685.242	333.984	153.351	-
7	731.689	379.669	79.437	-
8	586.456	833.679	250.397	-
9	263.885	161.377	264.801	-

Na segunda coleta, denominada coleta 02, foram coletadas 30 amostras dos dos 08 eventos transgênicos e do controle. Destas, apenas 28 puderam ser utilizadas devido à massa insuficiente das demais para a realização dos experimentos. O quadro 4.3 mostra as amostras coletadas com as suas respectivas identificações.

Quadro 4.3 - Amostras coletas na coleta 02 com suas respectivas identificações.

TRATAMENTOS (EVENTOS TRANSGÊNICOS E CONTROLE)	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4
1	909.637	966.187	971.863	-
2	22.888	-	653.503	468.811
3	906.097	391.205	827.515	-
4	380.524	437.897	186.676	284.358
5	763.916	625.183	816.620	-
6	685.242	-	153.351	-
7	731.689	379.669	79.437	505.962
8	586.456	833.679	250.397	-
9	263.885	161.377	264.801	-

4.2. Extração do óleo

A extração do OE foi feita por arraste a vapor em duplicata, sendo a massa de folhas frescas de cada extração 110 g para a primeira coleta e 400 g para a segunda. O equipamento utilizado é constituído de um balão de 5 L com uma resistência imersa, seguido do vaso extrator onde é colocado o material vegetal e um clevenger, onde o óleo misturado ao vapor é condensado e separado. O tempo total do experimento foi de aproximadamente 1h30min. A figura 4.2 mostra o equipamento experimental.



Figura 4.2 – Unidade laboratorial de destilação por arraste a vapor.

4.3. Cálculo do rendimento e densidade do óleo

O rendimento de óleo é calculado relacionando a massa de material vegetal utilizada e a massa da quantidade final de óleo obtida. O cálculo é mostrado abaixo na equação 01:

$$\text{rendimento} = \frac{V_{\text{óleo}} \times d_{\text{óleo}}}{m_{\text{planta}}} \times 100 \quad (1)$$

Para transformar o volume de óleo em massa, utiliza-se a densidade do óleo. A densidade é calculada pesando-se um determinado volume de óleo, conforme mostrado na equação 02:

$$\text{densidade}(d) = \frac{m_{\text{óleo}}}{V_{\text{óleo}}} \quad (2)$$

A construção das curvas de extração se dá a partir de dados de volume coletados em um intervalo de tempo determinado. A transformação dos dados em volume para massa é da mesma maneira mostrada nas equações (1) e (2).

4.4. Análise cromatográfica

O OE, depois de ser coletado do clewenger, foi desidratado, utilizando sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), e diluído em ciclo-hexano (Merk P.A.) na proporção 1:2 em volume. A análise do óleo essencial, já diluído, de cada extração foi realizada em duplicata, utilizando cromatografia gasosa com dois diferentes detectores. Primeiro utilizou-se o espectrômetro de massas (EM) para a correta identificação dos compostos. Em um segundo momento foi utilizado o detector por ionização em chama (FID) para a quantificação em percentual em área dos compostos.

O FID é um detector muito sensível a moléculas que contenham carbono e hidrogênio (Collins, 2007), por isso pode ser utilizado para quantificar amostras ricas em compostos com carbono e hidrogênio sem a utilização de um padrão interno. Os OE são formados basicamente por terpenos, que são moléculas compostas essencialmente de carbono e hidrogênio. Por isso o FID foi utilizado para quantificar a área percentual dos compostos neste estudo, sem que fosse necessária a utilização de um padrão.

O equipamento utilizado para a análise cromatográfica foi um CG marca Agilent Technologies, modelo 7890A. A coluna utilizada foi uma HP-5MS, 5% fenilmetilpolisiloxano, 30 m x 250 μm de diâmetro interno com espessura de filme de 0,25 μm . O gás de arraste utilizado foi Hélio ultra puro com fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do injetor 250 $^{\circ}\text{C}$, volume de injeção 01 μL , no modo split, razão de split 1:55. O método de análise inicia a uma temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$, que se mantém durante 08 min, aumentando a 03 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 180 $^{\circ}\text{C}$, mantendo esta temperatura por 01 min, aumentando a 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 250 $^{\circ}\text{C}$ e mantendo essa temperatura por 10 min. O detector utilizado foi o FID a 280 $^{\circ}\text{C}$.

A análise por CG/EM foi realizada no mesmo cromatógrafo e condições de análise citada acima, acoplado a um espectrômetro de massa marca Agilent, modelo 5975C. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e o EM foi de 230 °C, a voltagem de ionização por impacto de elétrons foi 70 eV e a faixa de massa analisada foi de 40 a 450 u.

Os compostos foram identificados através dos seus índices de retenção, determinados a partir de uma série de n-alcenos (C8-C20), com àqueles reportados na literatura (Adams, 2007). A comparação dos espectros de massas também foi realizada para a confirmação da identidade dos compostos.

4.5. Determinação da atividade antifúngica

Foram testados três fungos causadores de doenças em *Eucalyptus* tanto na fase de viveiro, quanto de floresta. Os fungos testados foram: *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis fimbriata* e *Quambalaria eucalypti*.

A verificação da atividade antifúngica dos óleos dos eucaliptos foi realizada pelo método de bioautografia indireta, que é uma variante do método de determinação de atividade antimicrobiana por difusão em ágar. É feito uma cromatografia em camada delgada (CCD) dos óleos a serem testados e a placa cromatográfica é imersa em ágar. Após o tempo de incubação pode ser visto se o extrato testado possui ou não atividade antimicrobiana.

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica gel GF254 onde foram aplicados os OE, empregando como fase móvel tolueno e

acetato de etila (93:7 em volume). A fase móvel, após a fase de eluição, foi evaporada em capela de exaustão de gases.

Os microorganismos *Quambalaria eucalypti*, *Ceratosystis fimbriata* e *Botrytis cinerea* foram padronizados pelo tubo 01 da escala de MacFarland⁴ ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL). Para cada 200 ml do meio de cultura Ágar Sabourad foram inoculados 5ml da solução padronizada de cada microorganismo ($7,5 \times 10^6$ UFC/mL). O controle negativo foi feito com o solvente utilizado como fase móvel na CCD e o positivo com o antifúngio comercial *Cetoconazol*.

Após a preparação do inóculo, adicionou-se em placas de Petry uma camada base do meio de cultura inoculado, onde foram introduzidas as placas cromatográficas e, posteriormente, acrescentou-se uma segunda camada para formar uma fina película sobre a placa de CCD. As placas de Petry foram encubadas em estufa a 24 °C e 35% de umidade por 48 horas. A figura 4.3 mostra um esquema da bioautografia indireta.

⁴ Escala óptica para quantificação de microorganismos em uma solução padronizada.

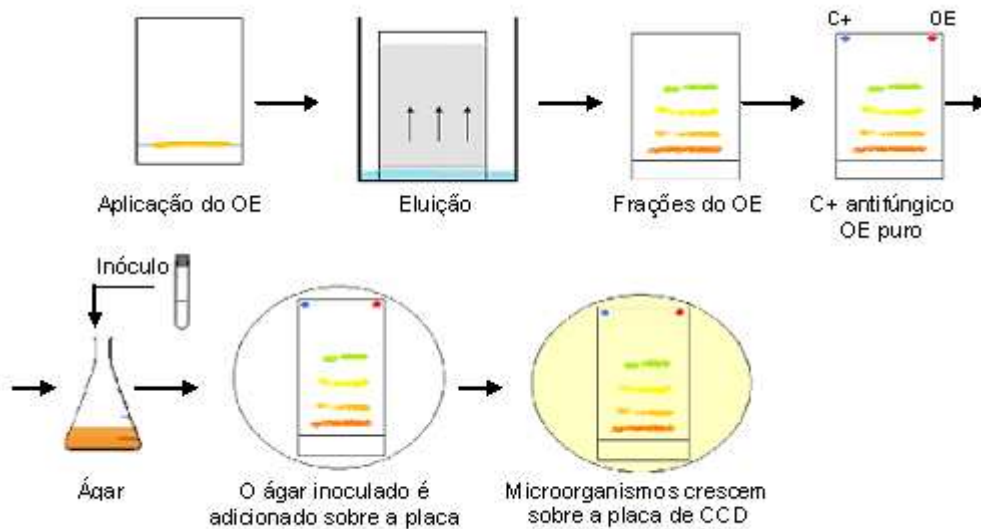


Figura 4.3 - Representação da bioautografia indireta (Adaptado de: Pereira, 2010)

4.6. Análise estatística

A análise estatística comparativa da composição química foi realizada através da técnica de Análise de Componentes Principais - PCA. O objetivo, conforme citado anteriormente, é fazer uma comparação entre os componentes do óleo extraído de *Eucalyptus* geneticamente modificados e de *Eucalyptus* convencional, para detectar diferenças na composição dos óleos essenciais extraídos das folhas por arraste de vapor.

Como não se tem a informação da orientação genética do material, que só será fornecida no final do projeto, foi realizada uma análise da composição química do OE com o objetivo de avaliar se os compostos voláteis extraídos para as diferentes amostras são estatisticamente semelhantes ou diferentes. Quando a orientação genética for conhecida, será feita a confirmação dos resultados descritos acima.

O software utilizado para realizar a análise estatística foi o *STATISTICA 7.1*. Os dados foram inseridos no programa em forma de matriz, sendo as linhas compostas pelas 08 transformações genéticas mais o controle, totalizando 09 linhas, e as colunas pelos compostos identificados em cada coleta. Os valores foram dados

em percentual em área, com estes dados o software calcula a matriz de covariância e, a partir dessa, calcula as novas variáveis, chamadas de componentes principais.

De acordo com a definição do cálculo do PCA, o total das novas variáveis será, impreterivelmente, o número de casos (linhas) utilizados menos um. No estudo em questão tem-se 09 casos, então o número de componentes principais foi 08. Estas 08 novas variáveis representam a variância total das variáveis originais e cada um tem um percentual representativo. O primeiro é o que possui percentual mais alto, ou seja, é o mais representativo da variação dos dados, a partir dele este percentual vai diminuído até chegar ao último componente, totalizando 100% da variância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Coleta 01 – Primavera

A primeira coleta de folhas, denominada de coleta 01, foi realizada durante a primavera em 07 de novembro de 2009. Não se teve acesso a uma quantidade grande de material vegetal, apenas 110 g que foram divididas em duas extrações para cada evento transgênico mais o controle, totalizando 55 g de folha para cada extração. Vale salientar que não se sabe qual dos tratamentos é o controle.

5.1.1. Rendimento

Para a primeira coleta, não foram coletados dados de volume durante a extração para o cálculo do rendimento. Isto se deve a pouca quantidade de material vegetal disponível e, conseqüentemente, pequeno volume de óleo essencial obtido. A média de volume final de óleo que se obteve em cada extração foi de 0,4 mL. Considerando uma massa média de folhas utilizada nas extrações de 55 g, tem-se um rendimento global de 0,7 mL de óleo por 100 g de folhas. A densidade foi medida pesando-se um volume de 0,4 mL de óleo, obtendo-se uma massa de 0,36 g. O resultado, calculado pela equação (2) da seção 4.3, foi uma densidade de 0,9 g/mL (medida a 25°C). O rendimento em base mássica, calculado pela equação (1) da seção 4.3 foi de 0,6%.

5.1.2. Análise cromatográfica

Na primeira coleta, 51 compostos foram identificados por EM e pelos índices de retenção (Adams, 2007). Na tabela 5.1 estão representados todos os compostos identificados nesta coleta de acordo com o valor médio de percentual em área para

a triplicata de cada tratamento genético mais o controle. Os valores são dados pela média das amostras que compõe cada evento transgênico e o controle. O desvio padrão dessas amostras pode ser visto no Anexo 1.

Tabela 5.1 – Composição química do óleo essencial dos eucaliptos para a primeira coleta. Os valores são dados em percentual em área em função dos componentes identificados no óleo essencial para cada evento transgênico mais o controle. As análises foram realizadas por CG e CG/EM.

COLETA 01	EVENTOS TRANSGÊNICOS E CONTROLE								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
COMPOSTO ^a	% EM ÁREA ^b								
α -tujeno	0,09	0,00	0,10	0,11	0,14	0,05	0,29	0,03	0,05
α -pineno	0,53	0,35	0,46	0,37	0,67	0,40	0,53	0,51	0,41
mirreno	0,00	0,00	0,04	0,06	0,07	0,11	0,04	0,00	0,00
α -felandreno	0,32	0,37	0,25	0,35	0,26	0,09	0,33	0,38	0,25
isobutirato de isoamila	0,20	0,09	0,14	0,05	0,24	0,08	0,17	0,07	0,10
p-cimeno	21,56	17,09	19,70	17,71	23,13	16,81	23,57	19,09	17,05
limoneno	28,12	27,56	29,78	22,74	37,88	26,95	29,05	36,48	27,73
1,8-cineol	10,55	9,15	8,23	9,29	10,16	10,48	9,46	12,27	10,49
z- β -ocimeno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
γ -terpineno	2,15	1,62	2,64	1,85	2,78	2,10	2,72	3,58	2,81
cis-óxido de linalol (furanóide)	0,24	0,00	0,05	0,04	0,07	0,12	0,20	0,00	0,05
p-cimeno	0,35	0,00	0,25	0,08	0,13	0,18	0,35	0,11	0,10
linalol	0,00	0,00	0,05	0,00	0,07	0,00	0,04	0,00	0,00
isovalerato de isopentila	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
borneol	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
terpinen-4-ol	1,18	1,04	1,29	1,10	0,96	1,25	1,24	1,02	1,19
p-cimen-8-ol	1,05	0,76	0,89	0,47	0,67	0,91	0,91	0,65	0,77
α -terpineol	1,38	1,03	1,48	1,28	0,73	1,76	1,49	1,08	1,39
trans-carveol	0,31	0,11	0,25	0,23	0,21	0,20	0,20	0,11	0,11
cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol	0,77	0,58	0,62	0,53	0,47	0,75	0,62	0,44	0,68
carvona	0,30	0,00	0,08	0,04	0,09	0,11	0,10	0,11	0,05
piperitona	0,27	0,10	0,28	0,24	0,22	0,19	0,29	0,16	0,26
acetato de trans-óxido de linalol	0,00	0,00	0,14	0,04	0,10	0,03	0,06	0,03	0,06
timol	0,37	0,14	0,35	0,33	0,26	0,36	0,37	0,19	0,42

carvacrol	0,52	0,44	0,41	0,44	0,25	0,51	0,34	0,30	0,46
acetato de α-terpenil	6,51	5,85	7,65	6,87	5,38	8,42	7,05	6,83	9,74
α-copaeno	0,00	0,07	0,00	0,00	0,02	0,00	0,04	0,00	0,00
E-jasmona+Z-jasmona	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00
α-gurjuneno	0,10	0,10	0,00	0,07	0,02	0,00	0,06	0,00	0,00
E-cariofileno	2,77	3,83	2,39	3,23	1,50	2,74	2,25	2,36	2,90
α-guaieno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
α-humuleno	0,48	0,65	0,44	0,59	0,26	0,44	0,42	0,39	0,44
9-epi-(E)-cariofileno	0,61	0,58	0,79	0,70	0,24	0,49	0,90	0,50	0,47
β-selineno	0,14	0,16	0,11	0,20	0,05	0,13	0,08	0,03	0,08
cis-β-guaieno	0,00	0,12	0,17	0,00	0,00	0,24	0,06	0,18	0,00
biciclogermacreno	0,62	0,91	0,39	0,89	0,33	0,25	0,37	0,44	0,76
α-muuroleno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,01	0,00
cis-calameno	1,38	1,54	1,09	1,65	0,58	1,32	0,76	0,91	1,22
α-calacoreno	0,05	0,15	0,10	0,17	0,02	0,29	0,11	0,02	0,00
maaliol	0,50	0,76	0,60	0,84	0,29	0,55	0,53	0,44	0,55
espatulenol	5,97	9,33	6,73	10,35	4,00	7,80	6,05	5,16	7,06
óxido de cariofileno	1,70	2,47	2,25	2,30	1,64	3,67	2,03	1,68	3,14
globulol	1,08	1,63	0,00	2,89	0,25	0,84	0,68	1,12	1,53
viridiflorol	1,91	2,83	2,10	3,54	0,88	2,50	1,43	1,12	1,36
cubeban-11-ol	0,17	0,33	0,14	0,58	0,10	0,00	0,63	0,12	0,16
rosifoliol	0,85	1,35	0,99	1,39	0,46	1,03	0,89	0,74	1,01
iso-leptospermona	0,72	1,15	0,66	1,04	0,31	0,88	0,53	0,59	0,74
1-epi-cubenol	1,07	1,24	1,03	1,60	0,66	1,23	0,98	0,85	1,17
epi-α-cadinol	0,81	1,17	0,95	1,08	0,44	1,27	1,06	0,71	0,74
α-muurolol	0,50	0,88	0,90	0,91	0,44	0,65	0,70	0,53	0,62
α-cadinol	0,26	0,59	0,50	0,42	0,20	0,17	0,36	0,01	0,21

^a = identificação baseada na comparação de espectros de massa (EM) e índices de retenção (IR) com a literatura (Adams, 2007).

^b = Os valores correspondem ao percentual em área, obtido com o FID, que cada pico representa da área total dos picos do cromatograma.

Os compostos que apresentaram percentual em área médio maior que 1% foram: limoneno, p-cimeno, 1,8-cineol, acetato de α -terpenil, espatulenol, E-

cariofileno, γ -terpineno, óxido de cariofileno, viridiflorol, α -terpineol, cis-calameno, terpinen-4-ol, globulou, 1-epi-cubenol, nesta ordem de percentual em área.

5.1.3. Análise estatística

Para a primeira coleta, 89,91% da variância total dos dados foram representados pelos dois principais componentes da análise de componentes principais. Observou-se que dois compostos destacaram-se dos demais, p-cimeno e limoneno. Este comportamento já era esperado, visto que estes compostos são os majoritários e a covariância destes com os demais é grande. A amplitude do vetor indica a variância destas variáveis (compostos), e a direção do vetor indica de que forma estas variáveis contribuem na variação percentual dos dados originais.

O limoneno mostrou uma variação positiva em ambos os fatores, e contribui mais para explicar a variação no fator 01. Já o p-cimeno possui uma distribuição de sua variação positiva no fator 01 e negativa no fator 02, contribuindo mais para explicar a variação dos dados neste último fator. Estes comportamentos são apresentados na figura 5.1.

Analisando o desvio padrão para cada variável, é possível observar o que foi descrito acima e que está representado na figura 5.1. Os compostos com os maiores desvios padrão são justamente aqueles que se destacaram na análise dos componentes principais (em torno de 2% para o p-cimeno e 4% para o limoneno, com uma área média de 19% e 29%, respectivamente). Os outros compostos, que se concentram ao redor da origem do gráfico, possuem um desvio padrão próximo de zero (em torno de 0,2%). As exceções, que possuem desvio padrão acima da média, mas abaixo dos valores do p-cimeno e limoneno são o 1,8-cineol (1%) e o espatulenol (2%). Ambos se destacam da origem do gráfico, porém com vetores de magnitude menor que o p-cimeno e limoneno.

A figura 5.2 representa o gráfico de PCA para os 08 tratamentos genéticos mais o controle para a coleta 01. Os vetores no fator 01 não passam de 0,15 e no fator 02 de 0,05. Isto significa que a covariância entre os eventos, valores que são

representados pelos eixos do gráfico, é muito pequena, visto que quanto mais próximo de zero o valor de covariância, menos as variáveis diferem entre si em termos de variação, além de que os valores estão abaixo do desvio padrão médio dos compostos, que é 0,2%. Os valores de variação entre os eventos são maiores para o fator 01 devido este representar 76,20% da variação dos dados originais contra 13,71% de representação do fator 02.

A figura 5.3 representa o dendograma para a coleta 01. Este tipo de gráfico agrupa os eventos similares e correlaciona com os demais. Quanto maior o bloco, mais distantes os valores das variáveis estão, ou seja, apresentam uma maior variação. Os grupos são formados a partir de duas amostras com menor variação, aumentando o número de componentes no grupo de acordo o aumento da variação entre as amostras. As distâncias entre os grupos são definidas pelo cálculo da Distância Euclidiana⁵ e são os valores que aparecem no eixo x. Estes valores aparecem na mesma unidade das variáveis em questão, ou seja, percentual em área.

⁵ Cálculo da Distância Euclidiana: $d_{i,j} = \left\{ \sum_{k=1}^p (x_{i,k} - x_{j,k})^2 \right\}$ (Lapponi, 2005)

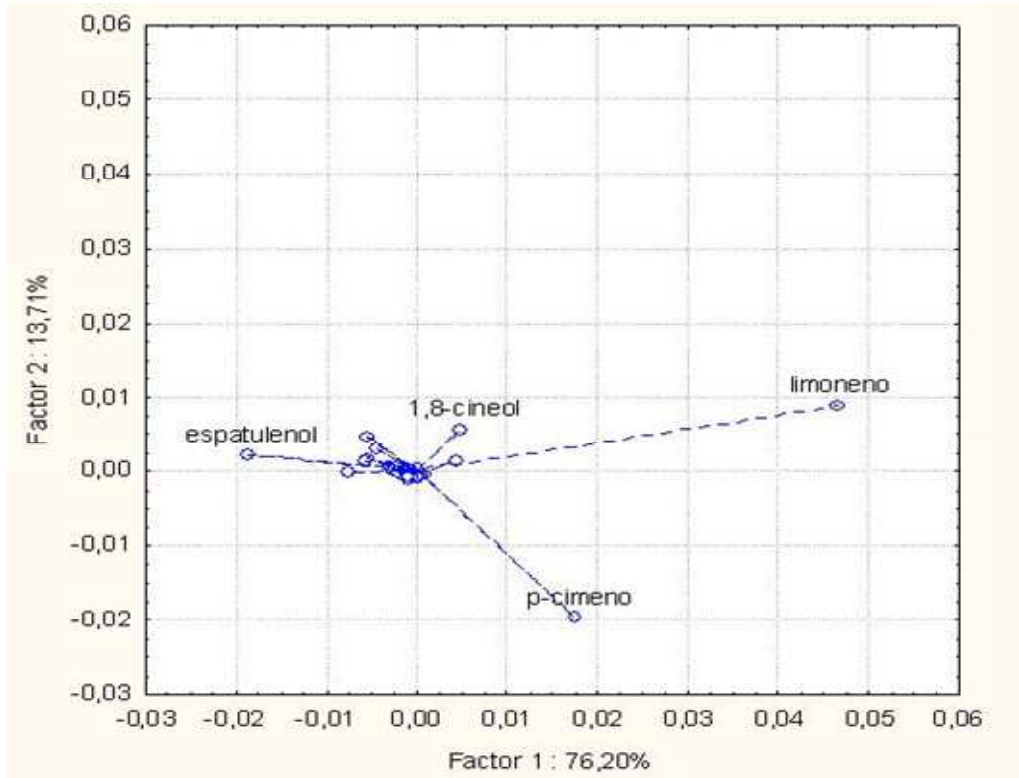


Figura 5.1 - Comportamento de variação dos compostos para a coleta 01

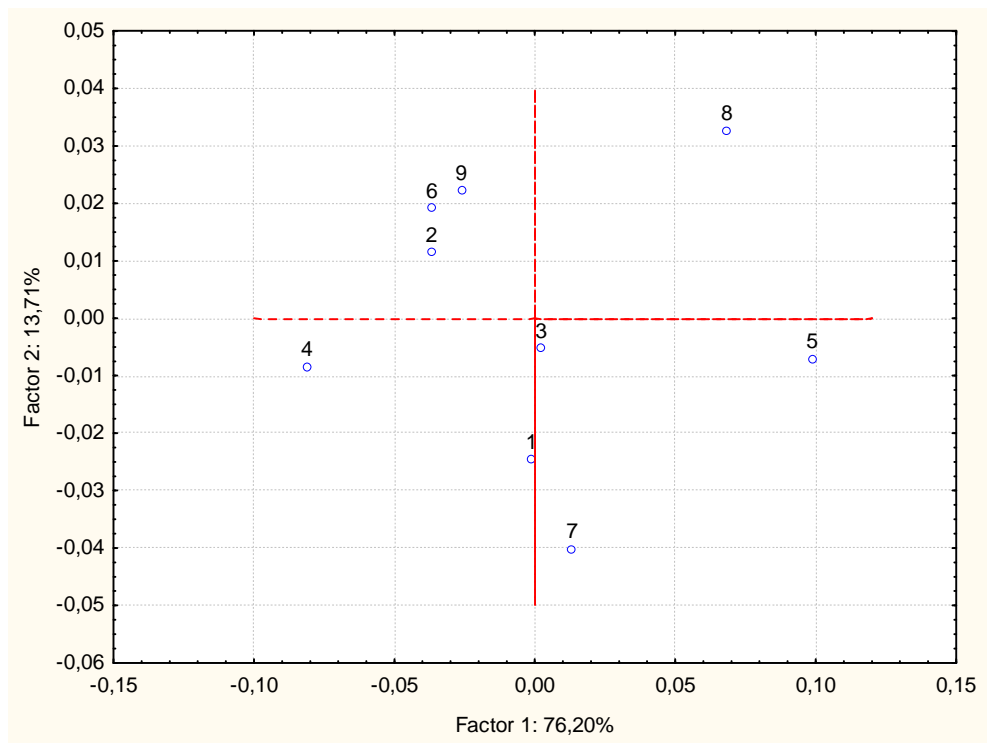


Figura 5.2 - Comportamento de variação entre os eventos para a coleta 01

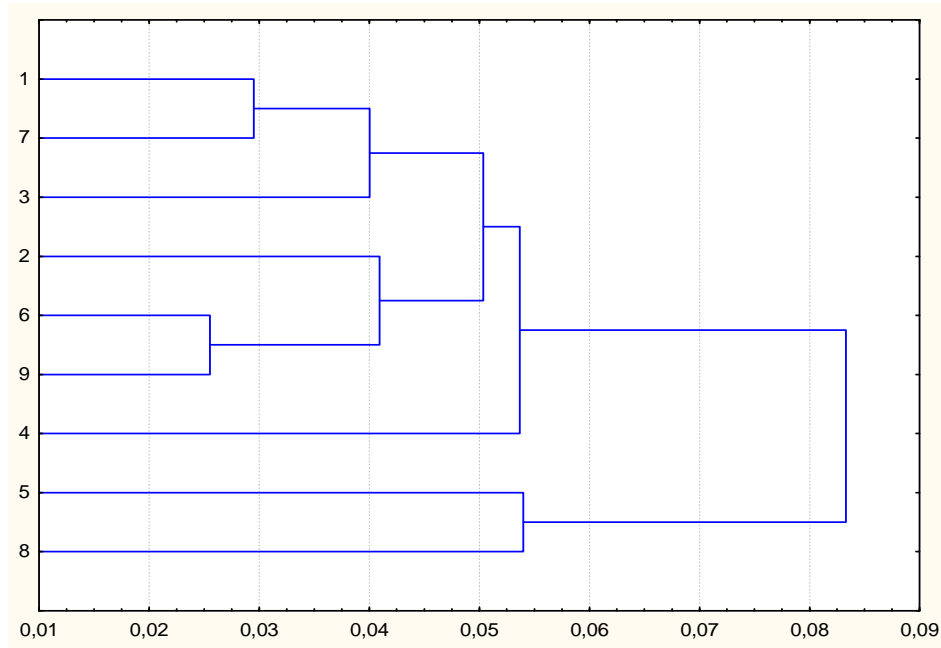


Figura 5.3 – Dendrograma para a coleta 01. O eixo y representa os tratamentos genéticos mais o controle e o eixo x representa a distância euclidiana entre os agrupamentos.

Analisando o gráfico acima, observa-se que o valor máximo do eixo x é de 0,09. Considerando que este eixo possui a mesma unidade das variáveis e que indica variação entre os grupos, pode-se afirmar que a máxima variação entre os eventos foi de 0,085%, aproximadamente. Este valor está abaixo do desvio médio padrão dos compostos que é de 0,2%. Pode-se concluir, então, que a variação existente entre os grupos não é significativa visto que é menor que o desvio padrão médio das variáveis. As exceções desta variação são àqueles compostos citados anteriormente que se destacam no gráfico do PCA, devido à maior quantidade destes nas amostras. Mesmo eles possuindo desvio padrão maior que o desvio médio encontrado para os demais compostos, eles não interferem na variância total dos dados, pois a maior distância de variação encontra-se abaixo do desvio padrão médio e não entre o valor médio e o valor dos desvios destes compostos.

5.1.4. Ação antifúngica

As análises para determinação da atividade antifúngica dos óleos dos eucaliptos para a primeira coleta não foram realizadas devido à falta de material disponível. A quantidade média de óleo que se obtinha de cada planta foi suficiente apenas para as análises cromatográficas, objetivo principal deste trabalho. A ação antifúngica foi testada somente na segunda coleta.

5.2. Coleta 02 – Verão

De posse dos resultados obtidos na coleta 01, pode-se observar que era necessária maior quantidade de material vegetal para que os experimentos fossem mais precisos e para que outros ensaios pudessem ser realizados, como o da ação antifúngica. A segunda coleta de folhas, denominada coleta 02, foi realizada durante o verão em 25 de fevereiro de 2010. Foram coletadas 400 g de folhas para as extrações em duplicata de cada evento, ou seja, 200 g para cada extração. Não se sabe qual dos eventos é o controle.

5.2.1. Rendimento

As curvas de rendimento de OE *versus* tempo foram construídas medindo, a cada 5 min, o volume de extrato obtido. O processo foi finalizado no momento em que não ocorresse variação de volume para três medidas consecutivas, isto é, após um período de tempo de 15 min. As curvas de extração que comparam os rendimentos de cada evento e do controle estão representadas na figura 5.4. Os valores de rendimento para a construção das curvas são uma média das amostras de cada um dos 08 eventos transgênicos mais o controle. As curvas com os respectivos desvios padrão é mostrado no Anexo 2. O volume médio de óleo obtido das extrações com 200 g foi de 1,5 mL, resultando em um rendimento global de 0,75% em base mássica ($d = 0,9 \text{ g/mL}$, a 25°C).

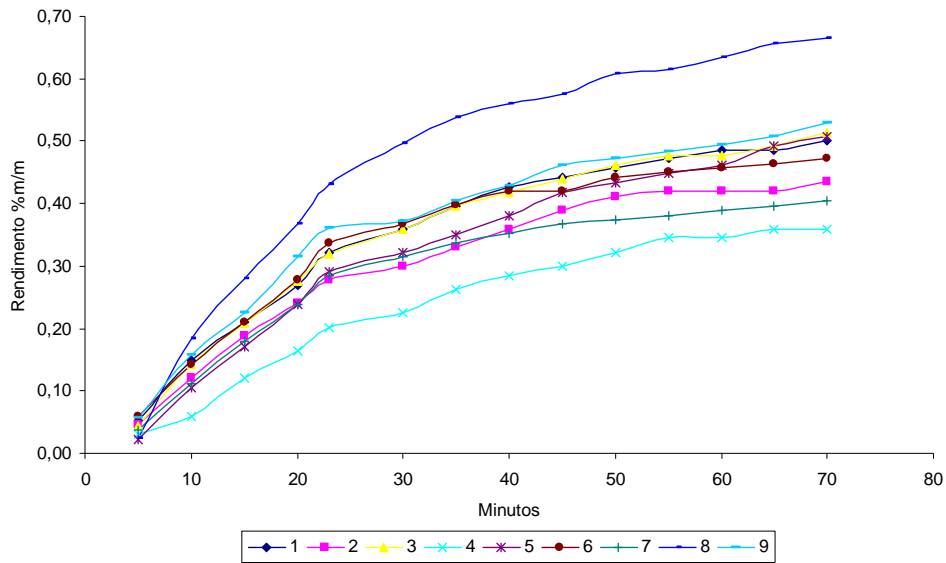


Figura 5.4 – Curvas de extração para os tratamentos genéticos e o controle da segunda coleta. Os números abaixo do eixo dos minutos significa a triplicata a que cada curva pertence.

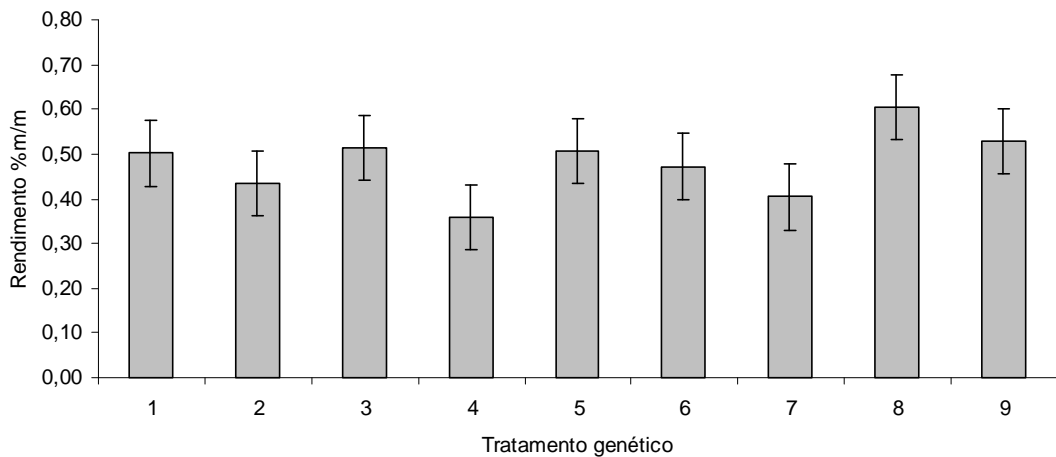


Figura 5.5 – Rendimento final para cada tratamento genético com o respectivo desvio padrão.

Nas curvas de rendimento (figura 5.4) e no gráfico de rendimento final (figura 5.5) pode-se observar que a curva do tratamento 08 possui uma diferença de rendimento maior com as demais. Já a curva do tratamento 04 possui uma diferença menor em relação às demais. Esta variação pode ser relativa à modificação

genética sofrida pelas plantas, porém, para que se possa afirmar, será necessário um estudo mais aprofundado sobre o assunto. Outro fator que pode ter causado esta variação é o teor de umidade das folhas, visto que uma pequena variação de umidade pode causar uma significativa diferença no rendimento. Até a diferença de tempo da coletas das folhas entre uma árvore e outra pode influenciar no teor de umidade das folhas.

5.2.2. Análises Cromatográficas

Para a segunda coleta, um total de 50 compostos foi identificado. A tabela 5.2 mostra todos os compostos identificados de acordo com o valor médio de percentual em área para as amostras de cada transformação genética mais o controle. O desvio padrão dessas amostras pode ser visto no Anexo 1.

Tabela 5.2 – Composição química do óleo essencial dos eucaliptos para a primeira coleta. Os valores são dados em percentual de área em função dos componentes identificados no óleo essencial para cada tratamento genético mais o controle. As análises foram realizadas por CG e CG/EM.

COLETA 02	EVENTOS TRANSGÊNICOS E CONTROLE								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
COMPOSTO ^a	% EM ÁREA ^b								
α -tujeno	0,29	0,20	0,20	0,20	0,25	0,24	0,20	0,19	0,18
α -pineno	0,77	0,96	0,85	0,85	0,76	0,96	0,81	0,79	0,78
mirreno	0,15	0,03	0,00	0,07	0,12	0,11	0,07	0,05	0,07
α -felandreno	0,42	0,49	0,37	0,40	0,46	0,57	0,38	0,29	0,42
isobutirato de isoamila	0,00	0,22	0,12	0,21	0,06	0,14	0,13	0,17	0,16
p-cimeno	20,38	23,48	20,92	24,47	19,22	21,29	23,46	20,52	22,61
limoneno	39,83	44,52	43,64	41,86	39,93	44,47	41,95	42,14	40,02
1,8-cineol	7,12	5,50	7,70	5,73	8,32	6,93	5,81	7,27	5,88
Z- β -ocimeno	0,03	0,19	0,14	0,16	0,11	0,19	0,17	0,15	0,15
γ -terpineno	3,58	5,89	5,30	5,12	3,89	5,62	5,33	5,23	5,63
óxido de cis-linalol (furanóide)	0,08	0,04	0,00	0,02	0,14	0,03	0,03	0,00	0,00
terpinoleno	0,12	0,16	0,07	0,13	0,08	0,18	0,06	0,01	0,13
p-cimeno	0,13	0,11	0,07	0,09	0,20	0,09	0,22	0,01	0,09

linalol	0,15	0,21	0,19	0,18	0,18	0,18	0,18	0,16	0,16
borneol	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
terpinen-4-ol	1,20	1,21	1,11	1,03	1,43	1,13	1,10	1,05	1,04
p-cimen-8-ol	0,42	0,41	0,40	0,47	0,55	0,41	0,48	0,46	0,52
α -terpineol	0,98	0,95	0,99	0,89	1,24	0,96	1,01	0,94	0,92
trans-carveol	0,20	0,11	0,15	0,12	0,22	0,10	0,15	0,09	0,15
cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol	0,36	0,29	0,31	0,31	0,44	0,29	0,31	0,31	0,31
carvona	0,09	0,03	0,05	0,07	0,12	0,06	0,06	0,05	0,10
piperitona	0,21	0,19	0,20	0,19	0,24	0,19	0,19	0,19	0,20
acetato de trans-óxido de	0,09	0,04	0,05	0,04	0,04	0,11	0,06	0,05	0,07
timol	0,11	0,17	0,21	0,20	0,21	0,10	0,20	0,22	0,21
carvacrol	0,26	0,20	0,25	0,25	0,28	0,22	0,25	0,28	0,26
acetato de α -terpenil	4,42	4,94	4,99	4,84	4,95	4,50	4,87	5,06	6,14
α -copaeno	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
β -elemeno	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
Z-jasmona	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
α -gurjuneno	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,03
E-cariofilene	2,09	1,17	1,13	1,17	1,45	1,11	1,27	1,37	1,50
aromandreno	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
α -guaieno	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
cis-muuroala-3,5-dieno	0,10	0,00	0,06	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
α -humuleno	0,27	0,21	0,13	0,08	0,27	0,20	0,23	0,25	0,27
allo-aromandreno	0,34	0,18	0,30	0,18	0,25	0,18	0,22	0,23	0,24
9-epi-(E)-cariofileno	0,30	0,26	0,13	0,19	0,37	0,27	0,28	0,28	0,32
trans-cadina-1(6),4-dieno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
β -selineno	0,04	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00	0,03	0,00	0,06
biciclogermacreno	0,65	0,50	0,40	0,43	0,48	0,35	0,47	0,45	0,61
δ -cadineno	0,69	0,39	0,40	0,41	0,52	0,39	0,45	0,48	0,51
α -calacoreno	0,04	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00	0,03
flavesona	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
espatulenol	5,57	2,57	3,50	3,59	5,15	3,24	3,67	4,37	3,72
óxido de cariofileno	1,25	0,98	1,53	1,07	1,01	1,25	1,16	1,40	1,08
viridiflorol+cubeban-11-ol	0,81	0,41	0,64	0,65	0,92	0,57	0,68	0,52	0,78
1-epi-cubenol	0,72	0,40	0,49	0,51	0,65	0,44	0,52	0,59	0,55

iso-leptospermona	0,56	0,32	0,47	0,44	0,57	0,42	0,44	0,50	0,44
α-muurolol	0,20	0,21	0,14	0,21	0,19	0,11	0,15	0,17	0,23
α-cadinol	0,24	0,03	0,17	0,10	0,23	0,11	0,17	0,20	0,15

^a = identificação baseada na comparação de espectros de massa (MS) e índices de retenção (IR) com a literatura (Adams, 2007).

^b = Os valores correspondem ao percentual em área, obtido com o FID, que cada pico representa da área total dos picos do cromatograma.

Conforme pode ser observado na tabela 5.2, os compostos que apresentaram percentual médio maior que 1% para a segunda coleta foram: limoneno, p-cimeno, 1,8-cineol, γ -terpineno, acetato de α -terpenil, espatulenol, E-cariofileno, óxido de cariofileno e terpinen-4-ol, nesta ordem de percentual em área. Nota-se que os compostos com percentual em área maior que 1%, para todos os eventos genéticos mais o controle na coleta 02, aparecem nas mesmas condições para a coleta 01. O que muda é a quantidade, ou seja, o percentual em área, que corresponde a um valor relativo. As exceções são o cis-calameno e o globulol que aparecem apenas na coleta 01 com percentual acima de 1%. Estas diferenças quantitativas são esperadas devido à diferença da estação do ano em que as folhas foram coletadas (Simões et al., 2007).

Observa-se também que alguns compostos estão presentes apenas na primeira coleta e outros apenas na segunda coleta. Porém, a quantidade destes compostos pode ser considerada traço, ou seja, menor que 1% em área, com exceção do cis-calameno e globulol na coleta 01. Na tabela 5.3 e 5.4 estes compostos podem ser visualizados assim como suas respectivas quantidades nas coletas.

Tabela 5.3 – Componentes do óleo essencial dos eucaliptos que foram identificados apenas na coleta 01.

COLETA 01	EVENTO TRANSGÊNICO MAIS CONTROLE ^a								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
COMPOSTOS	% EM ÁREA								
isovalerato de isopentila	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
cis- β -guaieno	0,00	0,12	0,17	0,00	0,00	0,24	0,06	0,18	0,00
cis-calameno	1,38	1,54	1,09	1,65	0,58	1,32	0,76	0,91	1,22
maliolol	0,50	0,76	0,6	0,84	0,29	0,55	0,53	0,44	0,55
globulol	1,08	1,63	0,00	2,89	0,25	0,84	0,68	1,18	1,53
cubeban-11-ol	0,17	0,33	0,14	0,58	0,10	0,00	0,63	0,12	0,16
rosifoliol	0,85	1,35	0,99	1,39	0,46	1,03	0,89	0,74	1,01
epi- α -cadinol	0,81	1,71	0,95	1,08	0,44	1,27	1,06	0,71	0,14

^a = Os valores correspondem ao percentual em área, obtido com o FID, que cada pico representa da área total dos picos do cromatograma.

Tabela 5.4 – Componentes do óleo essencial dos eucaliptos que foram identificados apenas na coleta 02.

COLETA 02	EVENTO TRANSGÊNICO MAIS CONTROLE ^a								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
COMPOSTOS	% EM ÁREA								
terpinoleno	0,12	0,16	0,07	0,13	0,08	0,18	0,06	0,01	0,13
β -elemeno	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
aromandreno	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
cis-muurola-3,5-dieno	0,10	0,00	0,06	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
allo-aromandreno	0,34	0,18	0,30	0,18	0,25	0,18	0,22	0,23	0,24
trans-cadina-1(6),4-diene	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
flavesona	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03

^a = Os valores correspondem ao percentual em área, obtido com o FID, que cada pico representa da área total dos picos do cromatograma.

O fato dos compostos terem sido identificados em apenas uma das coletas, não significa que ele não exista nas duas. A quantidade destes compostos no

extrato pode ser tão pequena naquela coleta que eles não são detectáveis devido a restrições de sensibilidade do equipamento e/ou método de análise definido para a realização das análises, previamente descrito no item 4.4.

5.2.3. Análise estatística

Para a segunda coleta, 95,16% da variância dos dados foi representada pelos dois principais fatores resultantes da análise estatística. Além dos dois compostos que se destacaram na primeira coleta (limoneno e p-cimeno), o 1,8-cineol também apresentou uma variância maior em relação aos demais compostos. A representação do exposto acima pode ser observada na figura 5.6.

Analisando o desvio padrão para cada variável, é possível observar o que foi descrito previamente e que está representado na figura 5.5. Os compostos com os maiores desvios padrão são justamente aqueles que se destacaram na análise dos componentes principais (em torno de 1% para o p-cimeno, limoneno e 1,8-cineol, com uma área média de 22%, 42% e 7%, respectivamente). Os outros compostos que se concentram ao redor da origem do gráfico, possuem um desvio padrão próximo de zero (em torno de 0,1%). As exceções que possuem desvio padrão acima da média, mas abaixo dos valores do p-cimeno, limoneno e 1,8-cineol são γ -terpineno (0,8%) e espatulenol (0,9%). Estes também se afastam da origem do gráfico, porém com vetores de magnitude menor que o p-cimeno, limoneno e 1,8-cineol.'

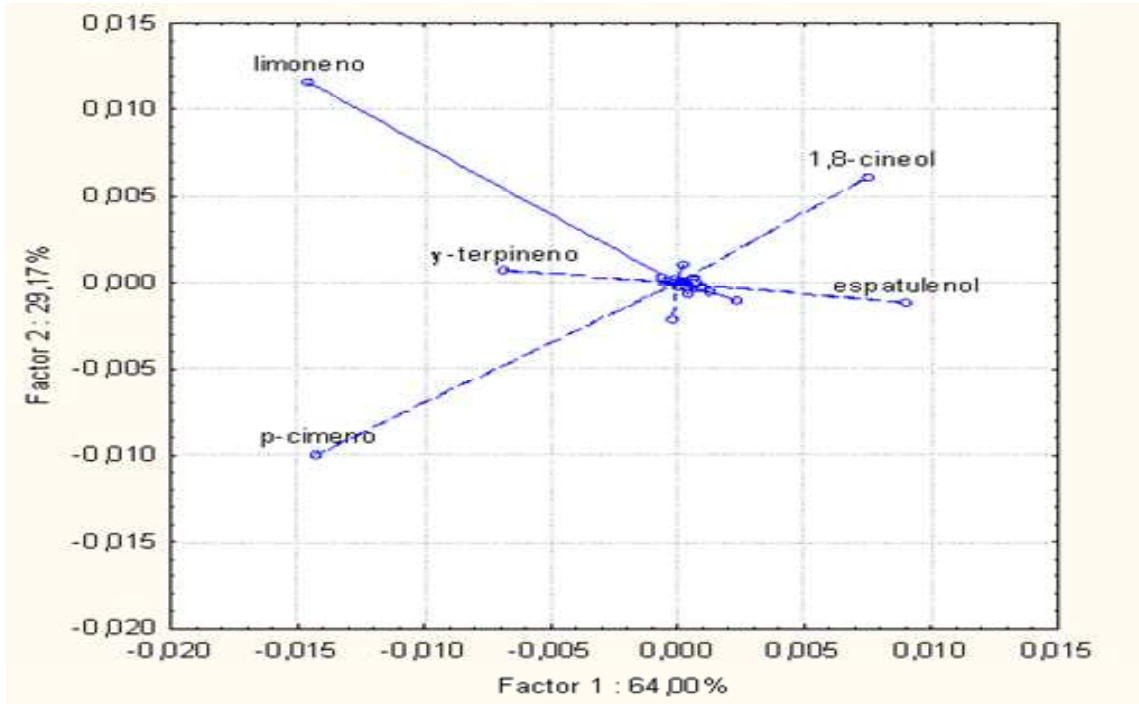


Figura 5.6 - Comportamento de variação dos compostos para a coleta 02

Os valores de desvio padrão para a coleta 02 foram menores que os valores para a coleta 01. Este fato deve-se a maior precisão dos resultados experimentais, principalmente em relação às extrações, pois na coleta 02 foi disponibilizada uma maior quantidade de material vegetal, conseqüentemente, maior quantidade de óleo obtido.

A figura 5.7 representa o gráfico de PCA para os 08 tratamentos genéticos mais o controle. Nota-se que os vetores não de passam de 0,05 nos eixos do gráfico, tanto para o fator 01 quanto para o fator 02. Isto mostra que a covariância entre os eventos, é muito pequena, visto que quanto mais próximo de zero o valor de covariância, menor a variação entre as variáveis.

A figura 5.8 representa o dendograma para a coleta 02. Os valores do eixo x estão na mesma unidade dos valores dos dados originais e representam a variação existente entre os grupos que o gráfico formou. Como pode ser observado, o valor de máxima variação está em 0,035. Este valor é muito baixo, considerando que o

desvio padrão médio encontrado para os compostos identificados nas amostras está em torno de 0,1%.

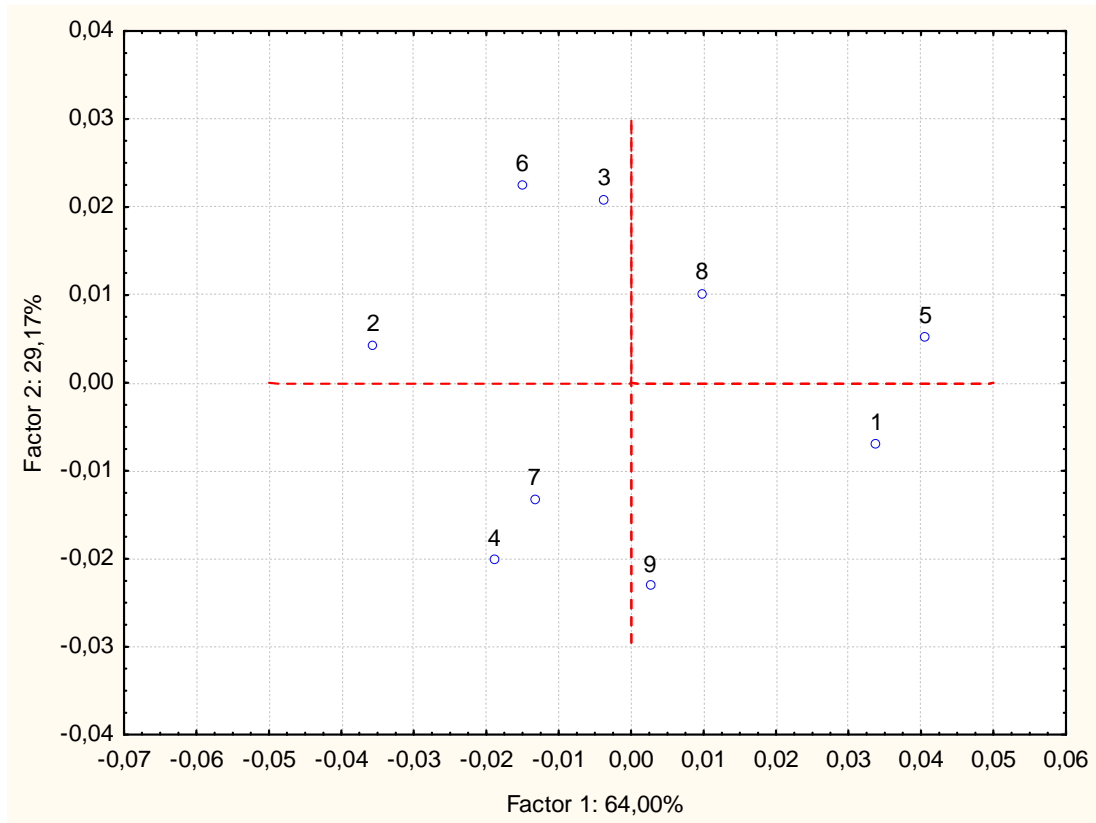


Figura 5.7 - Comportamento de variação entre os eventos para a coleta 02.

A diferença do dendograma da coleta 01 e o da coleta 02 deve-se ao erro intrínseco aos experimentos e análise e também à quantidade de material vegetal disponível em cada coleta. Observa-se que na coleta 02 os grupos são maiores e o valor máximo do eixo que representa a variação entre os grupos formados é menor quando comparado à coleta 01. Isto se deve a maior precisão experimental que a coleta 02 apresentou em virtude da maior quantidade de material vegetal com que se trabalhou. Os blocos maiores agrupam mais amostras e isso significa que a variação entre elas é tão pequena que pode ser considerada a mesma, ou seja, podem fazer parte de um mesmo grupo.

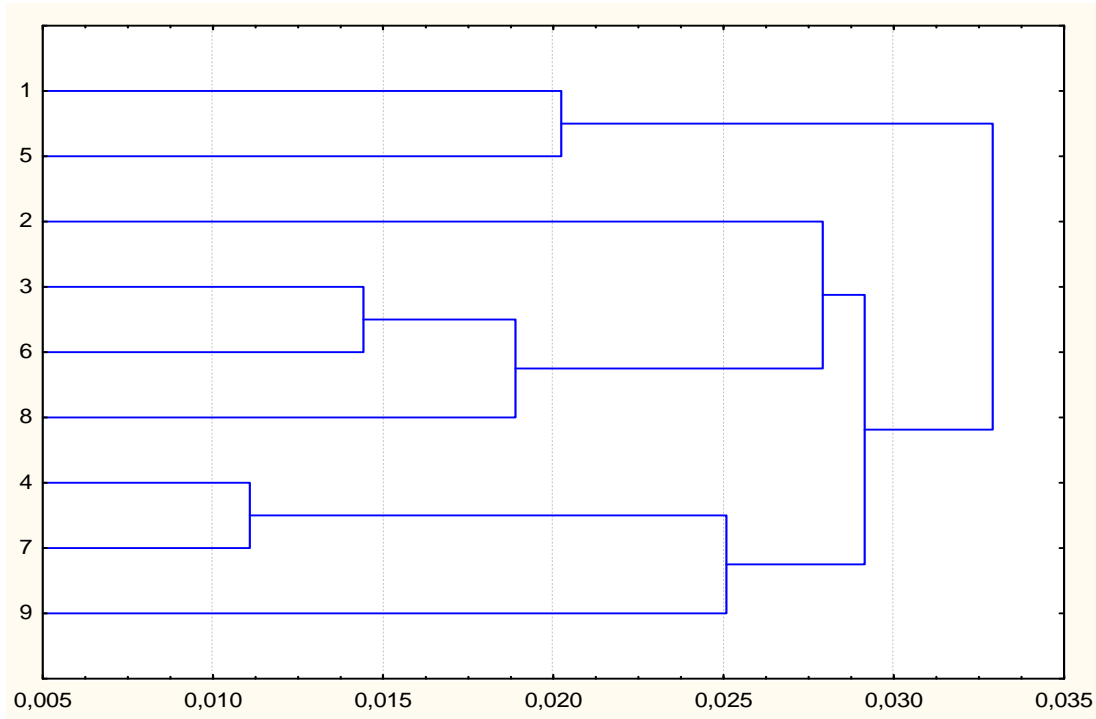


Figura 5.8 – Dendrograma para a coleta 02. O eixo y representa os tratamentos genéticos mais o controle e o eixo x representa a distância euclidiana entre os agrupamentos.

5.2.4. Ação antifúngica

Os testes de bioautografia para verificar a ação antifúngica do óleo essencial dos eucaliptos foram realizados com patógenos que causam doenças em *Eucalyptus*. Os fungos testados foram *Botrytis cinerea*, *Ceratosystis fimbriata* e *Quambalaria eucalypti*.

Os resultados obtidos mostraram que os óleos de todas os eventos genéticos e o controle têm ação antifúngica sobre os organismos testados. O quadro 5.1 mostra os resultados da bioautografia.

Analisando o quadro 5.1, é possível observar que todos os eventos genéticos, incluindo o controle que não se sabe qual é, apresentaram ação inibitória ao crescimento dos três fungos testados. Em especial o fungo *C. fimbriata*, que na figura 5.9 pode ser visto uma maior inibição ao seu crescimento em relação aos demais, representados nas figuras 5.10 e 5.11. O fungo no qual o OE dos eucaliptos

apresentou uma menor ação inibitória ao crescimento foi o *Q. eucalypti* (figura 5.10). É importante salientar que todas as amostras (08 tratamentos transgênicos mais o controle) foram testadas e apresentaram ação antifúngica. Devido ao elevado número de figuras, apenas uma amostra de cada fungo foi representada neste trabalho.

Quadro 5.1 – Ação antifúngica do óleo essencial dos 08 tratamentos genéticos mais o controle. Óleo Essencial [OE]; Fração do cromatograma [F]; Apresentou ação inibitória [+].

Eventos genéticos	<i>Quambalaria eucalypti</i>	<i>Ceratosystis fimbriata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
1	OE+; F+	OE+; F+	OE+; F+
2	OE+; F+	OE+; F+	OE+; F+
3	OE+;F+	OE+; F+	OE+; F+
4	OE+; F+	OE+; F+	OE+; F+
5	OE+;F+	OE+; F+	OE+; F+
6	OE+;F+	OE+; F+	OE+; F+
7	OE+;F+	OE+; F+	OE+; F+
8	OE+;F+	OE+; F+	OE+; F+
9	OE+;F+	OE+; F+	OE+; F+



Figura 5.9 – Resultado da bioautografia para um tratamento genético representando a inibição de crescimento ao fungo *Ceratosystis fimbriata*. As regiões onde não aparecem pontos pretos são as zonas em que houve inibição de crescimento.



Figura 5.10 – Resultado da bioautografia para um tratamento genético representando a inibição de crescimento ao fungo *Botrytis cinerea*. As regiões claras são as zonas em que houve inibição de crescimento.



Figura 5.11 – Resultado da bioautografia para um tratamento genético representando a inibição de crescimento ao fungo *Quambalaria eucalypti*. As regiões com “manchas” amareladas são as zonas em que houve inibição de crescimento.

6. CONCLUSÕES

A comparação entre as análises de *Eucalyptus* GM e não GM demonstra que não há diferenças em relação à composição do OE. As diferenças quantitativas e qualitativas observadas na composição do OE entre as estações já eram esperadas. Os OE têm sua composição alterada de acordo com as mudanças climáticas e do ambiente onde a planta está inserida (Simões et al., 2007).

Até o momento não se tem a informação sobre as construções genéticas de cada evento estudado. Devido a este fato, a afirmação do parágrafo acima é baseada nos resultados obtidos que mostram que todas as amostras testadas possuem o mesmo comportamento, além de também possuírem comportamentos típicos de plantas com relação ao seu OE como, por exemplo, a variação quantitativa com as diferenças climáticas. Quando a informação genética das plantas for conhecida, afirmações mais precisas poderão ser feitas.

Considerando a semelhança qualitativa e quantitativa entre os OE extraídos de plantas de *Eucalyptus* GM e seus controles isogênicos, não se espera que o óleo essencial produzido pelas plantas transgênicas avaliadas neste estudo cause qualquer efeito adverso ao meio ambiente, saúde humana e animal, diferente daquele já conhecido para o óleo de plantas convencionais de *Eucalyptus*.

O único parâmetro estudado que mostrou variação entre os eventos e o controle foi rendimento. Porém, para afirmar se este fato deve-se a modificação genética das plantas é necessário um estudo mais específico e aprofundado. O rendimento pode ser afetado por diversos fatores, inclusive pela umidade das folhas.

Os OE de todos os tratamentos avaliados da segunda coleta apresentaram ação inibitória ao crescimento dos fungos patogênicos de *Eucalyptus*, em especial o *C. fimbriata*. Isto mostra que o óleo produzido tanto pelas plantas transgênicas quanto pelos controles não transformados geneticamente apresentam os mesmos efeitos sobre fungos patogênicos. Este resultado indica que a capacidade natural do OE de *Eucalyptus* em proteger as plantas contra determinados fungos foi preservada nas plantas transgênicas. Desta forma, espera-se que as plantas de *Eucalyptus* GM apresentem a mesma capacidade de defesa contra patógenos encontrada nas plantas convencionais GM.

Desta forma, conclui-se que existe tanto equivalência da composição química quanto equivalência da ação antifúngica dos OE produzidos pelas plantas transgênicas avaliadas, comparadas com plantas convencionais de *Eucalyptus*, indicando a elevada biossegurança para o uso florestal destas plantas geneticamente transformadas.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como trabalhos futuros, sugere-se que sejam aprofundados os estudos de ação antifúngica destes óleos essenciais testando-os frente a outros microorganismos, assim como a realização de ensaios de determinação da concentração inibitória mínima.

A comparação de demais fatores que possam sofrer alteração com a modificação genética das plantas também devem ser testados, como por exemplo, as curvas de rendimento e a modelagem matemática destas para uma possível aplicação industrial destes óleos.

Avaliar outras propriedades dos óleos essenciais como propriedades físico-químicas, ação antioxidante e outros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gás chromatography / mass spectrometry. 4^o edição. Illinois: Allure. 2007. 804p.

FERREIRA, A. Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplane com *Eucalyptus*. Piracicaba. 2008. 77p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Brasil

ARNAL-SCHNEBELEN, Berengere; PARIS, Michel; GOETZ, Paul. Phytothérapie: la sante par les plantes. 1^o edição. França: Selection du Readers Digest, 2007. 447p.

BIZZO, H.R.; HOWELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. Química Nova, v. 32, p. 588-594. 2009.

BOREM, Aluizio. Biotecnologia simplificada. 2^o edição. Minas Gerais: UFV, 2002. 249p.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F. Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. J. Mex. Soc., v. 55, p. 57-60. 2006

CASSEL, E, VARGAS, R.M.F., BRUN, G.W., Processos de Extração Supercrítica Aplicados a Produtos Naturais In: Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapáuticos. 2^o edição. Porto Alegre : EDIPUCRS, 2008, p. 213-228.

CASSEL, E; VARGAS, R.M.F.; MARTINEZ, N; LORENZO, D.; DELLACASA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial Crops and Products*, v. 29, p. 171-176, 2009.

CASTRO, N.E.A.; CARVALHO, M.G. ; PIMENTEL, F.A. ; CORREA, R.M. ; GUIMARÃES, L.G.L. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. *Rev. Bras. Pl. Méd.*, v. 10, n. 1, p. 70-75. 2008.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. 1º edição. São Paulo: editora da UNICAMP, 2007. 456p.

COPPEN, J.J.W. *Eucalyptus – The genus Eucalyptus*. 1º edição, Londres: Taylor & Francis, 2002. 450p.

CTNBio. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: www.ctnbio.gov.br. Acesso em: janeiro de 2010.

ESTANISLAU, A.A; BARROS, F.A.S; PEÑA, A.P.; SANTOS,S.C.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V.11, n. 2, p. 95-100, 2001.

JACKSON, J.E., A user's guide to principal components. 1º edição, Nova Jersey: Wyley, 2003. 569p.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. Applied multivariate statistical analysis. 6º edição, Nova Jersey: Pearson, 2007. 773p.

LADEIRA, M.C.G. Biocontrole de *Quambalaria eucalypti* por meio de rizobactérias. Minas Gerais. 2004. 34p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. Brasil.

LAPPONI, J.C. Estatística usando o Excel. 4^o edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 476p.

LERAYER, A. Guia do eucalipto 2009. Disponível em: www.cib.org.br. Acesso em: janeiro de 2010.

LOPES, S. Plantas transgênicas. Disponível em: www.editorasaraiva.com.br/biosonialopes. Acesso em: janeiro de 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2^o edição. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LUCIA, A.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oil from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, n. 129, p. 107-114, 2008.

MANLY, B.J.F. Métodos estatísticos multivariados: uma introdução. 3^o edição. Tradução: Sara Ianda Carmona. Porto Alegre: Bookman, 2008. 229p.

MARRIOT, P.J.; SHELIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatography technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, v. 936, p. 1-22. 2001.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J.M. Basic gás chromatography. 2^o edição. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 239p.

MORAES, R., A era dos eucaliptos transgênicos. *Revista o papel*, agosto de 2008, pág. 36-40. Disponível em: www.abtcp.com.br. Acesso em: janeiro de 2010.

NASCIMENTO, F.C., NASCIMENTO, A.C., RODRIGUES, C.S., ANTONIOLLI, A.R., SANTOS, P.O., JUNIOR, A.M.B., TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), p. 108-113. 2007.

NICOLLE, D.; DUNLOP, P.J.; BIGNELL, C.M. A study of the variation with time of the compositions of the essential leaf oils of 16 *Eucalyptus* species. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 13, p. 324-328, 1998.

OLIVEIRA, F.N.M.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R.; SERAPHIN, J.C.; FILHO, E.P. Seasonal influence on the essential oil compositions of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake and *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden from Brazilian cerrado. *Journal of Essential Oil Research*, vol. 20, p. 555-559, 2008.

PEREIRA, M.A.A. Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica. Porto Alegre. 2010. 60p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). PUCRS. Brasil.

RIECHMANN, J. Cultivos e alimentos transgênicos: um guia crítico. Tradução: Ricardo Rosenbusch. 1ª edição. Rio de Janeiro: Vozes, 2002. 284p.

ROOD, D. The troubleshooting and maintenance guide for gas chromatography. 4ª edição. Califórnia: Wiley-VCH, 2007. 326p.

SANTOS, A.F., JUNIOR, A.G.A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Paraná: EMBRAPA, 2001. 20p. (Série: Circular Técnica 45).

SILVA, A.R. Tudo sobre aromaterapia: como usa-la para melhorar sua saúde física, emocional e financeira. 2ª edição. São Paulo: Roca, 2001. 576p.

SILVA, P.H. M., et al. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. *Sci. Agric.*, vol. 63, n. 1, p. 85-89, 2006.

SILVA, E.C. Eucalipto & meio ambiente, outubro de 2008. Disponível em: www.aracruz.com.br. Acesso em: agosto de 2009.

SIMÕES, C.M.O. ; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6^o edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 467-485.

YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Plantas Medicinais sob a Ótica da Moderna Química Medicinal. 1^o edição. Chapecó: Argos, 2001. 500p.

ANEXO 1

Desvios padrão para as amostras que compõe cada evento transgênicos e o controle da coleta 01.

COLETA 01	EVENTOS TRANSGÊNICOS E CONTROLE								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
COMPOSTO	DESVIOS PADRÃO (% EM ÁREA)								
α -tujeno	0,13	0,00	0,08	0,12	0,02	0,09	0,26	0,06	0,08
α -pineno	0,09	0,09	0,18	0,22	0,10	0,28	0,08	0,04	0,20
mirreno	0,00	0,00	0,07	0,06	0,06	0,19	0,06	0,00	0,00
α -felandreno	0,02	0,03	0,22	0,14	0,04	0,15	0,06	0,06	0,24
isobutirato de isoamila	0,05	0,13	0,12	0,09	0,00	0,14	0,15	0,12	0,17
p-cimeno	0,95	1,26	2,77	2,18	4,01	7,34	0,92	0,76	6,35
limoneno	1,91	7,32	8,07	3,78	4,73	8,87	2,40	7,17	9,73
1,8-cineol	3,95	4,00	1,84	1,12	3,01	2,08	1,79	2,14	3,77
z- β -ocimeno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14
γ -terpineno	0,04	0,01	0,56	0,19	0,41	0,54	0,34	0,47	1,48
cis-óxido de linalol (furanóide)	0,03	0,00	0,08	0,07	0,06	0,10	0,07	0,00	0,09
p-cimeneno	0,04	0,00	0,09	0,14	0,04	0,21	0,03	0,19	0,17
linalol	0,00	0,00	0,09	0,00	0,06	0,00	0,07	0,00	0,00
isovalerato de isopentila	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
borneol	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00
terpinen-4-ol	0,04	0,15	0,26	0,12	0,07	0,20	0,08	0,29	0,04

p-cimen-8-ol	0,20	0,08	0,23	0,46	0,06	0,26	0,12	0,24	0,20
α-terpineol	0,17	0,12	0,35	0,16	0,63	0,43	0,06	0,34	0,23
trans-carveol	0,07	0,15	0,07	0,04	0,03	0,19	0,18	0,12	0,19
cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol	0,21	0,15	0,19	0,12	0,06	0,14	0,12	0,16	0,28
carvona	0,18	0,00	0,07	0,06	0,07	0,11	0,09	0,14	0,09
piperitona	0,04	0,15	0,06	0,02	0,03	0,17	0,02	0,15	0,07
acetato de trans-óxido de linalol (piranóide)	0,00	0,00	0,14	0,06	0,01	0,06	0,10	0,05	0,10
timol	0,08	0,20	0,16	0,07	0,06	0,03	0,07	0,18	0,19
carvacrol	0,14	0,07	0,21	0,24	0,11	0,30	0,19	0,15	0,19
acetato de α-terpenil	0,44	0,65	2,03	1,06	0,99	2,35	0,71	0,63	4,43
α-copaeno	0,00	0,10	0,00	0,00	0,03	0,00	0,06	0,00	0,00
E-jasmona+Z-jasmona	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00	0,00
α-gurjuneno	0,14	0,14	0,00	0,11	0,03	0,00	0,10	0,00	0,00
E-cariofileno	0,82	0,79	0,66	0,81	0,25	0,83	0,40	0,08	1,42
α-guaiano	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00
α-humuleno	0,15	0,20	0,10	0,15	0,04	0,17	0,10	0,04	0,28
9-epi-(E)-cariofileno	0,01	0,23	0,56	0,14	0,06	0,13	0,13	0,46	0,17
β-selineno	0,19	0,23	0,10	0,18	0,09	0,15	0,14	0,05	0,13
cis-β-guaiano	0,00	0,16	0,29	0,00	0,00	0,42	0,11	0,32	0,00
biciclogermacreno	0,18	0,29	0,34	0,14	0,03	0,44	0,35	0,35	0,28
α-muuroleno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	0,02	0,00
cis-calameno	0,38	0,68	0,45	0,47	0,18	0,36	0,66	0,22	0,55
α-calacoreno	0,07	0,21	0,18	0,18	0,03	0,39	0,19	0,03	0,00
maaliol	0,09	0,21	0,21	0,10	0,08	0,16	0,13	0,12	0,28
espatulenol	0,65	3,14	1,44	1,57	1,26	3,95	0,83	1,72	3,58
óxido de cariofileno	1,24	1,54	1,51	2,01	0,98	1,74	1,07	0,87	2,26
globulol	1,53	2,30	0,00	2,66	0,44	1,46	1,18	1,05	1,50

viridiflorol	0,34	1,37	0,75	0,52	0,64	1,27	1,25	1,13	0,42
cubeban-11-ol	0,24	0,47	0,25	1,00	0,17	0,00	1,09	0,21	0,27
rosifoliol	0,07	0,45	0,26	0,19	0,30	0,46	0,10	0,17	0,56
iso-leptospermona	0,48	0,30	0,21	0,72	0,14	0,21	0,02	0,21	0,33
1-epi-cubenol	0,20	0,28	0,48	0,28	0,23	0,38	0,25	0,28	0,60
epi-α-cadinol	0,17	0,30	0,28	0,48	0,13	1,14	0,62	0,29	0,48
α-muurolol	0,18	0,05	0,76	0,48	0,13	0,07	0,31	0,09	0,28
α-cadinol	0,36	0,24	0,17	0,37	0,06	0,29	0,33	0,02	0,36

Desvios padrão para amostras que compõe cada evento transgênicos e o controle da coleta 02.

COLETA 02	EVENTOS TRANSGÊNICOS E CONTROLE								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
COMPOSTO	DESVIOS PADRÃO (% EM ÁREA)								
α-tujeno	0,01	0,02	0,01	0,01	0,05	0,01	0,03	0,02	0,01
α-pineno	0,06	0,15	0,04	0,14	0,12	0,08	0,10	0,04	0,11
mirreno	0,02	0,06	0,00	0,06	0,02	0,00	0,06	0,08	0,06
α-felandreno	0,05	0,05	0,07	0,12	0,14	0,13	0,18	0,05	0,13
isobutirato de isoamila	0,00	0,01	0,18	0,01	0,10	0,12	0,11	0,00	0,01
p-cimeno	3,29	3,05	1,57	4,30	0,88	0,77	3,85	0,64	3,27
limoneno	1,01	4,57	2,88	4,58	2,00	2,30	2,64	2,64	2,05
1,8-cineol	1,58	2,36	0,66	2,16	0,36	0,67	2,20	1,06	1,94
Z-β-ocimeno	0,05	0,02	0,04	0,02	0,02	0,04	0,06	0,05	0,04
γ-terpineno	0,42	0,27	0,76	0,53	0,63	0,59	0,68	0,99	0,60
óxido de cis-linalol (furanóide)	0,07	0,08	0,00	0,03	0,02	0,06	0,06	0,00	0,00
terpinoleno	0,03	0,06	0,03	0,10	0,07	0,08	0,05	0,02	0,10
p-cimeneno	0,11	0,09	0,10	0,08	0,02	0,08	0,15	0,02	0,08

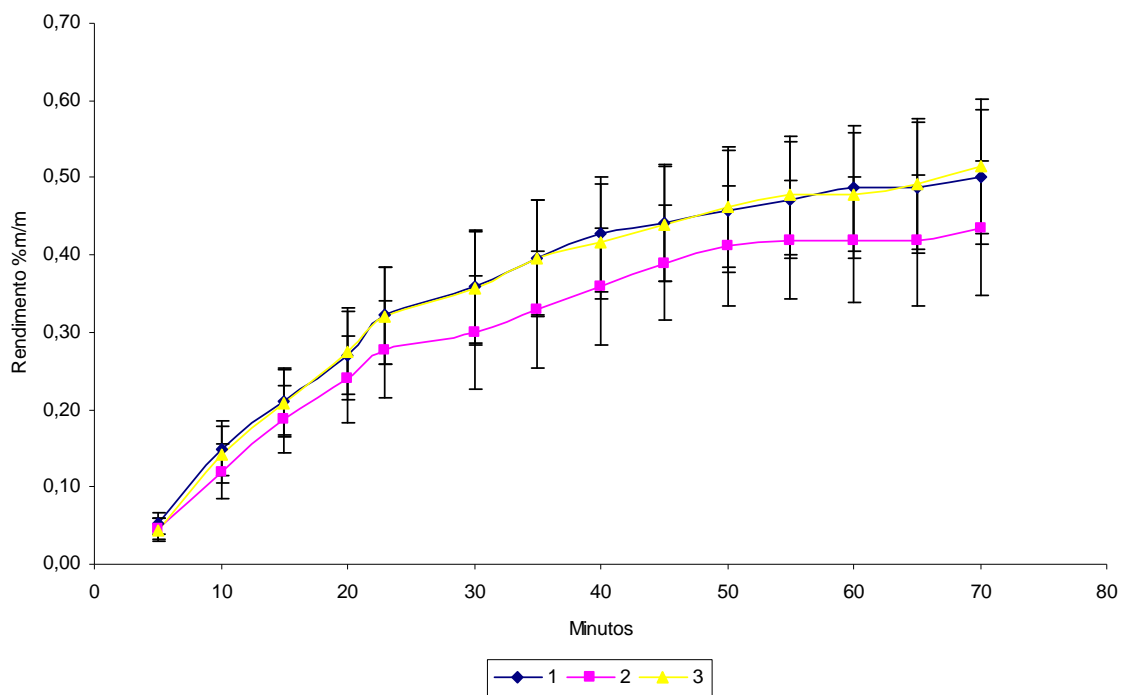
linalol	0,01	0,05	0,04	0,03	0,01	0,03	0,03	0,00	0,03
borneol	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
terpinen-4-ol	0,11	0,41	0,02	0,26	0,11	0,21	0,16	0,15	0,30
p-cimen-8-ol	0,03	0,16	0,05	0,14	0,14	0,16	0,18	0,24	0,16
α-terpineol	0,06	0,28	0,13	0,24	0,19	0,22	0,31	0,28	0,25
trans-carveol	0,03	0,11	0,00	0,10	0,02	0,09	0,03	0,12	0,09
cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol	0,03	0,09	0,04	0,09	0,04	0,07	0,08	0,12	0,09
carvona	0,08	0,06	0,07	0,06	0,01	0,05	0,06	0,08	0,01
piperitona	0,02	0,07	0,01	0,05	0,02	0,03	0,03	0,04	0,07
acetato de trans-óxido de linalol (piranóide)	0,08	0,07	0,08	0,07	0,06	0,11	0,05	0,07	0,06
timol	0,10	0,04	0,00	0,05	0,03	0,09	0,04	0,07	0,03
carvacrol	0,04	0,06	0,00	0,08	0,05	0,07	0,05	0,09	0,04
acetato de α-terpenil	0,56	0,66	0,04	0,30	0,45	0,14	0,30	0,40	1,24
α-copaeno	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
β-elemeno	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
Z-jasmona	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
α-gurjuneno	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,05
E-cariofilene	0,61	0,19	0,53	0,24	0,18	0,37	0,09	0,42	0,48
aromandreno	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
α-guaieno	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
cis-muurola-3,5-dieno	0,17	0,00	0,09	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
α-humuleno	0,25	0,04	0,19	0,15	0,03	0,06	0,01	0,06	0,08
allo-aromandreno	0,10	0,03	0,05	0,04	0,03	0,07	0,02	0,06	0,07
9-epi-(E)-cariofileno	0,05	0,14	0,18	0,16	0,06	0,05	0,06	0,04	0,16
trans-cadina-1(6),4-dieno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00
β-selineno	0,08	0,05	0,00	0,04	0,00	0,00	0,04	0,00	0,06
biciclogermacreno	0,27	0,15	0,10	0,16	0,31	0,33	0,11	0,16	0,38

δ-cadineno	0,21	0,09	0,19	0,09	0,05	0,12	0,02	0,11	0,17
α-calacoreno	0,07	0,05	0,00	0,05	0,00	0,00	0,03	0,00	0,05
flavesona	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
espatulenol	0,58	0,64	0,00	0,95	0,89	0,52	0,19	0,70	0,19
óxido de cariofileno	0,09	0,19	0,05	0,38	0,04	0,38	0,42	0,76	0,49
viridiflorol+cubeban-11-ol	0,46	0,21	0,09	0,05	0,11	0,08	0,06	0,40	0,09
1-epi-cubenol	0,14	0,09	0,02	0,08	0,09	0,05	0,01	0,08	0,04
iso-leptospermona	0,14	0,07	0,08	0,10	0,13	0,04	0,08	0,08	0,04
α-muurolol	0,05	0,08	0,00	0,18	0,04	0,03	0,00	0,03	0,14
α-cadinol	0,05	0,06	0,01	0,09	0,05	0,09	0,01	0,04	0,03

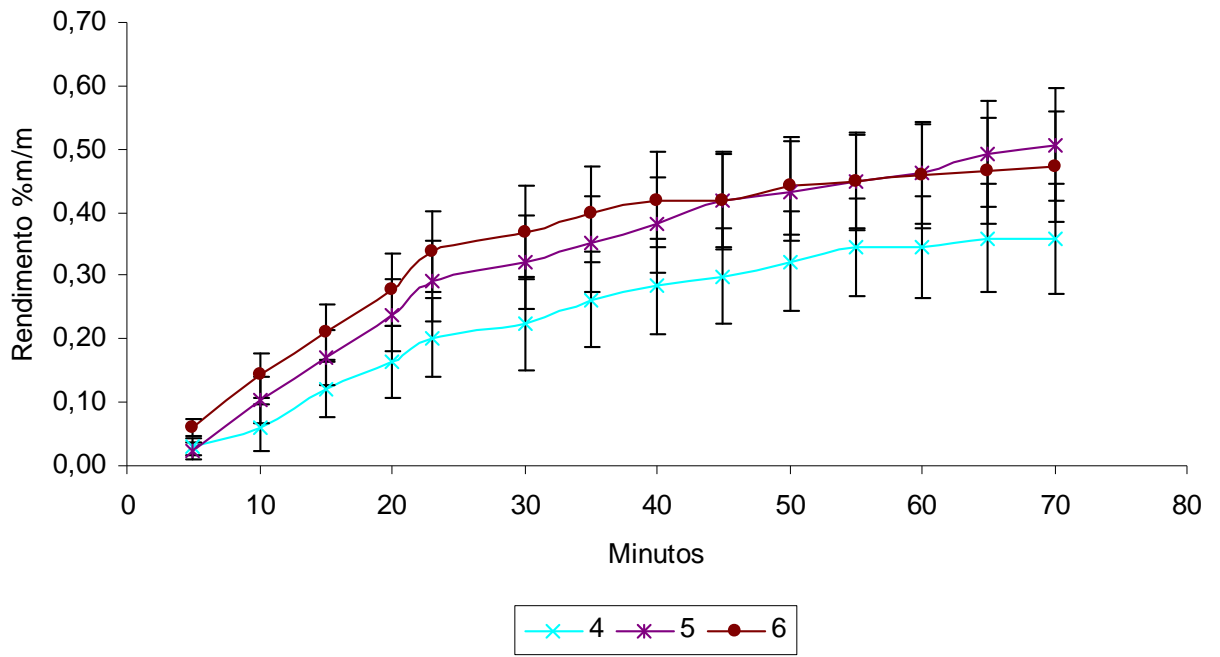
ANEXO 2

Curvas de extração para os eventos transgênicos e o controle da segunda coleta. Os pontos são representados junto com o respectivo desvio padrão.

- Eventos de 1 a 3



- Eventos de 4 a 6



- Eventos de 7 a 9

