

QUANTIFICAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE CERA EPICUTICULAR DE FOLHAS DE EUCALIPTO¹

Quantification and Chemical Composition of Epicuticular Wax of Eucalyptus Leaves

VIANA, R.G.², TUFFI SANTOS, L.D.³, DEMUNER, A.J.⁴, FERREIRA, F.A.⁵, FERREIRA, L.R.⁵, FERREIRA, E.A.⁶, MACHADO, A.F.L.⁷ e SANTOS, M.V.⁸

RESUMO - Objetivou-se neste trabalho quantificar e relatar a composição química da cera epicuticular da folha de seis clones de eucalipto (UFV01, UFV02, UFV03, UFV04, UFV05 e UFV06). A cera epicuticular foi extraída e quantificada, e os seus constituintes, analisados por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas. Maior quantidade de cera por área foliar foi encontrada nos clones UFV01, UFV02 e UFV05, enquanto o clone UFV03 apresentou o menor teor de cera. Nas amostras submetidas à espectrometria de massas, foram identificados 31 constituintes nos seis clones de eucalipto avaliados. A análise das amostras revelou maior presença de hidrocarbonetos entre os compostos identificados na folha. O componente encontrado em maior proporção nos clones UFV02 (36,07%), UFV03 (33,00%) e UFV06 (40,98%) foi o 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-al, ao passo que nos clones UFV01 (17,80%), UFV04 (11,38%) e UFV05 (17,62%) a maior proporção foi do hexacosano. Os clones UFV02 e UFV04 apresentaram, em sua cera, maior variedade de componentes químicos (19 componentes) do que os demais genótipos avaliados, havendo variação quanto ao tipo e à quantidade de compostos entre os genótipos, mesmo em clones pertencentes à mesma espécie.

Palavras-chave: composição química, *Eucalyptus* spp., cromatografia a gás.

ABSTRACT - This work aimed to quantify and evaluate the chemical composition of the epicuticular wax from leaves of six eucalyptus clones (UFV01, UFV02, UFV03, UFV04, UFV05 and UFV06). The epicuticular wax was extracted and quantified and their constituents analyzed by gas chromatography coupled with a mass spectrometer, with 31 constituents being identified in the six eucalyptus clones appraised. The analysis of the samples revealed mostly the presence of hydrocarbons. The component found in larger proportion in the clones UFV02 (36.07%), UFV03 (33.00%) and UFV06 (40.98%) was 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-al, while in the clones UFV01 (17.80%), UFV04 (11.38%) and UFV05 (17.62%) the component found in larger proportion was hexacosane. The clones UFV02 and UFV04 presented the most variety of chemical components (19 components).

Keywords: chemistry composition, *Eucalyptus* sp., gas chromatography.

INTRODUÇÃO

O manejo de plantas daninhas em áreas de eucalipto baseia-se principalmente no uso do controle químico, sobretudo com glyphosate. Por se tratar de um herbicida pós-emergente

e não seletivo, deve-se evitar o contato do glyphosate com as plantas de eucalipto e conseqüente ocorrência de intoxicação da cultura. Entretanto, na grande maioria das áreas em que esse produto é usado verifica-se a ocorrência de plantas com injúrias

¹ Recebido para publicação em 15.10.2009 e na forma revisada em 12.11.2010.

² Eng^a-Agr^a, D.Sc., Professor Adjunto, Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Campus de Parauapebas, 68515-000 Parauapebas-PA, <rafael.gomes@ufra.edu.br>; ³ Professor, Adjunto, Universidade Federal de Minas Gerais; ⁴ Professor Associado, DEQ/UFV; ⁵ Professor Titular, DFT/UFV; ⁶ Pós-Doutorando, DFT/UFV; ⁷ Doutor em Fitotecnia, Monsanto; ⁸ Professora Substituta, DZO/UFV.



causadas por ele. Trabalhos de pesquisa e observações no campo indicam a tolerância diferencial ao glyphosate entre genótipos (Tuffi Santos et al., 2005, 2007a).

O conhecimento dos fatores envolvidos com a tolerância diferencial ao glyphosate por genótipos de eucalipto é uma informação relevante para os programas de manejo e de melhoramento florestal, sendo, entretanto, pouco utilizado. Entre os mecanismos que conferem a tolerância diferencial de plantas a herbicidas estão as diferenças anatômicas, principalmente nas características da superfície epidérmica das folhas.

No caso de herbicidas pós-emergentes, as folhas constituem-se na principal via de penetração na planta. A cutícula que cobre as paredes periclinais externas das células epidérmicas é a principal barreira à penetração de compostos na folha. Esta é constituída por cutícula secundária ou parede cutinizada (cutícula mais parede), cutícula primária ou cutícula propriamente dita, onde se encontra a cera embebida e, sobre o revestimento cuticular, na parte mais externa, a cera epicuticular (Heredia et al., 1998).

A composição química do revestimento cuticular é variada, sendo a cutina e a cera seus principais componentes. A cera epicuticular pode ser depositada sob diferentes formas físicas, como camadas finas e amorfas, placas ou cristais de diferentes tamanhos e formas. As características químico-físicas da cera conferem a essa estrutura a função de proteção contra as perdas excessivas de água, a ação de patógenos, as radiações solares e a entrada de produtos químicos e contaminantes (Heredia et al., 1998; Schönherr, 2002).

A cera epicuticular é uma complexa mistura de diferentes compostos alifáticos. Normalmente, esses compostos contêm séries homólogas de alcanos, álcoois (primários e secundários), aldeídos, ácidos, cetonas, β -dicetonas e ésteres (Bianchi & Bianchi, 1990), cujas proporções variam de acordo com os genótipos e as condições ambientais em que a planta está se desenvolvendo.

No presente estudo, objetivou-se determinar a quantidade e relatar a composição química da cera epicuticular de clones de eucalipto.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Departamentos de Fitotecnia e de Química da Universidade Federal de Viçosa, em ambiente protegido, usando-se mudas padronizadas de seis clones de *Eucalyptus grandis*, adquiridos na CIA Suzano Papel e Celulose, codificados como UFV01, UFV02, UFV03, UFV04, UFV05 e UFV06.

O ensaio foi conduzido em vasos contendo 10 litros de substrato, composto de Argissolo Vermelho-Amarelo adubado, conforme recomendação para a cultura do eucalipto. Em cada vaso plantou-se uma muda de eucalipto, constituindo-se na parcela experimental do ensaio. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com cinco repetições. Aos 45 dias após o transplante das mudas, coletaram-se, por repetição, quatro folhas totalmente expandidas no terceiro ou quarto nó dos ramos laterais do terço inferior da planta. As folhas coletadas foram digitalizadas em câmera fotográfica, e as imagens, usadas para obtenção da área foliar com auxílio do programa Image-Pro Plus.

As amostras coletadas foram introduzidas, separadamente por repetição, em placa de Petri com 100 mL de clorofórmio por 20 segundos, agitando-se levemente. As soluções obtidas (cera mais clorofórmio) foram filtradas em papel-filtro e transferidas para um tubo de ensaio de 25 mL, de peso conhecido, onde foram evaporados em banho-maria, para obtenção do resíduo sólido (cera). A quantificação da cera foi expressa pela quantidade de cera por unidade de área foliar (mg cm^{-2}).

As análises químicas foram feitas no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Cada amostra foi submetida à análise em espectrômetro no infravermelho, registrado entre 4.000 e 500 cm^{-1} . As amostras que continham ésteres foram transesterificadas através de reação com H_2SO_4 /metanol, de acordo com o seguinte procedimento: em cada tubo de ensaio contendo 2 a 5 mg de amostra foi adicionado 1 mL de solução 2% de H_2SO_4 em metanol. Após duas horas em banho-maria,

à temperatura de 55 °C, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 mL de hexano, e a mistura foi transferida para um funil de separação.

A fase orgânica foi separada e lavada com solução saturada de NaCl (2 x 10 mL) e, em seguida, concentrada em evaporador rotatório. O resíduo foi dissolvido em 0,2 mL de hexano e injetado em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas. Os ésteres metílicos obtidos juntamente com a fração orgânica foram submetidos à cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). As análises cromatográficas foram realizadas em aparelho GC-MS PQ 5050A (Shimadzu), utilizando-se coluna capilar DB-1 (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 µm) e hélio como gás de arraste. A temperatura no injetor foi de 290 °C, com temperatura inicial de 80 °C, por cinco minutos, aumentando de 80 a 285 °C na razão de 4 °C min⁻¹. A temperatura final foi mantida a 285 °C por 40 minutos. A temperatura do detector foi de 290 °C, e a da interface do sistema CG-EM, de 290 °C.

O detector de massas operou com ionização de chama por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas de 30 a 600 Da. Foi injetado 1 µL de cada amostra, e a identificação dos compostos foi feita por meio de comparação dos espectros de massas das amostras com aqueles existentes no banco de dados (Wiley 229.000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença nos teores de cera epicuticular da folha entre os clones avaliados. Maior quantidade de cera por área foliar foi encontrada nos clones UFV01, UFV02 e UFV05 (Figura 1). As características hidrofóbicas das ceras epicuticulares diminuem a afinidade da água com a superfície foliar. Segundo Barthlott (1981), superfícies “molháveis”, ou seja, que apresentam filme de água, são favoráveis à colonização por microrganismos. Esse fato pode predispor a cultura ao ataque de patógenos. Para o eucalipto, a presença de água na folha predispõe as plantas a diversas doenças, entre elas a ferrugem do eucalipto (Alfenas et al., 2004).

Os clones UFV01 e UFV02 são resistentes à ferrugem do eucalipto e apresentam os maiores teores de cera epicuticular. Por outro lado, o clone UFV03 apresentou o menor peso de cera epicuticular por área da folha. Este clone é também altamente suscetível à ferrugem do eucalipto (Tuffi Santos et al., 2007b), o que reforça a hipótese da possível correlação entre quantidade de cera na folha e severidade dessa doença.

Nas amostras submetidas à espectrometria de massas, dos compostos com mais de 1,0% de participação na constituição das ceras epicuticulares, foram identificados 29 constituintes e dois hidrocarbonetos não identificados nos seis clones de eucalipto avaliados (Tabela 1). Os grupos de compostos observados na cera epicuticular dos seis clones foram hidrocarbonetos, álcoois, éteres, ésteres, ácidos graxos, aldeídos e cetonas.

Os hidrocarbonetos são os componentes menos polares (mais hidrofóbicos) encontrados na cera epicuticular, o que pode influenciar na facilidade de absorção de herbicidas com adjuvantes, como: tensoativos, espalhantes e adesivos. Os ácidos hexadecanoico, hexacosanoico e láurico foram encontrados em todos os seis clones avaliados (Tabela 1). O componente encontrado em maior proporção nos clones UFV02 (36,07%), UFV03 (33,0%) e UFV06 (40,98%) foi o 3β-acetoxy-urs-12-en-28-al, tendo este, pertencente à classe triterpeno com esqueleto ursânico, apresentado dois grupos funcionais: aldeído e um éster. Nos clones UFV01 (17,80%), UFV04 (11,38%) e UFV05 (17,62%), a maior proporção foi do hexacosano (Tabela 1).

Os clones UFV02 e UFV04 apresentaram, em sua cera, maior variedade de componentes químicos (19 componentes) em comparação aos demais genótipos avaliados. No clone UFV06 foi observado o menor número de componentes químicos entre os genótipos (13 componentes). Pela quantificação e caracterização química, pode-se afirmar que existe diferença no teor de cera por área foliar e na composição química da cera epicuticular entre os clones, porém sem relação direta com o grau de sensibilidade ao glyphosate. Herbicidas polares, como o glyphosate, penetram com maior facilidade em plantas que apresentam cera com maior polaridade.



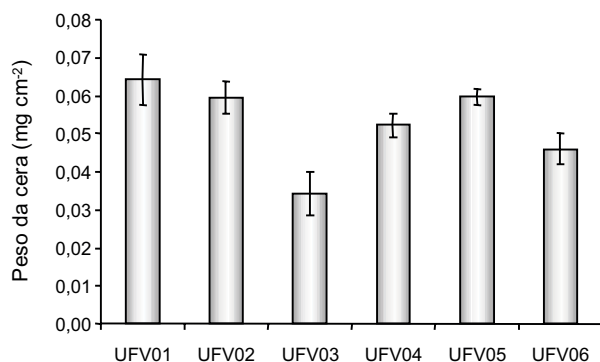


Figura 1 - Peso de cera epicuticular (mg cm⁻²) nas folhas de seis clones de *Eucalyptus grandis*.

Verifica-se na Tabela 2 que há maior concentração de hidrocarbonetos nos clones UFV01, UFV02, UFV03, UFV04 e UFV05, sendo, portanto, uma barreira à penetração de herbicidas hidrofílicos, como algumas formulações de glyphosate. Monquero et al. (2004) observaram que *Commelina benghalensis* – planta daninha com elevada tolerância ao glyphosate – apresentou maior proporção de hidrocarbonetos na cera epicuticular, sendo esse um indicio de que a composição da cera pode ocasionar tolerância diferencial entre plantas. O clone UFV06 apresenta maior concentração de aldeídos, sendo este também hidrofílico.

Tabela 1 - Composição química (%) da cera epicuticular de seis clones de eucalipto

Composto*	Tempo de retenção	Porcentagem de compostos na folha					
		UFV01	UFV02	UFV03	UFV04	UFV05	UFV06
Glicerol	14,116	-	1,74	-	-	4,43	-
Dietilenoglicol	12,766						
Ácido decanoico	19,722						
Acetophenona	20,160	1,09	1,15	1,88	-	1,07	-
Ácido dodecanoico	25,815						
Ácido cumárico	29,770						
Ácido hexadecanoico	36,283	1,06	1,77	1,83	1,10	1,62	1,13
Ácido octadecanoico	40,836	-	1,11	1,72	-	-	-
Hidrocarboneto	53,652	-	1,22	1,00	1,84		1,15
Ácido hexacosanoico	54,507	1,92	2,88	2,07	2,31	2,23	1,26
Hidrocarboneto não identificado	55,361	-	1,02	1,14	1,01	-	1,01
Hidrocarboneto não identificado	57,068	-	-	-	1,02	-	-
Octacosan-1-ol	57,953	1,94	4,14	2,39	1,97	2,85	1,48
Ácido heptacosanoico	59,875	-	1,86			1,56	
Tricosan-1-ol	62,497	-	3,54	-	-	4,61	2,20
Tricosano	62,522	3,68	-	4,10	4,10	-	-
Esteróide	63,022	1,49	-	-	1,52	-	-
Urs-12-eno	63,995	1,61	-	-	2,62	-	1,07
Ácido nonacosanoico	65,349	-	1,15	1,43	1,05	1,53	-
Esteróide	67,874	-	8,40	4,66	5,47	5,00	7,11
NI	69,371	-	-	-	11,05	-	-
NI	69,577	-	-	6,23	1,28	1,60	1,46
Tridocosan-1-ol	69,952	-	-	-	1,37	3,29	-
Hexacosano	70,605	17,80	15,31	17,93	11,38	17,62	-
Esteróide	71,174	1,47	1,8	1,16	1,00	3,29	-
NI	72,147	5,78	2,72	4,36	-	4,01	-
NI	72,744	13,98	-	-	-	-	-
3β-acetoxi-urs-12-en-28-al 1	72,813	16,76	36,07	33,00	-	11,96	40,98
Outros compostos	-	8,87	11,39	8,72	10,98	15,66	32,49
Nº de compostos identificados	-	16	19	17	19	17	13

* Foram listados todos os compostos identificados com mais de 1,0% de participação da composição total da cera. NI: não identificado.

Tabela 2 - Principais grupos de compostos (%) encontrados na cera epicuticular de seis clones de *Eucalyptus grandis*

Composição	Clones					
	UFV01	UFV02	UFV03	UFV04	UFV05	UFV06
Ácidos carboxílicos	2,98	8,77	7,05	4,46	6,94	2,39
Hidrocarbonetos	21,48	24,17	24,17	19,35	17,62	2,16
Álcoois	1,94	9,42	2,39	3,34	15,18	3,68
Cetona	1,09	1,15	1,88	-	-	-
Aldeídos	16,76	36,07	33,00	-	11,96	40,98
Outros	33,2	17,69	25,13	33,92	30,63	42,13

Além da composição da cera, outros fatores podem interferir na penetração do herbicida, como a própria cutícula, os tipos e a densidade de tricomas e estômatos. A presença de adjuvantes nas formulações herbicidas comercializadas, que visam aumentar a penetração do produto ativo nas plantas daninhas a serem controladas, pode, nos casos de contato do glyphosate com plantas não alvo, potencializar os problemas de intoxicação. Assim, a presença de adjuvantes e surfatantes nas formulações de glyphosate eficazes em promover a maior absorção do herbicida, independentemente das barreiras foliares, pode explicar a não correlação das características da cera epicuticular com a intoxicação variada. A cutícula foliar é a principal via de penetração do glyphosate, sendo o seu conhecimento de importância fundamental nos estudos de absorção de herbicidas (Silva et al., 2007).

Os surfatantes favorecem a entrada de glyphosate na folha, por possibilitarem que o herbicida supere a cutícula foliar e as barreiras da membrana, vindo a atingir seu sítio de ação (Feng et al., 1999). Segundo Schönherr (2002), a presença de água é fundamental para uma boa absorção de glyphosate pelas folhas, sendo evidente que grande parte do herbicida absorvido passe por poros hidratados da cutícula.

Outro fator que pode auxiliar na penetração de herbicidas em eucalipto são os erros na tecnologia de aplicação adotada. Viana et al. (2007) constataram em seu trabalho que a interação entre a formulação de herbicida, a ponta de pulverização e o genótipo de plantas pode aumentar o nível de intoxicação, sendo necessário um estudo conjunto dos fatores inerentes ao controle de plantas daninhas e à menor intoxicação de plantas.

Os clones UFV01, UFV02 e UFV05 possuem maior quantidade de cera que os demais. Em todos os clones, há maior concentração de hidrocarbonetos. Existe diferença entre os clones de *Eucalyptus grandis* na composição e na quantidade de cera epicuticular por área foliar. Os dados obtidos podem ser utilizados em programas de melhoramento para seleção de plantas com maior probabilidade de tolerância a herbicidas não seletivos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa ao primeiro autor, e à CIA Suzano Papel e Celulose, por viabilizar recursos ao projeto.

LITERATURA CITADA

- ALFENAS, A. C. et al. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442 p.
- BIANCHI, A.; BIANCHI, G. Surface lipid composition of C₃ and C₄ plants. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 18, n. 7, p. 533-537, 1990.
- BARTHLOTT, W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic J. Bot.**, v. 1, p. 345-355, 1981.
- FENG, P. C. C. et al. Analysis of surfactant leaf damage using microscopy and its relation to glyphosate or deuterium oxide uptake in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). **Pest. Sci.**, v. 55, n. 3, p. 385-386, 1999.
- HEREDIA, A. et al. La cutícula vegetal: estructura y funciones. **Ecologia**, v. 12, p. 293-305, 1998.
- MONQUERO, P. A. et al. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 203-210, 2004.



SCHÖNHERR, J. A. Mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. **Pest Manag. Sci.**, v. 58, n. 4, p. 343-351, 2002.

SILVA, A. A. et al. Métodos de controle de plantas daninhas. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. p. 17-55.

TUFFI SANTOS, L. D. et al. Crescimento e morfoanatomia foliar de eucalipto sob efeito de deriva do glyphosate. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 133-142, 2005.

TUFFI SANTOS, L. D. et al. Morphological responses of different eucalypt clones submitted to glyphosate drift. **Environ. Exper. Bot.**, v. 59, n. 1, p. 11-20, 2007a.

TUFFI SANTOS, L. D. et al. Glyphosate sobre a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 139-147, 2007b.

VIANA, R. G. et al. Características técnicas de pontas de pulverização LA1-JC e SR-1. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 211-218, 2007.

