



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Evaluación de compuestos orgánicos volátiles emitidos por las hojas de las principales especies de árboles en Portugal a través de metodología por HS-SPME/GC-MS

GONÇALVES, O. C.^{1*}, NUNES, L.², MAGRO, C.³, NENG, N. R.¹, REGO, F. C.², VIEIRA, P.³ y NOGUEIRA, J. M F.¹

¹Centro de Química Estrutural, Institute of Molecular Sciences, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal.

²Centre for Applied Ecology “Professor Baeta Neves” (CEABN), InBIO, School of Agriculture, University of Lisbon, 1349-017 Lisbon, Portugal

³Department of Physics, NOVA School of Science and Technology, NOVA University Lisbon, 2829-516 Caparica, Portugal

*ocgoncalves@alunos.fc.ul.pt

Resumen

A lo largo de los últimos años los cambios climáticos han continuado a aumentar la incidencia de fuertes olas de calor y períodos de sequía que contribuyen al desenlace de incendios forestales extremos. El impacto socioeconómico y ambiental de estos fenómenos incita la realización de estudios para comprender el efecto de las diversas fuentes que promuevan la alteración repentina su comportamiento. En particular, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), que son emitidos naturalmente por la vegetación, han demostrado exhibir mayor reactividad bajo ciertas condiciones atmosféricas, pudiendo estar relacionados con la aceleración del crecimiento y propagación de incendios. Por otro lado, en las últimas décadas diversas técnicas modernas de preparación de muestras han demostrado elevada eficacia para el análisis de vestigios de moléculas como los VOCs, como la microextracción en fase sólida (SPME). En este sentido, el presente trabajo tuvo como objetivo la aplicación de SPME en el modo de espacio de cabeza seguida de análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (HS-SPME/GC-MS) para la evaluación cualitativa y cuantitativa del perfil de VOCs emitidos por las hojas de las cuatro de las especies arbóreas más comunes en Portugal, específicamente *Eucalyptus globulus* Labill., *Pinus pinaster* Aiton., *Quercus suber* L. y *Quercus robur* L.

Palabras clave

VOCs, SPME, *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster*, *Quercus spp*, GC-MS.

1. Introducción

Los incendios forestales se han vuelto cada vez más recurrentes en los últimos años debido a los cambios climáticos (San-Miguel-Ayanz et al., 2019). La ocurrencia de olas de calor extremas y períodos de sequía en el verano, así como las lluvias intensas en invierno, han promovido la acumulación de combustibles en el medio ambiente y el crecimiento de la vegetación (Cramer et al., 2018; FOREST EUROPE, 2010). Debido a esto, los ecosistemas se han tornado más vulnerables a eventos de incendios forestales extremos (EWE) a través del aumento de la duración, tamaño e intensidad de estos, especialmente en Europa Meridional (San-Miguel-Ayanz et al., 2020; Kesselmeier et al. 1999). Solo en Portugal, fueron registrados un total de 10.832 incendios rurales en el territorio continental en 2019, siendo que aproximadamente la mitad ocurrieron en verano produciendo alrededor de 78 % de la superficie total abrasada de ese año (SGIF, 2019). En estos incendios, las especies arbóreas más afectadas fueron el eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), el pino marítimo (*Pinus pinaster* Aiton), el alcornoque (*Quercus suber* L.) y otros robles (por ejemplo, *Quercus robur* L.), que corresponden a algunos de las especies arbóreas más representativas de la floresta portuguesa, visto que presentan abundancias totales en el territorio continental de 26,2 %, 22,1 %, 22,3 % y 2,5 %, respectivamente (ICNF, 2019). En la actualidad, está demostrado que los incendios forestales son

influenciados simultáneamente por varios factores, incluyendo la topografía, el tipo de vegetación y los parámetros meteorológicos, como la temperatura del aire, velocidad y dirección del viento, humedad, precipitación y radiación solar (Xavier Viegas, 1998). Más recientemente, algunos estudios han sugerido que los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos por la vegetación pueden ser altamente reactivos e inflamables a temperaturas elevadas, lo que puede provocar brotes de incendios a larga distancia. Entre estos VOCs se encuentran principalmente los terpenoides, una clase de compuestos derivados del isopreno que presentan densidades más bajas que el aire, lo que podría ocasionar su acumulación a bajas altitudes, especialmente bajo la vegetación (Chatelon et al., 2014). Como resultado, en presencia de ciertas condiciones climáticas y gases comburentes, los terpenoides acumulados pueden suscitar una rápida e intensa ignición, promoviendo un aumento en la altura de la llama y una aceleración de la propagación del fuego. Por otro lado, estos terpenoides han demostrado degradarse térmicamente a partir de los 450 °C, produciendo moléculas de toxicidad e inflamabilidad más elevada que las del terpenoide original, lo que también podría contribuir a las drásticas alteraciones en el comportamiento de los incendios (Chetehouna et al., 2009; Coudour et al.; 2019).

Debido a las propiedades fisicoquímicas de los VOCs, el sistema instrumental de análisis más comúnmente utilizado para su análisis corresponde a la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS). Sin embargo, para el estudio de matrices biológicas de elevada complejidad, como es el caso de las hojas de los árboles, siempre se requiere un paso de previo de preparación. En este sentido, las técnicas modernas basadas en el equilibrio de sorción, como la microextracción en fase sólida (SPME), permiten la microextracción directa de los principales compuestos volátiles y semivolátiles de diversas matrices mediante muestreo por espacio de cabeza (HS). Actualmente, la técnica de HS-SPME es la más utilizada para el análisis de VOCs, visto que permite la extracción y concentración de analitos en un solo paso reduciendo el tiempo de manipulación y, simultáneamente, aumentando la sensibilidad y selectividad de la metodología analítica (Demeestere et al., 2007; Nogueira, 2012).

2. Objetivos

En la presente contribución, se propone una metodología analítica utilizando HS-SPME seguida de desorción térmica y análisis por GC-MS para la evaluación de las condiciones ambientales en la producción de VOCs por las hojas de las principales especies arbóreas portuguesas, incluyendo *E. globulus*, *P. pinaster*, *Q. suber* y *Q. robur*. El objetivo de este trabajo es discutir la influencia de la temperatura en la emisión de VOCs, así como las variaciones en la composición de los VOCs producidos por hojas en diferentes días durante dos años. Además, el proceso de optimización y validación de la metodología analítica también es completamente abordada, incluyendo la determinación de la concentración emitida de cinco VOCs: α-pineno, β-pineno, mirceno, limoneno y 1,8-cineol (Figura 1).

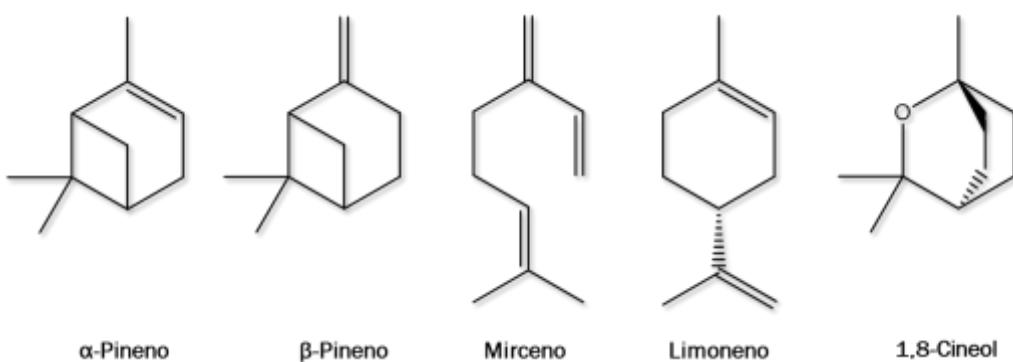


Figura 1. Estructuras químicas de los principales VOCs estudiados en el presente trabajo.

3. Metodología

3.1. Padrones químicos, materiales, y muestras reales

Las soluciones estándar de trabajo (1000 mg L⁻¹ de α-pineno, β-pineno, mirceno, limoneno y 1,8-cineol; 20 mg L⁻¹ de estándar interno o IS) fueron preparadas diariamente en *n*-hexano. Para el análisis por HS-SPME de los VOCs se utilizó un soporte de fibra SPME de operación manual, así como fibras de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB, 65 μm), Carboxen™-polidimetilsiloxano (CAR/PDMS, 75 μm) y divinilbenceno-Carboxen™-polidimetilsiloxano StableFlex™ (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm), todos adquiridos de Supelco® (Bellefonte, Estados Unidos). Antes de cada extracción, cada fibra fue condicionada de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante.

Las hojas de *E. globulus*, *P. pinaster*, *Q. suber* y *Q. robur* analizadas fueron recolectadas cada dos semanas en los Parques de Sintra - Montes da Lua y Monserrate (occidente de Portugal) desde junio de 2020 hasta septiembre de 2021 en un total de 33 recolectas. Después de cada recolecta, cada muestra fue congelada y transportada al laboratorio, donde fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento de análisis.

3.2. Procedimiento experimental

3.2.1. Ensayos de optimización

Para optimizar las condiciones experimentales de análisis, se adicionó 1 μL de una solución con 100,0 mg L⁻¹ de cinco VOCs (α-pineno, β-pineno, mirceno, limoneno y 1,8-cineol) y 20,0 mg L⁻¹ de IS en frascos de vidrio de 40 mL. Los frascos fueron lacrados usando tapones con *septum* adecuados para el análisis en modo HS, siendo seguidamente condicionados en un baño de arena durante 30 min a la temperatura de extracción seleccionada. La microextracción de los VOCs fue realizada mediante la exposición de la fibra de SPME en el HS. Luego, la fibra es retirada e insertada inmediatamente en el inyector del GC-MS para promover la retroextracción y análisis directo de los VOCs extraídos.

3.2.2. Validación de la metodología HS-SPME/GC-MS

Para validar la metodología propuesta fueron evaluados varios parámetros, incluyendo la linealidad, sensibilidad, selectividad, exactitud y precisión, tal como realizado en estudios previos (Qiu *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2019; Souza Silva *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2016; Rianawati *et al.*, 2009). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en condiciones previamente optimizadas, salvo en casos indicados.

La selectividad fue evaluada por medio de la verificación de la ausencia de interferencias en la retención de los compuestos extraídos por HS-SPME/GC-MS. Posteriormente, se construyeron curvas de calibración de α-pineno, β-pineno, mirceno, limoneno y 1,8-cineol en el rango comprendido entre 0,02 y 0,70 μg a través del análisis de diluciones consecutivas de las soluciones estándar. La linealidad de cada curva de calibración fue evaluada por aplicación de la prueba de *lack-of-fit*, verificación de la dispersión de residuos y coeficientes de determinación (*r*²). La sensibilidad de la metodología se evaluó mediante la determinación del límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y límite inferior de cuantificación (LLOQ). El LOD y LOQ corresponden a valores de relación señal/ruido (S/N) de 3/1 y 10/1, respectivamente, mientras que el LLOQ es la concentración más baja que se puede medir según los criterios de aceptación de la exactitud y precisión, siendo utilizado generalmente como el primer punto de la curva de calibración. Para evaluar la precisión de la exactitud intradía (*n*=6) e interdía (*n*=6, durante 3 días), se realizaron ensayos evaluando cuatro niveles de concentración de los VOCs mientras la cantidad de IS se mantuvo constante (0,02 μg). Los

niveles de fortificación evaluados correspondieron a 0,02 µg (LLOQ), 0,10 µg (bajo), 0,40 µg (intermedio) y 0,70 µg (alto). La exactitud y la precisión fueron estimados a través del porcentaje del error relativo (%RE) y la desviación estándar relativa (RSD), respectivamente, siendo que se aceptaron valores inferiores a 15 % para todos los niveles de fortificación a excepción del LLOQ, donde se aceptaron valores inferiores a 20 % (Ahmad et al., 2019; Souza Silva et al., 2017).

3.2.3. Ensayos con muestras reales

3.2.3.1. Variabilidad de los VOCs de hojas recolectadas en diferentes condiciones

Para estudiar la variabilidad en la emisión de VOCs por las especies de árboles fueron realizados ensayos por HS-SPME/GC-MS, en las condiciones de análisis previamente optimizadas, siendo que, en vez de fortificar con la mezcla de VOCs, serían añadidas las hojas recolectadas. Las masas de hojas utilizadas para este estudio correspondieron a 2 mg (*E. globulus*), 5 mg (*P. pinaster*) y 1 g (*Q. suber* y *Q. robur*). Las concentraciones de α-pineno, β-pineno, mirceno, limoneno y 1,8-cineol emitidas por las hojas de *E. globulus* y *P. pinaster* fueron determinadas a través de las curvas de calibración y el peso seco (DW) de las hojas. Esto llevó a la determinación de la masa emitida de cada compuesto por las hojas (DW, µg g⁻¹), permitiendo la comparación con otros estudios (Sampedro et al., 2010; McKiernan et al., 2015).

3.2.3.2. Efecto de la temperatura en la emisión de VOCs por las hojas

El efecto de la temperatura fue evaluado a través del estudio de los VOCs producidos por las hojas a diferentes temperaturas. Para esto, fueron realizados ensayos usando 1 g de hojas (para todas las especies) variando la temperatura de extracción en el rango comprendido entre 30 y 150 °C, mientras fueron mantenidas constantes las restantes condiciones de análisis.

3.3. Condiciones instrumentales

Los análisis por GC-MS se realizaron en un cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890 interconectado a un detector selectivo de masas Agilent 5973N (Agilent Technologies, Little Falls, DE, EE. UU.). Se utilizó un inyector *split/splitless* (S/SL), que funcionaba a 250 °C con inyección manual en el modo S (relación de *split* 1:40) para todos los análisis, exceptuando los ensayos para el estudio del efecto de la temperatura, donde se utilizó el modo SL. Una columna capilar de sílica fundida, de 30 m de longitud × 0,25 mm I.D. × 0,25 µm espesor del revestimiento (Zebron ZB-5; 5 % de difenil, 95 % de dimetilpolisiloxano; Phenomenex, Estados Unidos). La temperatura del horno se programó para comenzar a 80 °C, siguiendo de una isotérmica de 1 min, luego fue calentado hasta 300 °C a 20 °C min⁻¹ donde se mantuvo isotérmicamente durante 5 min. Fue utilizado helio como gas portador, a una velocidad de 30 cm s⁻¹. Las temperaturas de la línea de transferencia, la fuente de ionización y del cuadrupolo correspondieron a 280, 230 y 150 °C, respectivamente. En el modo de escaneo completo (*full-scan*), los espectros de masas fueron obtenidos en el rango de 45 a 550 Da utilizando el impacto de electrones con 70 eV de energía de ionización. Los datos de adquisición y control instrumentales fueron realizados a través del software *MSD ChemStation* (G1701CA, versión E.02.02.1431; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). La identificación de cada compuesto fue realizada mediante la comparación de sus índices de retención (RI) calculados en relación los RI de una mezcla de *n*-alcanos C₁₀ - C₄₀ (Adams, 2007) y los rasgos característicos de sus espectros de masas con los registrados en la biblioteca espectral Wiley (G1035B, Rev D.02.00; Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos).

4. Resultados

4.1. Optimización de las condiciones instrumentales del sistema GC-MS

Por medio del análisis de la mezcla de VOCs (α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno y 1,8-cineol) e IS (100 y 20 mg L⁻¹, respectivamente) fueron optimizadas las condiciones instrumentales de análisis por GC-MS. La sensibilidad instrumental fue determinada mediante la inyección de soluciones estándar diluidas de los analitos, lo que permitió el cálculo del LOD y LOQ para cada compuesto, mientras que la linealidad fue evaluada mediante la determinación de los valores de r^2 correspondientes a las curvas de calibración construidas con once niveles de concentración (20 – 700 mg L⁻¹), siendo obtenidos valores superiores o iguales a 0,9960. La precisión se evaluó mediante inyecciones de repetibilidad de la misma solución de 100 mg L⁻¹ ($n = 5$), lo que resultó en valores de RSD inferiores al 10,6 %. Estos valores, en conjunto con algunas propiedades fisicoquímicas de los compuestos, se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Log K_{ow}, RT, RI, LOD, LOQ y r² (para once niveles de concentración, 20 – 700 mg L⁻¹) obtenidos para el análisis por GC-MS de los cinco VOCs seleccionados en condiciones instrumentales optimizadas.

VOCs	Log K _{ow}	RT (min)	RI	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	r ²
α -Pineno	2,802	6,120	932	0,5	1,0	0,9975
β -Pineno	2,860	7,211	967	1,0	2,0	0,9967
Mirceno	3,537	7,587	982	1,0	2,0	0,9952
Limoneno	3,220	8,638	1018	0,5	1,0	0,9939
1,8-Cineol	2,348	8,707	1026	1,0	2,0	0,9960

4.2. Optimización de la metodología HS-SPME/GC-MS

El siguiente paso consistió en la optimización de las condiciones experimentales para el análisis de los VOCs por HS-SPME. Mediante la utilización de una estrategia de optimización univariante (OVAT), donde un parámetro se modifica para su evaluación mientras que los otros permanecen constantes lo que permitió el estudio del efecto del tipo de revestimiento de la fibra de SPME, el tiempo de retroextracción, el tiempo de microextracción y la temperatura de microextracción. Como los estudios son realizados con el método del estándar interno, las áreas de los picos cromatográficos obtenidos para cada compuesto fueron normalizados con el área del pico cromatográfico del IS (A/A_{IS}), siendo estos los valores utilizados para evaluar la eficiencia del proceso. De esta forma, en la Figura 2 son presentadas las eficiencias de extracción obtenidas en la optimización de cada una de las variables previamente descritas. Las condiciones experimentales optimizadas para la extracción de los VOCs estudiados correspondieron a: para la extracción, la fibra PDMS/DVB, 30 min, sin agitación, 30 °C, solución IS de 1 μ L (20 mg L⁻¹); y para la retroextracción, 5 min a 250 °C.

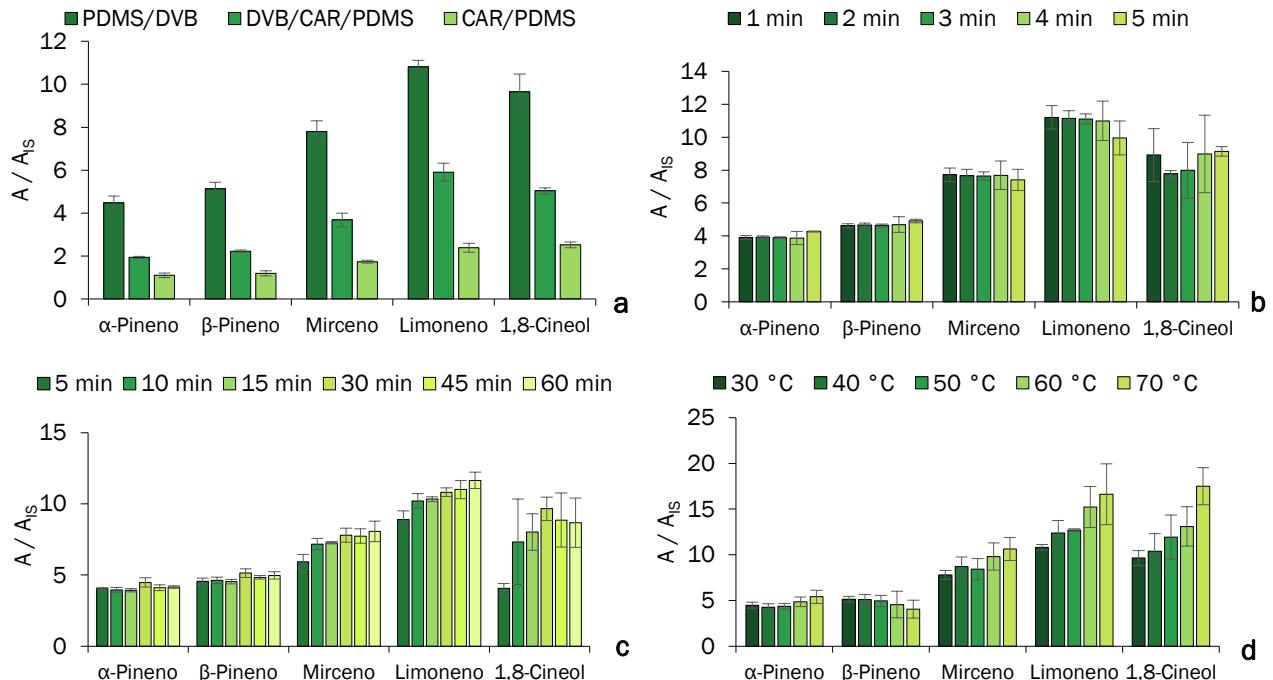


Figura 1. Efecto de la selectividad del revestimiento de la fibra (a), tiempo de retroextracción (b), tiempo de microextracción (c) y temperatura de microextracción (d) en el enriquecimiento de VOCs a través de HS-SPME/GC-MS. Las barras de errores representan la desviación estándar de tres réplicas.

4.3. Validación de la metodología HS-SPME/GC-MS

Para la validación de la metodología por HS-SPME/GC-MS fueron estudiados la sensibilidad, el rango dinámico de la gama lineal, la precisión y la exactitud. El rango dinámico lineal se obtuvo mediante el análisis de soluciones estándares de los cinco VOCs previamente mencionados con once niveles de fortificación comprendidos entre 0,02 y 0,70 µg, a través de los cuales fueron construidas curvas de calibración con r^2 superiores o iguales a 0,9966. También, se estimó la sensibilidad de la metodología mediante el cálculo de los LODs y LOQs, donde fueron determinados valores en las gamas de 0,001 – 0,002 µg y 0,002 – 0,005 µg, respectivamente. El rango de linealidad, así como los valores de r^2 de las curvas de calibración, los LODs y LOQs particulares para cada compuesto son presentados en la Figura 2.

Tabla 2. LODs, LOQs, gama lineal y r^2 de las curvas de calibración determinadas para los cinco VOCs a través de la metodología por HS-SPME/GC-MS bajo condiciones experimentales optimizadas.

VOCs	LOD (µg)	LOQ (µg)	Gama lineal (µg)	r^2
α-Pineno	0,001	0,002		0,9987
β-Pineno	0,001	0,002		0,9984
Mirceno	0,002	0,005	0,02 – 0,70	0,9985
Limoneno	0,001	0,002		0,9989
1,8-Cineol	0,002	0,005		0,9966

La exactitud y precisión de la metodología propuesta fue determinada a través de ensayos intradías (1 día) e interdías (3 días). Los estudios fueron realizados a través del análisis por HS-SPME/GC-MS con diferentes niveles de fortificación, incluyendo el LLOQ (0,02 µg), un nivel bajo (0,10 µg), intermedio (0,40 µg) y alto (0,70 µg). Fueron realizadas seis réplicas para cada nivel de fortificación, siendo que la exactitud se determinó a través de los valores de %RE y, la precisión, por los de RSD, siendo obtenidos valores inferiores a 19,9 y 17,7 %, respectivamente.

4.4. Ensayos con muestras reales

Seguidamente, la metodología optimizada y validada fue utilizada para el estudio de los VOCs producidos por hojas de *E. globulus*, *P. pinaster*, *Q. robur* y *Q. suber* recolectadas en los Parques de Sintra - Montes da Lua y Monserrate. En el procedimiento experimental, las hojas fueron pesadas y colocadas en frascos de 40 mL, siendo consecuentemente fortificadas con una solución de 20 mg L⁻¹ de IS. Algunos ejemplos de los cromatogramas obtenidos por HS-SPME/GC-MS de las hojas de cada especie de árbol se encuentran ilustrados en la Figura 3.

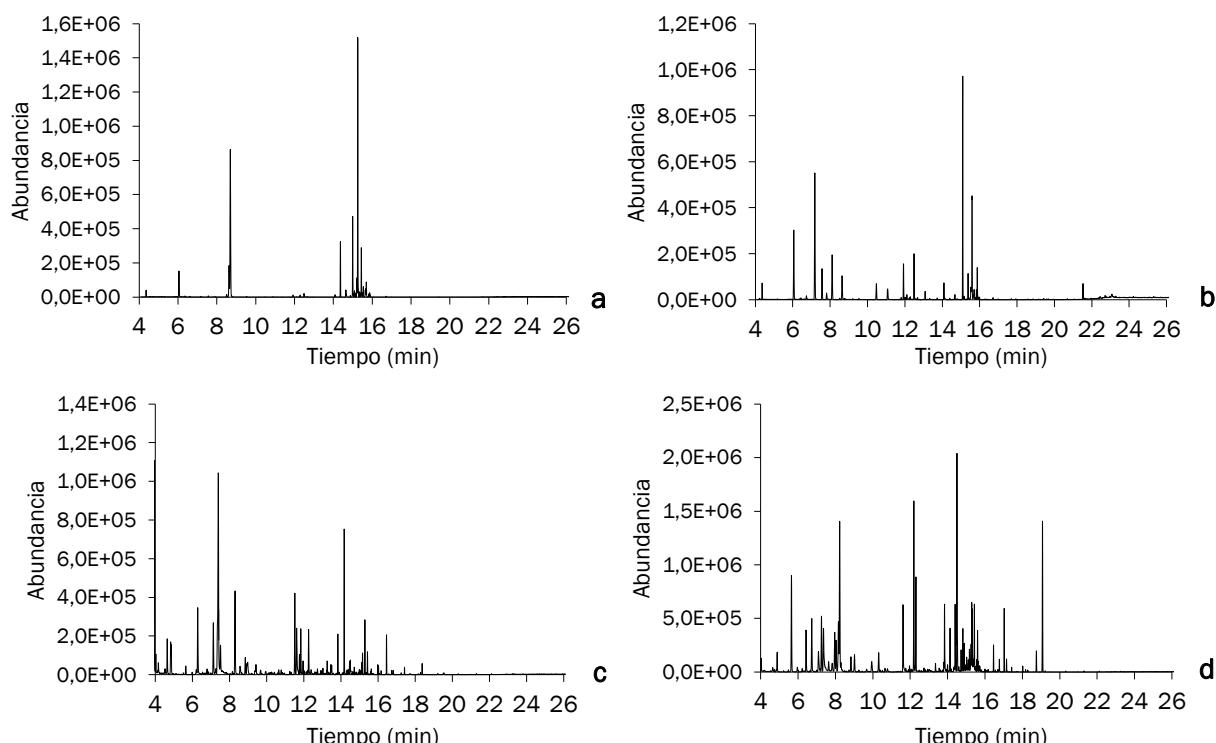


Figura 2. Ejemplos de chromatogramas resultantes del análisis por HS-SPME/GC-MS de los VOCs producidos por las hojas de *E. globulus* (a), *P. pinaster* (b), *Q. suber* (c) y *Q. robur* (d) en condiciones experimentales optimizadas.

4.4.1. Variabilidad en la composición de VOCs emitidos por hojas de diferentes recolectas

La variación de la composición de los VOCs producidos por las hojas de las cuatro especies fue realizado a través del análisis HS-SPME/GC-MS de las hojas recolectadas desde junio de 2020 hasta septiembre de 2021. La realización de estos estudios permitió determinar cuatro de los VOCs previamente analizados (α -pineno, β -pineno, mircenol y limoneno) tanto en las hojas de *P. pinaster*, como en las de *E. globulus*, mientras que el 1,8-cineol solo fue identificado en esta última especie. Conforme presentado en la Figura 4, los VOCs más abundantes en las hojas de los árboles ($A/A_{IS} > 5\%$) en todos las recolectas correspondieron a: a) *E. globulus* - α -pineno, limoneno, 1,8-cineol, α -gurjuneno, aromadendreno, alo-aromadendreno y ledeno; b) *P. pinaster* - β -cariofileno, germacreno D

y δ -cadineno; c) *Q. suber* - α -gurjuneno, β -cariofileno y *alo*-aromadendreno; d) *Q. robur* - α -copaeno, β -bourboneno, α -muuroleno, β -cariofileno, δ -cadineno y kaur-16-eno. Además, fue posible verificar que las principales clases de terpenoides producidas por las hojas de *E. globulus* y *P. pinaster* corresponden a los monoterpenoides y sesquiterpenoides, mientras que las emitidas por las hojas de *Q. suber* y *Q. robur* consisten principalmente en sesquiterpenoides y algunos diterpenoides.

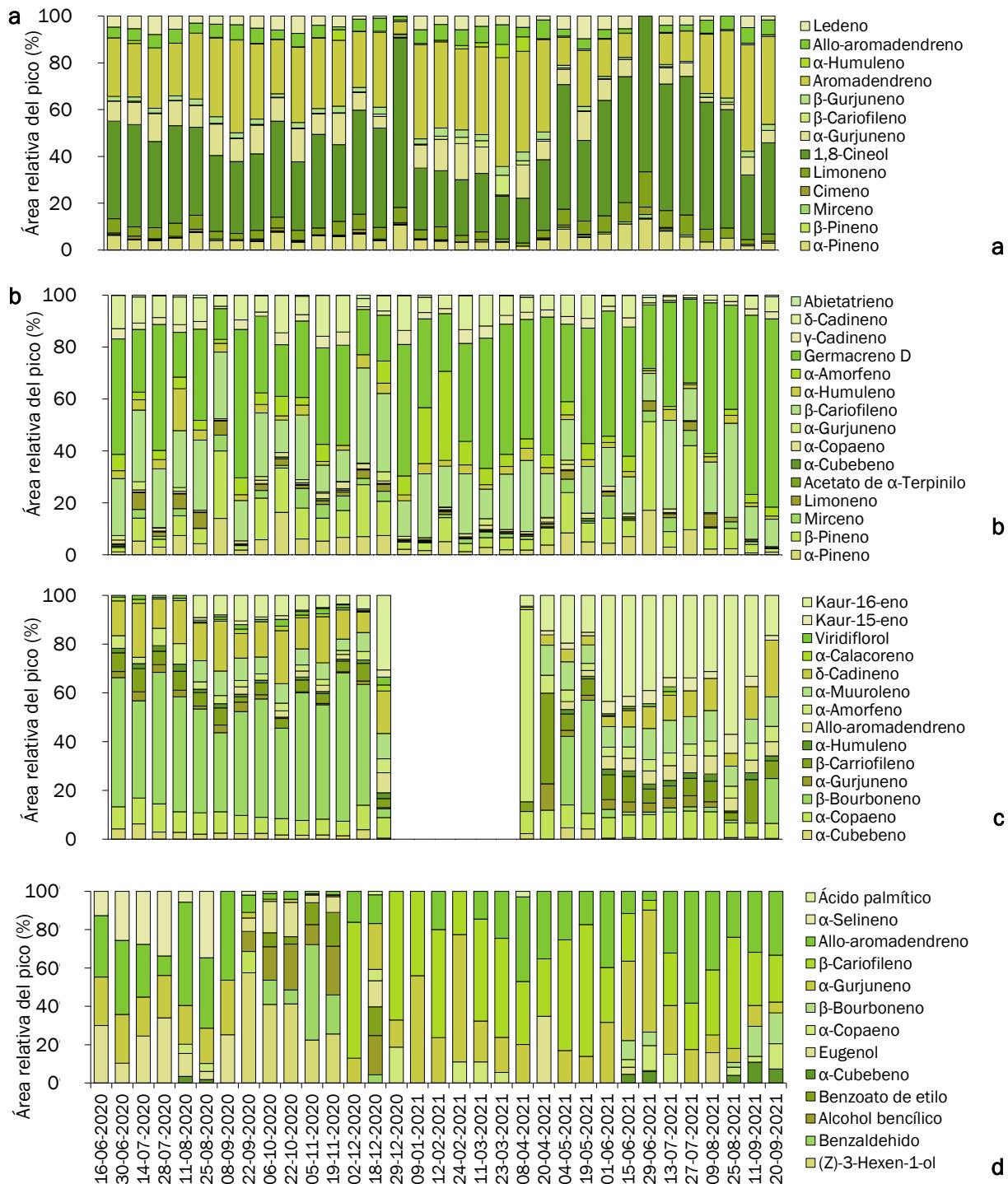


Figura 3. Variación total de VOCs producidos por las hojas de *E. globulus* (a), *P. pinaster* (b), *Q. robur* (c) y *Q. suber* (d), obtenida a través de análisis por HS-SPME/GC-MS en condiciones experimentales optimizadas.

4.4.1.1. Concentración emitida de VOCs por las hojas de *E. globulus* y *P. pinaster*

Por otra parte, recorriendo a las curvas de calibración construidas en el proceso de validación, se determinaron las concentraciones emitidas de los principales monoterpenoides (α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno y 1,8-cineol) por las hojas de *E. globulus* y *P. pinaster* en los diversos muestreos. Así, las gamas de concentración determinadas para cada compuesto se encuentran presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones mínimas y máximas detectadas a través de HS-SPME/GC-MS para los principales cinco VOCs producidos por las hojas de *E. globulus* e *P. pinaster*. Las concentraciones son expresadas con base al DW de las hojas, siendo los valores correspondientes a la media aritmética y la desviación estándar obtenidas a través de dos réplicas.

VOCs	<i>E. globulus</i>		<i>P. pinaster</i>	
	Concentración mínima	Concentración máxima	Concentración mínima	Concentración máxima
	($\mu\text{g g}^{-1}$)			
α -Pineno	95,2 ± 15,6	3183,3 ± 353,6	105,7 ± 1,6	1281,6 ± 168,5
β -Pineno	10,2 ± 1,3	78,2 ± 11,8	159,4 ± 19,1	3503,8 ± 396,3
Mirceno	18,4 ± 1,2	131,6 ± 14,1	10,3 ± 0,8	397,7 ± 28,9
Limoneno	39,6 ± 1,5	883,0 ± 18,4	9,2 ± 1,4	731,9 ± 115,3
1,8-Cineol	670,7 ± 110,8	7828,0 ± 40,0	-	-

4.4.2. Efecto de la temperatura en la emisión de VOCs por las hojas

El efecto de la temperatura se evaluó mediante la realización de ensayos en las condiciones experimentales optimizadas con alteración de la temperatura de extracción (30 – 150 °C). De modo a permitir la comparación de las cantidades relativas de VOCs entre las especies de árboles, el análisis GC-MS se realizó en el modo SL usando la misma cantidad de hojas (1 g). Como se muestra en la Figura 5, las cantidades relativas emitidas de VOCs mostraron una tendencia exponencial para cada una de las cuatro especies de árboles.

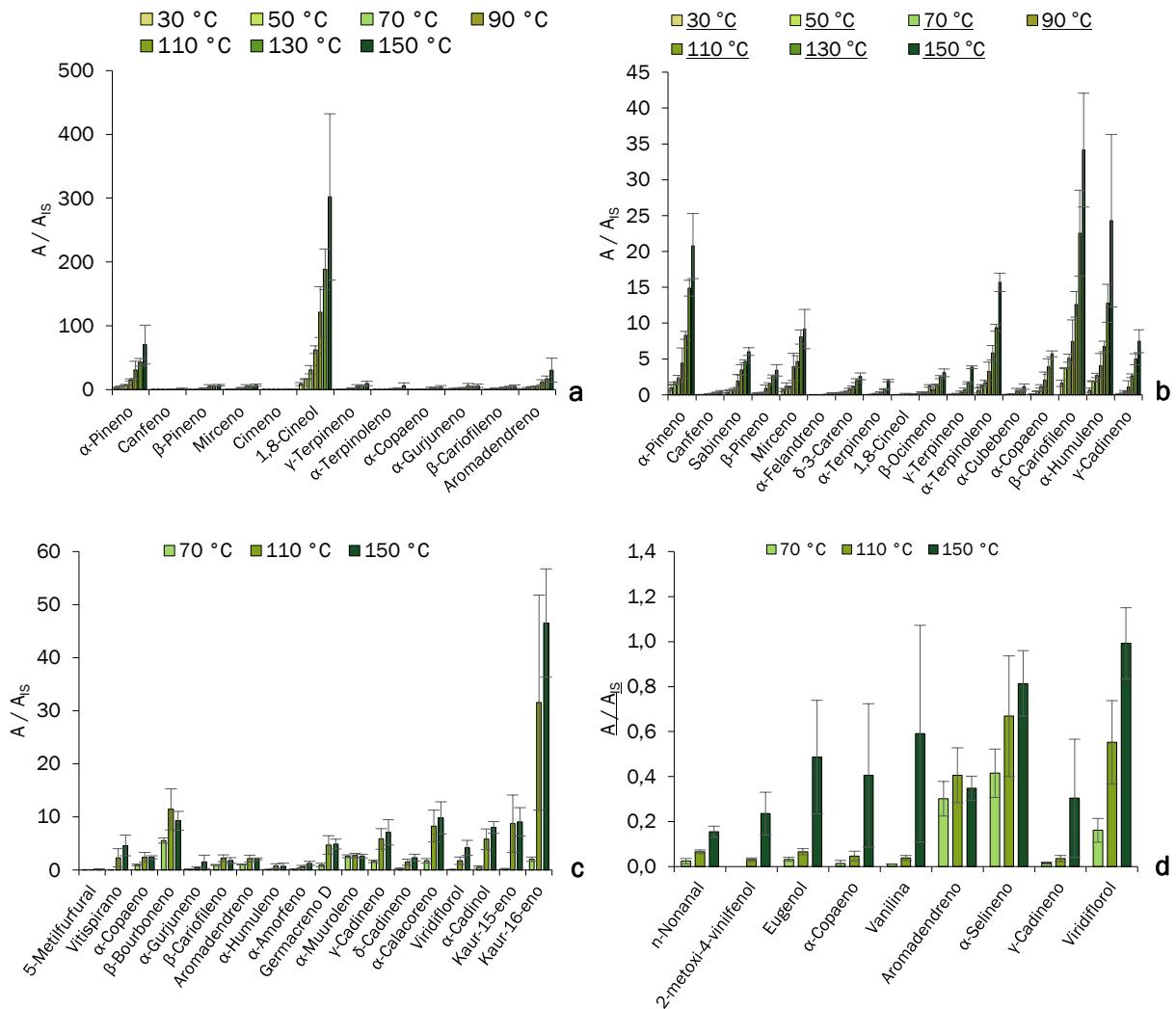


Figura 4. Efecto de la temperatura en la emisión de VOCs por las hojas de *E. globulus* (a), *P. pinaster* (b), *Q. robur* (c) y *Q. suber* (d) analizadas por HS-SPME/GC-MS bajo condiciones experimentales optimizadas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

5. Discusión

5.1. Optimización de las condiciones instrumentales del sistema GC-MS

La primera etapa del procedimiento experimental consistió en la optimización de las condiciones de análisis por GC-MS, de modo a establecer las condiciones instrumentales adecuadas para el estudio de los VOCs. Por medio del análisis de una solución estándar de los cinco VOCs (100 mg L^{-1}) en el modo *full-scan*, se adquirieron los espectros de masas característicos de cada compuesto a 70 eV. Este análisis permitió obtener picos cromatográficos simétricos para cada uno de los compuestos que, al mismo tiempo, mostraron una buena separación en un tiempo analítico aceptable (27 min). La sensibilidad instrumental fue estimada a través de los LODs y LOQs, siendo que para el α-pineno y limoneno correspondieron a concentraciones de 0,5 y 1,0 mg L^{-1} , respectivamente, mientras que, para el β-pineno, mirceno y 1,8-cineol estas correspondieron a 1,0 y 2,0 mg L^{-1} , respectivamente. Posteriormente, se determinó la precisión instrumental por medio del análisis de 6 inyecciones consecutivas de la misma solución, donde fueron obtenidos RSDs inferiores o iguales a 10,6 % para todos los analitos. La calibración instrumental se realizó mediante la

determinación de regresiones lineales con once niveles de concentración (en la gama de 20,0 a 700,0 mg L⁻¹) para cada uno de los cinco VOCs, en las cuales fueron verificadas buenas linealidades ($r^2 \leq 0,9963$).

5.2. Optimización de la metodología HS-SPME/GC-MS

El siguiente paso consistió en la evaluación de las condiciones experimentales del análisis por SPME, con el fin de obtener la máxima eficiencia de extracción para los VOCs en el modo HS. En el estudio de la selectividad del revestimiento de la fibra, se evaluó la eficiencia para la extracción de VOCs de tres fibras comerciales SPME (PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS y CAR/PDMS). Estas fibras promueven la extracción de los analitos por mecanismos de adsorción, en donde los compuestos interactúan con la superficie de los poros del material adsorbente mediante puentes de hidrógeno e interacciones de tipo π - π , dipolo-dipolo, hidrofóbicas e iónicas (Pawliszyn J., 2012). Conforme observado en la Figura 2.a, la fibra PDMS/DVB mostró mayor eficiencia para la extracción de los VOCs, ya que la respuesta instrumental para los analitos fue más del doble y cuádruple de las respuestas obtenidas con DVB/CAR/PDMS y CAR/PDMS, siendo estos resultados consistentes con los reportados por otros estudios con compuestos de estructuras similares (Zhu et al., 2016; Jerković et al., 2009). Por ende, la fibra de PDMS/DVB fue seleccionada para la realización de las restantes optimizaciones.

Posteriormente, se procedió al estudio del tiempo de retroextracción. Los resultados presentados en la Figura 2.b muestran comportamientos similares para el α - y β -pineno en los tiempos de retroextracción evaluados, siendo que para ambos la mayor eficiencia fue alcanzada a los 5 min. Esto también fue verificado para el 1,8-cineol; sin embargo, tanto el limoneno como el mirceno mostraron mejores resultados con la utilización de 3 y 4 min, respectivamente. Como los valores de A/A_{IS} para estos dos VOCs también fue relativamente alta, se optó por seleccionar un tiempo de extracción de 5 min para certificar una eficiencia de extracción máxima para la mayoría de los compuestos, así como asegurar una mejor limpieza de la fibra. A continuación, se evaluó el efecto del tiempo de microextracción. Dado que la SPME es una técnica de extracción basada en el equilibrio de distribución del analito entre la matriz de la muestra y el revestimiento de la fibra, la cantidad máxima de analito que puede ser extraído se determina apenas cuando el tiempo de equilibrio es alcanzado (Rianawati et al., 2009). En este sentido, los resultados obtenidos (Figura 2.c) muestran que para el α -pineno, β -pineno y 1,8-cineol la mejor eficiencia de extracción es alcanzada luego de 30 min de microextracción, indicando que el tiempo de equilibrio para estos compuestos ya podrá haber sido sobrepasado, mientras que para el mirceno y limoneno esto sucede apenas cuando luego de 60 min. Sin embargo, las RSDs de las respuestas instrumentales (A/A_{IS}) para estos dos últimos VOCs a 60 min, correspondientes a 8,8 y 5,0 %, respectivamente, son superiores a las obtenidos con 30 min (6,3 y 2,5 %, respectivamente), indicando una mayor dispersión entre réplicas para el mayor tiempo de microextracción y, consecuentemente, menor precisión en los resultados. Debido a esto, se optó por seleccionar 30 min como tiempo de microextracción seleccionado para los restantes ensayos.

El último paso del proceso de optimización consistió la evaluación de la temperatura de microextracción. Por medio de la observación de los resultados obtenidos (Figura 2.d) se observa que la eficiencia de extracción de los VOCs aumenta con la temperatura, a excepción del β -pineno, donde surge una disminución en el A/A_{IS} para temperaturas superiores a 40 °C. El aumento de la temperatura del HS afecta directamente la distribución del analito entre el aire y el revestimiento de la fibra, ya que aumenta el coeficiente de partición que, a su vez, mejora la capacidad de la fibra para extraer mayores cantidades de analitos. No obstante, la utilización de temperaturas elevadas puede conllevar a una disminución del coeficiente de partición entre la matriz de la muestra y el revestimiento de la fibra, lo que acarrea a pérdidas de eficiencia y sensibilidad (Qiu et al., 2014). En este sentido, la temperatura de 30 °C fue seleccionada para posteriores estudios debido a haber presentado la menor dispersión entre las réplicas para los cinco compuestos (RSD ≤ 8,54 %).

5.3. Validación de la metodología HS-SPME/GC-MS

Después de optimizar las condiciones de microextracción y retroextracción, se procedió a realizar la validación de la metodología por HS-SPME/GC-MS para la cuantificación de VOCs emitidos por las hojas de los árboles. La sensibilidad fue determinada mediante el cálculo de los límites analíticos de la metodología. Los LODs y LOQs determinados correspondieron a 0,001 y 0,002 µg, respectivamente, para el α -pineno y el limoneno, siendo que para el β -pineno, mirceno y 1,8-cineol estos correspondieron a 0,002 y 0,005 µg, respectivamente. El rango de linealidad se evaluó por medio de ensayos realizados fortificando los frascos con 10 niveles de concentración de la solución estándar constituida por los 5 VOCs, lo que permitiría la obtención de masas totales comprendidas entre 0,02 y 0,70 µg. Las regresiones lineales calculadas presentaron una buena linealidad ($r^2 \geq 0,9966$), siendo que a través de la prueba de *lack-of-fit* (al nivel de confianza de 95 %) fue posible observar su adecuación para el análisis de los VOCs en HS ($F_{\text{calc}} \leq F_{\text{tab}}$). La precisión y exactitud fueron determinados mediante la realización de ensayos de repetibilidad intradía e interdía, respectivamente, tal como indicado en la literatura (Oliveira et al., 2021). La repetibilidad intradía fue determinada a través de la realización de ensayos en un solo día, mientras que para la interdía se realizaron estudios en tres días. Tal como referido en la Tabla 3, la exactitud y precisión intradía se encontraron comprendidas dentro de los rangos de 2,4 – 19,9 % y 2,5 – 17,7 %, respectivamente, mientras que la exactitud y precisión interdía se localizaron entre los de 1,8 – 18,1 %, y 3,4 a 14,1 % respectivamente. Dado que los valores de RSD y %RE en el LLOQ se encontraron abajo de 19,1 % y, en el resto de los niveles de fortificación no sobrepasaron el 14,2 %, tanto la exactitud como la precisión de la metodología analítica propuesta es adecuada para el análisis de VOCs en este tipo de muestras.

5.4. Ensayos con muestras reales

5.4.1. Variabilidad en la composición de VOCs emitidos por hojas de diferentes muestreos

La aplicación de la metodología HS-SPME/GC-MS en hojas recolectadas desde junio de 2020 hasta septiembre de 2021 permitió observar diferentes características ecológicas con elevada especificidad para cada especie. Tal como observado en la Figura 4, la composición total de VOCs emitida por las hojas de *E. globulus* y *P. pinaster* muestra una variabilidad compleja a lo largo del tiempo. Sin embargo, el orden en la abundancia relativa de los compuestos principales permanece inafectada con el cambio de temporadas. Por el contrario, las composiciones totales de los VOCs emitidos por las hojas de *Q. suber* y *Q. robur* si exhibieron alteraciones súbitas con el tiempo. Sin embargo, dada la complejidad del sistema en estudio debido a la estructura interna de las hojas y las condiciones ambientales asociadas con los muestreos, se requiere la realización de estudios fisiológicos para estudios más extensos.

5.4.1.1. Contenido de VOCs emitido por las hojas de *E. globulus* y *P. pinaster*

Conforme observado la Tabla 3, las hojas de *P. pinaster* mostraron la capacidad de emitir mayores concentraciones de β -pineno ($3503,8 \pm 396,3 \mu\text{g g}^{-1}$) y mirceno ($397,7 \pm 28,9 \mu\text{g g}^{-1}$), mientras que las de *E. globulus* tuvieron las de α -pineno ($3183,3 \pm 353,6 \mu\text{g g}^{-1}$) y limoneno ($883,0 \pm 18,4 \mu\text{g g}^{-1}$). Por otro lado, sólo fueron detectadas emisiones de 1,8-cineol por las hojas de *E. globulus*, que alcanzaron una concentración máxima de $7828,0 \pm 40,0 \mu\text{g g}^{-1}$. Estas concentraciones máximas fueron detectadas en las hojas de *P. pinaster* a partir de junio de 2021 (mirceno) y julio de 2021 (β -pineno), mientras que para las hojas de *E. globulus* estas correspondieron a las hojas recolectadas en noviembre de 2020 (α -pineno, limoneno y 1,8-cineol). Las concentraciones máximas determinadas para el α -pineno, β -pineno y mirceno fueron menores en comparación con Sampetro et al. (2010), quienes reportaron los valores de 4357,5, 6187,2 y 1377,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los mismos compuestos, respectivamente, en el estudio de hojas de *P. pinaster*. Por otro lado, las

concentraciones de limoneno detectadas para las dos especies en el presente estudio fueron significativamente más elevadas que el valor reportado por los mismos autores ($463,2 \mu\text{g g}^{-1}$). No obstante, esta variabilidad en la concentración de los principales VOCs emitidos por una misma especie de árbol se encuentra asociada a los diferentes quimiotipos existentes de la misma, así como las condiciones meteorológicas del lugar de muestreo, lo que puede afectar el patrón de emisión de los diferentes VOCs (Figueiredo et al., 2020).

5.4.2. Efecto de la temperatura en la emisión de VOCs por las hojas

La variación en la temperatura ambiente mostró tener un impacto significativo en la emisión de VOCs por las hojas, ya que describió una tendencia exponencial para cada una de las cuatro especies de árboles, como observado en la Figura 5. Considerando que la humedad evapora de las hojas en la gama de temperaturas comprendidas entre 30 y 120 °C (Liu et al., 2015), el aumento en la temperatura también podrá estimular la emisión de terpenoides por las hojas de los árboles en esta misma gama. Además, tal como afirmado por Koppman R. (2007), los terpenoides son sintetizados y almacenados dentro de las hojas, siendo que su emisión podrá estar asociada a varios factores, incluyendo el estado de crecimiento de la planta, las condiciones ambientales, así como diversos procesos fisiológicos, bioquímicos y físicoquímicos. Los resultados obtenidos muestran que la cantidad total de VOCs producidos por las hojas del *E. globulus* es excesivamente mayor que la cantidad liberada de las otras especies, lo que justifica que su contribución al total de VOCs en la atmósfera podría ser más significativa que la de las otras especies, especialmente a temperaturas más elevadas, seguida del *P. pinaster* y el *Q. robur*, que presentan emisiones más parecidas. No obstante, mientras que las hojas de *P. pinaster* emiten más monoterpenoides, las de *Q. robur* emiten únicamente sesquiterpenoides. Como los monoterpenoides son las clases terpenoides más inflamables, así como los principales contribuyentes a la formación de oxidantes atmosféricos y aerosoles orgánicos secundarios (Koppmann, 2007; Kamens et al., 1999), el incremento de la temperatura ambiental en las plantaciones de *E. globulus* y *P. pinaster* aumentaría la concentración de estos compuestos en la atmósfera, lo que eventualmente podría ser una potencial fuente de ignición para los incendios.

6. Conclusiones

La metodología propuesta (HS-SPME/GC-MS) fue optimizada, validada y aplicada para el análisis de cinco monoterpenoides (α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno y 1,8-cineol). Los resultados demuestran que el enfoque analítico exhibe un gran desempeño, demostrando alta sensibilidad y robustez, así como resultados compatibles con otras estrategias analíticas reportadas previamente en la literatura. Los estudios de variación de VOCs a lo largo del año mostraron una especificidad diferente para cada especie, ya que la principal clase de VOCs producidos presenta elevada especificidad, siendo que las emisiones se encuentran constituidas principalmente por monoterpenoides (*E. globulus* y *P. pinaster*) y sesquiterpenoides (*Q. robur* y *Q. suber*), lo que podría justificar la propia inflamabilidad de cada especie debido a las características propias de estas clases de compuestos. Las tendencias de variabilidad muestran un sistema altamente complejo para cada espécimen, lo que sugiere la necesidad de evaluar la fisiología de la especie para mejorar la comprensión de los mecanismos de emisión. Además, los resultados mostraron que *E. globulus* presentó mayor emisión de α -pineno ($3183,3 \pm 353,6 \mu\text{g g}^{-1}$), limoneno ($883,0 \pm 18,4 \mu\text{g g}^{-1}$) y 1,8-cineol ($7828,0 \pm 40,0 \mu\text{g g}^{-1}$), mientras que *P. pinaster* tuvo valores más altos para β -pineno ($3503,8 \pm 396,3 \mu\text{g g}^{-1}$) y mirceno ($397,7 \pm 28,9 \mu\text{g g}^{-1}$). Finalmente, el aumento de la temperatura ambiente demostró incrementar la carga volátil emitida por las hojas de los árboles exponencialmente, lo que podrá ser utilizado para estudios futuros para estimar los VOCs emitidos a otras temperaturas. Estos estudios también permitieron demostrar que la carga volátil emitida por las hojas de *E. globulus* y *P. pinaster* es significativamente mayor que las emitidas por las restantes especies, siendo

principalmente constituida por monoterpenóides, por lo que podrían presentar una contribución más elevada para el desenlace de los incendios.

7. Agradecimientos

Financiado por la Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P./MCTES a través de fondos nacionales (PIDDAC) - PCIF/GFC/0078/2018, beca de maestría (O.C. Gonçalves), UIDB/00100/2020, UIDP/00100/2020 and LA/P/0056/2020. Los autores agradecen a la compañía Parques de Sintra-Monte da Lua, S.A, por permitir la utilización del Parque de Sintra e Monserrate como sitios de muestreo.

8. Bibliografía

- ABRAM, N. J.; HENLEY, B. J.; GUPTA, A. S.; LIPPmann, T. J. R.; CLARKE, H.; DOWDY, A. J.; SHARPLES, J. J.; NOLAN, R. H.; ZHANG, T.; WOOSTER, M. J.; WURTZEL, J. B.; MEISSNER, K. J.; PITMAN, A. J.; UKKOLA, A. M.; MURPHY, B. P.; TAPPER, N. J.; BOER, M. M; 2021. Connections of climate chance and variability to large and extreme forest fires in southeast Australia. *Commun. Earth Environ.* 2, 1 – 17.
- ADAMS, R. P.; 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition. Illinois USA Allured Publ. Corp. Carol Stream. 804 – 806.
- AHMAD, S. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; 2019. High throughput bar adsorptive microextraction: A novel cost-effective tool for monitoring benzodiazepines in large number of biological samples. *Talanta*. 199, 195 – 202.
- CHATELON, F. J.; SAUVAGNARGUES, S.; DUSSERRE, G.; BALBI, J. H.; 2014. Generalized Blaze Flash, a “Flashover” Behavior for Forest Fires—Analysis from the Firefighter’s Point of View. *Open J. For.* 04 (05), 547–557.
- CHETEHOUNA, K.; BARBONI, T.; ZARGUILI, I.; LEONI, E.; SIMEONI, A.; FERNANDEZ-PELLO, A. C.; 2009. Investigation on the emission of volatile organic compounds from heated vegetation and their potential to cause an accelerating forest fire. *Combust. Sci. Technol.* 181 (10), 1273 – 1288.
- COUDOUR, B.; CHETEHOUNA, K.; LEMÉ, L.; BERTIN, P.; GARO, J. P.; 2019. Thermal degradation of α -pinene using a Py-GC/MS. *J. Therm. Anal. Calorim.* 137, 1315–1328.
- CRAMER, W.; GUIOT, J.; FADER, M.; GARRABOU, J.; GATTUSO, J. P.; IGLESIAS, A.; LANGE, M. A.; LIONELLO, P.; LLASAT, M. C.; PAZ, S.; PEÑUELAS, J.; SNOUSSI, M.; TORETI, A.; TSIMPLIS, M. N.; XOPLAKI, E.; 2018. Climate change and interconnected risks to sustainable development in the Mediterranean. *Nat. Clim. Chang.* 8 (11), 972–980.
- DEMEESTERE, K.; DEWULF, J.; DE WITTE, B.; VAN LANGENHOVE, H.; 2007. Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices. *J. Chromatogr. A*, 1153, 130 – 144.

FOREST EUROPE - Ministerial Conference on the Protection of Forests in Europe; 2010. Assessment of Forest Fire Risks and Innovative Strategies for Fire Prevention. Rhodes, Greece.

GONÇALVES, E.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; HENRIQUES, J.; SOUSA, E.; BONIFÁCIO, L.; 2020. Effect of *Monochamus galloprovincialis* feeding on *Pinus pinaster* and *Pinus pinea*, oleoresin and insect volatiles. *Phytochemistry*, 169 (9), 112159.

Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. 6º Inventário Florestal Nacional IFN6. Final report; Ed.; Lisbon, Portugal.

JERKOVIĆ, I.; MARIJANOVIĆ, Z.; 2009. A short review of headspace extraction and ultrasonic solvent extraction for honey volatiles fingerprinting. *Croatian Journal of Food Science and Technology*. 1 (2), 28 – 34.

KAMENS, R.; JANG, M.; CHIEN, C. J.; LEACH, K.; 1999. Aerosol Formation from the Reaction of α -Pinene and Ozone Using a Gas-Phase Kinetics-Aerosol Partitioning Model. *Environ. Sci. Technol.* 33 (9), 1430 – 1438.

KESSELMEIER, J.; STAUDT, M; 1999. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *J. Atmos. Chem.* 33, 23 – 88.

KOPPMANN; R.; 2007. Volatile Organic Compounds in the Atmosphere. 1st Edition. John Wiley & Sons, Ltd: Oxford. 1 – 512.

LIU, Z.; QI, N.; LUAN, Y.; SUN, X.; 2015. Thermogravimetry-Infrared Spectroscopy Analysis of the Pyrolysis of Willow Leaves, Stems, and Branches. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015, 1 – 9.

MCKIERNAN, A. B.; POTTS, B. M.; BRODRIBB, T. J.; HOVENDEN, M. J.; DAVIES, N. W.; MCADAM, S. A. M.; ROSS, J. J.; RODEMANN, T.; O'REILLY-WAPSTRA, J. M.; 2015. Responses to mild water deficit and rewetting differ among secondary metabolites but are similar among provenances within *Eucalyptus* species. *Tree Physiol.* 36 (2), 133 – 147.

NOGUEIRA, J. M. F.; 2012. Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Anal. Chim. Acta*. 757, 1 – 10.

OLIVEIRA, M.N.; GONÇALVES, O.C.; AHMAD, S.M.; SCHNEIDER, J.K.; KRAUSE, L.C.; NENG, N.R.; CARAMÃO, E.B.; NOGUEIRA, J.M.F. Application of Bar Adsorptive Microextraction for the Determination of Levels of Tricyclic Antidepressants in Urine Samples. *Molecules*, 26 (3101), 1 – 18.

PAWLISZYN, J.; 2012. Handbook of Solid Phase Microextraction; Elsevier: Ontario.

QIU, R.; TRENGOVE, R.; AGARWAL, M.; REN, Y.; 2014. Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction Conditions for the Identification of *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Plant Disease*. 98 (8), 1088 – 1098.

RIANAWATI, E.; R. BALASUBRAMANIAN, R.; 2009. Optimization and validation of solid phase micro-extraction (SPME) method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and stormwater. *Phys. Chem. Earth.* 34 (13–16), 857 – 865.

SAMPEDRO, L; MOREIRA, X.; LLUSIA, J.; PEÑUELAS, J.; ZAS, R.; 2010. Genetics, phosphorus availability, and herbivore-derived induction as sources of phenotypic variation of leaf volatile terpenoids in a pine species. *J. Exp. Bot.* 61 (15), 4437 – 4447.

SAN-MIGUEL-AYANZ, J.; OOM, D.; ARTES, T.; VIEGAS, D. X.; FERNANDES, P.; FAIVRE, N.; FREIRE, S.; MOORE, P.; REGO, F.; CASTELLNOU, M.; 2020. Forest fires in Portugal in 2017. In: CASAJUS VALLES, A., MARIN FERRER, M., POLJANŠEK, K., CLARK, I. (eds.), *Science for Disaster Risk Management 2020: acting today, protecting tomorrow*, EUR 30183 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg.

SAN-MIGUEL-AYANZ, J; DURRANT, T; BOCA, R.; LIBERTÀ, G.; BRANCO, A.; DE RIGO, D.; FERRARI, D.; MAIANTI, P.; ARTÉS VIVANCOS, T.; OOM, D.; PFEIFFER, H.; NUIJTEN, D.; LERAY, T; 2019. Forest Fires in Europe, Middle East and North Africa 2018. Joint Research Centre. 1 – 178. Luxemburgo.

Sistema de Gestão de Informação de Incêndios Florestais. Disponível en: <https://fogos.icnf.pt/sgif2010/login.asp>

SOUZA SILVA, É. A.; SABOIA, G.; JORGE, N. C.; HOFFMANN, C.; DOS SANTOS ISAIAS, R. M.; SOARES, G. L. G.; ZINI, C. A.; 2017. Development of a HS-SPME-GC/MS protocol assisted by chemometric tools to study herbivore-induced volatiles in *Myrcia splendens*. *Talanta*. 175 (4), 9 – 20.

XAVIER VIEGAS, D.; 1998. Forest Fire Propagation. *Phil Trans. R. Soc. Lond. A.*, 356 (1748), 2907 – 2928.

ZHU, H.; ZHU, J.; WANG, L.; LI, Z.; 2016. Development of a SPME-GC-MS method for the determination of volatile compounds in Shanxi aged vinegar and its analytical characterization by aroma wheel. *J. Food Sci. Technol.* 53 (1), 171 – 183.