



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química

A Contribuição da Química para o Estudo de
Orchidaceae e seus Polinizadores

Mariza Gomes Reis

Dissertação de Mestrado

Orientadora
Anita Jocelyne Marsaioli

Campinas-SP
Dezembro/2000

UNIDADE	I 9
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	R277c
V.	Ex.
TOMBO BC	46184
PROC.	16-392/01
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	12-03-01
N.º CPD	Vinte 01

CM00158837-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

R277c

Reis, Mariza Gomes

A contribuição da química para o estudo
de Orchidaceae e seus polinizadores / Mariza
Gomes Reis. — Campinas, SP: [s.n], 2000.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Dissertação (mestrado) — Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fragâncias florais. 2. *Oncidium*. 3. Diacil-
gliceróis. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universi-
dade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
III. Título.

Ao meu querido esposo, Marlon.

*À minha querida mãe, Vera
e aos meus adoráveis irmãos, Rodrigo e Roberto.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Anita J. Marsaioli pela dedicada orientação e amizade demonstrada no decorrer deste trabalho.

À Professora Maria do Carmo E. Amaral, sempre tão simpática, obrigada pela atenção e ajuda.

Aos colegas da Biologia Cida e Emerson, que muito colaboraram e ajudaram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Marcos Eberlin e ao Betão pela colaboração com a reação com dissulfeto de dimetila

Ao Professor Sebastião pelas doações do polímero Porapak-Q.

Ao Iveraldo pelo desenho do *Headspace* dinâmico.

Aos colegas de laboratório André, Bira, Denise, Samísia, Regina, Gelson, Sergio, Ricardo, Laverde, Paulo, Clara, Luiz Antônio, Bia, Verushka, Jean, Ilka, Marisa, Ana Lúcia, Lourdinha, Celira, Pilar e a Míriam obrigada pela acolhida, amizade e paciência.

À Sônia, Soninha, Sergio, Laverde e Ricardo pela aquisição dos espectros de RMN.

Aos colegas, professores e funcionários que frequentam o cafezinho, pela convivência agradável durante estes anos.

À família Duarte pela acolhida, carinho e amizade.

Dissertação de Mestrado

A Contribuição da Química para o Estudo de Orchidaceae e seus Polinizadores

Resumo

Mariza Gomes Reis

Prof. Anita Jocelyne Marsaioli

Investigar a química envolvida na polinização de Orchidaceae foi o objetivo deste trabalho. Inicialmente foi estudada a composição da fragrância floral de cinco espécies: *Stanhopea lietzeii*, *Stanhopea insignis*, *Polystachya estrellensis*, *Psilochilus modestus* e *Epidendrum secundum*. Nestas espécies as fragrâncias são constituídas por misturas de compostos monoterpênicos, sesquiterpênicos, aromáticos e derivados de ácidos graxos. Os resultados deste estudo revelam uma grande diferença entre a composição da fragrância de flores polinizadas por abelhas e por borboletas. Numa segunda etapa foram focalizadas as recompensas florais de Orchidaceae, óleos florais produzidos em glândulas chamadas de elaióforos, de seis espécies de *Oncidium*: *O. pubes*, *O. truncatum*, *O. hookeri*, *O. enderianum* e *O. varicosum*; e três espécies do gênero *Gomesa*: *G. crispa*, *G. recurva* e *Gomesa* sp. foi revelada a presença de ésteres de glicerila; fenilpropanóides, terpenóides; e derivados de ácidos graxos. Os ésteres de glicerila foram encontrados principalmente como diacilgliceróis e triacilgliceróis nos quais o glicerol estava esterificado com um ou dois resíduos de ácido acético e um ácido graxo, sendo suas identificações sugeridas com base nas análises de CG/EM e RMN do óleo, e por comparação com 3 compostos sintetizados a partir do D-manitol, ácido oleico e ácido acético. Finalmente, nossos resultados fornecem evidências químicas que sugerem que a polinização destas espécies de *Oncidium* não estão baseadas num mecanismo de atração-engano dos visitantes florais, mas na recompensa com óleos florais. Este é o primeiro relato sobre a composição química destes óleos florais em espécies de Orchidaceae.

Abstract

The Chemical Contribution on Study of Orchidaceae and its Pollinators

Mariza Gomes Reis

Prof. Anita Jocelyne Marsaioli

The investigation of the Orchidaceae pollination is the aim of this work. At first the floral fragrance of five species were studied: *Stanhopea lietzei*, *Stanhopea insignis*, *Polystachya estrellensis*, *Psilochilus modestus* and *Epidendrum secundum*. The fragrances of these species are mixtures of monoterpenoids, sesquiterpenoids, and aromatic compounds and fatty acids derivatives. These work's results show a significant difference between the floral fragrance composition of flowers pollinated by bees and by butterflies. The second part of this work is focused on floral rewards, in this case, floral oils produced in the elaiophers glands, offered by orchidaceae flowers. Floral oils of six *Oncidium* species and three species of *Gomesa* genus were studied. The *Oncidium* species are: *O. pubes*, *O. truncatum*, *O. hookeri*, *O. enderianum*, and *O. varicosum*. The *Gomesa* species are: *G. crispa*, *G. recurva* and *Gomesa sp.* The composition of these oils presents glyceril esters, phenylpropanoids, terpenoids and fatty acid derivatives. The glyceril esters were found as di and triacilglycerols where the glycerol was esterified by one or two acetic acid residues and one fatty acid residue. The identification of these compounds is suggested by the GC/MS and NMR analysis and by comparing the oils data and three synthetic compounds data. These synthetic compounds were produced by using as starting products the D-manitol, oleic acid and acetic acid. This work presents chemical evidences, which suggest that species pollination is not based on attraction-deception system but based on floral rewards. This is the first study on chemical composition of floral oils of these Orchidaceae species.

Curriculum Vitae

1. DADOS PESSOAIS

- 1.1 - Nome: Mariza Gomes Reis
- 1.2 - Endereço eletrônico: mariza@igmm.unicamp.br
- 1.3 - Telefone: (19) – 3252-8701

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2.1 – Graduação
UFPB – Universidade Federal da Paraíba
João Pessoa – PB
Licenciada em Química
- 2.2 – Pós-graduação – Mestrado
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
Campinas – SP

3. PUBLICAÇÕES

- 3.1 – **Reis, M. G.**, Faria, A. D., Bittrich, V., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. The chemistry of flower rewards – *Oncidium* (Orchidaceae). *Journal of the Brazilian Chemical society*, **2000**, *11*, 600.
- 3.2 – **Santos, M. G.**, Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. The ecological role of the *Stanhopea* (Orchidaceae) flower volatiles. **Painel (PPA-010)** - 22nd IUPAC – International Symposium on the Chemistry of Natural Products – 3 – 8 de setembro, 2000, São Carlos. SP
- 3.3 – **Santos, M. G.**, Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. Identification of *Oncidium* (Orchidaceae) rewards. **Painel (PPA-011)** - 22nd IUPAC – International Symposium on the Chemistry of Natural Products – 3 – 8 de setembro, 2000, São Carlos. SP
- 3.4 – **Santos, M. G.**, Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. The chemistry of flower rewards. The role of *Oncidium* (Orchidaceae) oil in pollination. **Painel (P – 131)** - 2nd IUPAC – International Conference on Biodiversity – 11 a 15 de Julho, 1999, Belo Horizonte. MG
- 3.5 – Faria, A. D., Castro, M. M., **Santos, M. G.**, Marsaioli, A. J. e Amaral, M. C. E. Comparação da estrutura anatômica e determinação das substâncias secretadas pelas glândulas florais de *Oncidium flexuosum* Sims e *O. Pubes* Lindl. (Orchidaceae). **Painel (BE – 6)** – XIII Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo – 04 a 06 de Setembro de 2000.

Abreviaturas, Símbolos e Notas

C₀	Carbono quaternário
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massas
COSY	Correlation Spectroscopy (Espectro bidimensional de correlação H, H)
CP	Coinjeção de padrão
<i>d</i>	Dublete
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
<i>dd</i>	Duplo dublete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Incremento sem distorção por transferência de polarização)
DMAP	4-dimetilamino-piridina
DMDS	Dissulfeto de dimetila
EM	Espectrometria de Massas
EMAR	Espectro de massas de alta resolução
eV	Elétron Volt
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Espectro de RMN bidimensional de correlação C, H a uma ligação)
IR	Índice de Retenção
<i>J</i>	Constante de acoplamento
M⁺	Íon molecular
MHz	Mega Hertz
<i>m/z</i>	Relação massa / carga
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Triplete

Notas:

- Composto com numeração de 1 a 11 são compostos sintéticos
- Compostos com numeração de 20 a 49 foram identificados nas fragrâncias florais da primeira parte deste trabalho.
- Compostos com numeração acima 50 foram identificados nos óleos florais e fragrâncias florais da segunda parte deste trabalho

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Comunicação Química.....	3
1.2 Polinização.....	4
2. OBJETIVOS.....	9

CAPÍTULO I – FRAGRÂNCIAS FLORAIS

I.1 INTRODUÇÃO.....	13
I.1.1 Fragrância e polinização.....	13
I.1.2 Introdução aos caminhos biossintéticos de compostos presentes nas fragrâncias.....	14
I.1.2.1 Compostos aromáticos.....	14
I.1.2.2 Compostos monoterpenóides.....	15
I.1.2.3 Compostos sesquiterpenóides.....	16
I.1.3 Considerações sobre as espécies <i>Stanhopea lietzei</i> , <i>Stanhopea insignis</i> , <i>Polystachya estrellensis</i> , <i>Psilochilus modestus</i> e <i>Epidendrum</i> <i>secundum</i>	18
I.1.3.1 <i>Stanhopea</i> Frost ex Hooker.....	18
I.1.3.1.1 <i>Stanhopea lietzei</i>	18
I.1.3.1.2 <i>Stanhopea insignis</i>	19
I.1.3.2 <i>Polystachya</i> Hook.	19
I.1.3.2.1 <i>Polystachia estrellensis</i>	20
I.1.3.3 <i>Psilochilus</i> Barb. Rodr	20
I.1.3.3.1 <i>Psilochilus modestus</i>	20
I.1.3.4 <i>Epidendrum</i> L.	21
I.1.3.4.1 <i>Epidendrum secundum</i>	21

I.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
I.2.1	Otimização do método de extração da fragrância.....	22
I.2.2	<i>Stanhopea lietzei</i> - Polinização e Fragrância.....	26
I.2.3	<i>Stanhopea insignis</i> - Polinização e Fragrância.....	27
I.2.4	<i>Polystachya estrellensis</i> - Polinização e Fragrância.....	29
I.2.5	<i>Psilochilus modestus</i> - Polinização e Fragrância.....	30
I.2.6	<i>Epidendrum secundum</i> - Polinização e Fragrância.....	31
I.2.7	Conclusões do Estudo sobre Fragrâncias Florais.....	34

CAPÍTULO II – ÓLEOS FLORAIS

II.1	INTRODUÇÃO.....	39
II.1.1	Óleos florais e polinização.....	39
II.1.2	Composição Química de Óleos Florais.....	39
II.1.3	Considerações sobre o gênero <i>Oncidium</i> e <i>Gomesa</i>.....	40
II.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
II.3.1	Composição Química dos Óleos Florais de Espécies do Gênero <i>Oncidium</i> e <i>Gomesa</i> (Orchidaceae).....	44
II.3.2	Classe de compostos encontrados nos óleos florais.....	46
II.3.2.1	Fenilpropanóides.....	46
II.3.2.2	Terpenóides.....	46
II.3.2.2.1	Sesquiterpenóides.....	46
II.3.2.2.2	Esteróides.....	46
II.3.2.2.3	Meroterpenóides.....	48
II.3.2.3	Derivados de ácidos graxos.....	49
II.3.2.3.1	Ácidos livres.....	49
II.3.2.3.2	Ésteres.....	49
II.3.2.3.3	Hidrocarbonetos.....	49
II.3.2.3.4	Cetonas.....	49
II.3.2.4	Ésteres de glicerila.....	50

II.3.2.4.1	Sugestões de estrutura de di- e triacilgliceróis a partir do espectro de Massas.....	54
II.3.3	Síntese dos Padrões de Ésteres de glicerila.....	57
II.3.3.1	Obtenção do 2,3-isopropilideno-glicerol <u>3</u>	59
II.3.3.2	Obtenção do 1-acetil-glicerol <u>4</u>	59
II.3.3.3	Obtenção do 1,3-diacetil-glicerol <u>11</u>	61
II.3.3.3.1	Confirmação da presença do composto <u>11</u> no óleo floral de <i>O. hookeri</i>	62
II.3.3.4	Obtenção do 1-oleoil-2,3-isopropilideno-glicerol <u>5</u>	64
II.3.3.5	Obtenção do 1-oleil-glicerol, <u>6</u>	65
II.3.3.6	Obtenção do 1-oleil-3-acetil-glicerol, <u>7</u>	66
II.3.3.7	Obtenção do 1-oleoil-2,3-diacetil-glicerol <u>8</u>	70
II.3.4	Reação com dissulfeto de dimetila (DMS) para localizar a ligação dupla.....	75
II.3.5	Análise de RMN dos óleos florais de <i>O. hookeri</i> e <i>O. pubes</i>	77
II.3.6	Estudo das fragrâncias florais de <i>Oncidium pumilum</i> e <i>Gomesa crispa</i>	87
II.3.7	Conclusões do Estudo sobre Óleos Florais.....	90
3.	CONCLUSÃO FINAL.....	95
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	99
4.1	Materiais e métodos.....	99
4.2	Obtenção dos óleos florais – Estruturas Elaióforas.....	103
4.3	Obtenção das Fragrâncias Florais.....	104
4.3.1	Análise por injeção de sólidos.....	104
4.3.2	Headspace estático- Microextração em fase sólida com as flores na planta.....	104
4.3.3	Headspace estático – Microextração em fase sólida com flores coletadas.....	105
4.3.4	Headspace dinâmico – Polímero Porapak-Q.....	106

4.4	Síntese de padrões.....	107
4.4.1	1,2:5,6 – Diisopropilideno-D-manitol, <u>2</u>.....	107
4.4.2	2,3-O-Isopropilideno-D-glicerol, <u>3</u>.....	108
4.4.3	1-Acetil- glicerol, <u>4</u>.....	109
4.4.4	1,3-diacetil-glicerol, <u>11</u>.....	110
4.4.5	2,3-isopropilideno-1-oleoil-Glicerol, <u>5</u>.....	111
4.4.6	1-oleoil-glicerol, <u>6</u>.....	113
4.4.7	1-oleoil-3-acetil-glicerol, <u>7</u>	114
4.4.8	1-oleoil-2, 3-diacetil-glicerol, <u>8</u>.....	115
4.5	Reação com dissulfeto de dimetila (DMDS) para localizar a posição da ligação dupla.....	116
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
6.	CROMATOGRAMAS.....	129
7.	ESPECTROS.....	143

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Comunicação química

Organismos como plantas, insetos, animais e microorganismos são capazes de liberar substâncias que são usadas na comunicação intraespecífica e interespecífica no mesmo ou em diferentes níveis tróficos. Estas biomoléculas são chamadas de semioquímicos, onde semio em grego significa sinais, portanto semioquímico é sinônimo de substâncias de sinalização (Mori, 1998).

Os semioquímicos, que são biossintetizados pelo organismo emissor, tem sido classificado de acordo com o modo de ação: ação intraespecífica – feromônios, e ação interespecífica – aleloquímicos – subgrupos: kairomônios, alomônios e sinomônios. Os feromônios são biomoléculas mediadoras de interações entre organismos da mesma espécie. Substâncias exaladas pela fêmea de borboletas para atrair o macho, são feromônios sexuais (Karlson & Lüscher, 1959), substâncias exaladas por bactérias para organização das células na colônia são feromônios de agregação (Morikawa, *et al.*, 1998). Os aleloquímicos são biomoléculas que mediam interações entre organismos de diferentes espécies. Substâncias produzidas por um organismo que, em contato com organismo de outra espécie, provocam nesta respostas fisiológicas ou comportamentais que beneficiam o organismo emissor, mas não o organismo receptor, são chamadas de alomônios (biomoléculas exaladas pelo predador que atraem a presa). Substâncias produzidas por um organismo que, em contato com organismo de outra espécie, provocam nesta espécie respostas fisiológicas ou comportamentais que beneficiam o organismo receptor, mas não o organismo emissor, são chamadas de kairomônios (biomoléculas exaladas pela presa que atraem o predador). Substâncias produzidas por um organismo que em contato com organismo de outra espécie provocam nesta espécie respostas fisiológicas ou comportamentais que beneficiam o organismo emissor e o organismo receptor, são chamadas de sinomônios (biomoléculas exaladas por uma flor e atraindo o inseto polinizador) (Dicke & Sabelis, 1988, Oldham & Boland, 1996).

Uma mesma biomolécula, ou uma mesma mistura de biomoléculas, pode atuar como feromônio, kairomônio, alomônio ou sinomônio, dependendo dos organismos e do tipo de interação que esta biomolécula media. Por exemplo: Os feromônios sexuais de algumas pragas do gênero *Matsucoccus* que atacam florestas de pinheiros na Europa, além de atraírem as fêmeas de sua espécie, atraem também o seu predador, *Elatophilus hebraicus*, tendo, portanto neste último caso, a função de um kairomônio (Mori, 2000).

O estudo das biomoléculas envolvidas nas interações entre organismos aproxima duas áreas de estudo distintas: a química e a biologia, numa área denominada - Ecologia Química.

1.2 Polinização

Dentre as interações ecológicas tróficas e não tróficas mediadas por semioquímicos, a polinização de flores por insetos é uma das mais importantes nas Angiospermas. Esta associação costuma ser inteiramente mutualística, ou seja, na maioria dos casos, ambos são beneficiados. Na maioria das espécies de plantas, a reprodução sexuada é facilitada pela interação entre os órgãos reprodutores das Angiospermas, a flor, e o inseto ou animal polinizador que transfere o pólen ou a polínia de uma flor para outra. Os polinizadores são geralmente atraídos pela combinação de cores e fragrâncias da flor, associadas a algum tipo de recompensa alimentar (néctar, pólen e lipídios) ou não alimentar (resinas e fragrâncias) (Dobson, 1994). Dentre estas recompensas o néctar e o pólen, são mais comuns, e por isso, mais investigados (Buchmann, 1987).

A fragrância é muitas vezes o fator dominante da atração, particularmente em flores polinizadas por mariposas, que são visitadas a noite. Várias espécies de abelhas e moscas que polinizam Orchidaceae dependem da fragrância para reforçar o estímulo visual da coloração floral (Dodson, 1969). As espécies do gênero *Ophrys* (Orchidaceae), que mimetizam os compostos voláteis emitidos pela fêmeas de espécies de abelhas do gênero *Andrena*. Substâncias como o linalol, o cintronelol, o cintronelal, o geraniol e (*E,E*)-farnesol, foram identificados tanto na fragrância de *Ophrys* quanto na secreção da abelha fêmea. Esse mimetismo químico auxilia a reprodução destas espécies. Os machos destas abelhas são atraídos e realizam uma pseudocopulação, e assim, polinizam as flores destas orquídeas (Harborne, 1989). Estudos

realizados com *Rosa rugosa* mostrou que existem aromas específicos para as pétalas da flor e para o pólen (Harborne, 1989), o que deve ser importante para atrair abelhas coletoras de pólen.

O néctar floral tem como única função nas Angiospermas servir de recompensa aos visitantes, sendo importante para muitos polinizadores, especialmente para aqueles que não obtêm alimentos de outra forma (ex. borboletas). Na maioria dos nectários examinados, o néctar consiste basicamente de uma solução de açúcares (Harborne, 1992).

Para a planta o pólen é importante por carregar os gametófitos masculinos. Para os visitantes florais, o pólen é uma fonte de alimento, principalmente para abelhas e besouros. O pólen é rico nutricionalmente, contendo em geral entre 16 e 30% de proteínas, 1 e 7% de amido, 0 e 15% de açúcares livres, 3 e 10% de gorduras além de diversas vitaminas e sais inorgânicos como componentes minoritários (Harborne, 1992).

As flores podem exibir características complexas, que são interpretadas como o resultado de adaptações ao comportamento e as características do polinizador. Estas adaptações florais são chamadas de síndrome floral (Pijl & Dodson, 1969). Uma nova área da pesquisa em ecologia de polinização surgiu quando Vogel (1969) descreveu uma síndrome floral até então desconhecida, caracterizada pela presença de um órgão floral secretor de óleo. Essa estrutura secretora foi denominada de elaióforo, e está presente em várias famílias (Iridaceae, Krameriaceae, Malpighiaceae, Orchidaceae e Scrophulariaceae). Muitas destas flores oleíferas são visitadas e polinizadas por abelhas coletoras de óleo. Vogel (1974) foi pioneiro ao investigar a composição química destes óleos através da cromatografia em camada delgada, realizando um estudo espectroscópico da composição química do óleo de *Calceolaria pavonii* (Scrophulariaceae). Ele identificou os constituintes por RMN de ^1H e EM, onde observou a presença de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, nos quais uma das cadeias laterais é derivada de um ácido de cadeia longa substituído na posição 3 por grupos como hidroxila, metoxila, acetoxila ou metila.

Algumas espécies de *Clusia* (Guttiferae) produzem resinas florais, que são coletadas por abelhas e utilizadas na construção de seus ninhos. Estas resinas são constituídas de benzofenonas, que tem propriedades bactericidas e fungicidas (Oliveira, *et al.*, 1999).

As espécies da subtribo Stanhopeinae (Orchidaceae) são conhecidas por apresentar um sistema de polinização incomum. Machos de abelhas da subtribo Euglossinae coletam óleos essenciais destas flores, e neste processo, as polinizam (Curry *et al.*, 1991). Este fenômeno tem atraído a atenção de botânicos os quais tem formulado várias hipóteses para explicar este

comportamento. Foi sugerido que o macho Euglossinae poderiam utilizar estes óleos para atrair as fêmeas de sua espécie, mas não há nenhum estudo conclusivo a esse respeito.

Muitas das variações florais em espécies de Orchidaceae resultam de rearranjos morfológicos necessários para acomodar as características físicas de diversos organismos polinizadores. Embora vários insetos e animais polinizadores em potencial possam ser atraídos para a flor, a morfologia floral dificulta a polinização por insetos não específicos (Dodson, 1969). A especialização de espécies de plantas em relação a grupos específicos de polinizadores reduz o número de espécies de polinizadores e aumenta a eficiência na transferência de pólen entre indivíduos, reduzindo assim, o custo energético de uma fecundação bem sucedida. (Tremblay, 1992).

Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas, possuindo cerca de 20.000 espécies amplamente distribuídas (Dressler, 1993), apresentando sua maior diversidade nos trópicos, especialmente em regiões montanhosas. No Brasil, apresenta ampla distribuição na região Sudeste, onde estudos com relação à sua biologia reprodutiva e biologia floral são escassos, tornando necessário a realização de trabalhos que esclareçam os diversos mecanismos de reprodução existentes nesta família.

Dentro deste contexto, objetivo do presente trabalho é o de contribuir para a maior compreensão dos mecanismos de polinização de algumas espécies de Orchidaceae da região sudeste do Brasil elucidando a composição química de atrativos e de recompensas florais em espécies de Orchidaceae, e foi desenvolvido em colaboração com a equipe da Profa. Maria do Carmo E. Amaral do Instituto de Biologia desta Universidade.

Primeiramente foi feita a caracterização dos compostos florais voláteis emitidos por cinco espécies de Orchidaceae nativas da região sudeste do Brasil: *Stanhopea lietzeii*, *Stanhopea insignis*, *Polystachya estrellensis*, *Psilochilus modestus* e *Epidendrum secundum*, e a sua importância na atração de seus polinizadores.

A composição química das recompensas florais do gêneros *Oncidium* e *Gomesa* (Orchidaceae), foram alvo de estudo na segunda etapa do presente trabalho.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Como abordado na introdução, as interações entre plantas e insetos constituem uma das relações complexas e importantes da natureza. O presente estudo tem como objetivos a elucidação da composição química de atrativos e recompensas florais em espécies de Orchidaceae, através do estudo de fragrâncias e óleos produzidos por estas flores.

Principais objetivos:

Estudar a composição química de fragrâncias florais das espécies: *Stanhopea insignis*, *Stanhopea lietzei*, *Epidendrum secundum*, *Polystachya estrellensis* e *Psilochilus modestus*.

Estudar a composição química dos óleos coletados das estruturas florais, elaióforos, de seis espécies do gênero de *Oncidium*: *O. pubes*, *O. truncatum*, *O. hookeri*, *O. varicosum* e *O. praetextum*; e três espécies do gênero *Gomesa*: *G. crispa*, *G. recurva* e *Gomesa* sp.

CAPÍTULO I – FRAGRÂNCIAS FLORAIS

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 Fragrância & Polinização

A adaptação entre plantas e seus polinizadores é o resultado de contínuos processos co-evolutivos. Várias fragrâncias florais são formadas por misturas complexas contendo diversas classes de compostos químicos. A fragrância floral pode ser um sinal de recompensa para o polinizador, como fonte alimentar. As vezes a própria fragrância floral é a recompensa para os visitantes (ver abaixo). Outras vezes, a fragrância floral pode apenas mimetizar sinais de recompensa, ou copiar estruturas de feromônio de insetos (Knudsen, 1993), de modo que a polinização ocorre nestes casos por engano dos visitantes (polinização por engano).

Os insetos apresentam um alto nível sensitivo para perceber fragrâncias florais. O limiar olfativo da mosca de fruta oriental *Dacus dorsalis* (Terphritidae) por metil eugenol, um componente da fragrância de flores que atraem esta mosca, chega a 0.01µg. Este composto pode atrair estas pequenas moscas a uma distância de aproximadamente 800 m (Dodson, 1994).

Abelhas Euglossinis são de distribuição exclusivamente neotropicais. Os machos dessas abelhas são atraídos por iscas de compostos voláteis, que podem ocorrer nas flores de Orquídeas por elas polinizadas, a uma distância de aproximadamente 1 km. Estima-se que cerca de 650 espécies de Orquídeas sejam polinizadas por estas abelhas (Ackerman, 1989). A relação entre abelhas euglossinis e orquídeas é altamente específica, as flores de uma espécie atraem apenas uma ou poucas espécies, mesmo que no habitat ocorram dezenas de espécies de euglossini. Tal especificidade é um importante mecanismo de isolamento reprodutivo entre espécies interférteis de orquídeas simpátricas (Williams & Whitten, 1983).

Estímulos olfatórios também têm um papel importante para guiar abelhas forrageiras. Pólen é um alimento essencial para muitas espécies de abelhas, e a química específica dos voláteis contidos no pólen pode ter influência decisiva na seleção do pólen por abelhas oligoléticas (especialistas em visitar flores de poucas espécies), ou poliléticas (generalistas), incluindo abelhas melíferas (Dobson, 1987). Um estudo comparativo entre a

fragrância do pólen e a fragrância de partes da flor mostram que a fragrância do pólen é quimicamente distinta de outras partes da flor (Dobson, 1996, 2000).

Um exemplo impressionante de co-evolução entre flores e seus polinizadores são as flores polinizadas por mariposas, que possuem fragrância noturna. A Orquídea *Angraecum sesquipedale* polinizada a noite pela mariposa *Xanthopan morgani*, não apresenta fragrância durante o dia, mas a noite exala um forte perfume, que cessa ao amanhecer. Flores polinizadas por mariposas, são especialmente comuns em espécies de Orchidaceae africanas (Kaiser, 1993).

Estudos que evidenciem o uso do olfato por borboletas na localização e seleção de flores são escassos. A atração visual parece ser de grande importância para as borboletas, mas a fragrância floral pode ser decisiva na discriminação da flor a ser visitada. Flores de certas espécies, incluindo Compositae e Orchidaceae, são a maior fonte de alcalóides pirrolizidínicos coletados por algumas borboletas (subfamília Ithomiinae e Danainae) e mariposas (Arctiidae e Ctenuchidae). Os alcalóides são usados para a defesa pelos machos e fêmeas. A atração destes Lepidópteros por flores contendo alcalóides, é baseada primeiramente no olfato (Dobson, 1994).

I.1.2 Introdução aos Caminhos Biossintéticos de Compostos Presentes nas Fragrâncias

I.1.2.1 Compostos aromáticos

O ácido chiquímico origina os amino-ácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina). A amônia-liase fenilalanina (PAL) remove a amônia da fenilalanina, produzindo o ácido *trans*-cinâmico. Esta enzima marca o estado de transição do metabólito primário da planta para o secundário (é similar a ação da liase, na tirosina levando ao ácido p-coumárico). O ácido cinâmico não é um odorífero importante, mas é um precursor importante de muitos outros metabólitos aromáticos incluindo aldeídos, álcoois, lactonas e ésteres.

A degradação da cadeia-lateral de vários substituintes cinamatos por remoção de um carbono (α -oxidação) ou dois carbonos (β -oxidação) leva respectivamente aos ácido fenilacético ou benzóico (Croteau & Karp, 1994, Figura 1).

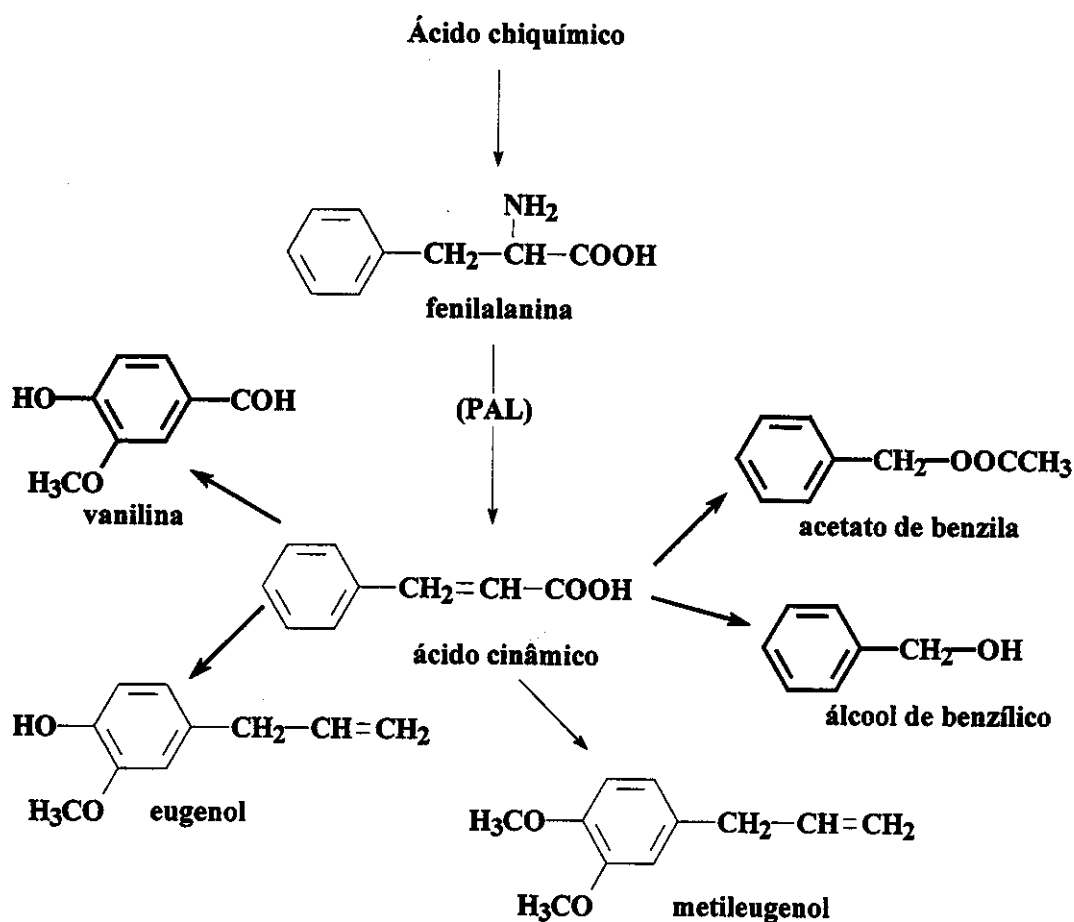


Figura 1. Rota biossintética dos derivados aromáticos (Croteau & Karp, 1994)

1.1.2.2 Monoterpenóides

Os monoterpenóides, construídos de duas unidades de isopreno, são derivados do ácido mevalônico. Neste caminho biossintético, a enzima sintase de pirofostato de geranila media a condensação do pirofostato de dimetilalila com o pirofostato de isopentila para formar o pirofostato de geranila, precursor dos monoterpenóides.

Muitos monoterpenóides são cíclicos. A enzima ciclase de monoterpenóides catalisa as isomerizações múltiplas e a ciclização do pirofosfato de geranila, para formar os vários tipos estruturais de monoterpenóides (Croteau & Karp, 1994, Figura 2).

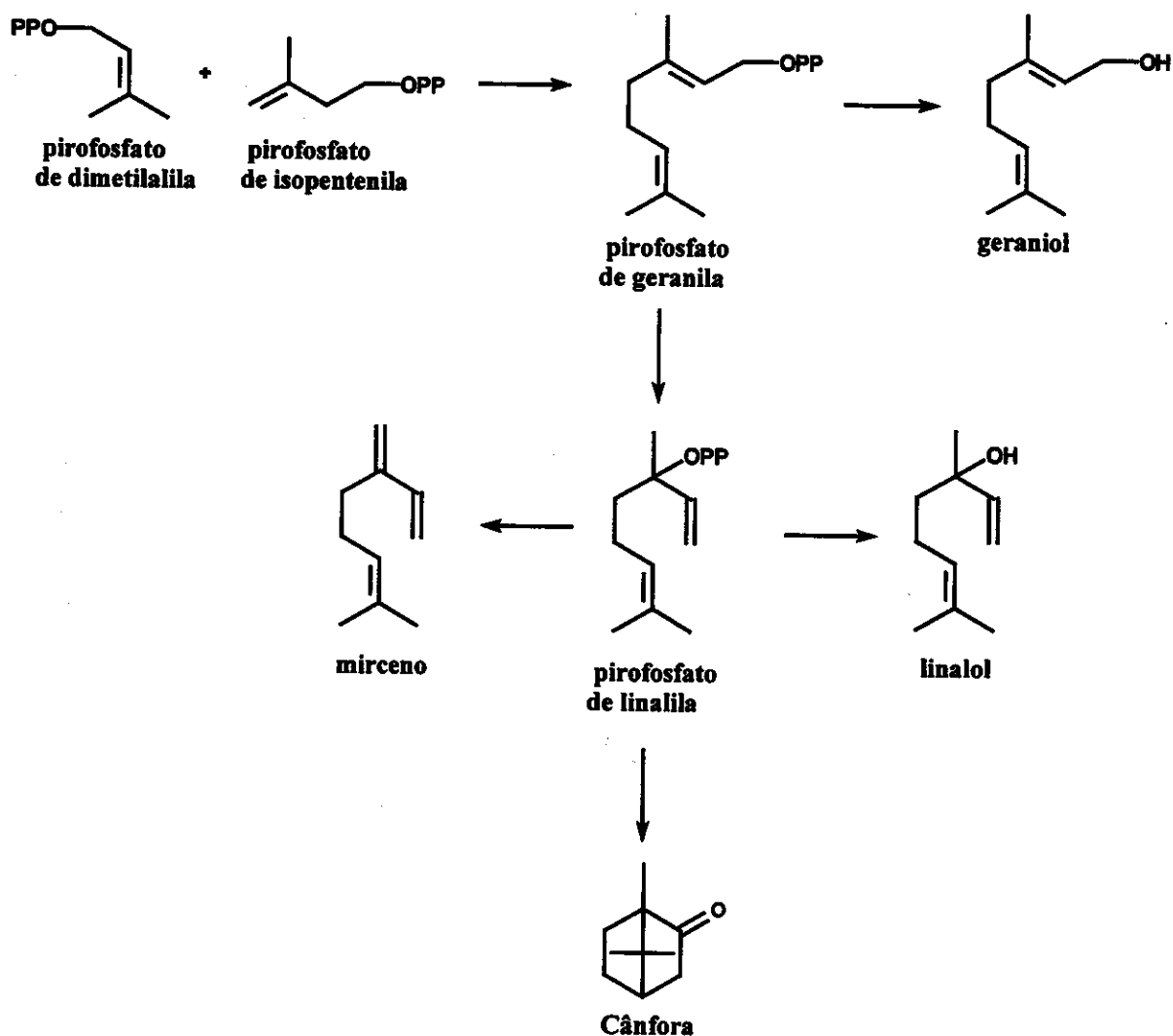


Figura 2. Rota biossintética dos derivados monoterpenóides (Croteau & Karp, 1994)

I.1.2.3 Sesquiterpenóides

Os sesquiterpenóides (C_{15}) contêm uma unidade a mais de isopreno que os monoterpenóides, e apresentam-se sob aproximadamente 200 tipos diferentes de esqueletos.

O pirofosfato de *trans,trans*-farnesila é considerado o precursor dos sesquiterpenóides, sendo derivado da adição de um unidade de isopreno ao pirofosfato de geranila via transferase de prenila. O farnesol é obtido pela hidrólise enzimática deste precursor. A ciclização na série sesquiterpenódica é iniciada pela ionização de um pirofosfato de alila, e envolve o ataque eletrofílico do centro catiônico a uma ligação dupla do precursor (Croteau & Karp, 1994, Figura 3).

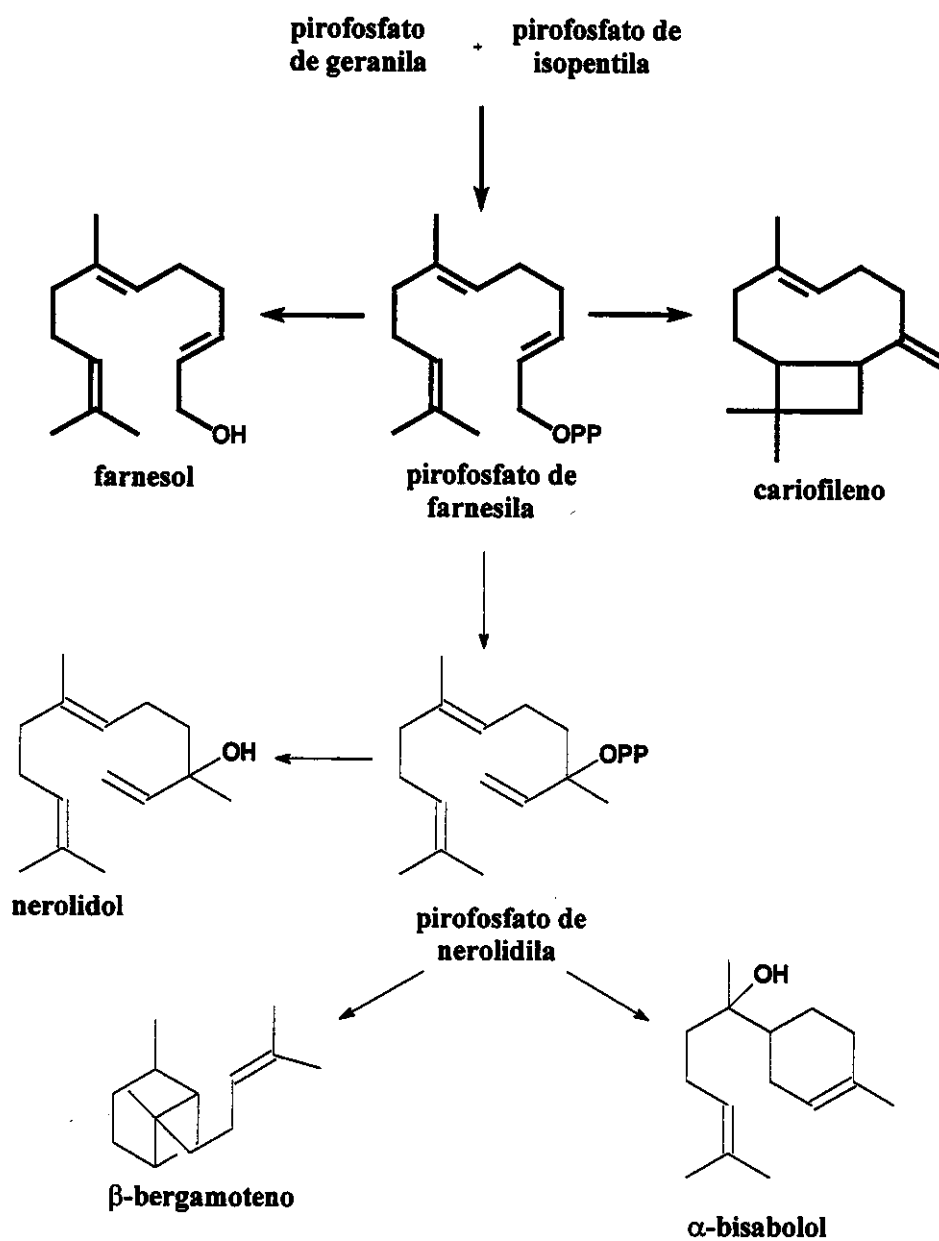


Figura 3. Rota biossintética dos derivados sesquiterpenóides (Croteau & Karp, 1994)

1.1.3 Considerações sobre a espécies *Stanhopea lietzei*, *Stanhopea insignis*, *Polystachya estrellensis*, *Psilochilus modestus* e *Epidendrum secundum*

1.1.3.1 *Stanhopea* Frost ex Hooker

O gênero *Stanhopea* possui aproximadamente 50 espécies, e pertence à subtribo Stanhopeinae (Orchidaceae). Suas flores têm vida curta, durando de um a três dias. Todas as espécies desta subtribo apresentam um sistema de polinização incomum, pois machos de abelhas euglossini são atraídos para coletar a fragrância floral produzida nos osmóforos das flores destas Orchidaceae (Curry *et al.*, 1991). As espécies *Stanhopea anfracta*, *S. annulata*, *S. candida*, *S. cirrhata*, *S. cornnata*, *S. costaricensis*, *S. ecornuta*, *S. embreei*, *S. florida*, *S. gibbosa*, *S. grandiflora*, *S. graveolens*, *S. guttulata*, *S. impressa*, *S. aff. impressa*, *S. jenichiana*, *S. oculata*, *S. panamensis*, *S. pulla*, *S. reichenbachiana*, *S. ruckeri*, *S. saccata*, *S. tigrina*, *S. tricornis* e *S. wardi* foram estudadas quanto à composição química de suas fragrâncias florais, tendo sido identificados como constituintes principais, compostos aromáticos e monoterpenóides (Williams & Whitten, 1983, Knudsen, *et al.*, 1993, Kaiser, 1993).

No presente trabalho, foram estudadas as fragrâncias florais de duas espécies do gênero *Stanhopea*: *S. lietzei* e *S. insignis*, nativas da região sudeste do Brasil.

1.1.3.1.1 *Stanhopea lietzei*

Habitat - *Stanhopea lietzei* é encontrada em matas semidecíduas¹ do interior do estado de São Paulo (Serra do Japi - Atibaia), onde ocorrem vários indivíduos agrupados ao longo dos paredões rochosos.

Características botânicas - Apresenta pseudobulbos cônicos que medem aproximadamente 5 cm de comprimento. Cada pseudobulbo apresenta apenas uma folha elíptico-lanceolada. As inflorescências são laterais e pendentes, podendo produzir até 4 flores por inflorescência. As flores medem aproximadamente 10 cm de comprimento e

¹ Florestas semidecíduas – São florestas constituídas tanto de árvores que perdem todas as folhas no outono e de árvores que não perdem todas as folhas nesta época.

apresentam coloração que se estende do branco ao laranja. As flores apresentam forte fragrância, que pode ser percebida no momento em que a flor se abre, tornando-se mais intensa a partir de, aproximadamente, 09:30h e principalmente entre, aproximadamente, 11:00 e 14:30, quando os raios de sol atingem as flores, intensificando assim o odor da flor. A flor permanece perfumada durante os três dias em que permanece aberta.

I.1.3.1.2 *Stanhopea insignis*

Habitat - *Stanhopea insignis* pode ser encontrada como epífita² na planície litorânea (Pinguaba), em árvores próximas a regiões alagadas, em ambiente de alta umidade relativa.

Características botânicas - Seus pseudobulbos são cônicos. Cada pseudobulbo apresenta uma folha lanceolada. A inflorescência lateral é pêndula e pode conter até 4 flores, sendo mais comum encontrar indivíduos com 2 a 3 flores por inflorescência. As flores medem cerca de 11 cm de comprimento e apresentam coloração branca com pontuações vináceas até creme com grandes manchas vináceas. As flores abrem ao amanhecer e permanecem abertas por três dias. A fragrância destas flores não foi percebida, sendo por isto classificado como fraca.

I.1.3.2 *Polystachya* Hook.

O gênero *Polystachya* incorpora cerca de 200 espécies. As espécies *Polystachya campyloglossa*, *P. cultriformis*, *P. fallax* e *P. mazumbaiensis*, todas nativas do continente africano, foram estudadas quanto à composição química de sua fragrância, sendo observado neste estudo que estas espécies apresentam composição da fragrância bastante diversificada (Kaiser, 1993).

No presente estudo foi investigada a composição da fragrância floral de *Polystachya estrellensis*.

I.1.3.2.1 *Polystachya estrellensis*

Habitat - *Polystachya estrellensis* é encontrada como epífita² ou raramente rupícola³ em matas semidecíduas do interior do Estado de São Paulo, e exclusivamente como epífita em matas da planície litorânea, em Pinciguaba.

Características botânicas - Os pseudobulbos são cônicos com 2 a 4 folhas elíptico-lanceoladas. Suas flores são verde-escuras ou verde-amareladas e medem aproximadamente 5 mm. As pétalas são linear-lanceoladas. O labelo apresenta aspecto pulverulento, que é devido à presença de pseudopólen.

I.1.3.3 *Psilochilus* Barb. Rodr

O gênero *Psilochilus* possui duas espécies terrestres encontradas principalmente nas florestas úmidas da Mata Atlântica do sudeste do Brasil (Miller *et al.*, 1996). Não foi encontrado na literatura nenhum estudo químico de espécies deste gênero.

No presente estudo foi investigada a composição da fragrância floral da espécie *Psilochilus modestus*.

I.1.3.3 *Psilochilus modestus*

Habitat - *Psilochilus modestus* pode ser encontrada como terrestre, desenvolvendo-se entre a serrapilheira no interior da mata, tanto em matas semidecíduas do interior do Estado de São Paulo como na planície litorânea de Pinciguaba e Ilha do Cardoso.

Características botânicas - As plantas de *Psilochilus modestus* podem ser encontradas como terrestres, e medem até 54 cm de altura. As folhas são elípticos-lanceoladas. Suas sépalas são branco-esverdeadas e medem aproximadamente 2 cm de comprimento por 5 mm de largura. As pétalas são espatuladas, branco-hialinas com extremidades róseas. O labelo mede aproximadamente 2 cm de comprimento, apresenta coloração branca, com extremidades róseas, no centro apresenta faixas amareladas que atuam como guias de néctar. A flor da espécie *Psilochilus modestus* tem vida curta, durando apenas 1 dia.

² Plantas que vivem sobre árvores ou outras plantas, sem parasitá-las.

³ Plantas que vivem sobre pedras.

I.1.3.4 *Epidendrum* L.

O gênero *Epidendrum* L. inclui aproximadamente 1000 espécies distribuídas entre a América tropical, Flórida e norte da Argentina. As espécies de *Epidendrum* podem ser polinizadas por mariposas, borboleta e pássaros. Particularmente as espécies polinizadas por mariposas apresentam um forte perfume à noite, em contraste com as espécies que são visitadas por borboletas, que comumente apresentam um perfume fraco para percepção humana. Existem estudos sobre a composição química das fragrâncias das espécies *Epidendrum ciliare*, *E. nocturnum*, *E. lacertinum* (Kaiser, 1993) e *E. aromaticum* (Hirose, et al., 1999). Foi sugerida a presença de alcalóides pirrolizidínicos em flores da espécie *E. paniculatum* devido às espécies borboletas que as visitam e polinizam (DeVries & Stiles, 1989). Essa sugestão, no entanto, não foi confirmada. Várias espécies de *Epidendrum* foram investigadas quanto à presença de alcalóides, através de cromatografia de camada delgada utilizando-se vários reagentes, inclusive a espécie *E. floribundum* (considerada hoje uma sinônima de *E. paniculatum*), não sendo observados alcalóides nesta espécie (Lüning, 1964).

No presente trabalho foi estudado a composição da fragrância floral da espécie *Epidendrum secundum*.

I.1.3.4.1 *Epidendrum secundum*

Habitat - *Epidendrum secundum* é encontrada como terrestre ou rupícola³ em áreas abertas de matas semidecíduas do interior do Estado de São Paulo, ou raramente como epífita² no dossel da mata na planície litorânea em Pinguaba.

Características botânicas - O tamanho das plantas pode variar entre 30 e 200 cm, dependendo do ambiente onde se encontram. O caule é cilíndrico, ereto ou pendente, com numerosas folhas coriáceas dispostas alternadamente ao longo do caule. As folhas são elíptico-lanceoladas. A inflorescência terminal única é elevada por um pedunculo. As flores apresentam geralmente coloração rósea.

Resultados e Discussão

I.2.1 Otimização do método de extração da fragrância

Uma das etapas mais importante deste estudo foi a otimização do método de extração das fragrâncias. O primeiro método testado foi o de injeção de sólidos (Silva *et.al.* 1999). Este método consiste na utilização de um aparelho de injeção de sólidos (Figura 4), onde é inserido um pequeno pedaço flor, preferencialmente a parte de flor que contém os osmóforos que são glândulas produtoras de fragrância. Em seguida este equipamento, contendo a parte da flor, é introduzido no injetor do cromatógrafo. A fragrância é liberada e detectada pelo sistema do cromatógrafo. Utilizando esta metodologia de extração, foi verificado na análise uma abundância de ácidos graxos, que provavelmente fazem parte da composição da cutícula da flor, mascarando a presença de compostos voláteis.

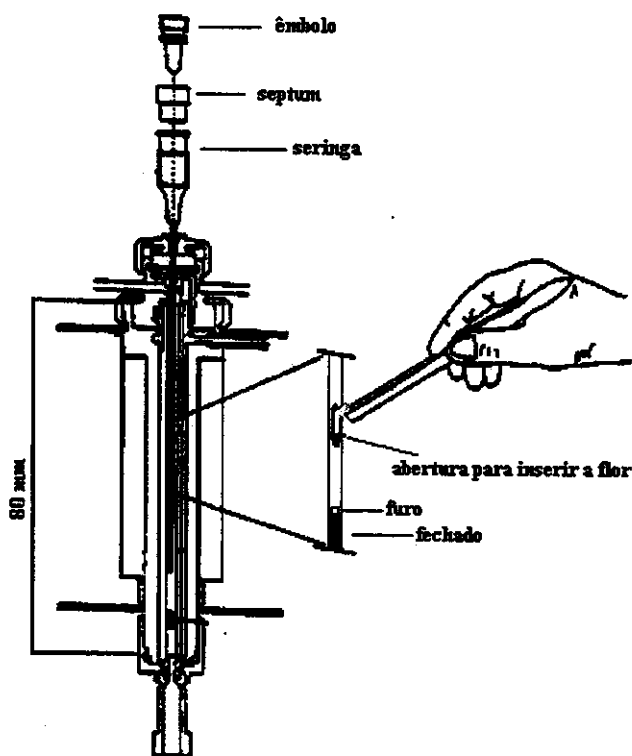


Figura 4. Equipamento para injeção de sólidos

Outro método também testado foi o *headspace* estático, utilizando microextração em fase sólida (Figura 5). Esta metodologia vem sendo usada ultimamente para extração e

pré-concentração de amostras para análise por cromatografia gasosa (Pawliszyn, 1997). Com este sistema, não foi obtido sucesso na pré-concentração das amostras analisadas, pois não foram observados sinais acima do ruído do aparelho. Outra desvantagem desta metodologia é a modificação necessária no injetor do cromatógrafo a gás, ocasionando assim um longo tempo de análise.

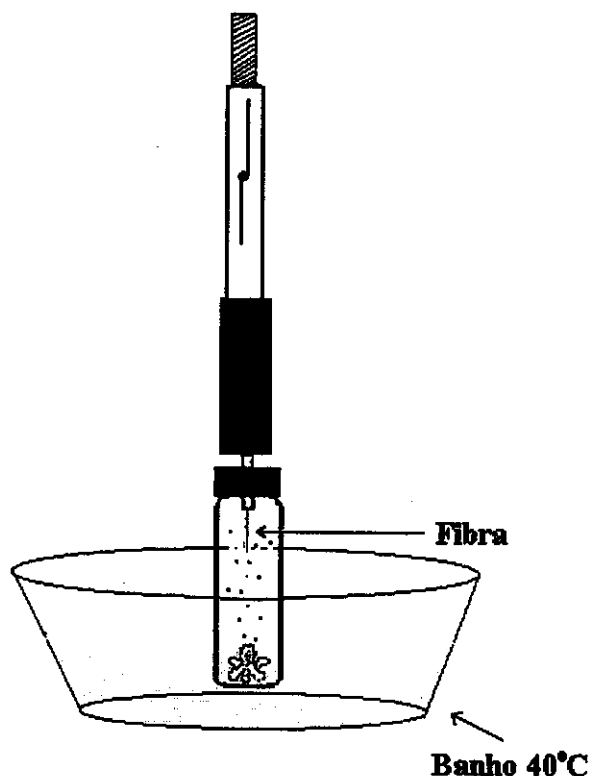


Figura 5. *Headspace* estático - microextração em fase sólida

Finalmente, foi testada a coleta de voláteis por *headspace* dinâmico (Figura 6) utilizando como adsorvente o polímero Porapak-Q (Raguso & Pellmyr, 1998, Kaiser, 1993), tubo de vidro (do tamanho aproximado da flor) com uma abertura para inserir a flor e outra oposta para conectar o trap contendo porapak-Q (30-60mg). O ar contendo a fragrância da flor foi arrastado a um fluxo de 500mL/min, com o auxílio de uma bomba. O processo de dessorção dos voláteis foi realizado utilizando pequena quantidade de diclorometano (aproximadamente 1,5mL), para evitar a diluição da pequena quantidade de voláteis obtida. A remoção do solvente foi realizada empregando um leve fluxo de nitrogênio ou argônio.

Um dos problemas desta técnica é a contaminação da amostra pelo o ar do ambiente onde foi realizada a análise, a fim de contornar este problema, foi realizado simultaneamente a análise dos voláteis e do ar do ambiente, que serviu como branco, para detectar possíveis interferentes na amostra, vindos do ambiente. Esta técnica mostrou-se reprodutiva e de fácil manuseio, por isto, foi escolhida para coleta das fragrâncias florais. A seguir o extrato foi analisado por CG/EM, sendo a identificação de seus constituintes realizada a partir do espectro de massas obtido em comparação com espectros da biblioteca Wiley, índice de retenção e coinjeção de padrões (as estruturas das substâncias identificadas se encontram no Apêndice 1, página 36).

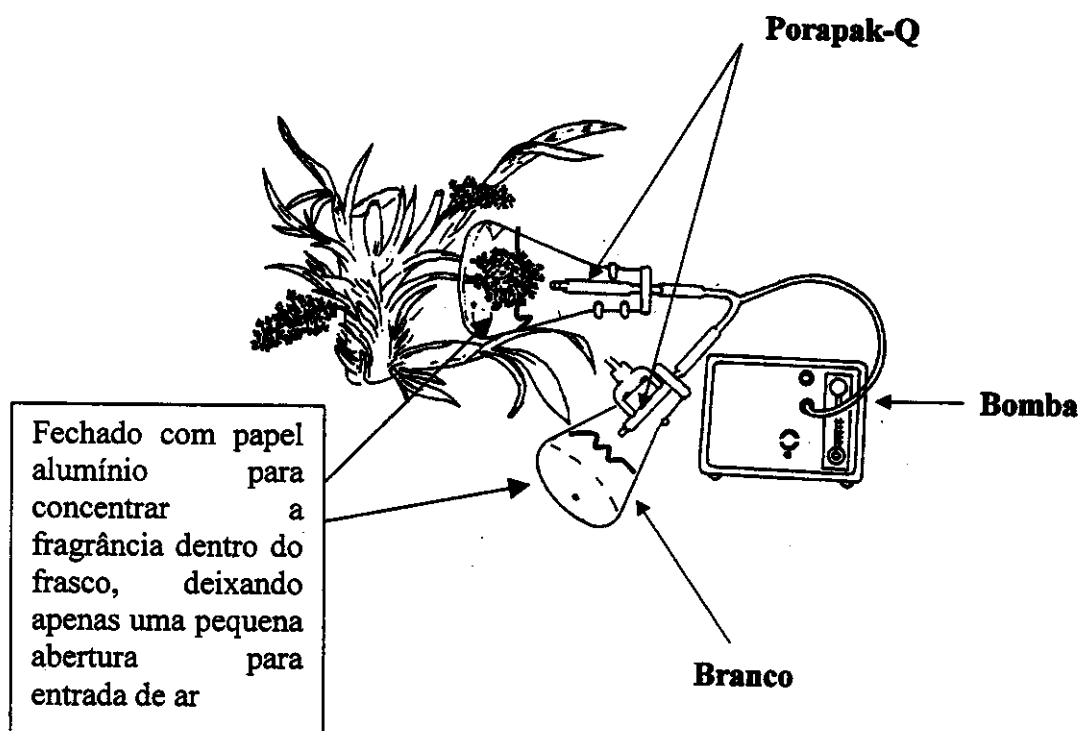


Figura 6. Sistema de *Headspace* dinâmico, utilizando o polímero Porapak-Q



Figura 7. **A** – *Stanhopea lietzei* com a abelha *Euglossa* sp.; **B** – *Stanhopea insignis* com a abelha *Eufriesea purpurata*; **C** – *Epidendrum secundum* com a borboleta Hesperiiidae; **D** – *Polystachya estrellensis* com a abelha *Plebeia droryana*; **E** – *Psilochilus modestus* com a abelha *Trigona spinipes*.

1.2.2 *Stanhopea lietzei*

Polinização e Fragrância

As flores de *Stanhopea lietzei* oferecem como recompensa, aos visitantes florais, óleos essenciais. Esses óleos são coletados ativamente pelos visitantes, que são machos de abelhas euglossini. O polinizador orienta-se na mata pela forte fragrância (Pansarin, 2000). Foi identificada a maioria dos constituintes da fragrância floral desta espécie cerca de 98% (Tabela 1). A fragrância (cromatograma 1) é de baixa complexidade, apresentando aproximadamente 9 substâncias, sendo os compostos mais abundantes originados da rota da biossintética do ácido chiquímico, substâncias aromáticas como álcool benzílico (20), benzoato de metila (22), benzoato de etila (25) e benzoato de benzila (28), e, em menor abundância, foram detectados compostos que seguem a rota do ácido mevalônico, monoterpenos oxigenados como o linalol (23) e a cânfora (24). Somente um composto nitrogenado, o indol (26), foi detectado nesta fragrância. Os constituintes majoritários desta fragrância são o benzoato de benzila (28) e o indol (26). Os compostos detectados em *S. lietzei* já foram identificados na fragrância floral de várias espécies de Orchidaceae, e outras famílias (Knudsen *et al.*, 1993), sendo o composto benzoato de benzila (28) majoritário na fragrância de várias espécies do gênero *Stanhopea* (Williams & Whitten, 1983).

A espécie *S. lietzei* apresentou *Euglossa cordata*, *Euglossa annectans* e *Eufriesea* aff. *pulchra* como visitantes florais, sendo *Eufriesea* aff. *pulchra* o único polinizador para a espécie (Pansarin, 2000, Figura 7).

Algumas substâncias identificadas em *S. lietzei*, quando administradas isoladamente como isca no campo, atraíram alguns tipos de abelhas euglossini no Panamá. Por exemplo, benzoato de benzila (28) que atrai *Eufriesea ornata*, *Euglossa hemichlora*, *Euglossa cyanaspis* e *Exaerete smaragdina*; o benzoato de metila (22) atrai a *Euglossa crassipunctata*, a *Eulaema bombiformis*, *Eufriesea* aff. *pulchra* e também *Exaerete smaragdina* (Ackerman, 1989). O linalol (23) e o benzoato de metila (22), presentes na fragrância floral de *S. lietzei*, atraíram *Eufriesea* aff. *pulchra* no Panamá, enquanto o benzoato de benzila não foi atrativo (Ackerman, 1989). No entanto, não é possível afirmar que os compostos linalol e benzoato de metila sejam os responsáveis por tal especificidade no presente trabalho, já que é conhecida a mudança de preferência dos machos de

Euglossini por determinados compostos ao longo do ano, ou em diferente regiões geográficas (Peruquetti *et al.*, 1999). Por isto, estudos adicionais de campo com substâncias constituintes desta fragrância, administrados isoladamente ou em diferentes proporções, devem ser realizados no ambiente e próximo ao período de floração da espécie *S. lietzeii*. Somente uma investigação no campo permitirá concluir-se qual a substância ou combinação de substâncias deve ser responsável por tal especificidade neste ambiente, uma vez que a maioria dos constituintes desta fragrância é conhecida.

Tab. 1- Composição química do fragrância floral de *Stanhopea lietzeii*

Substância	IR _a	IR _b	Abundância relativa(%)	Método de identificação
Álcool benzílico (20)	1032	1032	t	IR, EM, CP
Trans-óxido de linalol (21)	1083	1088	t	IR, EM
Benzoato de metila (22)	1091	1091	t	IR, EM
Linalol (23)	1097	1098	4.0	IR, EM, CP
Cânfora (24)	# 1140	1143	t	IR, EM, CP
Benzoato de etila (25)	1170	1170	t	IR, EM
Indol (26)	1295	1288	44.8	IR, EM, CP
Geranil acetona (27)	1449	1453	0.4	IR, EM
Benzoato de benzila (28)	1769	1762	49.4	IR, EM
Identificados	-	-	98.6	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); EM- Espectro de Massas; IR - Índice de retenção; CP- Coinjeção de Padrão; t - traço; # Valor estimado a partir da equação da reta

I.2.3 *Stanhopea insignis*

Polinização e Fragrância

Foram detectadas na fragrância de *Stanhopea insignis* 5 substâncias e identificadas como sendo o álcool benzílico (20), o acetato de benzila (30), o α -cubebeno (31),

benzaldeído (29) e o nonanal. 97 % desta fragrância é composta por um simples componente que é o álcool benzílico, os outros quatro componentes detectados apresentam abundância inferior a 2% (cromatograma 2). O nonanal foi detectado na análise da fragrância e do branco, sendo por isso derivado do ar do ambiente da extração. As substâncias identificadas na fragrância de *S. insignis* já foram observadas na fragrância de outras espécies de flores polinizadas por machos de abelhas Euglossini, como por exemplo o álcool benzílico (20), que é o componente majoritário também em *Stanhopea impressa* e *Catasetum expansu* (Williams & Whitten, 1983).

As espécies de abelhas Euglossini, *Eufriesea purpurata* e *Eulema cingulata*, foram visitantes florais, mas apenas *Eufriesea purpurata* foi o efetivo polinizador de *S. insignis* (Figura 8).

A abelha *Eulema cingulata* é atraída por Acetato de benzila (30) quando este foi administrado como isca de odor na República Guiana (Williams & Dodson, 1972) e no Panamá (Ackerman, 1989). Um grande número de indivíduos de *Eulema cingulata* também são atraídos pela isca de acetato de benzila (30) na mata atlântica do sudeste do Brasil (Peruquetti, *et al.*, 1999).

Também no caso de *S. insignis* são necessários outros estudos de campo para determinar qual componente ou mistura de componentes seria responsável pela atração da abelha *Eufriesea purpurata*, polinizador da espécie, no ambiente do presente estudo.

Tab. 2 -Composição química da fragrância floral de *Stanhopea insignis*

Substância	IR _a	IR _b	Abundância relativa(%)	Método de identificação
Benzaldeído (29)	-	961	1,1	IR, EM
Álcool benzílico (20)	1030	1032	97,5	IR, EM, CP
Acetato de benzila (30)	1165	1163	0,5	IR, EM
α-Cubebeno (31)	1342	1351	t	IR, EM
Identificados	-	-	99	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); EM- Espectro de Massas; IR – Índice de retenção; CP- Coinjeção de Padrão; t – traço

1.2.4 *Polystachya estrellensis*

Polinizadores e Fragrâncias

Os componentes caracterizados na fragrância de *Polystachya estrellensis*, (cerca de 98%) consistem dos monoterpenos: β -mirceno (32), *trans*- β -ocimeno (33), linalol (26) e geranial (34); e dos sesquiterpenos: α -copaeno (35) e δ -cadineno (36). Os monoterpenos e seus derivados oxigenados são responsáveis por aproximadamente 85% da composição total desta fragrância (Tabela 3, Cromatograma 3).

Estas flores oferecem como recompensa pseudopólen, que é uma massa pulverolenta produzida na superfície do labelo da flor, e é semelhante ao pólen (Pilj & Dodson, 1966). Os himenópteros (abelhas) foram os polinizadores para esta espécie. A atividade dos polinizadores ocorreu durante todo o dia, e foi possível observar espécies de abelha *Trigona* spp. e *Plebeia* spp. visitando as flores. As abelhas *Plebeia droryana*, *Trigona spinipes* e *Tetragonisca angustula* são as espécies mais frequentes nas flores de *P. estrellensis*. A abelha *Trigona spinipes* foi muito eficiente na polinização da espécie, retirando a maioria dos polinários das flores disponíveis no ambiente (Figura 9).

A análise da composição da fragrância de flores que oferecem pólen como recompensa revela a presença dos compostos geranial (34), linalol (35) e *trans*- β -ocimeno (33) (Dobson, *et al.*, 1987). Abelhas melíferas, *Apis mellifera* (Apidae), possuem glândulas secretoras de ferômonios que contém compostos isoprenóides como o geranial (34), neral Z, (*E,E*)-farnesol, nerol, *E*-ácido nerólico e o *E*-ácido gerânico (Hick, *et al.*, 1999, Harborne, 1989). Isso significa que estas abelhas são capazes de detectar estas moléculas como mensageiros (semioquímico). Visto que *P. estrellensis* oferece pseudo-pólen, cuja a aparência é semelhante ao pólen, como recompensa floral, e apresenta compostos em sua fragrância que estão presentes também em fragrância de flores que oferecem pólen como recompensa e em secreções de abelhas melíferas coletoras de pólen, isto sugere que as substâncias presentes na fragrância de *P. estrellensis* possam servir para atrair e/ou guiar abelhas coletoras de pólen.

Tab. 3- Composição química do fragrância floral de *Polystachya estrellensis*

Substância	IR _a	IR _b	Abundância relativa(%)	Método de identificação
β-Mirceno (32)	# 0958	0991	18,3	IR, EM
Trans-β-ocimeno (33)	1030	1050	6,8	IR, EM
Linalol (23)	1047	1098	49,3	IR, EM, CP
Geranial (34)	1268	1270	11,1	IR, EM
α-copaeno (35)	1368	1376	9,8	IR, EM
δ-Cadineno (36)	1516	1524	t	IR, EM
Identificados	-	-	95,3	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995)

EM- Espectro de Massas; IR - Índice de retenção; CP- Coinjeção de Padrão; t - traço;

Valor estimado a partir da equação da reta

1.2.5 *Psilochilus modestus*

Polinização e fragrância

Algumas espécies de abelhas foram responsáveis pela polinização de *P. modestus*, que oferece como recompensa tanto pólen quanto néctar. A preferência pela recompensa é uma característica de cada espécie de polinizador (predominando a preferência por pólen). No entanto, pode ocorrer exploração de ambos os recursos por uma só espécie, como acontece com uma espécie de Halictiidade (abelha), que coleta tanto pólen quanto néctar. As abelhas que coletam pólen pertencem ao gênero *Plebeia*: *Plebeia droryana*; e *Trigona*: *Trigona spinipes* e *Trigona* sp. (Figura 10)

A fragrância de *Psilochilus modestus* é constituída por substâncias aromáticas e isoprênicas (Tabela 4, Cromatograma 4). Os compostos aromáticos: álcool benzílico e tiglato de benzila, representam 46% desta fragrância. Os compostos isoprenóides são: 6-metil-5-hepteno-2-ona (isoprenóide irregular), geranil acetona (monoterpeno oxigenado), γ-cadineno, α-ylangeno (sesquiterpenos) e o nerolidol (sesquiterpeno oxigenado). Como em *Polystachya estrellensis*, certos compostos da fragrância floral de *Psilochilus modestus* estão presentes em algumas fragrâncias de flores que oferecem pólen, como a 6-metil-5-

hepteno-2-ona encontrado na fragrância de *Papaver rhoeas* e o α -ylangeno encontrado na fragrância de *Lupinus polyphyllu* (Dobson, *et al.*, 1996). O álcool benzílico encontra-se na fragrância das flores de *Rosa rugosa* e o geranil acetona está presente em grande abundância na fragrância do pólen de *Rosa rugosa* (Dobson, *et al.*, 1987).

Tab. 4 - Composição química do fragrância floral de *Psilochilus modestus*

Substância	IR _C	IR _L	Abundância relativa(%)	Método de identificação
6-metil-5-hepteno-2-one (37)	# 980	-	5,7	IR, EM
Álcool benzílico (20)	# 1026	1032	9,4	IR, EM, CP
α -Ylangeno (38)	1373	1372	3,0	IR, EM
Geranil acetona (27)	1447	1453	t	IR, EM
Tiglatato de benzila (39)	1498	1496	37,2	IR, EM
γ -Cadineno (40)	1515	1513	5,4	IR, EM
E-Nerolidol (41)	1561	1564	11,0	IR, EM, CP
Identificados	-	-	71,6	-

IR_C-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_L-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995);

EM- Espectro de Massas; IR – Índice de retenção; CP- Coinjeção de Padrão; t – traço

Valor estimado a partir da equação da reta

1.2.6 *Epidendrum secundum*

Polinização e fragrância

Os principais visitantes florais foram lepidópteros diurnos e abelhas do gênero *Bombus*. Dentre os vários visitantes florais, diversas espécies de lepidópteros diurnos (borboletas), pertencentes à família Hesperíidae, foram os principais agentes polinizadores, e estes coletam néctar das flores (Figura 11).

Na espécie de *Epidendrum secundum* foi considerada a possibilidade de que algumas das borboletas poderiam coletar alcalóides. Afim de investigar essa possibilidade foi realizada a extração de alcalóides segundo Lünig (1964). A presença de alcalóides foi pesquisada por cromatografia em camada delgada, com os reativos de Dragendorff, Mayer,

Wagner e ácido nítrico (Ugaz, 1988). Em todos os testes realizados o resultado foi negativo.

Borboletas apresentam atividade durante o dia e, em contraste com as abelhas, elas são capazes de perceber colorações avermelhadas. Muitas flores polinizadas por borboletas apresentam coloração vermelha, rósea e amarela (Kaiser, 1993 e Dobson, 1994). Estudos evidenciando o uso do olfato por borboletas na seleção e localização de flores são escassos, quando comparado aos vários estudos sobre mariposas (Dobson, 1994). A atração visual parece ser de grande importância para as borboletas, mas a fragrância floral pode ser decisiva na discriminação da flor a ser visitada. As fragrâncias de flores polinizadas por borboletas e lepidópteros diurnos são descritas como fraca e agradáveis a percepção humana (Dobson, 1994). No entanto, muitas flores que apresentam um perfume fraco a percepção humana, na verdade, produzem odor suficiente para atrair abelhas e borboletas (Harborne, 1992).

A fragrância floral de *E. secundum* apresenta em sua composição principalmente hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Foi detectada também a presença de um derivado de ácido graxo, o undecano (Tabela 5, Cromatograma 5). Borboletas podem usar compostos isoprenóides como semioquímicos (Hick, 1999). A fragrância de *E. secundum* mostrou-se muito distinta das demais fragrâncias de Orchidaceae analisadas no presente trabalho, por não exibir compostos monoterpênicos e nem aromáticos em sua composição. Esse resultado concorda com Dobson *et al.* (1997), que observou fortes diferenças na química das fragrâncias florais associadas a cada síndrome (mecanismo de polinização).

Tabela 5 - Composição química do fragrância floral de *Epidendrum secudum*

<i>Substância</i>	<i>IR_a</i>	<i>IR_b</i>	<i>Abundância relativa(%)</i>	<i>Método de identificação</i>
Undecano (42)	1100	1100	2,3	IR, EM
α -Cubebeno (31)	1348	1351	4,0	IR, EM
α -Copaeno (35)	1373	1376	16,3	IR, EM
β -Longipineno (43)	# 1415	1398	9,8	IR, EM
α -Patchuleno (44)	1450	1456	t	IR, EM
Allo-aromadendreno (45)	# 1462	1461	6,5	IR, EM
σ -Muroleno (46)	1476	1477	4,3	IR, EM
α -Muroleno (47)	# 1501	1499	5,3	IR, EM
σ -Cadineno (40)	1515	1513	5,8	IR, EM
δ -Cadineno (36)	1525	1524	29,3	IR, EM
Trans-Calameno (48)	1533	1532	t	IR, EM
α -Calacoreno (49)	# 1545	1542	t	IR, EM
Total de identificados	-	-	83,7	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995)

EM- Espectro de Massas; IR – Índice de retenção; CP- Coinjeção de Padrão; t – traço

Valor estimado a partir da equação da reta

I.2.7 Conclusões do Estudo sobre Fragrâncias Florais

As fragrâncias das espécies de *Stanhopea* apresentam maior abundância de compostos que seguem a rota biossintética do ácido chiquímico, levando a compostos aromáticos, e menor abundância de compostos que seguem a rota ácido mevalônico, levando a compostos isoprenóides (Tabela 6). Algumas das substâncias que compõem as fragrâncias destas espécies de *Stanhopea*, quando administradas como iscas de odor, atraem várias espécies de abelhas euglossini. Porém, tanto *Stanhopea lietzei* quanto *Stanhopea insignis* atraem poucos visitantes florais, e apenas um polinizador específico, demonstrando assim a alta especificidade destas espécies em relação ao polinizador. Estudos adicionais de campo devem ser realizados para concluir se a chave desta atração é um composto específico ou uma combinação de compostos.

Um fato curioso é a presença do linalol na fragrância *Polystachya estrellensis* (Tabela 3) e o álcool benzílico em *Psilochilus modestus* (Tabela 4). Estes compostos são geralmente utilizados como iscas de odores para abelhas euglossinins. É curioso que ambas as espécies mesmo vivendo em ambientes repletos de abelhas euglossini, não atraíram nenhuma espécie de euglossini, pelo menos nunca foram observadas visitando estas flores.

As flores estudadas apresentaram como polinizadores abelhas ou borboletas. As fragrâncias de flores polinizadas por abelhas: *Stanhopea lietzei*, *Stanhopea insignis*, *Polystachya estrellensis* e *Psilochilus modestus* (Tabelas 1 a 5), apresentam na composição de sua fragrância principalmente compostos aromáticos e/ou monoterpênicos enquanto a espécie polinizada por borboletas: *Epidendrum secundum* sua fragrância é composta majoritariamente de compostos sesquiterpênicos (Tabela. 6).

Os resultados deste estudo estão resumidos nas tabelas 6 e 7.

FRAGRÂNCIAS FLORAIS

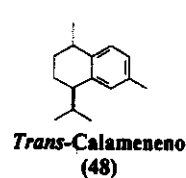
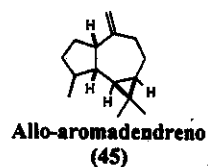
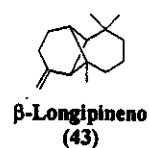
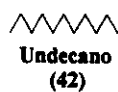
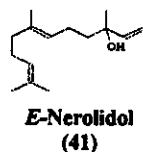
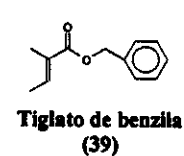
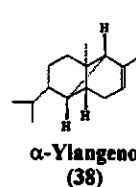
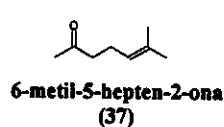
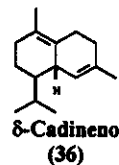
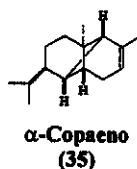
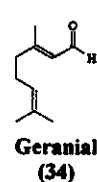
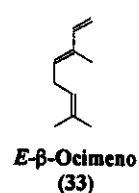
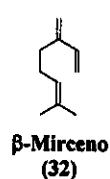
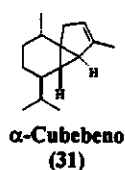
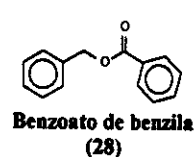
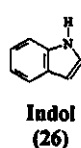
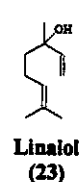
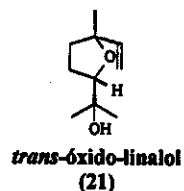
Tabela 6. Composição química das fragrâncias florais

Espécies	Aromáticos (Abundância Relativa)	Isoprenoides irregulares (Abundância Relativa)	Monoterpenoides (Abundância Relativa)	Nitrogenados (Abundância Relativa)	Sesquiterpenoides (Abundância Relativa)	Derivados de ácidos graxos (Abundância Relativa)
<i>Stanhopea lietzei</i>	49,4	-	4,0	44,8	-	-
<i>Stanhopea insignis</i>	98,0	-	-	-	t	-
<i>Polystachya estrellensis</i>	-	-	85,5	-	9,8	-
<i>Psilochilus modestus</i>	46,6	5,7	t	-	19,4	-
<i>Epidendrum secundum</i>	-	-	-	-	81,4	2,3

Tabela 7. Resumo das observações de campo

Espécies	Polinizadores		Recompensa floral			
			Óleo essencial	Pseudopólen	Pólen	Néctar
<i>Stanhopea lietzei</i>	Abelhas	<i>Eufriesea aff. pulchra</i>	x			
<i>Stanhopea insignis</i>	Abelha	<i>Eufriesea purpurata</i>	x			
<i>Polystachya estrellensis</i>	Abelhas	<i>Trigona spinipes</i>		x		
		<i>Plebeia droryana</i>		x		
		<i>Tretragonisca angustula</i>		x		
<i>Psilochilus modestus</i>	Abelhas	<i>Halictiidade sp2</i>			x	x
		<i>Trigona spinipes</i>			x	
		<i>Plebeia droryana</i>			x	
<i>Epidendrum secundum</i>	Borboletas	Espécies da família Hesperidae				x

Apêndice. 1 - Estruturas dos compostos identificados nas fragrâncias florais



CAPÍTULO II – ÓLEOS FLORAIS

II.1 Introdução

II.1.1 Óleos Florais & Polinização

Óleos florais correspondem a uma das muitas alternativas de recompensa floral. O termo óleo floral é usado somente para óleos não-voláteis (não confundir com óleos essenciais, encontrados em fragrâncias), embora óleos essenciais possam estar misturados aos óleos florais (Simpson & Neff, 1981).

Provavelmente o primeiro relato da presença de óleos em flores foi feito por Fritz Müller citado por Darwin (1862). Darwin relata que Fritz Müller, durante observações de flores de *Oncidium flexuosum* em matas do sul do Brasil, verificou que esta flor possuía “mamilas nutritivas” que são raspadas por insetos.

Gellert (1923) registrou a observação de que há óleo nos tecidos nutritivos de *Gomesa planifolia* Kl & Rchb.

Apesar do relato de Fritz Müller, a vários estudos sobre *Oncidium* relatam que estas flores são, na maioria das vezes, flores de engano, por não oferecerem recompensa. Muitos autores afirmaram que essas flores mimetizam flores de Malpigheaceae, família de plantas que oferece óleo como recompensa os polinizadores, abelhas Anthophoridae (Pijl & Dodson, 1966, Nierenberg, 1972, Ackerman, 1986, Chase, 1986, Singer & Cocucci, 1999). Recentemente, Singer e Cocucci (1999) observaram machos de abelha *Tetrapedia diversipes* (Anthophoridae) coletando o óleo floral de *Oncidium paranaense*, neste processo, estas abelhas promoveram a retirada do polinário.

II.1.2 Composição Química de Óleos Florais

Como já mencionado, Vogel (1974) foi o primeiro a investigar a composição química dos óleos florais, por cromatografia de camada delgada, realizando posteriormente um estudo espectroscópico da composição química do óleo de *Calceolaria pavonii* (Scrophulariaceae). Ele identificou os constituintes por RMN e EM, e observou a presença de pequenas misturas de

ácidos graxos e diacilgliceróis, onde, uma cadeia lateral era derivada de um ácido graxo 3-substituído por grupos como hidroxila, metoxila, acetoxila e metila.

A presença de compostos isoprenoides não-voláteis (ex. esteróides) foram detectados nos óleos de *Calceolaria* e *Malpighia* (Buchman, 1987).

Os constituintes principais dos óleos florais de quatro espécies de *Krameria* (Krameriaceae): *K. cuspidata*, *K. cystissodes*, *K. revoluta*, *K. parvifolia*, foram identificados como os ácido 3-acetoxi-hexadecanóico, ácido 3-acetoxi-octadecanóico e 3-acetoxi-eicosanóico (Simpson *et al.*, 1979, Seigler *et al.* 1978).

O óleo floral de *Bysonima crassifolia* (Malpigheaceae) é constituído de mono- e diacilgliceróis, alguns ácidos graxos livres e pequenas quantidades de triacilglicerol (Vison, *et al.*, 1998).

II.1.3 Considerações sobre o gênero *Oncidium* e *Gomesa*

Oncidium é um gênero com mais de 600 espécies, distribuídas principalmente pelas regiões tropicais da América. A maioria das espécies são epífitas, mas algumas são facultativas ou exclusivamente terrestres (Pridgeon & Morrison, 1997). No Brasil ocorrem cerca de 105 espécies, 40 dessas no Estado de São Paulo. Uma pesquisa na literatura revela que a química de *Oncidium* tem sido investigada quanto à presença de alcalóides somente por cromatografia de camada delgada, utilizando vários reagentes (Lüning, 1964). Derivados de fenantrenos foram isolados das folhas de *Oncidium cebolleta* (Stermitz, *et al.*, 1983). As fragrâncias de 4 espécies de *Oncidium*: *O. longipis*, *O. ornithorrhynchum*, *O. sarcodes* e *O. tigrinum*, foram investigadas por Roman Kaiser (1993). A presença de óleo floral em *Oncidium ornithorrhynchum* foi mencionada por Vogel (1974) que comparou este óleo com o óleo floral de *Calceolaria pavonii* (diacilgliceróis e triacilgliceróis) e de várias outras apenas por cromatografia de camada delgada.

Gomesa é um gênero com treze espécies, presentes em florestas da região central e do sudeste do Brasil (Pridgeon & Morrison, 1997). As espécies ocorrem como epífitas ou terrestres, em barrancos, cumes de morro, margens de estrada ou em troncos de árvores de pequeno e médio porte. Uma revisão na literatura mostra que a química de várias espécies de *Gomesa* foi investigada quanto à presença de alcalóides por cromatografia de camada delgada (Lüning, 1964).

Devido ao fato de várias espécies de *Oncidium* e todas as espécies de *Gomesa* serem endêmicas do Brasil e pouco ser conhecido sobre suas recompensas florais, foi proposto como parte deste trabalho identificar os componentes dos óleos florais de espécies deste gêneros, e investigar a possível importância dos mesmos para as abelhas coletoras de óleos.

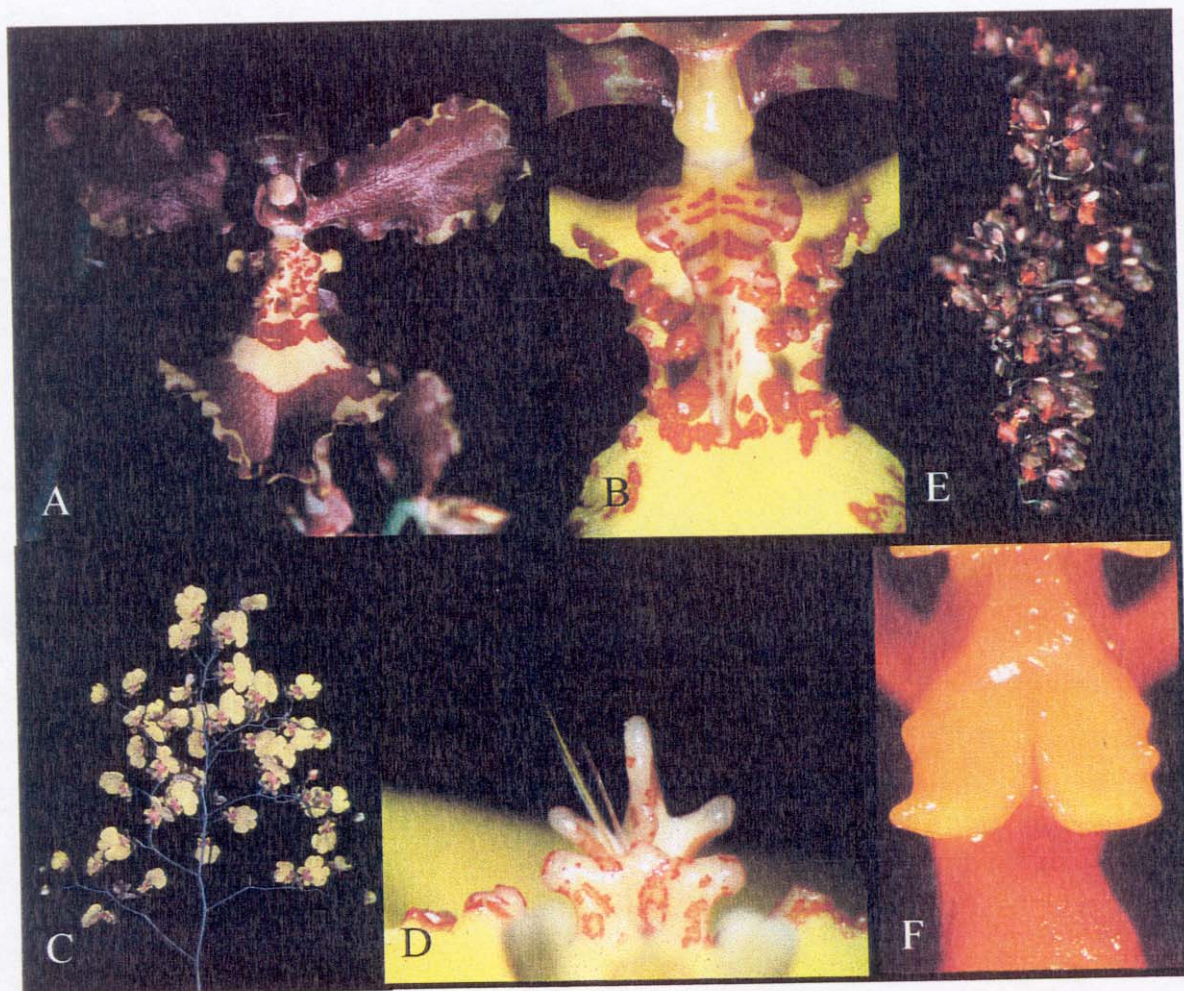


Figura 8. A – Flor de *Oncidium. praetextum*; B – Estrutura elaiófora de *O. praetextum*; C – Inflorescência de *O. varicosum*; D – Estrutura elaiófora de *O. varicosum*; E – Inflorescência de *O. pubes*; F – Estrutura elaiófora de *O. pubes*



A



B

Figura 9. A – Flores de *Gomesa recurva*; B – Flor de *G. crispa*

II.3 Resultados e discussão

II.3.1 Composição Química dos Óleos Florais de Espécies do Gênero *Oncidium* e *Gomesa* (Orchidaceae)

Os óleos das estruturas florais, elaióforos, de seis espécies de *Oncidium*; *O. pubes*, *O. truncatum*, *O. hookeri*, *O. pumilum*, *O. praetextum* e *O. varicosum*, e três espécies de *Gomesa*; *Gomesa crispa*, *Gomesa recurva* e *Gomesa* sp. (Tab-8 a 16) foram analisados neste trabalho. Este é o primeiro estudo sobre a composição química dos óleos florais nestas espécies de *Oncidium*, sendo que, estudo reportado para uma espécie deste gênero, *Oncidium ornithorrhynchum*, restringiu-se à análise por cromatografia em camada delgada (Ver introdução). É importante ressaltar que a maioria dos estudos sobre polinização de *Oncidium* sugerem que estas espécies sejam, na maioria das vezes, flores de engano por não oferecerem néctar ou pólen. Segundo vários autores, estas espécies mimetizam flores Malpighiaceae, família de plantas que recompensam o polinizador com óleos florais produzidos em estruturas chamadas de elaióforos (Pijl & Dodson, 1966, Nierenberg, 1972, Ackerman, 1986, Chase, 1986, Singer & Cocucci, 1999). O presente estudo é também o primeiro a investigar a composição química dos óleos florais no gênero *Gomesa*.

As amostras de óleos florais foram coletadas em diferentes épocas do ano, seguindo o período de floração de cada espécie. A coleta foi realizada utilizando pequenos tubos capilares, introduzidos em pontos onde os óleos eram exudados, sendo visualizados com o auxílio de microscópio estereoscópico. Também foi possível coletar estes óleos com a introdução de pequenas tiras de papel de filtro, previamente tratadas. Este tipo de coleta, embora trabalhosa, permitiu obter o óleo puro. Em razão das baixas quantidades de óleos, cerca de 0,003 mg/flor, o método escolhido para identificação dos constituintes foi Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.

Também foi realizado com o óleo *O. pubes* espectro de RMN ^{31}P , afim de averiguar a presença de fosfolípidios. No entanto, não foi detectado fósforo na análise.

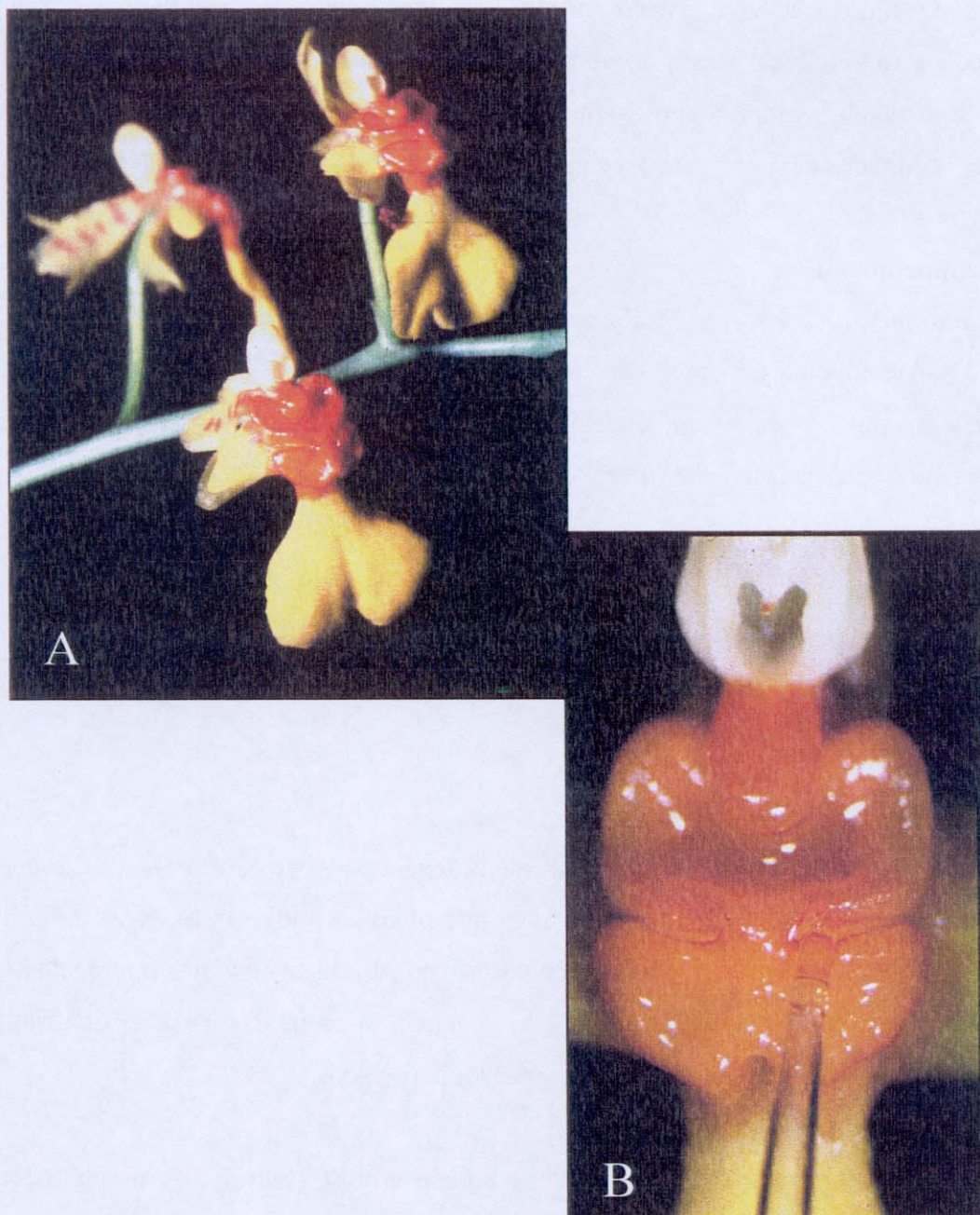


Figura 10. A - Flores de *Oncidium hookeri*; B - Estrutura elaiófora de *Oncidium hookeri* sendo retirado óleo floral com o auxílio de um capilar de vidro, que apresenta um diâmetro de 0,25mm.

II.3.2 Classe de compostos encontrados nos óleos florais

O conhecimento da composição química dos óleos produzidos nas glândulas florais pode fornecer dados importantes para a compreensão de diversos mecanismos de polinização. Nos óleos florais estudados, foram identificados as seguintes classes de compostos: fenilpropanóides, terpenóides, derivados de ácidos graxos e ésteres de glicerila (Tabelas 8 a 16).

II.3.2.1 Fenilpropanóides

Foram identificados três fenilpropanóides: elemicin 95, 4-metoxi-acetofenona 112 e vanilina 113. A elemicina foi observado no óleo floral de *O. pumilum*, a vanilina foi detectada nos óleos florais de *O. praetextum* (Tabela 11) e *Gomesa* sp. (Tabela 16) enquanto a 4-metoxi-acetofenona foi encontrada no óleo floral de *Gomesa* sp. (Tabela 16). Os fenilpropanóides são odoríferos, e encontrados, geralmente, em óleos voláteis (fragrâncias florais). Não foram encontrados relatos de sua presença em óleos de estruturas elaióforas de flores polinizadas por abelhas coletoras de óleos florais.

II.3.2.2 Terpenóides

II.3.2.2.1 Sesquiterpenóides

Hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram identificados nos óleos florais das espécies *O. praetextum* e *O. pumilum*, e foram encontrados nos óleos de todas as espécies analisadas do gênero *Gomesa*. Hidrocarbonetos sesquiterpênicos são constituintes de várias fragrâncias.

O óleo floral de *O. pumilum* (Tabela 13) foi o único, entre os das espécies analisadas, que apresentou em sua composição álcoois e ésteres sesquiterpênicos.

II.3.2.2.2 Esteróides

Os esteróides, stigmasterol 85 (Figura 11) e clionasterol 86 (Figura 12), foram encontrados apenas nos óleos florais de *O. varicosum* (Tabela 12). A identificação destes constituintes foi feita a partir da comparação do seu espectro de massas com o espectro obtido no banco de dados Wiley, no qual apresentou espectros idênticos, com grau de confiabilidade acima de 95%. Esteróides foram reportados como constituintes dos óleos florais de algumas espécies de *Caceolaria* (Scrophulareaceae) e *Malpighia* (Malphigheaceae), espécies estas polinizadas por

abelhas coletoras de óleo. A necessidade de esteróides na dieta é característica geral para a classe de insetos (Downer, 1978).

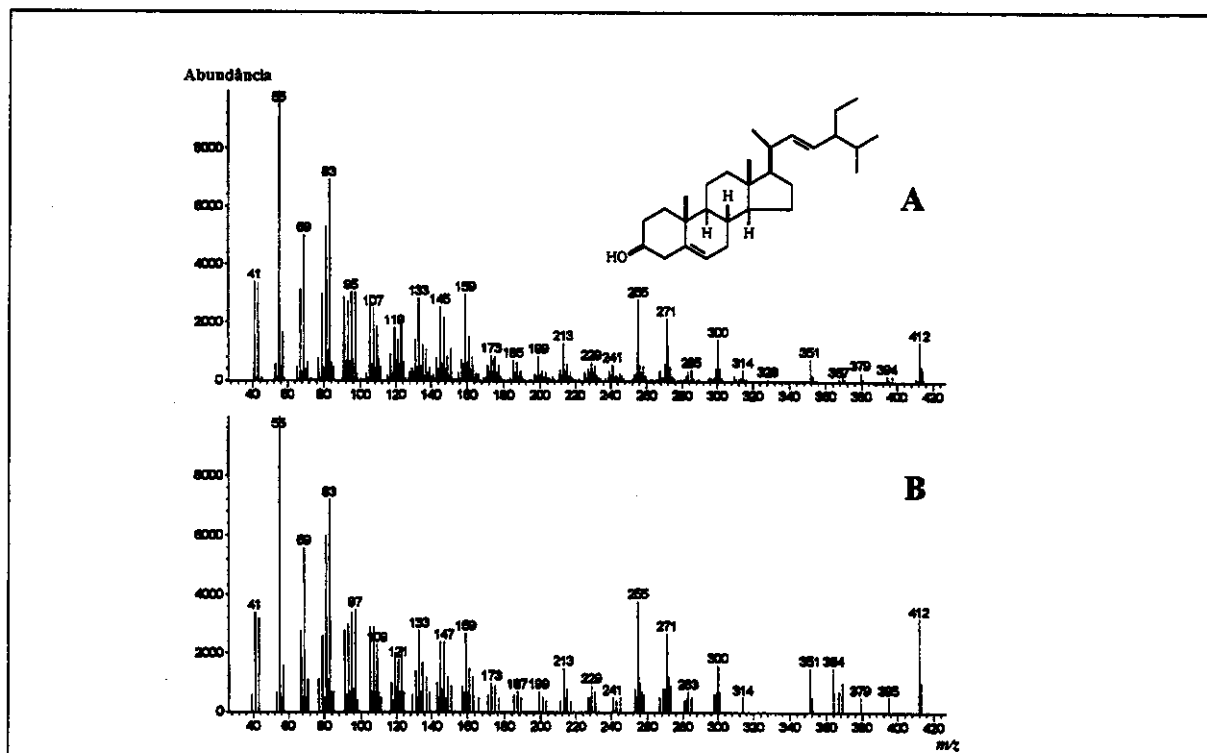


Figura 11. Espectro de massas do stigmasterol 85. A – Óleo floral de *O. varicosum*; B – Espectro da biblioteca Wiley

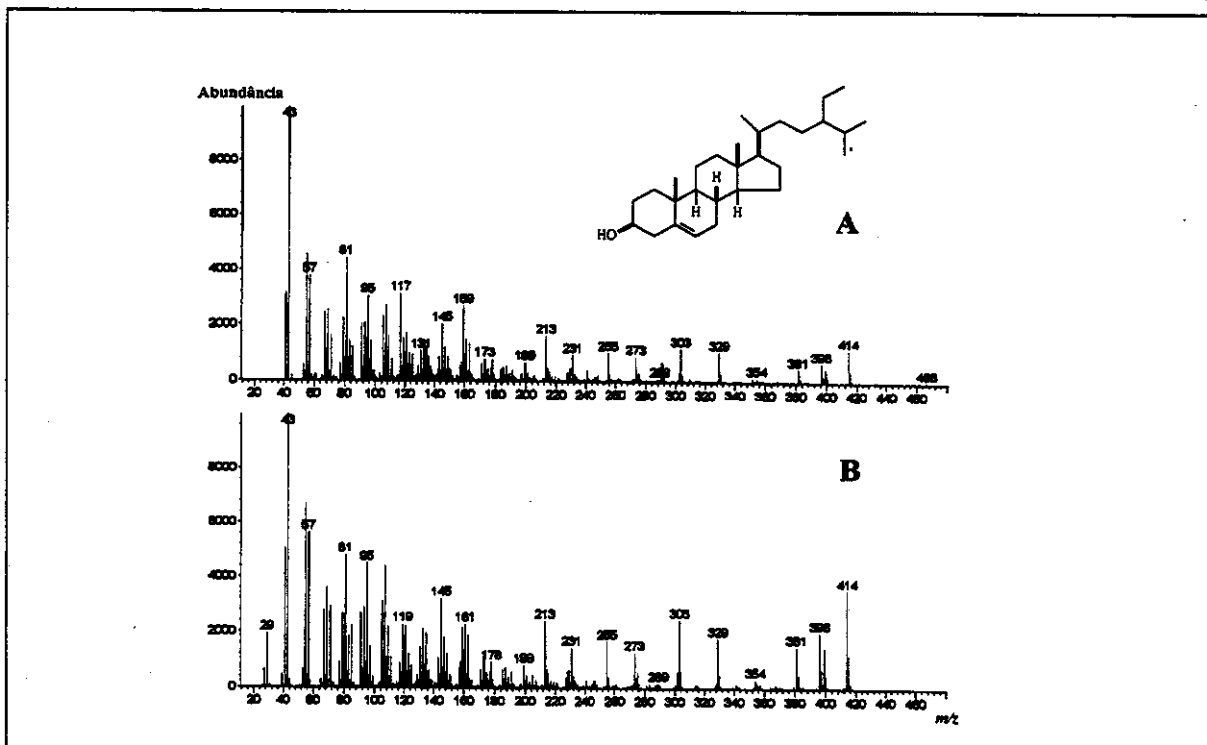


Figura 12. Espectro de massas do clonasterol 86. A – Óleo floral de *O. varicosum*; B – Espectro de biblioteca Wiley

II.3.2.2.3 Meroterpenóides

O α -Tocoferol, 80, está presente nos óleos de *O. varicosum* (Tabela 12) e *O. praetextum* (Tabela 11) em pequena abundância. A identificação deste composto foi realizada a partir da comparação do seu espectro de massas com o espectro obtido no banco de dados Wiley (Figura 13). O α -Tocoferol também é essencial para a alimentação de insetos, que precisam obtê-lo de plantas (Downer, 1978).

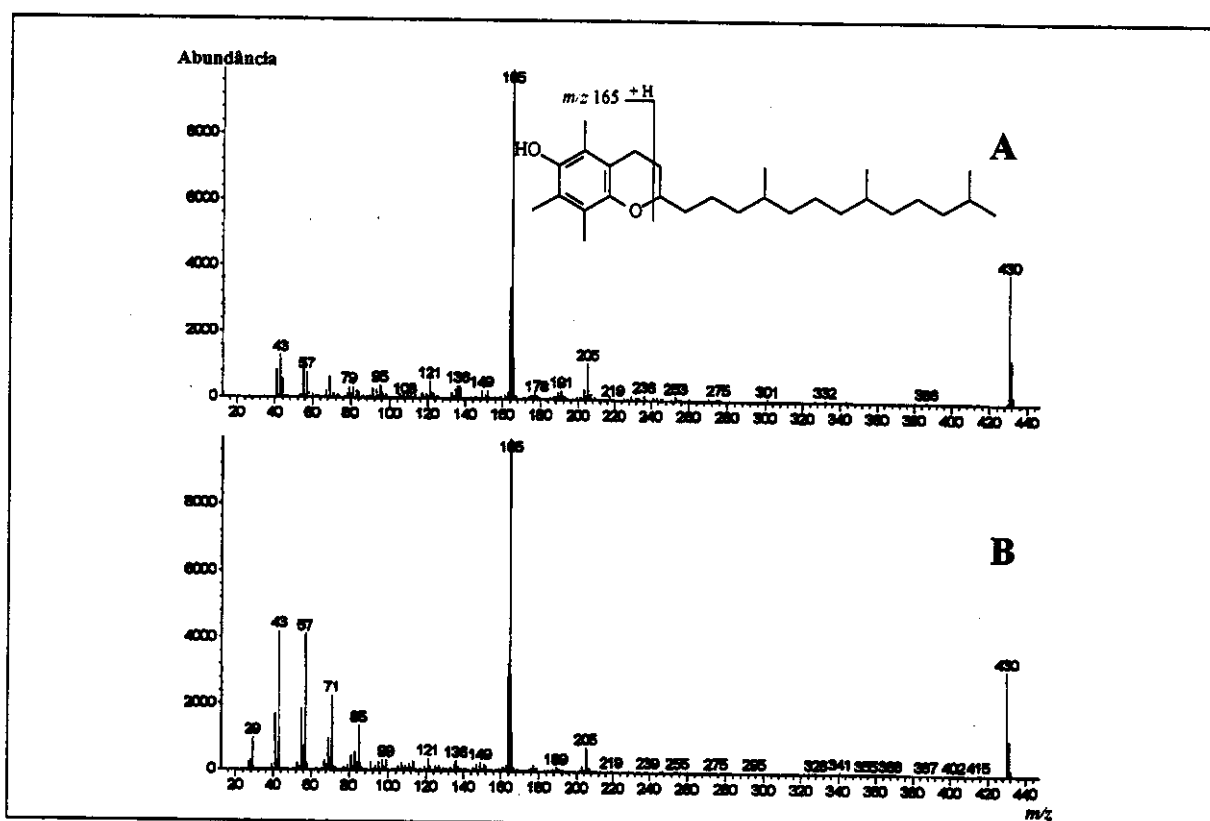


Figura. 13. Espectro de massas do α -tocoferol 80. A – Óleo floral de *O. varicosum*; B – Espectro de biblioteca Wiley

Os terpenóides são amplamente distribuídos na natureza e encontrados em grande abundância em plantas superiores. Esta classe de compostos presentes em plantas tem sido alvo de vários estudos de ecologia química pois desempenham o papel de fitoalexinas, substâncias impalátaveis e repelentes para insetos, agentes de defesa contra herbívoros, ferômonios, aleloquímicos e hormônios de plantas, desta forma terpenóides são responsáveis por muitas interações ecológicas (Robbers, *et al.*, 1996).

II.3.2.3 Derivados de ácidos graxos

II.3.2.3.1 Ácidos livres

Ácidos livres, como ácido palmítico, 72, e ácido linoléico, 73, foram encontrados em todos os óleos analisados, com exceção do óleo da espécie *O. pumilum* (Tabela 13). Há relatos da identificação destes ácidos em óleos florais de *Byrsonima crassifolia*, Malpighiaceae (Vison *et al.*, 1998). Ácidos β -acetoxi-graxo livres foram identificados e reportados nos óleos florais de várias espécies de *Krameria* (Krameriaceae) (Simpson *et al.*, 1979, Seigler *et al.* 1978), no entanto, não foram detectados em nenhum dos óleos analisados no presente estudo.

II.3.2.3.2 Ésteres

Os ésteres dodecanoato de metila, 94, tetradecanoato de metila, 101, e octadecanoato de metila, 106, foram identificados apenas no óleo floral *O. pumilum* (Tabela 13).

II.3.2.3.3 Hidrocarbonetos

Todos os óleos analisados mostraram a presença de n-alcenos entre C₁₉ e C₃₀, com as abundâncias relativas variando entre as espécies. As espécies do gênero *Gomesa* apresentaram maior abundância de hidrocarbonetos que as espécies do gênero *Oncidium*, excetuando-se a espécie de *O. pumilum*, que apresentou 29% da composição de seu óleo constituída de n-alcenos.

II.3.2.3.4 Cetonas

Cetonas, como 2-pentadecanona, 99, (Figura 14), 2-heptadecanona, 102, (Figura 15) e 2-eicosanona, 106, foram identificadas no óleo floral de *O. pumilum* a partir da análise do seu espectro obtido em comparação com espectro de massas encontrado no banco de dados da Wiley para as respectivas cetonas, no qual apresentou espectros idênticos, com grau de confiabilidade acima de 95%.

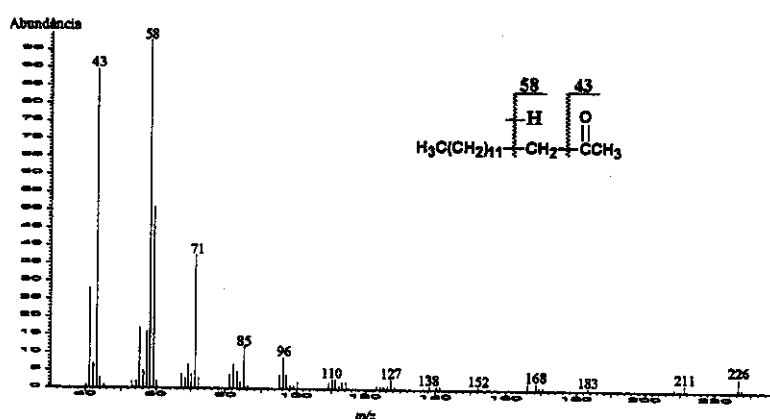


Figura 14. Espectro de massas da 2-pentadecanona, 99

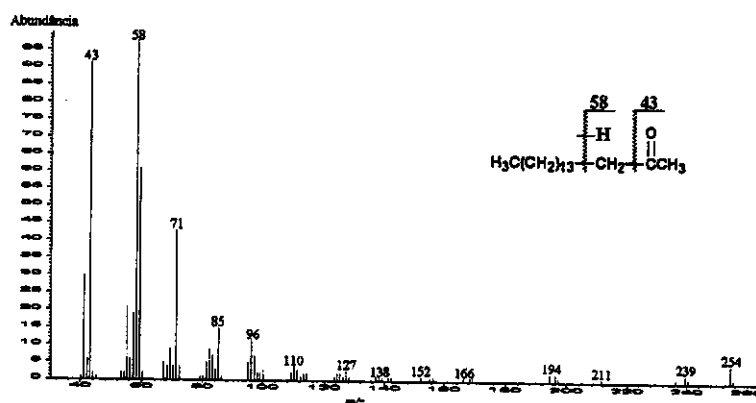


Figura 15. Espectro de massas da 2-heptadecanona, 103

Um estudo comparativo da composição química do óleo carregado por abelhas *Macropis nuda* (Melittidae), coletado nas flores de *Lysimachia ciliata* (Primulaceae), e a massa óleo/pólen destinados para a provisão de larvas desta abelha, identificou lipídios como constituintes majoritários. Neste estudo, foi verificado a presença de cetonas (C_{13} , C_{15} e C_{17}) na parede celular do ninho da abelha *M. nuda*. Segundo os autores, a origem destas cetonas é desconhecida, pois não foram detectadas nas análises químicas do óleo nem na massa óleo/pólen (Buchman, 1987). Tendo sido encontrado em *O. pumilum* as cetonas (C_{15} e C_{17}), é uma evidência que este óleo possa ser utilizado na construção da parede celular do ninho de abelhas coletoras de óleo.

II.3.2.4 Ésteres de glicerila

Os compostos monoacetilglicerol e 1,3-diacetilglicerol estão presentes em baixa quantidades em vários óleos das espécies de *Oncidium*, (Tabela 8 a 12) mas não foram encontrados em

nenhuma das espécies do gênero *Gomesa* (Tabela 14 a 16). Suas estruturas foram confirmadas a partir de síntese de padrões (ver seção Síntese de padrões de ésteres de glicerila).

A presença de compostos que se fragmentam no espectrômetro de massas fornecendo os íons de m/z 117 e/ou 159 foi observado em todos os óleos florais de *Oncidium* (Tabela 8 a 12) com exceção de *O. pumilum* (Tabela 13). Estes compostos também não foram observados nos óleos de nenhuma espécie de *Gomesa* (Tabela 14 a 16). A comparação dos espectros de massas destes compostos com os espectros do banco de dados Wiley, forneceu espectros com baixa similaridade, e portanto, não confiáveis.

Compostos que fragmentam-se no espectrômetro de massas gerando os íons 117 e 159, foram observados por Vogel (1974) nos óleos florais de *Calceolaria pavonii* (Scrophulariaceae) e identificados como diacilglicerois do tipo 1-acil-2-acetilglicerol, onde o grupo acil é derivado de um ácido graxo possuindo um grupo acetoxi como ramificação de sua cadeia (Esquema 1, página 53).

O triacilglicerol, 1-miristoil-2,3-diacetilglicerol ou 2-miristoil-1,3-diacetilglicerol, fragmentam-se no espectrômetro de massas fornecendo os íons m/z 159 (Johnson & Holman, 1966, Figura 16).

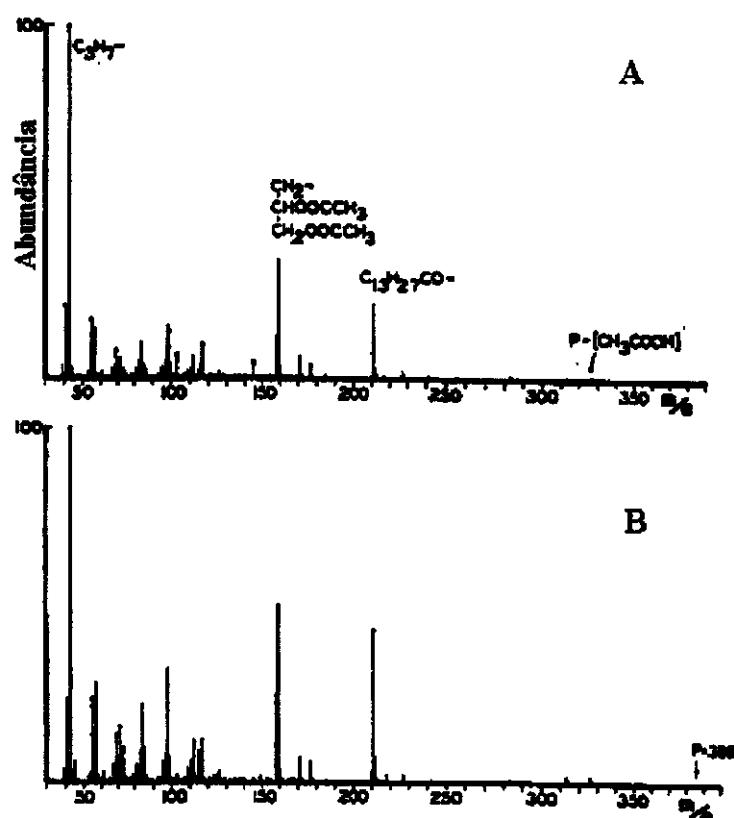


Figura 16. A = Espectro de Massas do 1-miristoil-2,3-diacetil-glicerol; B = Espectro de Massas do 2-miristoil-1,3-diacetil-glicerol (Johnson & Holman, 1966).

Monoacilglicerois, onde o grupo acil é derivado de um ácido graxo, fragmentam-se, levando a vários íons derivados principalmente de cadeia acíclica (Johnson & Holman, 1966, Figura 17).

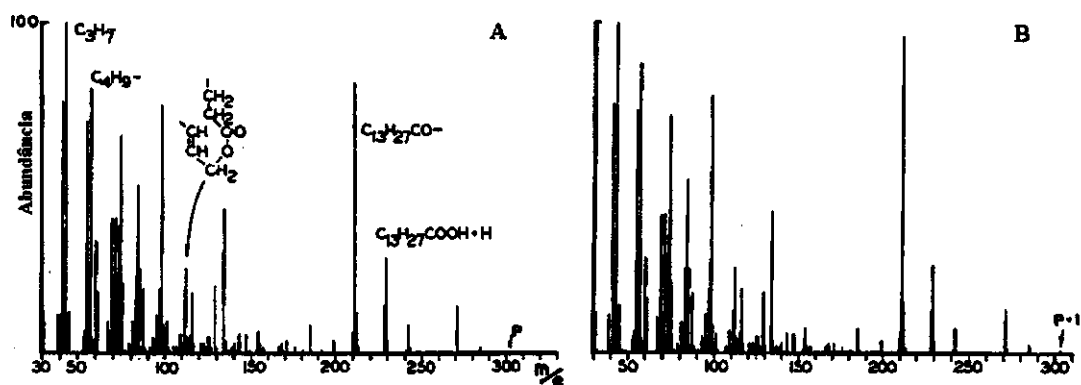
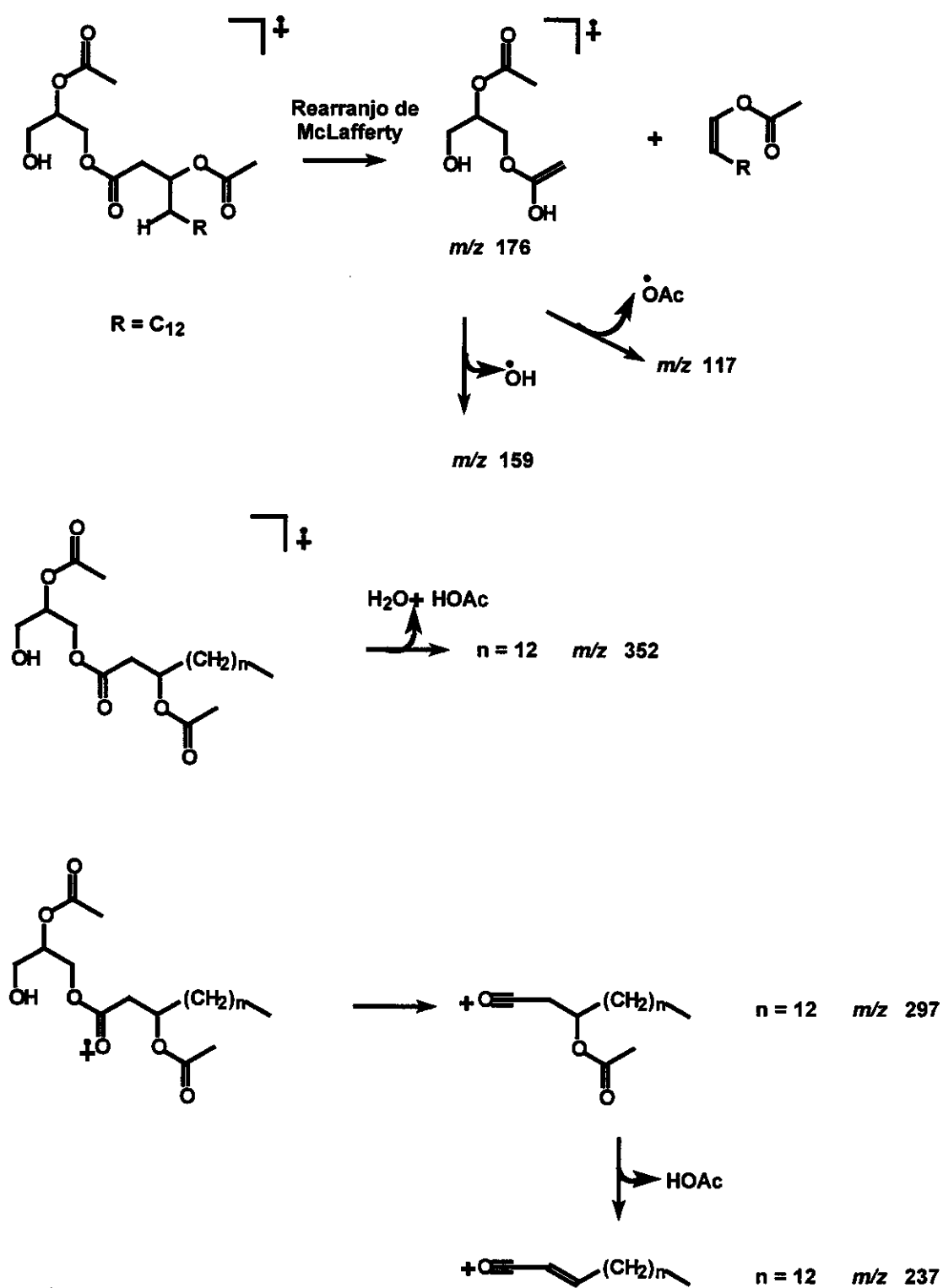


Figura 17. A = Espectro de Massas do 1-miristoil-glicerol; B = Espectro de Massas do 2-miristoil-glicerol (Johnson & Holman, 1966).



Esquema 1- Fragmentação do composto 2-acetil-3-(3-acetoxi-palmitoil)-glicerol proposto por Vogel (1974)

Com base nas observações descritas acima, foi sugerida a presença de di e triacilgliceróis nos óleos florais dos vários *Oncidium*, sendo os diacilgliceróis mais abundantes que os triacilgliceróis. Tanto os di quanto os triacilgliceróis possuem apenas uma cadeia derivada de um ácido de cadeia longa, sendo os demais grupos derivados do ácido acético. Também foi observado que alguns destes compostos possuíam fragmentos de m/z $[(265+nCH_2) - AcOH]$, onde $n = 0, 2$ e 4], que são compatíveis com cadeia acílica de ácidos graxos de cadeia longa com um grupamento acetoxi. Estes compostos apresentam índice de retenção variando entre 2910 e 3565, e estão presentes em grande abundância nos óleos de *O. pubes* (Tabela 8), *O. truncatum* (Tabela 9) e *O. hookeri* (Tabela 10), e em menor quantidade nos óleos das espécies *O. praetextum* (Tabela 11) e *O. varicosum* (Tabela 12), não sendo encontrados no óleo de *O. pumilum* (Tabela 13) e em nenhuma espécie do gênero *Gomesa* (Tabela 14 a 16). Espectros de massas característicos de monoacilgliceróis, onde o grupo acil é derivado de um ácido graxo cadeia longa (Figura 16), não foram detectados em nenhuma das análises dos óleos florais de *Oncidium* ou *Gomesa*.

II.3.2.4.1 Sugestões de estrutura de di- e triacilgliceróis a partir do espectro de Massas

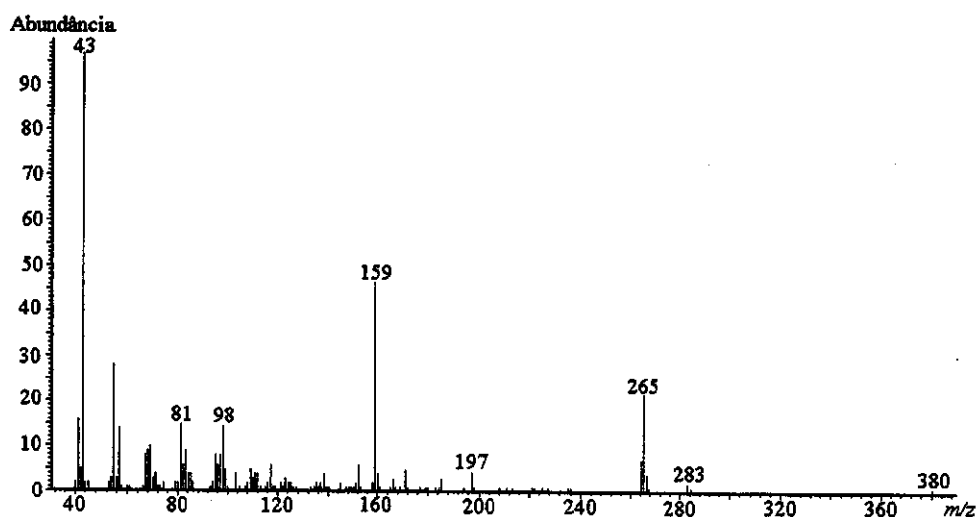


Figura 18. Espectro de massa do composto octadecenoil-diacetilglicerol, 52

A caracterização do composto octadecenoil-diacetilglicerol, 52 (IR= 2973, Figura 18), foi sugerida devido a presença dos íons de m/z 159, 265 e 380. O íon de m/z 380 é atribuído ao fragmento $[C_{23}H_{40}O_4]^+$ originado da perda de ácido acético pelo íon molecular. O íon de m/z 265

é atribuído ao fragmento $[C_{17}H_{33}CO]^+$ derivado da cadeia octadecenoila. O íon de m/z 159 é atribuído ao fragmento $[C_7H_{11}O_4]^+$ originado do rearranjo McLafferty, seguido pela perda de um radical acetil (Esquema 1, página 53). O espectro de massas não apresenta sinais que permitam sugerir a posição da ligação dupla.

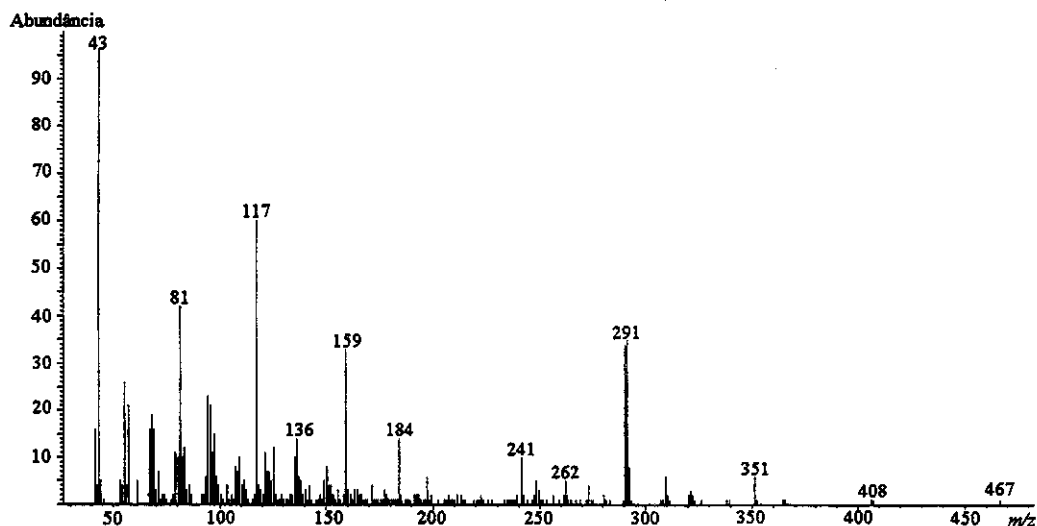


Figura 19. Espectro de massa do composto 1-(acetoxi-eicosenoil)- 2-acetilglicerol, 69

O composto 1-(acetoxi-eicosenoil)- 2-acetilglicerol, 69 (Figura 19) foi sugerido pela presença dos íons de m/z 117, 159, 291 e 351. O íon de m/z 351 é atribuído ao grupo acetoxi-eicosenoil, $[C_{22}H_{39}O_3]^+$. O íon de m/z 291 é atribuído ao fragmento $[C_{20}H_{35}O]^+$ derivado da cadeia acetoxi-eicosenoila, pela perda de ácido acético. O íon de m/z 159 é atribuído ao fragmento originado do rearranjo McLafferty, seguido da perda de um radical hidróxido, segundo Vogel (Esquema 1). O íon de m/z 117 é atribuído ao fragmento originado do rearranjo McLafferty, seguido da perda do radical acetil (Esquema 1).

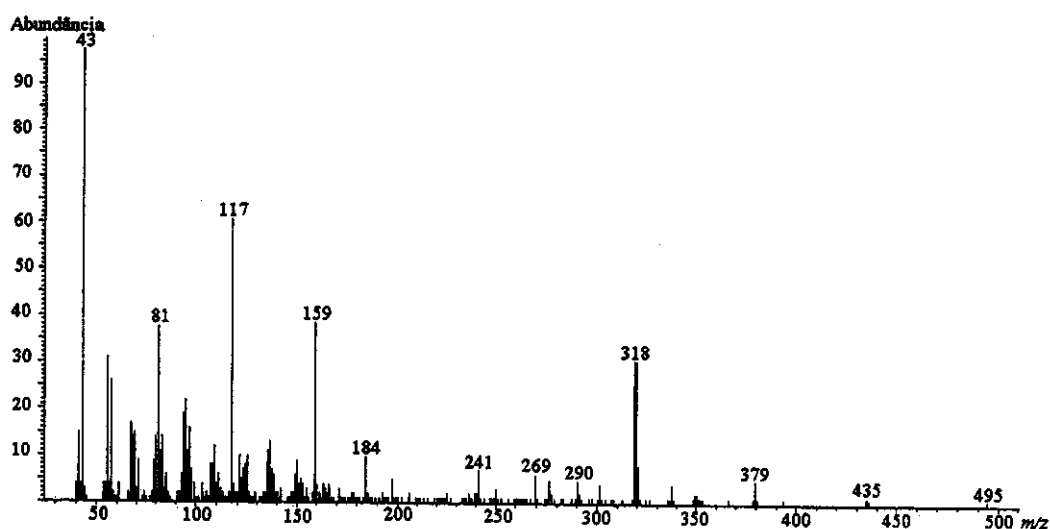


Figura 20. Espectro de massas do composto 1-(acetoxi-dodocosenoil)-2-acetilglicerol, 70

A caracterização do composto 1-(acetoxi-dodocosenoil)-2-acetilglicerol, 70 (Figura 20), foi sugerida pela presença dos íons de m/z 117, 159, 319 e 379. Os íons apresentam o mesmo padrão de fragmentação do espectro proposto para o 1-(acetoxi-eicosenoil)-2-acetilglicerol (Figura 19), com vinte oito daltons a mais nos íons derivado da cadeia lateral (m/z 319 e 379), o que sugere a presença de mais dois carbonos na cadeia lateral.

Ésteres de glicerila são constituintes essenciais na dieta de insetos (Downer, 1978, Vison, *et al.*, 1998). O óleo floral de *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) consiste de misturas de mono- e diacilgliceróis alguns ácidos graxos livres, e pequenas quantidade de triacilgliceróis, sendo este óleo coletado por várias espécies de abelhas *Centris* (Anthophoridae) (Vison, *et al.*, 1998). As espécies *O. pubes*, *O. truncatum* e *O. hookeri* produzem em suas estruturas elaióforas óleos florais constituídos principalmente de diacilgliceróis, pequenas quantidades de triacilgliceróis e ácidos graxos livres. Estes resultados fornecem evidências químicas que sugerem que o mecanismo de polinização das espécies *O. pubes*, *O. hookeri* e *O. truncatum* não tem por base a atração-enganosa como sugerido para várias espécies deste gênero (Pijl & Dodson, 1966, Nierenberg, 1972, Ackerman, 1986, Chase, 1986) mas, na recompensa de lípidios da mesma forma que ocorre em *B. crassifolia* (Malpighiaceae).

II.3.3 Síntese dos Padrões de Ésteres de glicerila

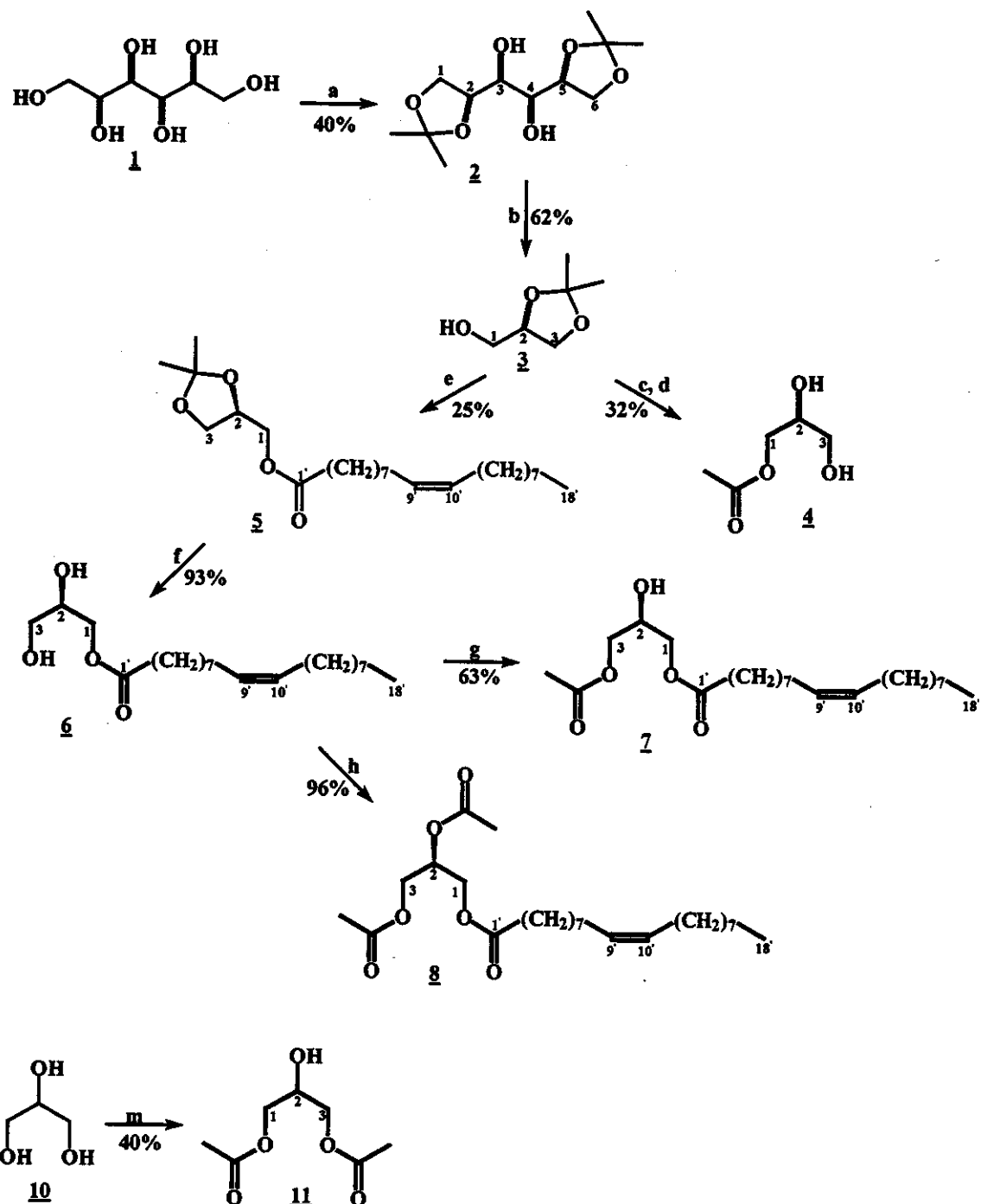
Face a importância ecológica dos ésteres de glicerila, ausência de índices de retenção e padrões sintéticos, recursos importantes para a identificação de compostos por CG/EM, fez-se necessário a síntese de alguns padrões. Espectros de massas com fragmentação compatível com os compostos 1-oleoil-2,3-diacetilglicerol, o 1-acetilglicerol, 1,3-diacetilglicerol, foram detectados em alguns óleos florais por isto a necessidade de padrões sintéticos. Composto com substituição do tipo do 1-oleoilglicerol e 1-oleoil-3-acetilglicerol foram sintetizados, para observar o valor do seu índice de retenção e sua fragmentação no espectrômetro de massas.

A rota sintética utilizada baseou-se no trabalho de Eibl & Woolley (1986) para compostos semelhantes, conforme Esquema – 2, que utiliza o 1,2-isopropilideno-glicerol como substrato. Esta substância é geralmente utilizada na síntese de lipídios e fosfolipídios enantiomericamente puros.

A síntese do 1, 2-isopropilideno-glicerol foi descrita pela primeira vez por Baer e Fischer em 1939, no qual foi obtido por conversão do D-manitol, utilizando acetona e cloreto de zinco, ao 1,2:5,6-diisopropilideno-D-manitol, seguido da clivagem do diol vicinal empregando para isto tetracetato de chumbo.

Várias modificações deste método clássico tem sido reportadas como: (a) utilização de 2,2-dimetoxipropano (ao invés de acetona) em 1,2-dimetoxietano na presença de cloreto de estanho (II); (b) o uso de 2-metoxipropano em dimetilformamida, na presença de quantidades catalíticas de ácido p-toluenossulfônico; (c) o emprego de 2,2-dimetoxipropano na presença de ácido p-toluenossulfônico e como solvente o dimetilsulfoxido anidro. Os métodos de Baer (clássico), (a) e (b) foram estudados em detalhe e comparados por cromatografia gás-líquido. Nos três métodos, diacetais isoméricos são formados. No entanto, o método de Baer leva ao 1,2;5,6-diacetal com alto rendimento (63%) enquanto os métodos (a) e (b) levam a misturas muito mais complexa de acetais, além de ambos os métodos serem menos econômicos que o método de Baer.

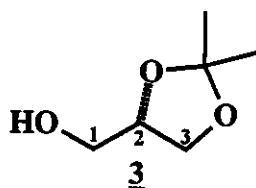
As modificações na segunda etapa da síntese do 1,2-isopropilideno-glicerol, a clivagem do 1,2:5,6-diisopropilideno-D-manitol, envolve a substituição do tetracetato de chumbo por periodato de sódio ou por quantidades catalíticas de derivados de bismuto: μ -oxo-bis(clorotrifenílbismuto) ou trifenílbismuto (Jurczak *et al.* 1986).



Esquema-2. Síntese dos padrões 1-acetil-glicerol **4**, 1-oleil-glicerol **6**, 1-oleil-3-acetil-glicerol **7**, 1-oleil-2,3-diacetil-glicerol **8**, 1,2- diacetil-glicerol **11**

Legenda: 1- a-Acetona/ ZnCl_2 , 0°C , 17h, ta; b- NaIO_4 / NaHCO_3 aq. 1h, 0°C , NaBH_4 /etanol, 0°C , 2h, ta, CH_3COOH , pH=8, 10min, ta; c- Anidrido acético/ piridina 30min, ta; d- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ 70%, 24h, ta; e- Ácido oléico/DMAP/DCC, 0°C , 20h, ta; f- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ 70%, 55°C , 5h; g- Anidrido acético/ piridina 1h, ta; h- Anidrido acético(excesso)/ piridina 3h, ta; m- Anidrido acético/piridina, 1h, ta

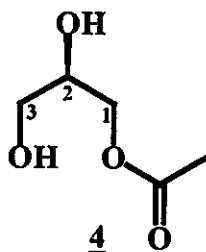
II.3.3.1 Obtenção do 2,3-isopropilideno-glicerol 3



Neste trabalho o D-manitol (1) foi cetalizado utilizando acetona e cloreto de zinco como catalizador para obtenção do 1,2:5,6-diisopropilideno-D-manitol 2 com rendimento de 40%. Os dados físicos e as atribuições de RMN de ^1H (Espectro E2) e de RMN de ^{13}C (Espectros E3 e E4) desse composto foram comparados e baseadas nas atribuições obtidas anteriormente (Schmid, *et al.* 1991, Citó, 1994).

O 1,2:5,6-diisopropilideno-D-manitol 2 foi submetido a uma clivagem oxidativa utilizando para isto, periodato de sódio em solução de bicarbonato de sódio, resultando assim no 1,2-isopropilideno-gliceraldeído, que foi reduzido com boroidreto de sódio em pH básico obtendo-se o 1,2-isopropilideno-glicerol 3 com rendimento de 62%. Os dados físicos e as atribuições de RMN de ^1H (Espectro E6) e de RMN de ^{13}C (Espectros E7 e E8) desse composto foram baseadas nas atribuições obtidas anteriormente (Schmid, *et al.* 1991, Citó, 1994).

II.3.3.2 Obtenção do 1-acetil-glicerol 4



O 1,2-isopropilideno-glicerol 3 foi acetilado utilizando anidrido acético e piridina, obtendo-se o produto acetilado. Este foi desprotegido com solução de ácido acético (Eibl, 1986) obtendo-se o produto desejado 1-acetil-glicerol 4 com rendimento de 32%.

O espectro de RMN de ^1H (Espectro E10) para o composto 4 apresentou um singlete em δ 2.11 correspondente aos hidrogênios do grupo metílico e três multipletos em δ 3.64, δ 3.88 e δ 4.13 correspondentes aos hidrogênios H-3, H-2 e H-1, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C (Espectros E11 e E12) apresentou os sinais δ 63.28, δ 65.24 e δ 70.08 que foram atribuídos aos carbonos C-3, C-2 e C-1, respectivamente.

O espectro de IV (Espectro E9) apresentou uma banda larga em 3390cm^{-1} característica do estiramento O-H, uma banda em 2952cm^{-1} característica de estiramento C-H e outra banda em 1726cm^{-1} atribuída ao estiramento de C=O.

O espectro de massas de alta resolução (Espectro E13) do composto 4 apresentou com principais fragmentos os íons de m/z : 117.01885 ($\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_3^+$, 9.7%), 103.00795 ($\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3^+$, 100%), 74.01375 ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2^+$, 57%) e 61.01101 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2^+$, 53%). Onde o íon de m/z 103.00795, pico base, é originado da perda de um radical CH_2OH .

A análise do composto 4 por CG/EM revelou o mesmo padrão de fragmentação e a mesma faixa de eluição do composto encontrado no óleo floral de *O. hookeri* e *O. truncatum*. Infelizmente não foi possível realizar a coinjeção deste composto devido ao consumo das primeiras amostras de óleos em outros testes, a ausência desta substância no óleo floral de *Oncidium hookeri* na floração do ano seguinte e a não floração da espécie *Oncidium truncatum*. O índice de retenção (IR) calculado para o composto 4 foi 1135 enquanto o índice de retenção calculado para o composto 56, encontrado nos óleos florais, foi 1123. Apesar dos espectros apresentarem um padrão de fragmentação muito semelhante (Figura 21) não é possível afirmar que se tratam do mesmo composto, devido a diferença de 13 unidades em seus índices de retenção.

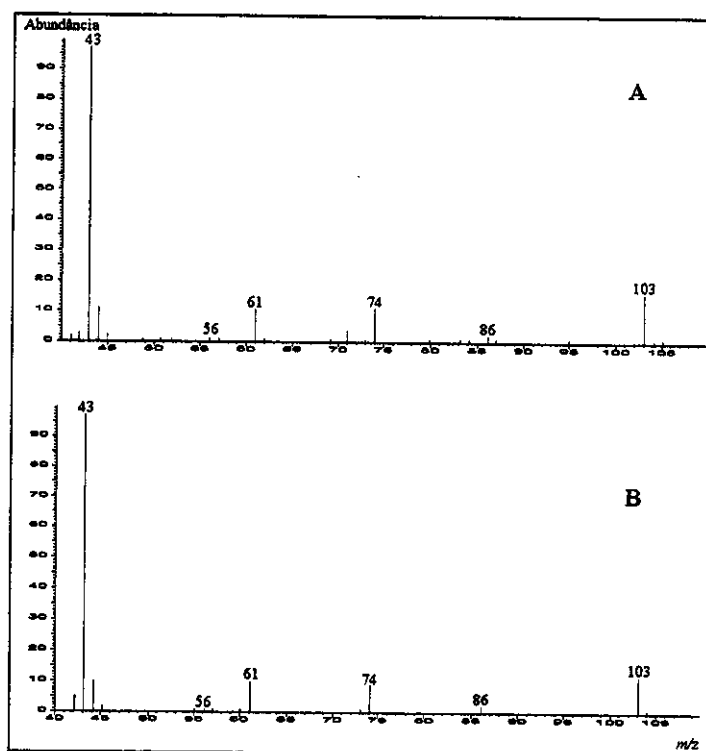
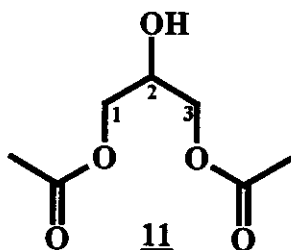


Figura 21. Espectros de massas A = composto 56, B = padrão sintético 1 -acetil-glicerol (4).

II.3.3.3 Obtenção do 1,3-diacetil-glicerol 11



O 1,3-acetil glicerol 11 foi obtido a partir da acetilação seletiva das hidroxilas primárias do glicerol (20), obtendo-se um rendimento de 30%.

O espectro de RMN de ^1H (E15) para o composto 11 apresentou um singleto em δ 2.11 correspondente aos hidrogênios dos grupos metílicos, um singleto largo atribuído ao hidrogênio da hidroxila e um multipeto em δ 4.21 correspondentes aos hidrogênios H-1, H-2 e H-3.

No espectro de RMN de ^{13}C (E16 e E17) foram atribuídos os sinais em δ 20.82 aos carbonos metílicos, δ 65.22 aos C-1 e C-3, δ 67.99 ao carbono C-2 e δ 171.2 as carbonilas.

O espectro de IV (E14) apresentou uma banda larga em 3439cm^{-1} característico de estiramento O-H, uma banda em 2959cm^{-1} característica de estiramento C-H e outra banda em 1739cm^{-1} estiramento de C=O.

O espectro de massas de alta resolução (E18) do composto **4** apresentou como principais fragmentos os íons de m/z : 117.03202 ($\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_3^+$, 9.7%), 103.02052 ($\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3^+$, 100%), 74.02134 ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2^+$, 57%) e 61.01746 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2^+$, 53%). Onde o íon de m/z 103, pico base, é originado da perda de um radical CH_2OH .

II.3.3.3.1 Confirmação da presença do composto **11** no óleo floral de *O. hookeri*

A análise do composto **11** por CG/EM revelou o mesmo padrão de fragmentação e a mesma faixa de eluição do composto **57** encontrado no óleo floral de *O. hookeri*. A realização da coinjeção deste composto com o óleo floral de *O. hookeri* confirmou se tratar do mesmo composto (Figuras 22 e 23).

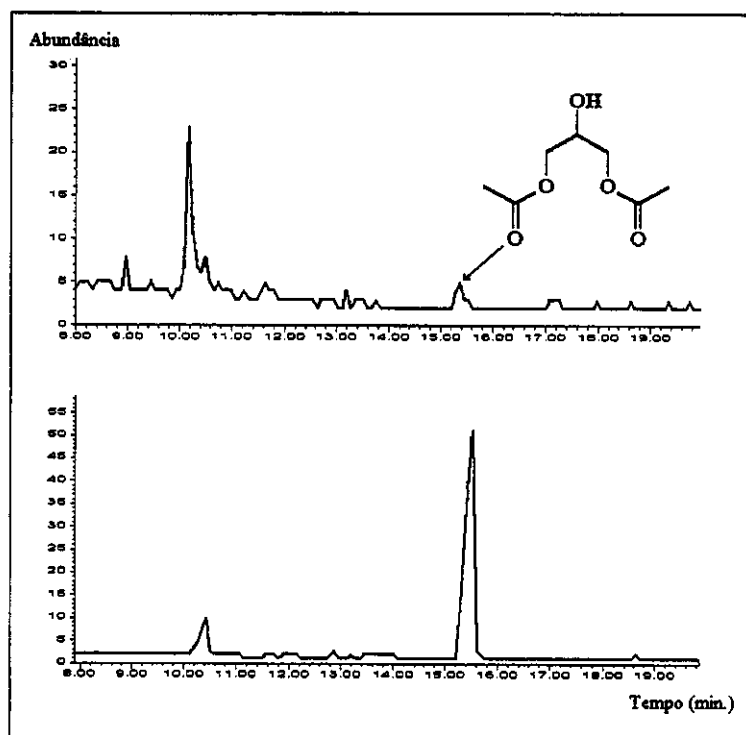


Figura 22. Coinjeção do padrão sintético, 1,3-diacetil-glicerol (**11**), com o óleo floral de *O. hookeri*

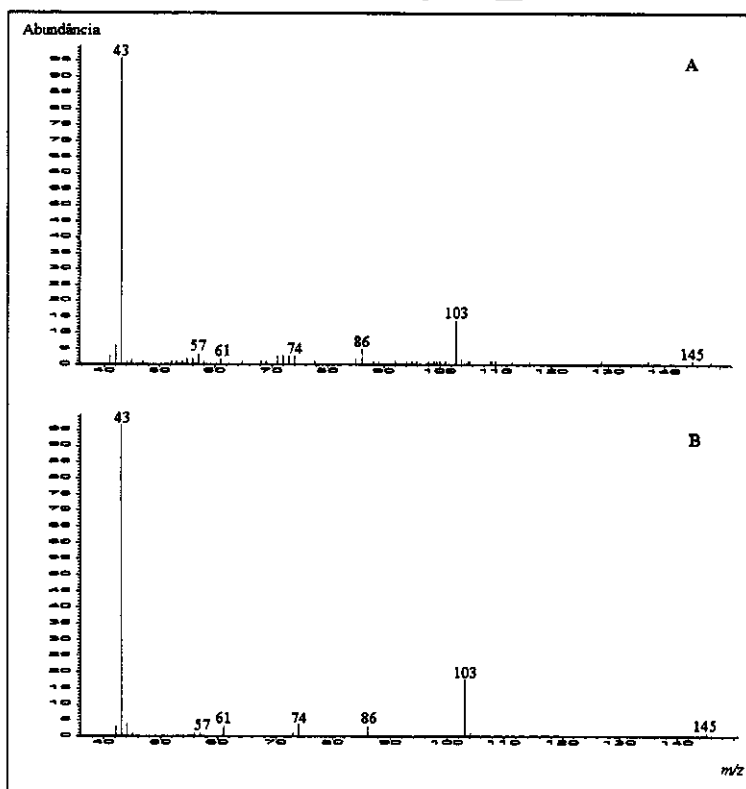
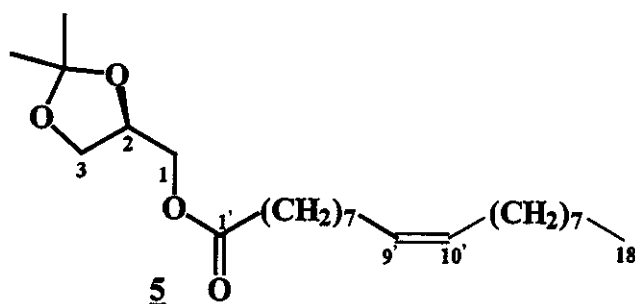


Figura 23. Espectro de massas do composto 1,3-diacetil-glicerol (**11**). A = composto presente no óleo de *O. hookeri*, B = padrão sintético

II.3.3.4 Obtenção do 1-oleoil-2,3-isopropilideno-glicerol 5

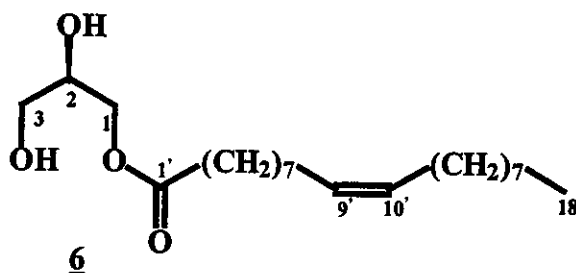
O 1,2-isopropilideno-glicerol 3 foi esterificado com ácido oléico na presença de N, N-diciclohexilcarbodiimida e 4-dimetilaminopiridina, obtendo-se o composto 5 com rendimento de 25%. Este baixo rendimento é atribuído a formação da N-acilureia, além da baixa pureza do ácido oléico (Eibl, 1986, Panek e Sarks, 1990, Mikolajczyk & Kielbasinski, 1981).

O espectro de RMN de ^1H (E20) para o composto 5 apresentou um tripleto em δ 0.88 atribuído aos hidrogênios da metila, H-18', os sinais intensos e largo entre δ 1-1.5 foram atribuídos aos hidrogênios dos vários grupos metilênicos da cadeia lateral derivada do ácido graxo, dois singletos δ 1.37 e 1.44 foram atribuídos aos hidrogênios das metilas geminais e o mutiplete em δ 5.35 é característico dos hidrogênios olefinicos H-9' e H-10'.

No espectro de RMN de ^{13}C (E21 e E22) foram atribuídos os sinais em δ 109.70, 173.60 aos carbonos C_0 e ao carbono da carbonila, C-1', respectivamente.

O espectro de IV (E19) apresentou uma banda em 2926 cm^{-1} característica de estiramento C-H, e uma banda em 1742 cm^{-1} característica de C=O.

O espectro de massas de alta resolução (E23) apresentou o íon molecular de m/z 396.32381 e o pico base de m/z 381.30009 este último indica a perda de um grupo metila. Os principais fragmentos para o composto 5 no espectro de alta resolução são os de m/z 101.05200 ($\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2^+$, 50.7%), 129.04559 (64.8%), 338.27859 ($\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_3^+$, 61,6%), 381.30009 ($\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{O}_4^+$, 100%) e 396.32381 ($\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_4$, 5%).

II.3.3.5 Obtenção do 1-oleoil-glicerol, 6

O grupo protetor cetal foi retirado do composto 5 utilizando solução de ácido acético, obtendo-se assim o composto 6 como um óleo incolor com rendimento de 93%.

O espectro de RMN de ^1H (E25) do composto 6 apresentou um tripleto em δ 0.88 característicos dos hidrogênios metílicos, 18'. Foi observado entre δ 1-1.5 sinais intensos e largos indicando os vários grupos metilênicos existentes na cadeia derivada do ácido graxo, na região δ 1.85 e δ 2.80 foi observado dois singletos largos atribuídos aos prótons das duas hidroxilas, em δ 3.59 e δ 3.70 foi observado dois duplos dubletos atribuídos aos hidrogênios H-3, e dois multipletos em δ 3.93 e δ 4.17 atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-1 respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C (E26 e E27) foram atribuídos os sinais em δ 63.31, δ 65.1 e δ 70.23 aos carbonos C-3, C-1 e C-2, respectivamente. Os sinais em δ 129.7 e δ 130.0 foram atribuídas aos carbonos olefínicos C-9' e C-10', e o sinal em δ 174.3 ao carbono da carbonila, C-1'.

O espectro de IV (E24) apresentou uma banda em 3391cm^{-1} característica de estiramento O-H, uma banda em 2924cm^{-1} característico de estiramento C-H e outra banda em 1739cm^{-1} estiramento de C=O.

O espectro de massas de alta resolução (E28) apresentou o íon molecular de m/z 356.2925. e como pico base o íon de m/z 55. Os principais fragmentos para o composto 6 no espectro de massas de alta resolução são os de m/z 55.0464 (C_4H_7^+ , 100%), 69.0601 (C_5H_9^+ , 66%), 98.0648 ($\text{C}_7\text{H}_{14}^+$, 49%), 264.2413 ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}^+$, 31%) e 265.2484 ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}^+$, 20%).

A análise deste composto por CG/EM confirmou a ausência de compostos (monoacilgliceróis) com este tipo de fragmentação (Figura 24) nos óleos florais estudados, sendo seu índice de retenção calculado igual a 2714.

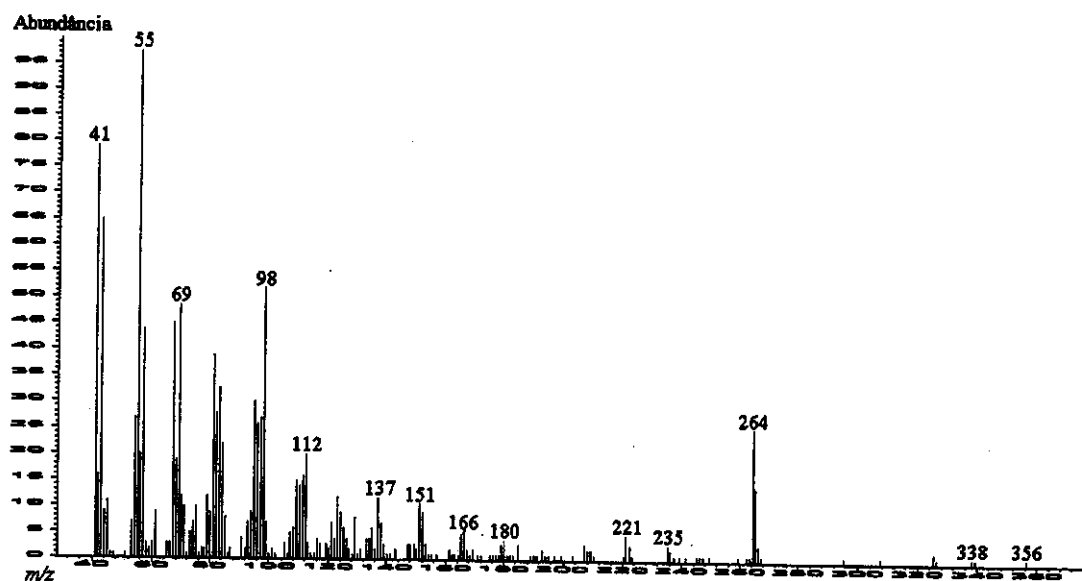
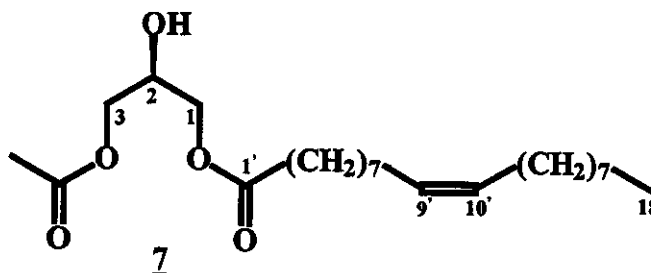


Figura 24. Espectro de massas do 1-oleoil-glicerol, 6

II.3.3.6 Obtenção do 1-oleoil-3-acetil-glicerol, 7



Uma vez obtido o 3-oleoil-glicerol 6, foi realizado uma acetilação seletiva da hidroxila primária com anidrido acético e piridina obtendo-se o produto 1-acetil-3-oleoil-glicerol 7 com rendimento de 62%.

O espectro de RMN de ^1H (E30) para o composto 7 apresentou sinais intensos e largos entre δ 1-1.5ppm indicando a presença dos prótons dos vários grupos metilênicos existentes na cadeia lateral derivada do ácido graxo, um singlete em δ 2.08 atribuído aos hidrogênios da metila do grupo acetil, em δ 4.20 um multiplete atribuído aos hidrogênios H-1, H-2 e H-3, observou-se que a substituição da hidroxila pelo grupo acetil ocasionou uma desproteção para os hidrogênios H-3.

O espectro de RMN de ^{13}C (E31 e E32) foram atribuídos os sinais em δ 20.78 ao carbono da metila do grupo acetil, δ 129.7 e δ 130.0ppm aos carbonos olefinicos e os sinais δ 171.0 e δ 173.9ppm aos carbonos das duas carbonilas, grupo acetil e C-1', respectivamente.

O espectro de IV (E29) apresentou uma banda em 3438cm^{-1} característica de estiramento O-H, uma banda em 2925cm^{-1} característica de estiramento C-H e outra banda em 1742cm^{-1} estiramento de C=O.

No espectro de massas de alta resolução (E33) os principais fragmentos são de m/z : 380.28611 ($\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4^+$, 13%), 265.2366 ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}$, 28%), 264.2281 ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}$, 30%) e 117.0345 ($\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_3$, 100%). Onde o fragmento de m/z 380.28611 corresponde a perda de H_2O e o íon de m/z 265 corresponde a fragmentação da porção do ácido oléico. O íon de m/z 117.0345, pico base, é originado do rearranjo de McLaffery, seguido pela perda de um radical acetil.

A análise por CG/EM revelou que este composto apresenta mesma faixa de eluição dos compostos encontrados nos óleos florais de várias espécies do gênero *Oncidium* que apresentam os íons de m/z 117 e/ou 159 confirmando assim que tais compostos são realmente ésteres de glicerila. O composto **7** apresenta padrão de fragmentação (Figura 25) semelhante ao de compostos majoritários encontrados no óleo floral de *O. pubes* (Figura 26, 27 e 28). O índice de retenção calculado para este composto foi $\text{IR}=2810$.

O espectro de massas apresentou os íons de m/z : 380 ($\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4^+$, 1%), 265 ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}$, 4%), 117 ($\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_3$, 42%) e 43 ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$, 100%). A partir destes íons foi proposta a fragmentação para este composto (Figura 30) onde o fragmento de m/z 380 corresponde a perda de H_2O e o íon de m/z 265 corresponde a fragmentação da porção do ácido oléico. O íon de m/z 117 é originado do rearranjo de McLaffery, seguido pela perda de um radical acetil. O íon de m/z 43, pico base, corresponde a fragmentação da porção do ácido acético.

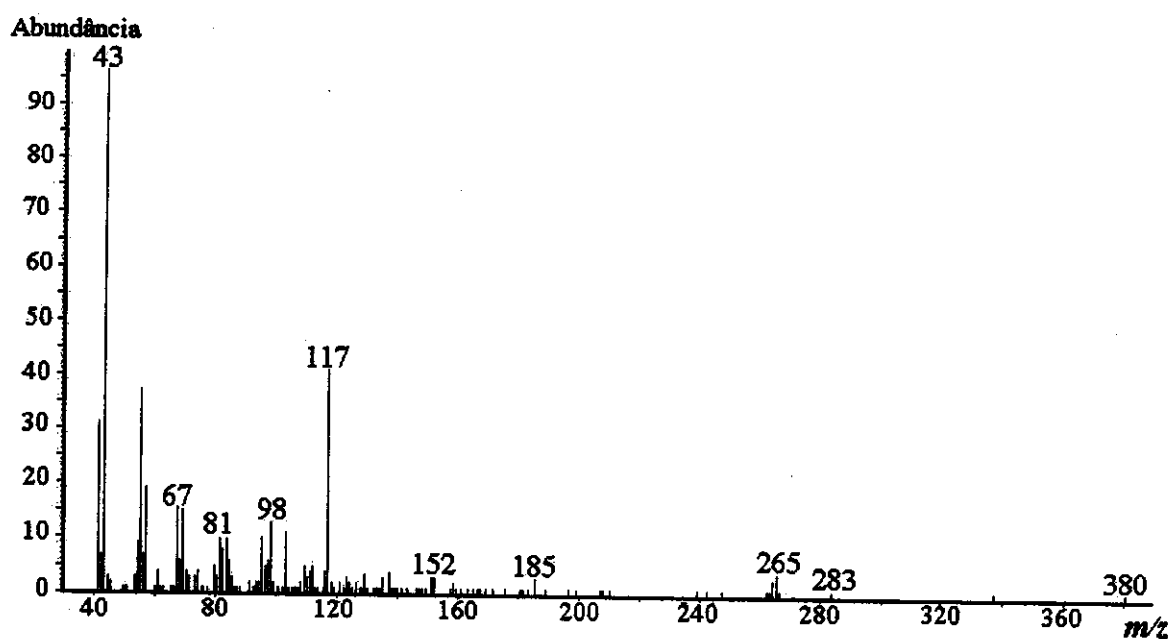


Figura 25. Espectro de massa do composto do 1-acetil-3-oleoil-glicerol (7)

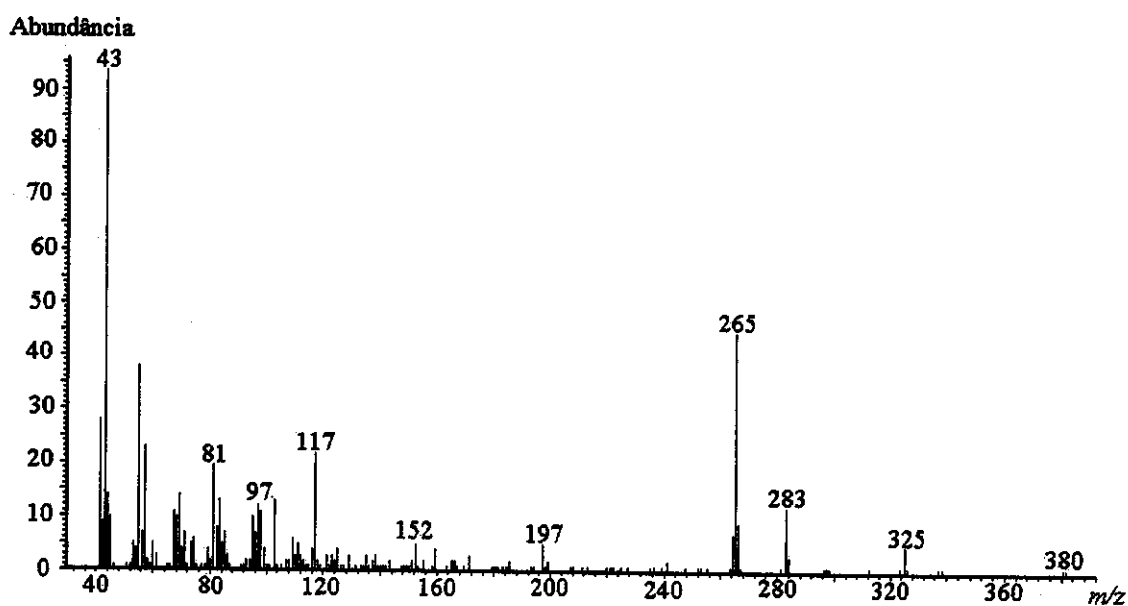


Figura 26. Espectro de massas do composto (acetoxi-octadecanoil)-acetil-glicerol, 51

A caracterização do composto (acetoxi-octadecanoil)-acetil-glicerol, (Figura 26) foi sugerida pela presença dos íons de m/z 117, 265 e 325. O íon m/z 117 é atribuído ao fragmento $[C_5H_9O_3]^+$ originado do rearranjo McLafferty, seguido pela perda de um grupo acetil (Figura 30). O íon de m/z 265 é atribuído ao fragmento $[C_{18}H_{33}O]^+$ derivado da cadeia acetoxi-

octadecanoil, seguido da perda de ácido acético. O íon de m/z 325 é atribuído ao grupo β -acetoxi-octadecanoil, $[C_{20}H_{37}O_3]^+$.

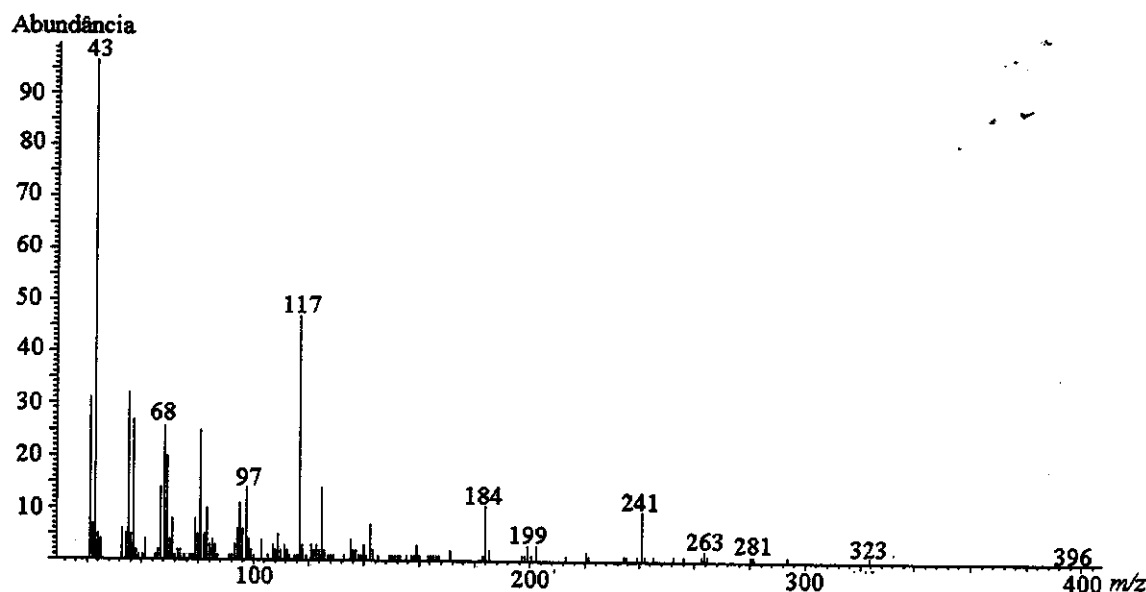


Figura 27. Espectro de massa do composto (3-acetoxi-6-hidroxi-octadecanoil)-acetil-glicerol, 53

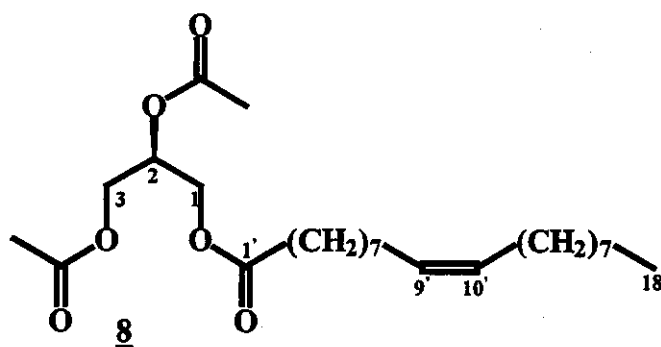
A caracterização do composto (3-acetoxi-6-hidroxi-octadecanoil)-acetil-glicerol, (Figura 27), foi sugerida pela presença dos íons de m/z 117, 199, 241, 263, 323. O íon de m/z 117 é atribuído ao fragmento $[C_5H_9O_3]^+$ originado do rearranjo McLafferty, seguido pela perda de um grupo acetil (Figura 30). O íon de m/z 265 é atribuído ao fragmento $[C_{17}H_{35}CO]^+$, derivado da cadeia 3-acetoxi-6-hidroxi-octadecanoil, seguido da perda de ácido acético e água. O íon de m/z 199 é atribuído ao fragmento derivado da clivagem α a hidroxila $[C_{13}H_{27}O]^+$. A perda do ácido acético da cadeia lateral gera uma ligação dupla e a clivagem desta ligação gera o íon de m/z 241 $[C_{16}H_{33}O]^+$. O íon de m/z 323 é atribuído ao grupo 3-acetoxi-octadecanoil, $[C_{20}H_{35}O_3]^+$.



Figura 28. Espectro de massa do composto (3-acetoxi-6-hidroxi-eicosanoil)-acetil-glicerol, 55

A caracterização do composto (3-acetoxi-6-hidroxi-eicosanoil)-acetil-glicerol, 55 (Figura 28), foi sugerida pela presença dos íons de m/z 117, 227, 269, 291 e 351. Os íons apresentam o mesmo padrão de fragmentação proposto para o (3-acetoxi-6-hidroxi-octadecanoil)-acetil-glicerol, 53 (Figura 27), com vinte oito daltons a mais nos íons derivado da cadeia lateral (227, 269, 291 e 351), o que sugere a presença de mais dois carbonos na cadeia lateral.

II.3.3.7 Obtenção do 1-oleoil-2,3-diacetil-glicerol 8



Finalmente foi realizada a acetilação do 3-oleoil-glicerol 6 com excesso de anidrido acético obtendo o produto 1,2-diacetil-3-oleoil-glicerol 8 com rendimento de 96%.

O espectro de RMN de ^1H (E35) para o composto apresentou dois singletos em δ 2.08 e δ 2.09ppm atribuídos aos prótons das duas metilas dos grupos acetilas. Os multipletos em δ 4.15, δ 4.29 e δ 5.26 foram atribuídos aos prótons H-3, H-1 e H-2, respectivamente. Observou-se também nesta molécula a desproteção sofrida pelo próton H-1, com a substituição do grupo hidroxila pelo acetil.

No espectro de RMN de ^{13}C (E36 e E37) foram atribuídos os sinais com em δ 20.7 e δ 20.9 para os carbonos das metilas dos dois grupos acetila. Os sinais em δ 61.9, δ 62.3 e δ 69.1 foram atribuídos para os carbonos C-1, C-3 e C-2, respectivamente, os sinais em δ 170.1 e δ 170.5 foram atribuídas aos carbonos das carbonilas acetilicas enquanto o sinal em δ 173.3 foi atribuído a carbonila C-1'.

O espectro de IV (E34) apresentou uma banda forte em 2926cm^{-1} característica de estiramento C-H e outra banda forte em 1749cm^{-1} estiramento de C=O.

O espectro de massas de alta resolução (E38) do composto **8** apresenta como principais íons de m/z : 380.2835 ($\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4^+$, 10.5%), 265.2385 ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}$, 19%), 264.2316 ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}$, 25%) e 159.0498 ($\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_4$, 100%). Onde o fragmento de m/z 380.2835 equivale a perda de H_2O e CH_3OOH , o fragmento de m/z 265.2385 é originado da mesma forma que o do composto **7**, ou seja deriva da cadeia do ácido oleico e o íon de m/z 159.0498 é originado do rearranjo de McLafferty seguido pela perda de um radical acetil.

A análise por CG/EM revelou que este composto apresenta padrão de fragmentação (Figura 29) semelhante ao de compostos encontrado no óleo floral de *O. pubes* (Figura 18). O índice de retenção calculado para o composto **8** foi $\text{IR} = 2897$.

O espectro de massas apresentou os íons de m/z : 380 ($\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4^+$, 2%), 265 ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}$, 4%), 159 ($\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_4$, 50%) e 43 ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$, 100%). A partir destes íons foi proposta a fragmentação para este composto onde o fragmento de m/z 380 equivale a perda de H_2O e CH_3OOH , os fragmentos de m/z 265 e 43 é originado da mesma forma que o do composto **7**, ou seja deriva da cadeia do ácido oleico e do ácido acético respectivamente. O íon de m/z 159 é originado do rearranjo de McLafferty seguido pela perda de um radical acetil.

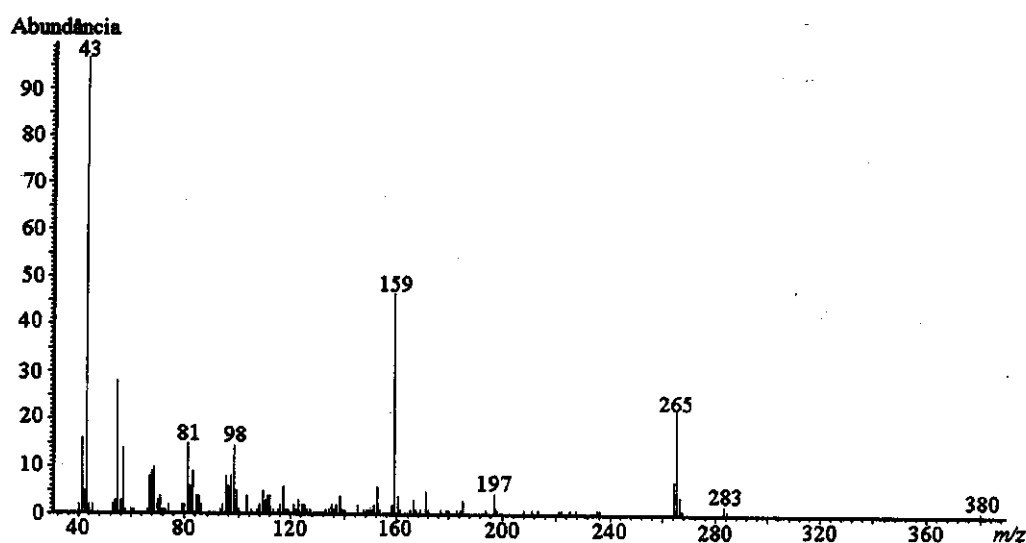


Figura 18. Espectro de massa do composto octadecenoil-diacetil-glicerol, 52

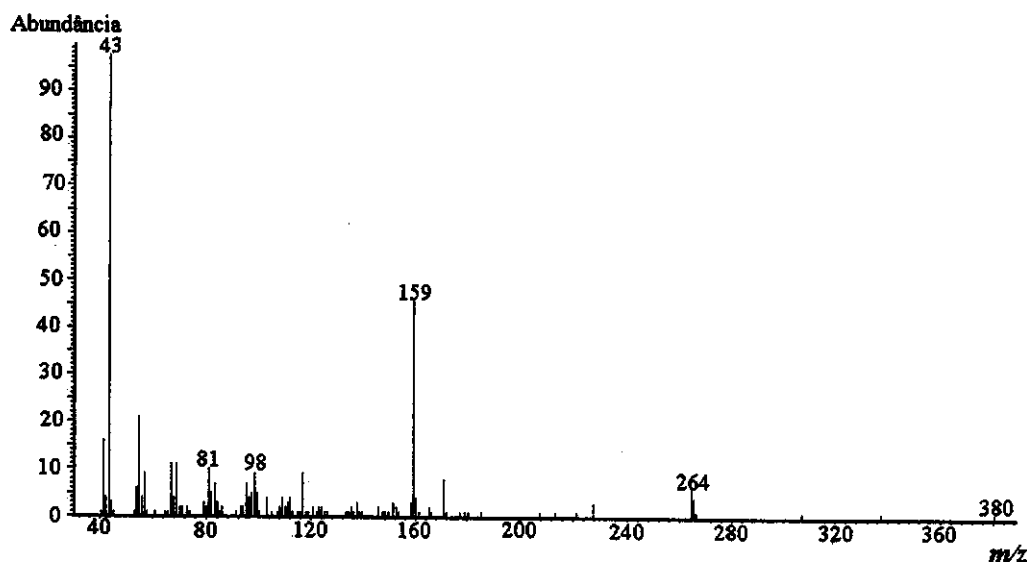


Figura 29. Espectro de massa do composto 1, 2-diacetil-3-oleoil-glicerol (8)

O espectro de massas do composto 1, 2-diacetil-3-oleoil-glicerol (Figura 29) não é igual ao espectro do éster de glicerila encontrado nos óleos sugerido ser o 1, 2-diacetil-3-octadecenoil-glicerol (Figura 18) pois os espectros apesar de apresentarem mesmo padrão de fragmentação, alguns íons como m/z 265 ($[RCO]^+$) e m/z 264 ($[RCO-1]^+$) apresentam intensidades diferentes nos dois espectros. Segundo Leonhardt *et. al.* (1983) a intensidade de muitos fragmentos de massa variam com a variação da posição da ligação dupla na cadeia. A coinjeção deste padrão com o óleo de *O. pubes* mostrou não se tratar do mesmo éster de glicerila, pois apresentam tempos de

retenção variando aproximadamente de 1 minuto. Estes resultados sugerem que é possível que a cadeia lateral do éster de glicerila do óleo tenha 18 carbonos e uma insaturação situada em posição diferente. Para identificar a posição da ligação dupla deste produto natural realizou-se uma reação com dissulfeto de dimetila.

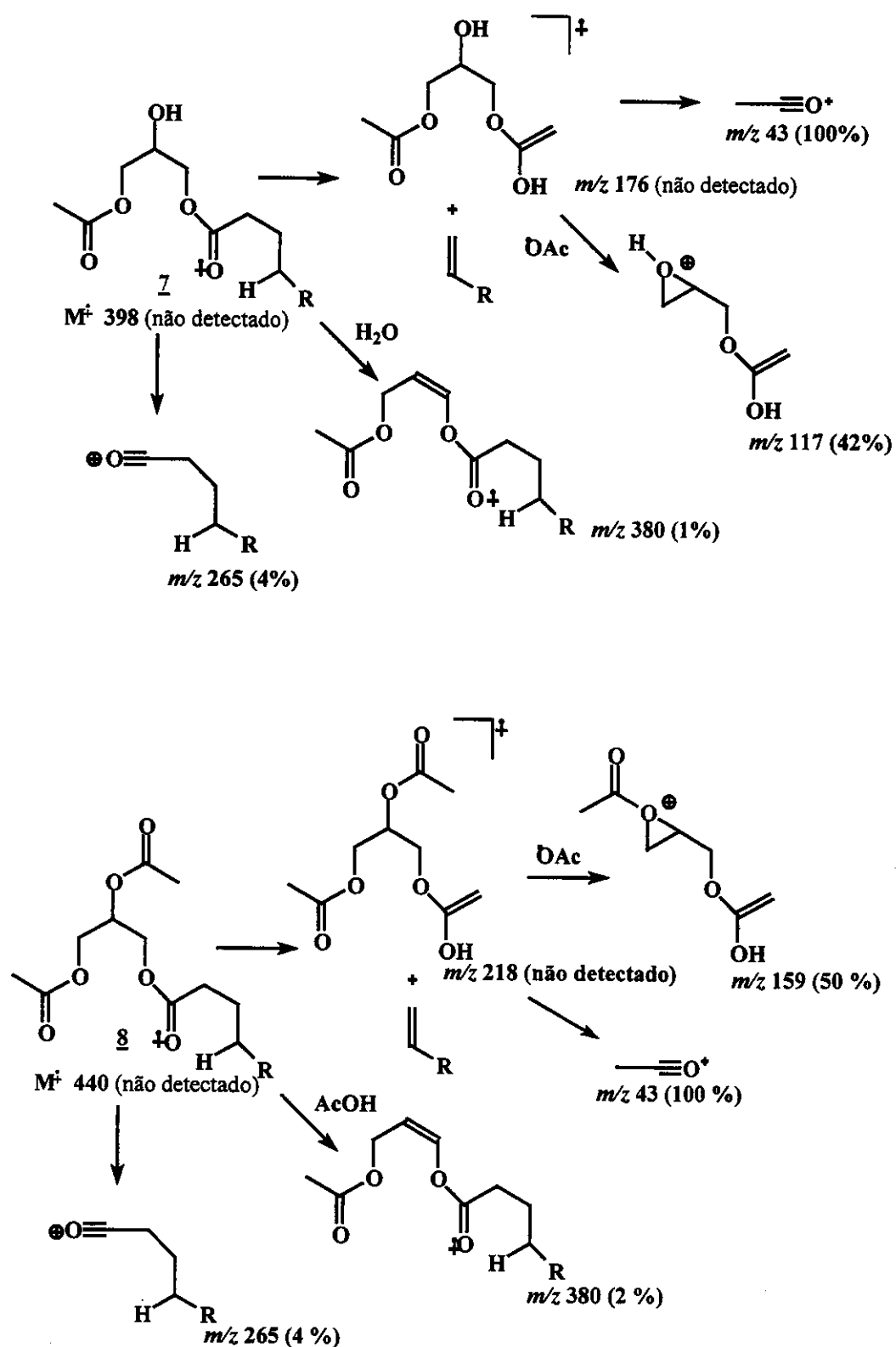
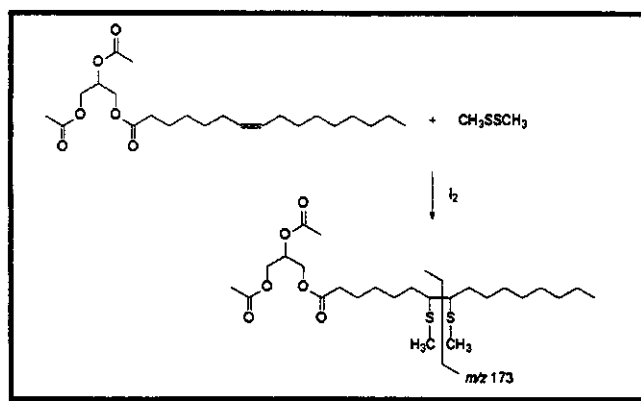


Figura 30. Proposta de fragmentação para os compostos 7 e 8

II.3.4 Reação com dissulfeto de dimetila(DMDS) para localizar a posição da ligação dupla

Afim de localizar a posição da ligação dupla na cadeia lateral do composto octadecanoil-diacetil-glicerol, **52**, encontrado no óleo *O. pubes* foi realizada reação com DMDS. A reação com DMDS é uma reação de adição do dissulfeto de dimetila a ligação dupla utilizando iodo como catalizador. Esta adição é estereoespecífica possuindo os isômeros *cis* e *trans* sinais distintos em CG. O produto desta reação apresenta índice de retenção maior que o composto não derivatizado, sendo esta diferença de aproximadamente 580 a 750 unidades. O índice de retenção do derivado *cis* é de 15 a 40 unidades menor que o mesmos composto *trans*. O espectro de massas do composto derivatizado apresenta íons intensos correspondentes a clivagem entre os dois grupos metiltiol. (Leonhardt e DeVilbiss, 1985).

A reação foi realizada primeiro com o padrão sintético, **8**, para avaliar a viabilidade desta metodologia. A análise do produto da micro-reação por CG/EM mostrou a formação de dois sinais no cromatograma, o primeiro referente ao padrão que não reagiu e outro 12,895 minutos após o do padrão. A presença do íon m/z 173 no espectro de massas deste composto de maior tempo de retenção indica a adição de DMDS à ligação dupla em C-9 (Esquema. 3) como esperado.



Esquema. 3. Adição de dissulfeto de dimetila(DMDS) a ligação dupla

A partir do sucesso desta primeira análise, realizou-se a reação com o óleo de *O. pubes*. Neste caso, também foi observado a formação de um produto derivatizado possuindo tempo de

retenção 13,642 minutos (IR=3569) maior que o tempo de retenção do éster de glicerila do óleo (IR=2973), sendo a diferença entre os índices de retenção de 596 unidades.

A presença do íon m/z 257 no espectro de massas do produto indica uma ligação dupla na posição C-3 da cadeia lateral (Figura 31).

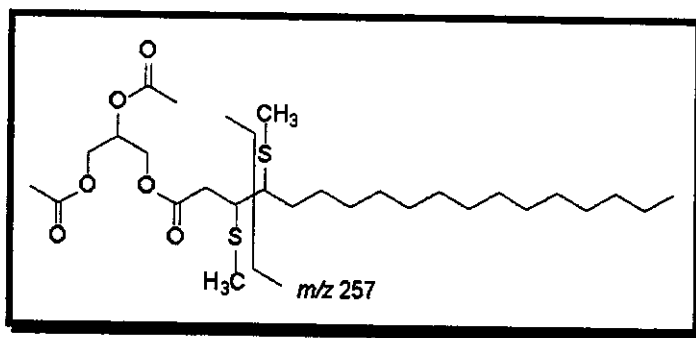


Figura 31. Substância derivatizada encontrada no óleo de *O. pubes*

Com base nos estudos de Leonhardt e DeVilbiss (1985) o aumento no intervalo entre o tempo de retenção referente ao éster presente no óleo e ao éster do óleo derivatizado (13,642 minutos) em relação ao intervalo do padrão-sintético e padrão derivatizado (12,895 minutos) foi atribuído a presença de uma ligação dupla, no éster do óleo, com configuração *E*.

II.3.5 Análise de RMN dos óleos florais de *O. hookeri* e *O. pubes*

Os dados de espectrometria de massas permitiram sugerir que os compostos majoritários (diacilglicerois) presentes no óleo floral de *O. hookeri* com fragmentos de m/z 117 (63%) e 159 (35%) em seus espectros de massas (Figuras 19 e 20), são compatíveis com substâncias do tipo 1-acil-2-acetil-glicerol (Vogel, 1974, Esquema 1). Por outro lado, os espectros de massas dos composto majoritários (Figuras, 26, 27 e 28) do óleo de *O. pubes*, apresentaram espectros de massas com predominância do íon de m/z 117 (65%) e baixa abundância do íon de m/z 159 (imperceptível), sendo desta forma semelhante ao padrão sintético **7**, que apresenta substituição 1-acil-3-acetil-glicerol. Segundo Vogel (1974) os íons de m/z 117 e 159 são derivados do resíduo glicerol. Portanto com base nestes resultados foi sugerido que uma alteração na posição do grupo acetil que esterifica o glicerol poderia justificar a mudança no comportamento do seus espectros de massas.

O espectro de RMN de ^1H do óleo de *O. pubes* e *O. hookeri* foi adquirido com o intuito de identificar a posição do grupo acetoxi na cadeia lateral derivada do ácido graxo. Este espectro mostrou-se inesperadamente muito simples, pois se esperaria uma maior complexidade já que se tratava de uma mistura.

A posição do grupo acetoxi foi identificada a partir da obtenção do espectro de RMN de ^1H do óleo de *O. pubes* (Espectro E41) e *O. hookeri* (Espectro E39), onde foi observado a presença de um sinal em 5.20 ppm atribuído ao próton H-3 do resíduo do ácido graxo 3-acetoxi-substituído e ao sinal em 2.04 ppm atribuído aos prótons da metila do grupo 3-acetoxi, ambas atribuições estão baseadas na identificação de óleos florais de Scrophulareaceae e Krameriaceae (Vogel, 1974, Seigler *et al.* 1978).

A análise do mapa de contornos do RMN de 2D COSY (H, H) do óleo de *O. pubes* (E44) e *O. hookeri* (E40) permitiu identificar vários sistemas de spins (Figura 32) caracterizados para os componentes majoritários.

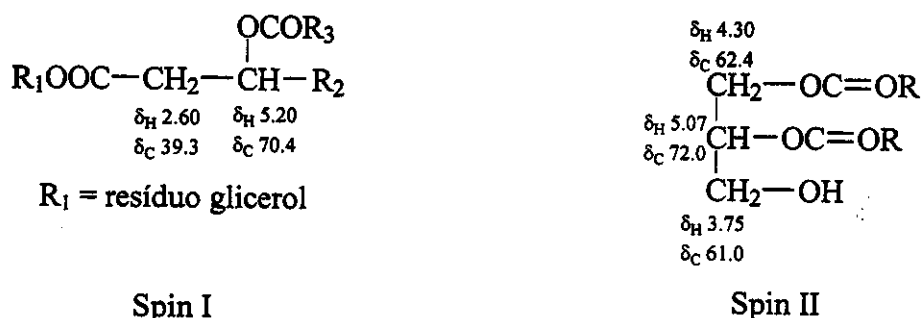


Figura 32. Sistema de Spin I e II - Dados de correlações homonuclear de ^1H , ^1H (COSY) para os óleos florais de *O. pubes* (E44) e *O. hookeri* (E40) e heteronuclear de ^1H , ^{13}C a uma ligação (HSQC) obtidos por RMN de 2D, para o óleo floral de *O. pubes* (E45)

A análise do sistema de spin I pelo sinal múltiplo em δ 2.60 mostra que o mesmo tem correlação com o sinal múltiplo em δ 5.20 os quais se relacionam heteronuclearmente (HSQC) com CH e CH₂ (Figura 32). Confirmando assim, que o sistema de spins I pertence aos grupos 3-acetoxi da cadeia lateral.

O sistema de spins II, onde o sinal múltiplo em δ 5.07 correspondente ao CHOAcil, apresenta correlação com o sinal múltiplo em δ 4.30, correspondente ao metilenos CH₂Oacil, e com o sinal múltiplo em δ 3.75 correspondente ao metileno, CH₂OH. Estas correlações são confirmadas pela correlação heteronuclear, por uma ligação, no mapa de contornos HSQC (Figura 32).

Este último resultado é intrigante pois os compostos majoritários dos óleos de *O. pubes* e *O. hookeri* apresentam sinais, referentes à substituição no resíduo do glicerol, no espectro de RMN de ^1H que indicam o mesmo tipo de substituição, ou seja 1,2-diacil-glicerol, diferentes do padrão sintético, 7 (Espectro E30). Segundo a fragmentação (Esquema 1, página 53) o tipo de substituição, 1,2-diacil-glicerol, pode gerar tanto o íon de m/z 117 quanto o íon de m/z 159. Desta forma, se os compostos majoritários destes dois óleos apresentam o mesmo tipo de substituição, mas padrões de fragmentação diferentes com relação aos íons de m/z 117 e 159. Uma justificativa para este fato seria a posição relativa dos grupos acetil e acil que podem estar posição relativa 1 ou 2 do glicerol.

Tabela 8. Composição química do óleo de *Oncidium pubes*

Substância	IR _a	IR _b	Abund. Relativa (%)	Método de identificação
Hexadecanoato de metila (50)	1974	-	1.9	EM
* (3-acetoxi-octadecanoil)- acetil-glicerol (51) / Figura 26	# 2910	-	33.2	EM
* octadecenoil-diacetil-glicerol (52) / Figura 18	2973	-	4.7	EM
* (3-acetoxi-6-hidroxi-octadecanoil)- acetil-glicerol (53) / Figura 27	3097	-	22,6	EM
* (3-acetoxi-6-hidroxi-octadecenoil)- diacetil-glicerol (54) / E46	3146	-	5.9	EM
* (3-acetoxi-6-hidroxi-eicosanoil)- acetil-glicerol (55) / Figura 28	# 3257	-	3.4	EM
Identificados	-	-	71,6	-

Óleo metilado com diazometano, por isso o hexadecanoato de metila (50) é derivado do ácido hexanóico, IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); EM- Espectro de Massas; * Estrutura sugerida a partir do estudo de seu espectro de massas; # - Valor estimado a partir da equação da reta;

Tabela 9. Composição química do óleo de *Oncidium truncatum*

Substância	IR [#]	IR _b	Abund. Relativa (%)	Método de identificação
acetil-glicerol (56) / Figura 21	# 1123	-	9,0	EM
1,2-diacetil-glicerol (57) / Figura 23	# 1251	-	1,4	EM
1,2,3-triacetil-glicerol (58)	# 1435	-	5,0	EM
Tetradecanal (59)	# 1765	-	0,2	EM
1-heptadeceno (60)	# 1895	-	0,2	EM
Pentadecanal (61)	# 1998	-	6,7	EM
9,12-Octadecadienal (62)	# 2175	-	0,8	EM
17-octadecenal (63)	# 2400	-	1,0	EM
* (3-acetoxi-octadecanoil)- acetil-glicerol (51) / Figura 26	# 2910	-	14,9	EM
* octadecenoil-diacetil-glicerol (52) / Figura 18	# 2973	-	12,1	EM
* (3-acetoxi-6-hidroxi-octadecanoil)- acetil-glicerol (53) / Figura 27	# 3097	-	12,8	EM
* (3-acetoxi-6-hidroxi-eicosanoil)- acetil-glicerol (55) / Figura 28	# 3257	-	6,3	EM
Identificados	-	-	70,4	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); EM- Espectro de Massas; * Estrutura sugerida a partir do estudo de seu espectro de massas; IR[#] - # Valor estimado a partir da equação da reta

Tabela 10. Composição química do óleo de *Oncidium hookeri*

Substância	IR _a	IR _b	Abund. Relativa (%)	Método de identificação
1, 3-diacetil-glicerol (57)	1251	-	t	EM, CP
Hexacosano (64)	2600	2600	t	IR, EM
Heptacosano (65)	2700	2700	t	IR, EM
* (3-acetoxi-octadecanoil)-acetil- glicerol (66) / E47	2889		2,2	EM
* (3-acetoxi-eicosanoil)-acetil-glicerol (67) / E48	3094		13,7	EM
* eicosenoil- diacetil -glicerol (68) / E49	3135		12,8	EM
* (3-acetoxi-eicosenoil)- acetil-glicerol (69) / Figura 19	3365		27,3	EM
* (3-acetoxi-docosenoil)-acetil-glicerol (70) / Figura 20	3565		5,2	EM
Identificados	-	-	61,2	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); IR- Índice de Retenção (comparação do Índice de Retenção calculado com o Índice de Retenção da literatura);

EM- Espectro de Massas; CP – Coinjeção de Padrão; * Estrutura sugerida a partir do estudo de seu espectro de massas; E48 – Espectro 48 (ver espectros)

Tabela 11. Composição química do óleo de *Oncidium praetextum*

<i>Substância</i>	<i>IR_a</i>	<i>IR_b</i>	<i>Abund. Relativa (%)</i>	<i>Método de identificação</i>
α -copaeno (71)	1375	1372	t	IR, EM
Ácido hexadecanóico (72)	1974	-	4,7	EM
Ácido linoléico (73)	2050	-	8,1	EM
Tricosano (74)	2300	2300	6,2	IR, EM
Tetracosano (75)	2400	2400	3,7	IR, EM
Pentacosano (76)	2500	2500	3,9	IR, EM
Hexacosano (64)	2600	2600	3,4	IR, EM
Nonacosano (77)	2900	2900	3,6	IR, EM
Triacotano (78)	3000	3000	2,7	IR, EM
Heneitriacotano (79)	3100	3100	2,8	IR, EM
Tocoferol (80)	3157	-	1,1	EM
* (3-acetoxi-eicosenoil)- acetil-glicerol (81) / E50	# 3205	-	1,5	EM
* (3-acetoxi-eicosenoil)- acetil-glicerol (69) / Figura 19	# 3365	-	9,2	EM
* (3-acetoxi-eicosenoil)-diacetil-glicerol (82) / E51	# 3435	-	1,6	EM
Identificados	-	-	52,5	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); IR- Índice de Retenção (comparação do Índice de Retenção calculado com o Índice de Retenção da literatura); EM- Espectro de Massas (Comparação do Espectro de Massas obtido com o espectro adquirido na biblioteca Wiley / 270 mil compostos); t – traço; * Estrutura sugerida a partir do estudo de seu espectro de massas; # Valor estimado a partir da equação da reta; E50 – Espectro 50 (ver espectros)

ÓLEOS FLORAIS

Tabela 12. Composição química do óleo de *Oncidium varicosum*

Substância	IR _a	IR _b	Abund. Relativa (%)	Método de identificação
Ácido hexadecanóico (71)	1974	-	29,7	EM
Hexadecanoato de etila (83)	1996	1993	3,4	EM
Ácido linoléico (73)	2050	-	3,5	EM
Tricosano (74)	2300	2300	1,3	IR, EM
Heptacosano (65)	2700	2700	2,0	IR, EM
Octacosano (84)	2800	2800	0,9	IR, EM
Nonacosano (77)	2900	2900	6,1	IR, EM
Triacotano (78)	3000	3000	1,4	IR, EM
Heneitriacotano (79)	3100	3100	3,3	IR, EM
Tocoferol (80)	3141	-	3,4	EM
Stigmasterol (85)	3232	-	4,7	EM
Clionasterol (86)	3287	-	15,9	EM
* (3-acetoxi-eicosenoil)-diacetil-glicerol (82) / E51	# 3435	-	6,8	EM
Identificados	-	-	82,5	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); IR- Índice de Retenção (comparação do Índice de Retenção calculado com o Índice de Retenção da literatura);

EM- Espectro de Massas (Comparação do Espectro de Massas obtido com o espectro adquirido na biblioteca Wiley / 270 mil compostos); * Estrutura sugerida a partir do estudo de seu espectro de massas; # Valor estimado a partir da equação da reta; E51 - Espectro 51 (ver espectros)

Tabela 13. Composição química do óleo de *Oncidium pumilum*

Substância	IR _a	IR _b	Abund. Relativa (%)	Método de identificação
acetil-glicerol (56)	1123	-	t	EM
Indol (87)	# 1263	1288	t	EM
α -cubebeno (88)	1352	1351	1,6	IR, EM
α -copaeno (71)	1372	1376	t	IR, EM
β -cubebeno (89)	1384	1390	2,6	IR, EM
<i>Trans</i> - β -cariofileno (90)	1420	1418	0,6	IR, EM
<i>Cis</i> - 4(14),5-dieno- Murola (91)	1451	-	1,9	IR, EM
Epi-cubebol (92)	1494	1493	2,7	IR, EM
<i>E, E</i> - α -farneseno (93)	1509	1508	3,0	IR, EM
Dodecanoato de metila (94)	# 1531	1525	10,5	EM
Elemicina (95)	1559	1554	1,6	IR, EM
Globulol (96)	1587	1583	t	IR, EM
Cubenol (97)	1646	1642	1,1	IR, EM
Cinamato de butila (98)	1678	-	0,7	IR, EM
2-pentadecanona (99)	1704	-	3,4	EM
(<i>E, E</i>)-farnesol (100)	1727	1722	t	IR, EM
tetradecanoato de metila (101)	1827	1726	3,5	EM
Acetato de farnesila (102)	1841	1843	t	IR, EM
2-heptadecanona (103)	1904	-	5,7	EM
2-Acetoxi-heptadecano (104)	# 2011	-	1,8	EM
8,11-Octadecanoato de metila (105)	# 2098	-	5,2	EM
Octadecanoato de metila (106)	2102	2128	0,6	EM
2-eicosanona (107)	# 2240		8,2	EM
Pentacosano (76)	2500	2500	9,8	IR, EM
Heptacosano (65)	2700	2700	13,0	IR, EM
Nonacosano (77)	2900	2900	3,1	EM
Identificados	-	-	80,6	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); IR- Índice de Retenção (comparação do Índice de Retenção calculado com o Índice de Retenção da literatura);

EM- Espectro de Massas (Comparação do Espectro de Massas obtido com o espectro adquirido na biblioteca Wiley / 270 mil compostos); t - traço; # Valor estimado a partir da equação da reta

Tabela 14. Composição química do óleo de *Gomesa crispa*

Substância	IR _a	IR _b	Abund. Relativa (%)	Método de identificação
α -copaeno (71)	1381	1376	9.0	IR, EM
<i>Trans</i> - β -cariofileno (90)	1426	1418	34.0	IR, EM
β -gurgujeno (108)	1436	1432	21.2	IR, EM
<i>Z</i> - α -bisaboleno (72)	1509	1503	8.3	IR, EM
Eneicosano (109)	2100	2100	21.5	IR, EM
Identificados	-	-	94.0	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); IR- Índice de Retenção (comparação do Índice de Retenção calculado com o Índice de Retenção da literatura);

EM- Espectro de Massas (Comparação do Espectro de Massas obtido com o espectro adquirido na biblioteca Wiley / 270 mil compostos); # Valor estimado a partir da equação da reta

Tabela 15 -Composição química do óleo de *Gomesa recurva*

Substância	IR _a	IR _b	Abund. Relativa (%)	Método de identificação
Ciclosativeno (110)	1366	1367	4,4	IR, EM
α -copaeno (71)	1378	1376	14,3	IR, EM
β -cariofileno (90)	1421	1478	2,5	IR, EM
Eneicosano (109)	2100	2100	36,3	IR, EM
Dodocosano (111)	2200	2200	t	IR, EM
Tricosano (74)	2300	2300	4,0	IR, EM
Tetracosano (75)	2400	2400	3,7	IR, EM
Pentacosano (76)	2500	2500	3,9	IR, EM
Hexacosano (64)	2600	2600	3,5	IR, EM
Heptacosano (65)	2700	2700	2,3	IR, EM
Identificados	-	-	89,2	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); IR- Índice de Retenção (comparação do Índice de Retenção calculado com o Índice de Retenção da literatura);

EM- Espectro de Massas (Comparação do Espectro de Massas obtido com o espectro adquirido na biblioteca Wiley / 270 mil compostos); t - traço

Tabela 16 -Composição química do óleo de *Gomesa* sp.

Substância	IR _a	IR _b	Abund. Relativa (%)	Método de identificação
4-metoxi-acetofenona (112)	1332	1348	t	EM
α-Copaeno (71)	1390	1376	31,7	IR, EM
Vanilina (113)	1408	1391	t	IR, EM
β-Cariofileno (89)	1430	1418	2,4	IR, EM
γ-Muuroleno (114)	1482	1477	t	IR, EM
Germacreno-d (115)	1487	1480	5,9	IR, EM
(E, E)-α-Farneseno (92)	# 1519	1508	1,2	IR, EM
δ-Cadineno (116)	1523	1524	1,6	IR, EM
α-dimetil-α-Ionone (117)	1554	-	3,1	EM
Ác. Tetradecanóico (118)	# 1757	-	1,9	EM
(E, E)-Acetato de farnesila (102)	1832	1843	1,7	IR, EM
Nonadecano (119)	1900	1900	1,3	IR, EM
Ác. Hexadecanóico (72)	1962	-	28,5	EM
Eicosano (120)	2000	2000	1,6	IR, EM
Eineicosano (109)	2100	2100	10,4	IR, EM
Identificados	-	-	91,3	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); IR- Índice de Retenção (comparação do Índice de Retenção calculado com o Índice de Reta da literatura);
 EM- Espectro de Massas (Comparação do Espectro de Massas obtido com o espectro adquirido na biblioteca Wiley / 270 mil compostos); t - traço; # Valor estimado a partir da equação da reta

II.3.7 Estudo das fragrâncias florais de *Oncidium pumilum* e *Gomesa crispa*

Foi verificado a presença de compostos voláteis na composição dos óleos das estruturas elaióforas de *O. pumilum* e em todas as espécies do gênero *Gomesa*. Essas substâncias geralmente são detectadas em fragrâncias florais. Foi então investigada a composição da fragrância floral da espécie de *O. pumilum* e de *Gomesa crispa*, com o intuito de verificar as semelhanças entre a composição química dos óleos florais e das fragrâncias florais.

Vários compostos estão presentes tanto no óleo quanto na fragrância, como a elemicina e o dodecanoato de metila em *O. pumilum* (Tabelas 13 e 17) e o α -copaeno e o β -cariofileno em *G. crispa* (Tabelas 14 e 18), evidenciando portanto, que estas glândulas florais produzem também fragrâncias florais.

Tabela 17- Composição química do fragrância floral de *Oncidium pumilum*

Substância	IR _a	IR _b	Abundância relativa(%)	Método de identificação
Linalol (120)	1102	1098	5,1	IR, EM
Hexanoato de butila (121)	1189	1188	2,7	IR, EM
α -Terpineol (122)	1194	1189	t	IR, EM
2-Undecanona (123)	1294	1291	3,9	IR, EM
Decanoato de metila (124)	# 1324	1326	4,1	IR, EM
Hexanoato de hexila (125)	1385	1383	1,0	IR, EM
<i>Trans</i> -Cariofileno (90)	1419	1418	0,8	IR, EM
(<i>E, E</i>)- α -Farneseno (82)	1504	1508	9,0	IR, EM
Dodecanoato de metila (100)	1526	1525	42,0	EM
Elemicina (95)	1547	1554	6,3	IR, EM
Cinamato de butila (98)	1676	-	t	EM
2-pentadecanona (99)	1697	-	3,5	EM
(<i>E, E</i>)-Farnesol (100)	1714	1722	0,9	IR, EM
Tetradecanoato metila (101)	1724	1726	t	IR, EM
(<i>E, E</i>)-Acetato de farnesila (102)	1832	1842	2,0	IR, EM
2-Heptadecanona (103)	# 1898	-	1,3	EM
Identificados	-	-	82,6	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); IR- Índice de Retenção (comparação do Índice de Retenção calculado com o Índice de Retenção da literatura);

EM- Espectro de Massas (Comparação do Espectro de Massas obtido com o espectro adquirido na biblioteca Wiley / 270 mil compostos); t - traço; # Valor estimado a partir da equação da reta

Tabela 18 - Composição química do fragrância floral de *Gomesa crispa*

Substância	IR _a	IR _b	Abundância relativa(%)	Método de identificação
α-Pineno (126)	# 0948	0939	t	IR, EM
β-Mirceno (127)	# 0994	0991	t	IR, EM
Decano (128)	1000	1000	t	IR, EM
Limoneno (129)	# 1030	1031	t	IR, EM
Trans-β-ocimene (130)	1046	1050	8.5	IR, EM
orto-Guaicol (131)	1089	1086	t	IR, EM
α-cubebeno (132)	1349	1350	t	IR, EM
Cicloasativeno (109)	1367	1368	t	IR, EM
α-copaeno (71)	1378	1376	24.1	IR, EM
Trans-β-cariofileno (90)	1424	1418	24.5	IR, EM
Diidro-β-ionone (133)	1438	-	5.2	EM
Allo-aromadendreno (134)	1465	1461	t	IR, EM
β-ionona (135)	1488	1485	t	IR, EM
E, E-α-farneseno (93)	1509	1508	16.2	IR, EM
δ-cadineno (116)	1528	1524	2.3	IR, EM
Identificados	-	-	80,8	-

IR_a-Índice de Retenção calculado (Van den Dool, 1963); IR_b-Índice de Retenção da literatura (Adams, 1995); IR- Índice de Retenção (comparação do Índice de Retenção calculado com o Índice de Retenção da literatura);

EM- Espectro de Massas (Comparação do Espectro de Massas obtido com o espectro adquirido na biblioteca Wiley / 270 mil compostos); t - traço; # Valor estimado a partir da equação da reta

II.3.7 Conclusões do Estudo sobre Óleos Florais

Nas análises dos óleos florais foi observado que as espécies *O. pubes*, *O. truncatum*, *O. hookeri*, *O. praetextum* e *O. varicosum* produzem, em suas estruturas elaióforas, compostos que são necessários na dieta alimentar de insetos como os ácidos graxos, ésteres de glicerila, esteróides e o α -tocoferol. Muito destes compostos foram encontrados também em óleos de estruturas elaióforas de flores polinizadas por abelhas coletoras de óleos florais.

Dentre as espécies de *Oncidium* estudadas o óleo de *O. pumilum* (Tab. 13) mostrou-se distinto dos demais, pois apresentou maior abundância de sesquiterpenos, ésteres, hidrocarbonetos e cetonas. Estes compostos não são necessários na dieta de insetos. No entanto, abelhas coletoras de óleos também coletam de flores, óleos para construção de seu ninho, afim de impermeabiliza-lo ou protege-lo contra fungos e bactérias (Simpson & Neff, 1981). Foi observado em um estudo que o ninho da abelha *Macropis nuda* (Melittidae) apresenta em sua composição as cetonas 2-pentadecanona e 2-heptadecanona, estando estas cetonas também presentes nos óleos de *O. pumilum*, sendo indício de que este óleo possa ser coletado por abelhas para a construção de seu ninho.

As espécies de *Oncidium* podem ser divididas em três grupos de acordo com a similaridade dos constituintes presentes nos óleos florais: O grupo 1 é composto pelo *O. pubes*, *O. truncatum* e *O. hookeri* devido a alta abundância de ésteres de glicerila em seus óleos florais. O grupo 2 é formado por *O. praetextum* e *O. varicosum* devido a baixa abundância de ésteres de glicerila e a presença do α -tocoferol. O grupo 3 - é composto apenas por *O. pumilum* pois esta espécie mostrou-se muito distinta das demais espécies de *Oncidium* analisadas, por não apresentar ácidos graxos livres, esteróides, ou ésteres de glicerila esterificados com um ácido graxo cadeia longa.

Os óleos florais das espécies do gênero *Gomesa* (Orchidaceae) apresentaram poucos constituintes, dentre os quais, sesquiterpenos, ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeia normal. Não foi observado nestas espécies de *Gomesa* compostos derivados do glicerol. Estes óleos podem ser coletados por outro tipo de polinizador ou utilizado de outra forma pelo polinizador, ou pode ainda ser usado em processos metabólicos pela flor, sugerindo portanto a necessidade de mais estudos com este gênero.

Os padrões sintéticos auxiliaram a identificação e sugestões estruturais dos vários ésteres de glicerila encontrados nos óleos florais de *Oncidium*. A microreação com dissulfeto de dimetila mostrou-se viável para detectar a posição da ligação dupla em ésteres de glicerila como o encontrado no óleo floral de *O. pubes*.

O espectro de RMN dos óleos florais de *O. pubes* e *O. hookeri* mostrou-se muito simples, viabilizando por isto, não só identificação da posição do grupo acetoxi na cadeia lateral, mas também o tipo de substituição na porção do glicerol.

Vários compostos estão presentes tanto no óleo floral quanto na fragrância floral de *O. pumilum* (Tabelas 13 e 17) e de *G. crispa* (Tabelas 14 e 18), evidenciando portanto, que estas glândulas florais produzem também fragrâncias florais.

CONCLUSÃO FINAL

3. Conclusão Final

No transcorrer do presente trabalho foi possível estudar as fragrâncias das espécies *Stanhopea lietzei*, *Stanhopea insignis*, *Polystachya estrellensis*, *Psilochilus modestus*, *Epidendrum secundum*, *Oncidium pumillum* e *Gomesa crispa* pela técnica de “headspace dinâmico”. Foi possível observar que existem uma diferença na composição química da fragrância de flores polinizadas por abelhas e por borboletas, pois as fragrâncias de flores polinizadas por abelhas apresentam em sua composição substâncias aromáticas e monoterpênicas, enquanto a espécie polinizada por borboletas apresenta em sua composição compostos sesquiterpênicos, não sendo detectado a presença nem de compostos aromáticos nem monoterpênicos.

A presença de compostos coletados por insetos nos óleos de *O. pubes*, *O. truncatum*, *O. hookeri*, *O. varicosum*, *O. enderianum* e *O. pumillum* sugere que estes óleos possam ser coletados também por abelhas coletoras de óleo. Sendo assim, estes óleos seriam a recompensa e portanto, a estratégia da flor para atrair o polinizador, não podendo estas espécies serem classificadas como flores de engano como sugerido para várias espécies deste gênero.

Os óleos florais das espécies do gênero *Gomesa* (Orchidaceae) apresentaram poucos constituintes, dentre os quais, sesquiterpenoides, ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeia normal. Não foi observado nestas espécies de *Gomesa* compostos derivados do glicerol. Estes óleo podem ser coletado por outro tipo de polinizador ou utilizado de outra forma pelo polinizador, ou pode ainda ser usado em processos metabólicos pela flor, sugerindo portanto a necessidade de mais estudos com este gênero.

A estrutura produtora do óleo floral em *O. pumillum* e *G. crispa* também é a produtora da fragrância, já que os vários compostos foram detectados tanto na análise do óleo floral quanto na análise da fragrância floral.

A síntese dos padrões foi de grande importância para validar as sugestões estruturais dos compostos encontrados nos óleos dos vários *Oncidium*. Observamos também a viabilidade da microreação com dissulfeto de dimetila para detectar a posição da ligação dupla em ésteres de glicerila como o encontrado no óleo floral de *O. pubes*.

É importante salientar que os padrões 4, 6, 7 e 8 foram obtidos a partir de composto enantiomericamente puro (D-manitol), sendo assim estes auxiliarão a determinação da configuração absoluta dos componentes dos óleos florais de *Oncidium*, em etapas futuras desta linha de pesquisa.

Os diacilgliceróis encontrados majoritariamente em três das seis espécies de *Oncidium* são particularmente interessantes. Diacilgliceróis, diferente dos monoacilgliceróis e triacilgliceróis, apresenta a propriedade de ativar a proteína quinase C e por isto, vem recebendo grande atenção nos últimos tempos (McNamara *et. al.*, 1984, Bijleveld *et. al.*, 1988, Roldan & Harrison, 1992, KaWanda, *et. al.*, 1993). A proteína quinase C participa de forma efetiva no processo de transmissão de sinais extra celulares para dentro da célula, como realizados por certos hormônios, neurotransmissores, alguns fatores de crescimento e outras substâncias biologicamente ativas (Kishi & Rando, 1998, Nishizuka, 1992, Nishizuka, 1986). Por isto, tal atividade desperta a curiosidade acerca da utilidade destes óleos para abelhas polinizadoras, ou seja, se estes óleos possuem outras funções além da construção de ninhos ou de fonte alimentar.

PARTE EXPERIMENTAL

4. Parte Experimental

4.1 Materiais e Métodos:

♦ Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analiticamente puros e ou indicados pelos fabricantes, para uso em síntese orgânica. Sempre que houve necessidade de reagentes e solventes com um grau maior de pureza, foram utilizados os métodos gerais de purificação descritos na literatura (Perrin *et al.* 1980)

♦ Os procedimentos experimentais aqui descritos referem-se aos melhores resultados obtidos em laboratório.

♦ As reações sensíveis à umidade foram realizadas em atmosfera de argônio seco e utilizando vidrarias previamente secas em estufa a 180°C. A secagem do argônio foi realizada, passando o gás, inicialmente, por um condensador, resfriado a -78°C, em seguida, através de cinco frascos de adsorção, conectados entre si e contendo, respectivamente: sílica gel ativada, cloreto de cálcio anidro, peneira molecular de 4 Å (4-8 mesh), pentóxido de fósforo e peneira molecular de 4 Å, respectivamente.

♦ As cromatografias de adsorção em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas da marca Merck

♦ A determinação da posição de um composto sobre as placas de CCD foram obtidas pulverizando a superfície do adsorvente com uma mistura de *p*-anisaldeído (0,5 mL), ácido acético glacial (50 mL) e ácido sulfúrico concentrado (1 mL). Após a pulverização, as placas eram aquecidas até o aparecimento de manchas coloridas ((Reativos Merck, 1980).

♦ As cromatografias em coluna foram realizadas utilizando sílica gel-60 (0,05-0,20 mm; 70-230 mesh). As dimensões das colunas de vidro e as quantidades de adsorventes utilizadas, variaram de acordo com a quantidade de material cromatografado. A relação entre o material a ser cromatografado e o adsorvente variou de 1:30 até 1:50, respectivamente. As eluições dos compostos da coluna foram obtidas empregando solventes orgânicos em ordem crescente de

polaridade. O controle de pureza das frações era realizado através de C.C.D., sendo reunidas todas aquelas frações que apresentavam semelhanças.

♦ Os compostos sintetizados foram purificados pelos métodos usuais (*i.e.*, cromatografia, cristalização, destilação etc.). Foram considerados puros, quando apresentavam, um único pico por cromatografia em fase gasosa e ou um intervalo de ponto de fusão de no máximo 2°C, quando sólido, ou um ponto de ebulição constante, se líquido.

♦ Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho da firma MicroQuímica, modelo MQAPF-301, com registrador automático de temperatura, acoplado a um microscópio de luz polarizada da firma Carl Zeiss. Os pontos de fusão não sofreram correções.

♦ As rotações ópticas foram determinadas à temperatura ambiente, em um polarímetro da firma Carl Zeiss, modelo Polamat A, com precisão de 0,005°. Para as medições, foram empregadas uma lâmpada de vapor de mercúrio (546 nm), uma cela de vidro de 1 cm de espessura e o clorofórmio, como solvente. Para calcular as rotações específicas $[\alpha]$, a 20°C e em relação ao comprimento de onda da raia D do sódio (589 nm), foram empregadas as seguintes equações, recomendadas pelo fabricante:

$$\alpha'_Z = \alpha_Z^{20} [1 + 0,000143(t - 20)]$$

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha_Z^{20}}{1,17543 \cdot c \cdot l}$$

onde,

- α_z^t = rotação óptica lida no aparelho, a uma temperatura "t" qualquer e no comprimento de onda de 546 nm;
- α_z^{20} = rotação óptica corrigida para a temperatura de 20°C;
- $[\alpha]_D^{20}$ = rotação específica a 20°C, em relação ao comprimento de onda de 589 nm;
- c = concentração da amostra em gramas por mililitros;
- l = comprimento da cela em decímetros.

♦ Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1600-FTIR, com transformada de Fourier. As amostras sólidas foram examinadas em pastilhas de KBr e as líquidas na forma de um filme, entre placas de NaCl. As absorções foram expressas em número de onda (cm^{-1}). Como referência interna foi utilizada a absorção em 1601 cm^{-1} do poliestireno.

♦ Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de 300, 06 MHz e 499.88 MHz, foram obtidos à temperatura ambiente, nos espectrômetros das firmas: Varian (modelo Gemini-300) e Varian (modelo Inova-500). Os deslocamentos químicos foram fornecidos em ppm, utilizando como referências interna o tetrametilsilano ($\delta = 0 \text{ ppm}$). As constantes de acoplamento foram fornecidas em Hertz (Hz). Para as atribuições das multiplicidades dos sinais nos espectros, recorreu-se, quando necessário, às expansões dos mesmos; estas, entretanto, nem sempre são mostradas nas figuras dos respectivos espectros.

♦ Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 desacoplados a 75.46 MHz e 125.69 MHz, foram obtidos à temperatura ambiente, nos espectrômetros das firmas: Varian (modelo Gemini-300) e Varian (modelo Inova-500). Os deslocamentos químicos foram fornecidos em ppm, utilizando o trimetilsilano como referência interna ($\delta = 0 \text{ ppm}$). A interpretação dos dados foi realizada com o auxílio dos espectros de RMN de ^{13}C obtidos pela técnica DEPT a 135° onde: CH_3/CH = sinais positivos, CH_2 = sinal negativo e C_o (quaternário) = sinal de intensidade zero e RMN de ^{13}C DEPT a 90° onde só aparecem os sinais de CH.

♦ As análises por espectrometria de massas das amostras foram obtidas em um espectrômetro da firma Micromass, modelo VG AutoSpec, à 70 eV.

♦ CG/EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, utilizando um cromatógrafo à gás da firma Hewlett Packard (modelo HP-MSD 5890-serie II) acoplado a um detetor de massas do mesmo fabricante (modelo HP-MSD 5970), operado à 70 eV. O cromatógrafo era equipado com colunas capilares de sílica fundida dos tipos: HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Como gás de arraste, foi empregado o hélio. As injeções das amostras líquidas foram da ordem de 1 μ L da solução da mesma, em diclorometano (Fragrância florais) ou acetato de etila (óleos florais).

Para fragrâncias florais:

Programa 1- O programa de temperatura empregado foi o seguinte: $T_i = 50^\circ\text{C}$ (1 min.) $\Rightarrow 4^\circ\text{C/min.} \Rightarrow T_f = 290^\circ\text{C}$ (5 min.), com as temperaturas do injetor e do detetor em 220°C e 290°C , respectivamente.

Para os óleos Florais:

Programa 2- O programa de temperatura empregado foi o seguinte: $T_i = 50^\circ\text{C}$ (1 min.) $\Rightarrow 4^\circ\text{C/min.} \Rightarrow T_f = 290^\circ\text{C}$ (15 min.), com as temperaturas do injetor e do detetor em 240°C e 290°C , respectivamente.

Para o óleo após a reação com dissufeto de dimetila

Programa 3- O programa de temperatura empregado foi o seguinte: $T_i = 50^\circ\text{C}$ (1 min.) $\Rightarrow 4^\circ\text{C/min.} \Rightarrow T_f = 290^\circ\text{C}$ (45 min.), com as temperaturas do injetor e do detetor em 240°C e 290°C , respectivamente.

♦ Os índices de retenção foram calculados a partir da coinjeção da fragrância floral com uma mistura padrão de hidrocarbonetos, C_{11} - C_{30} , sobre as mesmas condições de equipamento descritas acima e com aplicação da equação de Van den Dool e Kratz (1963).

$$IR = [(T_S - T_{Cn-1}) / (T_{Cn} - T_{Cn-1})] \times 100 + 100 \times N \quad (\text{Equação de Dool e Kratz, 1963})$$

Onde:

T_s - Tempo de retenção da substância analisada

T_{Cn-1} - Tempo de retenção do n-alcane que elui antes da substância analisada

T_{Cn} - Tempo de retenção do n-alcane que elui depois da substância analisada

N - Número de carbonos do n-alcane que elui antes da substância analisada

Para algumas substâncias não foi possível calcular o índice de retenção pela equação de Van den Dool devido a ausência de dados (ex. algumas substâncias da fragrância apresentam tempo de retenção inferior ao tempo de retenção do hidrocarboneto undecano- C_{11}). Para estas substâncias o valor do índice de retenção foi estimado a partir da equação da reta, e esta equação foi obtida pelo método matemático de regressão linear utilizando o conjunto dados, índices de retenção e tempos de retenção, das demais substâncias desta fragrância.

Foram utilizadas espécies de *Orchidaceae* coletadas na região sudeste e cultivadas em casa de vegetação no Instituto de Biologia da UNICAMP.

4.2 Obtenção dos óleos florais – Estruturas Elaióforas

A coleta dos óleos das estruturas florais, elaióforos, foi realizada com o auxílio de microscópio, utilizando pequenos tubos capilares que foram introduzidos nos pontos onde os óleos eram exudados. Também foi possível coletar estes óleos com a introdução de pequenas tiras de papel de filtro previamente tratados em soxhlet (acetato de etila). Em seguida os óleos foram extraídos com acetato de etila e concentrados sob fluxo de nitrogênio. As amostras assim obtidas foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Em razão das baixas quantidades de material coletado o método escolhido para identificação dos constituintes foi Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

Tabela 18. Dados sobre as espécies do gênero *Oncidium* e *Gomesa*

Espécies*	Dados da Coleta	Épocas de inflorescências
<i>Oncidium pubes</i>	E. R. Pasarin, 547	Outubro
<i>Oncidium truncatum</i>	R. B. Singer et. al., sn	Janeiro
<i>Oncidium hookeri</i>	R. B. Singer et. al., sn	Abril
<i>Oncidium enderianum</i>	R. B. Singer et. al., sn	Março
<i>Oncidium varicosum</i>	A. D. Faria & E. R. Pasarin, sn	Março
<i>Oncidium pumilum</i>	M. C. E. Amaral & V. Bittrick, sn	Janeiro
<i>Gomesa crispa</i>	E. R. Pasarin, 272	Fevereiro
<i>Gomesa recurva</i>	A. D. Faria et. al., sn	Fevereiro
<i>Gomesa sp.</i>	A. D. Faria et. al., sn	Fevereiro

*Espécies depositadas no herbário da UNICAMP

4.3 Obtenção das Fragrâncias Florais

4.3.1 Análise por injeção de sólidos

As partes da flor, sépala, pétala e labelo, foram retiradas de flores recém coletadas e com o auxílio de pinça, estilete e agulha foram introduzidas separadamente no injetor de sólidos e em seguida injetadas no CG/EM.

4.3.2 Headspace estático- Microextração em fase sólida com as flores na planta

Um tubo de vidro com duas aberturas em extremidades opostas, foi fechada com um septo numa das extremidades e na outra extremidade foi inserida a flor ou inflorescência (planta viva) e fechada com papel alumínio afim de concentrar os voláteis neste ambiente, após 30 minutos foi acoplado ao septo o sistema de microextração em fase sólida contendo a fibra (carboxem) que foi exposta a atmosfera saturada com os voláteis (sistema semelhante - Figura 6). Após 1 hora a fibra foi recolhida e em seguida inserida no equipamento de CG/EM para dessorção e análise dos compostos voláteis que foram adsorvidos pela fibra.

4.3.3 Headspace estático – Microextração em fase sólida com flores coletadas

Em um tubo de vidro foi adicionado 4g de flores recém coletados e 7 mL de água, este sistema foi fechado, mantido sobre agitação e banho de água aquecido a 50°C após 30 minutos o sistema de microextração em fase sólida foi acoplado e a fibra (carboxem) exposta a atmosfera saturada com os voláteis. Após 1 hora a fibra foi recolhida e em seguida inserida no equipamento de CG/EM para dessorção e análise dos compostos voláteis que foram adsorvidos pela fibra.

4.3.4 Headspace dinâmico – Polímero Porapak-Q

Um tubo de vidro (do tamanho aproximado da flor) foi construído com uma abertura para inserir a flor e outra oposta para conectar o tubo de vidro (5cm de comprimento e 0,5 centímetro de diâmetro interno) contendo 30-60mg de porapak-Q 80-100 *mesh* e lã de vidro (ambos previamente tratados com solvente e ativados a 150°C sob vácuo). O ar contendo a fragrância da flor foi arrastado a um fluxo de 500mL/min, por meio de uma bomba operando a pilha num período de 2 a 4 horas. Após este tempo interrompeu-se a sucção e o tubo contendo os compostos adsorvidos foi desconectado do sistema. O processo de dessorção dos voláteis foi realizado utilizando uma pequena quantidade de diclorometano aproximadamente 1,5mL, a remoção do solvente foi realizada utilizando um leve fluxo de nitrogênio ou argônio, até atingir a concentração de aproximadamente 20µL. Simultaneamente a análise dos voláteis foi feita uma análise que mimetizava as condições da análise dos voláteis ou seja foi montado ao mesmo tempo um sistema idêntico e sob as mesmas condições, só que neste sistema não estava presente a flor, a finalidade desta análise foi com o intuito de verificar a presença de possíveis interferentes vindos do ambiente laboratorial em nossa amostra. Em seguida as amostras coletadas foram analisadas por CG/EM.

Tabela 19. Horário de adsorção das fragrâncias florais

Espécies	Horário da extração das fragrâncias (hs)
<i>Stanhopea lietzeii</i>	14:45 – 16:45
<i>Stanhopea insignis</i>	13:45 – 17:30
<i>Polystachya estrellensis</i>	10:00 – 17:30
<i>Psilochilus modestus</i>	13:30 – 18:30
<i>Epidendrum secundum</i>	16:55 – 13:55

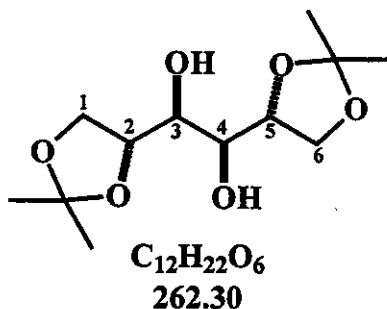
Tabela 20. Dados sobre as espécies *S. lietzeii*, *S. insignis*,
P. estrellensis, *P. modestus* e *E. secundum*

Espécies*	Dados da Coleta	Época de inflorescência
<i>Stanhopea lietzeii</i>	E. R. Pasarin, 88	Janeiro
<i>Stanhopea insignis</i>	E. R. Pasarin, 710	Janeiro
<i>Polystachya estrellensis</i>	E. R. Pasarin, 245	Dezembro
<i>Psilochilus modestus</i>	E. R. Pasarin, 132	Janeiro
<i>Epidendrum secundum</i>	E. R. Pasarin, 190	Setembro

*Espécies depositadas no herbário da UNICAMP

4.4 Síntese de padrões

4.4.1) -1,2:5,6 – Diisopropilideno-D-manitol, **2** (Citó, 1994), (Eibl, 1981), (Schmid & Jerry, 1991)



Tratamento do cloreto de zinco- Em um balão foi adicionado 7.5g de cloreto de zinco úmido e aquecido até fundir sobre bico de Bunsen. O aquecimento foi mantido e com auxílio de uma linha de vácuo reduziu-se a pressão dentro do balão, observou-se imediatamente a formação de uma coloração amarelada, neste instante o vácuo foi interrompido inserindo-se um fluxo de gás seco inerte (N_2), e o balão foi resfriado em dessecador. O cloreto de zinco foi em seguida utilizado na reação.

A uma solução de cloreto de zinco (6,7g, 49,5mmol) em acetona (50 cm^3) adicionou-se D-manitol (5,0g, 27,5mmol) sob atmosfera de nitrogênio, a 0 °C e deixou-se sob agitação por 30 minutos e à temperatura ambiente durante 17 horas. Em seguida adicionou-se clorofórmio (25 cm^3) e solução saturada de NaCl (25 cm^3). A fase aquosa foi extraída com clorofórmio (3 x 20 cm^3), e em seguida fase orgânica foi lavada com solução de hidróxido de amônia a 5% (2 x 50 cm^3) e tratada com sulfato de sódio anidro. A fase clorofórmica foi evaporada até secar (3.6g). Ao resíduo foi adicionado éter de petróleo. A mistura foi aquecida até ebulição durante 40 minutos. O D-manitol que não reagiu, permaneceu insolúvel no éter de petróleo e foi removido por filtração a quente. Com o resfriamento houve cristalização em forma de agulhas brancas e após filtração obteve-se o produto cristalino (2.9g, 40%).

Forma física: Sólido branco

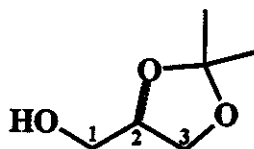
PF: 116,8-118,9 °C (Lit.¹ 118-120 °C)

IV (KBr) $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3310, 2982, 2938, 1068. (E1)

RMN ^1H (499,88 MHz; CDCl_3) δ : 1.39 (6H, s, 2 CH_3); 1.41 (6H, s, 2 CH_3); 2.68 (2H, OH); 3.74 (2H, t, $J = 6,4$ Hz, H-3 e H-4); 3.98 (2H, dd, $J = 5,6$ e $8,4$ Hz, H-1' e H-6'); 4.12 (2H, dd, $J = 5,8$ e $8,1$ Hz, H-1 e H-6); 4.18 (2H, ddd, $J_{1,2}=J_{2,3}=J_{3,4}= 6,4$ Hz, H-2 e H-5). (E2)

RMN ^{13}C (125.69 MHz; CDCl_3) δ : 109.63 (2C, C_0); 76.45 (2C, C-3 e C-4); 71.39 (2C, C-2 e C-5); 66.98 (2C, C-1 e C-6); 25,43 (2C, C-7 e C-8); 26.96 (2C, C-7' e C-8'). (E3), (E4)

4.4.2) - 2,3-O-Isopropilideno-D-glicerol, **3** (Citó, 1994), (Eibl, 1981), (Schmid & Jerry, 1991)



$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$
132.15

A uma suspensão de 1,2:5,6-diisopropilideno-D-manitol (3,0g, 11.4mmol) em solução aquosa de bicarbonato de sódio (5%, 30 cm^3), sob agitação vigorosa, a 0°C, adicionou-se 7 cm^3 de solução de periodato de sódio ($M = 2$ mol em água), gota a gota. A agitação foi mantida durante uma hora a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado etanol (90 cm^3) para precipitar o iodato de sódio, removido do meio reacional por filtração.

O filtrado contendo o 2,3-O-Isopropilideno-gliceraldeído, foi resfriado a 0°C, tratado com boroidreto de sódio (0.85g, 22.88mmol) e mantida sob agitação durante 2 horas. A mistura reacional foi filtrada e o filtrado foi concentrado a um volume de aproximadamente 20mL. Adicionou-se clorofórmio (20 cm^3) e o ácido acético que foi cautelosamente adicionado, a 0°C com agitação, até pH 8. Após 10 minutos, a mistura foi extraída com clorofórmio (6 x 20 cm^3). As fases orgânicas reunidas foram evaporados sob vácuo, fornecendo o álcool bruto (2.9g), o qual foi destilado em aparelho horizontal do tipo "Kugelrohr" a 60 °C (a pressão menor que 10mmHg), obtendo-se um óleo incolor cujo os dados físicos e espectrais são idênticos aos já citados na literatura para o (S)-2,3-O-isopropilideno-D-glicerol (1.9g, 63%).

Forma física: Óleo incolor

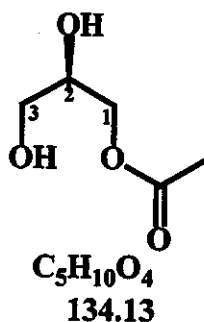
$[\alpha]_D^{20} = +10.9^\circ$ (c. 23.4, MeOH) [Lit.ⁱⁱ. $[\alpha]_D^{20} = -10.9^\circ$ (c. 1, MeOH), correspondente ao enantiômero-oposto-(R)-2,3-O-Isopropilideno-D-glicerol]

IV (filme) $\nu_{\max}$. cm^{-1} : 3422, 2988, 2936, 1075 (E5)

RMN ^1H (499.88 MHz; CDCl_3) δ : 1.38 (3H, s, H-4'), 1.45 (3H, s, H-4), 2,24 (1H, sl, OH), 3.60 (1H, dd, $J = 5.1$ and 11.7 Hz, H-1'), 3.73 (1H, dd, $J = 3.7$ and 11.7 Hz H-1), 3.81 (1H, dd, $J = 6.6$ e 8.4 Hz H-3'), 4.04 (1H, dd, $J = 6.6$ e 8.1 Hz H-3), 4.24 (m, 1H, H-2). (E6)

RMN ^{13}C (125.69 MHz; CDCl_3) δ : 26.64 (1C, C-4'), 25.21 (1C, C-4), 62.95 (1C, C-1), 65.65 (1C, C-3), 76.12 (1C, C-2), 109.37 (1C, C₀). (E7), (E8)

4.4.3) - 1-Acetil- glicerol, 4 (Eibl & Woolley, 1986)



A uma solução do álcool 1,2-O-isopropilidenoglicerol (100,00 mg, 0.75 mmol) em piridina (0.2 cm^3), adicionou-se anidrido acético (77,2 mg, 0,7 mmol), sob agitação a temperatura ambiente. Após 30 minutos a reação foi tratada com solução sulfato de cobre e água e extraída com acetato de etila (3 x 10 cm^3), as fases orgânicas foram reunidas e concentradas sob fluxo de ar comprimido. Esta metodologia de concentração foi escolhida devido as primeiras tentativas de concentração em evaporador rotativo levarem sempre a baixo rendimento, atribuído a alta volatilidade deste composto. Em seguida tratou-se o extrato concentrado, contendo o 1-acetil-2,3-isopropilideno-glicerol, com ácido acético (70% em água, 0.3 cm^3). Após 24 horas o solvente foi removido sob fluxo de ar comprimido.

O resíduo (45 mg), obtido após a evaporação do solvente, foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de

hexano/acetato de etila a 50 %, obteve-se o 1-acetil-glicerol (33mg, 32 % de rendimento), na forma de um óleo incolor.

Forma física: Óleo incolor

IV (filme) $\nu_{\max}$. cm^{-1} : 3390, 2952, 2886, 1725, 1263 (**E9**)

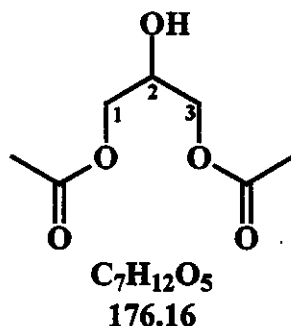
RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 2.11 (3H, s, CH_3), 3.64 (2H, m, H-3), 3.88 (1H, m, H-2) e 4.13 (2H, m, H-1). (**E10**)

RMN ^{13}C (75, 45 MHz; CDCl_3) δ : 20.81 (1C, CH_3), 63.28 (1C, C-3), 65.24 (1C, C-1), 70.08 (1C, C-2), 171.62 (1C, C_0). (**E11**), (**E12**)

EMAR Encontrada M^+ 135.02394 Calculada para $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$: 134.05791. m/z (int. rel.): 117.01885 [$\text{M}^+ - \text{OH}$] $^+$ (9.7); 103.00795 [$\text{M}^+ - \text{HOCH}_2$] $^+$ (100); 74.01375 [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$] $^+$ (57.6); 61.01101 [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2$] $^+$ (53.5). (**E13**)

CG/EM: Índice de retenção =1135, m/z (int. rel.): 103 (15), 86 (4), 74 (9), 61 (13), 43 (100). (**Figura 25**)

4.4.4) -1,3-diacetil-glicerol, **11**



A uma solução de glicerol (100.0 mg, 1.1 mmol) em piridina (0.2 cm^3), adicionou-se anidrido acético (111.0 mg, 1.1mmol), sob agitação a temperatura ambiente. Após 30 minutos a reação foi tratada com solução sulfato de cobre em água e extraída com acetato de etila (3 x 10 cm^3). Os extratos foram reunidos e concentrados sob fluxo de ar comprimido (esta metodologia foi escolhida pelo mesmo motivo descrito para o composto anterior).

O resíduo (98 mg), obtido após a evaporação do solvente, foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 30 %, obteve-se o 1,3-diacetil-glicerol (35 mg, 40 % de rendimento), na forma de um óleo incolor.

Forma física: Óleo incolor

IV (filme) $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3439,2959, 2902,1738, 1737 (**E14**)

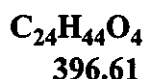
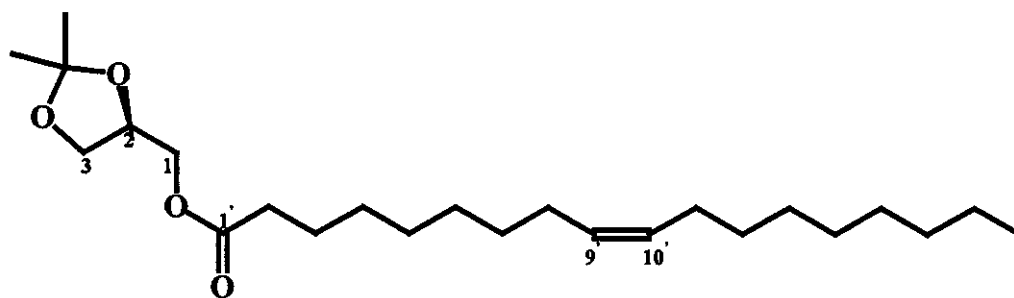
RMN de ^1H (499.88 MHz; CDCl_3) δ : 2.11 (6H, s, 2 CH_3), 2.93 (1H, sl, OH), 4.21 (5H, m, H-1, H-2 E H-3) (**E15**)

RMN de ^{13}C (125, 69 MHz; CDCl_3) δ : 20.82 (2C, CH_3), 65.22 (2C, C-1 e C-3), 67.99 (1C, C-2), 171.20 (2C, C_0) (**E16**), (**E17**)

EMAR Encontrada M^+ 177.03919 Calculada para $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_5$: 176.06847. m/z (int. rel.): 159.0347 [$M^+ - \text{OH}$] $^+$ (8.8); 117.03202 [$M^+ - \text{OCOCH}_3$] $^+$ (3.7); 103.02052 [$M^+ - \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$] $^+$ (100). (**E18**)

CG/EM: Índice de retenção =1251, m/z (int. rel.):145 (2), 103 (20), 86 (4), 74 (4), 61 (5), 43 (100) (Figura 27)

4.4.5) -2,3-isopropilideno-1-oleiol-Glicerol, 5



A uma solução do álcool 2,3-O-isopropilideno-glicerol (1.0 g, 7,6 mmols) em diclorometano (31 cm^3), a 0°C sob atmosfera de nitrogênio adicionou-se ácido oléico com 50% de pureza (2,4 g, 4,2 mmols) e quantidade catalítica de 4-dimetilamino-piridina, DMAP, (0,01g).

À esta solução adicionou-se 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCC, (1,7 g, 8,3 mmol) sob agitação. Imediatamente depois da adição de DCC uma suspensão branca de DCC hidratado, dicicloexiluréia, DCU, se forma. Depois de 20 horas a temperatura ambiente, filtrou-se a mistura reacional através de celite e o filtrado foi evaporado a vácuo em evaporador rotativo. Destilou-se o filtrado em destilador horizontal do tipo "Kugelrohr". Recuperou-se 257 mg do 2,3-isopropilideno-glicerol, a temperatura foi elevada lentamente até 120°C obtendo-se os subprodutos da reação provenientes das impureza do ácido oléico comercial. A temperatura foi então mantida a 120°C afim de ser obtido o produto desejado puro. No entanto, foi observado por CG/EM que a N-acilúreia (outro subproduto da reação) estava sendo coletada juntamente com o produto desejado, e por este motivo, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 10%, obteve-se o 1-oleoil-2,3-isopropilideno-glicerol (367mg, 25 % de rendimento), na forma de um óleo incolor.

Forma física: óleo incolor

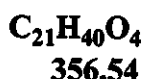
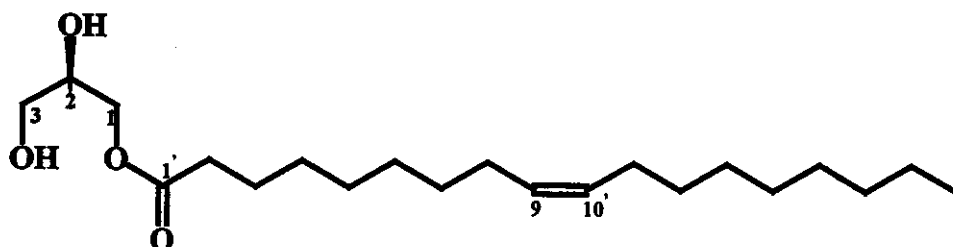
IV (filme) $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 2926, 2855, 1742, 1160 (**E19**)

RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 0.88 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H-18'), 1.26 (20H, m, H-3', H-4', H-6', H-7', H-12', H-13', H-14', H-15' e H-16'), 1.37 (3H, s, CH_3), 1.44 (3H, s, CH_3), 1.62 (2H, m, H-17'), 2.01 (4H, m, H-8' e H-11'), 2.34 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2'), 3.73 (1H, dd, $J = 6.3$ e 8.5 Hz, H-1), 4.08 (1H, dd, $J = 6.6$ e 8.5 Hz, H-1), 4.09 (1H, dd, $J = 6.3$ and 11.5 Hz, H-3), 4.17 (1H, dd, $J = 4.6$ e 11.5 Hz, H-3), 4.31 (1H, m, H-2), 5.35 (2H, m, H-9' e H-10') (**E20**)

RMN ^{13}C (75.45 MHz, CDCl_3/TMS): δ 14.07 (CH_3 , C-18'), 22.65 (CH_2 , C-17'), 24.83 (CH_2 , C-15'), 25.35 (CH_3), 26.63 (CH_3), 27.11, 27.17, 29.04, 29.11, 29.21, 29.29, 29.41, (7 CH_2 , C-4', C-5', C-6', C-7', C-12', C-13', C-14'), 29.51, 29.64 (2 CH_2 , C-8' e C-11'), 29.72 (CH_2 , C-3') 31.9 (CH_2 , C-16'), 34.06 (CH_2 , C-2'), 64.48 (CH_2 , C-19'), 66.29 (CH_2 , C-3), 73.61 (CH, C-2), 109.78 (C_0), 129.70, 130.00 (2CH, C-9' e C-10'), 173.60 (CO, C-1') (**E21**), (**E22**)

EMAR Encontrada M^+ 396.3238 Calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_4$: 396.3239 m/z (int. rel.):
381.3001 [$M^+ - \text{CH}_3$] $^+$ (100), 338.2786 [$M^+ - \text{C}_3\text{H}_7$] $^+$ (61), 101.0520 [$M^+ - \text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{O}_2$] $^+$ (51) (**E23**)

4.4.6) -1-oleoil-glicerol, 6



O 2,3-isopropilideno-1-oleoil-glicerol (100mg) foi tratado com 0,6 cm³ de ácido acético/água 70%, a 55°C, sob agitação. Após 6 horas a reação foi tratada com solução sulfato de cobre e água e extraída com acetato de etila (3 x 10 cm³). Os extratos foram reunidos e evaporados

O resíduo obtido após a evaporação do solvente, foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 50 %, obteve-se o 1-oleoil-glicerol (84mg, 93 % de rendimento), na forma de um óleo incolor.

Forma física: Óleo incolor

IV (filme) ν_{max} , cm⁻¹ : 3392, 3005, 2924, 2853, 1738 (**E24**)

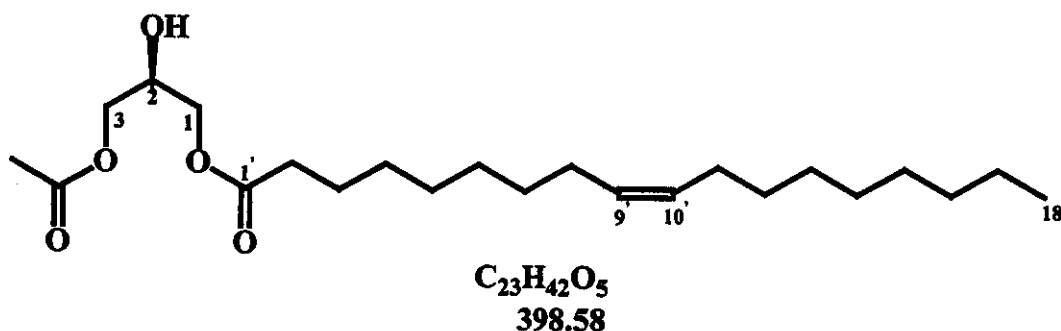
RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 0.88 (3H, t, $J=6.9$ Hz, H-18'), 1.27 (20H, m, H-3', H-4', H-6', H-7', H-12', H-13', H-14', H-15' e H-16'), 1.63 (2H, m, H-17'), 1.85 (1H, s, OH), 2.03 (4H, m, H-8' e H-11'), 2.35 (2H, t, $J=7.7$ Hz, H-2'), 2.80 (1H, bs, OH), 3.59 (1H, dd, $J=5.9$ e 11.3Hz, H-3), 3.70 (1H, dd, $J=5.9$ e 11.7Hz, H-3), 3.93 (1H, m, H-2), 4.17 (2H, m, H-1), 5.33 (2H, m, H-9' and H-10') (**E25**)

RMN de ¹³C (75.45 MHz, CDCl₃/TMS) δ : 14.08 (CH₃, C-18'), 22.64 (CH₂, C-17'), 24.85 (CH₂, C-15), 27.12, 27.18, 29.06, 29.11, 29.21, 29.29, 29.48 (7 CH₂, C-4', C-5', C-6', C-7', C-12', C-13', C-14'), 29.64, 29.72 (2CH₂, C-8' e C-11'), 31.89 (CH₂, C-16'), 32.59 (CH₂, C-3'), 34.12 (CH₂, C-2'), 63.31 (CH₂, C-3), 65.11 (CH₂, C-1), 70.23 (CH, C-2), 129.68, 130.00 (2CH, C-9 and C-10'), 174.35 (CO, C-1') (**E26**), (**E27**)

EMAR Encontrada M^+ 398.3032 calculada para $C_{21}H_{44}O_6$: 398.2968 m/z (int. rel.): 380.28611 [$M^+ - H_2O$] $^+$ (13), 265.2366 [$M^+ - C_7H_{11}O_5$] $^+$ (20), 264.2413 [$M^+ - C_7H_{10}O_5$] $^+$ (31) (E28)

CG/EM: Índice de retenção = 2714, m/z (int. rel.): 265 (15), 264 (65), 98 (60), 55 (100) (Figura 24)

4.4.7) -1-oleoil-3-acetil-glicerol, 7



A uma solução de 1-oleoil-glicerol (26.00 mg, 0,07 mmols) em piridina (0.1 cm³), adicionou-se anidrido acético (7.50 mg, 0.07 mmol), sob agitação a temperatura ambiente. Após 1 hora a reação foi tratada com solução sulfato de cobre em água e extraída com acetato de etila (3 x 10 cm³), os extratos foram reunidos e concentrados.

O resíduo obtido após a evaporação do solvente, foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 40 %, obteve-se o 1-oleil-3-acetil-glicerol (18mg, 62 % de rendimento), na forma de um óleo incolor.

Forma física: Óleo incolor

IV (filme) ν_{max} . cm⁻¹ : 3438, 2925, 2854, 1743, 1236 (E29)

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 0.88 (3H, t, $J=6.9$ Hz, H-18'), 1.27 (20H, m, H-3', H-4', H-6', H-7', H-12', H-13', H-14', H-15' e H-16'), 1.62 (2H, m, H-17'), 2.01 ((4H, m, H-8' e

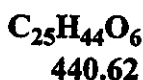
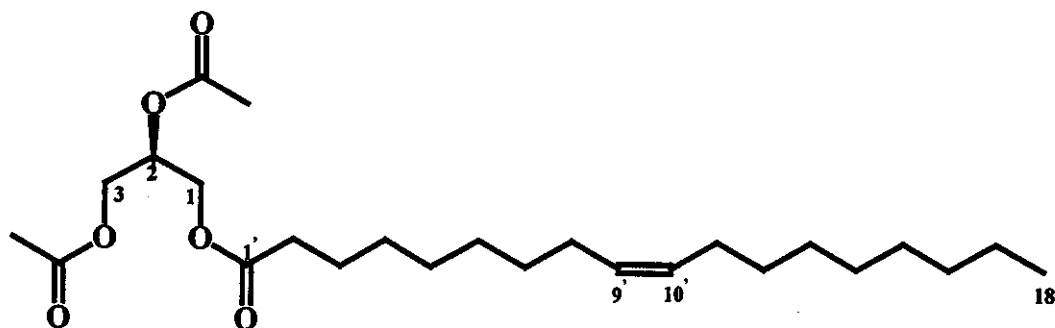
H-11'), 2.08 (3H, s, CH₃CO), 2.35 (2H, t, $J=7.3$ Hz, H-2'), 4.20 (5H, m, H-1, H-2 and H-3), 5.35 (2H, m, H-9' e H-10') (E30)

RMN de ¹³C (75.45 MHz, CDCl₃/TMS): δ:14.10 (CH₃, C-18'), 20.78 (CH₃, CH₃CO), 22.65 (CH₂, C-17'), 24.85 (CH₂, C-15'), 27.14, 27.20, 29.06, 29.13, 29.30 (7CH₂, C-4', C-5', C-6', C-7', C-12', C-13', C-14'), 29.50, 29.66 (2CH₂, C-8' e C-11'), 29.74 (CH₂, C-3'), 31.89 (CH₂, C-16'), 34.06 (CH₂, C-2'), 65.00 (CH₂, C-3), 65.22 (CH₂, C-1), 68.28 (CH, C-2), 129.70, 130.02 (2CH, C-9 e C-10'), 171.07 (CO, COCH₃), 173.92 (CO, C-1') (E31), (E32)

EMAR Encontrada M⁺ : 398.2968, calculada para: C₂₃H₄₂O₅: 398.3032, m/z (rel. int.): 380.2861 [M⁺ -H₂O]⁺ (13), 264.2280 [M⁺ -C₅H₁₀O₄]⁺ (30), 265.2366 [M⁺ -C₅H₉O₄]⁺ (28), 117.0345 [M⁺ -C₁₈H₃₃O₂]⁺ (100) (E33)

CG/EM: Índice de retenção = 2810, m/z (int. rel.):380 (1), 265 (4), 264 (3), 117 (42), 43 (100) (Figura. 25)

4.4.8) -2, 3-diacetil-1-oleoil-Glicerol, 8



A uma solução de 1-oleoil-glicerol (11,50 mg, 0,03 mmols) em piridina (0.1 cm³), adicionou-se anidrido acético (9.00 mg, 0.08 mmol), sob agitação a temperatura ambiente. Após 4 horas a reação foi tratada com solução sulfato de cobre em água e extraída com acetato de etila (3 x 10 cm³), os extratos foram reunidos e concentrados.

O resíduo obtido após a evaporação do solvente, foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 40 %, obteve-se o 1-oleil-2,3-diacetil-glicerol(13.5 mg, 96 % de rendimento), na forma de um óleo incolor.

Forma física: Óleo incolor

IV (filme) $\nu_{\max}$. cm^{-1} : 2926, 2854, 1749, 1222 (E34)

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-18'), 1.28 (20H, m, H-3', H-4', H-6', H-7', H-12', H-13', H-14', H-15' e H-16'), 2.02 (4H, m, H-8' e H-11'), 2.08 (3H, s, CH_3CO), 2.09 (3H, s, CH_3CO), 2.31 (2H, t, $J=7.7$ Hz, H-2'), 4.15 (2H, m, H-3), 4.29 (2H, m, H-1), 5.26 (1H, m, H-2), 5.36 (2H, m, H-9' e H-10').(E35)

RMN de ^{13}C (75.45 MHz, CDCl_3/TMS) δ : 14.10 (CH_3 , C-18'), 20.68 (CH_3 , CH_3CO), 20.87 (CH_3 , CH_3CO), 22.67 (CH_2 , C-17'), 24.82 (CH_2 , C-15'), 27.14, 27.20, 29.04, 29.08, 29.14, 29.30 (7 CH_2 , C-4', C-5', C-6', C-7', C-12', C-13', C-14'), 29.50, 29.68 (2 CH_2 , C-8' and C-11'), 29.74 (CH_2 , C-3'), 31.88 (CH_2 , C-16'), 34.00 (CH_2 , C-2'), 61.97 (CH_2 , C-1), 62.28 (CH_2 , C-3), 69.09 (CH, C-2), 129.71, 130.00 (2CH, C-9 e C-10'), 170.10 (CO, COCH_3), 170.52 (CO, COCH_3), 173.30 (CO, C-1'). (E36), (E37)

EMAR Encontrada M^+ : 440.3133; calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{O}_6$: 440.3137. m/z (int. rel.): 380.2835 [$M^+ - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}$] $^+$ (10.5), 264.2315 [$M^+ - \text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_5$] $^+$ (25), 265.2385 [$M^+ - \text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$] $^+$ (19), 159.0498 [$M^+ - \text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2$] $^+$ (100). (E38)

CG/EM: Índice de retenção = 2897, m/z (int. rel.): 380 (1), 265 (4), 264 (6), 159 (50), 43 (100). (Figura 29).

4.5 Reação com dimetil dissulfeto (DMDS) para localizar a posição da ligação dupla

A uma solução de heptano (2 cm^3) contendo 1-2 mg do composto **8** foi tratado com 10 cm^3 de DMDS e 0,1 cm^3 de solução de iodo em éter etílico (0.06%). A reação permaneceu em agitação por uma noite (14 horas) à 40°C. A reação é tratada com a adição de 4 cm^3 de heptano 2,5 cm^3 de solução de aquosa de tiosulfato de sódio (5%). A fase orgânica foi concentrada em

evaporador rotativo e em seguida analisada por CG/EM. O mesmo procedimento foi empregado com o óleo floral de *Oncidium pubes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

- ACKERMAN, J. D. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in Orchids. *Lindleyana*, 1986, 1, 108.
- ACKERMAN, J. D. Geographic and seasonal variation in fragrance choices and preferences of male Euglossine bees. *Biotropica*, 1989, 21, 340.
- ADAMS, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Publishing Co., Illinois. 1995.
- BIJLEVELD, C. GEELLEN, M. J. H., HOUWELING, M. VAARTJES, W. J. Dissimilar effects of 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol and phorbol 12-myristate 13-acetate on fatty acid synthesis in isolated rat-liver cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988, 151, 193.
- BUCHMANN, S. L. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 1987, 18, 343.
- CHASE, M. W. A reappraisal of the Oncidioid orchids. *Systematic Botany*, 1986, 11, 477.
- CITÓ, A. M. G. *Rotas sintéticas exploratórias a partir do ácido-(+)-tartárico e D-Manitol*. Tese (Doutorado em Ciências. Instituto de Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1994
- CROTEAU, R., KARP, F. Origin of natural odorantes. In: MÜLLER, P. M., LAMPARSKY, D. *Perfumes; art science technology*. 1st ed. Great Britain (London): Chapman & Hall, Parte II, cap. 4, 101-126. 1994.
- CURRY, K. J., McDOWELL, L. M., JUDD, W. S. AND STERN, W.L., Osmophoros, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 1991, 78, 610.
- DARWIN, C. R. *The various contrivances by which orchids are fertilized by insects*. London. John Murray. 1862
- DICKE, M., SABELIS, M. W. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology*, 1988, 2, 131.
- DOBSON H. E. M., BERGSTRÖM J., BERGSTRÖM G., GROTH, I. Pollen and flower volatiles in two *Rosas* species. *Phytochemistry*, 1987, 26, 3171.

- DOBSON, H. E. M. Floral volatile in insect biology. In: BERNAYS, E.A. *Insect-plant interactions*, Vol. V, CRC Press. Boca Raton. 1994.
- DOBSON, H. E. M., GRATH, I. BERGSTRÖM, G. Pollen Advertisement: chemical contrasts between whole-flower and pollen odors. *American Journal of Botany*, 1996, 83, 877.
- DOBSON, H. E. M., ARROYO, J., BERGSTRÖM, G., GROTH, I. Interspecific variation in floral fragrance within the genus *Narcissus* (Amarylidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997, 25, 685.
- DOBSON, H. E. M., BERGSTRÖM, G., The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Systematic and Evolution*, 2000, 222, 63.
- DODSON, C.H., DRESSLER, R. L., HILLS, H. G., ADANS, R. M., WILLIAMS, N. H. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science*, 1969, 164, 1243.
- DOWNER, R. G. H. Functional role of lipids in insects. In Rockstein, M. *Biochemistry of insects*. London, Academic Press, 1978.
- DRESSLER, R. L. *The phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge University Press, Cambridge, 1993.
- DeVRIES, P. J., STILES, F. G. Attraction of pyrrolizidine alkaloid seeking Lepidoptera to *Epidendrum paniculatum* orchids. *Biotropica*, 1990, 22, 290.
- EIBL, H., Woolley P. Synthesis of enantiomerically pure glyceryl esters and ethers. I. Methods employing the precursor 1, 2-isopropylidene-*sn*-glycerol. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1986, 41, 53.
- EIBL, H. Na improved method for the preparation of 1, 2-isopropylidene-*sn*-glycerol. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1981, 28, 1.
- GELLERT, M. Anatomische studien über den Bau der Orchideenblütwe. *Fedde Rep. Beih.* 1923, 25, 1.
- HARBORNE, J.B. Recent advances in chemical ecology. *Natural Product Reports*, 1989 85.
- HARBONE, J.B. *Introduction to ecological biochemistry*. Ed. Academic Press, 4^a ed. 1992.
- HICK, A. J., LUSZNIAK M. C., PICKETT, J. A. Volatile isoprenoids that control insect behaviour and development. *Natural Product Reports*. 1999, 16, 39.
- HIROSE, S., JOICHI, A., NAKAMURA S., AWANO, K. Volatile components of musky scent of orchids. *Flavour and Fragrance Journal*, 1999, 14, 183.

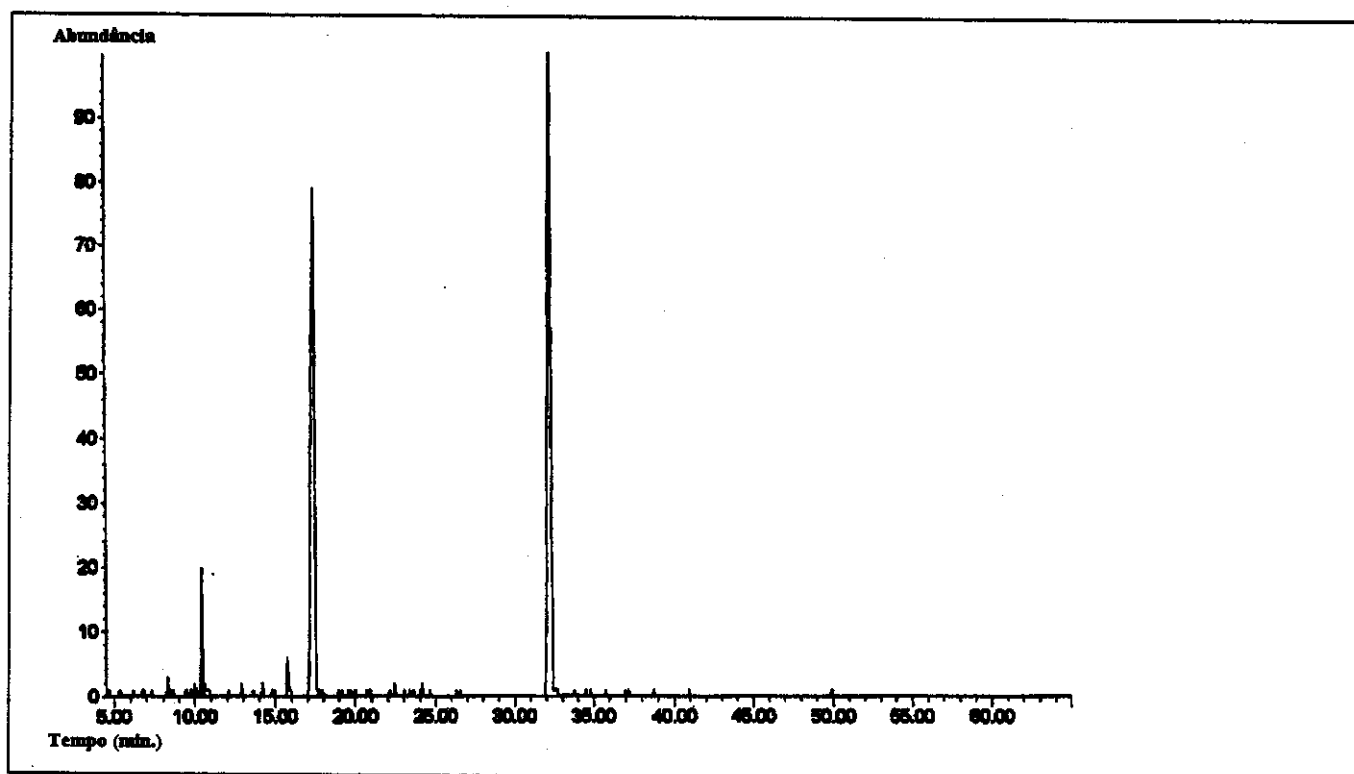
- KAISER, R., *The scents of orchids, olfactory and chemical investigations*. Elsevier, editions Roche, Basel. Amsterdam, 1993.
- KAWADA, M., EDASHIGE, K., YASUDA, Y. W. T., UTSUMI, K., Increase in cell responses and protein phosphorylation of neutrophils induced by synthetic diacylglycerols. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, **1993**, *25*, 237.
- KARLSON, P., LÜSCHER, M. Pheromones: a New Term for a class of Biological Active Substances. *Nature*, **1959**, *3*, 55.
- KISHI, Y., RANDON, R. R. Structural basis of protein kinase C activation by tumor promoters. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 163.
- KNUDSEN, J. T., TOLLSTEN, L., BERGSTRÖM, L. G. Floral Scents – A checklist of volatile compound isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, **1993**, *33*, 253.
- JONHSON, C. B., HOLMAN, R. T. *Lipids*, **1966**, *1*, 371.
- JURCZAK, J., PIKUL, S., BAUER, T. (R)- and (S)-2,3-isopropilideneglyceraldehyde in stereoselective organic synthesis. *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 447.
- LEONHARDT, B. A., DeVilbiss, E. D. Separation and double-bond determination on nanogram quantities of aliphatic monounsaturated alcohols, aldehydes and carboxylic acid methyl esters. *Journal of Chromatography*, **1985**, *322*, 484.
- LEONHARDT, B. A., DEVILBISS, E. D., KLUM, J. A. Gas chromatographic mass spectrometric indication of double bond position in monounsaturated primary acetates and alcohols without derivatization. *Organic Mass Spectrometry*, **1983**, *18*, 9.
- LÜNING, B. Studies on Orchidaceae alkaloids I. *Acta Chemica Scandinavica*, **1964**, *18*, 1507.
- McNAMARA, M. J. C., SCHMITT, J. D., WYKLE, R. L., DANIEL, L. W. 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol stimulates differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells to macrophage-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1984**, *122*, 824.
- MIKOLAJCZYK, M., KIELBASINSKI, P. Recent developments in the carbodiimide chemistry. *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 233.
- MORI, K. Recent results in synthesis of ecological important bioregulators. (in press). **2000**
- MORI, K. Semiochemical – Synthesis, Stereochemistry, and Bioactivity. *European Journal Organic Chemistry*. **1998**, 1479

- MORIKAWA, Y., TAKAYAMA, S., FUDO, R., YAMANAKA, S. MORI, K., ISOGAI, A. Absolute chemical structure of the myxobacterial pheromone of *Stigmatella aurantiaca* that induces the formation of its fruiting body. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 165, 29.
- NIERENBERG, L. The mechanism for the maintenance of species integrity in sympatrically occurring equitant *Oncidium* in the Caribbean. *American Orchid Society Bulletin*. 1972, 41, 873.
- NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 1992, 258, 607.
- NISHIZUKA, Y. Studies and Perspectives of Protein Kinase C. *Science*, 1986, 233, 305.
- OLDEHAN, N. J., BOLAND, W. Chemical Ecology: multifunctional compounds and multitrophic interactions, *Naturwissenschaften*, 1996, 83, 248.
- OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO, A. L. M.; BITTRICH, V.; MARSAIOLI, A. J. Two polyisoprenysated benzophenones from the floral resins of tree *Clusia* species, *Phytochemistry* 1999, 50, 1073.
- PANEK, J. S., SARKS, A. M. Synthesis, resolution and absolute stereochemical assignment of C1-Oxygenated allylsilanes and C3-oxygenated Vinylsilanes. *Tetrahedron Asymmetry* 1990, 1, 801.
- PANSSARIM, E. R. *Estudo da biologia reprodutiva e morfologia floral de algumas espécies de Orchidaceae em ambientes diferentes no estado de São Paulo*. Dissertação de mestrado – Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.2000
- PAWLISZYN, J. Solid Phase microextraction theory and practice. Wiley-VCH, New York, 1997.
- PERIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F. E., PERRIN, D. R. *Purification of laboratory chemicals*, 2ª ed., Pergamon Press, New. York, 1980.
- PERUQUETTI, R. C., CAMPOS, L. A. O., COELHO, C. D. P., ABRANTES, C. V. M., LISBOA, L. C. O. Abelhas euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1999, 16 (supl. 2), 101.
- PIJL, L. V., DODSON, H. *Orchid flowers their pollination and evolution*. University of Miami Press, Florida, 1969.

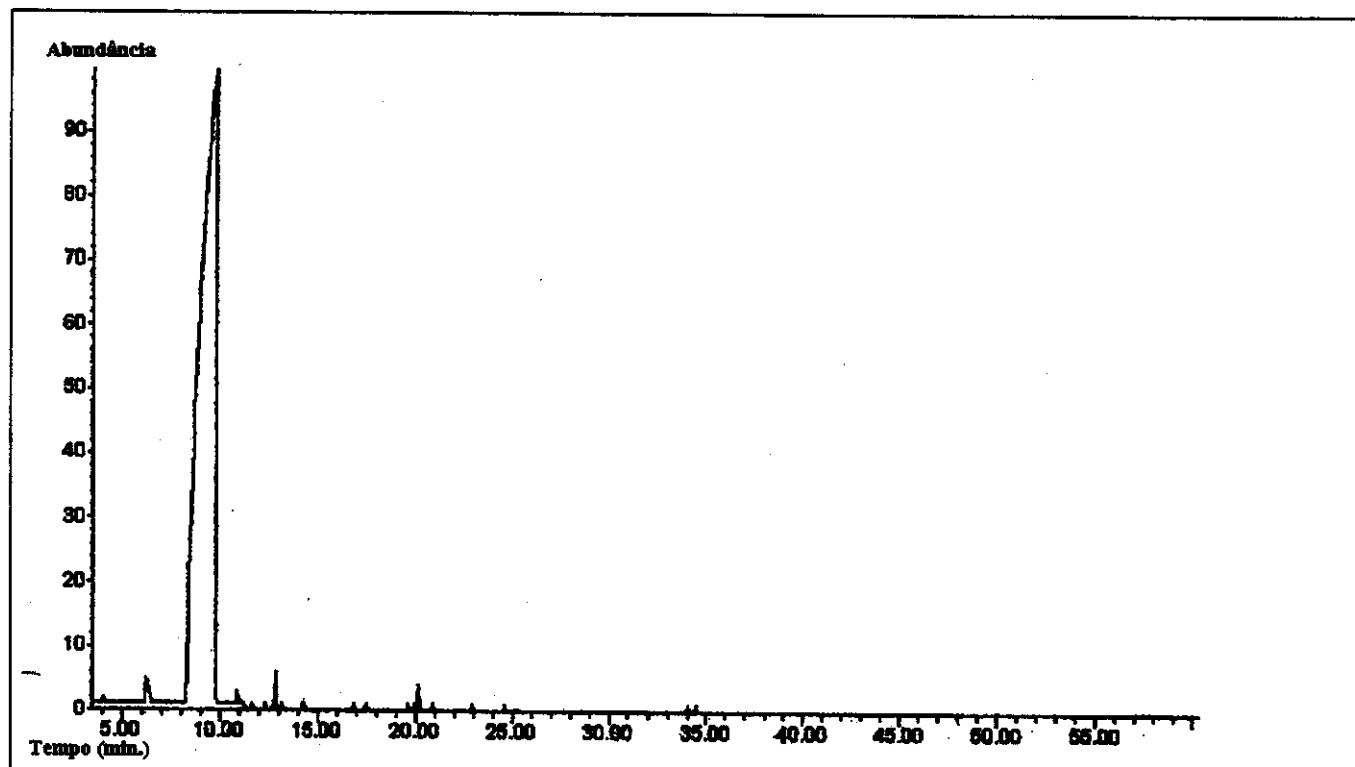
- PRIDGEON, A., MORRISON, A. *The illustrated encyclopedia of orchids*. Timber Press, Potland 1997.
- RAGUSO, R.A., PELLMYR, O. Dynamic headspace analysis of floral volatiles: a comparison of methods. *OIKOS*, 1998, 81, 238.
- _____. *Reactivos de coloración pra cromatografia en capa fina y en papel*. E. Merck, Darmstadt, 1980.
- ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Ed. Williams & Wilkinins. 1996.
- ROLDAN E. R. S., HARRISON, R. A. P. The role of diacylglycerol in the exocytosis of the sperm acrosome. *Biochemical journal*, 1992, 281, 767.
- SCHMID, C.R., BRYANT, J. D., DOWLATZEDAH, M., PHILLIPS, J. L., PRATHER, D.E., SCHANTZ, D.R., SEAR, L.N., VIANCO, C. S. Synthesis of 2,3-O-isopropilidene-D-glycerol in high chemical and optical purity: observations on the development of a pratical bulk process. *Journal of Organic Chemistry*, 1991, 56, 4056.
- SEIGLER, D., SIMPSON, B. B., MARTIN, C., NEFF, J. L. Free 3-acetoxylfatty acids in glands of *Krameria* species. *Phytochemistry*, 1978, 17, 995.
- SINGER, R. B., COCCUCI, A. A. Pollination mechanisms in four sympatric southern brazilian Epiendroideae Orchids. *Lindleyana*, 1999, 14, 47.
- SILVA, U. F., BORBA, E. L., SEMIR, J., MARSAIOLI, A. J. A simple solid injection device for the analyses of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) volatiles. *Phytochemistry*, 1990, 50, 31.
- SIMPSON, B. B.; NEFF, J. L. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals Missouri Botanical Gardens*, 1981, 68, 301.
- SIMPSON, B. B.; SEIGLER, D. S.; NEFF, J. L. Lipids from the glands of *Krameria*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1979, 7, 193.
- STERMITZ, F. R., SUESS, T. R. SCHAUER, C. K., ANDERSON, O. P. New an Old phenanthrene derivatives from *Oncidium cebolleta*, a peyote-replacemete plant. *Journal Natural Products*, 1983, 46, 417.
- TREMBLAY, R. L. Trends in pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics, *Canadian Journal of Botany*, 1992, 70, 642.

- VAN DER DOOL, H., KRATZ, P. D. J. A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 1963, 11, 463.
- VISON, S.B., WILLIAMS, H.J., FRANKIE, G.W., SHRUM, G. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpigheaceae) and use of floral lipids by *Centris* bees (Hymenoptera: Apidae), *Biotropica*, 1997, 29, 76.
- VOGEL, S. *Öblumen und ölsammelnde Bienen*. Akad. Wissenschaften Mainz. Wiesbaden: Franz Steiner, 1974
- VOGEL, S. Flower offering fatty oil instead of nectar. Proc. XI Intl. Bot. Congress, Seattle, 1969.
- WILLIAMS, N.H., DODSON, C.H. Selective attraction of male Euglossine bees to Orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. *Evolution*, 1972, 26, 84.
- WILLIAMS, N.H. AND WRITTEN, W.M. Orchid floral fragrance and male euglossine bees methods and advances in the last sesquidecade, *Biological Bulletin*. 1983, 164, 355.
- UGAZ, O. L. *Investigacion fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales*, Pontificia Universidad Católica del Perú Fondo Editorial. Perú. 1988.

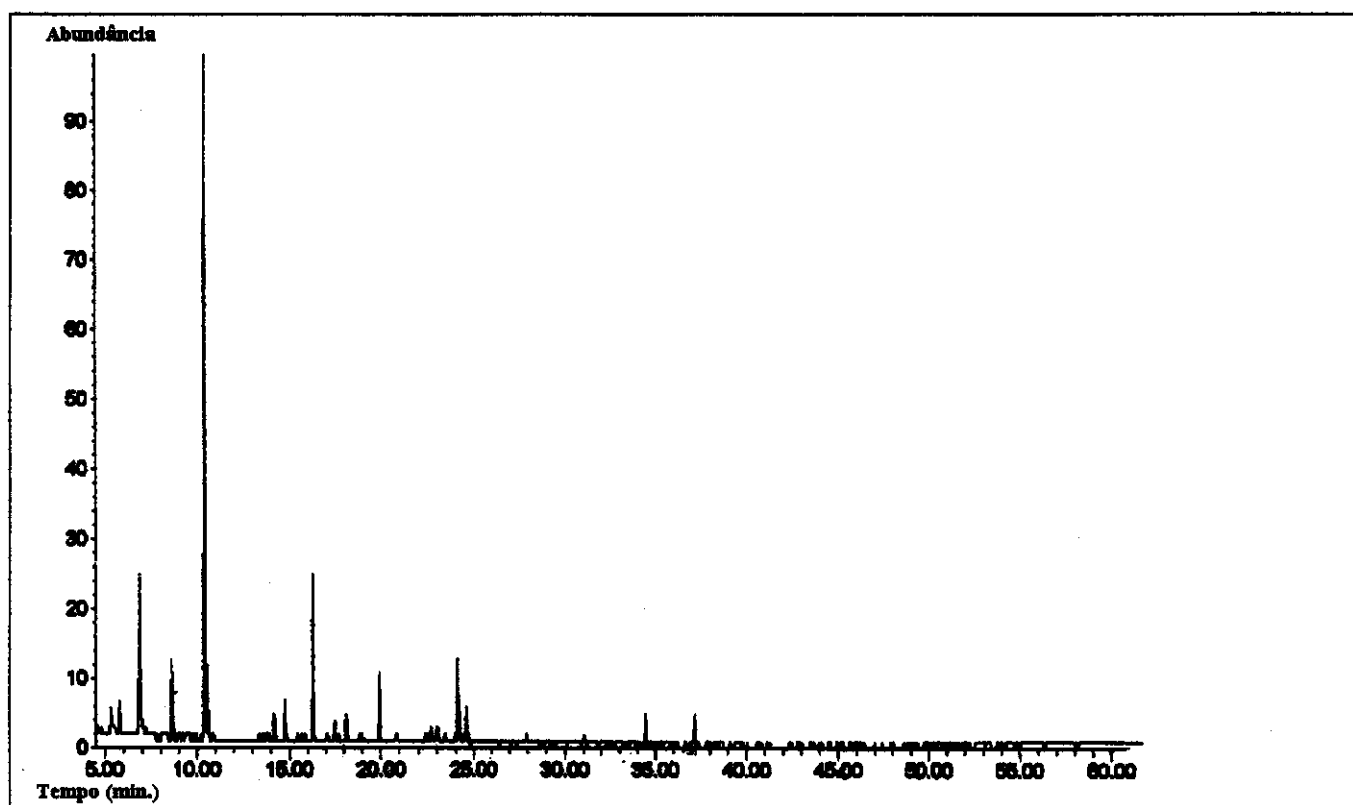
CROMATOGRAMAS



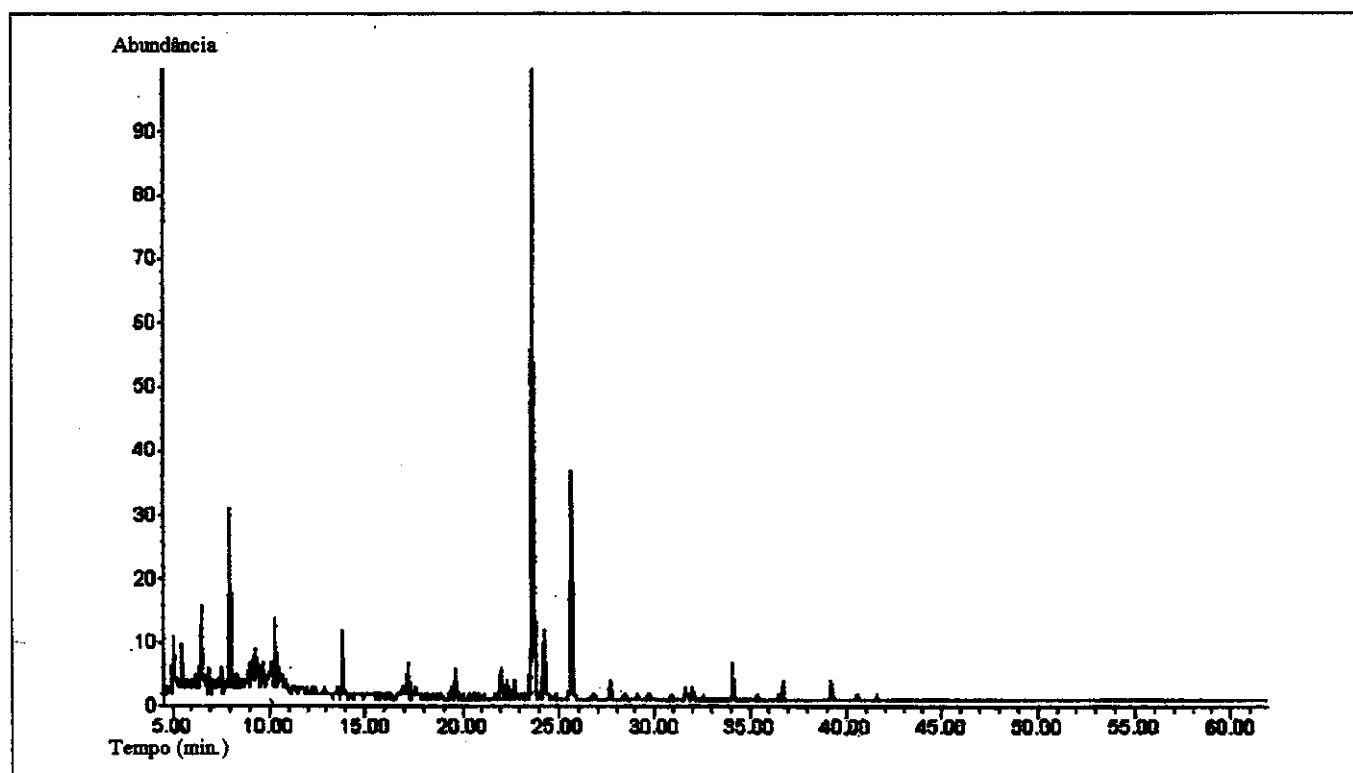
Cromatograma 1. Cromatograma de CG/EM da fragrância floral de *Stanhopea lietzei*



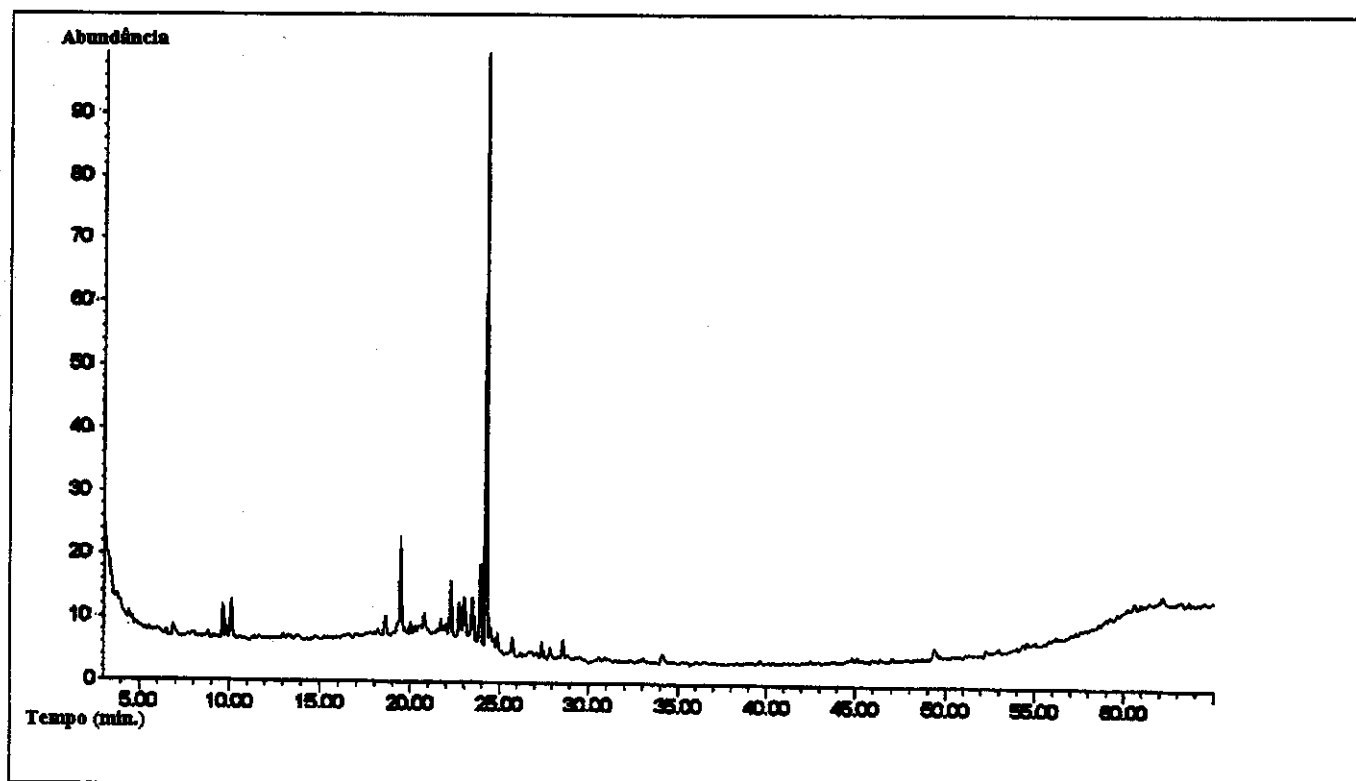
Cromatograma 2. Cromatograma de CG/EM da fragrância floral de *Stanhopea insignis*



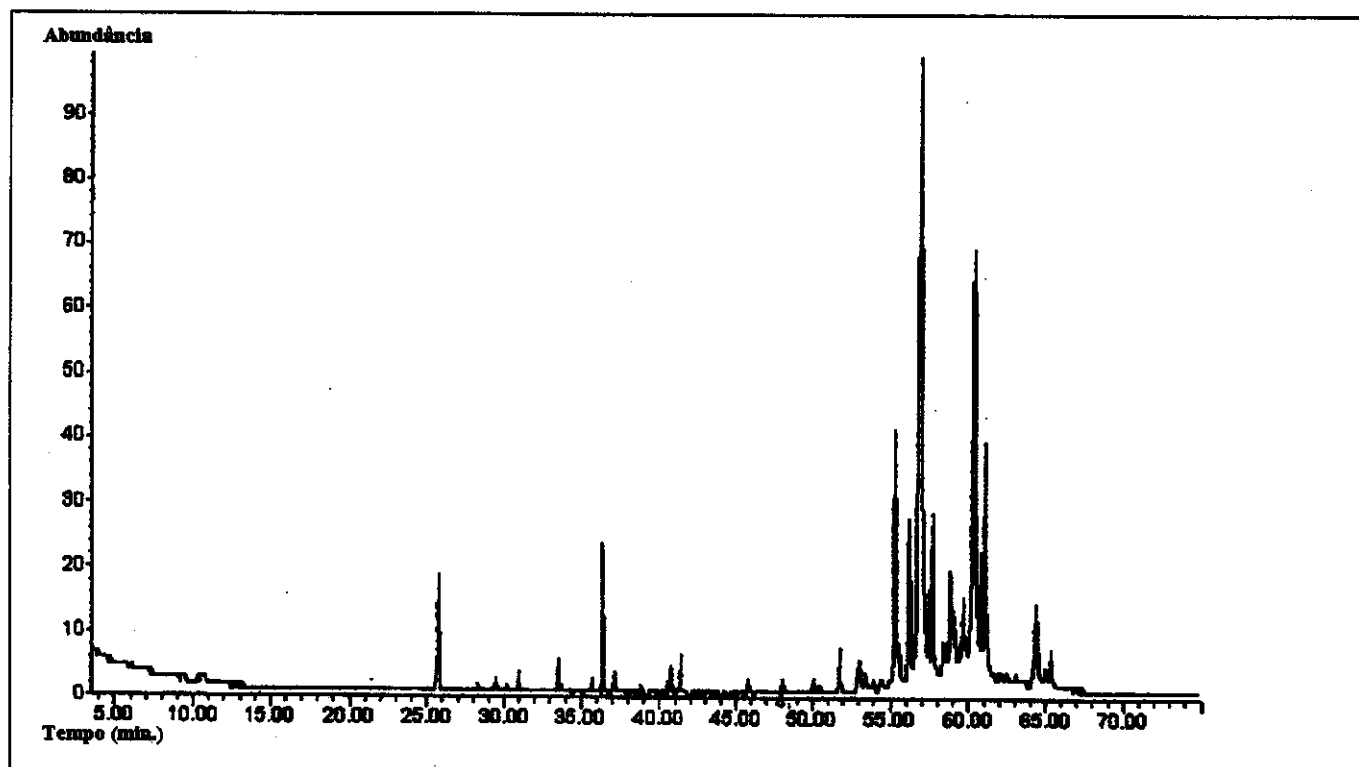
Cromatograma 3. Cromatograma de CG/EM da fragrância floral de *Polystachya estrellensis*



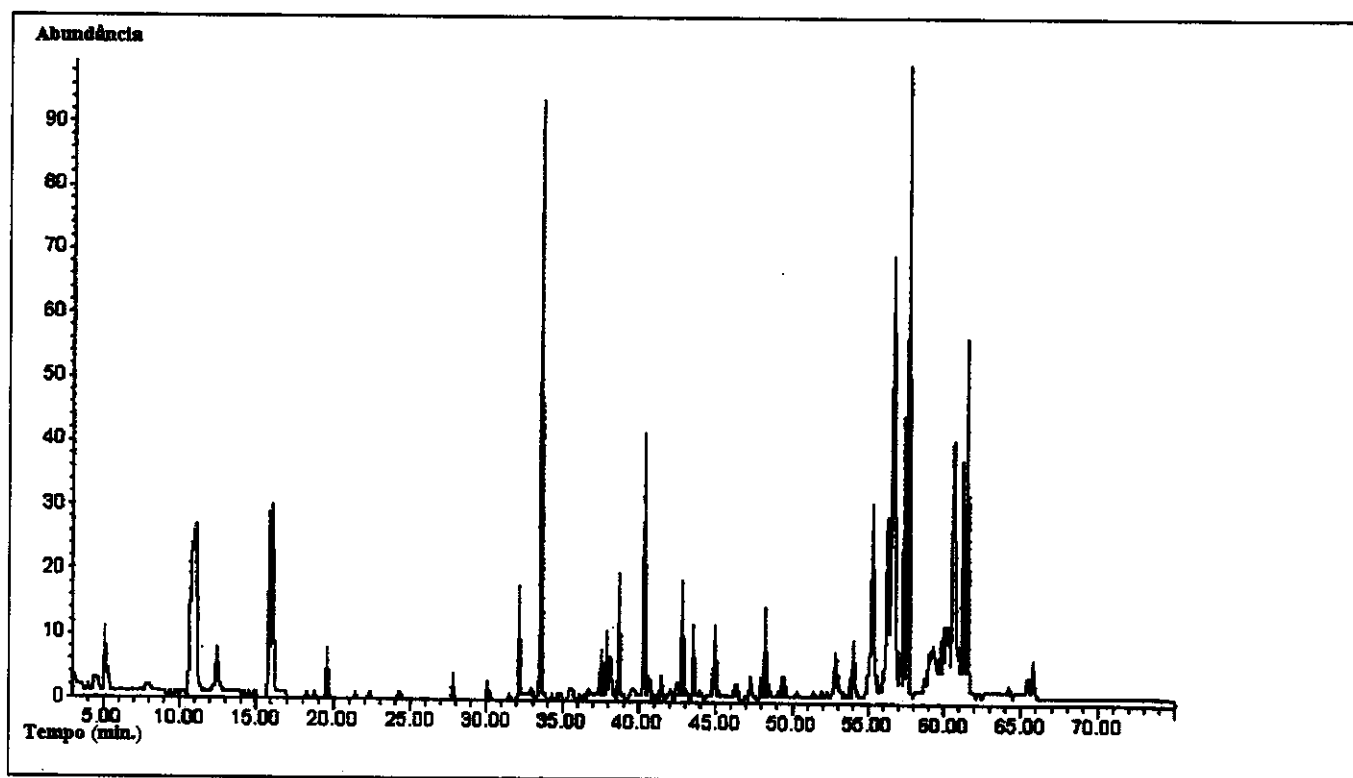
Cromatograma 4. Cromatograma de CG/EM da fragrância floral de *Psilochilus modestus*



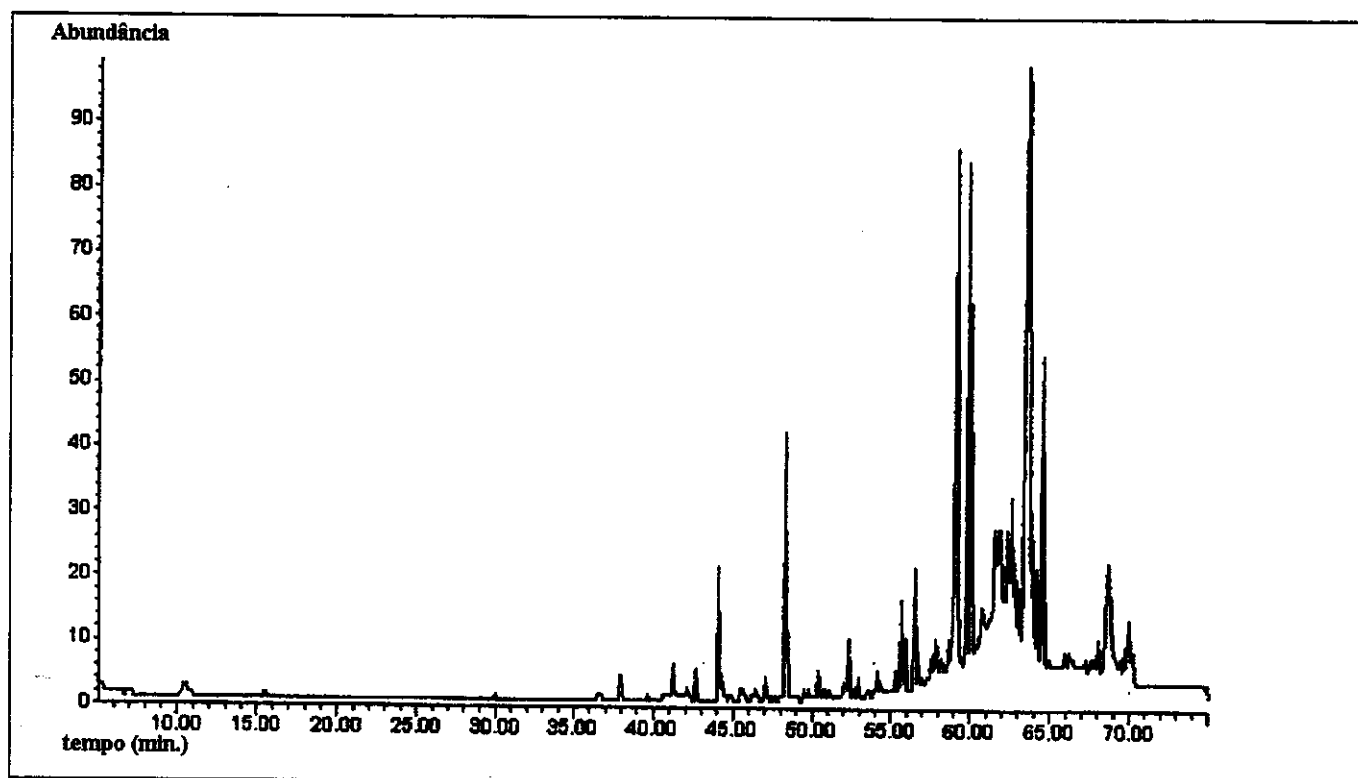
Cromatograma 5. Cromatograma de CG/EM da fragrância floral de *Epidendrum secundum*



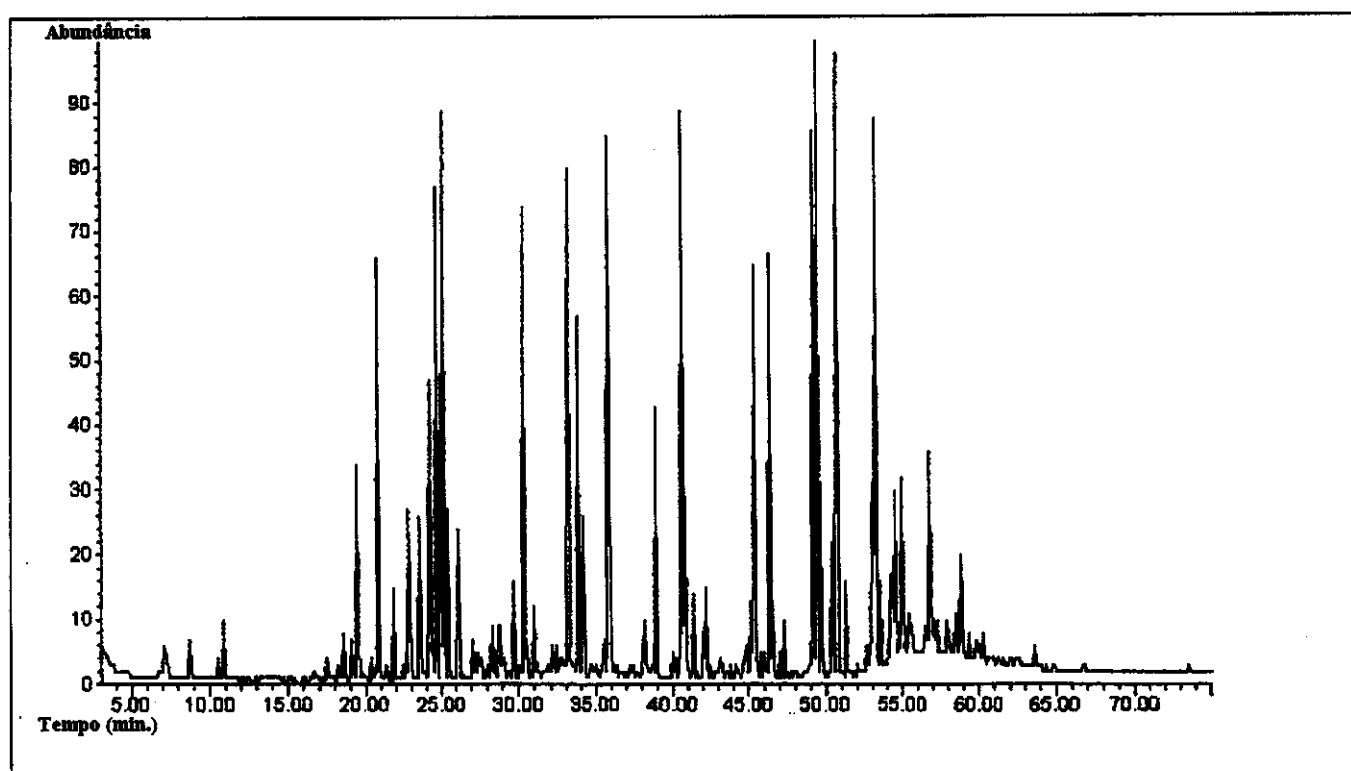
Cromatograma 6. Cromatograma de CG/EM do óleo floral de *Oncidium pubes*



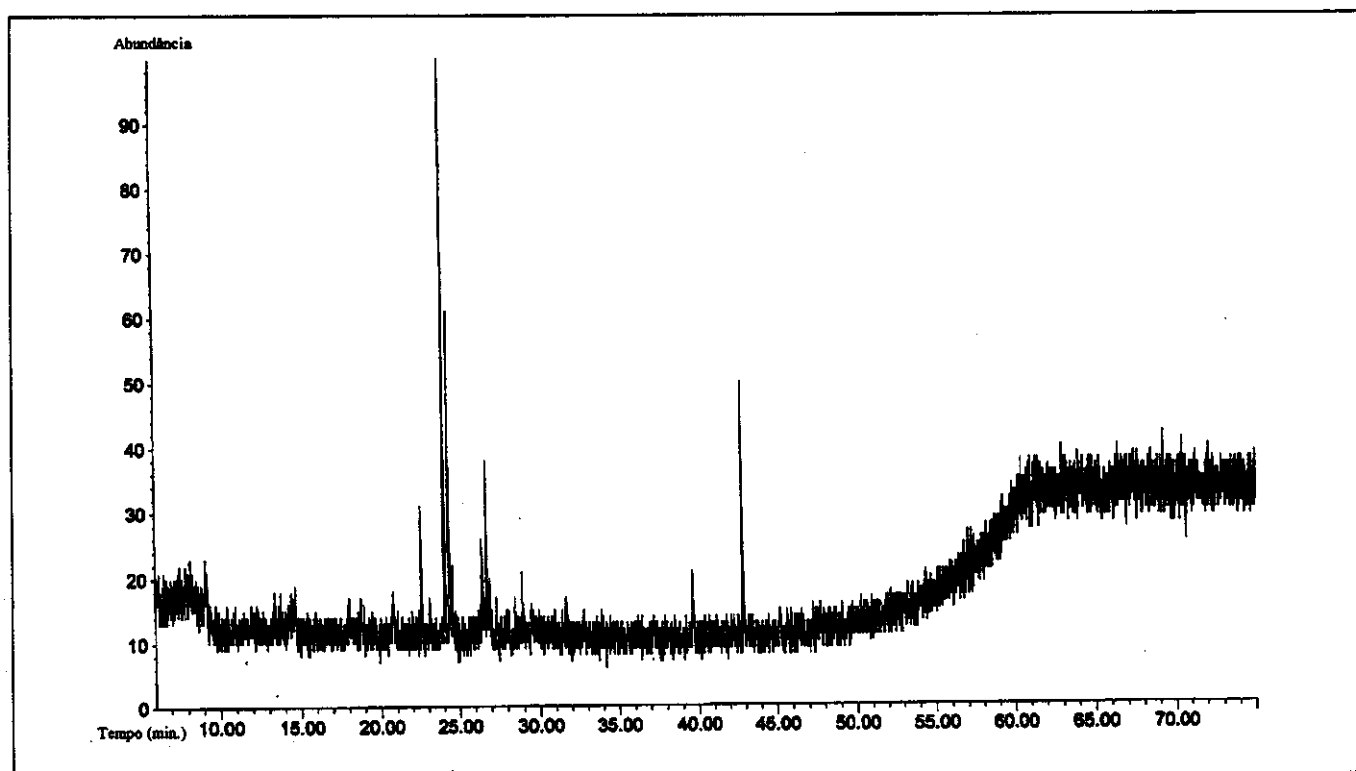
Cromatograma 7. Cromatograma de CG/EM CG/EM do óleo floral de *Oncidium truncatum*



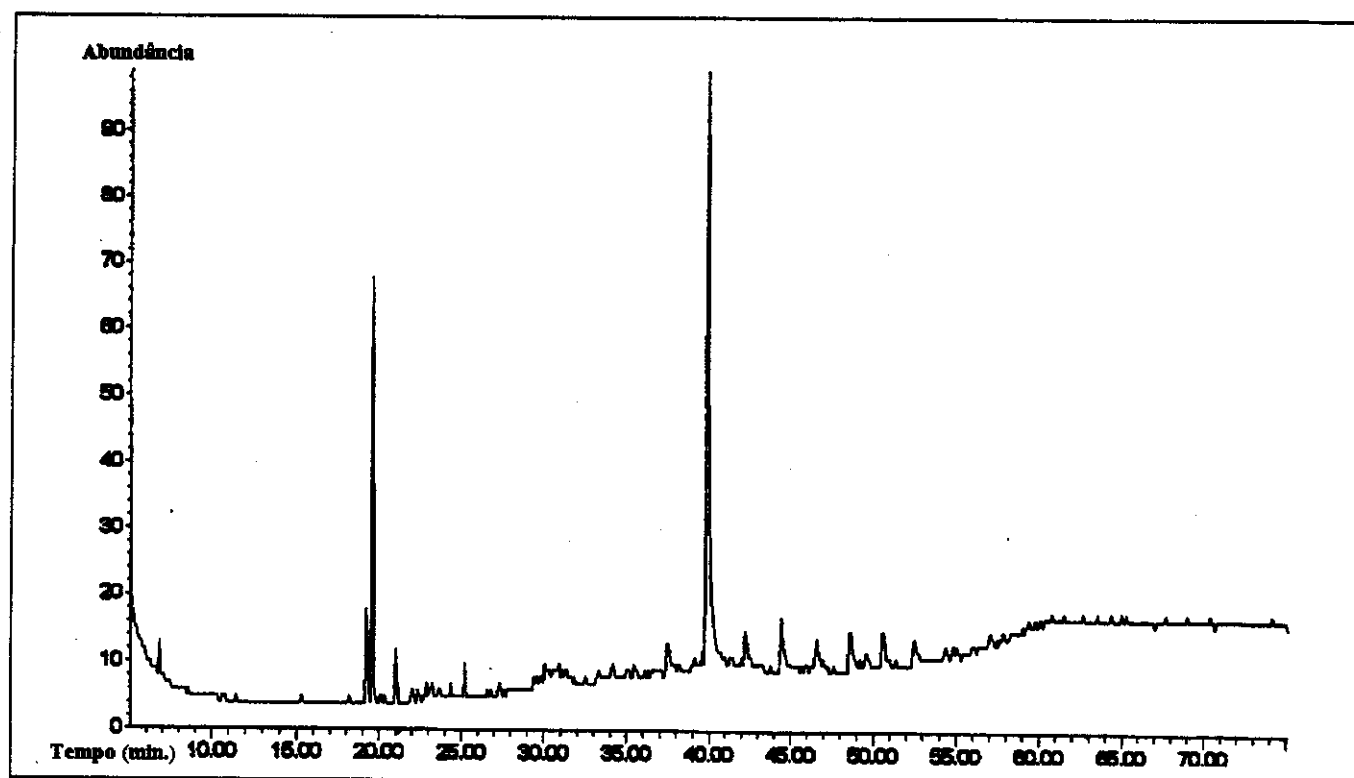
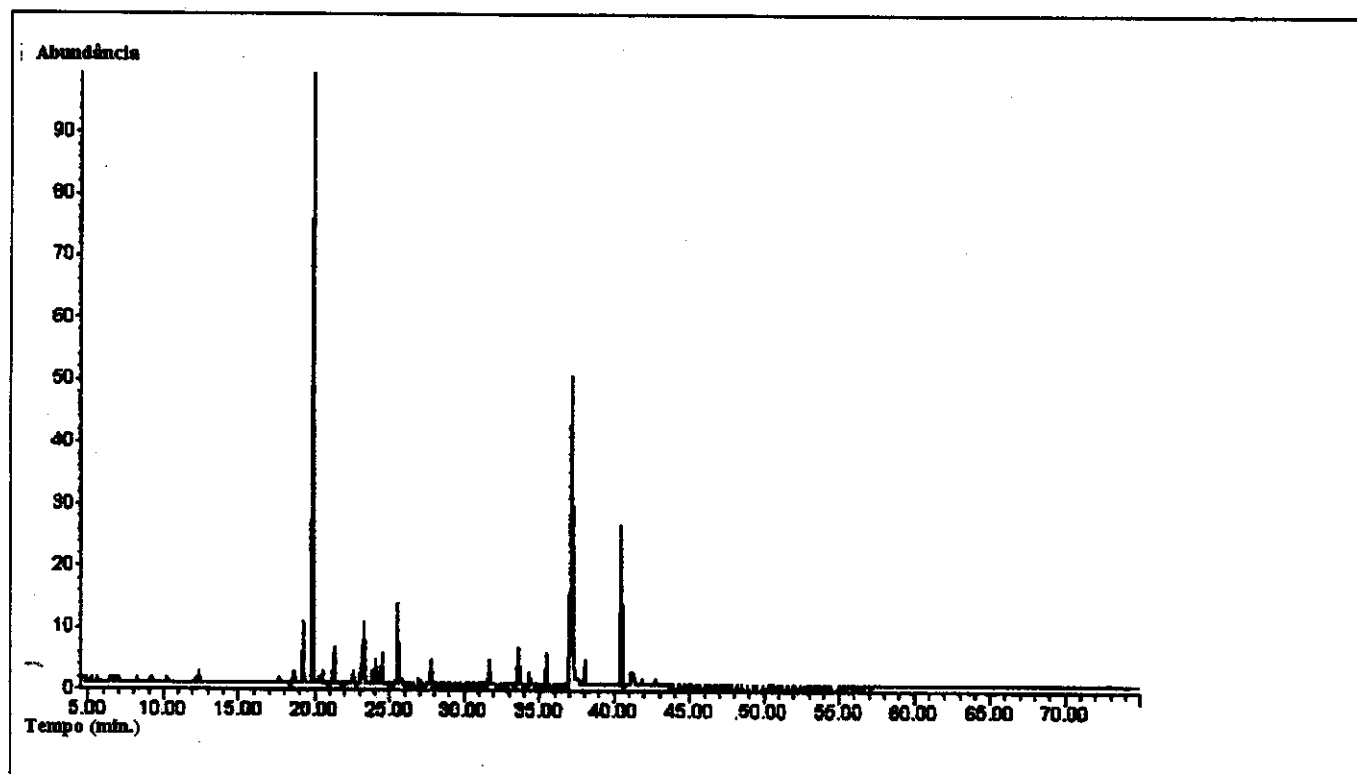
Cromatograma 8. Cromatograma de CG/EM do óleo floral de *Oncidium hookeri*



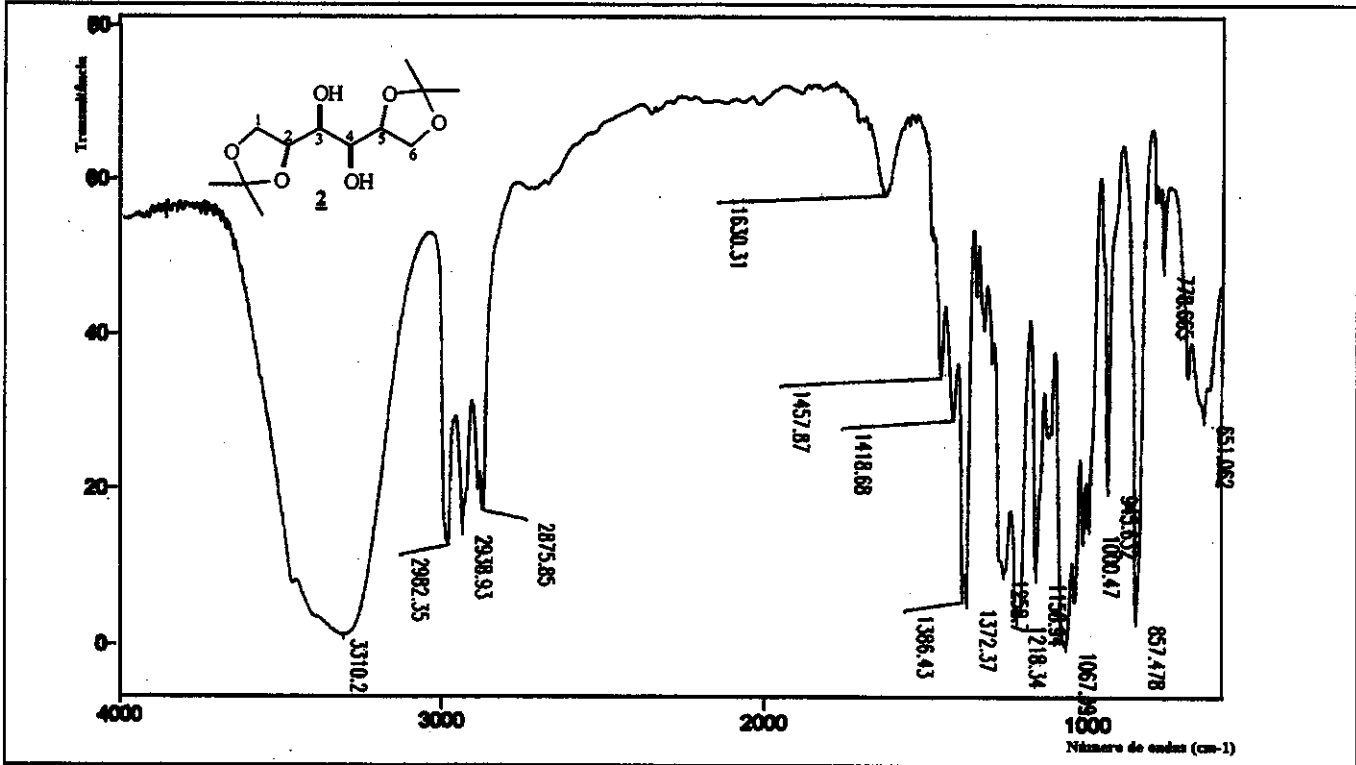
Cromatograma 11. Cromatograma de CG/EM do óleo floral de *Oncidium pumilum*



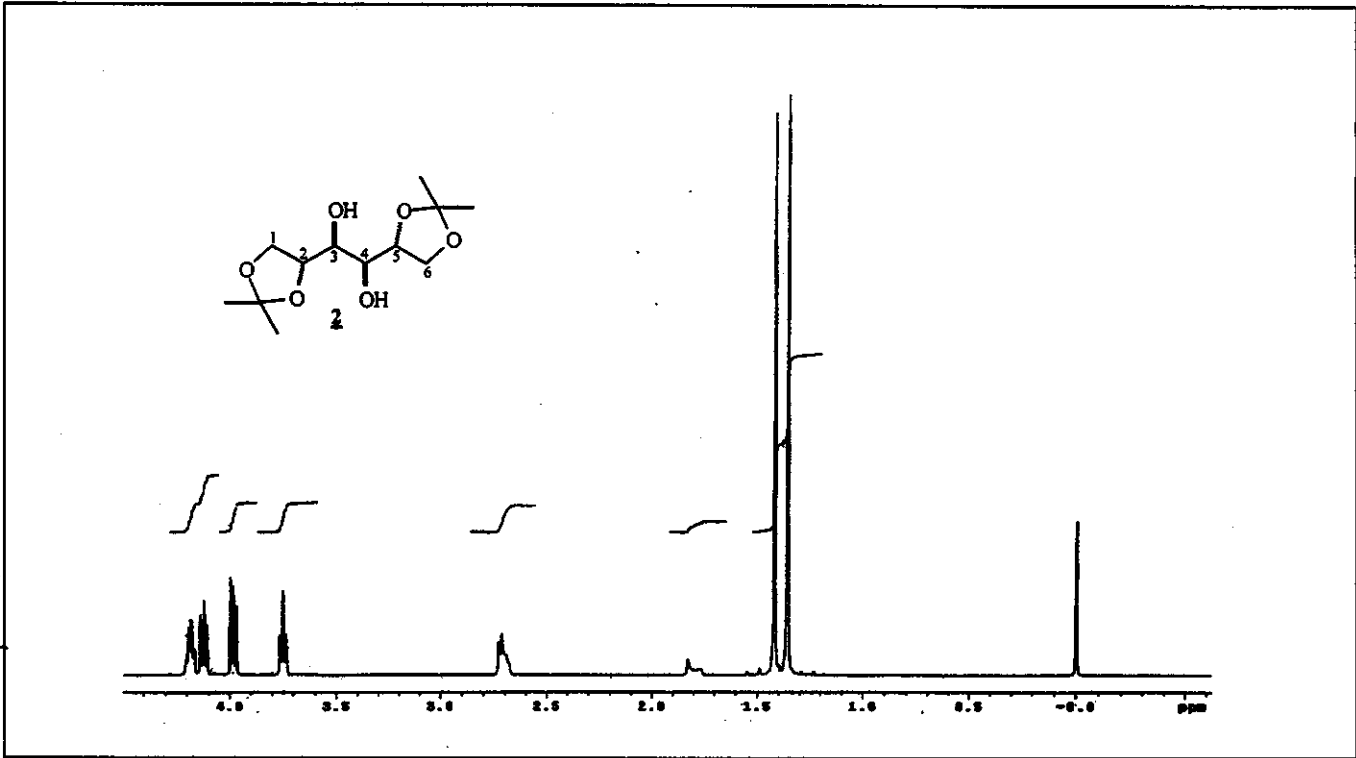
Cromatograma 12. Cromatograma de CG/EM do óleo floral de *Gomesa crispa*

Cromatograma 13. Cromatograma de CG/EM do óleo floral de *Gomesa recurva*Cromatograma 14. Cromatograma de CG/EM do óleo floral de *Gomesa* sp.

ESPECTROS

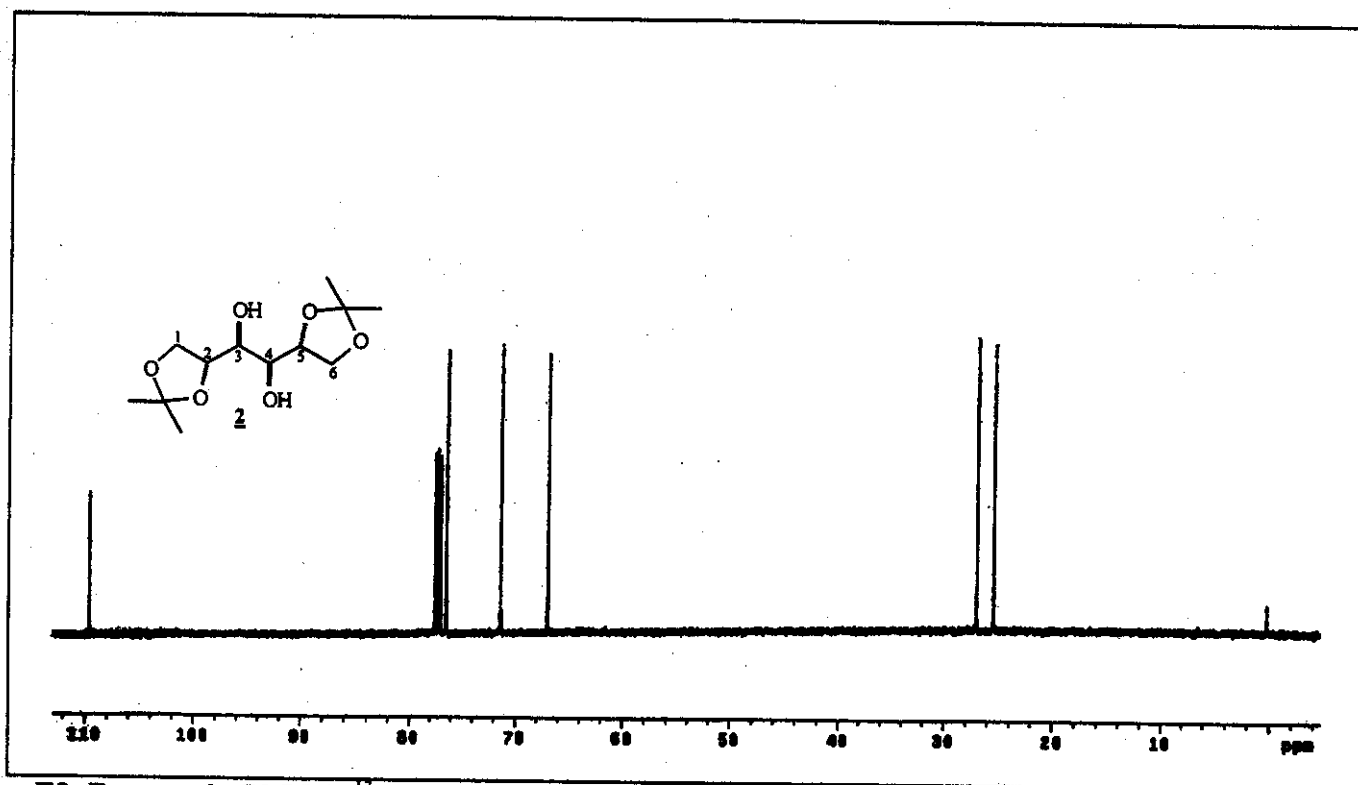


E1-Espectro no Infra Vermelho (pastilha de KBr) do 1,2:5,6 – Diisopropilideno-D-manitol, 2

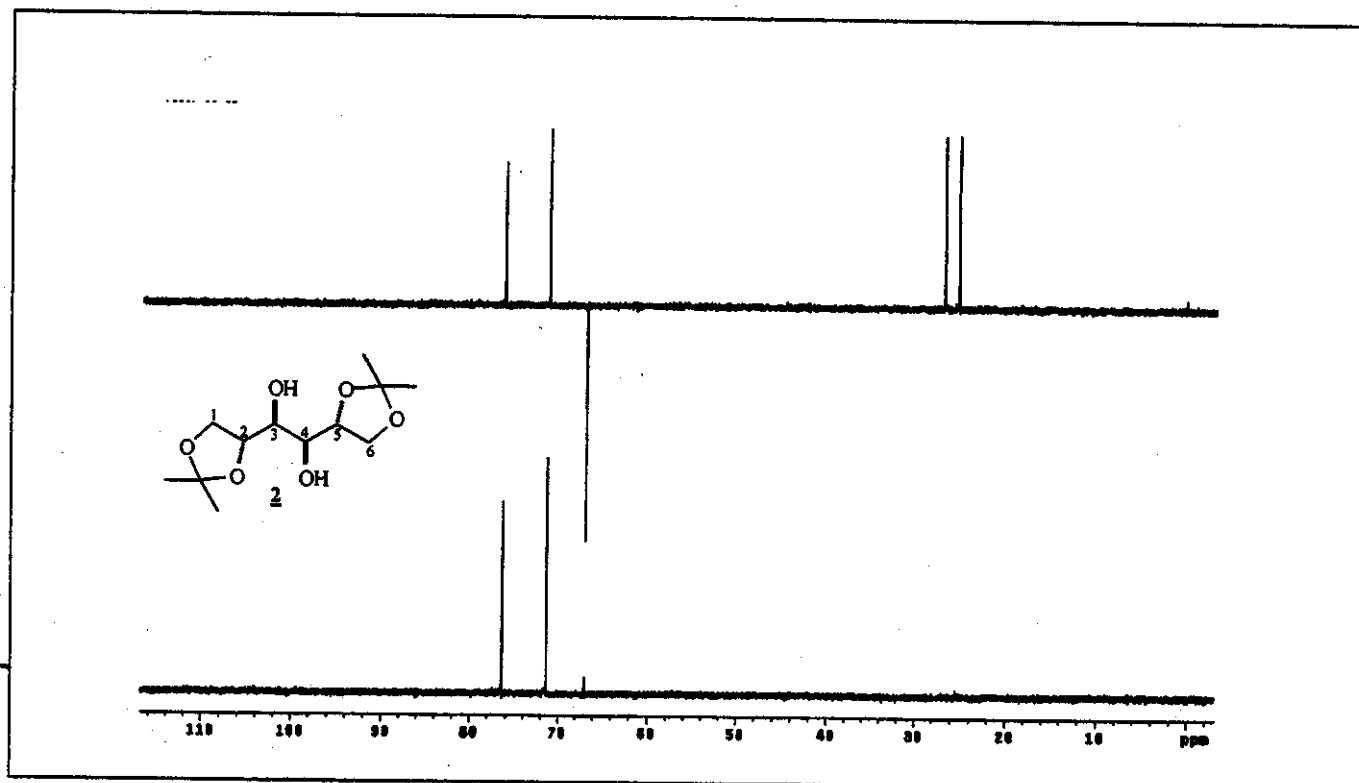


E2- Espectro de RMN de ^1H (499.88 MHz, CDCl_3) do 1,2:5,6 – Diisopropilideno-D-manitol, 2

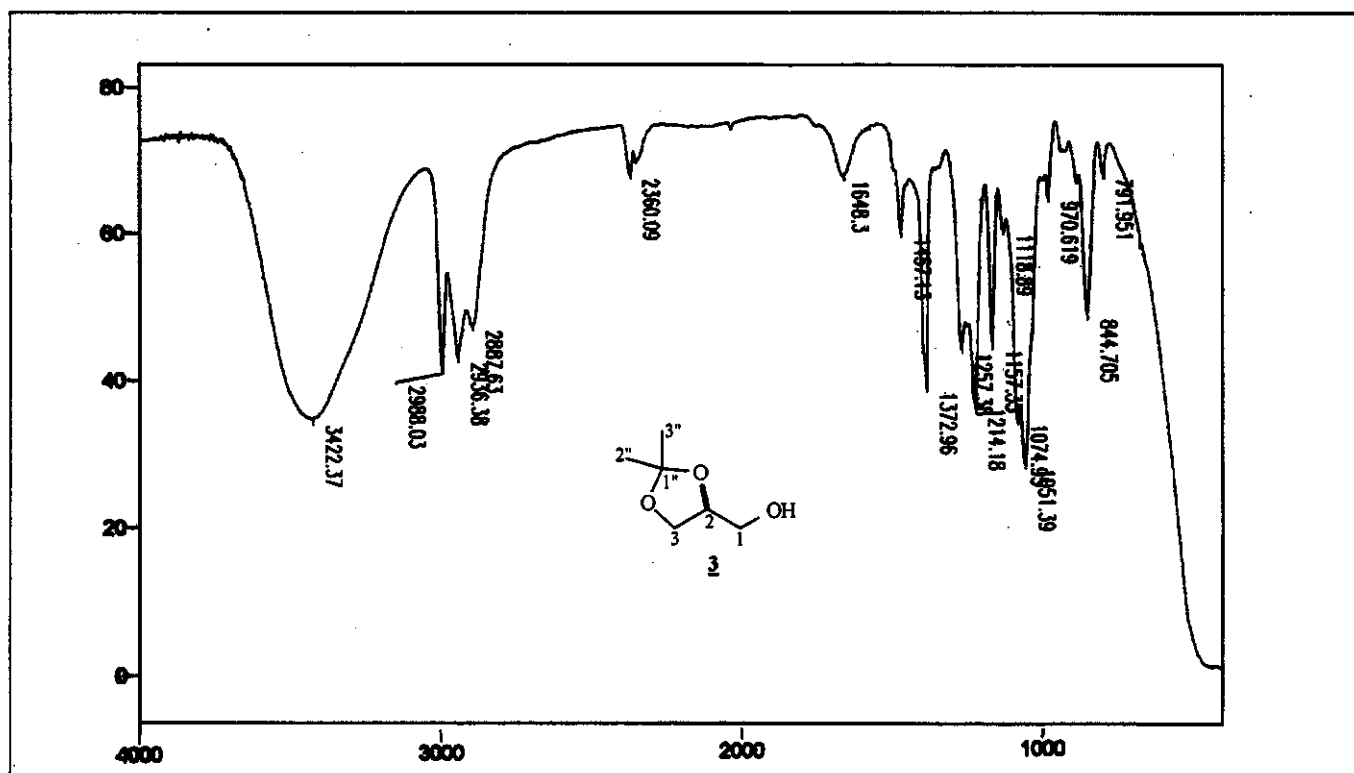
ESPECTROS



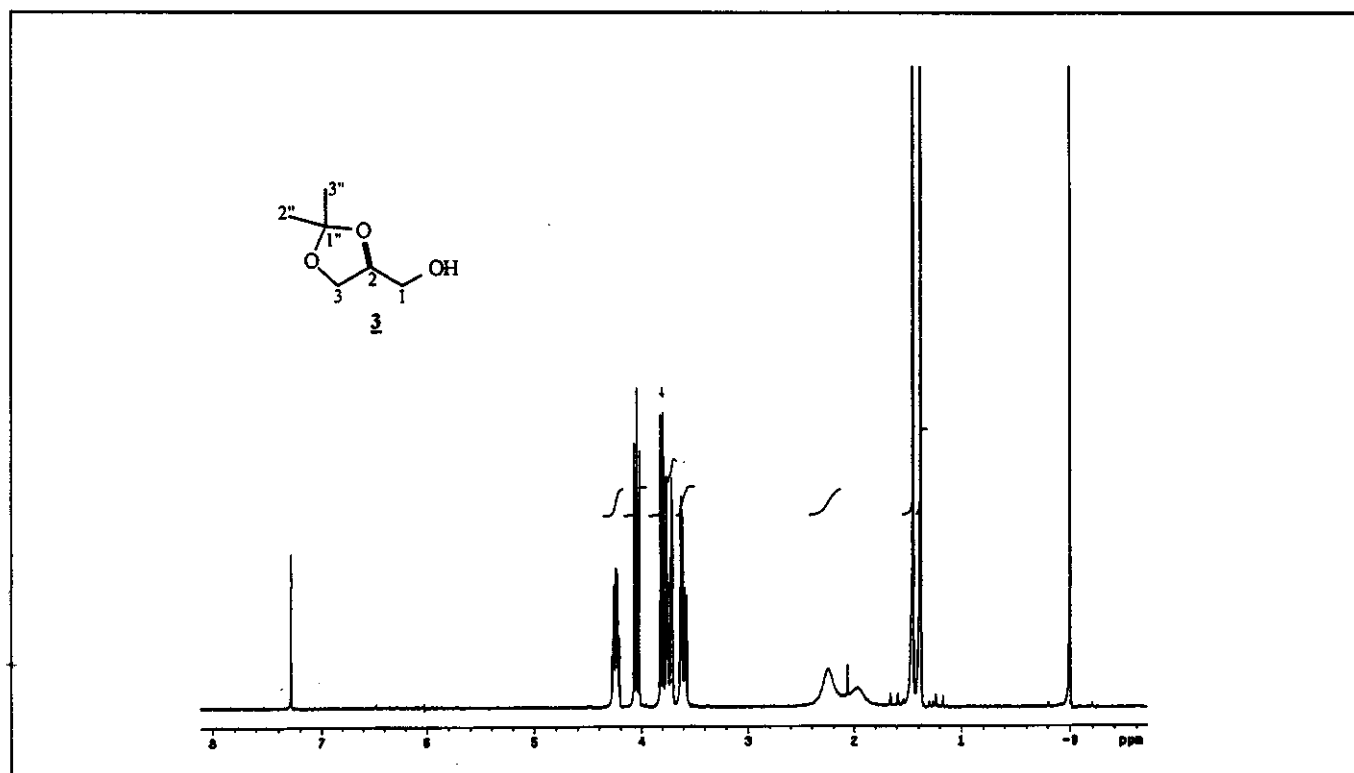
E3- Espectro de RMN de ¹³C desacoplado (125.69 MHz, CDCl₃) do 1,2:5,6 – Diisopropilideno-D-manitol, **2**



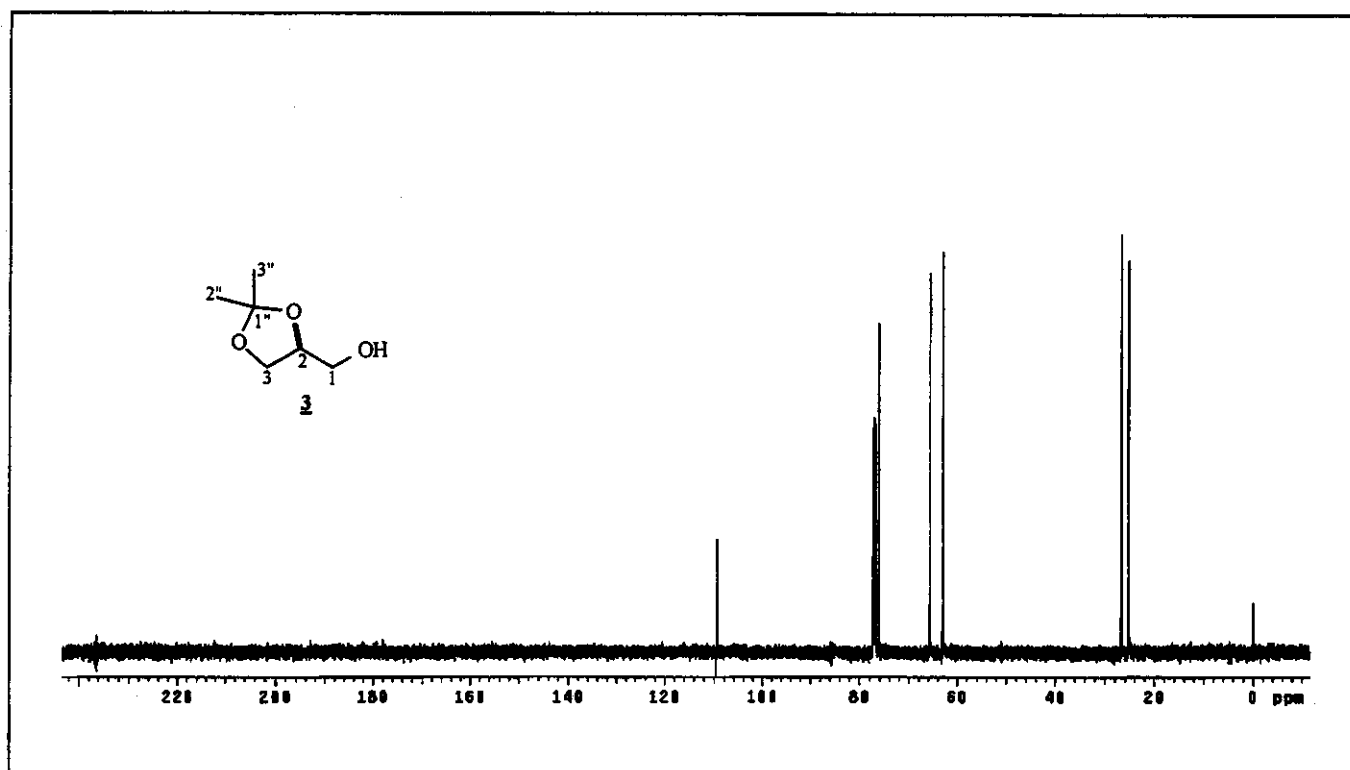
E4 - Espectro de RMN de ¹³C a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl₃) do 1,2:5,6 – Diisopropilideno-D-manitol, **2**



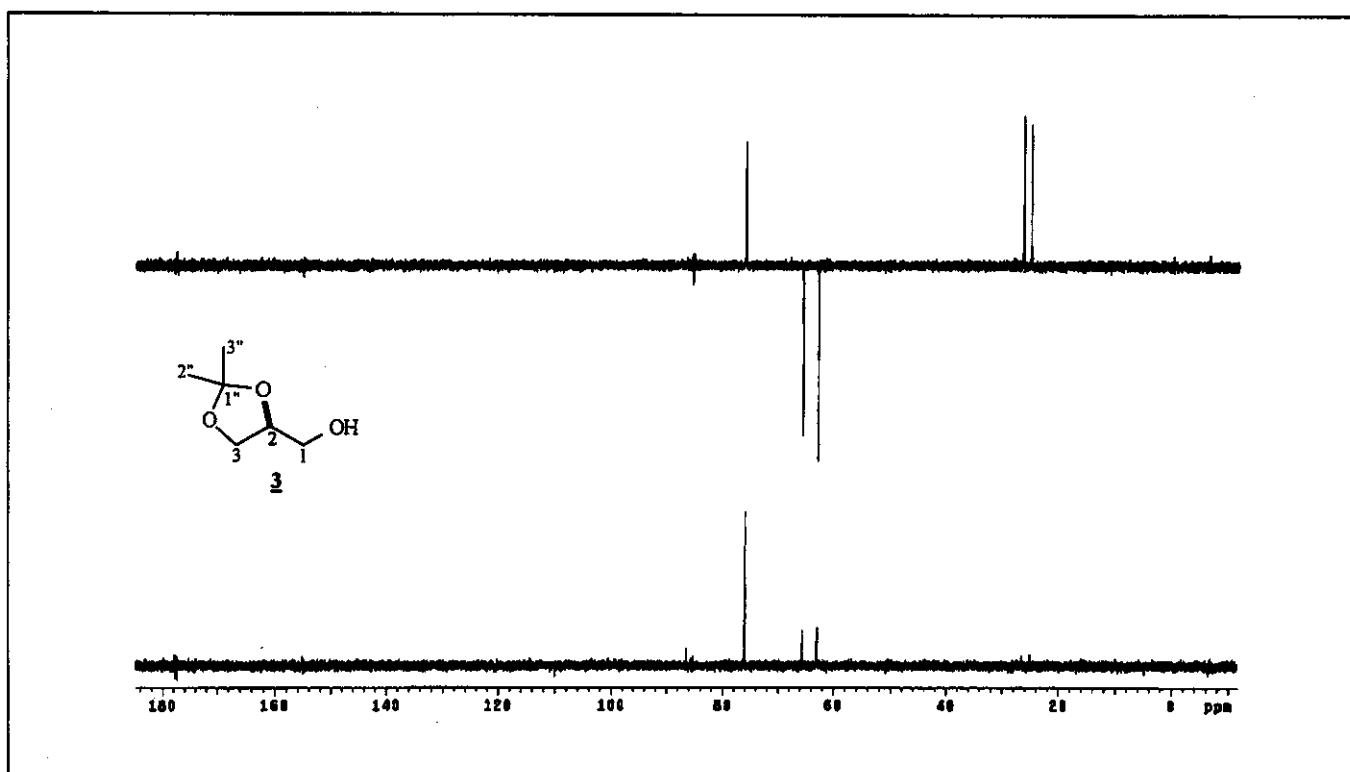
E5 – Espectro de Infra Vermelho (filme) do 2,3-O-Isopropilideno-D-glicerol, **3**



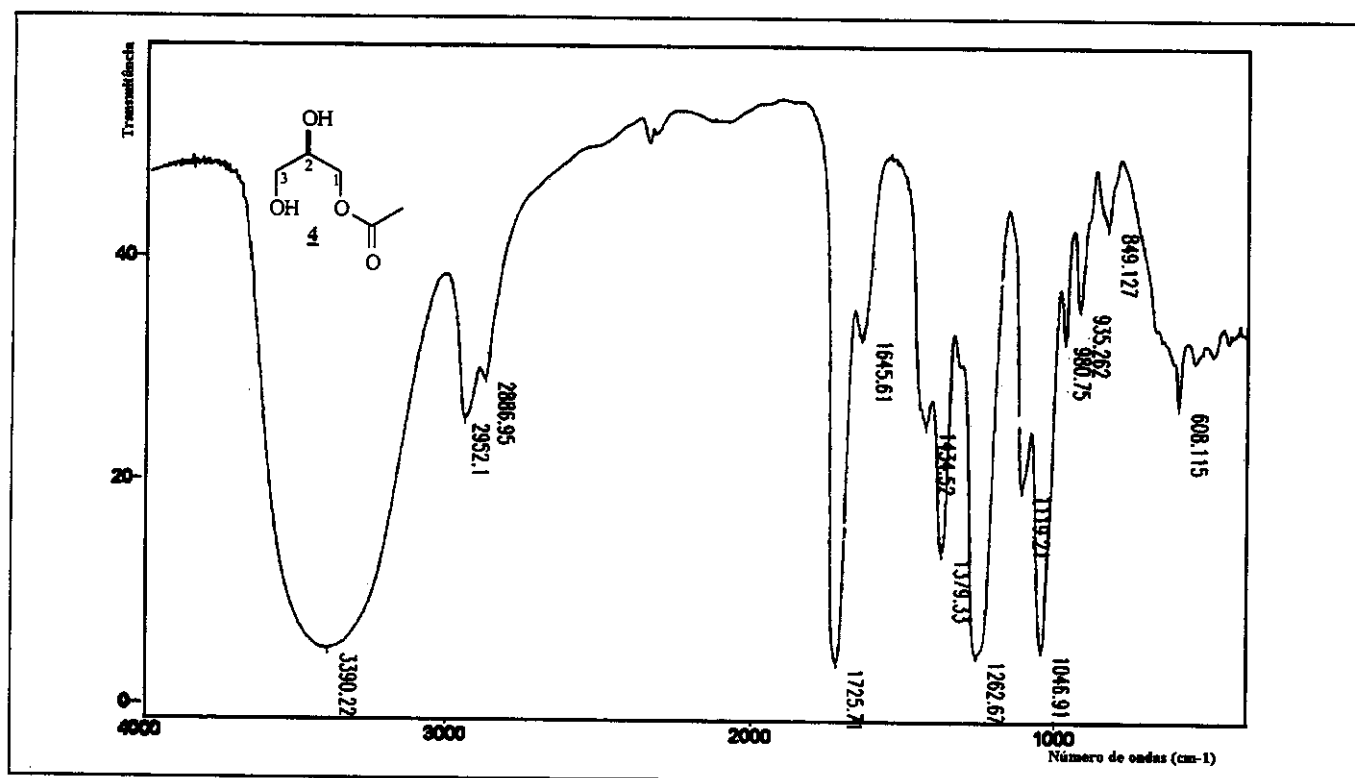
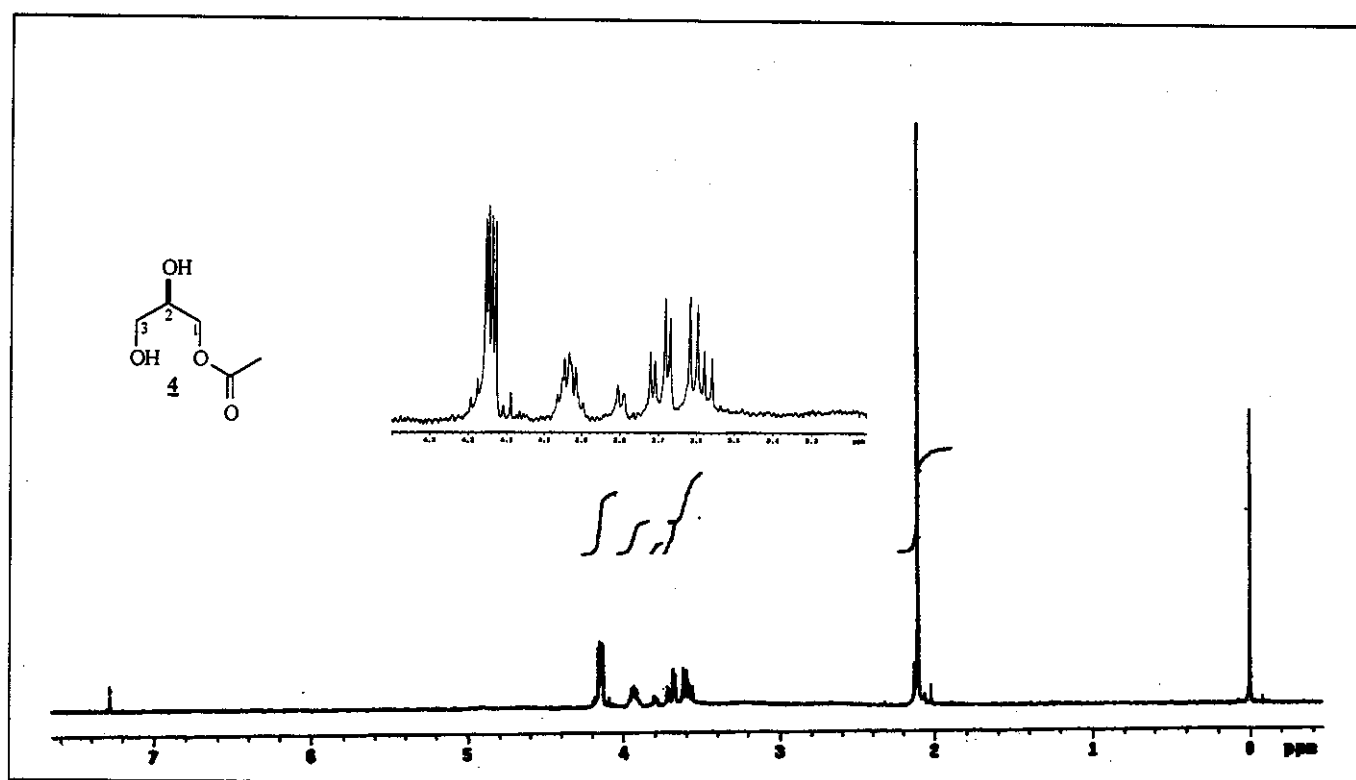
E6 – Espectro de RMN de ¹H (499.88 MHz, CDCl₃) do 2,3-O-Isopropilideno-D-glicerol, **3**

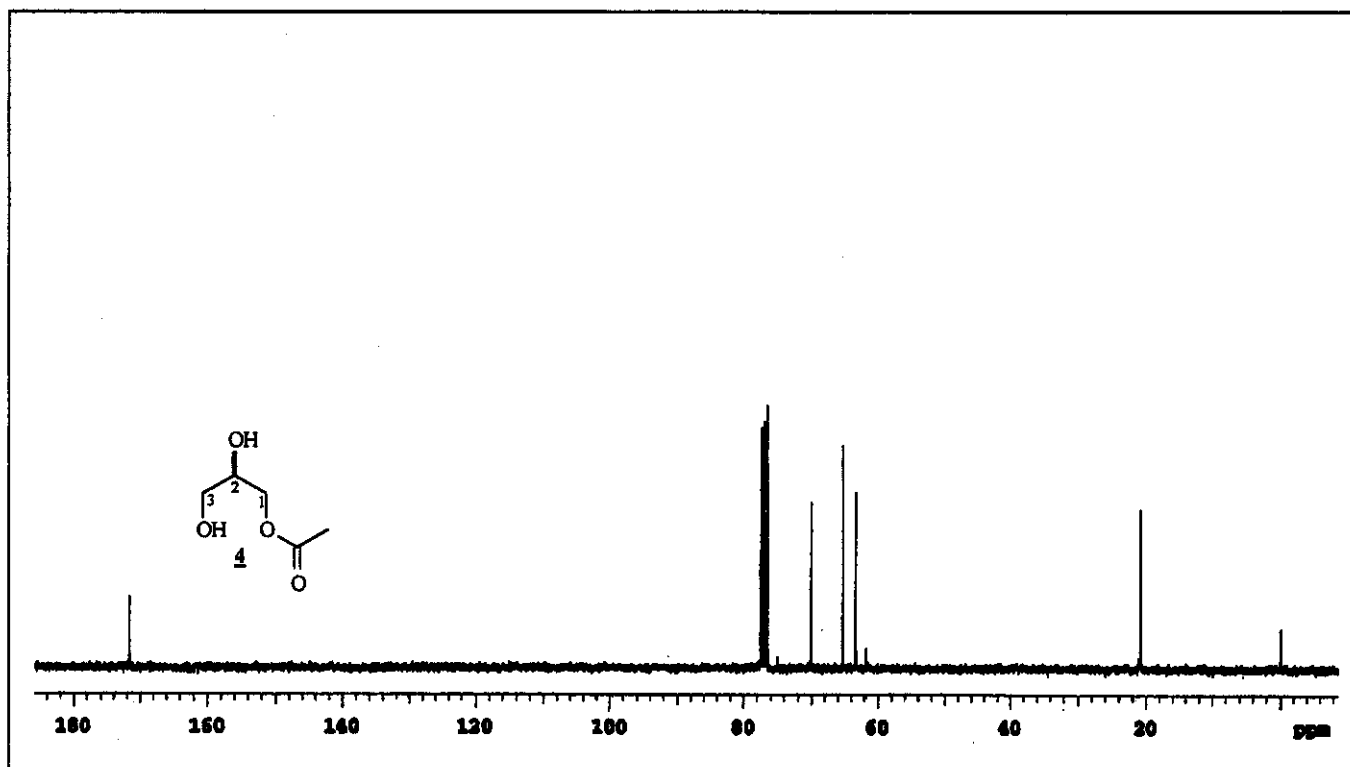


E7 – Espectro de RMN de ¹³C desacoplado (125.69 MHz, CDCl₃) do 2,3-O-Isopropilideno-D-glicerol, **3**

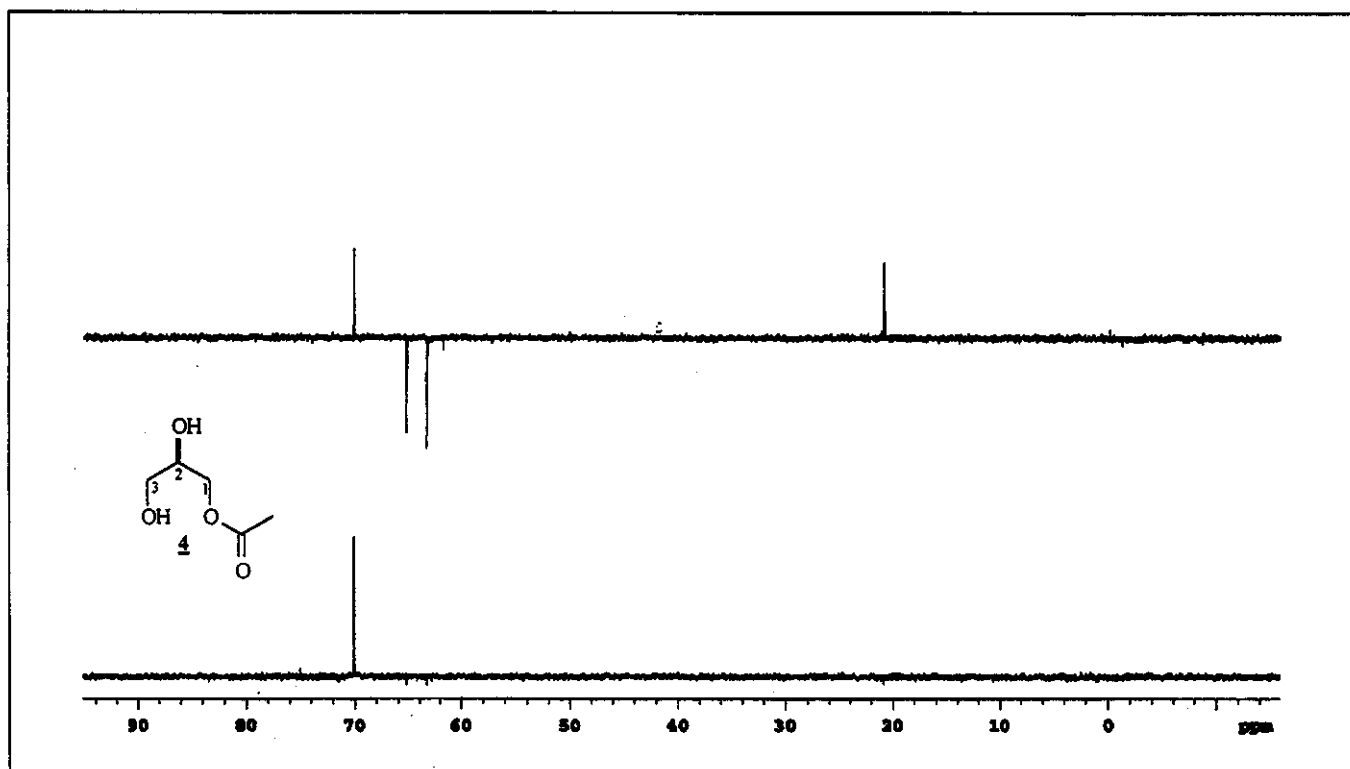


E8 – Espectro de RMN de ¹³C a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125.69 MHz, CDCl₃) do 2,3-O-Isopropilideno-D-glicerol, **3**

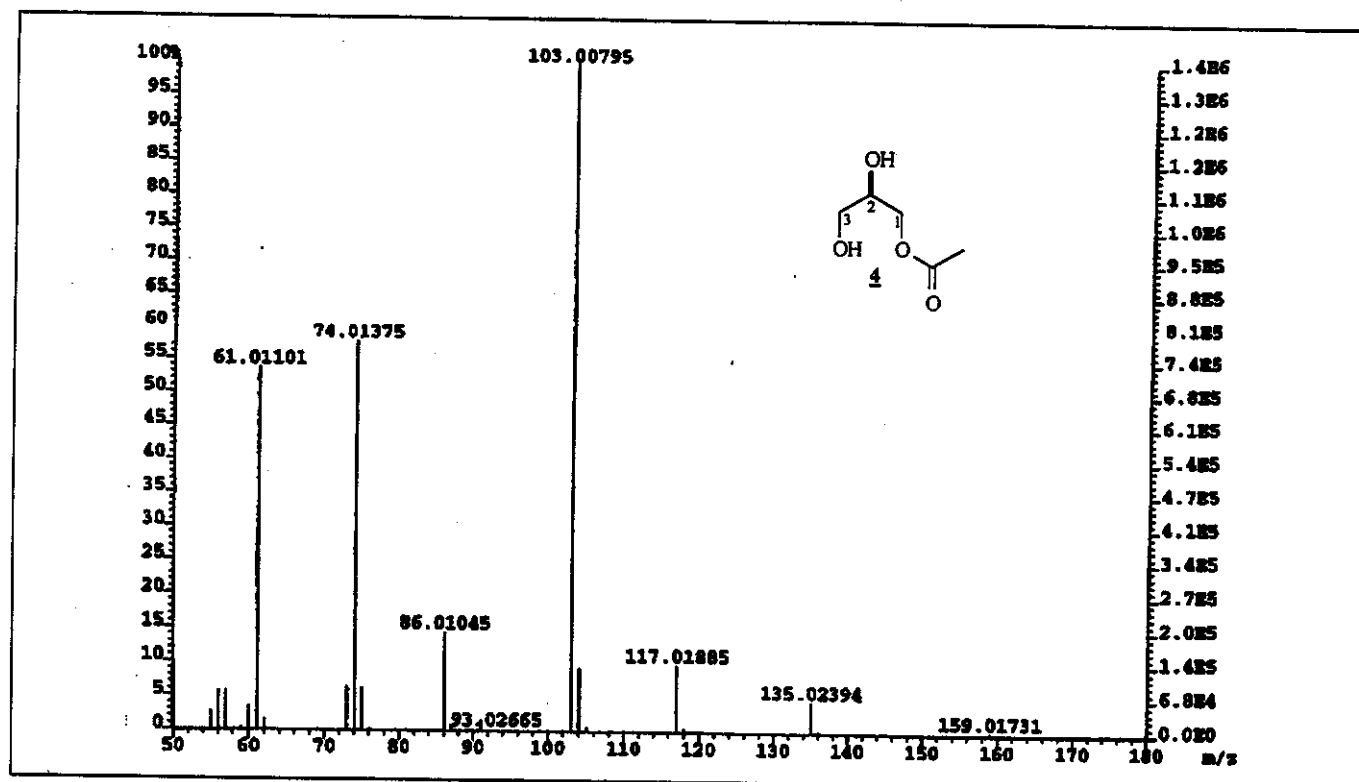
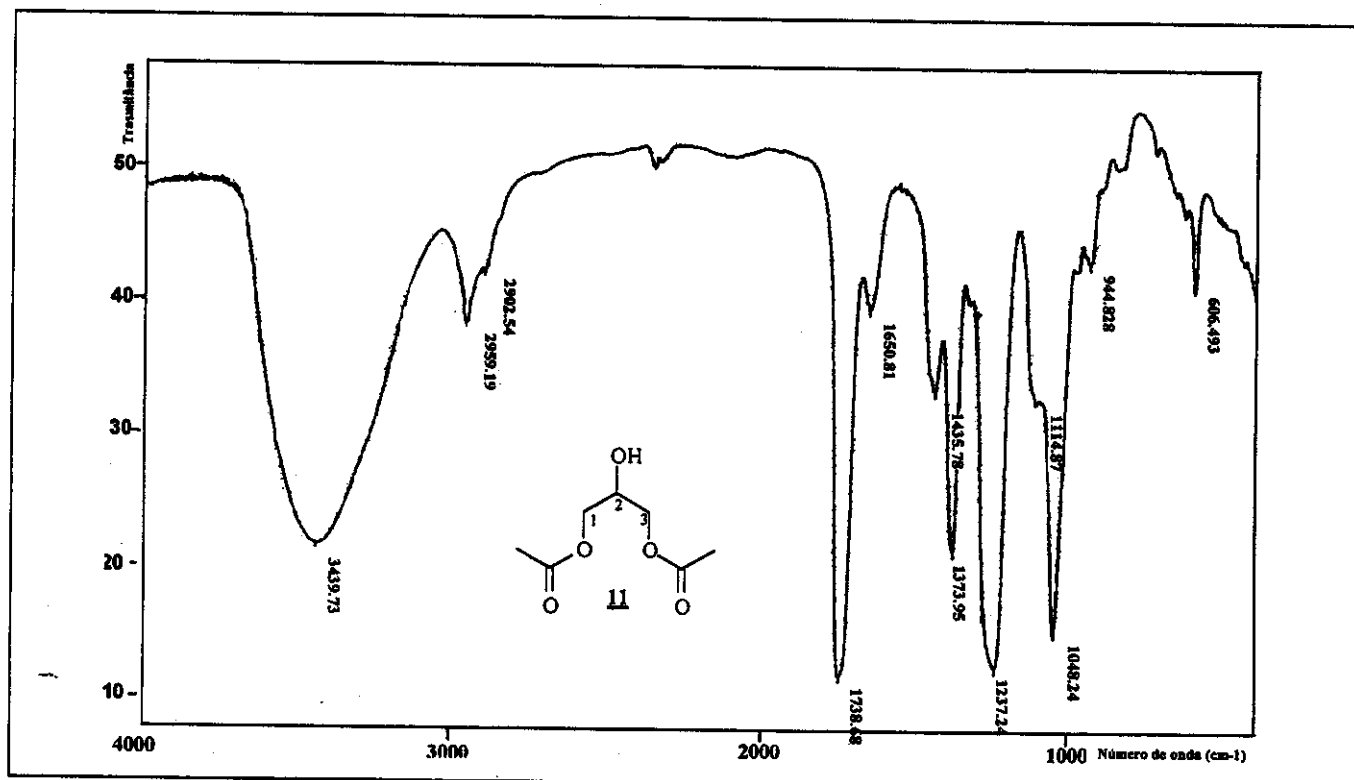
E9 – Espectro de Infra Vermelho (filme) do 1-acetil-glicerol, **4**E10 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do 1-acetil-glicerol, **4**

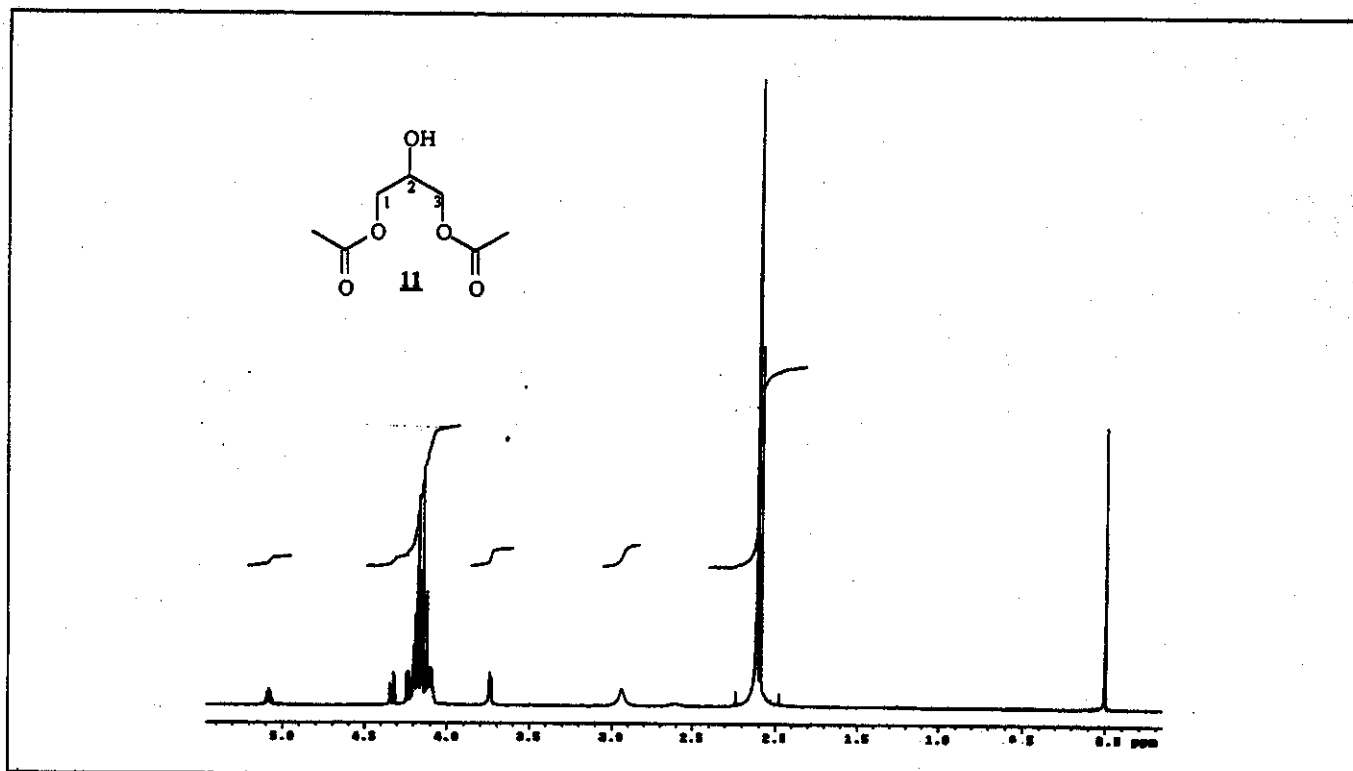


E11 – Espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (75.45 MHz, CDCl_3) do 1-acetil-glicerol, 4

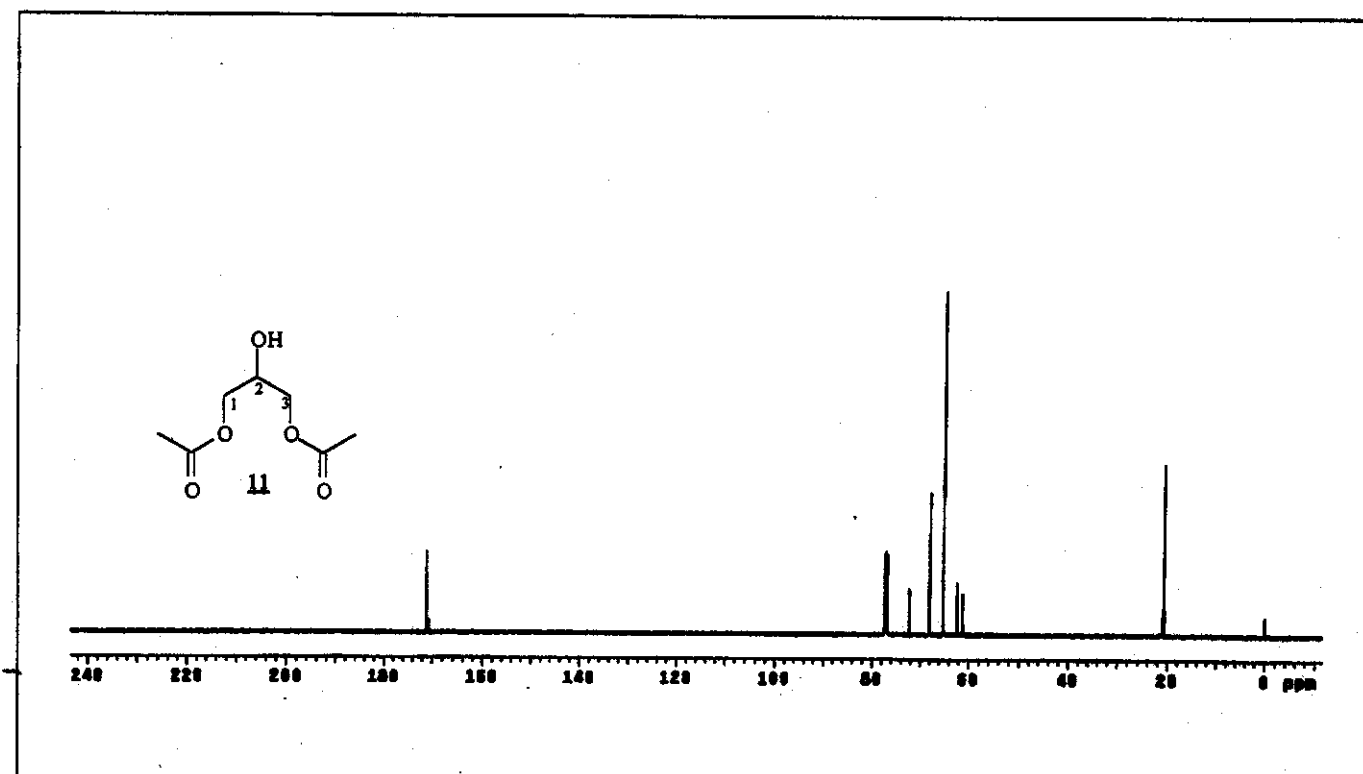


E12 – Espectro de RMN de ^{13}C a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do 1-acetil-glicerol, 4

E13 - Espectro de Massas (EI 70 eV) do 1-acetil-glicerol, 4E14 - Espectro de Infra Vermelho (filme) do 1,3-diacetil-glicerol, 11

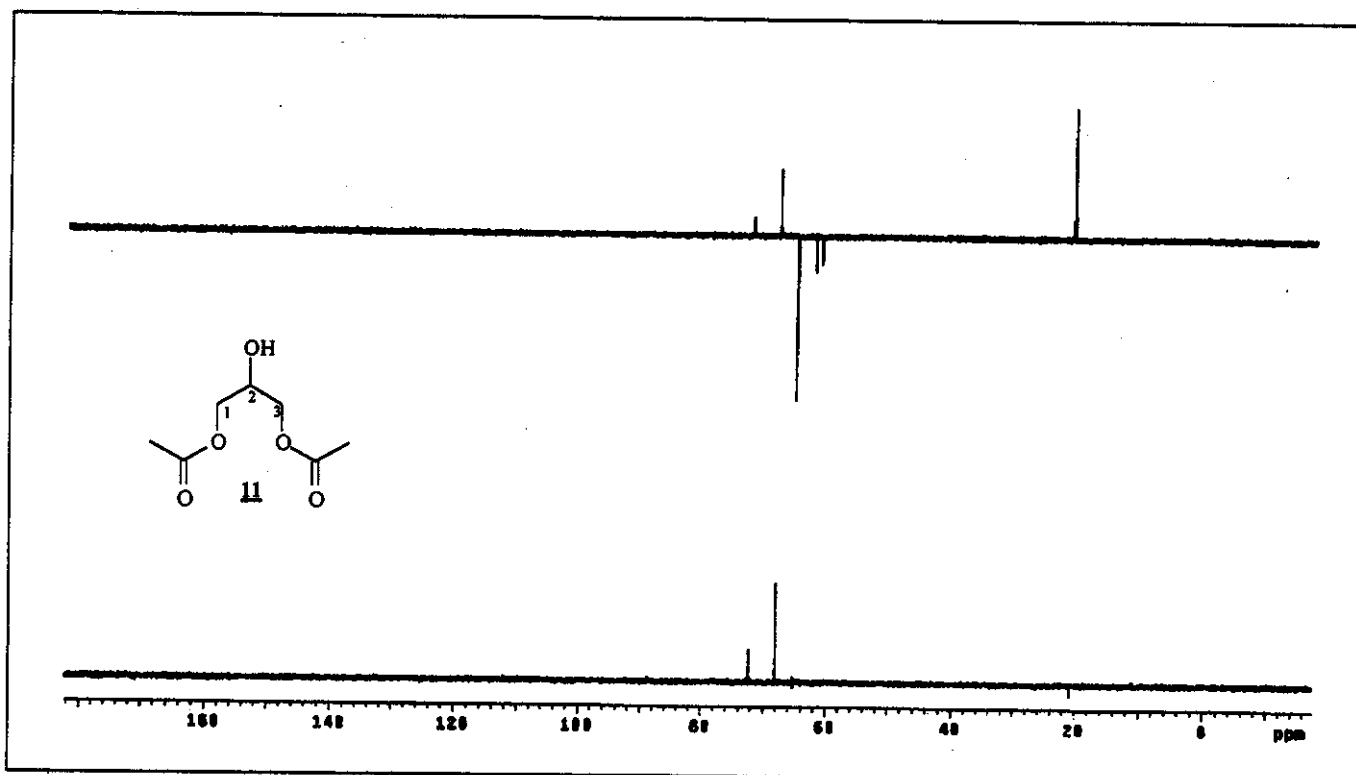


E15 – Espectro de RMN de ^1H (499.88 MHz, CDCl_3) do 1,3-diacetil-glicerol, **11**

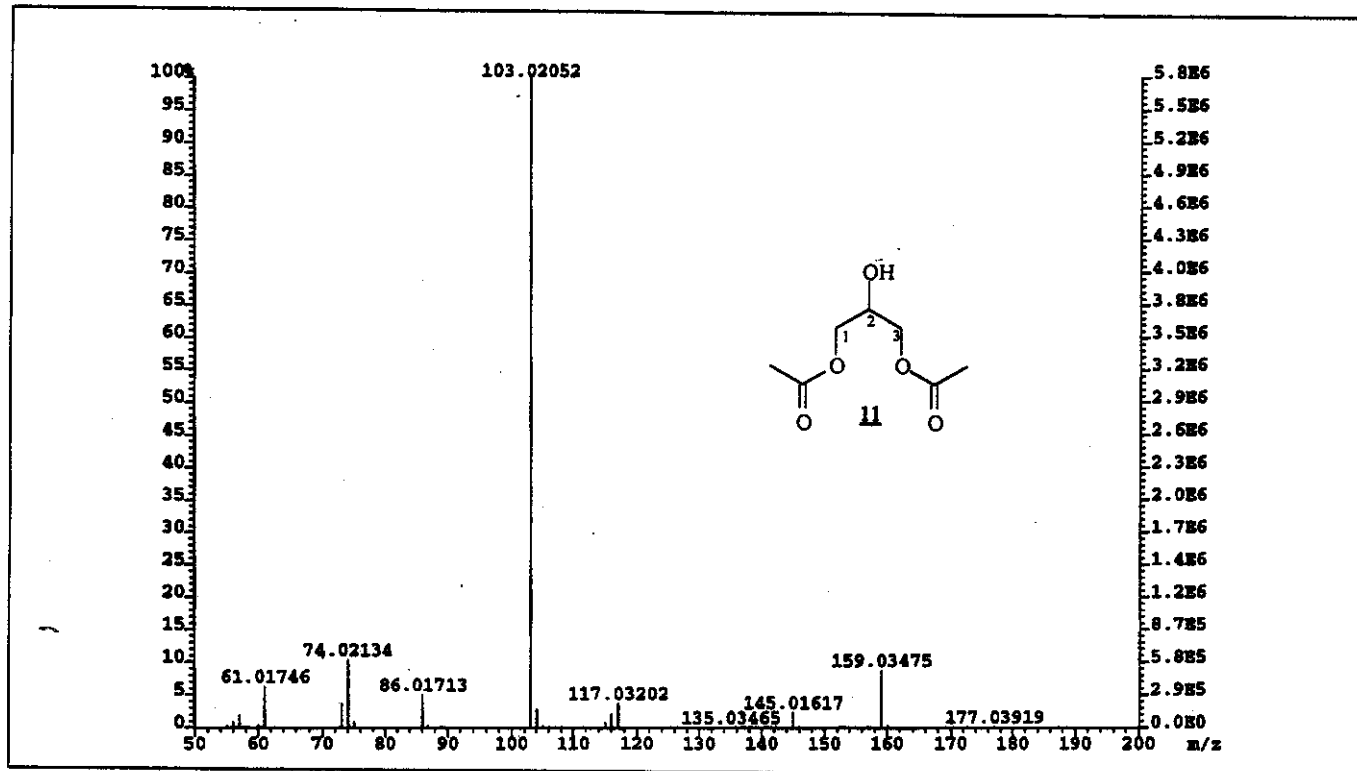


E16 – Espectro de RMN desacoplado (125.69 MHz, CDCl_3) do 1,3-diacetil-glicerol, **11**

ESPECTROS

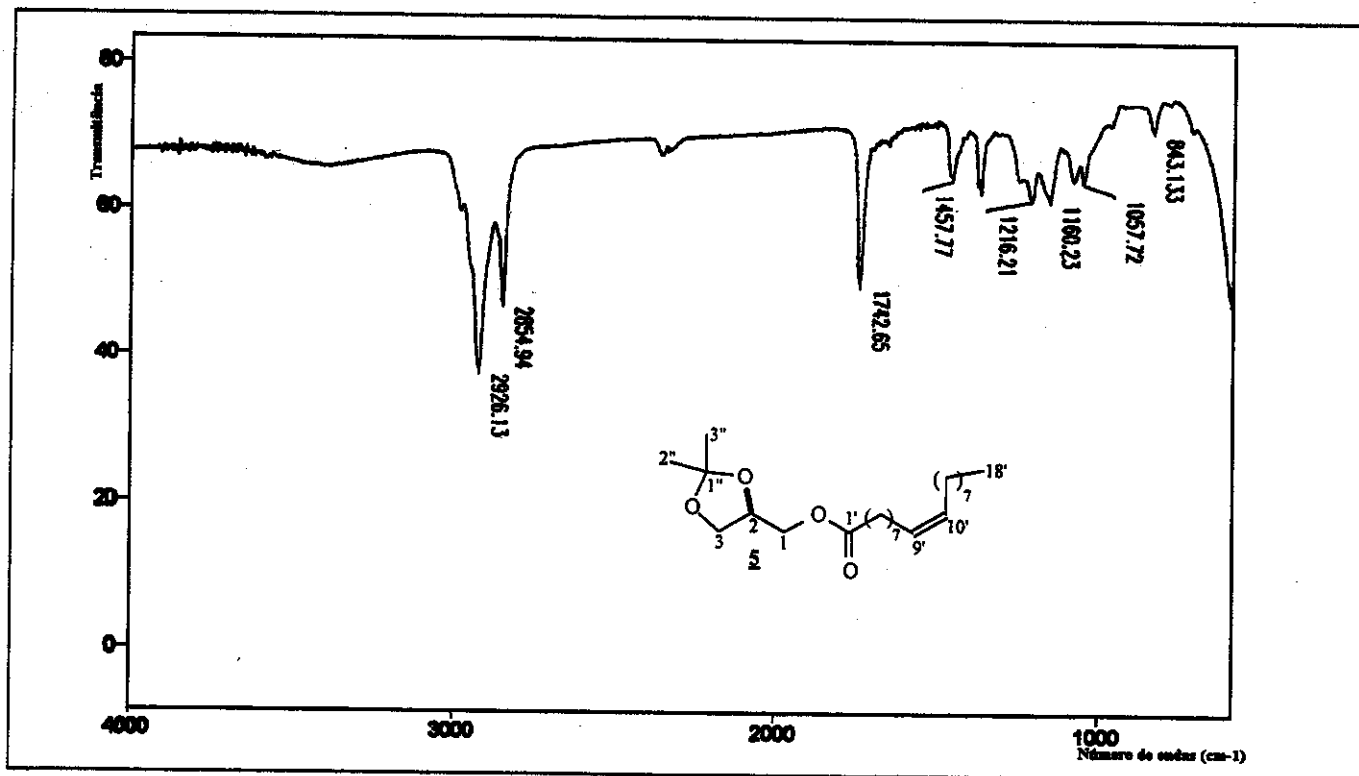


E17 –Espectro de RMN de ¹³C a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125.69 MHz, CDCl₃) do 1,3-diacetil-glicerol, **11**

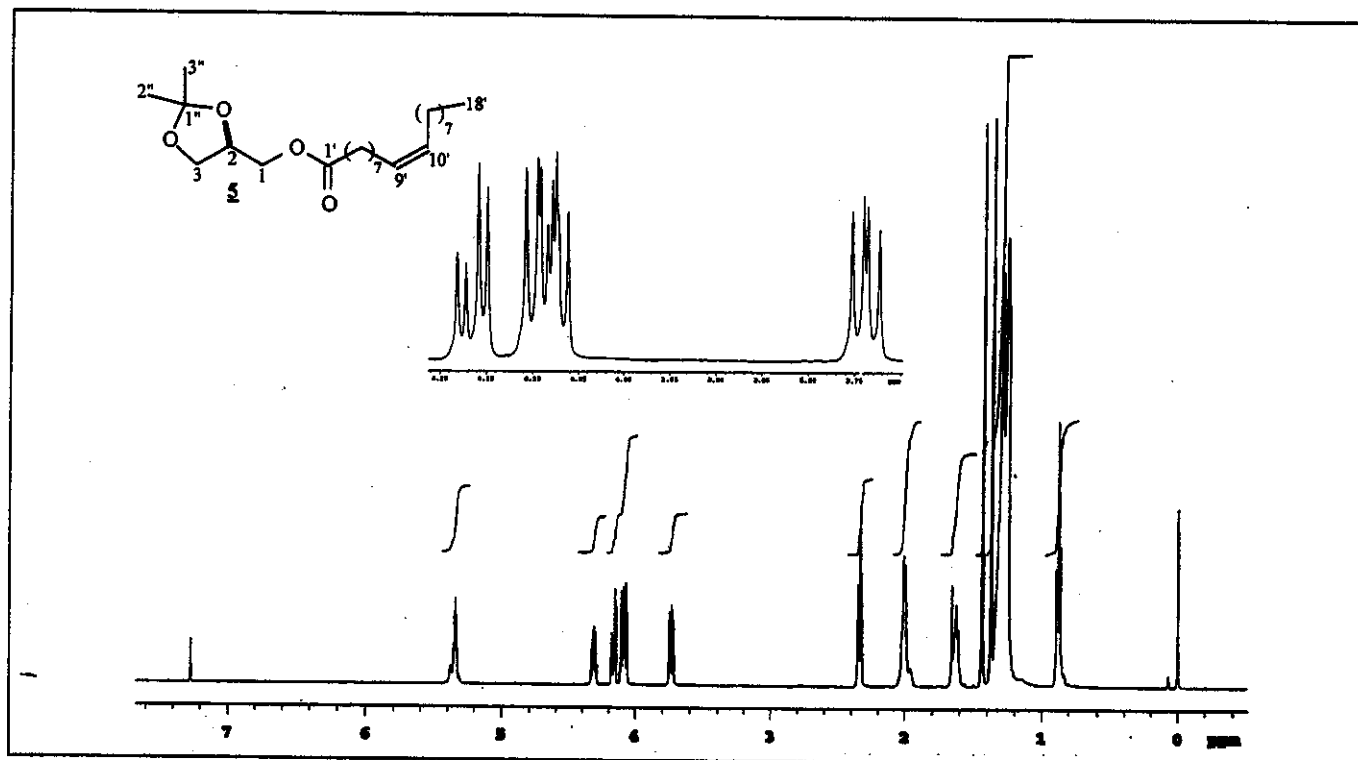


E18 –Espectro de Massas (EI 70 eV) do 1,3-diacetil-glicerol, **11**

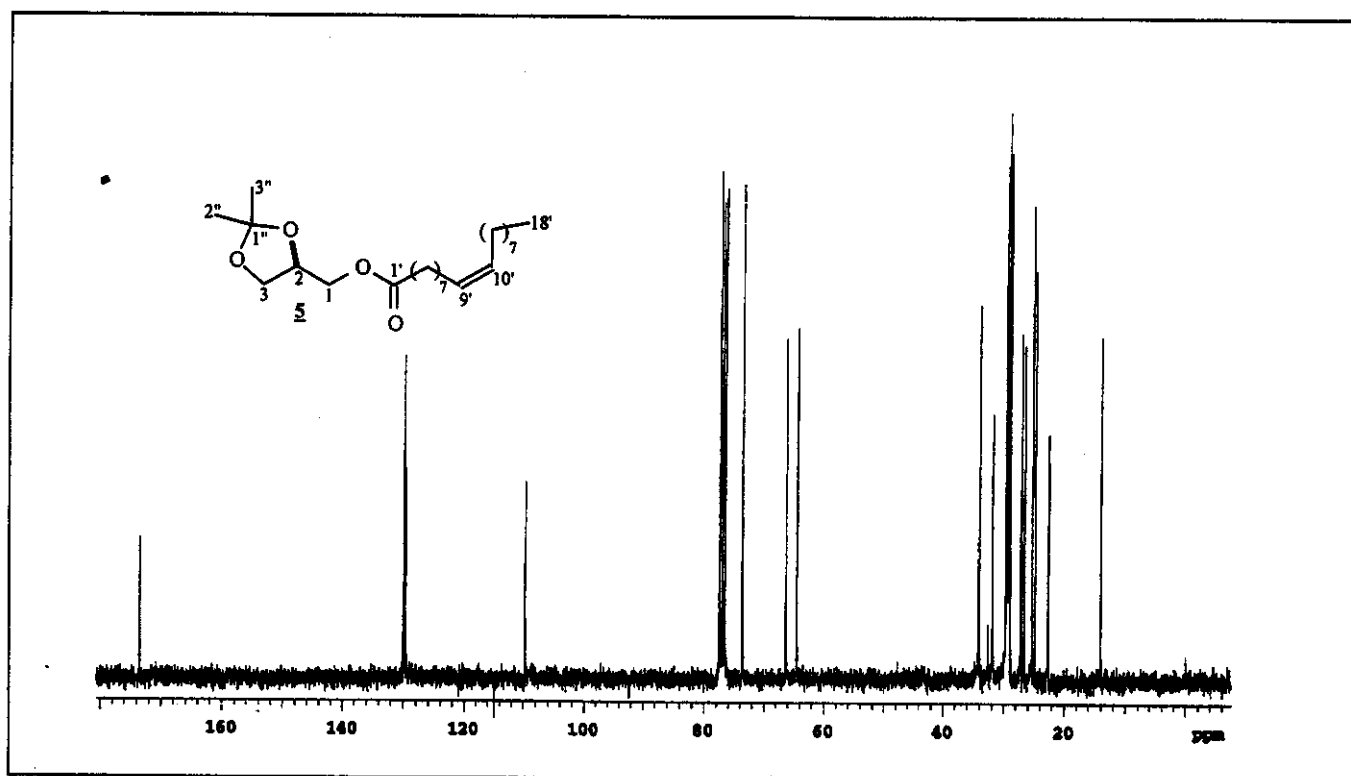
ESPECTROS



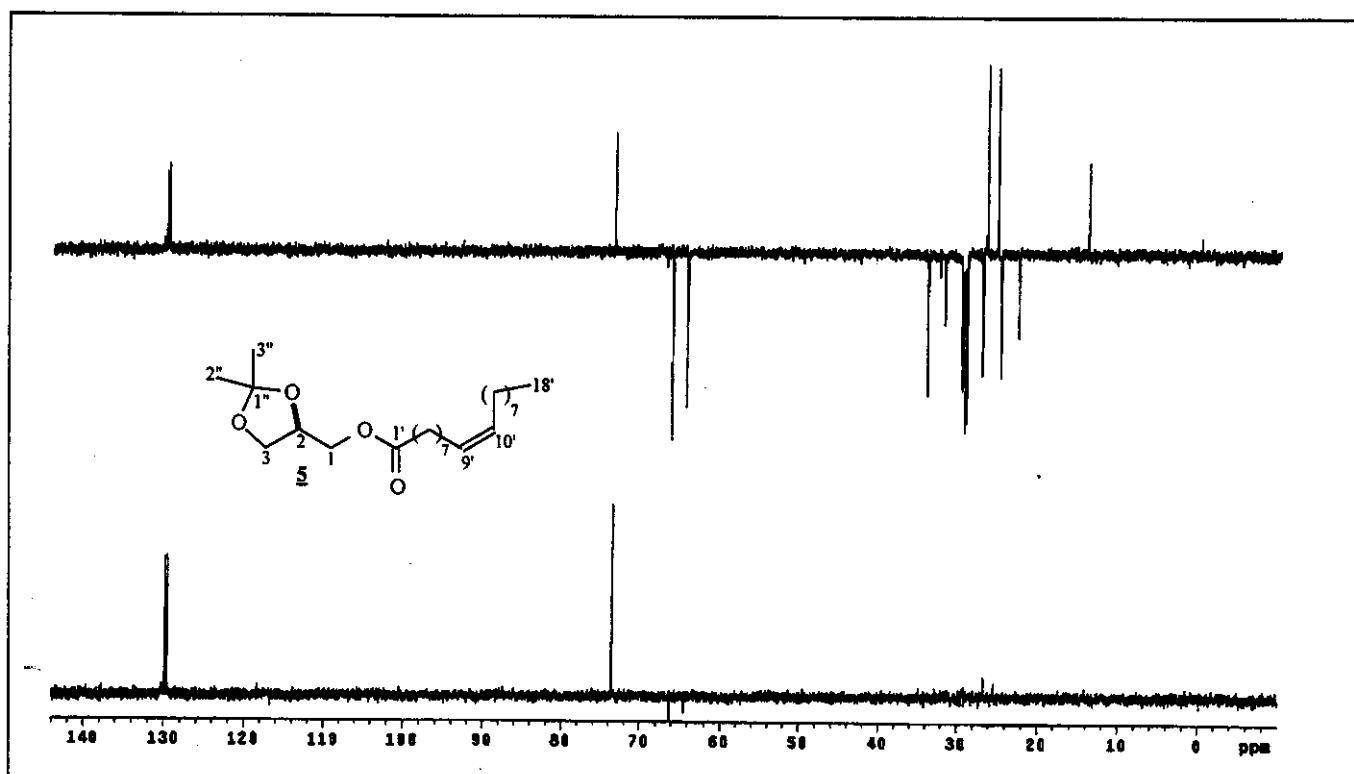
E19 – Espectro de Infra Vermelho (filme) do 2,3-isopropilideno-1-oleoil-glicerol, 5



E20 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 2,3-isopropilideno-1-oleoil-glicerol, 5

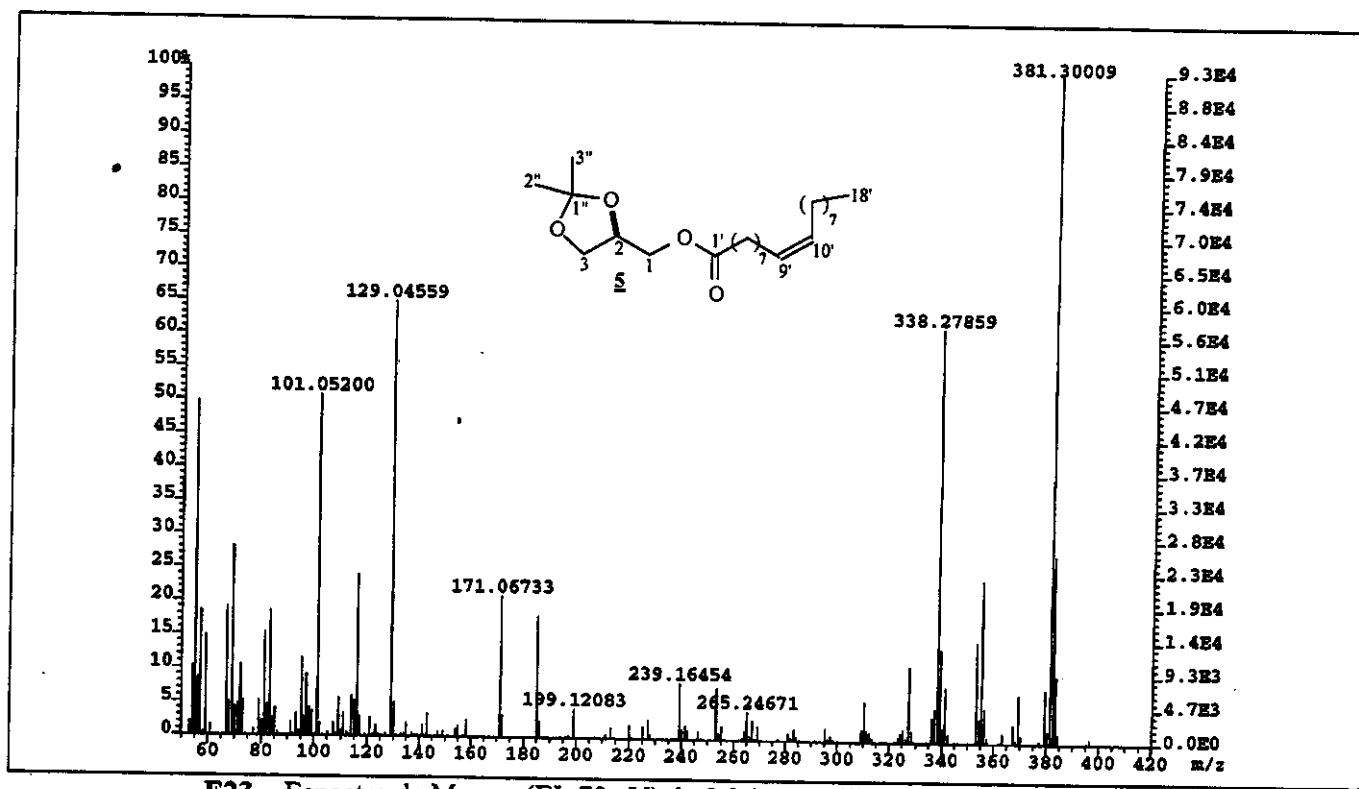


E21 – Espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (75.45 MHz, CDCl_3) do 2,3-isopropilideno-1-oleoil-glicerol, **5**

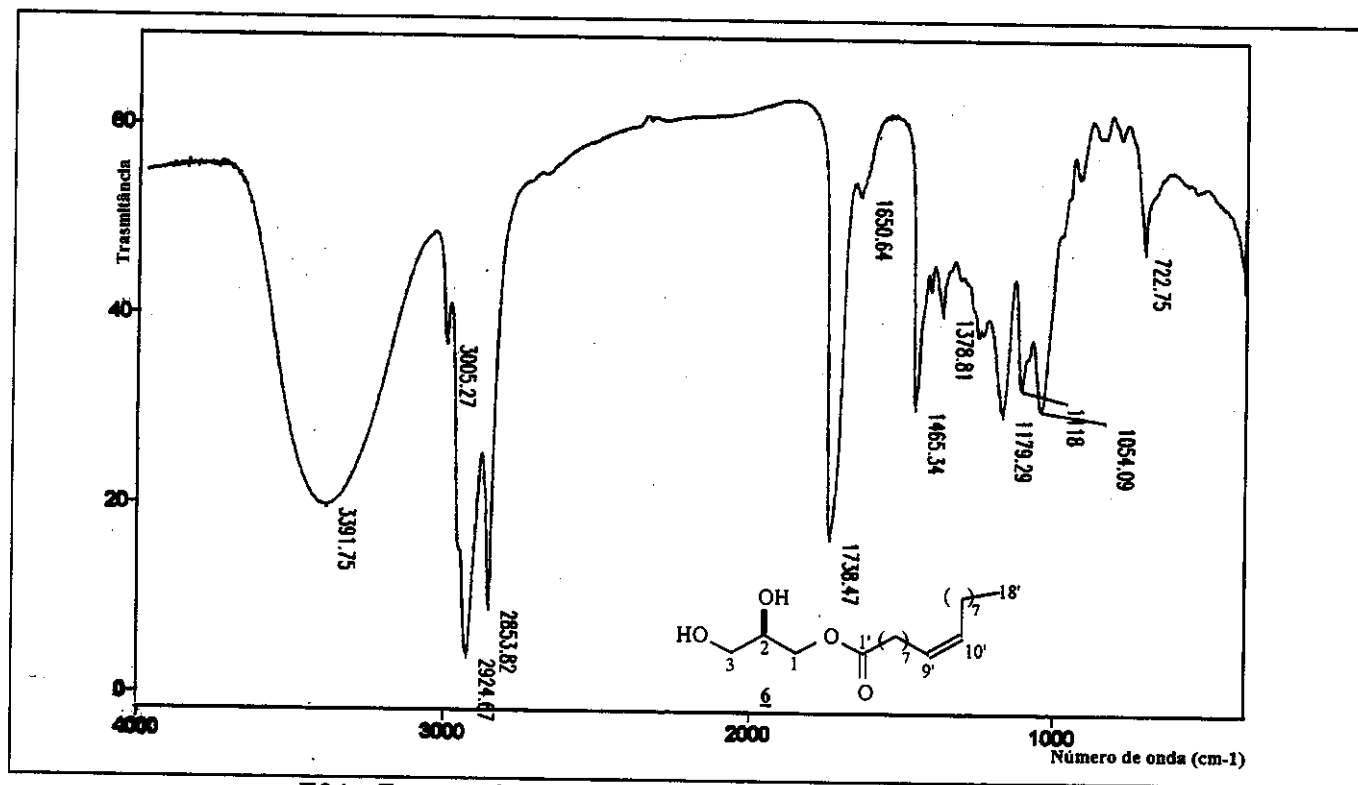


E22 – Espectro de RMN de ^{13}C a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do 2,3-isopropilideno-1-oleoil-glicerol, **5**

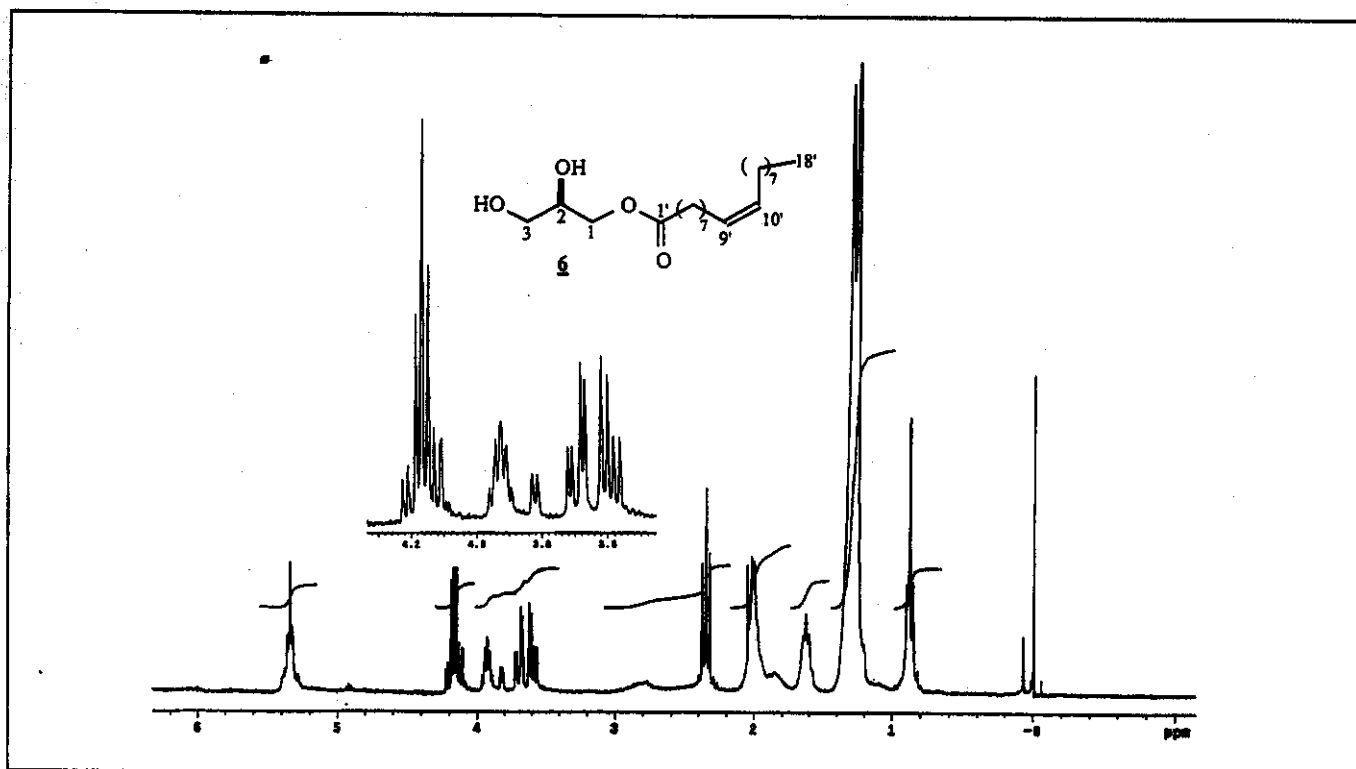
ESPECTROS



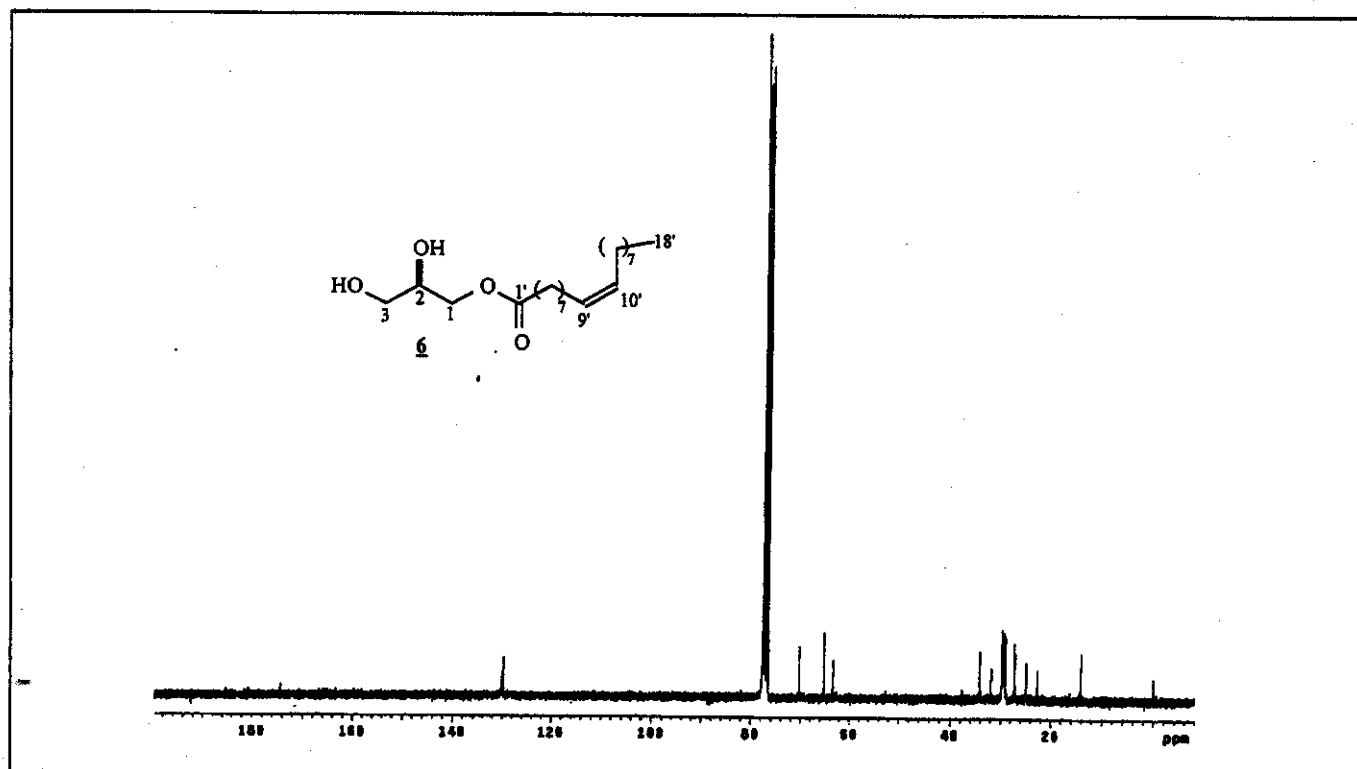
E23 – Espectro de Massas (EI, 70 eV) do 2,3-isopropilideno-1-oleoil-glicerol, **5**



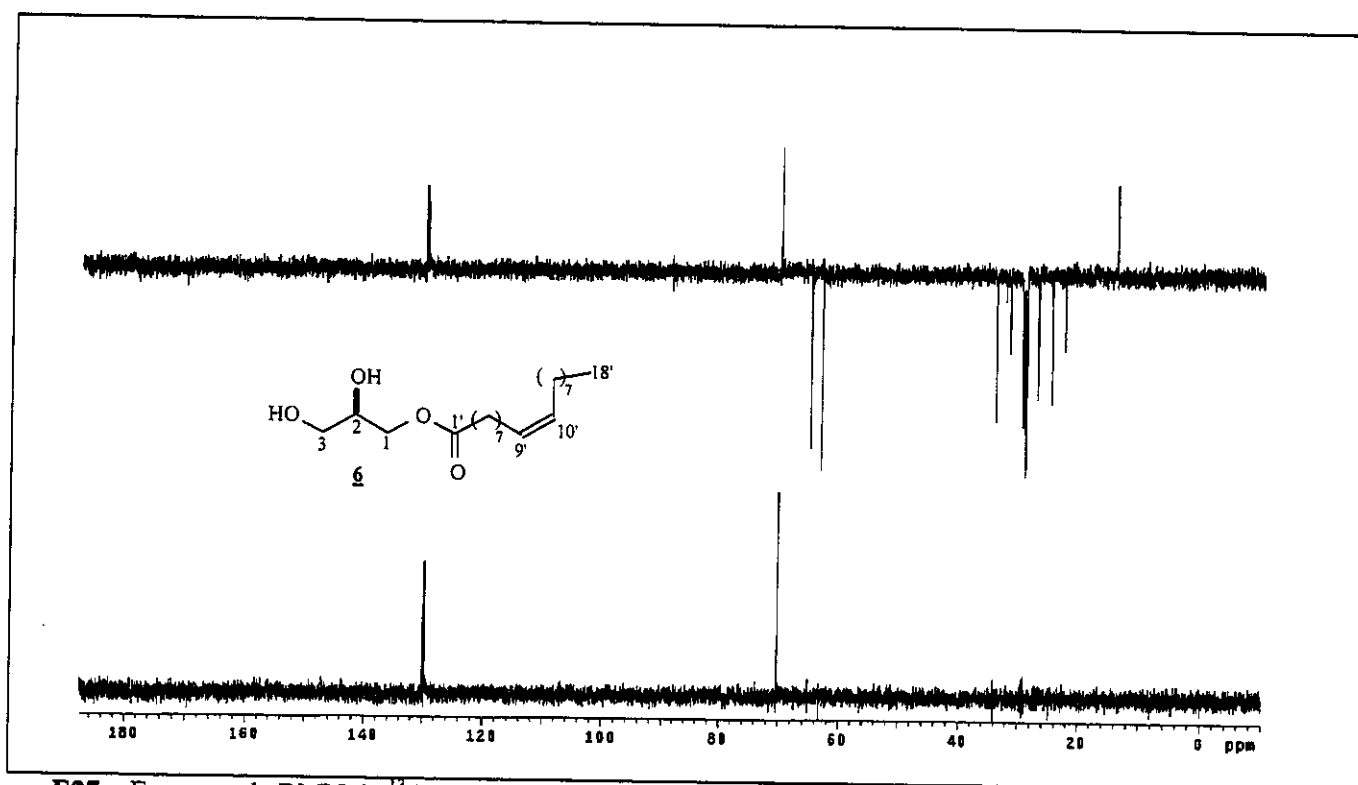
E24 – Espectro de Infra Vermelho (filme) do 1-oleoil-glicerol, **6**



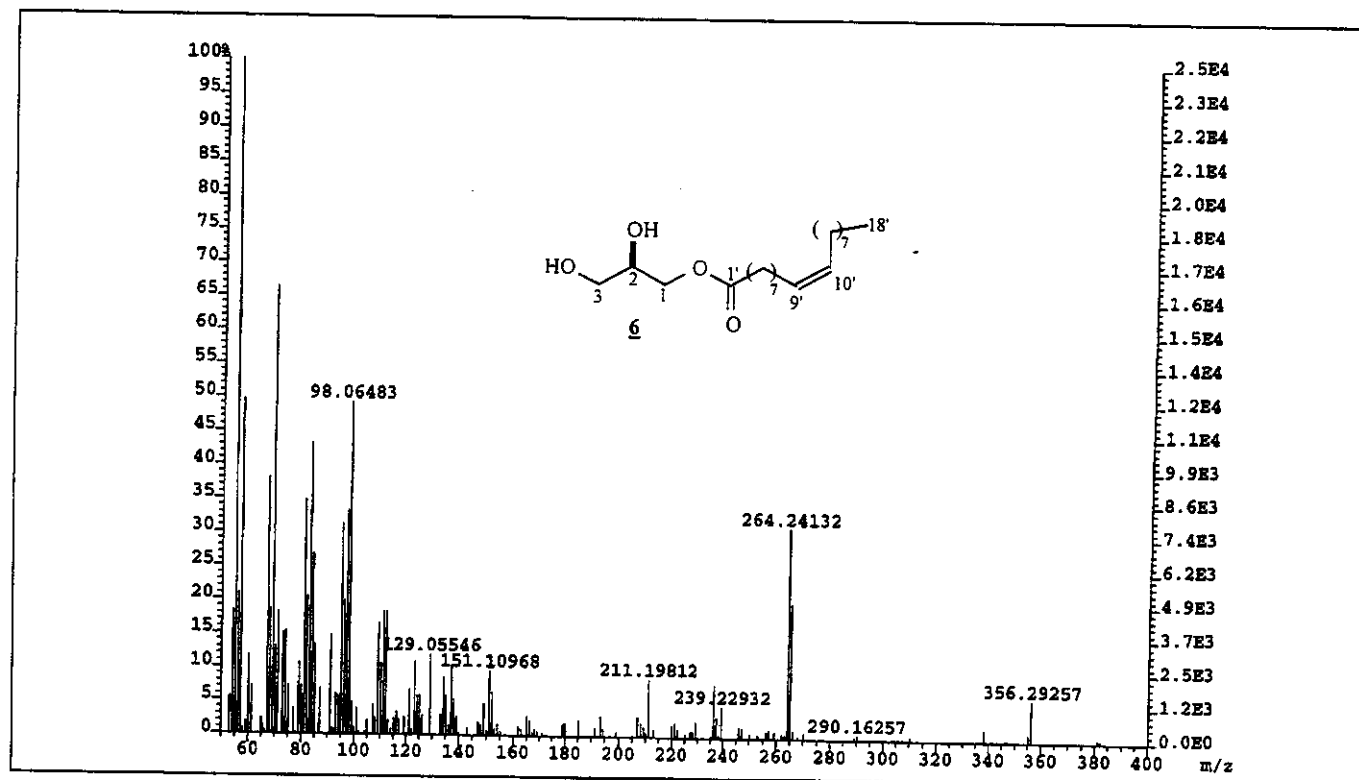
E25 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 1-oleoil-glicerol, 6



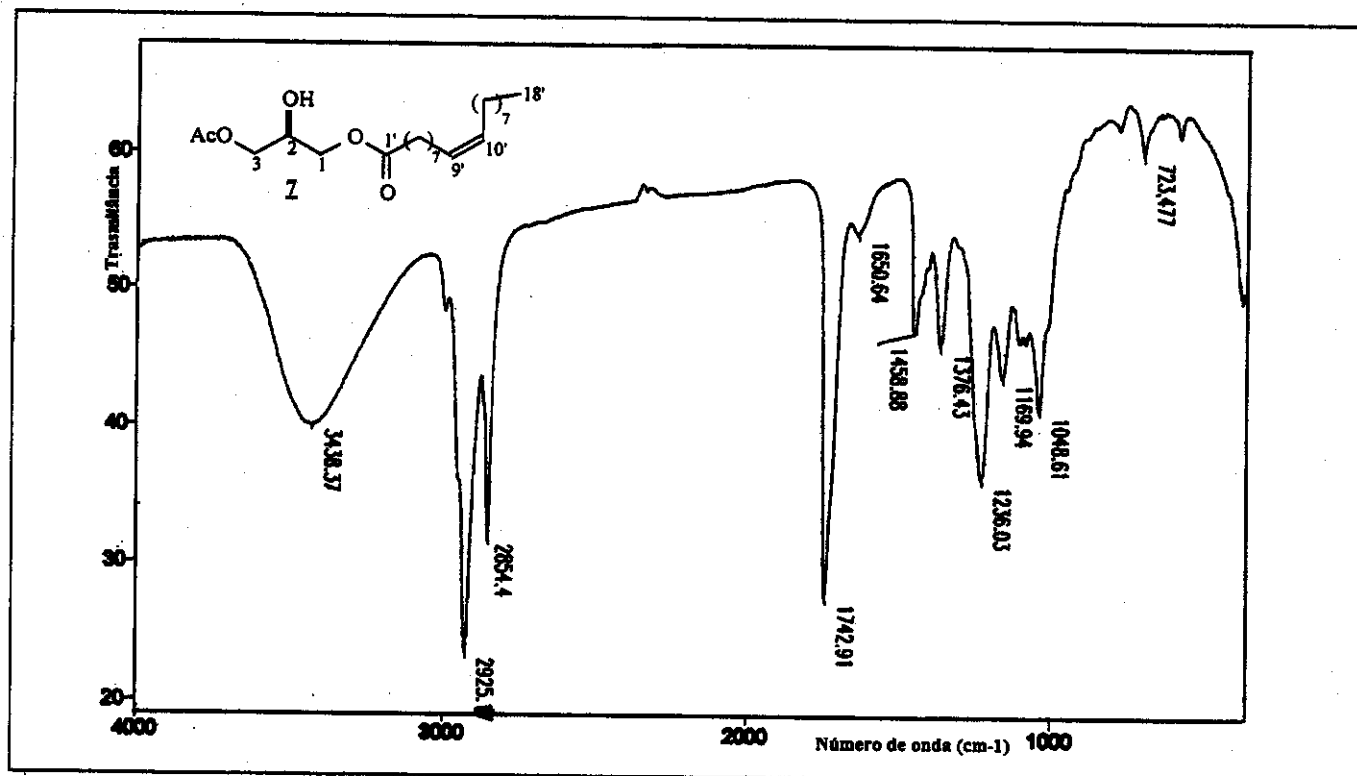
E26 – Espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (75.45 MHz, CDCl_3) do 1-oleoil-glicerol, 6



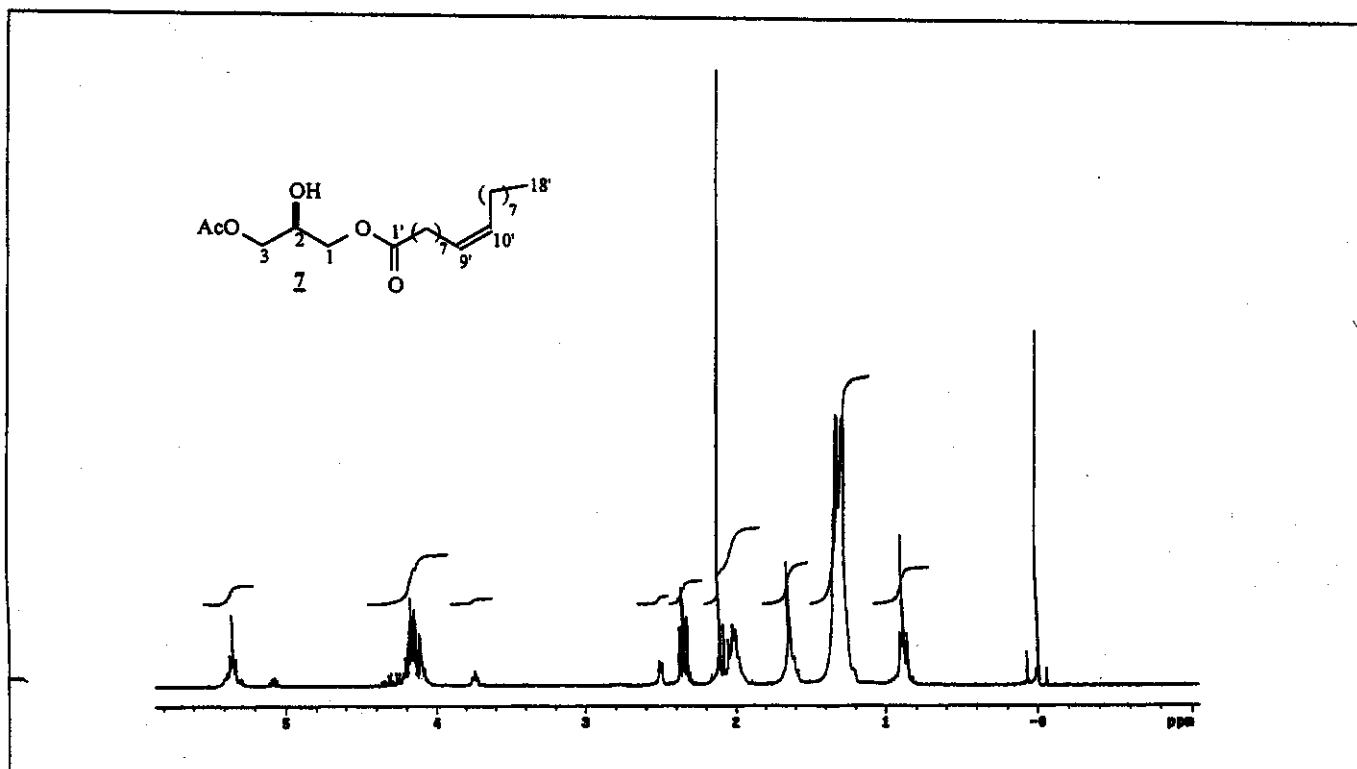
E27 – Espectro de RMN de ¹³C a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl₃) do 1-oleoil-glicerol, **6**

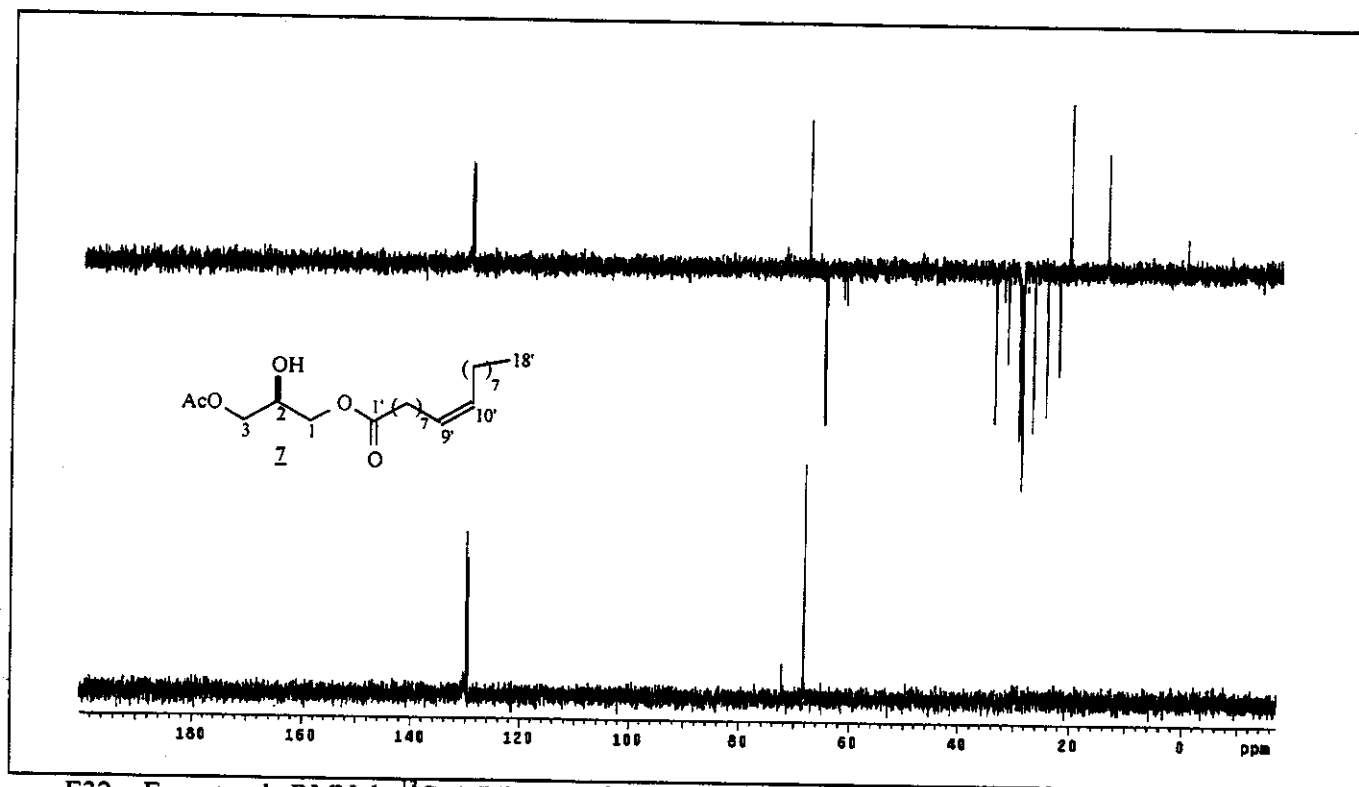
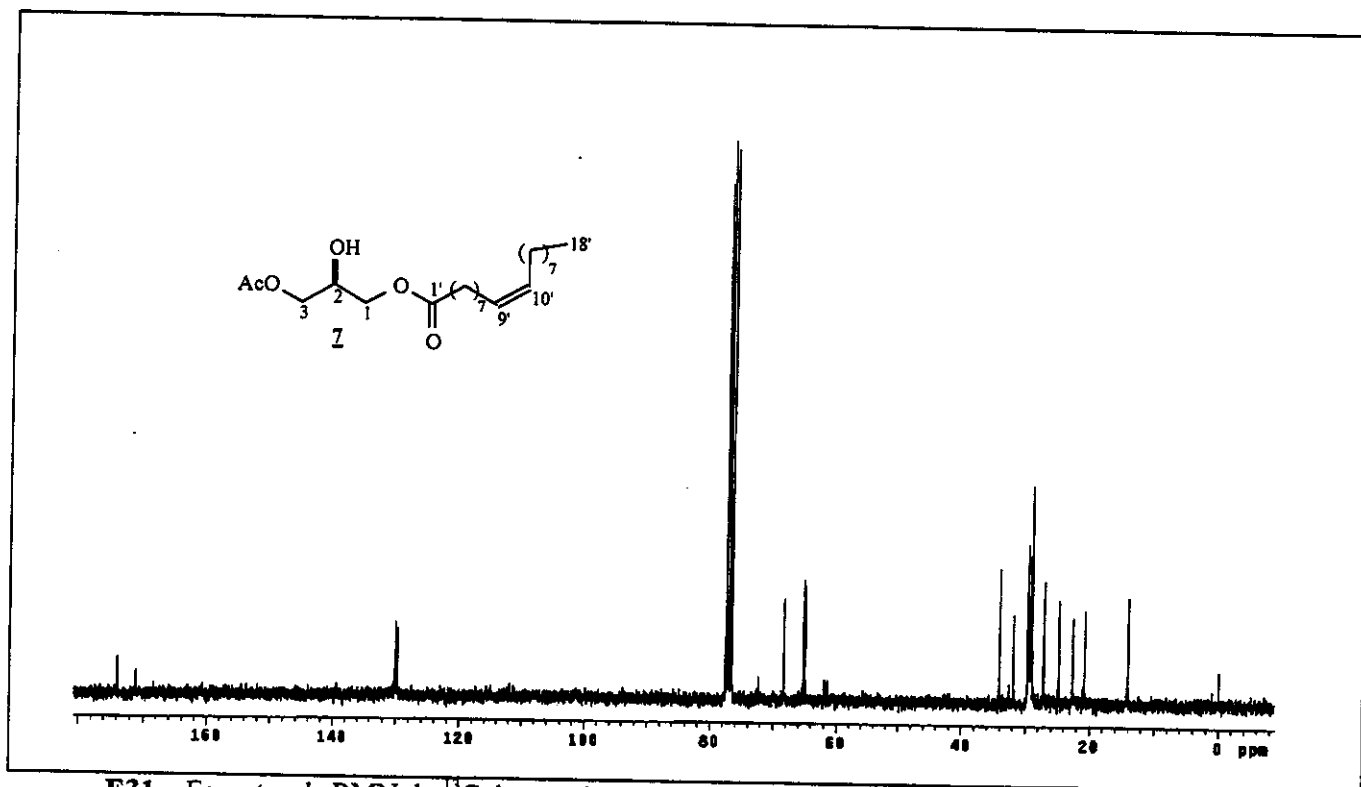


E28 – Espectro de Massas (EI 70 eV) do 1-oleoil-glicerol, **6**

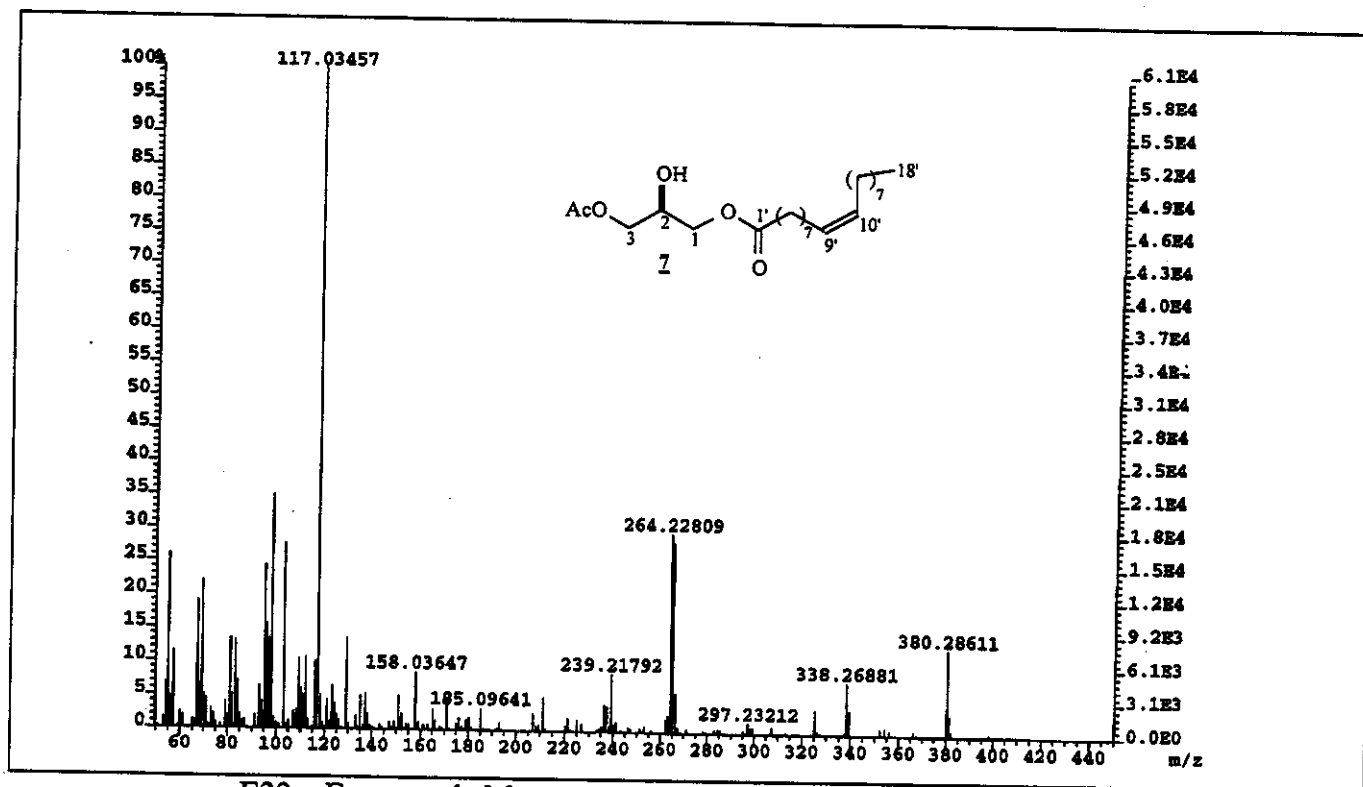


E29 – Espectro de Infra vermelho (filme) do 1-oleoil-3-acetil-glicerol, 7

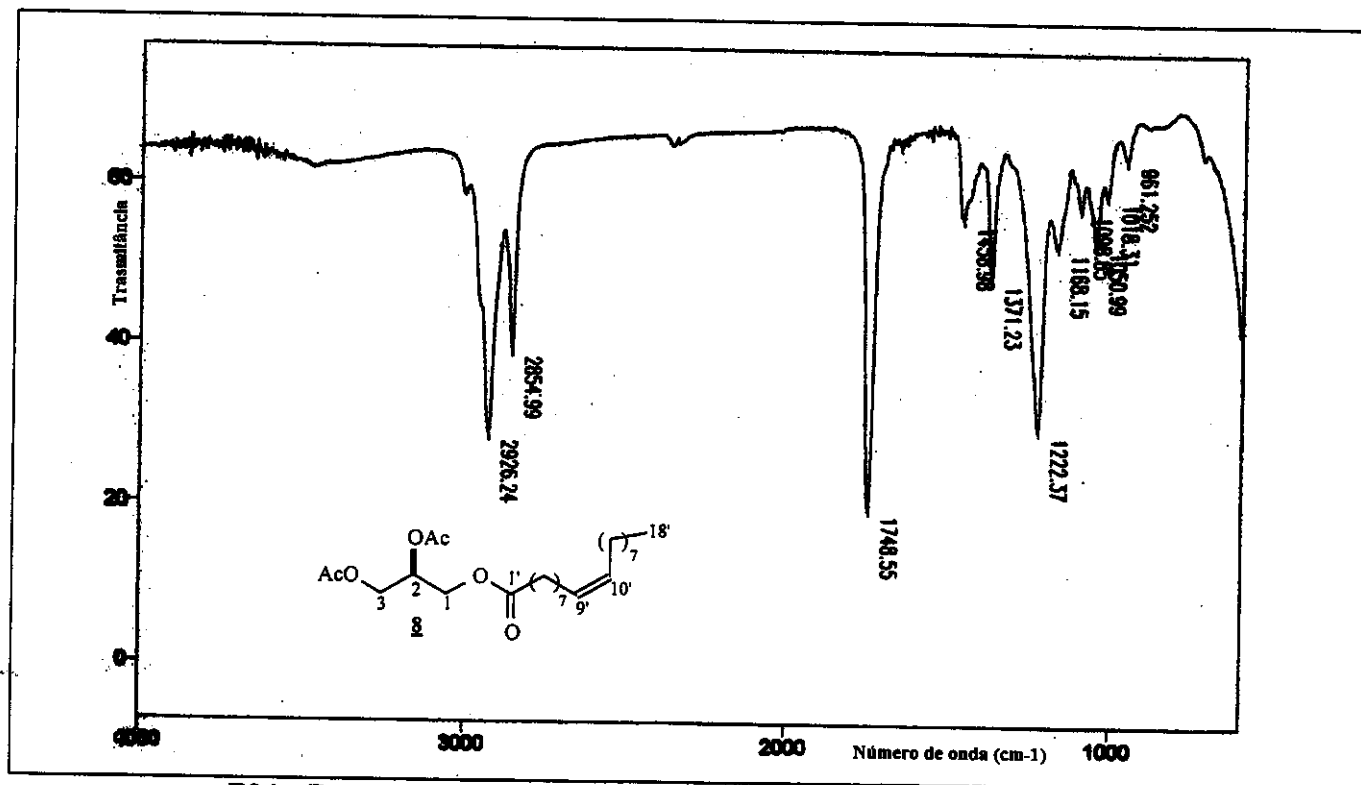
E30 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do 1-oleoil-3-acetil-glicerol, 7



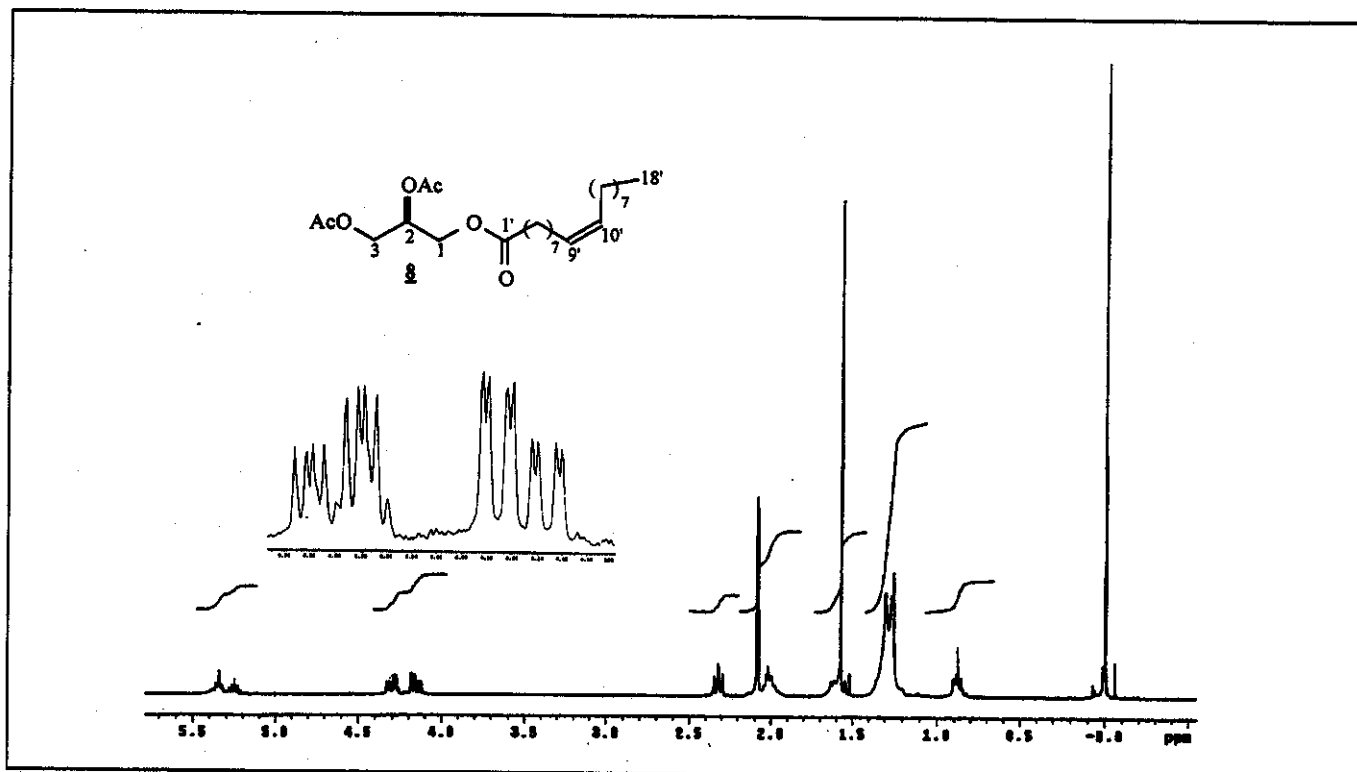
ESPECTROS



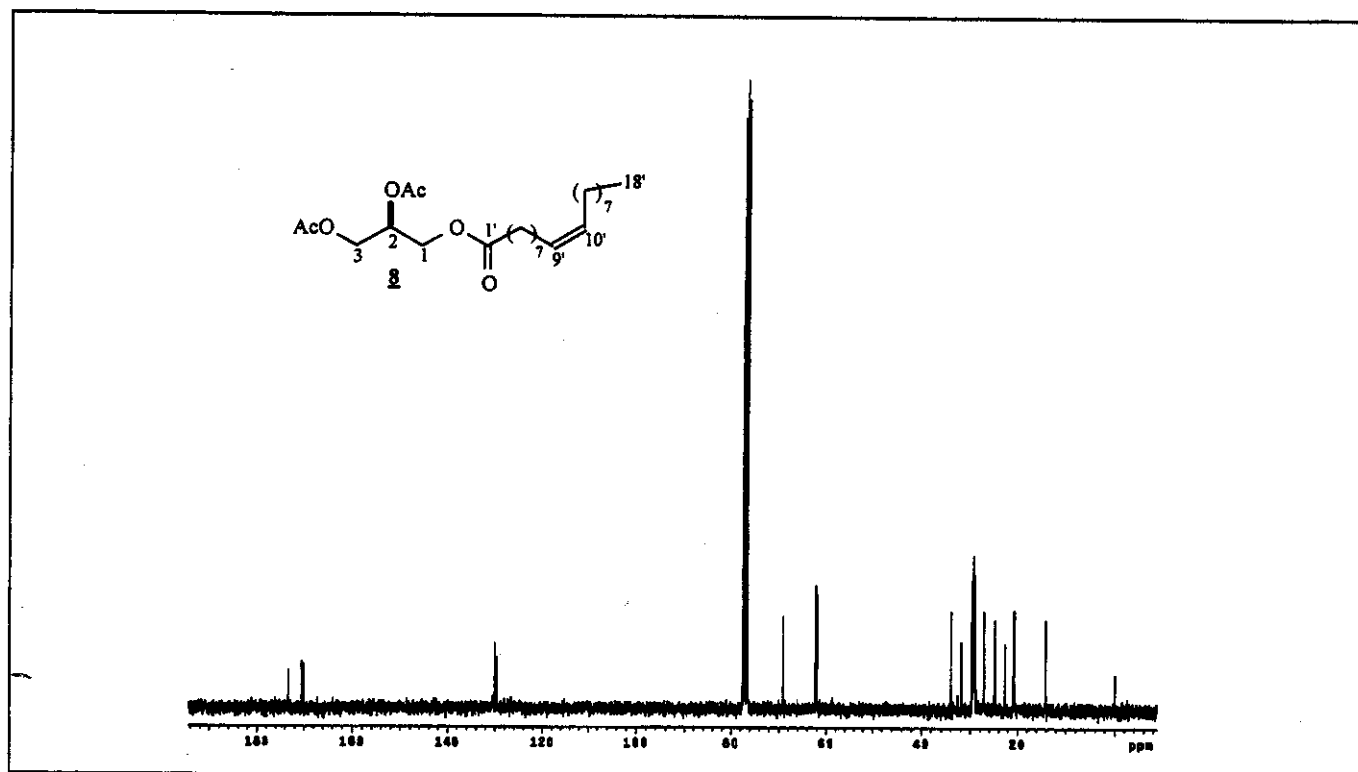
E33 – Espectro de Massas (EI 70 eV) do 1-oleoil-3-acetil-glicerol, 7



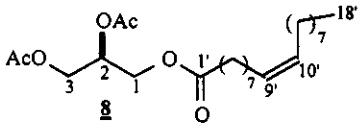
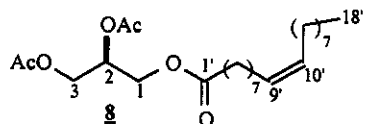
E34 – Espectro de Infra Vermelho (filme) do 1-oleoil-2,3-diacetil-glicerol, 8

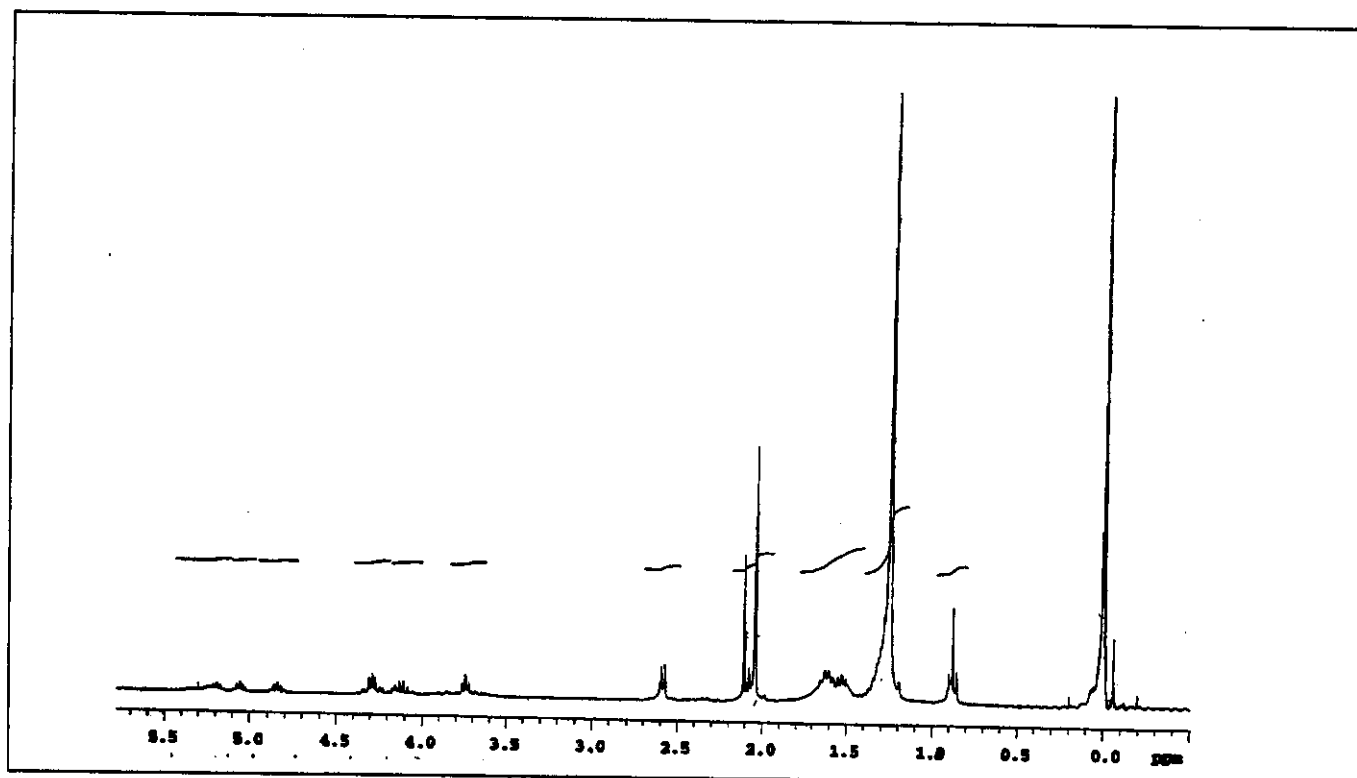


E35 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do 1-oleoil-2,3-diacetil-glicerol, **8**

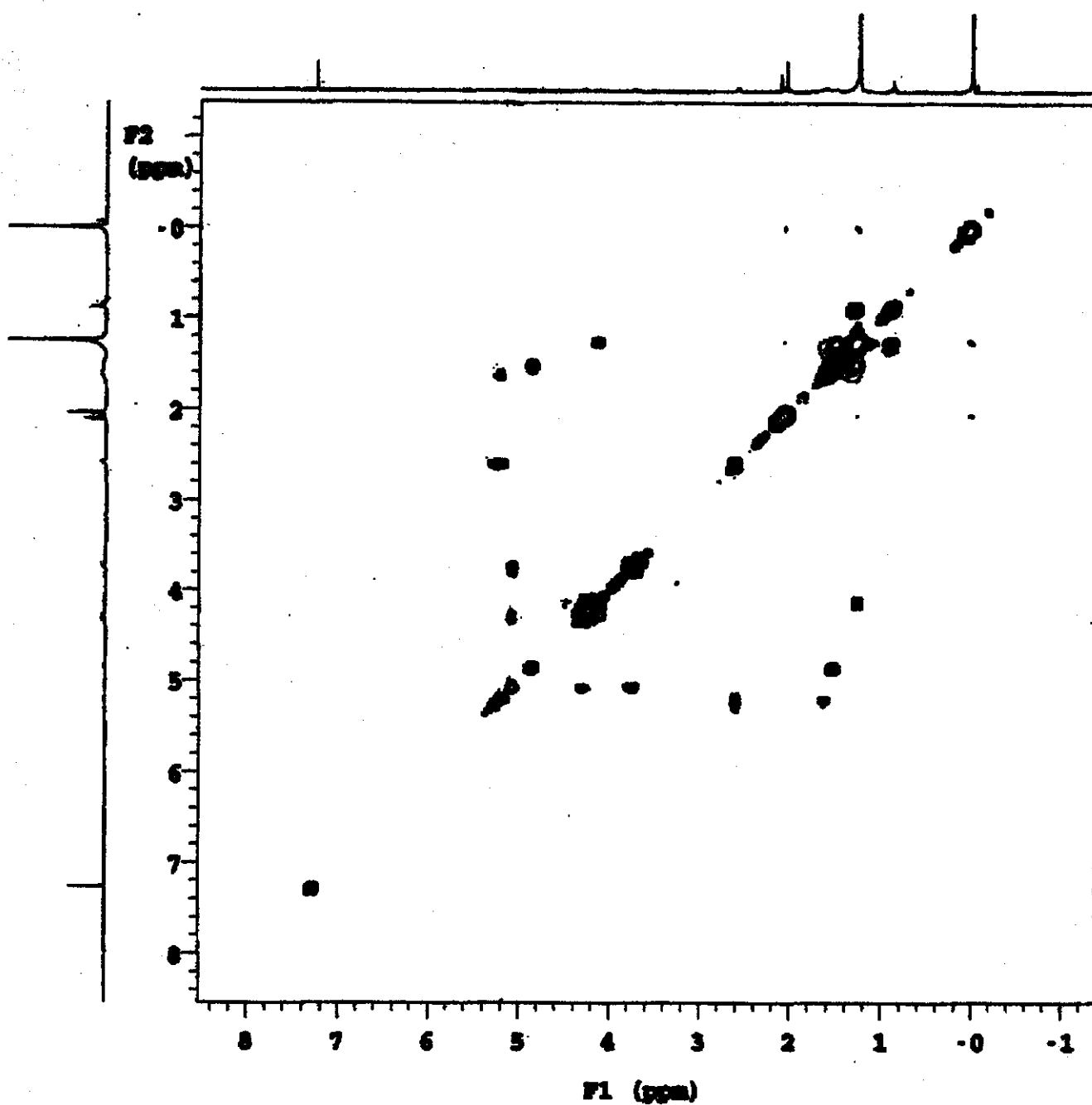


E36 – Espectro de RMN de ¹³C desacoplado (75.45 MHz, CDCl₃) do 1-oleoil-2,3-glicerol, **8**

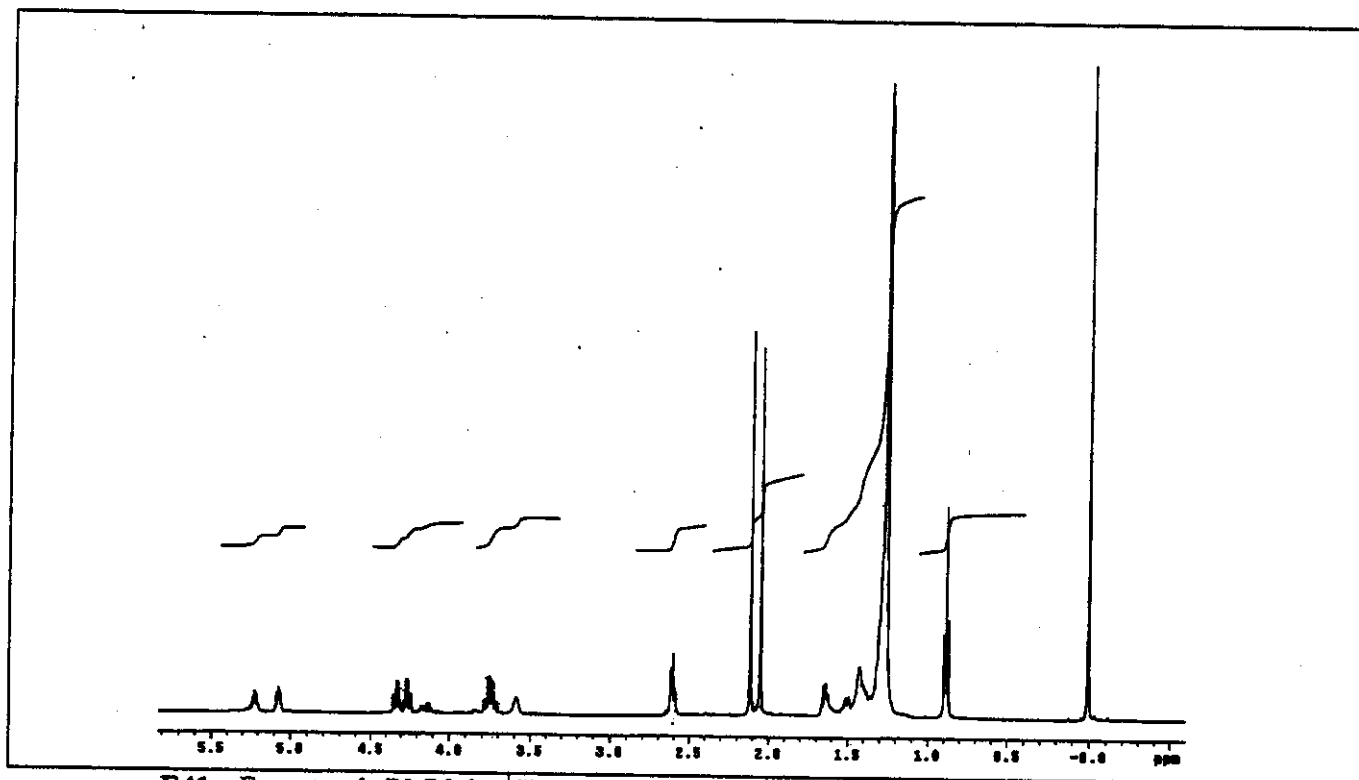




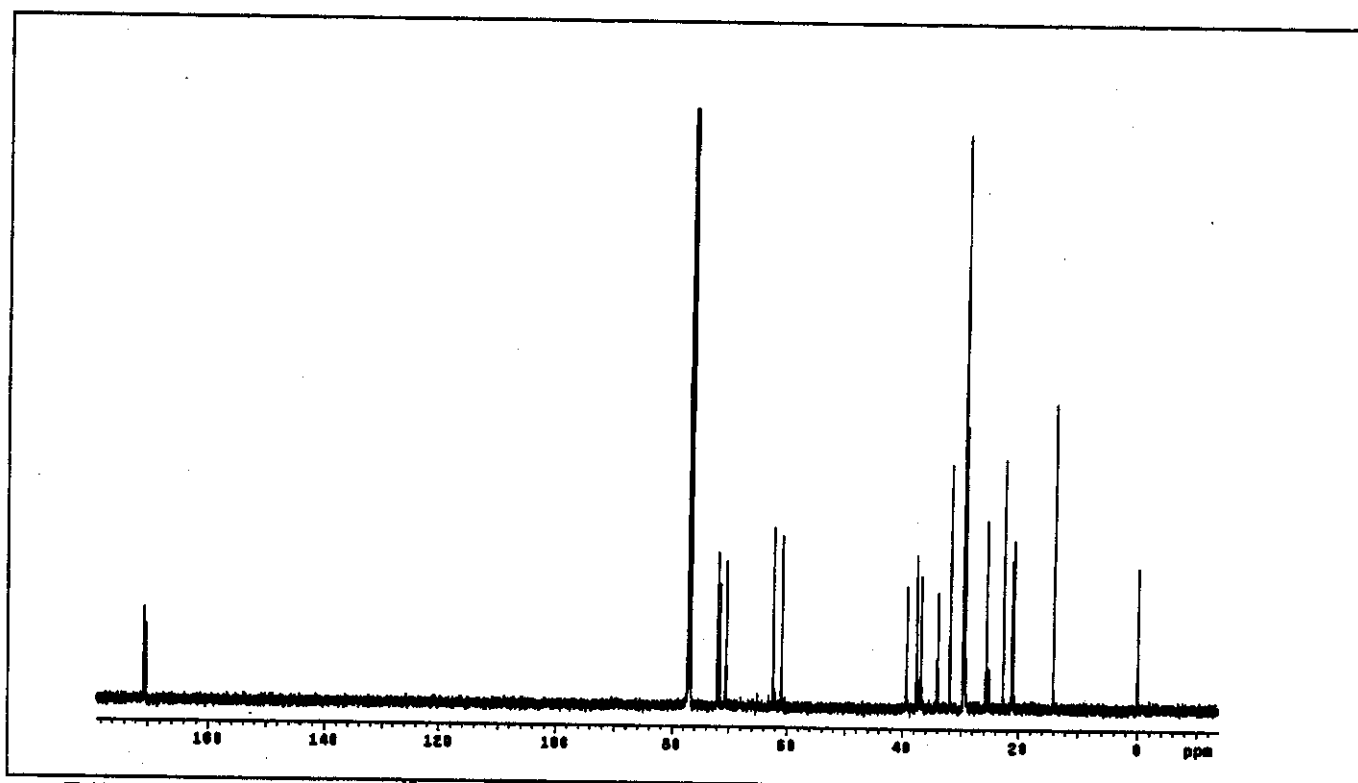
E39 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium hookeri*



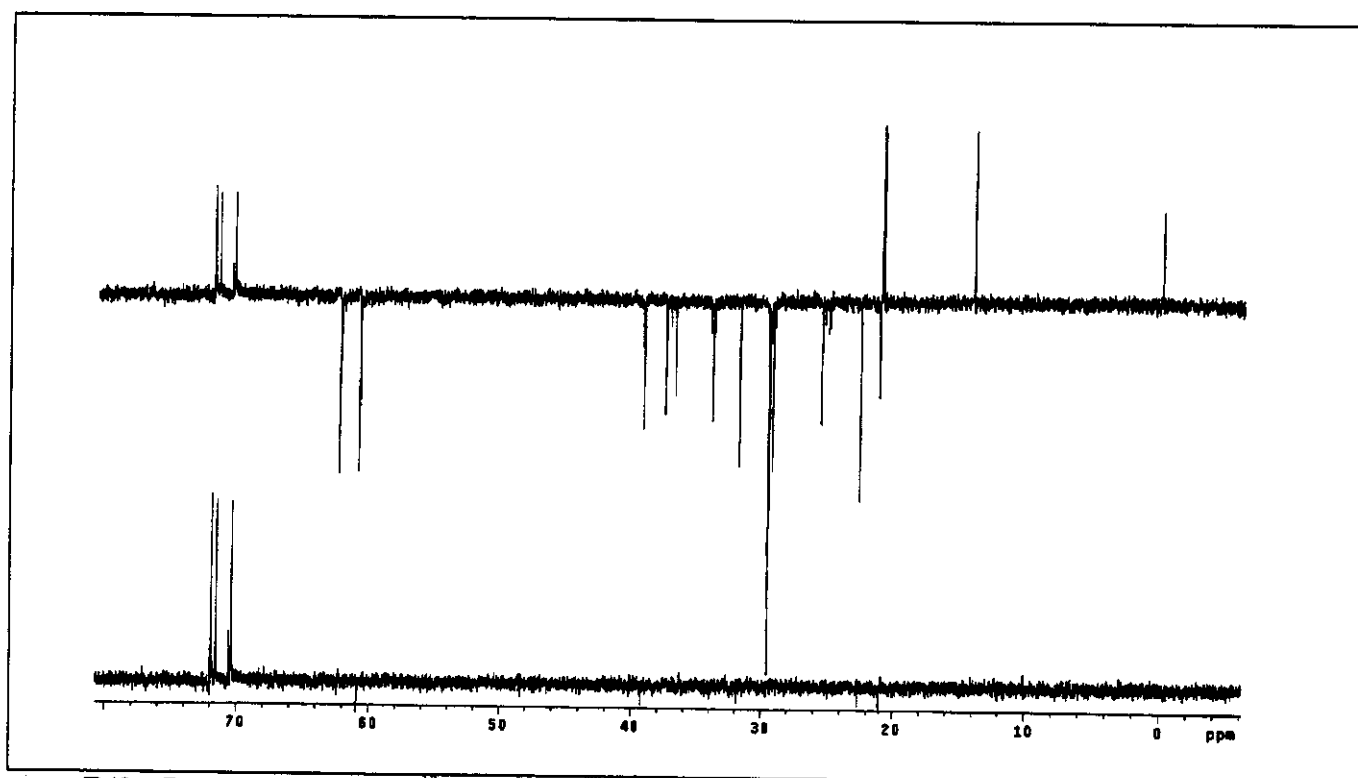
E40 – Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H , ^1H – COSY(300 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium hookeri*



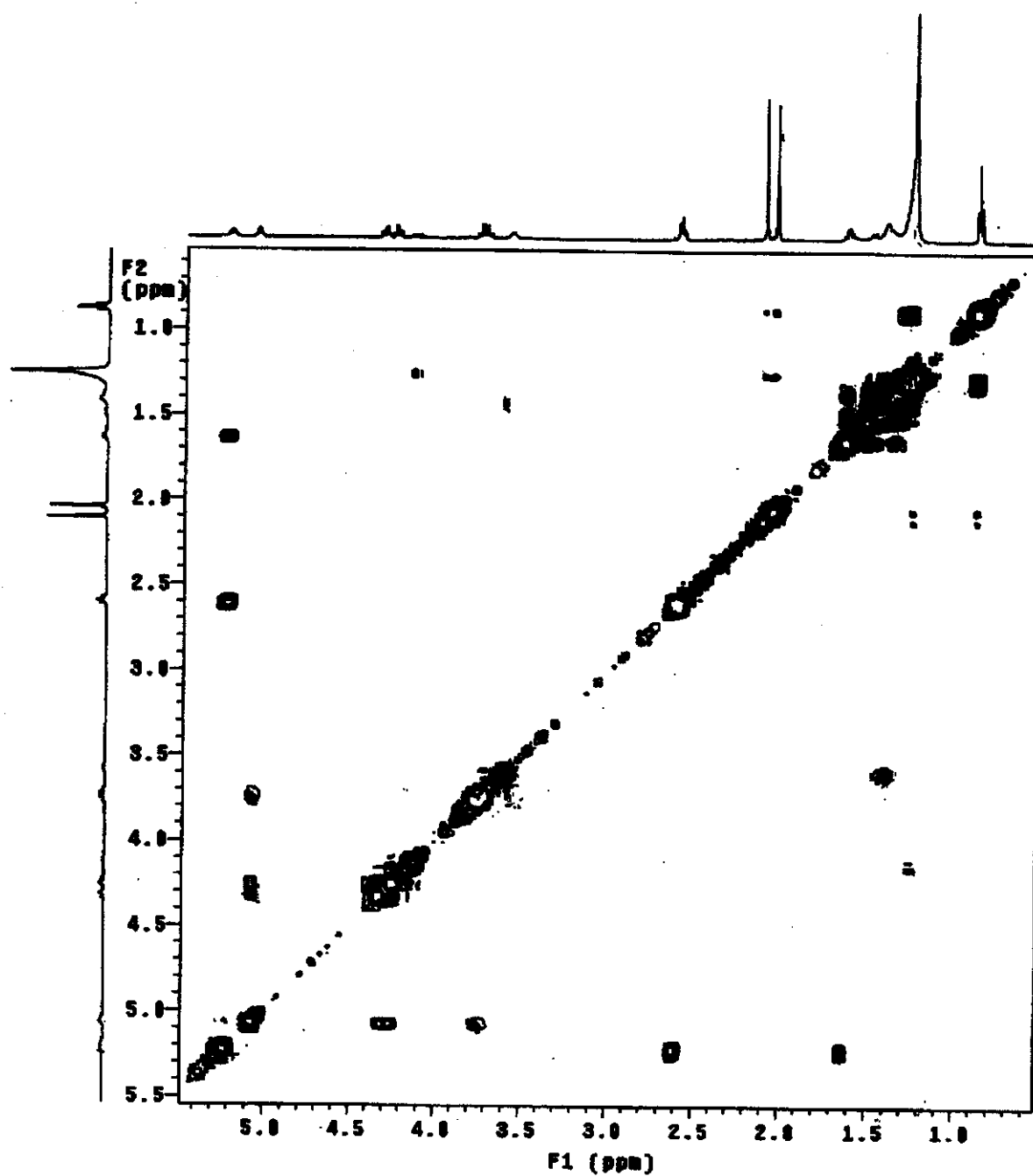
E41 – Espectro de RMN de ^1H (499.88 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium pubes*



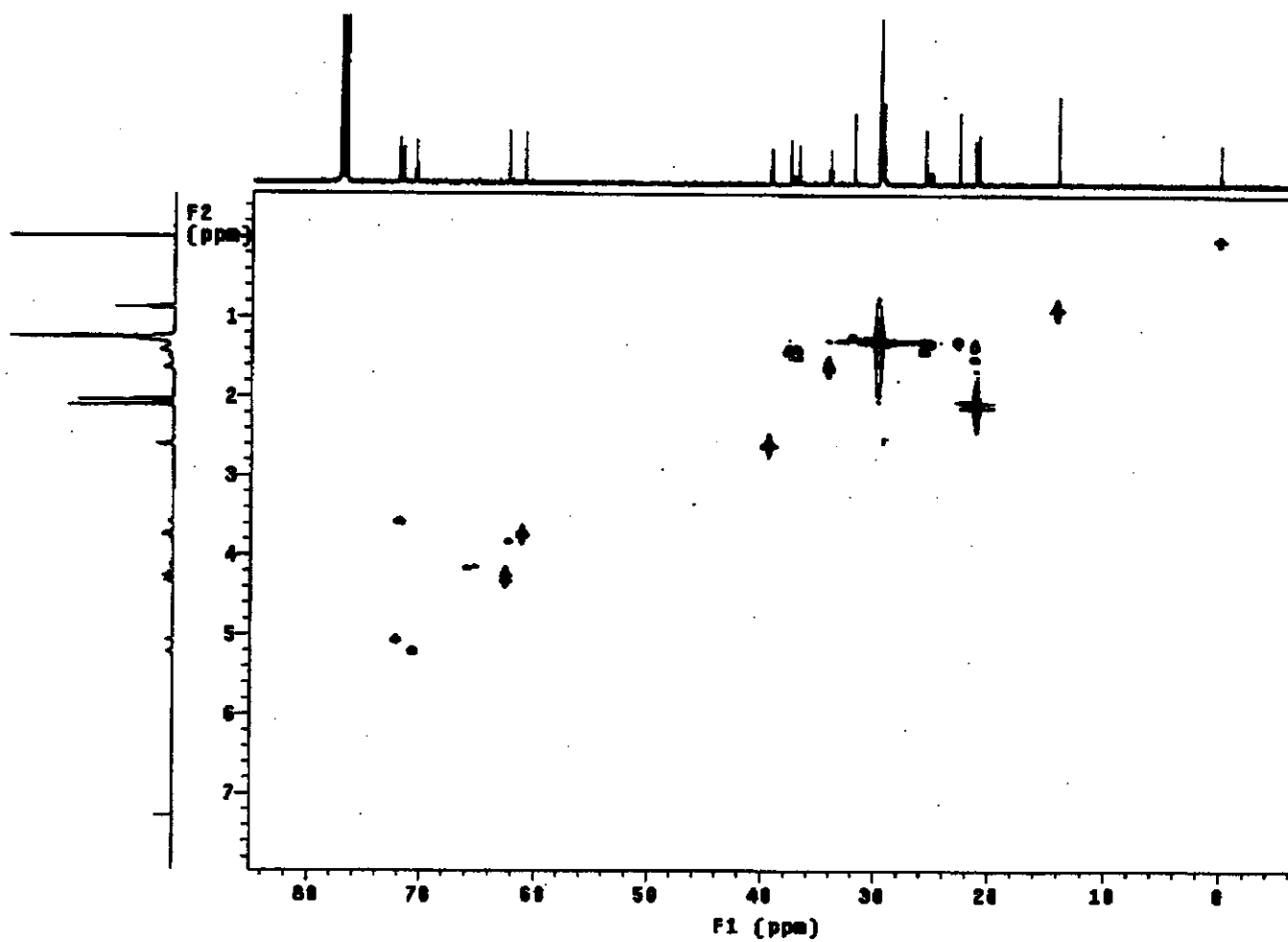
E42 – Espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (125.69 MHz, CDCl_3) do do óleo floral de *Oncidium pubes*



E43 – Espectro de RMN de ^{13}C a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125.69 MHz, CDCl_3) da óleo floral de *Oncidium pubes*

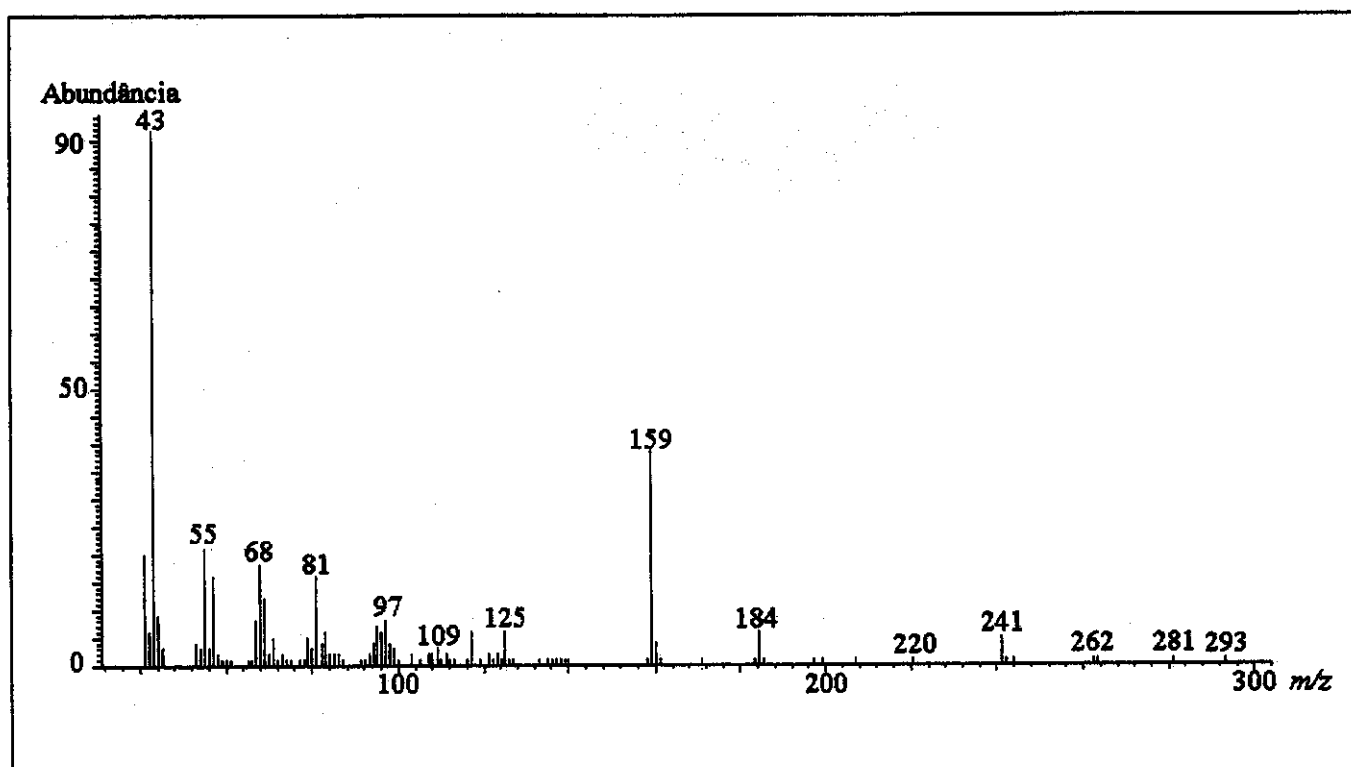


E44— Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H , ^1H – COSY, (499.69 MHz, CDCl_3)
do óleo floral de *Oncidium pubes*

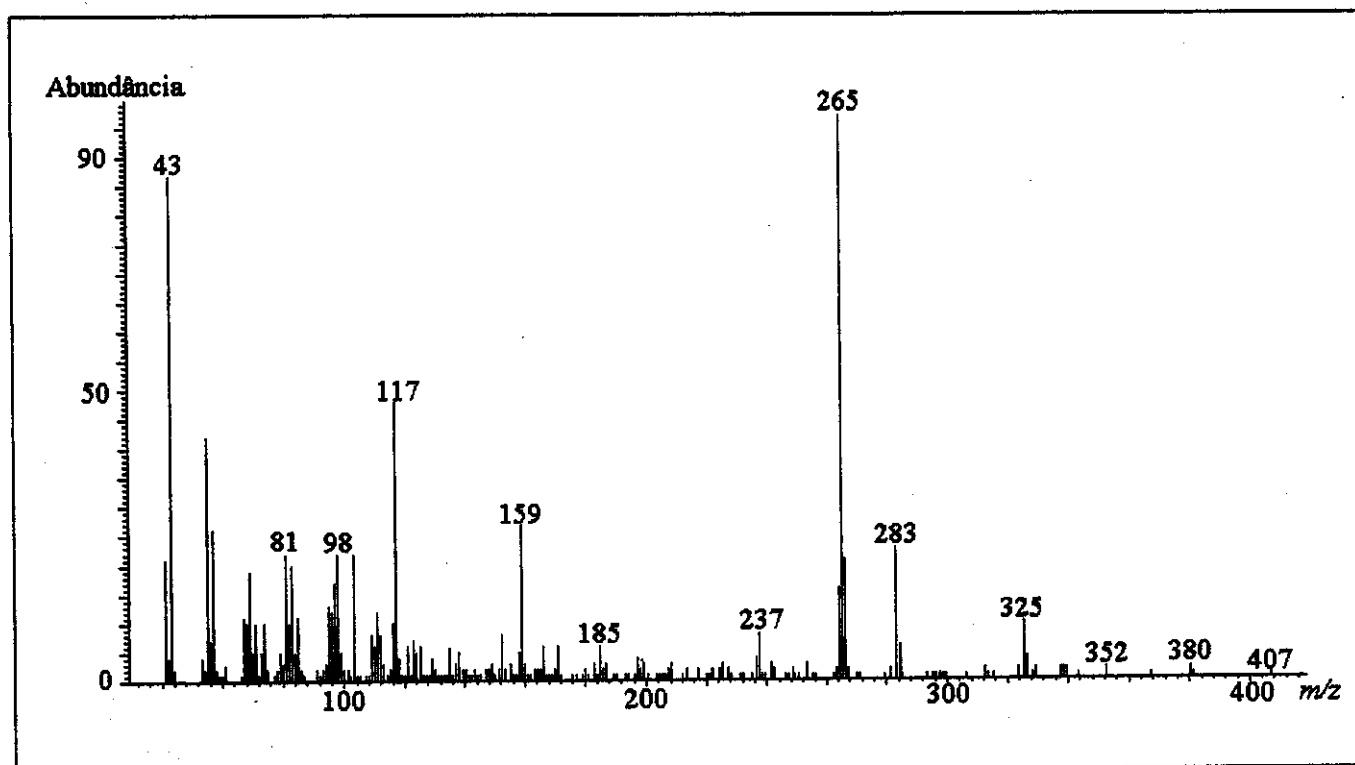


E45 – Mapa de contornos de RMN 2D de ^1H , ^{13}C – HSQC (CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium pubes*

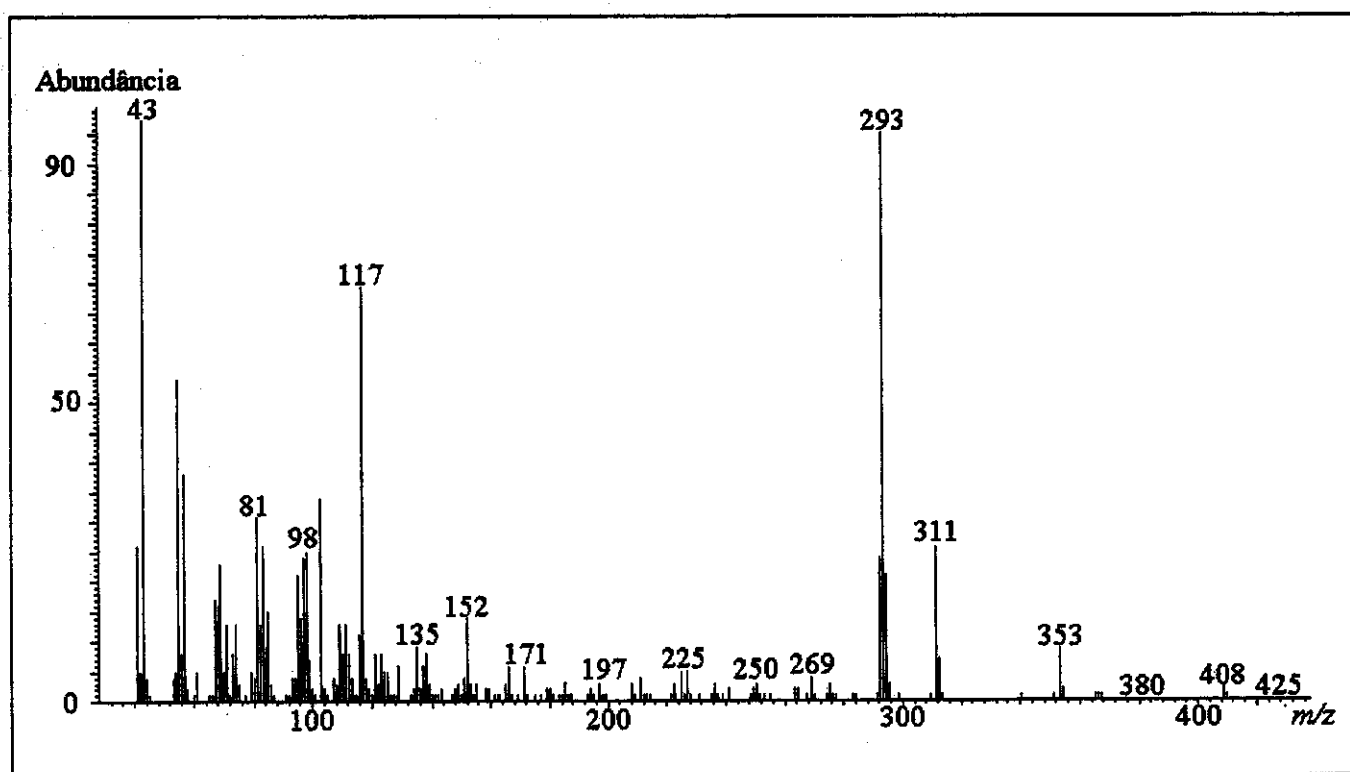
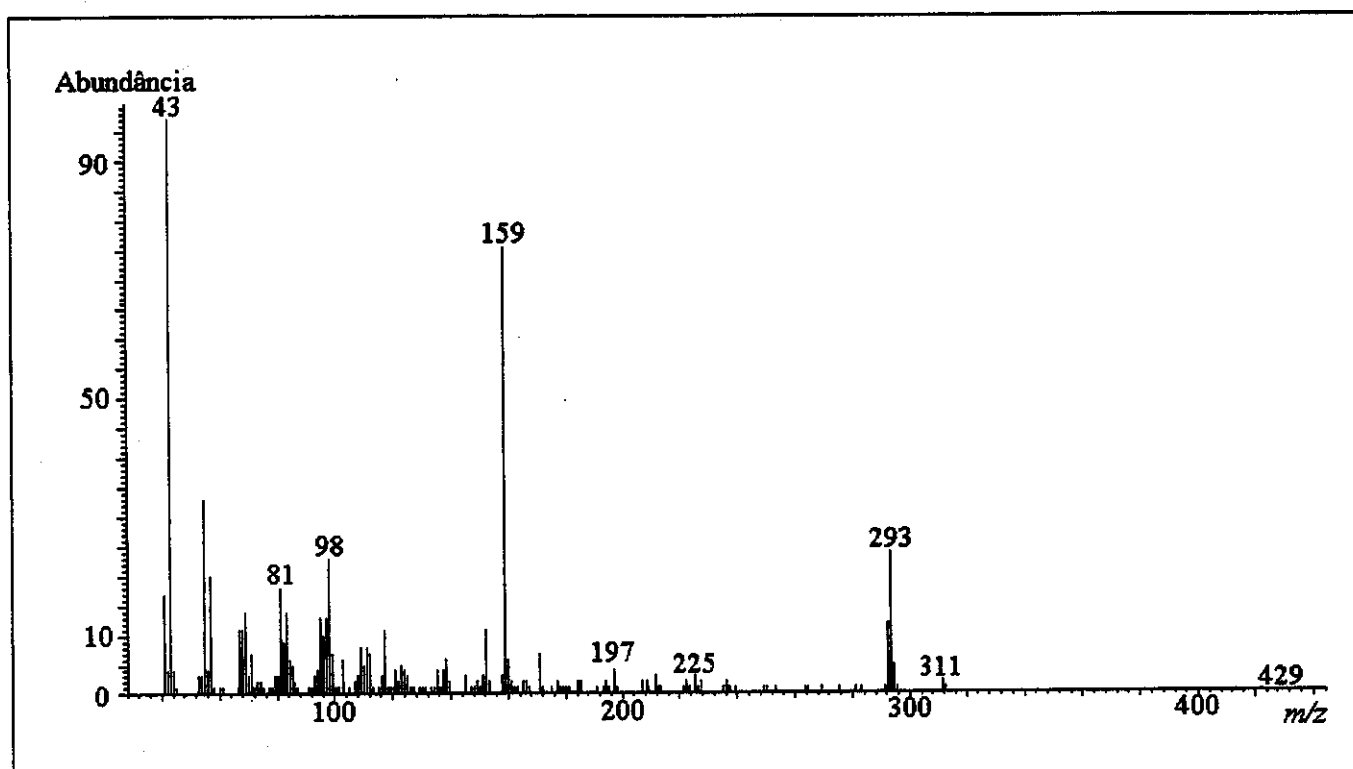
ESPECTROS

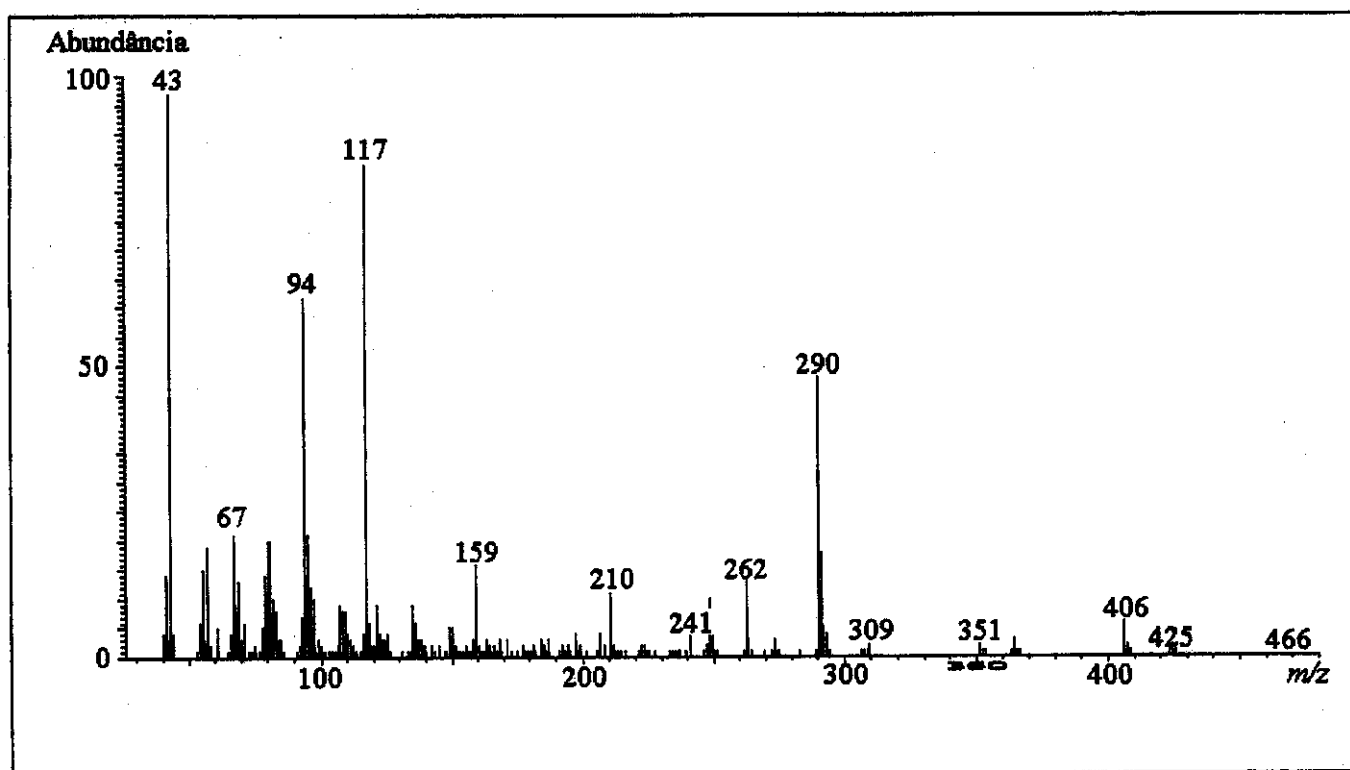
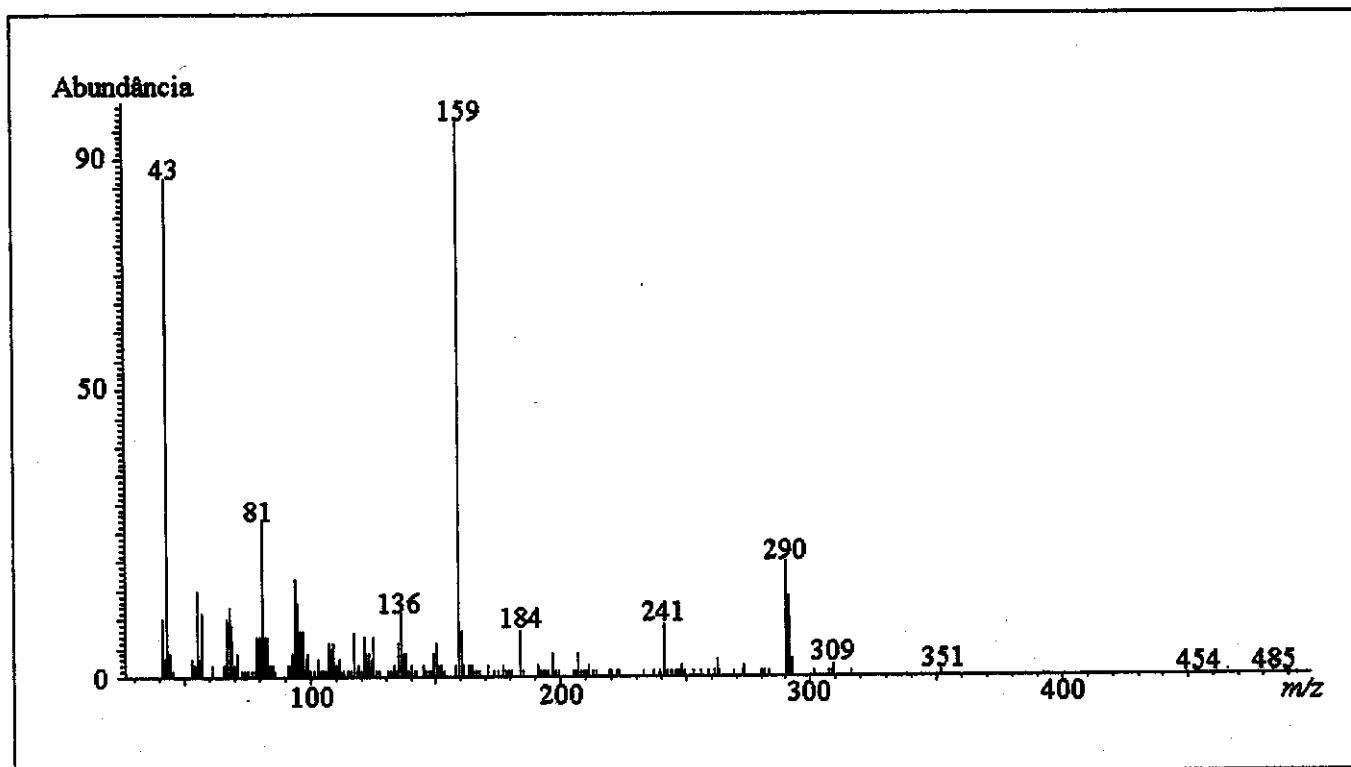


E46 – Espectro de massas (70 eV) do composto (3-acetoxi-6-hidroxi-octadecanoil)-diacetil-glicerol, **54**



E47 – Espectro de massas (70 eV) do composto 1-(3-acetoxi-octadecanoil)-2-acetil-glicerol, **66**

E48 – Espectro de massas (70 eV) do composto (3-acetoxi-eicosanoil)-acetil-glicerol, **67**E49 – Espectro de massas (70 eV) do composto eicosenoil-diacetil-glicerol, **68**

E50 – Espectro de massas (70 eV) do composto (3-acetoxi-eicosenoil)-acetil-glicerol, 81E51 – Espectro de massas (70 eV) do composto (3-acetoxi-eicosenoil)-diacetil-glicerol, 82