



CONTRIBUIÇÃO À QUÍMICA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS E INTERAÇÕES COM OS ORGANISMOS RECEPTORES

PAULO CESAR DE LIMA NOGUEIRA

Tese apresentada à universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do curso de pós-graduação do Instituto de Química, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli
Orientadora

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Campinas
São Paulo-Brasil
Março 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE 30
Nº CHAMADA TI/UNICAMP
N689c
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 49692
PROC 16-837102
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 16/06/02
Nº CPD _____

BIB ID 245748

CM00169445-4

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

N689c

Nogueira, Paulo Cesar de Lima
Contribuição à química dos compostos
voláteis e interações com os organismos
receptores / Paulo Cesar de Lima Nogueira. –
Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese (doutorado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Compostos voláteis. 2. *Clusia*. 3. *Tovomita*.
4. *Alicyclobacillus*. I. Marsaioli, Anita Jocelyne.
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

"O bom senso é, de todas as coisas entre os homens, a mais igualmente distribuída; todas as pessoas pensam que são tão abundantemente providas de bom senso, que até mesmo aqueles que são os mais difíceis de se satisfazer em outras coisas, normalmente não desejam uma medida maior desta qualidade que aquela que já possuem. E assim, não é provável que todos estejam bastante enganados com essa convicção, que é tomada como testemunho de que o poder de julgar corretamente e de distinguir a verdade do erro, o que é propriamente chamado de bom senso ou razão, é por natureza igual em todos os homens; e que a diversidade de nossas opiniões, por conseguinte, não surge de alguns sendo dotados de uma parte maior de razão que outros, mas somente disto, que nós administramos nossos pensamentos ao longo de caminhos diferentes, e não fixamos nossa atenção nos mesmos objetos. Ser possuidor de vigorosos poderes mentais não é o bastante; o requisito principal é justamente saber aplicá-los bem . As maiores mentes, assim como são capazes das maiores excelências, estão igualmente abertas às maiores aberrações; e aqueles que caminham muito lentamente podem fazer maiores progressos, contanto que sempre mantenham-se convictos em seu caminho, que aqueles que, enquanto correm, o abandonam."

Renée Descartes

"...E nunca considerem seu estudo como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável de aprender, sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito, para seu prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual pertencerá o seu trabalho futuro."

Albert Einstein

*À Valéria,
...Ao meu lado em todos os momentos...*

Aos meus pais, Antonio e Maria, responsáveis por tudo que sou...

Às minhas irmãs, Célia e Celane, por sempre acreditarem em mim...

Ao Sr. Edegar, D. Dirce, Wânia, Wladimir e Rita, pela acolhida e pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli, pela orientação, pela dedicação, pela amizade, pelos princípios e pelos ensinamentos durante minha passagem por seu grupo de pesquisa.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Instituto de Química, pela oportunidade e pelas facilidades encontradas ao longo do curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos de “sempre”, Inácio, Vera, Kilber e Kelly, pela amizade e pelo apoio em todas as situações.

Aos amigos de “todas as horas” e seu rebento, Jair, Ceição e Guí, pela amizade sincera e pelo muito que passamos juntos...Obrigado!!!

Aos amigos e colegas de grupo, Bira (Dr.), Gelson (Dr.), Renato (Dr.), Laverde (Dr.), Cláudio (Dr.), Cecília (Dra.), André (Dr.), Clara (Dra.), Denise (Dra.), Regina (Dra.), Marizinha, Luiz Antonio, Sérgio, Ricardo e Beatriz, pelo apoio, pelo aprendizado, pela amizade e pelos momentos agradáveis dentro e fora da UNICAMP.

À Samisia e Adauto, pela amizade, pela convivência e pela hospitalidade.

Aos Drs. Volker Bittrich e Maria do Carmo E. Amaral, pela colaboração no trabalho, pela predisposição e pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas de convivência, Adão, Aderbal (Prof.), Ana Lúcia, Beto (Dr.), Carlos, Catarina (Dra.), Celira, Eva (Profa.), Gislaíne (Dra.), Inês, Lourdes, Machado, Marisa (Dra.), Maurício (Dr.), Míriam (Dra.), Paulo (Prof.), Pilar, Raquel (Dra.), Rosana, Sandra (Dra.), Sebastião (Prof.), Valéria Riatto (Dra.) e Zeca (Dr.), pela convivência, pela descontração, pelos assuntos aleatórios...etc...

Aos que saíam quando eu chegava, Drs. Gilvandete, Péricles, Lídia, Vera, Mary Ann, Domingos, pela convivência descontraída.

À família Souza Moraes pelo apoio e acolhida.

Ao Prof. Ivo Milton Raimundo Jr. pela confiança em ser meu fiador.

À Dona Maria Lopes, pela presteza e competência.

À todos os funcionários do Instituto de Química, em especial ao Fontana, Bel (CPG), André (CPG), Elaine (BIQ), Toninho (BIQ), Iara (*in memoriam*), Paula (xerox) Zelinda (CG/EM), Cidão (CG/EM), Sônia Fanelli (RMN), Sônia Crisóstomo (RMN), Paula Pilli (RMN), pela atenção e pelos serviços caprichosos.

À Soraya, pelo incentivo e pelo aprendizado...

Aos “primos e primas”, Juliana, Sérgio, Paula e Tiago, pelo acolhida, pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos da Discar, em especial ao Avelino, Bruno, Célio e Zezuel, pelo apoio e momentos de descontração.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho.

RESUMO

CONTRIBUIÇÃO À QUÍMICA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS E INTERAÇÕES COM OS ORGANISMOS RECEPTORES

Paulo Cesar de Lima Nogueira

Orientadora : Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Palavras-chave: compostos voláteis, Guttiferae, *Clusia*, *Tovomita*, suco de laranja, *Alicyclobacillus*, benzofenonas.

O presente trabalho foi dividido em 4 partes que abordam 2 temas centrais: a importância dos compostos voláteis sob a égide da ecologia química e a síntese de produtos naturais.

Na primeira e segunda parte, analisamos o papel dos compostos voláteis produzidos por espécies de *Clusia* e *Tovomita* (Guttiferae), respectivamente, nas interações com seus insetos polinizadores. O perfil químico dos voláteis produzidos pelas pétalas de 16 espécies de *Clusia* pertencentes a 4 diferentes seções taxonômicas do gênero revelaram alguma correlação com a cladística das espécies e o tipo de polinizador. No caso do gênero *Tovomita*, os filamentos dos estames das 4 espécies (*T. amazonica*, *T. acutiflora*, *T. rubella* e *T. aff. grata*) de ocorrência simpátrica estudadas produzem gotículas de um óleo aromático que atrai machos de abelhas euglossine como polinizadores. A análise destes óleos revelaram uma clara diferenciação entre sua composição química, provavelmente para a atração seletiva de espécies diferentes de euglossine evitando assim a polinização cruzada inter-específica.

Na terceira parte, abordamos o efeito dos compostos voláteis produzidos pelo suco de laranja infectado por *Alicyclobacillus*. Nessa etapa, com auxílio da técnica de cromatografia à gás associada à olfatometria, propusemos que os principais responsáveis pelo mau odor são os ácidos isovalérico e 2-metil-butírico e não o guaiacol, como sugerido em trabalhos anteriores da literatura.

Por fim, a última parte do trabalho relata as tentativas de obtenção de benzofenonas preniladas, isoladas da resina floral de *Clusia*, através de 2 rotas biomiméticas.

ABSTRACT

CONTRIBUTION TO THE CHEMISTRY OF VOLATILES AND INTERACTIONS WITH RECEIVER ORGANISMS

Paulo Cesar de Lima Nogueira

Adviser : Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Key words: volatiles compounds, Guttiferae, *Clusia*, *Tovomita*, orange juice, *Alicyclobacillus*, benzophenones.

This research is divided into 4 chapters focusing 2 main topics: the importance of volatiles to the living organisms and synthesis of natural products.

The first and second chapters deal with the role of volatile compounds from *Clusia* and *Tovomita* species, respectively. The chemical compositions of floral volatiles of sixteen species of *Clusia* belonging to four different taxonomic sections of the genus were investigated. These were in part, but not always, related to the taxonomic position of the species, and to a minor extent to the type of pollinator observed on the flowers as revealed by clustering analysis. On the other hand, droplets of fragrant oils produced by the filaments of the *Tovomita* flower stamens, a dioecious genus, attracts male euglossine bees as pollinators and the oils of four species (*T. amazonica*, *T. acutiflora*, *T. rubella* e *T. aff. grata*) were investigated revealing that the composition is different for all four species, possibly to selectively attract different euglossine species and to avoid interspecific cross-pollination.

The third chapter deals with off-flavor arising from contaminated orange juice by *Alicyclobacillus*. Based on gas chromatography/olfactometry technique we proposed that the off-flavors compounds are isovaleric and 2-methyl butyric acids, but not guaiacol as suggested in the literature.

Finally the last chapter describes the very first attempts to prepare polyisoprenylated benzophenones from floral resins of *Clusia* species using two bio-mimetic approaches.

Curriculum Vitae

Paulo Cesar de Lima Nogueira

Naturalidade : Maracanaú-CE

Nacionalidade : Brasileira

e-mail : pclimanog@uol.com.br

Formação Acadêmica

Graduação

Curso : Química Industrial

Instituição : Universidade Federal do Ceará

Grau : Químico Industrial

Obtenção : 18/01/94

Trabalhos em Congressos Científicos

Edna H. Azuma, Fumio Yokoya, Paulo C. L. Nogueira e Anita J. Marsaioli. *Influência de Alicyclobacillus acidoterrestris nas características sensoriais, microbiológicas e químicas de suco de laranja reconstituído. Livros de Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Fortaleza-CE, agosto, 2000.

Nogueira, P.C.L.; Bittrich, V.; Marsaioli, A.J. *Atração diferenciada dos aromas florais de 1º e 2º dia de Clusia lanceolata em abelhas Trigonas. Livro de Resumos do I Encontro Brasileiro de Ecologia Química*, Curitiba-PR, dezembro, 1999.

M.E.M.C. Pinhatti, S.Y. Eguchi, E.H. Azuma, F. Yokoya, P.C.L. Nogueira, J.R. Cagnon and A.J. Marsaioli. *GC/MS analyses of volatiles in industrial orange juice infected by acidothermophilic bacilli (Alicyclobacillus spp.). Annals of the 2nd IUPAC International Conference on Biodiversity*, Belo Horizonte-Brazil, julho, 1999.

Paulo C. de L. Nogueira, Volker Bittrich e Anita J. Marsaioli. *Avaliação e métodos de obtenção de voláteis florais de 16 espécies de Clusia. Livro de Resumos da 21ª Reunião Anual SBQ*. Vol. 2, PN-032, Poços de Caldas-MG, maio, 1998.

- Cecilia M. A. de Oliveira, André L.M. Porto, Paulo C. L. Nogueira, Volker Bittrich and Anita J. Marsaioli. *Oils and resins: The mesmerizing chemical world of Clusia pollination. Annals of the 20th IUPAC Symposium on the Chemistry of Natural Products*, Chicago-USA, setembro, 1996.
- Paulo C. de L. Nogueira, Volker Bittrich e Anita J. Marsaioli. *Estudo dos óleos essenciais de pétalas de Clusia spp. Livro de Resumos da 19^a Reunião Anual SBQ*. PN-70, Poços de Caldas-MG, maio, 1996.
- Paulo C. de L. Nogueira, Volker Bittrich e Anita J. Marsaioli. *Função ecológica dos óleos de Tovomita spp. Livro de Resumos da 19^a Reunião Anual SBQ*. PN-92, Poços de Caldas-MG, maio, 1996.
- Telma L. G. de Lemos, Afrânio A. Craveiro, J. Wilson Alencar e Paulo C. de L. Nogueira. *Contribuição ao conhecimento químico de óleos essenciais do gênero Spondias ssp. Livro de Resumos do XXXIII Congresso Brasileiro de Química*. IC-273, Fortaleza-CE, outubro, 1993.
- Telma L. G. de Lemos e Paulo C. de L. Nogueira. *Triterpenos de Sambucus australis. Livro de Resumos do XXXII Congresso Brasileiro de Química*. JO-33, Belém-PA, outubro, 1992.

Artigos Publicados

- Paulo C. de L. Nogueira, Anita J. Marsaioli, Volker Bittrich, George J. Shepherd and Ariadna V. Lopes. **The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of Clusia species (Guttiferae).** *Phytochemistry*, **56**(5), 443-452, 2001.
- Igor A. Degterev, Paulo C. L. Nogueira, Anita J. Marsaioli, Aníbal E. Vercesi. **Microsomal metabolism of quinifuryl – a nitrofuryl-ethenyl-quinoline antiseptic possessing antitumor activity in vitro.** *Eur. J. Drug Metab. Ph.*, **24**(1), 15-22, 1999.
- Paulo C. de L. Nogueira; Anita J. Marsaioli, Maria do Carmo E. Amaral and Volker Bittrich. **The fragrant floral oils of Tovomita species (Guttiferae).** *Phytochemistry*, **49**(4), 1009-1012, 1998.
- Lemos, Telma L.G.; Nogueira, P.C.L.; Alencar, J.W.; Craveiro, A.A. **Composition of the leaf oils of four Spondias species from Brazil.** *J. Essent. Oil Res.*, **7**, 561-563, 1994.

Índice

<i>Lista de Figuras</i>	xxi
<i>Lista de Esquemas</i>	xxvii
<i>Lista de Espectros</i>	xxix
<i>Lista de Tabelas</i>	xxxi
<i>Lista de Abreviaturas</i>	xxxiii
<i>Parte 1-Introdução</i>	1
<i>1.2 Objetivos</i>	13
<i>Parte 2 - Métodos de análise de voláteis</i>	15
2.1 Considerações gerais	17
2.2 Procedimentos para o isolamento de óleos essenciais	18
2.2.1 Métodos clássicos	18
2.2.1.1 Extração direta com solvente	18
2.2.1.2 Destilação a vapor (arraste a vapor, hidrodestilação, destilação à vácuo)	19
2.2.2 Métodos atuais de amostragem	20
2.2.2.1 Amostragem estática e dinâmica do espaço livre (polímeros adsorventes)	21
2.2.2.2 Extração com fluido supercrítico (EFSC)	23
2.2.2.3 Microextração em fase sólida (SPME)	25
2.3 Métodos de separação cromatográfica	27
2.3.1 Cromatografia gasosa (CG)	27
2.4 Técnicas de identificação	28
2.4.1 Índices de retenção (I_R)	28
2.4.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)	29
2.4.3 Análises sensoriais olfativas	30
<i>Parte 3-Importância ecológica e taxonômica dos voláteis florais de Clusia</i>	35

3.1 Considerações gerais	37
3.2 Objetivos	44
3.3 Resultados e discussão	45
3.4 Conclusões	73
<i>Parte 4-Função ecológica dos óleos florais de Tovomita</i>	77
4.1 Considerações gerais	79
4.2 Objetivos	86
4.3 Resultados e discussão	87
4.4 Conclusões	98
<i>Parte 5-Análises de voláteis por CG/EM em suco de laranja industrial infectado por Alicyclobacillus spp.</i>	99
5.1 Considerações gerais	101
5.2 Objetivos	107
5.3 Resultados e discussão	107
5.3.1 Identificação dos microrganismos	107
5.3.2 Análise dos sucos de laranja	120
5.4 Conclusões	146
<i>Parte 6-Estudos sintéticos visando obtenção de benzofenonas isoladas de Clusia spp.</i>	147
6.1 Considerações Gerais	149
6.2 Objetivos	160
6.3 Resultados e discussão	160
6.4 Conclusões	193
<i>Parte 7-Conclusões finais</i>	195
<i>Parte 8-Experimental</i>	199
8.1 Notas gerais	201
8.2 Experimental referente à parte 3: Importância ecológica e taxonômica dos voláteis florais de Clusia	203

8.2.1 Obtenção do material vegetal	203
8.2.2 Métodos de extração dos voláteis	204
8.2.2.1 Micro-hidrodestilação	204
8.2.2.2 SPME	204
8.2.2.3 CO ₂ líquido (EFSC)	204
8.2.2.4 “headspace” dinâmico com Porapak Q®	205
8.2.3 CG e CG/EM	205
8.3 Experimental referente à parte 4: Função ecológica dos óleos florais de <i>Tovomita</i>	206
8.3.1 Métodos e obtenção do material vegetal	206
8.3.2 CG e CG/EM	207
8.3.3 Reação de hidrogenação do fitol comercial (obtenção do diidrofitol)	208
8.4 Experimental referente à parte 5: Análises de voláteis por CG/EM em suco de laranja industrial infectado por <i>Alicyclobacillus</i> spp.	209
8.4.1 Método de análise dos ácidos graxos dos microrganismos	209
8.4.2 Procedimento para obtenção dos sucos de laranja deteriorados	209
8.4.3 Procedimento para a extração dos componentes voláteis dos sucos de laranja	211
8.4.4 CG e CG/EM	212
8.4.5 Preparação do inóculo	213
8.4.6 Protocolo do teste com atmosfera de gases modificada	213
8.4.7 Preparo das amostras	213
8.4.8 Análises Olfativas (CG/O)	214
8.5 Experimental referente à parte 6: Estudos sintéticos para obtenção das benzofenonas isoladas de <i>Clusia</i>	215
8.5.1 Rota via acetilacetona	215
8.5.1.1 Preparação do 1-bromo-3-metil-2-buten-2-ol (brometo de prenila)	215
8.5.1.2 Obtenção do prenol a partir do 2-metil-3-buten-2-ol (rearranjo alílico)	216
8.5.1.2.1 Hidrólise do acetato de prenila	217

8.5.1.3 Reação de alquilação da acetilacetona	217
8.5.1.4 Reação de acilação da 3,3-diprenil-1,4-pentanodiona	218
8.5.1.5 Tentativa de carbetoxilação da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona	222
8.5.2 Rota via floroglucinol	223
8.5.2.1 Reação de acilação do floroglucinol (Acilação de Friedel-Crafts)	223
8.5.2.2 Reação de metilação do floroglucinol	224
8.5.2.3 Reação de prenilação do 3,5-dimetoxifenol (Método de Miura <i>et al.</i>)	225
8.5.2.4 Reação de prenilação do floroglucinol desidratado	226
8.5.2.5 Tentativa de obtenção da grandona (S1) (Método de Miura <i>et al.</i>)	227
8.5.2.6 Reação de prenilação da florobenzofenona com KOH	227
8.5.2.7 Reação de alquenilação da florobenzofenona em NH ₃ líquida	230

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo geral para o processo de transdução _____	4
Figura 2. Esquema simplificado da biologia do cheiro _____	5
Figura 3. Definições dos termos usados em aleloquímicos de acordo com o conceito de infoquímicos _____	10
Figura 4. Classificação geral dos termos em ecologia química _____	11
Figura 5. Esquema geral para destilações a vapor. a) hidrodestilação b) aparelhagem Likens-Nickerson _____	19
Figura 6. Esquema geral para amostragem dinâmica do espaço livre (“headspace” dinâmico) utilizando polímeros adsorventes _____	22
Figura 7. Sistema de alta pressão para extração com CO ₂ líquido. a) corte transversal do sistema b) equipamento comercial (J&W Scientific) para extrações em escala de laboratório _____	24
Figura 8. Esquema geral para análise com SPME em CG. a) Detalhe da fibra com a amostra b) inserção da seringa no injetor do CG _____	26
Figura 9. Sistema CG/O com um analisador sentado na frente de um terminal registrando as percepções de odor _____	31
Figura 10. Modelo de sistema otimizado para cheirar efluentes do CG _____	32
Figura 11. Processo para coleta e representação dos dados obtidos por CG/O baseados nos 2 protocolos de diluição em série mais comuns, AEDA e CHARM _____	33
Figura 12. Mapa da distribuição geral de Guttiferae (Clusiaceae) no mundo _____	38
Figura 13. Espécies estudadas de <i>Clusia</i> representantes da seção <i>Chlamydoclusia</i> : A) <i>C. grandiflora</i> com abelha euglossa coletando resina B) <i>C. rosea</i> C) <i>C. nemorosa</i> masc. _____	40
Figura 14. Espécies estudadas de <i>Clusia</i> representantes da seção <i>Cordylandra</i> : A) <i>C. weddelliana</i> masc. B) <i>C. paralicola</i> masc. C) <i>C. spiritu-sanctensis</i> masc. D) <i>C. panapanari</i> fem. com abelha <i>Trigona spinipes</i> coletando resina _____	41
Figura 15. Representantes das espécies de <i>Clusia</i> estudadas. A) <i>C. parviflora</i> masc. (seção <i>Criuva</i>) com besouros coletando pólen B) <i>C. lanceolata</i> fem. (seção <i>Phloianthera</i>) com abelha <i>Trigona spinipes</i> coletando resina _____	42
Figura 16. Cromatogramas (CG/EM: coluna DB-5) representativos dos voláteis florais de <i>C. fluminensis</i> obtidos através de SPME (30 µm PDMS) (A) e micro-hidrodestilação (B) _____	46

- Figura 17.** Cromatogramas (CG/EM: coluna DB-5 30m) representativos dos voláteis florais de *C. flava* obtidos através de micro-hidrodestilação (A) e SPME (30 µm PDMS) (B) _____ 44
- Figura 18.** Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) representativos dos voláteis florais de *C. grandiflora* ♂ obtidos através CO₂ líquido (A) e micro-hidrodestilação (B) _____ 48
- Figura 19.** Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) representativos dos voláteis florais de *C. parviflora* ♂ obtidos através de micro-hidrodestilação (A), CO₂ líquido (B) e SPME (30 µm PDMS) (C) _____ 49
- Figura 20.** Cromatogramas (CG/EM) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Chlamydoclusia* através de micro-hidrodestilação. A) *C. grandiflora* ♀, B) *C. nemorosa* ♂, C) *C. nemorosa* hermaf., D) *C. rosea* ♀ _____ 51
- Figura 21.** Cromatogramas (CG/EM) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Cordylandra* através de micro-hidrodestilação. A) *C. paralicola* ♂, B) *C. spiritus-sanctensis* ♂, C) *C. panapanari* ♀, D) *C. renggerioides* ♂ _____ 52
- Figura 22.** Cromatogramas (CG/EM) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Cordylandra* através de micro-hidrodestilação. A) *C. burchellii* ♂, B) *C. fluminensis* ♀, C) *C. pernambucensis* ♂, D) *C. weddelliana* ♂ _____ 53
- Figura 23.** Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Criuva* através de micro-hidrodestilação. A) *C. parviflora* ♂, B) *C. criuva* ♂, C) *C. flava* ♂ _____ 54
- Figura 24.** Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Phloianthera* através de micro-hidrodestilação. A) *C. hilariana* ♂, B) *C. lanceolata* ♂ _____ 55
- Figura 25.** Dendrograma mostrando similaridades das espécies de *Clusia* usando a média de grupo (UPGMA) com a distância corda baseada na matriz de dados das fragrâncias florais de acordo com a Tabela 1 _____ 59
- Figura 26.** Dendrograma mostrando similaridades das espécies de *Clusia* usando a média de grupo (UPGMA) com a distância corda baseada na matriz de dados das fragrâncias florais de acordo com a Tabela 2 _____ 59
- Figura 27.** Experimento com tecido preto impregnado com pétalas de *C. lanceolata* para atração de abelhas (no detalhe) _____ 69
- Figura 28.** Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) mostrando as diferenças entre os voláteis das pétalas de 1º e 2º dia em *Clusia lanceolata* feminina _____ 71

Figura 29. Comparação entre EM do composto $I_R=1405$ (A) e do dolícodial (B)	72
Figura 30. Cladograma mostrando relações filogenéticas entre as espécies usando caracteres de sequenciamento de DNA nuclear (região ITS)	75
Figura 31. Principais compostos encontrados em estudos fitoquímicos de <i>Tovomita</i>	81
Figura 32. Macho de abelha euglossínea. A) escovas da perna dianteira B) seção mostrando o interior glandular da perna traseira	83
Figura 33. Principais compostos encontrados no órgão da perna traseira de 3 espécies de abelhas Euglossíni (<i>Euglossa cognata</i> , <i>E. imperialis</i> , <i>E. tridentata</i>)	84
Figura 34. Posição do macho empoleirado na árvore em seu território. a) visão lateral de uma <i>Euglossa imperialis</i> b) visão do dorso de uma <i>Eulaema meriana</i> se exibindo (asas em forma de leque)	85
Figura 35. Flores de <i>Tovomita spruceana</i> Planch. & Triana. A) com uma abelha euglossínea coletando óleo B) detalhe das gotículas de óleo aromático secretadas pelos estames	86
Figura 36. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por CG/EM (coluna DB-5 30m) das 4 espécies de <i>Tovomita</i> estudadas	88
Figura 37. Principais compostos encontrados nos óleos dos estames das 4 espécies de <i>Tovomita</i>	89
Figura 38. Espectros de massas dos compostos majoritários com $I_R=1533$ (T21), $I_R=1744$ (T43), $I_R=1808$ (T51) e $I_R=1831$ (T53) encontrados em <i>Tovomita</i> aff. <i>grata</i>	97
Figura 39. Principais compostos associados ao mau odor em sucos infectados	105
Figura 40. Diagrama mostrando a origem da vida	108
Figura 41. Principais ácidos graxos encontrados na membrana celular de <i>Bacteria</i> e <i>Eukarya</i>	110
Figura 42. Principais tipos de lipídios encontrados na membrana celular das bactérias	111
Figura 43. Principais tipos de ligações encontradas nos lipídios da membrana celular. a) éster acílico que é encontrado na maioria das bactérias b) ligação etérea presente no grupo <i>Archaea</i> c) unidade repetida derivada do isopreno encontrada na cadeia lateral dos lipídios de <i>Archaea</i>	112
Figura 44. Principais ácidos graxos encontrados nas membranas celulares dos <i>Alicyclobacillus</i>	114
Figura 45. TIC (CG/EM: coluna DB-5 30m) dos EMAG obtidos a partir de <i>Alicyclobacillus</i> sp.	116

Figura 46. Espectros de massas (IE, 70ev) dos ésteres metílicos dos ácidos ω -cicloexilundecanóico e ω -cicloexiltridecanóico obtidos a partir da membrana celular dos <i>Alicyclobacillus</i>	117
Figura 47. Espectros de massas (IE, 70ev) dos ésteres metílicos dos ácidos ω -cicloeptildecanóico e ω -cicloeptilundecanóico obtidos a partir da membrana celular dos <i>Alicyclobacillus</i>	118
Figura 48. Espectros de massas (IE, 70ev) dos ésteres metílicos dos ácidos ω -cicloeptildodecanóico e α -OH- ω -cicloeptilundecanóico obtidos a partir da membrana celular dos <i>Alicyclobacillus</i>	119
Figura 49. Espectro de massas (IE, 70ev) do éster metílico do ácido ω -cicloeptiltridecanóico obtido a partir da membrana celular dos <i>Alicyclobacillus</i>	120
Figura 50. Variações nos percentuais relativos de compostos importantes encontrados nos experimentos para otimização do crescimento dos microrganismos e método de extração dos voláteis em SLCC	123
Figura 51. Cromatogramas de íons totais (TIC) (CG/EM: coluna DB-5 30m, 0,25mm, 0,25 μ m) dos voláteis dos sucos de laranja fresco e deteriorado obtidos através do experimento II	124
Figura 52. Espectros de massas dos compostos co-eluídos (SL68 e SL68') com $I_R=1562$ encontrados apenas nos sucos deteriorados	125
Figura 53. Esquema representativo da adaptação das 2 colunas DB-1 (30m, 0,25mm, 0,25 μ m) no CG para as análises olfativas (CG/O) realizadas nas amostras de suco de laranja	130
Figura 54. TIC (CG/EM: DB-5 30m) dos voláteis produzidos nas amostras de suco de laranja preenchidas com nitrogênio	134
Figura 55. TIC (CG/EM: DB-5 30m) dos voláteis produzidos nas amostras de suco de laranja preenchidas com oxigênio	135
Figura 56. TIC (CG/EM: DB-5 30m) dos voláteis produzidos nas amostras de suco de laranja preenchidas com ar atmosférico	136
Figura 57. Cromatogramas do experimento CG/O realizado com amostra de suco de laranja com 21 dias de incubação preenchida com ar atmosférico. A) TIC (CG/EM: DB-5 30m) B) e C) expansões dos cromatogramas (CG-FID: DB-1 30m) na análise de CG/O associando t_r e odor percebido	145
Figura 58. Benzofenonas poliisopreniladas isoladas da resina floral de <i>Clusia</i> spp.	150

Figura 59. Benzofenonas simples encontradas em Guttiferae _____	151
Figura 60. Algumas benzofenonas verdadeiras encontradas em Guttiferae _____	153
Figura 61. Algumas benzofenonas verdadeiras isoladas de Guttiferae _____	154
Figura 62. Benzofenonas poliisopreniladas isoladas de Guttiferae _____	155
Figura 63. Proposta de formação das benzofenonas poliisopreniladas bi- e tricíclicas _____	156
Figura 64. Estrutura dos compostos lupulona e humulona _____	157
Figura 65. Produtos obtidos da reação de alquilação da florobenzofenona (S8) usando KOH como base _____	171

Lista de Esquemas

Esquema 1. Diagrama dos métodos atuais de amostragem que não utilizam solvente orgânico	20
Esquema 2. Preparação do diidrofitol a partir da reação de hidrogenação catalítica do fitol comercial _____	93
Esquema 3. Proposta de formação do 4-vinil-guaiacol _____	105
Esquema 4. Caminho biossintético para os polifenóis a partir de um policetídeo _____	157
Esquema 5. Caminho biossintético proposto por Drawert & Beier _____	158
Esquema 6. Rota biossintética para lupulona proposta por Verpoorte <i>et al.</i> _____	159
Esquema 7. Proposta de retrossíntese para as benzofenonas poliisopreniladas via 2 caminhos biomiméticos _____	160
Esquema 8. Proposta para obtenção dos precursores das benzofenonas bicíclicas _____	161
Esquema 9. Tentativa de obtenção do tricetoéster (S5) _____	162
Esquema 10. Proposta de mecanismo para formação do produto retro-Claisen (S6) _____	166
Esquema 11. Reação de alquilação descrita por Miura <i>et al.</i> _____	172
Esquema 12. Reação de acilação de Friedel-Crafts do floroglucinol (S7) _____	172
Esquema 13. Tentativa de obtenção do produto de alquilação C,C-geminal sob as condições de Miura <i>et al.</i> _____	176
Esquema 14. Alquilação da florobenzofenona (S8) usando KOH como base _____	179
Esquema 15. Proposta de fragmentação para o produto 2,2-dimetilcromano (S11) _____	188
Esquema 16. Síntese bem sucedida do composto trialquenilado _____	189
Esquema 17. Florobenzofenona (S8) como intermediário pivotal aos dois tipos de benzofenonas isoladas de Guttiferae _____	194

Lista de Espectros

E1: Espectro de massas (IE, 70 eV) do 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecanol, diidrofitol (T76)	93
E2: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecanol (T76)	94
E3: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecanol (T76)	94
E4: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90 e 135°) (75,45 MHz, CDCl_3) do diidrofitol (T76)	95
E5: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3)	163
E6: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3)	163
E7: Espectro de DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3)	164
E8: Espectro de massas (IE, 70 eV) da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3)	164
E9: Espectro RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (S4)	166
E10: Espectro RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (S4)	167
E11: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, CDCl_3) da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (S4)	167
E12: Espectros de massas (IE, 70 eV) da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (S4) (3 tautômeros)	168
E13: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do produto da clivagem retro-Claisen (S6)	169
E14: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do produto da clivagem retro-Claisen (S6)	169
E15: Espectro de DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do produto da clivagem retro-Claisen (S6)	170
E16: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto da clivagem retro-Claisen (S6)	170
E17: Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, acetona- d_6) da florobenzofenona (S8)	173
E18: Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, acetona- d_6) da florobenzofenona (S8)	173
E19: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, acetona- d_6) da florobenzofenona (S8)	174
E20: Espectro no Infravermelho (pastilha KBr) da florobenzofenona (S8)	174
E21: Espectro de massas (IE, 70 eV) da florobenzofenona (S8)	175

E22: Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (S9)	176
E23: Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (S9)	177
E24: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, CDCl_3) do 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (S9)	177
E25: Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (S9)	178
E26: Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S11)	180
E27: Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S11)	181
E28: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S11)	181
E29: Espectro no Infravermelho (pastilha KBr) do produto 2,2-dimetilcromano (S11)	182
E30: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto 2,2-dimetilcromano (S11)	182
E31: Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S12)	183
E32: Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S12)	183
E33: Espectro DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, CDCl_3) do 2,2-dimetilcromano (S12)	184
E34: Espectro no Infravermelho (pastilha KBr) do produto 2,2-dimetilcromano (S12)	184
E35: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto 2,2-dimetilcromano (S12)	185
E36: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S13)	185
E37: Expansão do espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do 2,2-dimetilcromano (S13)	186
E38: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S13)	186
E39: Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do 2,2-dimetilcromano (S13)	187
E40: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto 2,2-dimetilcromano (S13)	187
E41: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do produto alilflorobenzofenona (S14)	190
E42: Expansões do espectro RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do produto alilflorobenzofenona (S14)	190
E43: Espectro RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do produto alilflorobenzofenona (S14)	191
E44: Espectro de DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do produto alilflorobenzofenona (S14)	191
E45: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto alilflorobenzofenona (S14)	192

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição percentual relativa dos óleos essenciais das pétalas de 16 espécies de <i>Clusia</i> pertencentes a quatro seções taxonômicas _____	61
Tabela 2: Componentes voláteis das flores de 16 espécies de <i>Clusia</i> agrupadas em 10 classes diferentes _____	67
Tabela 3: Composição percentual relativa dos óleos dos estames de <i>Tovomita</i> spp. _____	90
Tabela 4: Percentagem relativa dos compostos voláteis obtidos a partir dos sucos de laranja frescos (SF) e deteriorados (SD) por hidrodestilação nos experimentos I e II _____	126
Tabela 5: Composição percentual relativa dos voláteis de suco laranja contaminados com <i>Alicyclobacillus</i> variando-se o gás de preenchimento (ar atmosférico, oxigênio e nitrogênio) _____	137
Tabela 6: Condições usadas para as reações de acilação da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona ____	165
Tabela 7: Fases da análise das amostras de suco inoculado com <i>Alicyclobacillus</i> e armazenados em diferentes condições de atmosfera de gases _____	202

Lista de Abreviaturas

δ	deslocamento químico
AEDA	“aroma extraction dilution analysis”
ATSB	“acid thermophilic sporeforming bacterium”
<i>ca.</i>	<i>circa</i> , em torno de
CCD	cromatografia em camada delgada
CCT	coleção de culturas tropicais
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG/O	cromatografia gasosa acoplada à olfatometria
CHARM	“combined hedonic and response measurements”
DEPT	“distortionless enhancement by polarization transfer”
EFSC	extração com fluido supercrítico
EM	espectrometria de massas
EMAG	ésteres metílicos de ácidos graxos
eV	elétons-volt
FID	“flame ionization detector”
Hz	Hertz
IE	ionização por elétrons
I_R	índice de retenção
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento escalar

LDA	diisopropilamideto de lítio
LHMDS	hexametildissilazida de lítio
m/z	razão entre a massa do fragmento e sua respectiva carga elétrica
M^+	íon molecular
Me	grupo metila
nBuLi	n-butil-lítio
NHMDS	hexametildissilazida de sódio
Nu	nucleófilo
PA	poliacrilato
PDMS	polidimetilsiloxano
Ph	fenil
PTSA	ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
PVG	4-vinil-guaiacol
RMN	ressonância magnética nuclear
SLCC	suco de laranja concentrado e congelado
SPME	“solid phase micro extraction”
t.a.	temperatura ambiente
THF	tetraidrofurano
TIC	“total ion chromatogram”
TMS	tetrametilsilano
t_r	tempo de retenção
UFC	unidade formadora de colônia
UPGMA	“unweight pair group method arithmetical”

Parte 1

Introdução

1. Introdução

Os seres vivos se comunicam através de mensagens veiculadas através dos cinco sentidos. Audição, visão e tato são sentidos essencialmente físicos, enquanto paladar e olfato são sentidos químicos, isto é, baseiam-se nas interações entre moléculas e receptores de órgãos apropriados.

Dentre os cinco sentidos, aqueles que quase todos os animais dependem mais profundamente são os sentidos químicos; apenas alguns grupos de pássaros e alguns poucos primatas dependem mais da visão que do olfato e do paladar. A quimiorrecepção, ou seja, a habilidade para detectar sinais químicos, foi provavelmente o primeiro tipo de sensação entre os organismos primitivos e o mecanismo original da quimiorrecepção é provavelmente a base do olfato e do paladar que nós e outros animais possuímos até hoje.

Apesar da importância dos sentidos químicos, pouco se sabe a respeito deles. Os resultados das pesquisas nesta área indicaram que os receptores usados para detectar os odorantes (compostos químicos que produzem a sensação de odor) são similares àqueles usados na visão, bem como aos receptores usados para detectar os hormônios¹. O sistema olfativo dos seres humanos e de outros organismos vivos consiste da transdução, ou seja, um processo para converter uma forma química em impulsos eletroquímicos que são transmitidos ao cérebro (Figura 1). Esta transdução (detecção dos odorantes) ocorre na superfície de uma área pequena de tecido amarelo, localizada no topo da cavidade nasal aproximadamente no nível dos olhos, chamada de epitélio olfativo (Figura 2). O epitélio possui vários tipos de células receptoras, as quais retransmitem os sinais nervosos via neurônios dentro do bulbo olfativo localizado no cérebro, e de lá para o sistema límbico e para o cérebro superior (Figura 2). Há evidências de que todos os sinais de um tipo de receptor convergem para uma área comum do bulbo olfativo e que os receptores respondem a mais de um odorante, sugerindo que eles detectam apenas as partes características de sua estrutura (os chamados odotopos) e não a molécula toda. Estudos recentes confirmaram que os sítios de um receptor no epitélio olfativo são formados por

¹ Axel, R. *Sci. Amer.*, 1995, October, 130.

proteínas que se entrelaçam sete vezes dentro e fora da membrana celular do receptor (proteína-G). Estas proteínas receptoras possuem um desenho primordial e compartilham suas características estruturais com diferentes espécies. Esta similaridade implica que diferentes espécies podem “cheirar” o mesmo composto químico ou similar, da mesma maneira que diferentes espécies respondem ao mesmo comprimento de onda da luz.

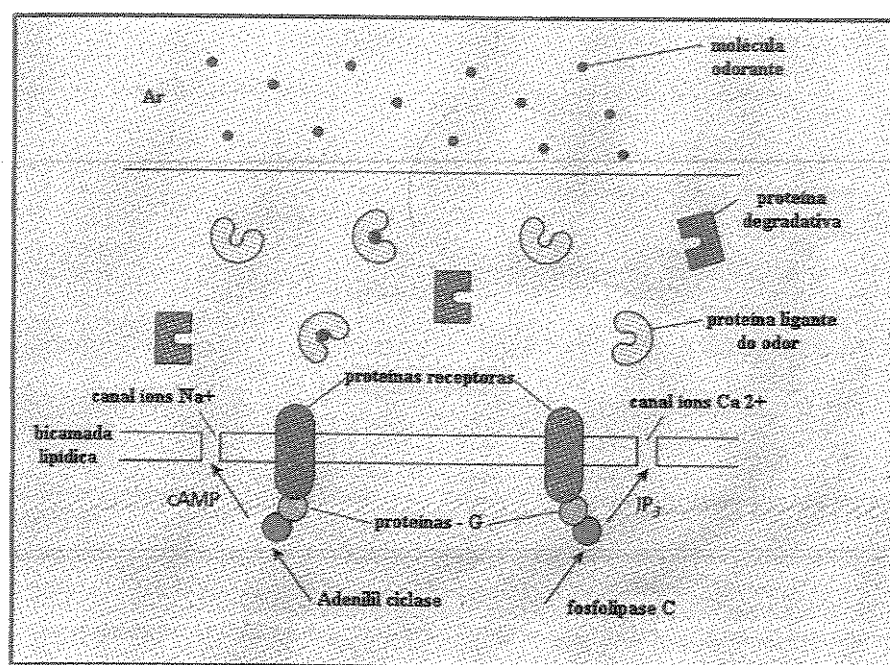


Figura 1. Modelo geral para o processo de transdução: a mudança causada na proteína receptora pela sua interação com uma molécula de odorante, faz com que a proteína-G associada com o receptor ative tanto a fosfolipase-C quanto a adenilil-ciclase, que por sua vez liberam os mensageiros secundários inositol trifosfato (IP₃) e adenosina monofosfato cíclica (cAMP) na célula. Estes mensageiros fazem com que os canais de Na⁺ e Ca²⁺ na membrana celular se abram e o influxo de íons positivos na célula inicia uma diminuição na voltagem através da membrana celular ocasionando, ao final, a geração de um impulso nervoso.

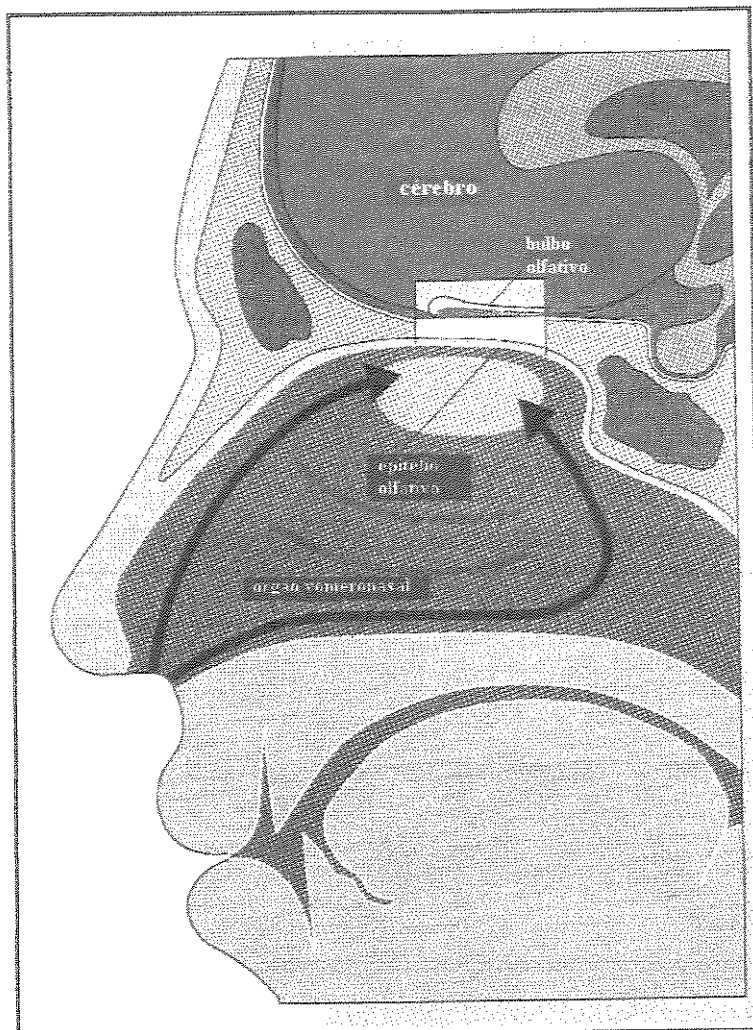


Figura 2. Esquema simplificado da biologia do cheiro.

Muitas teorias tentam explicar como os seres vivos percebem os odores², sendo a teoria da radiação, postulada por Aristóteles no século 4 a.C, a mais estranha dentre todas. Esta teoria propõe que as substâncias odoríferas emitem uma radiação que é detectada pelo receptor olfativo. Miles & Beck, em 1947, deram suporte para esta teoria afirmando que as abelhas deveriam detectar o cheiro de mel através de um recipiente

² Sell, C. *Chem. Britain*, 1997, **33**, 39.

transparente ao espectro do infravermelho distante, mas como seus resultados nunca foram repetidos, hoje não se dá importância a esta teoria. Outras teorias fora de uso incluem a teoria da atividade termodinâmica postulada por Gavaudan (1948), a teoria cromatográfica de Mozell (1970) e a teoria da penetração da membrana de Davies (1971). Estas teorias possuem em comum o fato de relatar a solubilidade e/ou volatilidade do odorante, propriedades estas que determinam o transporte da molécula da fonte ao receptor, mas não estão necessariamente envolvidas na geração do impulso nervoso.

As teorias que ainda são levadas a sério podem ser separadas em 2 classes, chamadas aqui de teorias de reconhecimento (odotopos) e vibração. Ambas as classes propõem que uma molécula do odorante entre em contato com um receptor apropriado, ocasionando a geração de um impulso nervoso na célula do receptor. Nas teorias de reconhecimento, o contato se dá pelo reconhecimento molecular de um substrato (o odorante) por uma proteína (o receptor), enquanto nas teorias de vibração, o receptor de alguma maneira sente uma vibração molecular específica ou um grupo de vibrações do substrato.

A primeira teoria de reconhecimento foi postulada por Epicurus no século 4 a.C., sendo o conceito mais atual proposto por John Amoore, o qual postula a existência de diferentes tipos de receptores no nariz, cada qual capaz de reconhecer uma forma molecular particular (o odorante) que, ao entrarem em contato, geram um sinal para um odor primário³. Segundo Amoore, os odores primários da olfação têm função similar às cores primárias utilizadas na visão e, após estudos com anosmias específicas, ou seja, a incapacidade de algumas pessoas em detectar parcial ou totalmente alguns tipos de odores, postulou uma lista com 10 odores primários (acre, almíscar, ambergris, cânfora, etéreo, floral, hortelã, pútrido, sândalo e urina).

³ Amoore, J.E. Odor theory and odor classification. In *Fragrance chemistry: the science of the sense of smell*. Theimer, E.T. (Ed.). Academic Press, New York, 1982, 27.

Há ainda outras duas teorias de reconhecimento que merecem atenção. Aquela postulada por M. G. J. Beets⁴ (1968), o qual propôs que o grupo funcional num odorante serve para alinhá-lo com o receptor e que o perfil do volume espacial apresentado ao receptor é de fundamental importância para a determinação do odor; e uma outra teoria, que combina o uso da estrutura eletrônica e a conformação das moléculas, chamado de método elétron-topológica⁵, a qual é defendida por um grupo de pesquisadores na Universidade de Kishinev na Moldávia. Nesta última teoria, o reconhecimento se daria através dos elétrons dos orbitais de fronteira do odorante e pressupõe uma série dos chamados triângulos do odor, cujas dimensões do triângulo de átomos e as suas propriedades eletrônicas numa molécula foram preestabelecidas de acordo com cada tipo de odor, que mesmo variando em tamanho e forma de um tipo de odor para o outro o triângulo normalmente compreende um átomo de oxigênio e 2 átomos de hidrogênio.

A teoria de vibração foi inicialmente proposta por G. M. Dyson⁶ em 1938 e propõe que um receptor no nariz detecta as vibrações das moléculas odorantes e estas são interpretadas pelo cérebro como odor. Esta teoria foi refinada por Robert Wright⁷, pesquisador britânico, o qual afirmou ter encontrado correlações entre odor e o espectro de infravermelho durante as décadas de 60 e 70. Recentemente, Luca Turin⁸ (1996) apresentou um mecanismo complementar correlacionando as bandas vibracionais no espectro de infravermelho dos compostos odorantes com a resposta olfativa.

De modo geral, esta é uma questão que permanece aberta e nenhuma das teorias consegue responder com clareza como percebemos os odores, e cada teoria complementa a outra, ou seja, a teoria de vibração melhor determina o caráter do odor de uma molécula enquanto a teoria de reconhecimento (odotopos) explica melhor a sua intensidade (limites de detecção).

Independente dos modelos citados acima, a comunicação química ocorre através de moléculas orgânicas voláteis de aproximadamente 300 daltons, facilmente carregadas pela

⁴ Turin, L.; Yoshii, F. Hipertexto : http://www.physiol.ucl.ac.uk/research/turin_l/review_final.pdf e referências citadas.

⁵ Rossiter, K.J. *Chem. Reviews*, 1996, **96**, 3201 e referências citadas.

⁶ Dyson, G.M. *Chem. Ind.*, 1938, **57**, 647.

⁷ Wright, R.H. *The sense of smell*. CRC Press, Boca Raton, 1982.

água e pelo ar. Os compostos voláteis englobam muitas classes de produtos naturais (isoprenóides, derivados de ácidos graxos, benzenóides e aminóides) e cada uma delas podem conter os mais diversos grupos funcionais (hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres).

Os compostos voláteis são a base das respostas emocionais e comportamentais e são utilizados em diferentes contextos nas interações entre organismos vivos: na aquisição de alimento ou atração do parceiro sexual, em interações sociais diárias, para demarcação de território, para repelir um inimigo ou para avisar outros do perigo. Podem ser importantes no sentido de equacionar um dos maiores problemas da humanidade, isto é, a produção de alimento; seja evitando a utilização de substâncias agressivas à natureza através do controle biológico de insetos daninhos ou através do controle de sua qualidade tornando-os mais atrativos aos consumidores, uma vez que a demanda de alimentos industrializados nas últimas décadas aumentou com o rápido crescimento da população no planeta.

Para os seres humanos, compostos voláteis não veiculam mensagens entre seus indivíduos, mas são utilizados em perfumaria e na química de aromatizantes. Dezenas de milhares de compostos foram identificados e correlacionados aos estudos dos odores característicos, que se estendem desde pesquisa de olfatometria simples até avaliações de propriedades medicinais e efeitos fisiológicos e psicológicos⁹. Podemos dividir os aromas em duas classes genéricas: aquelas agradáveis (perfumadas) e aquelas desagradáveis (repulsivas ou aminoídicas)¹⁰. Entretanto, os outros organismos vivos são atraídos pelo aroma, qualquer que seja a classificação dos mesmos pelo olfato humano. Em alguns casos, o constituinte majoritário pode ser responsável por um odor em particular, mas normalmente os aromas são misturas de componentes, sendo que um componente pode reforçar a efetividade de um segundo e terceiro, produzindo um odor característico.

⁸ Turin, L. *Chem. Senses*, 1996, **21**, 773.

⁹ van Toller, S.; Dodd, G.H. (Eds.). *Perfumery: the psychology and biology of fragrance*. Chapman & Hall, Cambridge, 1988.

¹⁰ Harborne, J.B. *Introduction to ecological biochemistry*. 4th Ed. Academic Press, London, 1993, p. 54.

Sob o prisma da ecologia química¹¹, a área de estudo que trata das interações entre organismos e seu meio-ambiente mediadas por agentes químicos¹², os voláteis desempenham um papel fundamental e dentro deste universo, alguns termos foram criados. O mais conhecido deles é *feromônio*, o qual refere-se a compostos químicos ou misturas deles que são usados como vetores de comunicação entre indivíduos de uma mesma espécie. São classificados de acordo com sua função: sexual, alarme, recrutamento, trilha, agregação, etc. Outro termo, menos conhecido entre não especialistas, é *aleloquímico*, o qual refere-se a um grupo muito maior de compostos que facilitam a comunicação entre indivíduos de espécies diferentes (Figura 3). São subdivididos em alomônio (benéfico ao emissor e prejudicial ao receptor); cairomônio (benéfico ao receptor e prejudicial ao emissor); sinomônio (benéfico para ambos) e apneumônio (emitido a partir de material não vivo, e benéfico ao receptor). Atualmente, ainda encontramos na literatura controvérsias a respeito da definição global destes mediadores (Figura 4), os quais podem ser denominados como infoquímicos¹³ (termo mais atual, baseado em conceitos evolutivos e na relação custo-benefício) ou semioquímicos¹⁴ (termo original e ainda o mais usado¹⁵, baseado em critérios de origem-organismo emissor).

¹¹ definição segundo a ISCE (International Society of Chemical Ecology): área que estuda a estrutura, função e biossíntese de produtos naturais, sua origem evolucionária e sua aplicação às necessidades de uma sociedade.

¹² Oldham, N.J.; Boland, W. *Naturwissenschaften*, 1996, **83**, 248.

¹³ Dicke, M.; Sabelis, M.W. *Functional Ecology*, 1988, **2**, 131.

¹⁴ Nordlund, D. A.; Lewis, W.J. *J. Chem. Ecol.*, 1976, **2**, 211.

¹⁵ Hick, A. J.; Luszniak, M.C.; Pickett, J. A. *Nat. Prod. Rep.*, 1999, **16**, 39.

Aleloquímicos
compostos químicos que permitem a comunicação entre indivíduos de espécies diferentes.
alomônio: um aleloquímico pertinente a biologia de um organismo 1 que em contato com um organismo de uma outra espécie (organismo 2) provoca no receptor um comportamento e/ou resposta fisiológica que é favorável ao organismo 1, mas não ao organismo 2. Ex: o aroma emitido por flores de <i>Dracula chestertonii</i> para atrair moscas fêmeas, suas polinizadoras, o qual é similar ao aroma de um cogumelo (local de ovoposição destas moscas) usado como fonte nutritiva para suas larvas, que ao eclodirem morrem por escassez de alimento ¹⁶ .
caiomônio: um aleloquímico pertinente a biologia de um organismo 1 que em contato com um organismo de uma outra espécie (organismo 2) provoca no receptor um comportamento e/ou resposta fisiológica que é favorável ao organismo 2, mas não ao organismo 1. Ex: os voláteis emitidos pelo milho (fenilacetaldéido e 3-metil-1-butanol) e o etileno das frutas maduras atraem e estimulam a produção do feromônio sexual de mariposas fêmeas de <i>Helicoverpa zea</i> [(Z)-11-hexadecenal] que, só atraem eficientemente os machos, quando em contato com acetato de (Z)-3-hexenila, um componente volátil emitido normalmente por plantas de folhas verdes, que servirão de fonte de alimento para a futura prole (as larvas) ¹⁷ .
sinomônio: um aleloquímico pertinente a biologia de um organismo 1 que em contato com um organismo de uma outra espécie (organismo 2) provoca no receptor um comportamento e/ou resposta fisiológica que é favorável tanto ao organismo 1 quanto ao organismo 2. Ex: os voláteis emitidos pelo milho (<i>Zea mays</i>) quando é atacado por lagartas de <i>Spodoptera exigua</i> , atraem fêmeas da vespa <i>Cortesia marginiventris</i> , um predador natural das lagartas ¹⁷ .
apneumônio* : substâncias emitidas por material não vivo que provoca no receptor um comportamento e/ou resposta fisiológica que é favorável ao organismo receptor, mas não ao organismo de outra espécie que pode ser ou não encontrado no material não vivo.

Figura 3. Definições dos termos usados para aleloquímicos de acordo com o conceito de infoquímicos. * Termo usado apenas no conceito de semioquímicos.

¹⁶ Kaiser, R. *The scent of orchid, olfactory and chemical investigations*. Elsevier, Amsterdam, 1993.

¹⁷ Oldham, N.J.; Boland, W. *Naturwissenschaften*, 1996, **83**, 248.

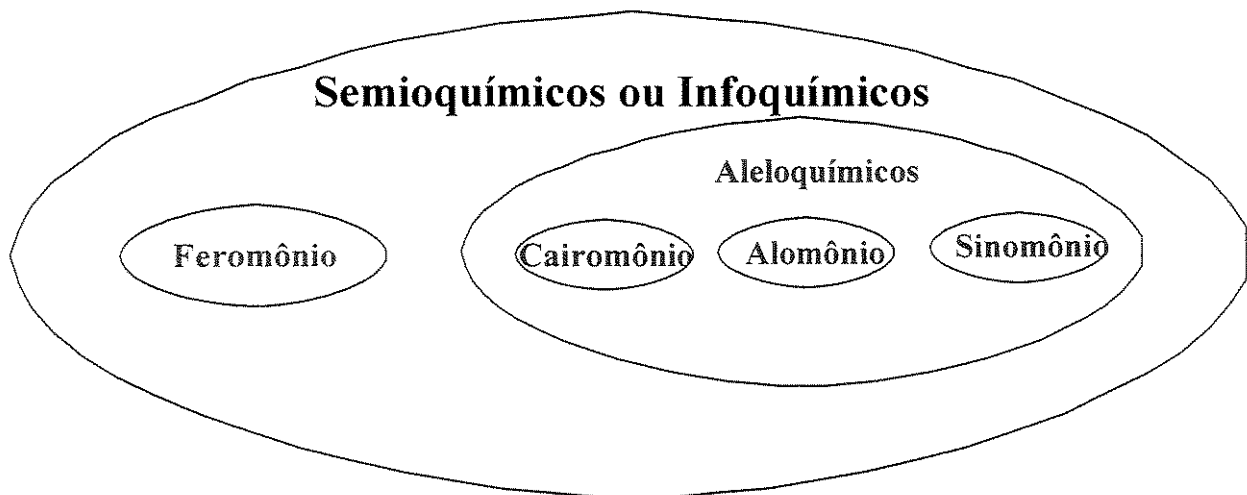


Figura 4. Classificação geral dos termos em ecologia química

Aroma floral é um componente importante da biologia reprodutiva de muitas angiospermas (plantas floríferas), advertindo a presença de recompensas para um polinizador, ou mesmo servindo como a própria recompensa. Podem servir como atraente em plantas polinizadas por abelhas, besouros, borboletas, moscas, mariposas e até morcegos. Pesquisas nesta área têm implicações importantes em estudos de dispersão de pólen, polinização por engano, comportamento de insetos forrageiros e controle de insetos daninhos. Além disso, a variação na composição destes aromas, quando combinada com a variação de visita dos polinizadores, pode fornecer um mecanismo para o isolamento reprodutivo em algumas angiospermas. Estes estudos se expandiram graças aos rápidos avanços obtidos em CG/EM durante os últimos 30 anos, o que acelerou o desenvolvimento de análises químicas sensíveis e reprodutíveis nas pesquisas de aromas¹⁸. No entanto, considerando a importância das interações inseto-plantas, ainda existe uma falta de informação considerável sobre a química dos aromas florais. Num universo de mais de 200.000 espécies de plantas floríferas, apenas uma pequena fração foi estudada¹⁹ (mais de 700 compostos voláteis caracterizados a partir de 441 espécies em 174 gêneros de 60 famílias de plantas), sendo relativamente poucos os estudos que estabelecem a estrutura dos constituintes do aroma de uma planta com relação a interação

¹⁸ Raguso, R.A.; Pellmyr, O. *Oikos*, 1998, **81**, 238.

específica com um inseto²⁰. Além disso, nesta área de pesquisa tão abrangente, novos direcionamentos têm sido observados, no que concerne à taxonomia e evolução, revelando uma complexidade ainda maior do que se supunha entre os organismos vivos e a emissão de sinais químicos^{21, 22, 23}.

¹⁹ Knudsen, J.T.; Tollsten, L.; Bergström, L.G. *Phytochemistry*, 1993, **33**, 253.

²⁰ Metcalf, R.L. *Mikrochim. Acta*, 1998, **129**, 167.

²¹ Isaacs, R. *Trends Ecol. Evol.*, 1998, **13**, 3.

²² Norin, T. *Pure Appl. Chem.*, 1996, **68**, 2043.

²³ Armbruster, W.S. *Ecology*, 1997, **78**, 1661.

1.2 Objetivos

Esta tese, cujo tema central é o papel dos compostos voláteis nas interações com organismos receptores, foi dividida em 4 partes. Nas duas primeiras etapas, o tema foi abordado sob o prisma da ecologia química, enquanto numa terceira etapa, foi dado ênfase a interação dos voláteis na dieta dos seres humanos. Por fim, na quarta etapa, como complemento da formação acadêmica, foi feita uma incursão no campo da síntese de produtos naturais. Desta forma, os objetivos gerais do presente trabalho são:

- 1) Averiguar do ponto de vista químico, o papel ecológico dos aromas florais oriundos de espécies de *Clusia* e *Tovomita* nas interações com seus polinizadores;
- 2) Verificar a composição química dos voláteis produzidos pelo suco de laranja deteriorado por microrganismos;
- 3) Viabilizar uma rota sintética para obtenção de benzofenonas isoladas de resinas florais de *Clusia* spp.

Parte 2

Métodos de análise de voláteis

2. Métodos de análise de voláteis

2.1 Considerações gerais

Óleos essenciais são substâncias odoríferas amplamente usadas na indústria de perfumaria, no setor farmacêutico e na área de nutrição humana. São constituídos, na maioria das vezes, de mais de 200 compostos, os quais podem ser divididos basicamente em 2 partes²⁴. A primeira delas, é mais volátil constituindo 90-95% do total do óleo, composta principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, podendo conter aldeídos alifáticos, derivados aromáticos, álcoois e ésteres. A segunda parte é menos volátil, constituindo 5-10% do total do óleo, que pode conter hidrocarbonetos de cadeia longa, ácidos graxos, esteróides, carotenóides, cumarinas e diterpenos. Na fração mais volátil, os terpenos são, em geral, compostos insaturados de fácil decomposição pela ação da luz, do calor e do oxigênio produzindo compostos indesejáveis, os quais podem provocar adulteração do aroma original. A fração oxigenada é altamente odorífera sendo na maioria dos casos, a principal responsável pelos aromas característicos.

No processo de obtenção dos óleos essenciais, as etapas de isolamento, concentração e purificação tornam-se fundamentais tendo em vista o amplo uso destes compostos há vários anos. Os processos mais utilizados são os chamados métodos clássicos²⁵, ou seja, aqueles baseados no arraste a vapor e na extração com solventes orgânicos e, atualmente, os métodos adotados pela indústria para a obtenção dos óleos essenciais são a destilação fracionada a vácuo, a extração seletiva com solvente e a separação por cromatografia.

Sabe-se que a composição dos óleos essenciais depende do método de extração utilizado. Desta forma, as técnicas utilizadas atualmente oferecem várias vantagens individuais, mas também sofrem de algumas limitações específicas. Um problema

²⁴ Luque de Castro, M.D.; Jiménez-Carmona, M.M.; Fernández-Pérez, V. *Trends Anal. Chem.*, 1999, **18**, 708.

²⁵ Sides, A.; Robards, K.; Helliwell, S. *Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 322.

comum a todas elas é a deterioração do aroma pela produção de artefatos (componentes não naturais). Portanto, é desejável empregar condições brandas para evitar oxidações, degradações térmicas ou outras alterações químicas.

Neste capítulo objetivamos apresentar de forma genérica os principais métodos utilizados para o isolamento e identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais, bem como as técnicas alternativas que estão surgindo na tentativa de superar algumas limitações dos métodos clássicos.

2.2 Procedimentos para o isolamento de óleos essenciais

2.2.1 Métodos clássicos

2.2.1.1 Extração direta com solvente

A extração com solvente orgânico é um método importante e muito utilizado para o isolamento dos óleos essenciais de produtos naturais. A extração simples com solvente seguida pela evaporação do mesmo é um dos primeiros métodos usados para recuperar compostos com aroma, principalmente em alimentos. No entanto, os baixos níveis de compostos recuperados aliado ao nível de componentes co-extraídos da matriz restringem o uso da extração direta. Esta técnica utiliza tanto solventes puros quanto misturas, sendo o diclorometano, éter etílico, éter de petróleo e o pentano os solventes orgânicos mais utilizados, principalmente, por apresentarem um baixo ponto de ebulição, permitindo que os componentes mais sensíveis não sejam destruídos por aquecimento, além da seletividade, permitindo que as substâncias odoríferas sejam removidas primeiro²⁶.

²⁶ Walradt, J.P. Analysis of fragrance materials. In *Fragrance chemistry: the science of the sense of smell*. Theimer, E. T. (Ed.). Academic Press, New York, 1982, 575.

2.2.1.2 Destilação a vapor (arraste a vapor, hidrodestilação, destilação à vácuo)

A maioria dos óleos essenciais são preparados usando-se várias técnicas de destilação a vapor, as quais podem ser agrupadas em 2 categorias: no método direto (arraste a vapor), um recipiente é preenchido com o material a ser extraído e o vapor, que é introduzido na base, mistura-se com os compostos voláteis, desta forma, capturando-os. Já no método indireto (hidrodestilação) (Figura 5a), o frasco com o material é inicialmente preenchido com água e depois se permite o aquecimento até a temperatura de ebulição da água de forma que os voláteis possam ser arrastados pelo vapor, o qual é condensado, separando em água e óleo essencial.

A destilação a vapor é um dos processos convencionais mais utilizados para extração de óleos essenciais de plantas e é normalmente feita através da aparelhagem de Likens-Nickerson ou suas derivações (Figura 5b). Esta técnica possui como principal desvantagem a decomposição dos compostos termolábeis. Para evitar esta perda utiliza-se a destilação à vácuo.

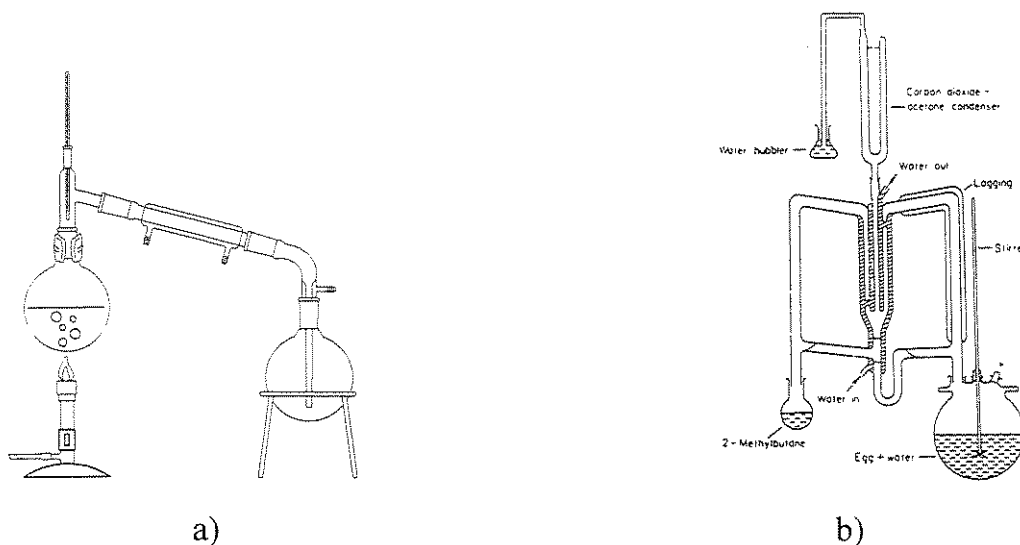
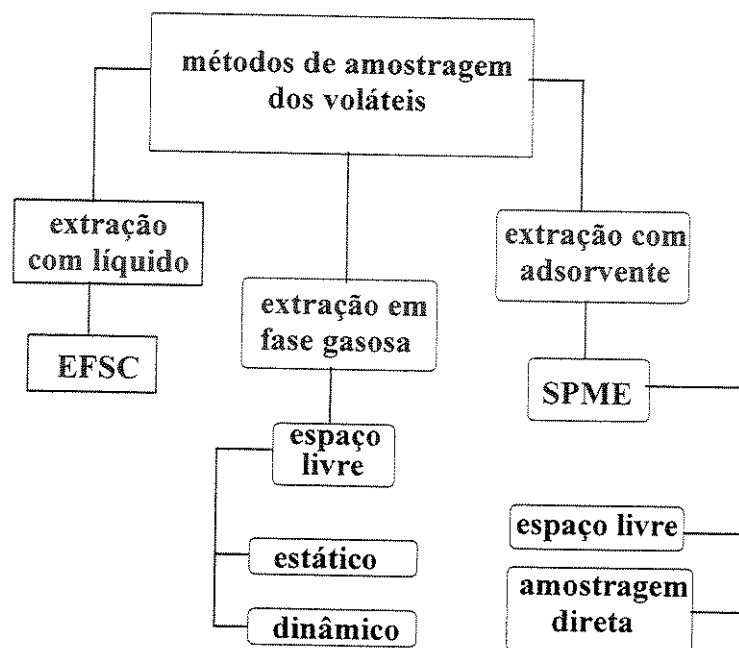


Figura 5. Esquema geral para destilações a vapor. a) hidrodestilação b) aparelhagem Likens-Nickerson.

2.2.2 Métodos atuais de amostragem

As técnicas de amostragem de voláteis mais recentes utilizam pouco ou nenhum solvente orgânico e, como qualquer método de amostragem, dependem da partição entre os analitos da matriz e uma fase extratora que pode ser um gás, um líquido ou um adsorvente²⁷ (Esquema 1).



Esquema 1. Diagrama dos métodos atuais de amostragem que não utilizam solvente orgânico.

Métodos tais como a amostragem estática do espaço livre (“headspace” estático) ou a extração por purga e captura (do inglês “purge and trap”, “headspace” dinâmico) possuem uma característica em comum, isto é, a partição dos analitos ocorre numa fase gasosa. Durante a partição, os compostos não voláteis de alto peso molecular são eliminados, impedindo a contaminação da coluna de separação, o que torna este método bastante eficiente.

²⁷ Pawliszyn, J. *Solid phase microextraction*. Wiley-VCH, New York, 1997.

2.2.2.1 Amostragem estática e dinâmica do espaço livre (polímeros adsorventes)

Os méritos das técnicas de amostragem do espaço livre para recuperação de compostos voláteis associados com o aroma já são reconhecidos há algum tempo e atualmente, tornaram-se o método preferido para captura de voláteis, principalmente em estudos de ecologia química^{28, 29}.

No procedimento original, a amostragem estática do espaço livre ("headspace" estático), permite-se que a fase líquida e o vapor de uma amostra entrem em equilíbrio no espaço livre de um recipiente fechado a uma temperatura controlada e assim um volume pequeno e bem definido deste espaço livre é retirado através de um septo e analisado diretamente, em geral por cromatografia gasosa (CG). Além de fácil e rápido, este método é provavelmente o mais simples, permanecendo até hoje, como a técnica de preparação de amostra livre de solvente mais utilizada, principalmente em análises de campo. A principal desvantagem é a diluição da amostra acarretando na baixa sensibilidade da análise. Outro problema está no fato da composição da fase gasosa ser distinta da composição da matriz.

Já no procedimento de amostragem dinâmica do espaço livre ("headspace" dinâmico) (Figura 6), também conhecido como método de purga e captura, permite-se que um gás inerte remova os compostos voláteis da matriz (purga), os quais são arrastados para serem coletados de várias formas (captura). O equilíbrio entre a amostra e o espaço livre é alterado a todo o momento e, concentrando os voláteis no adsorvente, o torna aplicável a uma faixa muito mais ampla de materiais. Os detalhes do procedimento encontram-se nos tipos de armadilhas utilizadas (criogênica ou com adsorventes). As armadilhas criogênicas, ou seja, aquelas na qual a captura dos compostos ocorre através de recipientes refrigerados, possuem a desvantagem de coletar água junto com os voláteis, o que torna as armadilhas com adsorventes, principalmente as que utilizam carvão ativo ou polímeros porosos, mais convenientes. Podem-se utilizar como sólidos adsorventes desde carvão ativo até sílica gel, porém os mais utilizados são os polímeros

²⁸ Raguso, R.A.; Pellmyr, O. *Oikos*, 1998, **81**, 238.

²⁹ Agelopoulos, N.G.; Pickett, J.A. *J. Chem Ecol.*, 1998, **24**, 1161.

porosos Chromsorb[®] 101, 102 e 105, Porapak Q[®] e Tenax GC[®], devido a pouca retenção de água e álcoois inferiores bem como pela boa seletividade na retenção dos compostos orgânicos. Os compostos voláteis podem ser recuperados com bons rendimentos através de dessorção térmica, uma técnica que embora seja aplicável a uma ampla faixa de compostos pode causar mudanças moleculares naqueles mais sensíveis; ou por meio da dessorção (eluição) com solvente, uma técnica mais branda, mas que pode mascarar ou causar a perda de alguns compostos voláteis.

As principais vantagens desta abordagem encontram-se: no fato dos extratos assim obtidos serem mais limpos, ou seja, conterem um número menor de compostos que naqueles obtidos por extração com solvente ou pelos métodos de destilação; na facilidade em dessorver os voláteis capturados em polímeros adsorventes porosos diretamente na porta de injeção do cromatógrafo a gás (dessorção térmica), além de uma maior flexibilidade em acondicionar as amostras em recipientes de vários tamanhos de acordo com a necessidade. A principal desvantagem desta técnica é a contaminação por compostos de uma análise anterior.

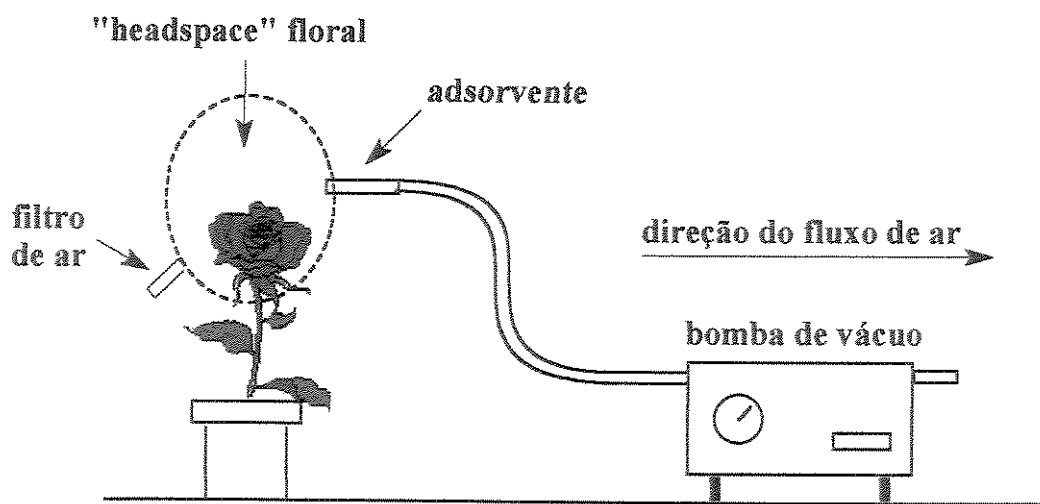


Figura 6. Esquema geral para amostragem dinâmica do espaço livre ("headspace" dinâmico) utilizando polímeros adsorventes.

2.2.2.2 Extração com fluido supercrítico (EFSC)

Um outro método de amostragem é a extração com fluido supercrítico (EFSC) (Figura 7). Esta é uma tecnologia relativamente recente baseada no aumento do poder de solvatação de um fluido acima de seu ponto crítico, na qual a extração pode ser ajustada através do controle do poder de solvatação de um extrator por meio de otimização da temperatura e pressão de extração e, como as propriedades de transporte de massa são maiores nos fluidos supercríticos, resulta em fluxos de extração mais rápidos e em tempos de extração mais curtos.

Fluido supercrítico é o estado da matéria acima da temperatura crítica e da pressão crítica, onde o vapor e o líquido têm a mesma densidade e o fluido não pode ser liquefeito pelo simples aumento da pressão. Dentre uma variedade de fluidos supercríticos, CO₂ é o mais utilizado devido ao seu baixo custo, inércia química, baixa toxicidade, não ser inflamável e ser de fácil remoção após extração³⁰, além de possuir a capacidade de remover compostos menos voláteis a temperatura ambiente. Esta técnica está se expandindo graças a algumas características atrativas dos fluidos supercríticos, ou seja, possuir tanto características de transferência de massa semelhante a um gás quanto a capacidade de solvatação similar a um líquido. Contudo, o método requer um sistema de distribuição de fluido a alta pressão e uma fonte de gás de alta pureza, o que torna as análises de campo mais complicadas. Um outro problema da técnica encontra-se na recuperação de compostos polares.

³⁰ Queiroz, S.C.N.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. *Química Nova*, 2001, **24**, 68.

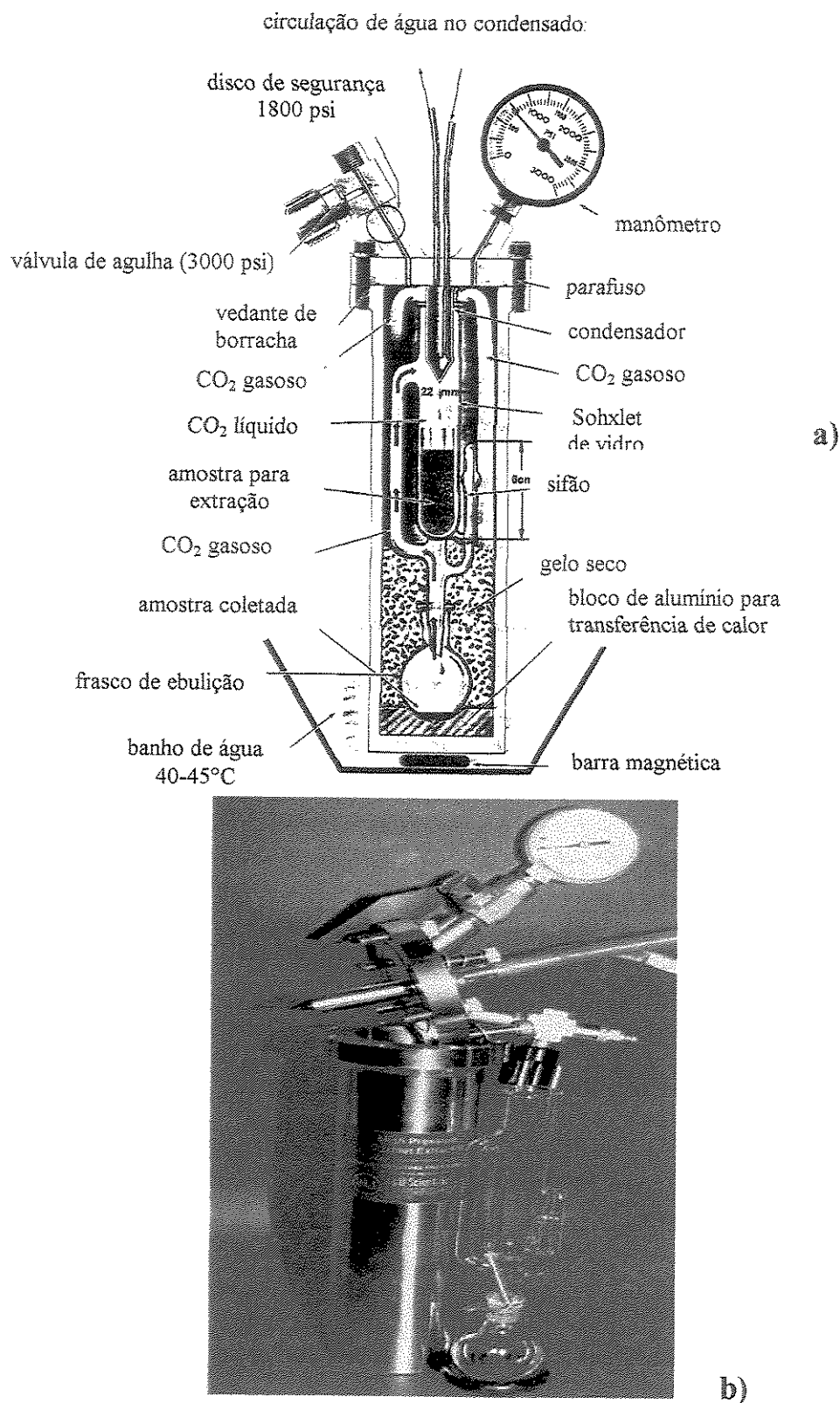


Figura 7. Sistema de alta pressão para extração com CO₂ líquido. a) corte transversal do sistema b) equipamento comercial (J&W Scientific) para extrações em escala de laboratório.

2.2.2.3 Microextração em fase sólida (SPME)

A Microextração em Fase Sólida (SPME) é uma técnica recente desenvolvida por Janusz Pawliszyn³¹ em 1993 e que tem se tornado um método de escolha nas análises de aroma pela sua amostragem rápida, facilidade de manuseio, boa sensibilidade, baixo custo e, principalmente, pela não utilização de solvente. A técnica utiliza um pequeno pedaço de sílica fundida recoberta com um polímero adsorvente (a fibra), a qual pode ser imersa diretamente numa amostra aquosa ou no espaço livre acima do líquido ou do sólido a ser analisado. Os analitos assim adsorvidos pela fibra são liberados por dessorção térmica diretamente no injetor do CG (Figura 8).

Vários parâmetros devem ser considerados no que se refere ao tipo de amostra a ser analisada e ao controle da fibra utilizada para absorção dos voláteis, tais como a volatilidade da amostra e a seleção de uma fibra com a polaridade apropriada, em geral, misturas de fases de cobertura são mais indicadas para análise dos voláteis. A técnica é muito sensível às condições experimentais e qualquer mudança que influencie diretamente o coeficiente de distribuição e as velocidades de absorção e, conseqüentemente, a reprodutibilidade. Assim, para resultados reprodutíveis, as variáveis experimentais devem ser controladas durante o processo de absorção, isto inclui o método de amostragem (espaço livre ou imersão), volumes de líquido ou espaço livre, controle de pH ou conteúdo de sal (a adição de sal normalmente aumenta absorção da fibra de SPME), controle do tempo de amostragem e temperatura e, no caso de imersão, o comprimento imerso da fibra. A agitação e o aquecimento da amostra reduzem o tempo de equilíbrio para os compostos menos voláteis e o espaço livre da amostra deverá ser mantido o menor possível para aumentar a absorção na fibra.

A principal vantagem desta técnica está na habilidade em isolar e concentrar compostos voláteis sem a interferência dos outros componentes da matriz, aliado a uma maior seletividade para compostos voláteis e semivoláteis quando comparada à técnica convencional de amostragem estática do espaço livre.

³¹ Zang, Z.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1843.

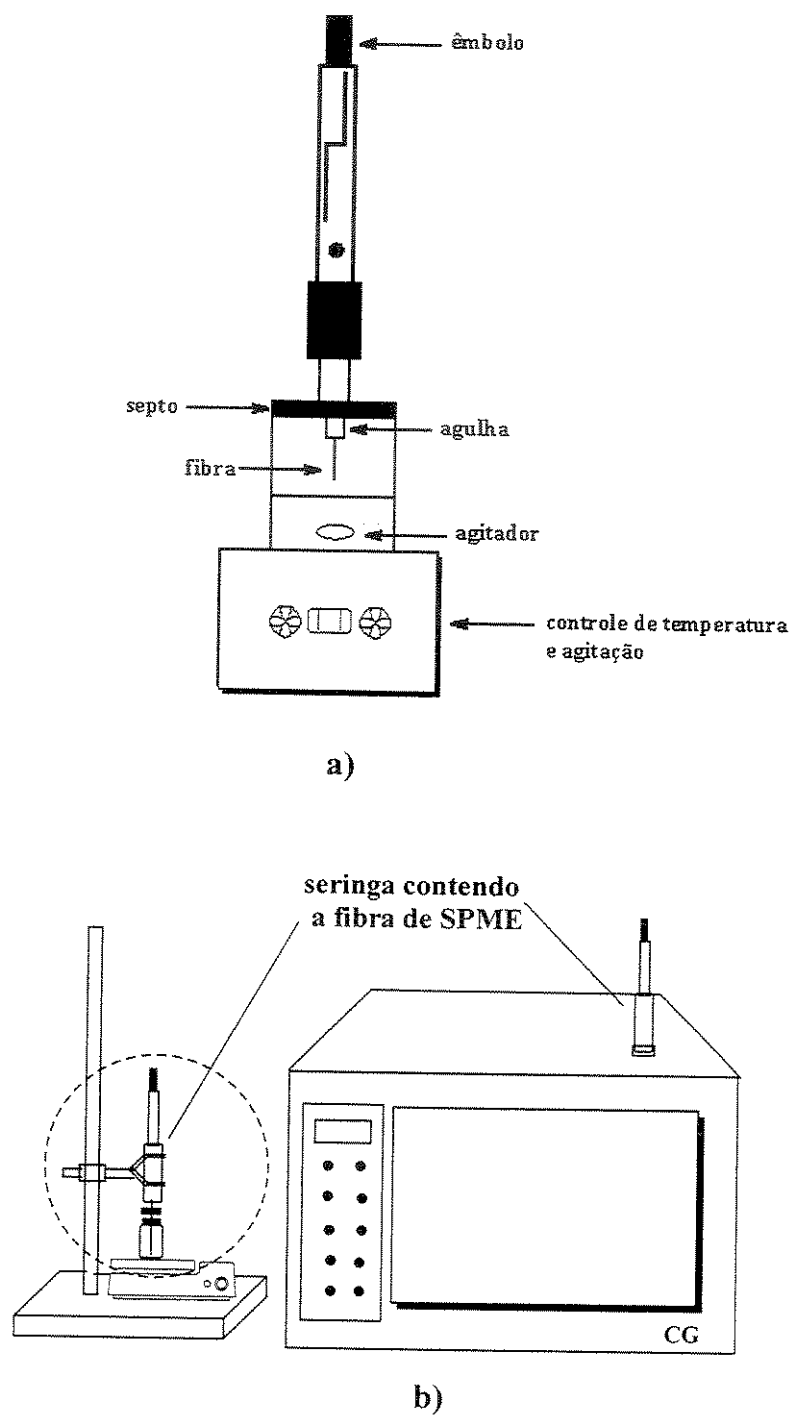


Figura 8. Esquema geral para análise com SPME em CG. a) Detalhe da fibra com a amostra b) inserção da seringa no injetor do CG.

2.3 Métodos de separação cromatográfica

2.3.1 Cromatografia gasosa (CG)

A indústria de fragrâncias e óleos essenciais está entre as pioneiras na aplicação da técnica de cromatografia gasosa (CG), permanecendo até hoje como forte aliada dos químicos analíticos nesta área. Além disso, esta técnica possui uma ampla aplicabilidade, sensibilidade, rapidez nas análises, uma boa precisão quantitativa e um alto poder de resolução, características que a tornou o método preferido para a análise de voláteis.

O princípio básico de operação de um cromatógrafo a gás envolve a volatilização de uma amostra no injetor, a separação dos componentes da mistura numa coluna apropriada e a detecção de cada um deles por um detector³². Uma característica importante da técnica é o uso de um gás para arrastar a amostra do injetor até o detector passando pela coluna. Este gás de arraste precisa ser inerte e não pode ser adsorvido pela fase estacionária da coluna (He, H₂ ou N₂).

Num cromatógrafo a gás, a etapa de separação dos compostos ocorre dentro de uma coluna aquecida, a qual contém uma fina camada de uma substância química líquida não volátil, a fase. As colunas capilares empregadas atualmente proporcionam um poder de resolução mais satisfatório para as misturas complexas comuns em óleos essenciais. As colunas capilares modernas são feitas de sílica pura fundida, o que garante uma maior eficiência, inércia e longevidade quando comparadas as antigas colunas de vidro. Esta maior eficiência é atribuída ao menor conteúdo de elementos metálicos, os quais acreditase, sejam responsáveis pela decomposição de algumas fases líquidas e de alguns componentes da própria amostra. Para aplicações mais gerais, as melhores fases são os dimetilsiloxanos (DB-1 ou equivalente) e as 5% fenil/95% dimetilsiloxano (DB-5 ou equivalente), ou seja, as fases pouco polares. Um outro fator importante é a espessura da fase estacionária e, em geral, as que possuem 0,3 µm são as melhores para compostos com temperatura de ebulição mais elevadas enquanto as fases com 1,0 µm propiciam uma melhor retenção para substâncias com temperatura de ebulição mais baixas.

2.4 Técnicas de identificação

2.4.1 Índices de retenção (I_R)

Com a tecnologia disponível atualmente, ainda não é possível identificar inequivocamente alguns compostos presentes nos óleos essenciais pela simples análise de seus espectros de massas. Devido a isso, a utilização de tempos de retenção ainda é uma ferramenta auxiliar útil, principalmente após o surgimento das colunas capilares com fases quimicamente ligadas, o que permitiu a obtenção de tempos de retenção mais reprodutíveis. Portanto, a identificação dos componentes do óleo essencial através de índice de retenção/espectrometria de massas/busca algorítmica computadorizada tornou-se um processo mais seguro. Para este fim, utiliza-se a cromatografia gasosa com programação de temperatura ou com um sistema de índice de retenção isotérmico. Nos casos onde a complexidade dos óleos essenciais é maior, o método preferido é aquele com programação de temperatura, pois além de se comparar com precisão os dados de retenção, o sistema de índice de retenção isothermal original pode ser generalizado para ser aplicado a um sistema com programação de temperatura, mesmo que a precisão e a reprodutibilidade deste sistema não seja tão eficiente quanto o sistema isotérmico.

O sistema de índice de retenção (I_R) mais utilizado é aquele baseado na modificação de Van den Dool & Kratz³³ para a interpolação linear entre padrões. Os padrões utilizados são hidrocarbonetos alifáticos de cadeia linear ou ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia alifática normal, sendo os índices calculados de acordo com a Equação 1.

³² Kitson, F.G.; Larsen, B.S.; McEwen, C.N. *Gas chromatography and mass spectrometry*. Academic Press, San Diego, 1996, 3.

³³ Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J. *J. Chromatog.*, 1963, **11**, 463.

$$I_R = 100i \cdot \left[\frac{t_r(X) - t_r(HA)}{t_r(HD) - t_r(HA)} \right] + 100N \quad (\text{Equação 1})$$

onde

$t_r(X)$ = tempo retenção do composto não identificado

$t_r(HA)$ = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto (X)

$t_r(HD)$ = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto (X)

i = diferença do número de carbonos entre os hidrocarbonetos que elui depois e antes

N = número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes do composto (X)

Este método é, sem dúvida, adequado como uma ferramenta de confirmação de identificação quando associado com CG/EM e, quando necessário, com avaliação de odor.

2.4.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

Os avanços nesta área de pesquisa têm proporcionado resultados mais reprodutíveis em análises mais sensíveis e em tempos mais curtos nos estudos de componentes voláteis.

Os sistemas de aquisição de dados em espectrometria de massas junto com as bibliotecas de pesquisa, modelos de reconhecimento e software de interpretação espectral é um outro campo que se ampliou vertiginosamente nos últimos anos. As bibliotecas de espectros de massas de padrões controladas por computador, NIH/EPA e Wiley/NBS, são as mais utilizadas e juntas contém espectros de massas de mais de 350.000 compostos.

Com as atuais colunas capilares de alta resolução, CG/EM e seus sistemas de bibliotecas computadorizadas, a análise e identificação dos compostos presentes nas fragrâncias e óleos essenciais nos níveis superiores a 0,1% ocorrem de maneira rápida e eficiente. Nesta área, a maioria dos trabalhos com CG/EM são feitos utilizando-se a

ionização por elétrons (IE) a 70 eV que dá origem a fragmentações características de cada composto.

2.4.3 Análises sensoriais olfativas

A combinação de dados de índice de retenção (I_R) obtidos através de cromatografia gasosa capilar de alta resolução (CGAR) e espectrometria de massas (EM) aliada com os dados das bibliotecas de padrões tornaram-se um critério de identificação amplamente aceito, mas não infalível, na química de compostos voláteis e em várias outras áreas de análise orgânica.

A cromatografia gasosa acoplada à olfatometria (CG/O) utiliza o nariz humano como um detector de compostos voláteis com odor ativo³⁴ eluídos a partir de um cromatógrafo a gás (CG) (Figura 9). É uma técnica normalmente usada para examinar, nos extratos, os compostos com odor mais pronunciado e quando combinada com a identificação molecular, permite determinar os compostos responsáveis pelos odores agradáveis e desagradáveis, principalmente nos alimentos³⁵.

³⁴ Rizzolo, A.; Lombardi, P.; Vanoli, M.; Polesello, S. *J. High Resol. Chromatog.*, 1995, **18**, 309.

³⁵ Hanaoka, K.; Vallet, N.; Giampaoli, P.; Heyd, B.; MacLeod, P. *Food Chem.*, 2001, **72**, 97.

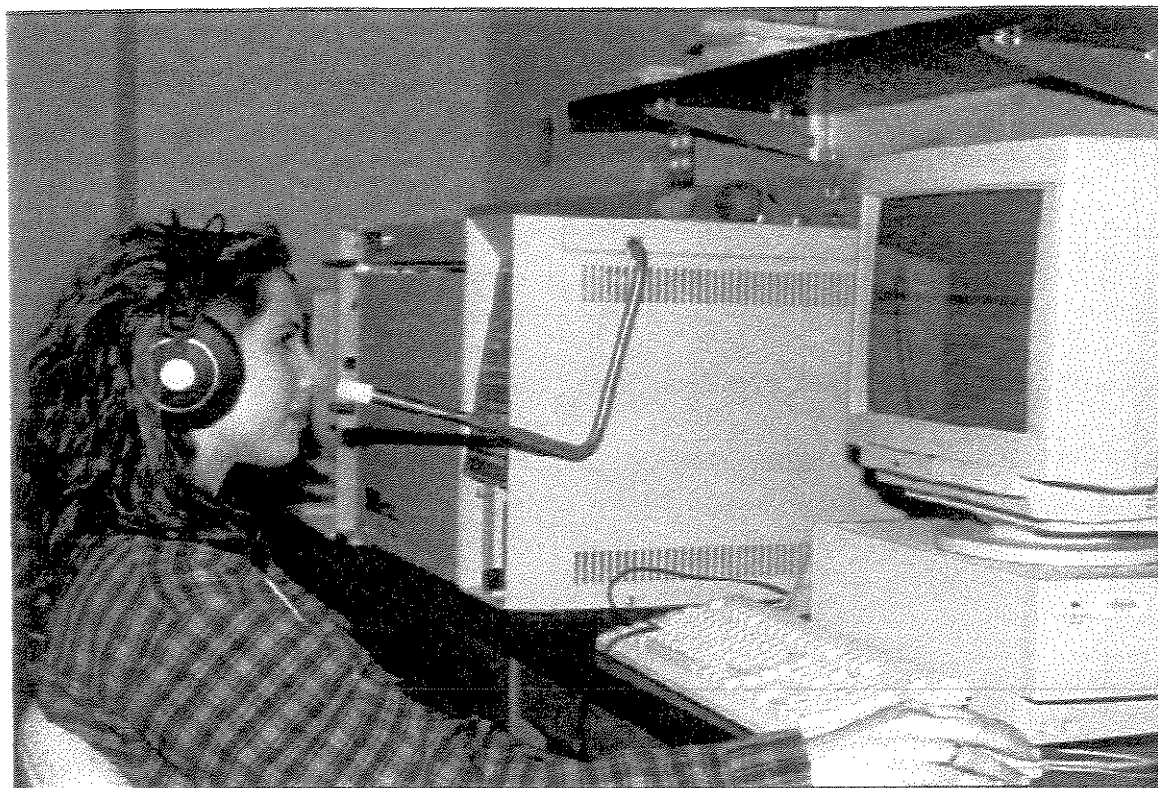


Figura 9. Sistema CG/O com um analisador sentado na frente de um terminal registrando as percepções de odor.

Vários tipos de interface foram desenvolvidas com intuito de detectar compostos com odor ativo num fluxo do gás de arraste, sendo que o primeiro sistema para cheirar os efluentes do CG foi projetado por Fuller *et al.*³⁶ em 1964. O aparelho mais simples idealizado foi um tubo de vidro especial colocado na saída do detector em vez da cabeça do FID. Visando minimizar o efeito secante dos efluentes do CG na membrana nasal, foram criados vários tipos de olfatômetros para otimizar a combinação da mistura dos efluentes do CG com o ar umedecido (Figura 10).

³⁶ Acree, T.E. *Anal. Chem.*, 1997, 69, 170A e referências citadas.

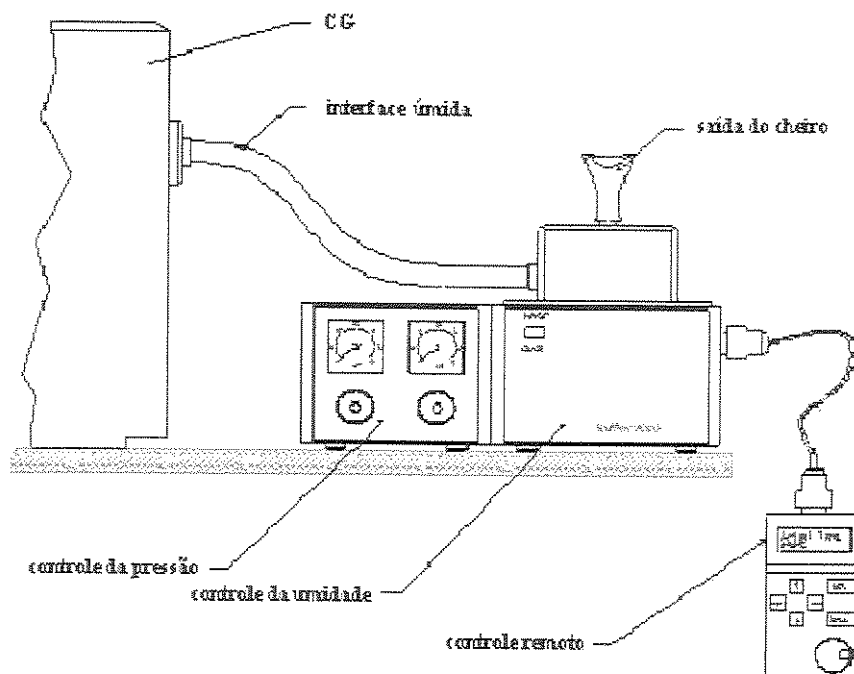


Figura 10. Modelo de sistema otimizado para cheirar efluentes do CG (reproduzido a partir <http://www.brechbuehler.ch/sniffer.htm>).

O uso do nariz humano como um detector de cheiro em cromatografia gasosa foi um marco nas pesquisas de aromas. Com esta técnica tornou-se possível dividir as substâncias voláteis identificadas em compostos com odor ativo e não ativo de acordo com as concentrações na amostra analisada³⁷. Na última década, vários métodos foram desenvolvidos para aumentar a qualidade e o valor informativo dos resultados, por exemplo, várias técnicas para o isolamento dos voláteis baseadas na destilação à vácuo, métodos de extração (destilação e extração simultânea, DES) ou os sistemas de análise do espaço livre das amostras (“headspace” estático e dinâmico); além dos métodos de CG/O tais como a Análise de Diluição do Aroma Extraído (AEDA) ou Combinação Hedônica e Medidas de Resposta (CHARM) que identificam o impacto de uma única substância no aroma total ou ainda a utilização de narizes artificiais.

A técnica de CG/O tem sido amplamente utilizada para identificar nos cromatogramas os compostos com aroma mais importante. A maneira tradicional de indicar alterações na composição dos voláteis é calcular o valor do aroma obtido a partir

³⁷ Steinhart, H.; Stephan, A.; Bücking, M. *J. High Resol. Chromatog.*, 2000, **23**, 489.

da razão entre a concentração e o limite de detecção do odor; uma outra maneira é usar painelistas treinados que avaliam os efluentes da coluna durante a análise de CG³⁸. O uso da descrição de odor é amplamente adotada para se obter dados qualitativos enquanto os métodos de análise de diluição (CHARM) produzem picos cromatográficos similares àqueles produzidos pelos detectores químicos. Já as análises de diluição do aroma (AEDA) e os métodos de intervalo de resposta fornecem dados sobre os valores de potência e tempo de duração da percepção do odor (Figura 11).

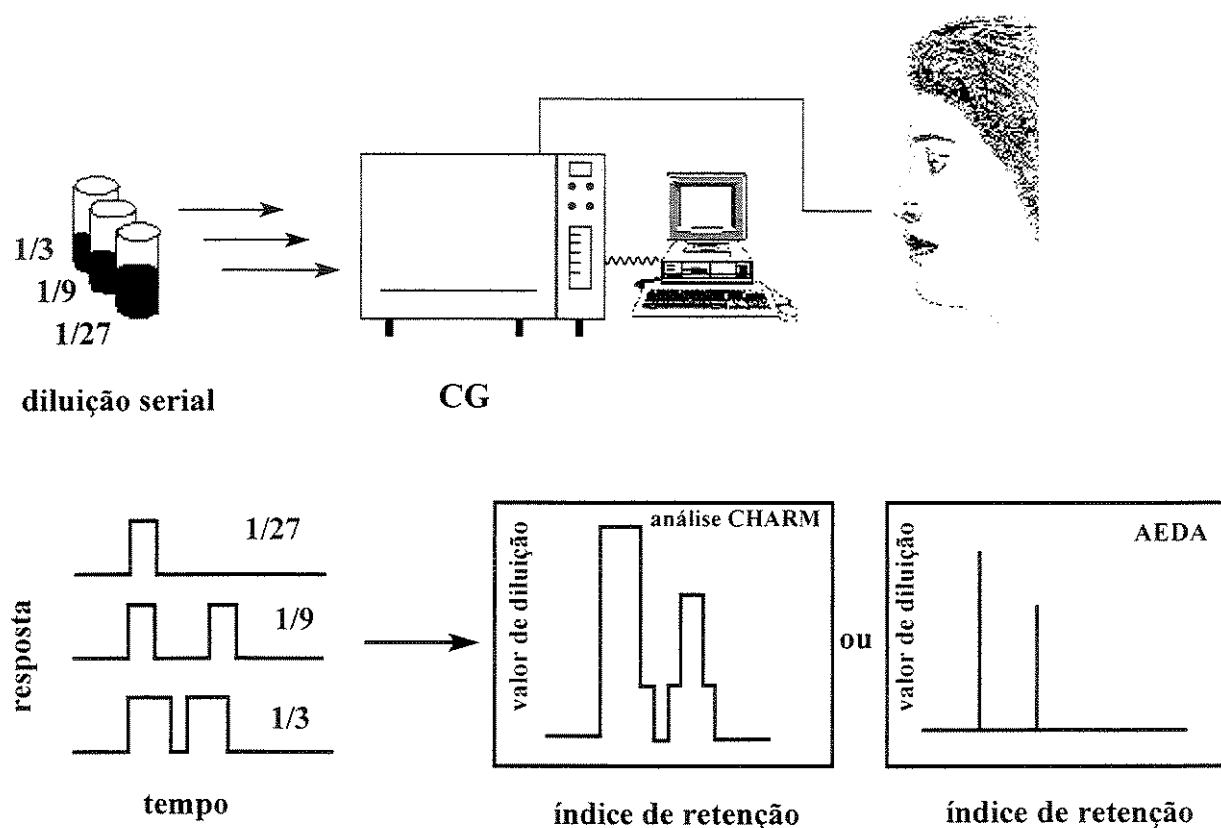


Figura 11. Processo para coleta e representação dos dados obtidos por CG/O baseados nos 2 protocolos de diluição em série mais comuns, AEDA e CHARM.

³⁸ Tonder, D.; Petersen, M.A.; Poll, L.; Olsen, C.E. *Food Chem.*, 1998, **61**, 223.

Os dois tipos mais gerais de olfatômetros usados são os estáticos e os dinâmicos. Olfatômetros estáticos podem ser tão simples quanto um frasco plástico contendo as soluções dos odorantes num veículo sem odor, normalmente água. Devido sua simplicidade, portabilidade e padronização, são os olfatômetros mais usados em pesquisas e testes de consumo. Os sistemas estáticos expõem o analista a pulsos do odorante misturado com ar úmido ($\sim 100\%$ umidade relativa) e os sistemas dinâmicos são avaliados num fluxo de ar menos úmido contendo doses constantes do odorante.

Os dados obtidos com CG/O envolvem medidas de duas variáveis: atividade do odor percebido e índice de retenção cromatográfico (I_R). O índice de retenção é uma característica das propriedades químicas do odorante (volatilidade) e tem um considerável poder de identificação, especialmente quando combinado ao espectro de massas, a outro índice de retenção (I_R) (índice de retenção em duas fases cromatográficas diferentes) ou com o caráter do odor.

Parte 3

Importância ecológica e taxonômica dos voláteis florais de Chusia

3. Importância ecológica e taxonômica dos voláteis florais de *Clusia*[‡]

3.1 Considerações gerais

A família Guttiferae (Clusiaceae), de acordo com os estudos de Engler, compreende 47 gêneros e mais de 1000 espécies distribuídas em 6 subfamílias, todas com representantes no Brasil³⁹ (ca. 21 gêneros e 183 espécies), que estão confinadas nos trópicos quentes e úmidos (Figura 12), sendo a principal exceção o gênero *Hypericum*, o qual ocorre amplamente nas regiões temperadas. Alguns gêneros e espécies ocorrem de forma endêmica na América do Sul, como *Kielmeyera*, e outros são restritos ao Continente africano, é o caso de *Pentadesma butyracea* Sabine. Nesta família, vários gêneros e espécies são de interesse econômico, seja pelo uso como plantas ornamentais (é o caso de algumas espécies de *Clusia*, *Hypericum*, etc.); seja por fornecer frutos comestíveis como em *Garcinia* e *Platonia*, ou mesmo pelo seu valor terapêutico como *Garcinia kola* e *Clusia rosea*. O látex resinoso de espécies de *Moronobea*, *Platonia* e *Symphonia* é usado pelos índios do continente americano para impermeabilizar canoas, fazer máscaras e queimar em tochas para iluminação⁴⁰.

[‡] Trabalho desenvolvido em colaboração com o Dr. Volker Bittich (IB-UNICAMP)

³⁹ Barroso, G.M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. LCT/EDUSP, 1978, Vol. 1, 139.

⁴⁰ Kearns, D.M.; Berry, P.E.; Stevens, P.F.; Cuello, N.L.; Pipoly III, J.J.; Robson, N.K.B., Holst, B.K.; Kubitzki, K.; Weitzman, A.L. Hipertexto : Flora of the venezuelan guayana. 2001. (<http://www.MOBOT.org>).

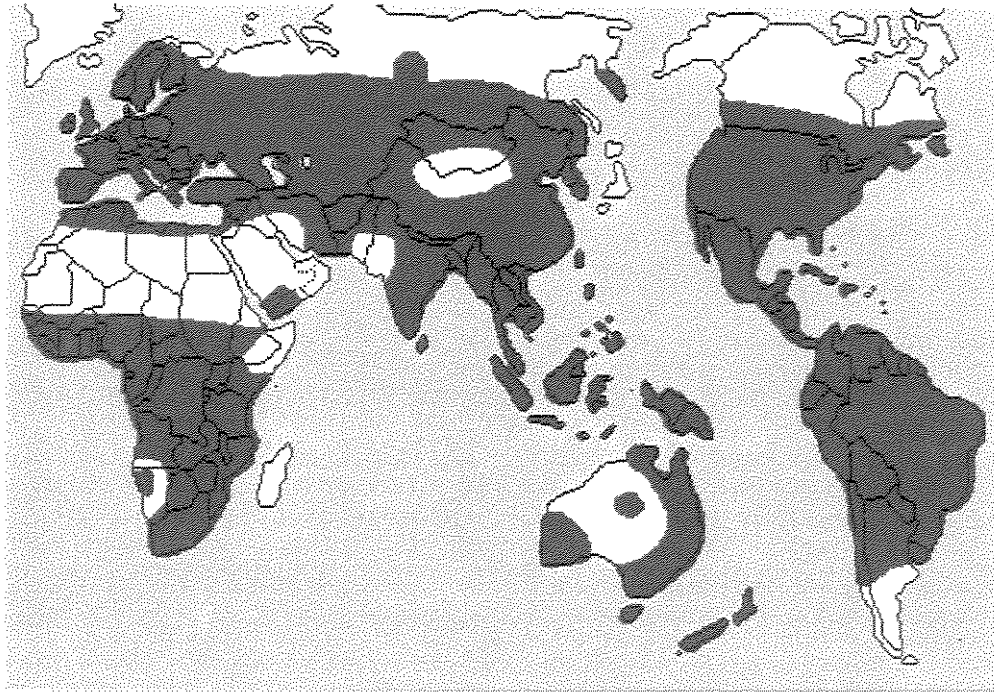


Figura 12. Mapa da distribuição geral de Guttiferae (Clusiaceae) no mundo.

O gênero neotropical *Clusia* L. (Guttiferae) compreende cerca de 250-300 espécies agrupadas em várias seções taxonômicas naturais^{41, 42, 43}, distribuídas desde a Flórida até o Rio Grande do Sul, com aproximadamente 70 espécies no Brasil. As formas de vida deste gênero incluem hemiepífitas (às vezes estranguladoras), lianas, arbustos e árvores. Estudos recentes mostraram uma alta variabilidade no metabolismo de CO₂ no gênero, talvez responsável em parte pelo sucesso de *Clusia* em vários habitats⁴⁴. O gênero é notável pela grande variabilidade da morfologia floral, que se reflete em grande parte na diversidade de sua biologia reprodutiva⁴⁵.

⁴¹ a) Planchon, J.E.; Triana, J. *Ann. Sci. Nat.*, sér. 4, Bot., 1860, 13, 306. b) *Ibid.*, 1860, 14, 226.

⁴² Engler, A. In *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Engler, A.; Prantl, K. (Eds.). Dunker & Humblot, Berlin, 1925, Vol. 21, 154.

⁴³ Gustafsson, M.H.G.; Bittrich, V. XVI International botanical congress. Abstracts, 1999, 381.

⁴⁴ Franco, A.C.; Ball, E.; Lüttge, U. *Oecologia*, 1990, 85, 108.

⁴⁵ Bittrich, V.; Amaral, M.C.E. *Kew Bull.*, 1997, 52, 617.

As espécies de *Clusia* encontradas no Brasil estão distribuídas em pelo menos oito seções⁴⁶ (as espécies investigadas são mencionadas entre parênteses):

- 1) *Cordylandra*, com 16 espécies (*C. paralicola*, *C. panapanari*, *C. renggerioides*, *C. burchellii*, *C. fluminensis*, *C. pernambucensis*, *C. spiritu-sanctensis* e *C. weddelliana*);
- 2) *Phloianthera*, 11 espécies (*C. hilariana* e *C. lanceolata*);
- 3) *Chlamydoclusia*, 6 espécies (*C. grandiflora*, *C. rosea* e *C. nemorosa*);
- 4) *Polythecandra*, 3 espécies;
- 5) *Omphalanthera*, 2 espécies;
- 6) *Criuva*, 12 espécies (*C. criuva*, *C. parviflora* e *C. flava*);
- 7) *Clusiastrum*, 3 espécies;
- 8) *Anandrogyne*, 3 espécies.

As recompensas para os polinizadores⁴⁷ (várias abelhas de pequeno até grande porte, beija-flores, besouros e moscas) incluem resina floral⁴⁸ (seções 1-5), pólen (seções 6-7), e néctar (seção 8) e em algumas espécies, as flores femininas não possuem recompensa e assim são polinizadas por engano (ex.: *C. parviflora*, seção *Criuva*)^{49, 50}.

⁴⁶ Bittrich, V. XLVI Congresso nacional de botânica. Resumos, 1995, 3.

⁴⁷ Lopes, A.V.; Machado, I.C. *Pl. Syst. Evol.*, 1998, **213**, 71.

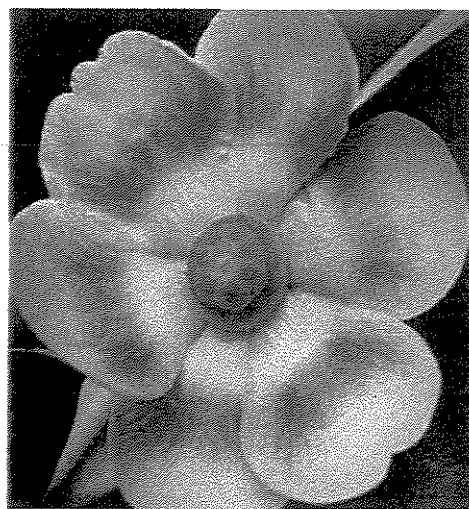
⁴⁸ Armbruster, W.S. *Amer. J. Bot.*, 1984, **71**, 1149.

⁴⁹ Correia, M.C.R.; Ormond, W.T.; Pinheiro, M.C.B.; de Lima, H.A. *Bradea*, 1993, **6**, 209.

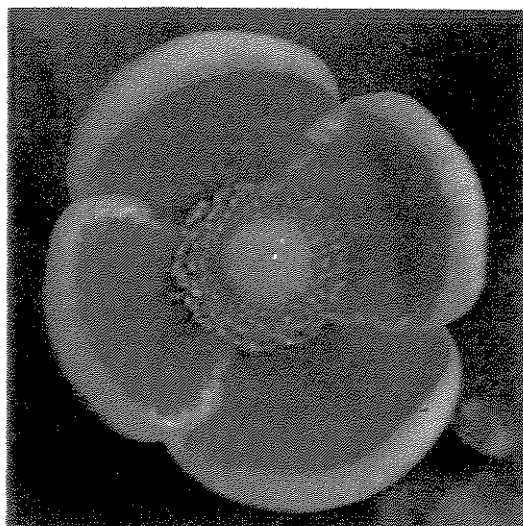
⁵⁰ Bittrich, V.; Amaral, M.C.E. *Kew Bull.*, 1996, **51**, 681.



A)



B)



C)

Figura 13. Espécies estudadas de *Clusia* representantes da seção *Chlamydoclusia*: A) *C. grandiflora* com abelha euglossa coletando resina B) *C. rosea* C) *C. nemorosa* masc.



Figura 14. Espécies estudadas de *Clusia* representantes da seção *Cordylandra*: A) *C. weddelliana* masc. B) *C. paralicola* masc. C) *C. spiritu-sanctensis* masc. D) *C. panapanari* fem. com abelha *Trigona spinipes* coletando resina.



Figura 15. Representantes das espécies de *Clusia* estudadas. A) *C. parviflora* masc. (seção *Criuva*) com besouros coletando pólen B) *C. lanceolata* fem. (seção *Phloianthera*) com abelha *Trigona spinipes* coletando resina.

A grande maioria das espécies de *Clusia* são dióicas, entretanto existem algumas espécies hermafroditas ou raças com flores hermafroditas. Várias espécies mostram um polimorfismo acentuado na morfologia floral, tanto entre populações diferentes quanto numa mesma população, às vezes até ao nível de indivíduo. Esse polimorfismo parece ser mais acentuado nas espécies com resinas florais.

Resinas florais são recompensas extremamente raras em angiospermas e, além de *Clusia*, são conhecidas apenas nos gêneros *Dalechampia* L. (Euphorbiaceae)⁵¹ e *Chusiella* Planch. & Triana (Guttiferae). A química da resina floral de algumas espécies de *Clusia* foi recentemente investigada em nosso laboratório, e várias benzofenonas poliisopreniladas foram encontradas como constituintes majoritários^{52, 53, 54}. Além da

⁵¹ Armbruster, W.S. *Amer. J. Bot.*, 1984, **71**, 1149.

⁵² de Oliveira, C.M.A.; Porto, A.M.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A.J. *Tetrahedron Lett.*, 1996, **36**, 6427.

⁵³ de Oliveira, C.M.A.; Porto, A.L.M.; Bittrich, V.; Marsaioli, A.J. *Phytochemistry*, 1999, **50**, 1073.

⁵⁴ Porto, A.L.M.; Machado, S.M.F.; de Oliveira, C.M.A.; Bittrich, V.; Amaral, M.C.E.; Marsaioli, A.J. *Phytochemistry*, 2000, **55**, 755.

resina, estes compostos também são encontrados em frutos^{55, 56, 57, 58, 59}, raízes⁶⁰ e folhas^{61, 62} tanto no gênero *Clusia* quanto em outras Guttiferae.

Essências florais são encontradas na grande maioria das plantas polinizadas por animais, exceto as flores ornitófilas⁶³ (polinizadas por pássaros). As essências servem principalmente para atrair ou orientar polinizadores⁶⁴. Os óleos essenciais perfumados podem também servir como recompensa para os polinizadores, machos de abelhas euglossini⁶⁵, entretanto este é um fenômeno raro. Na família Guttiferae, este fenômeno foi observado recentemente no gênero *Tovomitia* e a composição química de sua fragrância foi investigada⁶⁶. Aromas florais são, em geral, uma mistura de várias substâncias orgânicas voláteis e são normalmente emitidos pelas pétalas, porém outras partes da flor também podem produzir e emitir aromas. O tipo de essência e o tempo de sua emissão podem ser típicos de flores que atraem certos grupos de polinizadores, desta forma fazendo parte da chamada síndrome floral⁶⁷. Por outro lado, como todos os caracteres hereditários, os compostos químicos nos aromas podem também refletir afinidades taxonômicas das espécies. Como outras características das plantas, os aromas e sua composição química refletem tanto a história evolucionária quanto as condições ecológicas atuais.

⁵⁵ Gonzalez, J.G.; Cuellar, V.; Betancourt, A.; Pinzon, M.I. *Phytochemistry*, 1983, **22**, 2088.

⁵⁶ Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Gacs-Baitz, E. *Phytochemistry*, 1991, **30**, 703.

⁵⁷ Cerrini, S.; Lamba, D.; Delle Monache, F.; Pinheiro, R.M. *Phytochemistry*, 1993, **32**, 1023.

⁵⁸ Olivares, E.M.; Gonzalez, J.G.; Delle Monache, F. *Phytochemistry*, 1994, **36**, 473.

⁵⁹ Gonzalez, J.G.; Olivares, E.M.; Delle Monache, F. *Phytochemistry*, 1995, **38**, 485.

⁶⁰ Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Cavalcanti, J.F.; Pinheiro, R.M. *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 563.

⁶¹ Gustafson, K.R.; Blunt, J.W.; Munro, M.H.G.; Fuller, R.W.; McKee, T.C.; Cardellina II, J.H.; McMahon, J.B.; Cragg, G.M.; Boyd, M.R. *Tetrahedron*, 1992, **48**, 10093.

⁶² Henry, G.E.; Jacobs, H.; McLean, S.; Reynolds, W.F.; Yang, J.-P. *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 4575.

⁶³ Proctor, M.; Yeo, P.; Lack, A. *The natural history of pollination*. Harper Collins, London, 1996.

⁶⁴ Dobson, H.E.H. Floral volatiles in insect biology. In *Insect-plant interactions*. Bernays, E.A. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, 1994, Vol. V, 47.

⁶⁵ Ackerman, J.D. *Biol. J. Linnean. Soc.*, 1983, **20**, 301.

⁶⁶ Nogueira, P.C. de L.; Marsaioli, A.J.; Amaral, M.C.E.; Bittrich, V. *Phytochemistry*, 1999, **49**, 1009.

⁶⁷ Faegri, K.; Van der Pijl, L. *The principles of pollination ecology*. 3rd. ed.: Pergamon Press, Oxford, 1979.

Este trabalho é o primeiro relato sobre a composição química dos óleos essenciais neste gênero⁶⁸.

3.2 Objetivos

Esta parte do trabalho visa investigar os óleos voláteis das pétalas de várias espécies de *Clusia* pertencentes a 4 seções taxonômicas do gênero, buscando relacionar a química dos aromas florais ao tipo de polinizador e/ou à posição das espécies, nos grupos supostamente naturais ao gênero.

⁶⁸ Nogueira, P.C.L.; Marsaioli, A.J.; Bittrich, V.; Shepherd, G.J.; Lopes, A.V. *Phytochemistry*, 2001, **56**, 443 .

3.3 Resultados e discussão

Inicialmente, as metodologias disponíveis para obtenção destes voláteis foram a micro-hidrodestilação, microextração em fase sólida (SPME) (fibras cobertas com 30µm PDMS ou 85µm PA ou 75µm Carboxen-PDMS) e extração com CO₂ líquido (EFSC). Com as duas últimas técnicas, no entanto, os resultados obtidos foram de baixa reprodutibilidade, além de observarmos uma maior seletividade para compostos não oxigenados com SPME, associado com um número sempre menor de compostos, por exemplo em *C. fluminensis* (seção *Cordylandra*) (Figura 16). Em algumas espécies, por exemplo, *C. flava* (seção *Criuva*), obtivemos bons resultados com SPME que corroboraram com aqueles obtidos através de micro-hidrodestilação (Figura 17, página 47). Por outro lado, com *C. grandiflora* (seção *Chlamydoclusia*) (Figura 18, página 48), por exemplo, observamos diferenças nas abundâncias relativas dos componentes majoritários obtidos com micro-hidrodestilação e CO₂ líquido, enquanto com *C. parviflora* (seção *Criuva*), percebemos também diferenças no perfil químico obtido através de micro-hidrodestilação, SPME e CO₂ líquido (Figura 19, página 49). De maneira geral, os perfis químicos dos componentes voláteis obtidos pelas 3 técnicas apresentaram-se distintos, somando-se o fato da técnica de CO₂ líquido ser mais laboriosa para a captura simultânea dos voláteis das várias espécies, bem como a não uniformidade da pressão no extrator, o que reflete na extração de compostos mais polares em algumas espécies. Além disso, a técnica de SPME não apresentou uniformidade das condições experimentais no que concerne a temperatura da amostra (temperatura ambiente, 40°C ou 70°C), extrações com ou sem adição de água na amostra e tempo de exposição da fibra.

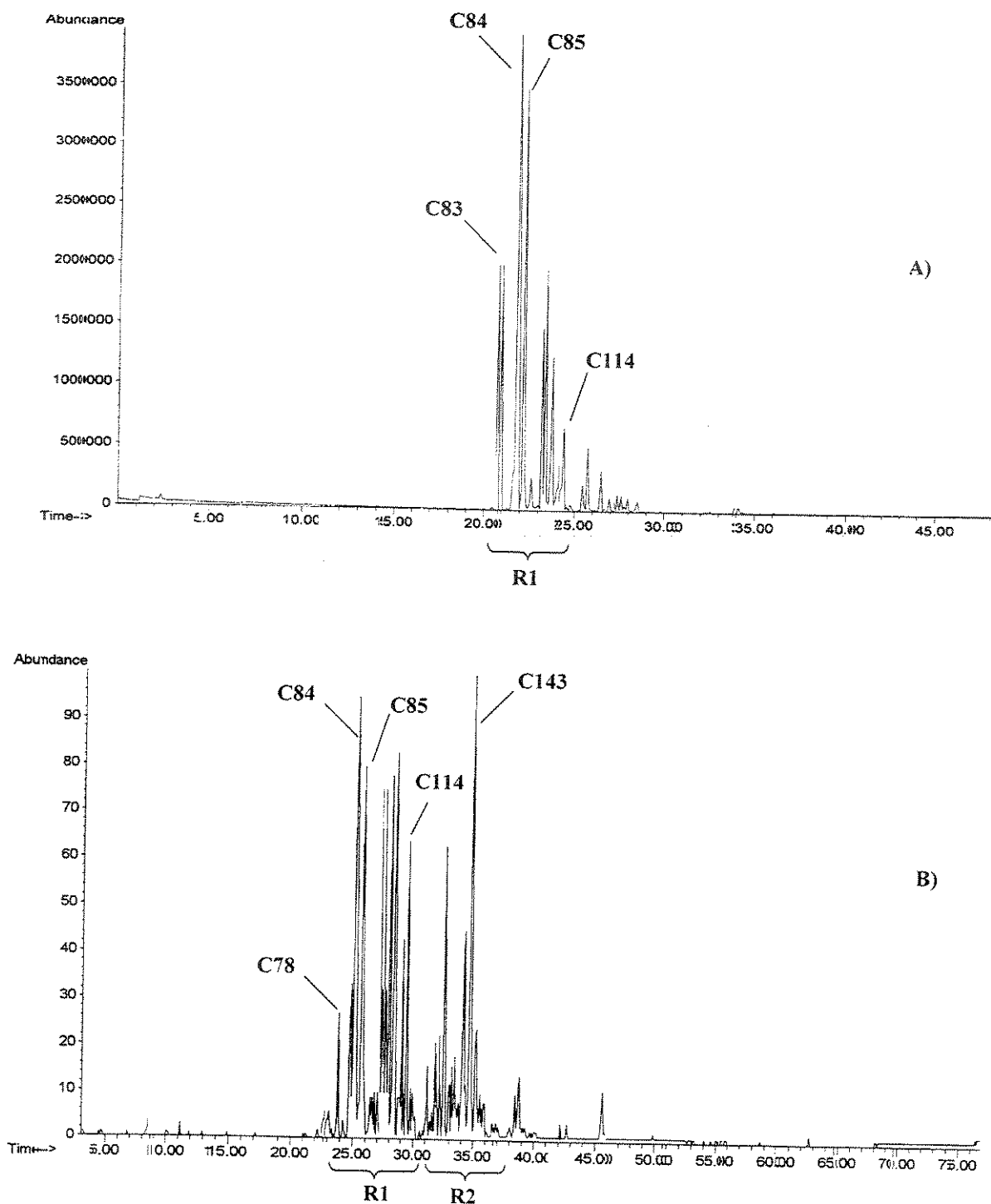


Figura 16. Cromatogramas (CG/EM: coluna DB-5) representativos dos voláteis florais de *C. fluminensis* obtidos através de SPME (fibra 30µm PDMS) (A) e micro-hidrodestilação (B). Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 1. **R1**=região de sesquiterpenos não oxigenados, **R2**=região de sesquiterpenos oxigenados.

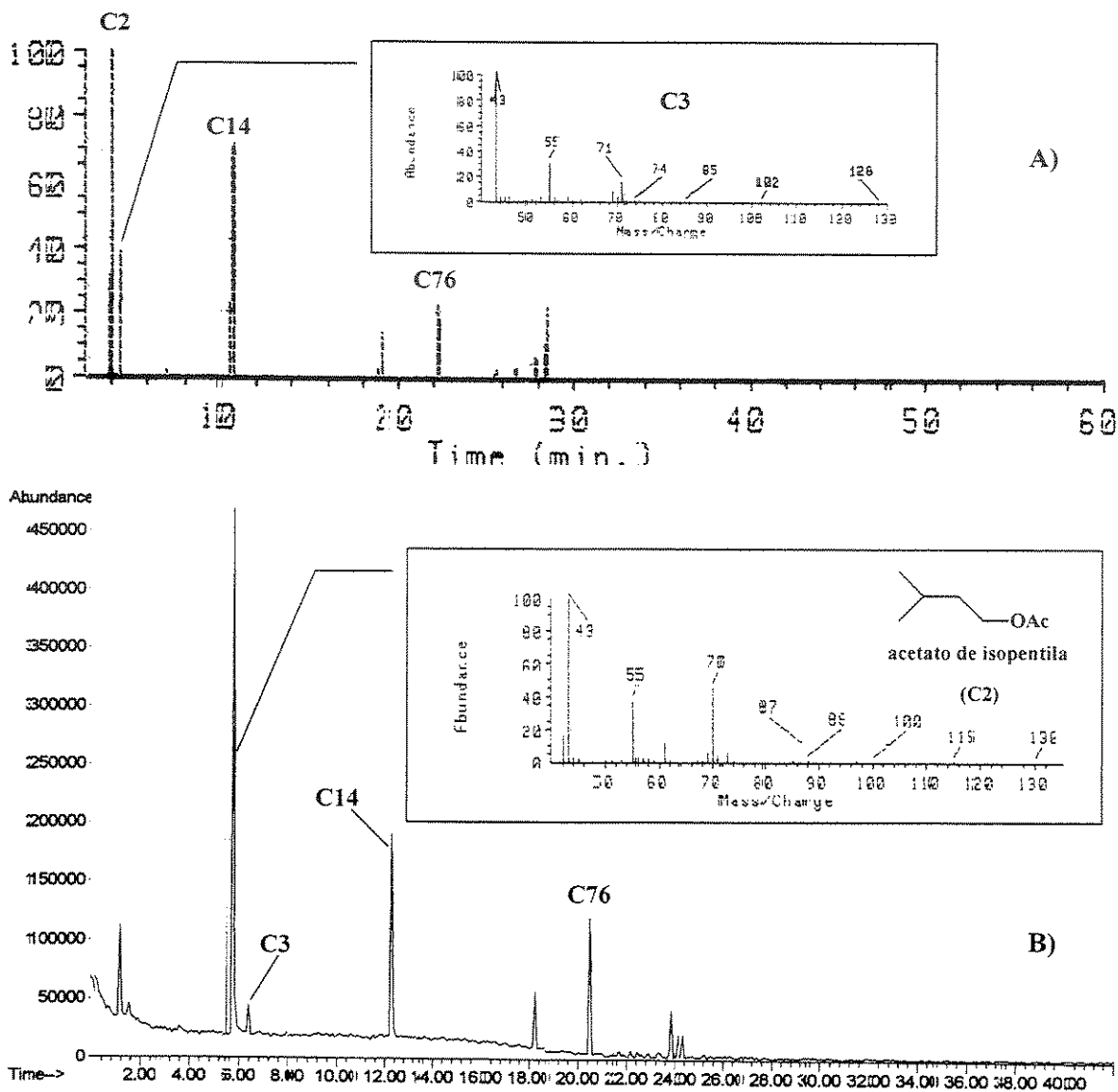


Figura 17. Cromatogramas (CG/EM: coluna DB-5 30m) representativos dos voláteis florais de *C. flava* obtidos através de micro-hidrodestilação (A) e SPME (30 μ m PDMS) (B). Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 1.

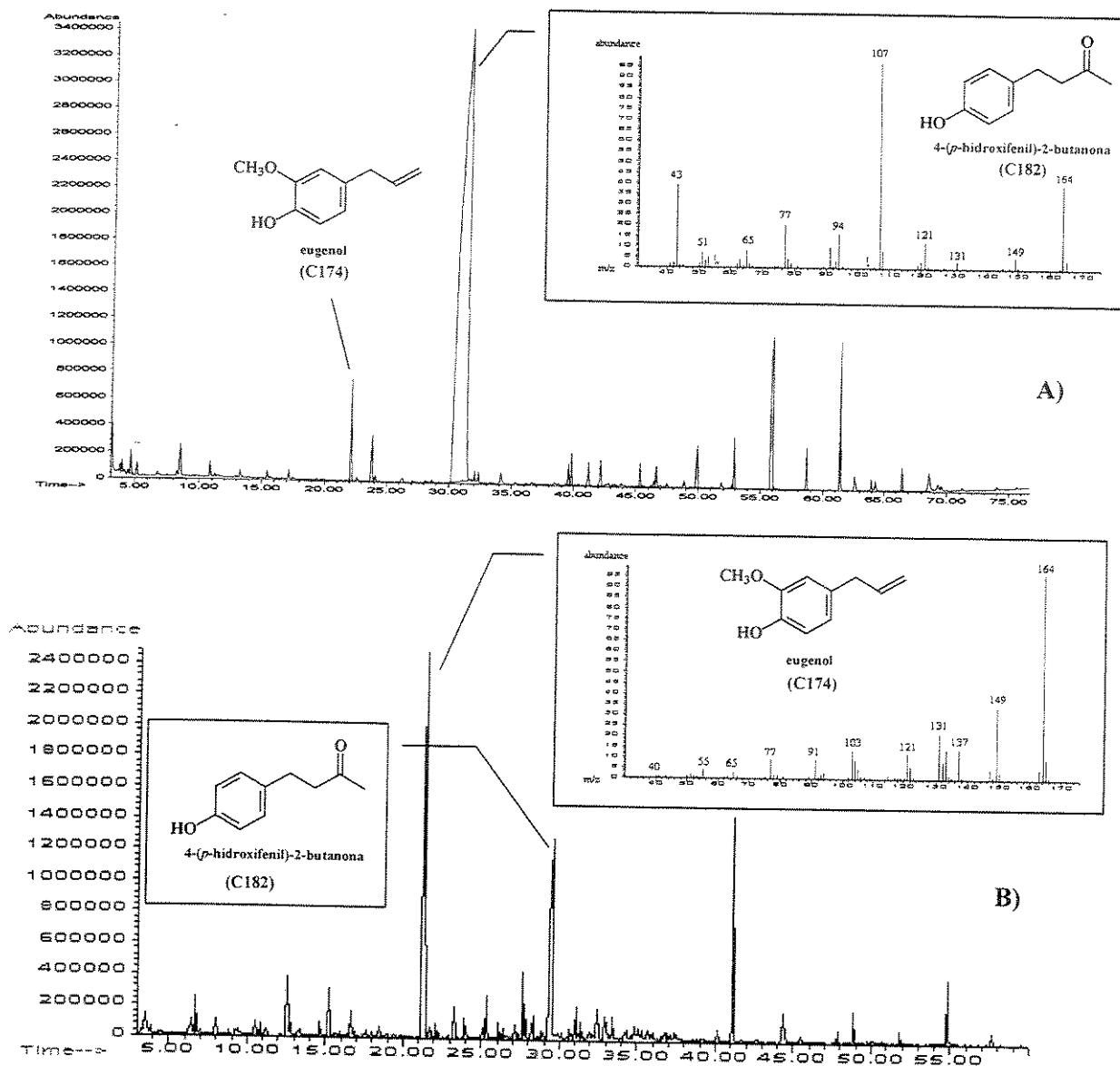


Figura 18. Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) representativos dos voláteis florais de *C. grandiflora* ♂ obtidos através CO₂ líquido (A) e micro-hidrodestilação (B). Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 1.

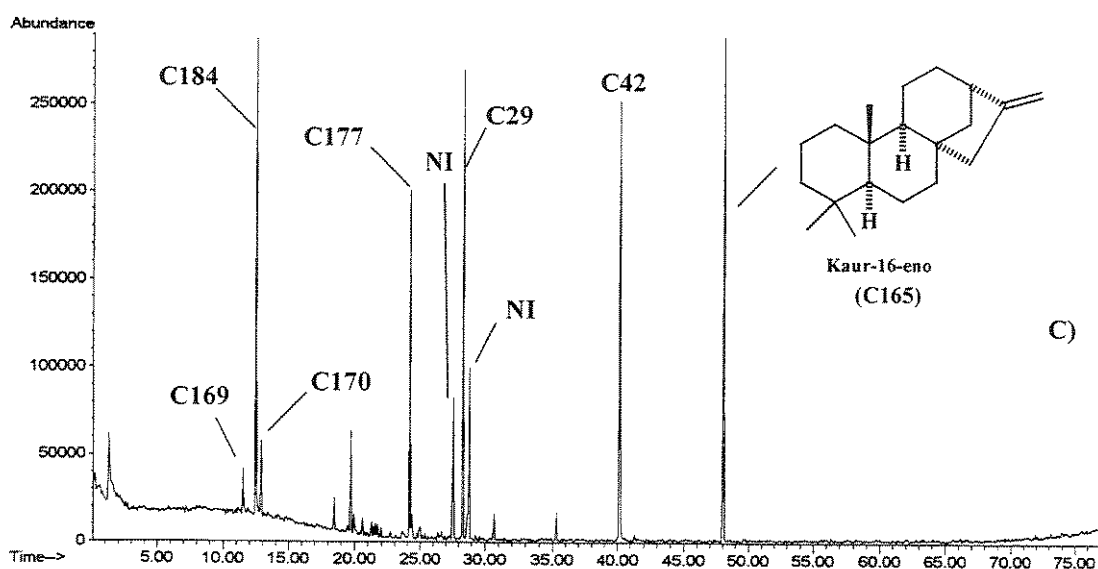
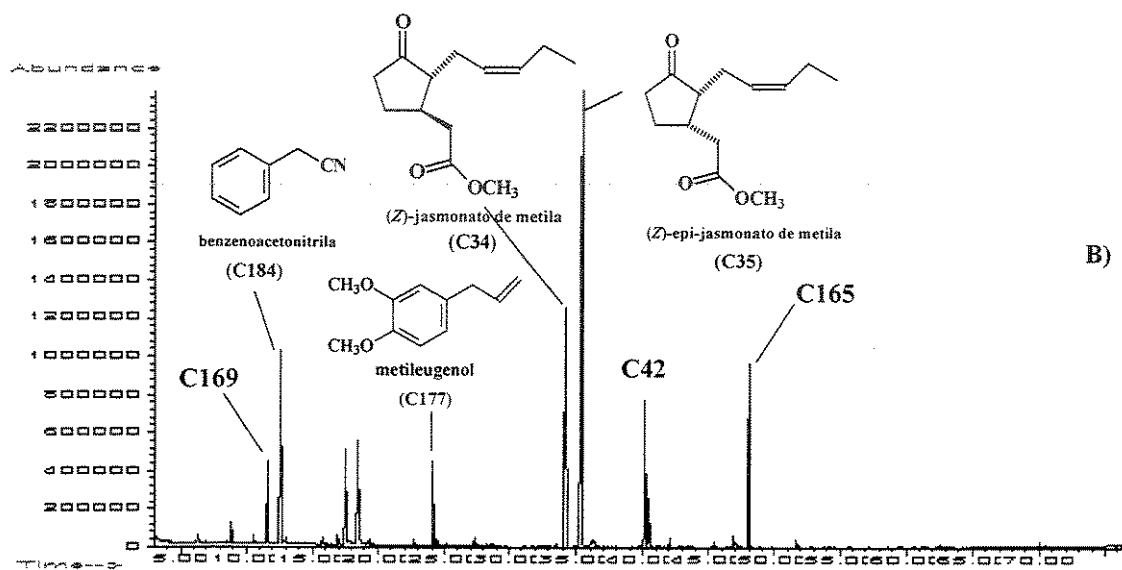
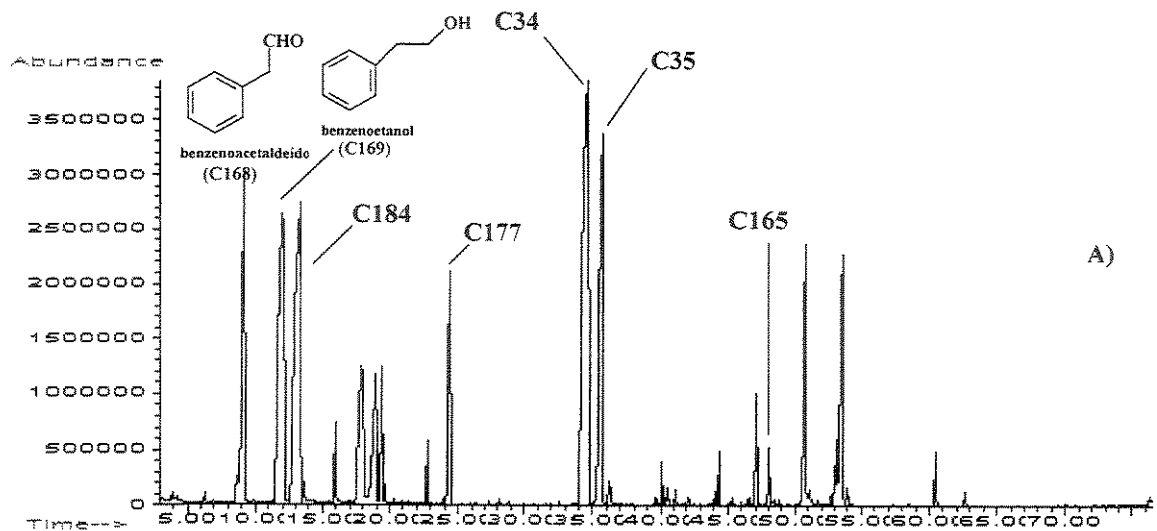


Figura 19. Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) representativos dos voláteis florais de *C. parviflora* ♂ obtidos através de micro-hidrodestilação (A), CO₂ líquido (B) e SPME (30 μm PDMS) (C). Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 1. NI=não identificado.

Assim, para comparação dos voláteis florais se fez necessário um método mais reprodutível que nos fornecesse um perfil indiscriminado dos compostos presentes nas amostras e, desta forma, a técnica de micro-hidrodestilação foi escolhida para captura dos componentes voláteis das pétalas de 16 espécies de *Clusia* estudadas e os resultados das análises obtidos através de CG/EM (Figuras 20-24) (identificação dos compostos se deu através de comparação dos EM, IR e da co-injeção, quando possível, com padrões comerciais) foram agrupados de acordo com as seções taxonômicas como mostrado na Tabela 1.

Em algumas espécies (*C. grandiflora*, *C. nemorosa* masc., *C. spiritu-sanctensis*, *C. fluminensis*, *C. paralicola*, *C. weddelliana*, *C. parviflora*, *C. lanceolata* e *C. hilariana*) foram realizadas réplicas e tréplicas (em períodos distintos de floração) das análises sendo que em nenhuma destas observamos mudanças significativas na composição química, mas apenas algumas variações na abundância relativa dos compostos.

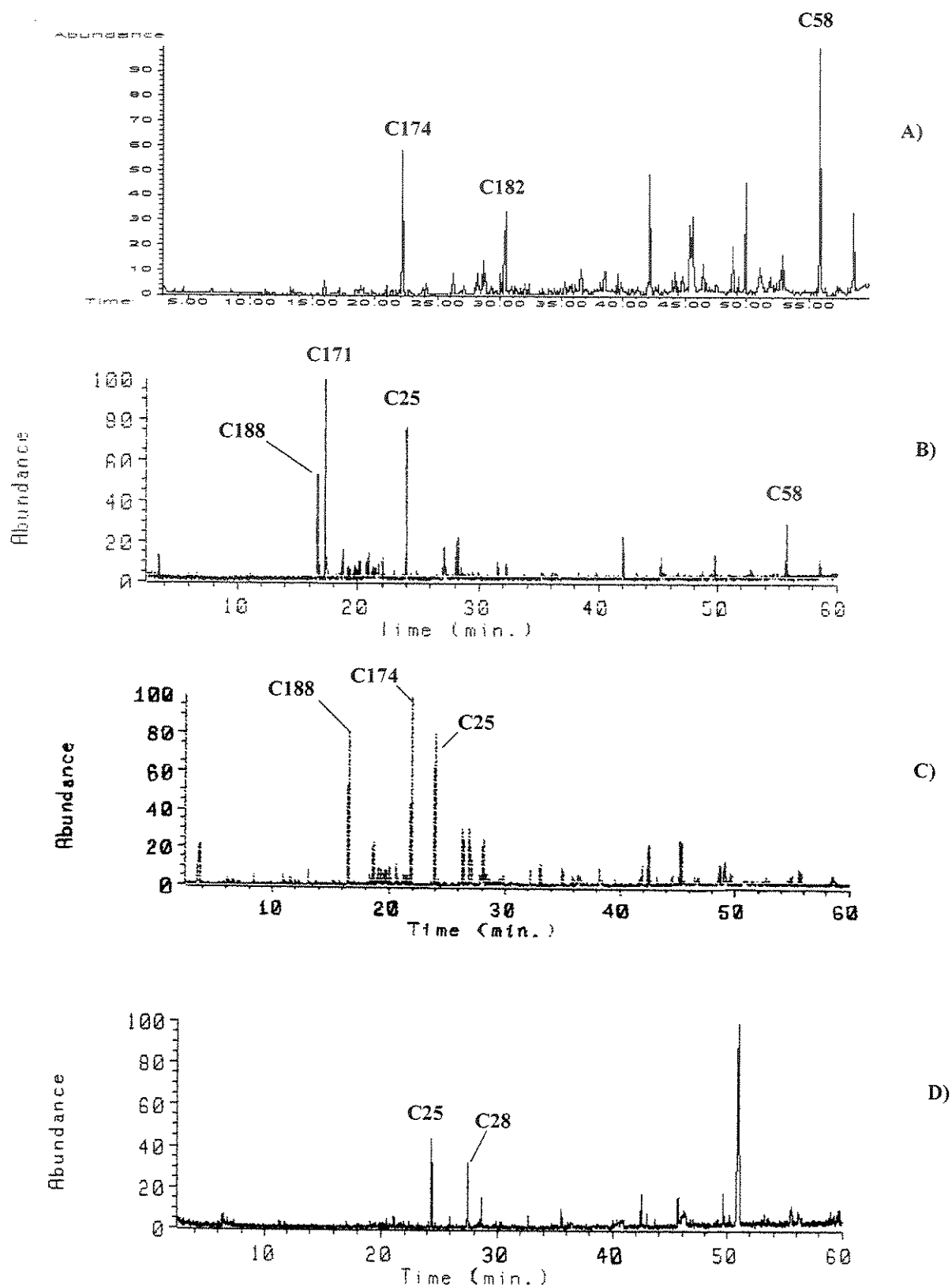


Figura 20. Cromatogramas (CG/EM) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Chlamydoclusia* através de micro-hidrodestilação. **A)** *C. grandiflora* ♀, **B)** *C. nemorosa* ♂, **C)** *C. nemorosa* hermaf., **D)** *C. rosea* ♀. Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 1.

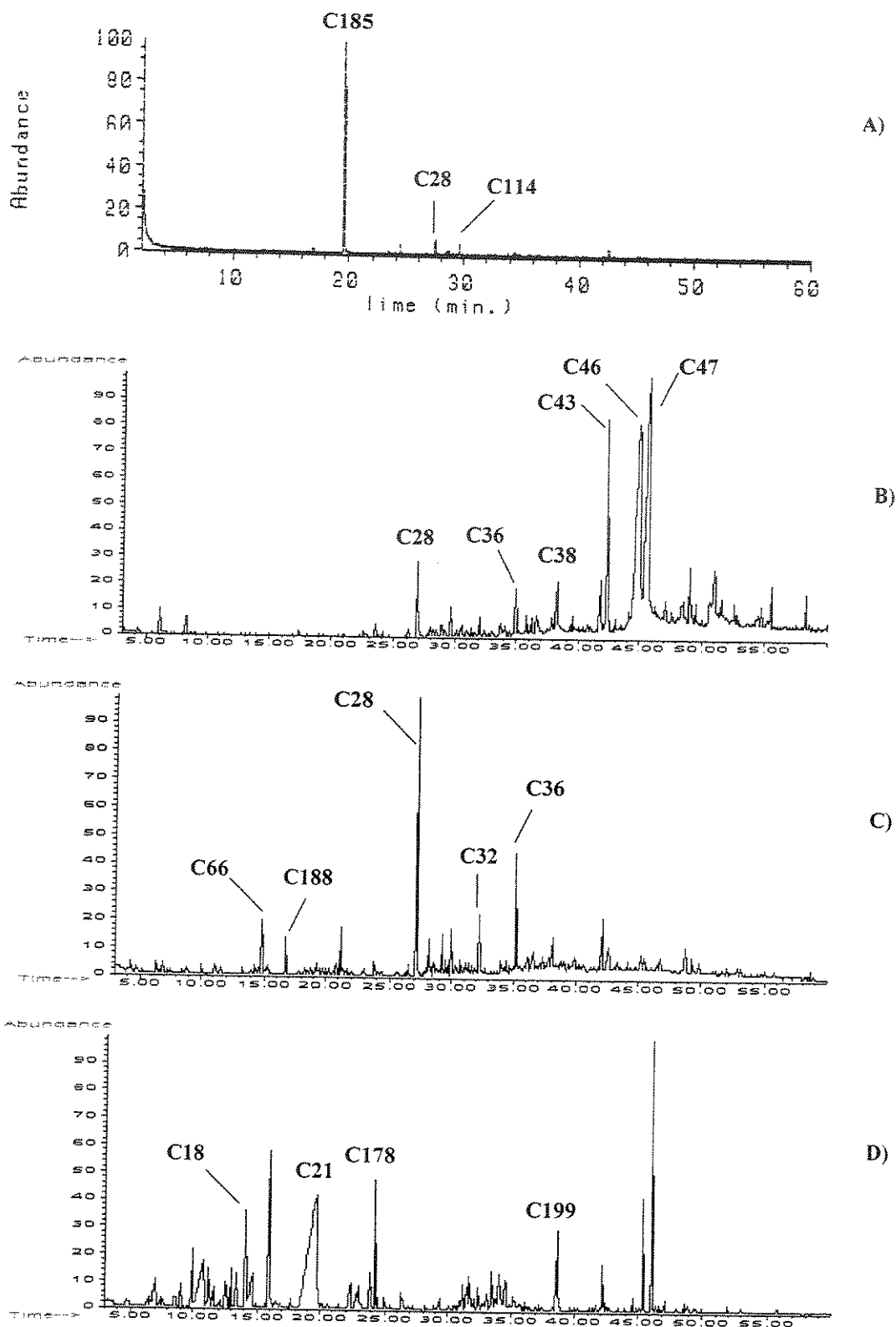


Figura 21. Cromatogramas (CG/EM) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Cordylandra* através de micro-hidrodestilação. A) *C. paralicola* ♂, B) *C. spiritus-sanctensis* ♂, C) *C. panapanari* ♀, D) *C. renggerioides* ♂. Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 1.

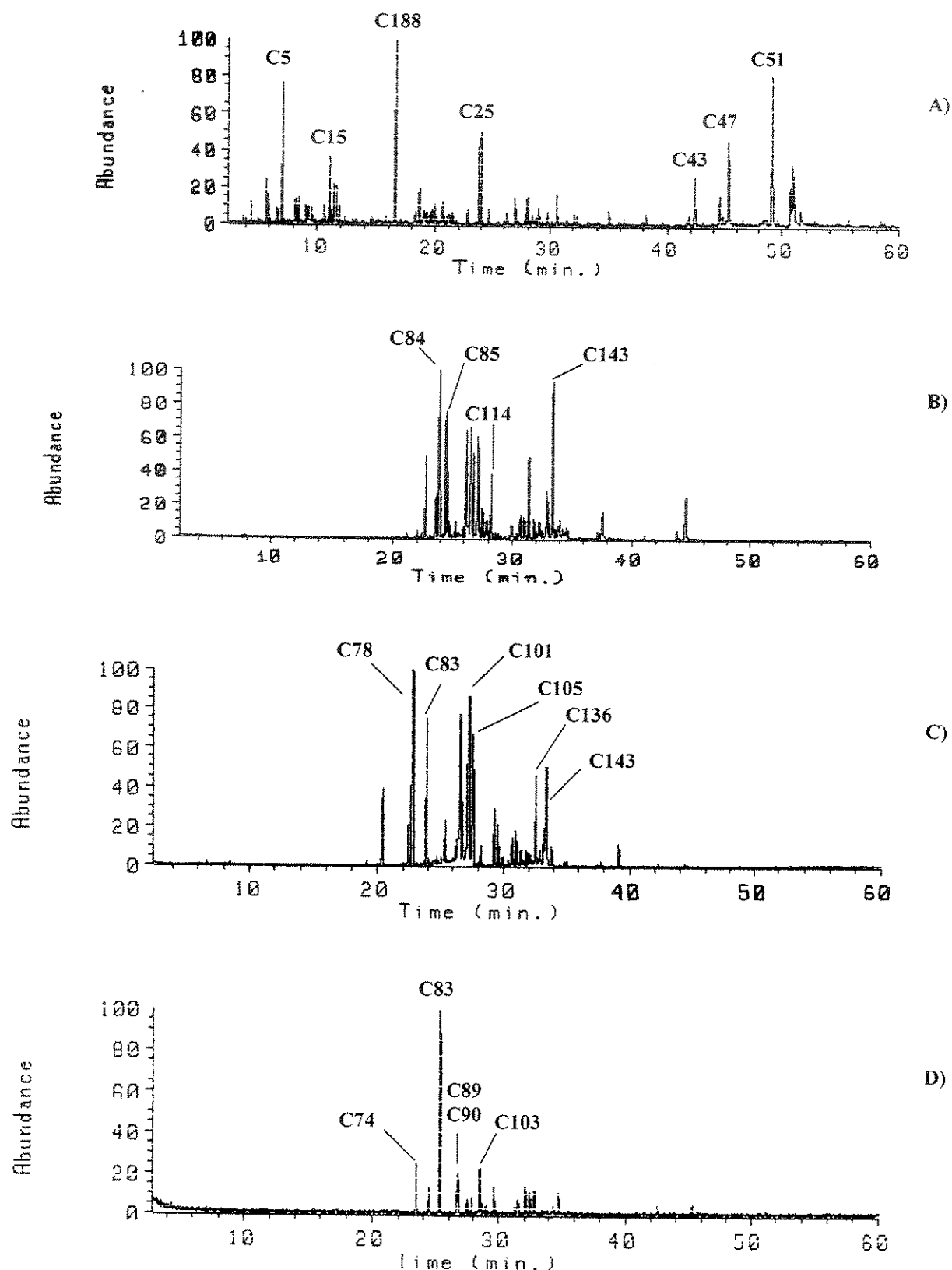


Figura 22. Cromatogramas (CG/EM) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Cordylandra* através de micro-hidrodestilação. A) *C. burchellii* ♂, B) *C. fluminensis* ♀, C) *C. pernambucensis* ♂, D) *C. weddelliana* ♂. Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 1.

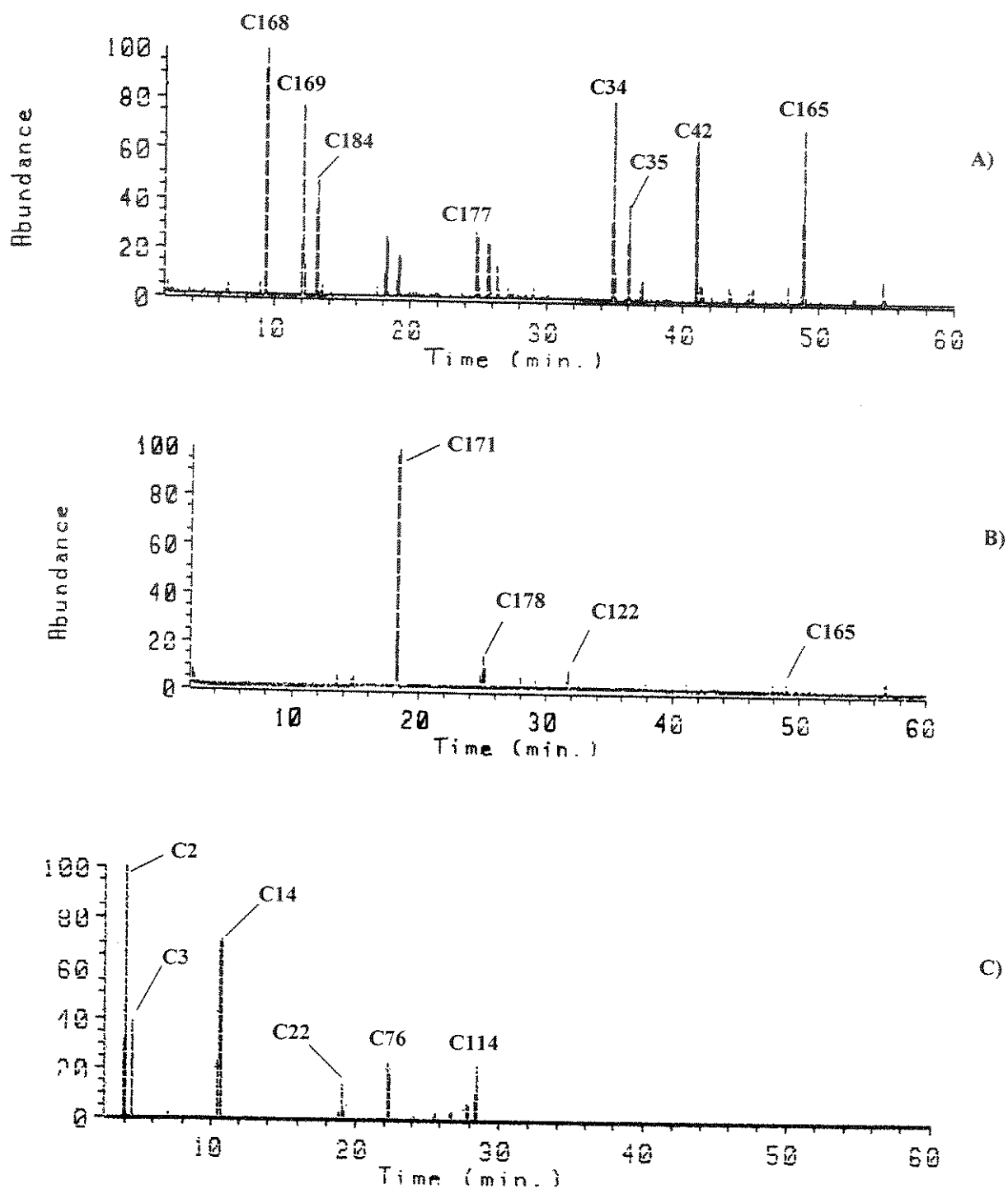


Figura 23. Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Criuva* através de micro-hidrodestilação. A) *C. parviflora* ♂ B) *C. criuva* ♂, C) *C. flava* ♂. Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 1.

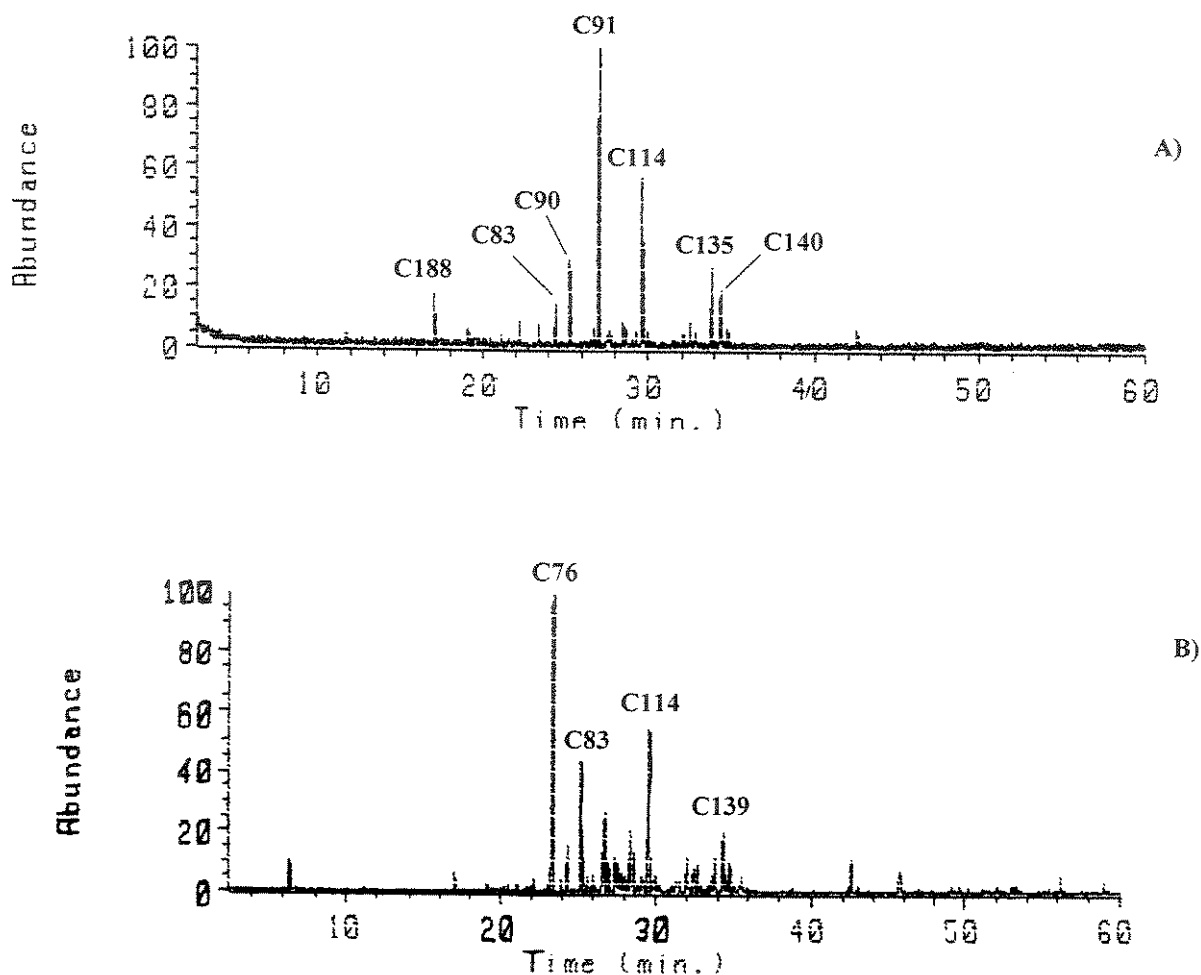


Figura 24. Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) representativos dos voláteis florais obtidos das espécies da seção *Phloianthera* através de micro-hidrodestilação. A) *C. hilariana* ♂, B) *C. lanceolata* ♂. Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 1.

Inicialmente nenhuma relação direta entre a posição taxonômica e a composição dos voláteis florais foi visualizada. A reorganização dos dados, Tabela 1, através do agrupamento dos componentes em 4 classes distintas⁶⁹ (derivados de ácidos graxos, isoprenóides, benzenóides e compostos contendo nitrogênio) permitiu uma melhor visualização da variação molecular dos grupos. Assim, tornou-se evidente que, na seção *Chlamydoclusia* [*C. grandiflora*, *C. nemorosa* (masculina e hermafrodita) e *C. rosea*], há predominância de derivados de ácidos graxos e compostos benzenóides. Já a composição

⁶⁹ Knudsen, J.T.; Tollsten, L.; Bergström, L.G. *Phytochemistry*, 1993, 33, 253.

dos voláteis das espécies pertencentes à seção *Cordylandra* (*C. pernambucensis*, *C. fluminensis*, *C. weddelliana*, *C. panapanari*, *C. spiritu-sanctensis*, *C. burchellii*, *C. renggerioides* e *C. paralicola*) podem *a priori* ser subdivididas em 2 grupos, um deles caracterizado pelo predomínio de componentes voláteis possuindo esqueletos tipo isoprenóides (subgrupo 1: *C. pernambucensis*, *C. fluminensis* e *C. weddelliana*) e o outro com predomínio de derivados de ácidos graxos (subgrupo 2: *C. panapanari*, *C. spiritu-sanctensis*, *C. renggerioides* e *C. burchellii*). Por outro lado, as flores de *C. paralicola* possuem um aroma muito peculiar, assinalado pela presença de indol (**C185**, Tabela 1), com 80,1% de sua composição. Devido a este aspecto particular, à primeira vista, esta espécie constitui uma exceção, porém omitindo-se o indol e recalculando as abundâncias relativas dos componentes restantes, um novo modelo de distribuição molecular foi obtido (derivados de ácidos graxos, 49,5%; isoprenóides, 31,0%; outros, 5,8%), o qual é consistente com aquele das outras espécies pertencentes à seção *Cordylandra*, subgrupo 2. A presença de diterpeno (kaureno, **C165**) e o predomínio de derivados aromáticos caracterizam as 2 espécies de *Clusia* da seção *Criuva*, *C. criuva* e *C. parviflora*, a última provavelmente melhor tratada como subespécie de *C. criuva*. *Clusia flava* possui um aroma mais forte, semelhante ao de banana, atribuído à presença de 16,4% de acetato de isopentila⁷⁰ (**C2**) (acetato de 3-metil-1-butanol, feromônio de Curculionidae⁷¹) e 9,0% de um composto que pode ser um derivado do acetato de 2-metil-butila (acetato de 2-metil-2-butenila)⁷² ou tiglatato de etila^{72b} (**C3**, Figura 17a), e seus voláteis são uma exceção às características do grupo acima citado. Finalmente, os voláteis florais das espécies pertencentes à seção *Phloianthera* (*C. hilariana* e *C. lanceolata*) possuem uma composição muito similar àquelas pertencentes à seção *Cordylandra* subgrupo 1, com uma predominância de isoprenóides.

⁷⁰ Bauer, K.; Garbe, D. *Common fragrance and flavor materials*. VCH, Weinheim, 1985, p.12.

⁷¹ Jaffé, K.; Sanchez, P.; Cerda, H.; Hernandez, J.V.; Jaffé, R.; Urdaneta, N.; Guerra, G.; Martinez, R.; Miras, B. *J. Chem. Ecol.*, 1993, **19**, 1703.

⁷² a) Rochat, D.; Meillour, P.N.-L.; Esteban-Duran, J.R.; Malosse, C.; Perthuis, B.; Morin, J.-P.; Descoins, C. *J. Chem. Ecol.*, 2000, **26**, 155. b) Borges, E.S.; Rezende, C.M. *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 71.

Uma das maneiras de agrupar um conjunto de dados ocorre através da análise estatística multivariada baseada em índices de similaridades⁷³. Para tanto, se faz necessário construir uma matriz de dados, que no nosso caso, foi feita agrupando-se os percentuais relativos das classes de compostos encontrados nos voláteis de cada espécie (Tabelas 1 e 2) e, desta forma, 2 dendrogramas foram produzidos após tratamento estatístico, baseado no método UPGMA (do inglês, “Unweight Pair Group Method Arithmetical”), em software (programa Cluster 2.0) desenvolvido pelo Prof. Dr. George J. Shepherd (IB-UNICAMP).

O dendrograma 1 (Figura 25) reflete a similaridade total dos óleos essenciais das espécies de *Clusia* investigadas e foi produzido usando os dados mostrados na Tabela 1 (os componentes dos aromas florais foram agrupados em 4 classes de compostos como sugerido por Knudsen *et al.*⁷⁴). O dendrograma 2 (Figura 26) foi produzido a partir de uma segunda matriz de dados, agrupando os componentes dos óleos essenciais em 10 classes de compostos e utilizou a abundância relativa dos mesmos na construção da matriz (Tabela 2). Os dois dendrogramas são similares, porém o segundo apresentou uma melhor separação entre as espécies pertencentes às seções *Chlamydoclusia* e *Cordylandra*. O dendrograma 2 mostra 5 grupos diferentes com *C. paralicola* formando um grupo isolado. O segundo grupo contém algumas das espécies da seção *Cordylandra* (*C. fluminensis*, *C. pernambucensis* e *C. weddelliana*) junto com espécies da seção *Phloianthera* (*C. hilariana* e *C. lanceolata*). O terceiro grupo contém espécies pertencentes à seção *Criuva* (*C. parviflora* e *C. criuva*). *Clusia renggerioides*, *C. burchellii* e *C. spiritu-sanctensis* pertencentes à seção *Cordylandra* formam o quarto grupo. Finalmente, o quinto grupo é formado pelas espécies pertencentes à seção *Chlamydoclusia* (*C. grandiflora*, *C. nemorosa* (masc.), *C. nemorosa* (hermafrodita) e *C. rosea*), com exceção de *C. panapanari* e *C. flava*, as quais pertencem às seções *Cordylandra* e *Criuva*, respectivamente.

⁷³ ter Braak, C.J.F. *Ecology*, 1986, **67**, 1167.

⁷⁴ Knudsen, J.T.; Tollsten, L.; Bergström, L.G. *Phytochemistry*, 1993, **33**, 253.

O dendrograma 2 desta forma, mostra alguma correlação com as subdivisões taxonômicas baseada nos caracteres morfológicos, mas não está totalmente de acordo com eles. Por exemplo, está de acordo, principalmente, com o grupo taxonômico da seção *Chlamydoclusia*, na qual o grupo é perturbado apenas pela presença de *C. panapanari* (seção *Cordylandra*) e *C. flava* (seção *Criuva* s.lat.). Em outros casos, no entanto, até espécies próximas como *C. burchellii* e *C. weddelliana* ou *C. fluminensis* e *C. spiritu-sanctensis* (todas da seção *Cordylandra*), possuem aromas florais de composição química diferentes, como indica suas posições no dendrograma 2.

Como esperado, existe alguma correlação entre os polinizadores, os grupos taxonômicos e a composição química dos voláteis florais. Desta forma, as flores de espécies de *Clusia* da seção *Chlamydoclusia* são, principalmente, polinizadas por abelhas da tribo *Euglossini*, enquanto abelhas *Trigonini* são responsáveis pela polinização das flores na seção *Cordylandra*. Flores da seção *Criuva* s.lat. atraem, principalmente, besouros, e aquelas da seção *Phloianthera* atraem abelhas *Euglossini* (flores grandes) e *Trigonini* (flores pequenas).

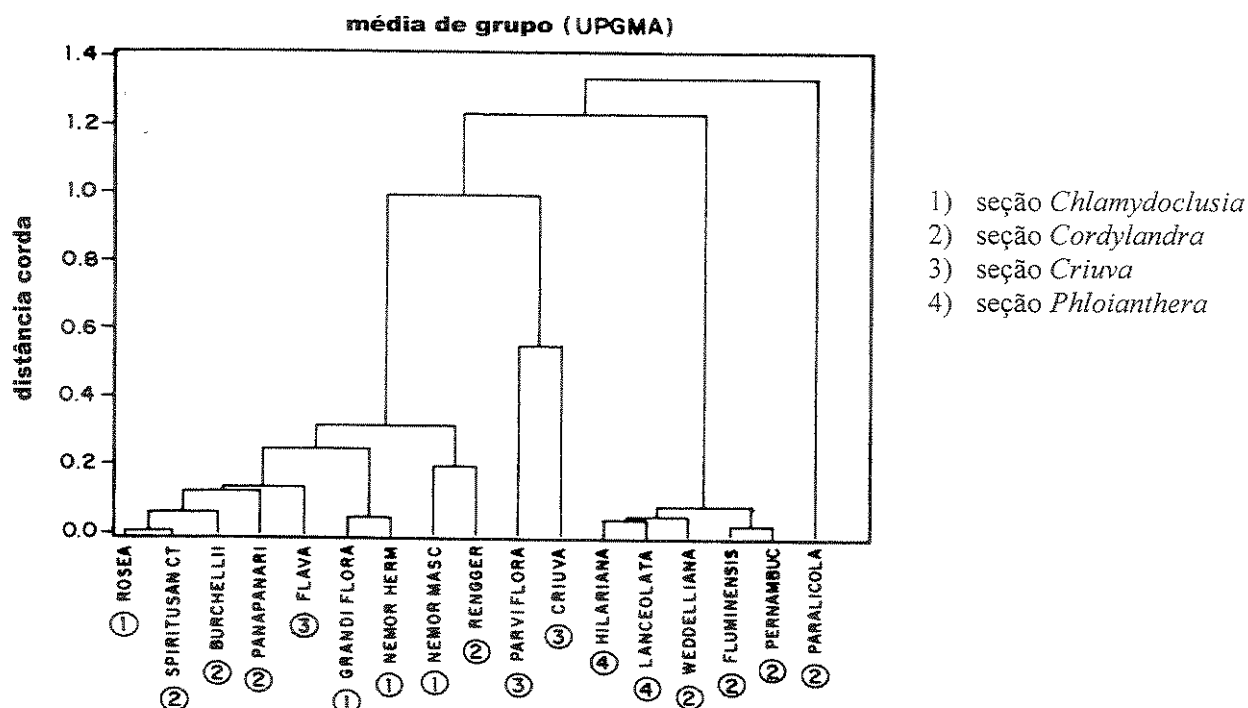


Figura 25. Dendrograma mostrando similaridades das espécies de *Clusia* usando a média de grupo (UPGMA) com a distância corda baseada na matriz de dados das fragrâncias florais de acordo com a Tabela 1.

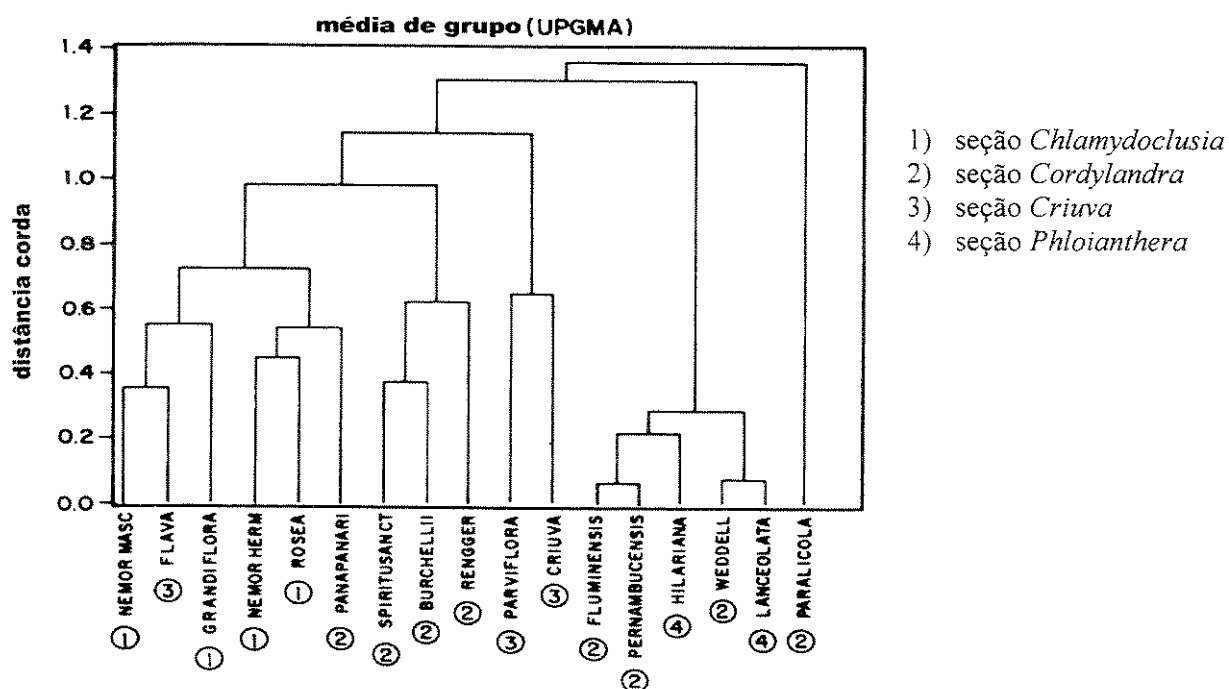


Figura 26. Dendrograma mostrando similaridades das espécies de *Clusia* usando a média de grupo (UPGMA) com a distância corda baseada na matriz de dados das fragrâncias florais de acordo com a Tabela 2.

Tabela 1: Composição percentual relativa dos óleos essenciais das pétalas de 16 espécies de *Clusia* pertencentes a quatro seções taxonômicas.

Seções Taxonômicas																								
Compostos			Chlamydoclusia						Cordylandra								Criuva				Phloianthera			
			grandiflora			nemorosa			rosea	paralicola	spiritu- sancensis	panapanari	rengger.	burchellii	fluminensis	pernambuc.	weddeliana	parviflora	criuva	flava	hilariana	lanceolata		
Derivados de ác. graxos																								
C1			900	825	-	-	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	Pentanoato de metila?		906	876	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,4	-	-	-	-	-
C3	Acetato de 2-metil-2-butenila ou tiglatto de etila?		918	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,0	-	-	-	-	-
C4	Isobutirato de 3-metil-butila?		941	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	Propanoato de pentila ?		952	972	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	2-Octanol?		962	997	-	-	-	-	1,1	1,1	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	Octanal?		968	1001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8	Ácido hexanóico		981	-	-	-	0,2	-	-	-	tr	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9	1-Octen-3-ol?		992	978	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	Hexanoato de etila		997	996	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	Decano		1000	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
C12	Octanol		1067	1070	-	-	-	-	-	-	-	1,7	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	Heptanoato de etila		1093	1095	-	-	-	-	-	-	-	5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14	Undecano		1100	1100	-	-	-	0,5	-	-	-	-	0,6	tr	tr	-	-	-	54,6	-	-	-	-	-
C15	Nonanal		1102	1098	-	-	-	0,4	-	-	0,9	1,4	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	Isovalerato de isopentila		1106	1103	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17	Ácido 2-etil-hexanóico		1123	1129	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18	Nonanol		1169	1171	-	-	-	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C19	Ácido Octanóico		1183	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20	Dodecano		1200	1200	-	-	-	0,2	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C21	Ácido nonanóico		1283	1280	0,6	-	-	-	-	-	-	21,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
C22	Tridecano		1300	1300	-	1,0	0,5	-	-	-	tr	-	tr	-	-	-	0,2	-	3,3	-	-	-	-	tr
C23	γ-Nonalactona		1359	1360	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C24	Ácido decanóico		1374	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C25	Tetradecano		1400	1400	0,8	18,6	10,0	13,4	2,5	-	tr	-	-	5,3	-	-	3,1	-	-	-	0,2	-	-	1,9

[illegible]

C142	Vulgarona B?	1649	1647	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5
C143	α-Cadinol	1656	1653	0.6	-	-	-	-	0.5	-	1.8	-	-	2.9	-	-	-	-	-	2.7	1.4	
C144	Bulnesol	1666	1666	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	-	-	
C145	14-OH-9-epi-β-Cariofileno?	1672	1664	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	0.3	
C146	β-Bisabolol	1674	1671	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.6	-	-	-	tr	0.5	
C147	Khusinol?	1674	1674	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	
C148	neo-Cedran-5-ol?	1678	1677	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	
C149	Acorenona	1685	1685	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	
C150	epi-α-Bisabolol	1685	1686	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	-	
C151	α-Bisabolol?	1687	1683	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	
C152	(Z)-α-trans-Bergamotol	1694	1693	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C153	Selin-7(11)-en-4-ol	1696	1691	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C154	(2Z, 6E)-Farnesol	1697	1697	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	tr	
C155	14-OH-α-Humuleno	1711	1709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	
C156	Oplopanona?	1717	1733	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-	
C157	(E,E)-Farnesol	1722	1722	tr	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	
C158	Zerumbona?	1731	1731	-	-	-	-	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C159	Bisabolona	1746	1744	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	
C160	Aristolona	1762	1756	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	
C161	Acetato (Z)-α-trans-Bergamotol?	1800	1798	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	
C162	14-OH-δ-Cadineno	1805	1799	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	
C163	Acetato de (E,E)-farnesila	1837	1843	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	0.2	-	
C164	Pimaradieno	1941	1941	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	1.4	-	-	-	-	-	-	-	
C165	Kaur-16-eno	2043	2034	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.5	1.8	-	-	
subtotal					6.6	15.2	4.6	2.0	5.9	2.9	5.0	22.8	5.4	94.1	90.6	76.0	17.4	10.8	15.8	76.7	79.4	
Benzenóides																						
C166	Benzaldeído	980	961	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	
C167	Alcool benzílico	1034	1032	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	
C168	Benzoacetaldéido	1043	1043	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.4	-	-	-	-	
C169	Benzoetanol	1109	1110	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	tr	-	12.1	-	-	-	-	
C170	1,2-Dimetoxibenzeno	1148	1147	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	0.4	2.0	-	-	-	
C171	p-Anisaldeído	1249	1252	-	3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58.7	-	-	-	
C172	Alcool p-metoxibenzílico	1278	1279	-	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C173	2-Metoxibenzoato de metila	1335	1335	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	
C174	Eugenol	1354	1356	6.6	1.0	13.3	1.1	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C175	4-tert-Amilfenol?	1393	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C176	Vanilina	1394	1391	0.5	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C177	Metileugenol	1402	1401	-	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-	3.5	-	-	-	-	
C178	1,3,5-Trimetoxibenzeno	1405	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	0.5	6.5	-	-	-	

Tabela 2: Componentes voláteis das flores de 16 espécies de *Clusia* agrupados em 10 classes diferentes.

Seções Taxonômicas																						
Chlamydoclusia										Cordylandra							Criuva				Phloiianthera	
Compostos	grandiflora	nemorosa		rosea	paralicola	spiritu- sanciensis	panapanari	Rengger.	burchellii	fluminensis	pernambuc.	weddelliana	parviflora	criuva	flava	hilariana	lanceolata					
		masc.	herm.																			
Benzenóides	12.7	6.9	13.6	1.1	-	0.9	5.0	4.7	1.4	-	-	3.7	31.0	67.2	-	-	-					
Monoterpenos	-	-	-	-	-	1.0	-	0.8	0.7	0.5	0.2	-	-	-	-	-	-					
Monoterpenos oxigenados	2.0	-	0.8	-	-	-	5.0	7.4	-	0.1	-	-	0.2	2.6	-	-	0.4					
Hidrocarbonetos de cadeia longa	35.2	40.8	19.8	29.5	4.4	5.1	11.8	1.2	8.3	0.1	-	4.5	0.8	6.9	58.2	5.6	3.9					
Compostos oxigenados de cadeia longa	2.4	4.5	18.2	24.2	5.0	41.9	28.1	13.7	32.9	0.2	-	1.9	32.2	6.5	25.4	-	3.8					
Sesquiterpenos	-	15.2	3.8	2.0	3.6	-	-	2.7	1.6	64.1	59.2	59.2	5.4	-	15.8	43.4	63.8					
sesquiterpenes oxigenados	4.6	-	-	-	2.3	1.9	-	11.7	3.1	29.4	31.2	15.4	0.3	6.4	-	33.3	15.2					
Ácidos carboxílicos	13.1	4.3	6.6	7.2	-	42.6	1.1	27.7	15.7	2.0	-	-	-	-	-	-	1.7					
Diterpenos	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	1.4	11.5	1.8	-	-	-					
Compostos nitrogenados	-	-	-	-	80.1	-	-	1.0	-	-	-	-	6.5	-	-	-	-					

A combinação das análises químicas dos aromas florais com as observações de campo do comportamento dos insetos que visitam as flores são uma forma importante para comprovar o efeito dos voláteis na atração dos insetos polinizadores⁷⁷. Neste sentido, dois experimentos de campo foram realizados pelo Dr. Volker Bittrich e Ariadna V. F. Lopes para testar os voláteis florais de *Clusia*. No primeiro teste, extratos diclorometânicos de flores frescas foram depositados em papel de filtro e, após evaporação do solvente, os papéis foram suspensos em ramos de *C. lanceolata* (seção *Phloianthera*) próximo a um papel de filtro tratado apenas com diclorometano (evaporado). No segundo teste, pétalas de flores frescas foram espremidas em pedaços de tecido preto e estes também foram suspensos em ramos, próximo a pedaços de tecido preto sem o tratamento. Ambos papéis de filtro contendo os aromas florais e os pedaços de tecido impregnados com fluido das pétalas atraíram abelhas *Trigona spinipes*, que também visitavam as flores da planta para a coleta de resina (Figura 27). Em outro experimento combinou-se flores de diferentes espécies. Assim, quando flores de *C. grandiflora* (seção *Chlamydoclusia*) foram depositadas numa árvore de *C. lanceolata*, as abelhas não a visitaram, embora elas sejam resiníferas e visitadas por *Trigona spinipes* regularmente em outra planta mãe distante cerca de 100 metros. No entanto, quando duas pétalas de uma flor de *C. lanceolata* foram colocadas sobre uma flor muito maior de *C. grandiflora*, abelhas *Trigona* coletoras de resina quase que imediatamente visitaram esta flor e começaram a coletar sua resina.

⁷⁷ Dobson, H.E.H. Floral volatiles in insect biology. In *Insect-plant interactions*. Bernays, E.A. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, 1994, Vol. V, 47.



Figura 27. Experimento com tecido preto impregnado com pétalas de *C. lanceolata* para atração de abelhas (no detalhe).

Uma outra observação interessante diz respeito à idade da flor e seu impacto na proporção de visita pelas abelhas *Trigona*. Flores do segundo dia, geralmente com nenhuma ou muito pouca resina, são praticamente ignoradas por abelhas *Trigona*, embora a forma, cor e seu aroma para os humanos sejam comparáveis às flores do primeiro dia. A mudança de comportamento das abelhas polinizadoras com relação às flores de segundo dia nos fez levantar a hipótese de uma possível mudança na composição dos voláteis florais, tanto pela redução das fragrâncias atrativas quanto pela emissão de um repelente, semelhante ao caso observado com flores de *Acacia* e suas formigas de guarda⁷⁸. Esta mudança poderá ser resultado de um sinal químico, tanto desencadeado pelo processo de fertilização, quanto automaticamente emitido durante o segundo dia por economia de pólen, pois do contrário, as chances das abelhas depositarem pólen numa flor já fertilizada são altas. Para verificar a alteração da composição química das

⁷⁸ Willmer, P.G.; Stone, G.N. *Nature*, 1997, 388, 165.

fragrâncias entre flores de primeiro e segundo dia, os voláteis das pétalas de flores de primeiro e segundo dia de *C. lanceolata* (feminina) foram obtidos por hidrodestilação. As análises de CG/EM (Figura 28) das 2 amostras revelaram que a distribuição molecular foi quase idêntica, exceto pela abundância relativa de um composto não identificado ($I_R=1405$) (traços nas pétalas do primeiro dia e 2,4% nas pétalas de segundo dia), β -cariofileno (6,0% e 2,3% primeiro e segundo dia, respectivamente) e biciclogermacreno (7,8% e 4,0% primeiro e segundo dia, respectivamente).

O modo de fragmentação do composto com $I_R=1405$ (Figura 29) é consistente com a dos iridóides⁷⁹, uma classe de compostos naturais com atividade repelente contra insetos^{80, 81, 82}. Novos experimentos de campo foram realizados, bem como o uso de outras técnicas para extração dos voláteis (SPME e “headspace” dinâmico com Porapak Q®), no entanto não conseguimos observar as diferenças mencionadas anteriormente nos cromatogramas (Figura 28). Vale ressaltar que o comportamento das abelhas foi alterado em relação às condições do primeiro experimento, ou seja, as abelhas *Trigona* estavam mais agressivas e atacavam a flor (cortavam as pétalas com suas mandíbulas) antes mesmo de sua abertura. É provável que a não reprodutibilidade do experimento para este fenômeno possa estar relacionada com a mudança de comportamento das abelhas *Trigona*.

⁷⁹ Cavill, G.W.K.; Houghton, E.; McDonald, F.J.; Williams, P.J. *Insect Biochem.*, 1976, **6**, 483.

⁸⁰ Cavill, G.W.K.; Clark, D.V. In *Naturally occurring insecticides*. Jacobson, M.; Crosby, D.G. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1971, p. 271.

⁸¹ Cavill, G.W.K.; Robertson, P.L.; Brophy, J.J.; Clark, D.V.; Duke, R.; Orton, C.J.; Plant, W.D. *Tetrahedron*, 1982, **38**, 1931.

⁸² Cornelius, M.L.; Grace, J.K.; Ford, P.W.; Davidson, B.S. *Environ. Entomol.*, 1995, **24**, 1263.

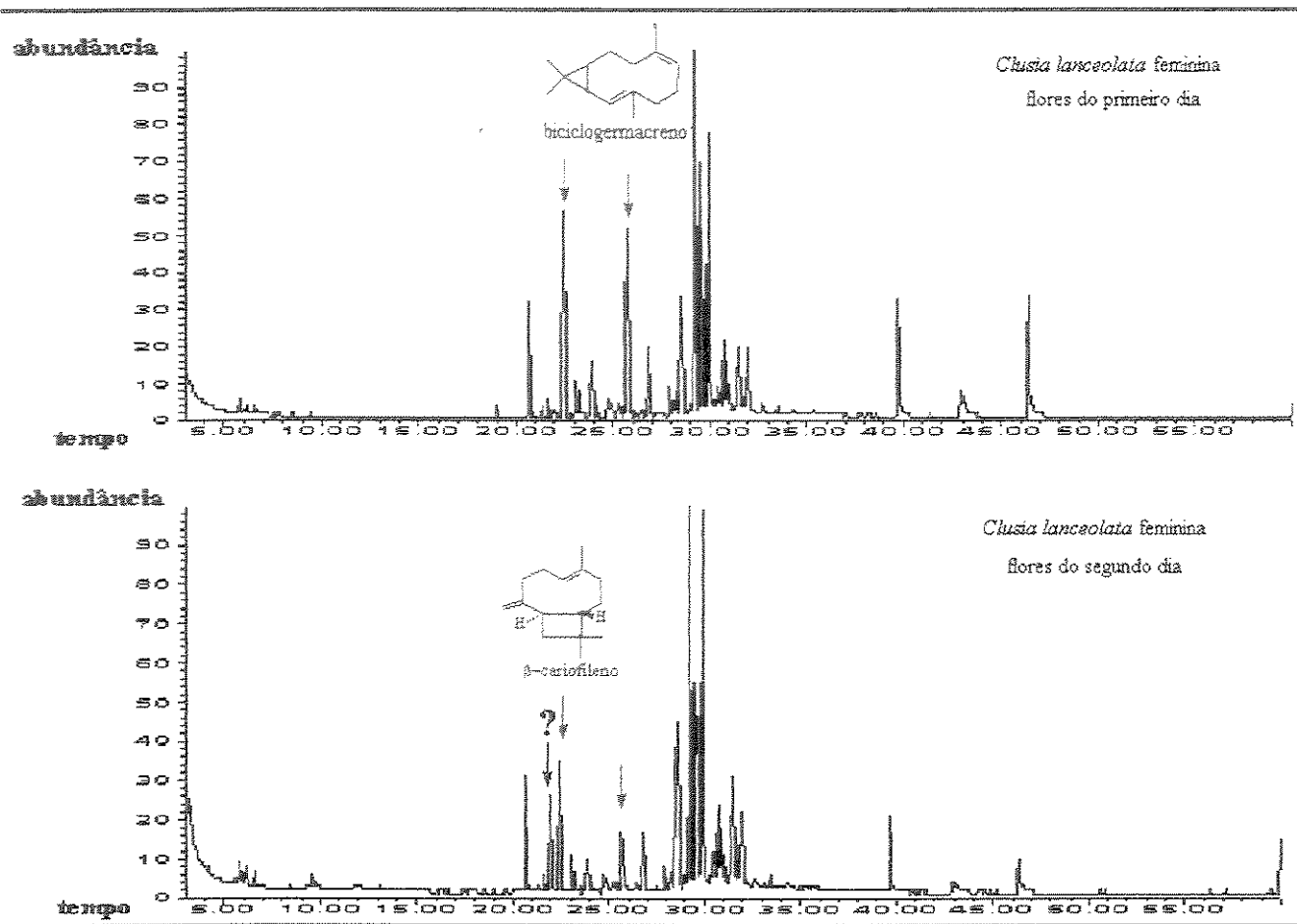


Figura 28. Cromatogramas (CG/EM: DB-5 30m) mostrando as diferenças entre os voláteis das pétalas de 1º e 2º dia em *Clusia lanceolata* feminina.

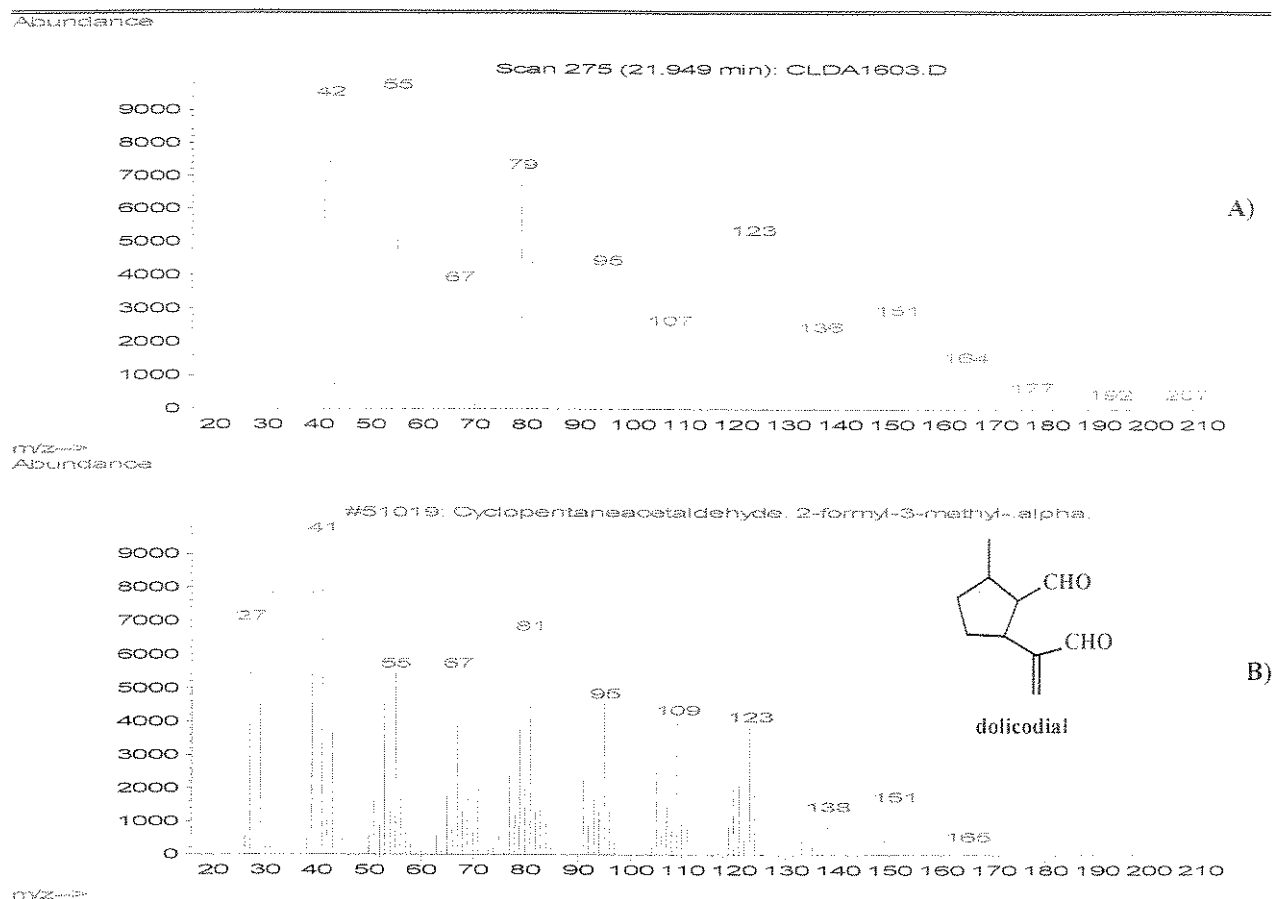


Figura 29. Comparação entre EM do composto $I_R=1405$ (A) e do dolicodial (B).

3.4 Conclusões

A composição química dos aromas florais em *Clusia* reflete apenas em parte os grupos taxonômicos aos quais pertencem as espécies investigadas. Isto é o caso, por exemplo, das espécies da seção *Chlamydoclusia* agrupadas no dendrograma 2. Seu grupo é apenas perturbado pela presença de *C. panapanari* (seção *Cordylandra*) e *C. flava* (seção *Criuva*). Em outros casos, até espécies proximalmente relacionadas como *C. burchellii* e *C. weddelliana* ou *C. fluminensis* e *C. spiritu-sanctensis*, mostraram diferença na composição química de seus aromas florais, como pode ser observado pelas suas posições no dendrograma 2 (Figura 26).

O desacordo entre os grupos dos dendrogramas e as seções taxonômicas pode ter causas diferentes:

1) a divisão tradicional das seções com base nos caracteres morfológicos não é monofilética, ou seja, não possui ancestral comum. As seções de *Clusia*, como *Cordylandra* e *Phloianthera*, incluídas nesta análise são de fato monofiléticas com base numa análise filogenética obtida a partir dos caracteres de seqüenciamento de DNA (Figura 30, página 75), o que derruba esta hipótese.

2) a adaptação das espécies a polinizadores diferentes poderia levar a um rápido desenvolvimento dos aromas florais. O odor tipo banana das flores de *Clusia flava* é, certamente, uma adaptação à polinização por besouros Curculionidae⁸³. A alteração dos aromas florais pode estar relacionada à necessidade de atrair polinizadores distintos para garantir a integridade das espécies, na tentativa de evitar a polinização cruzada interespecífica. Acredita-se que esta seja a razão principal pelas distorções observadas entre os dendrogramas e as seções taxonômicas, pois experimentos de cruzamentos artificiais têm mostrado que muitas espécies de *Clusia*, até de diferentes seções, podem ser cruzadas com relativa facilidade. Híbridos naturais, por outro lado, são raros. Isto sugere que aromas florais diferentes são importantes para especialização e manutenção da integridade das espécies já desenvolvidas.

⁸³ Hammel, B. *Selbyana*, 1986, 9, 112.

Por fim, nossos resultados estão de acordo com o pensamento de Dressler⁸⁴, ou seja, quando há espécies crescendo próximas e com eventos fenológicos sincronizados, há uma pressão natural para produção de diferentes compostos voláteis atraindo diferentes espécies de polinizadores. Por outro lado, devido à presença de outras barreiras interespecíficas, espécies não relacionadas podem produzir compostos similares atraindo os mesmos polinizadores, mas mantendo assim mesmo sua integridade.

⁸⁴ Dressler, R.L. *Rev. Biol. Trop.*, 1968, **15**, 143.

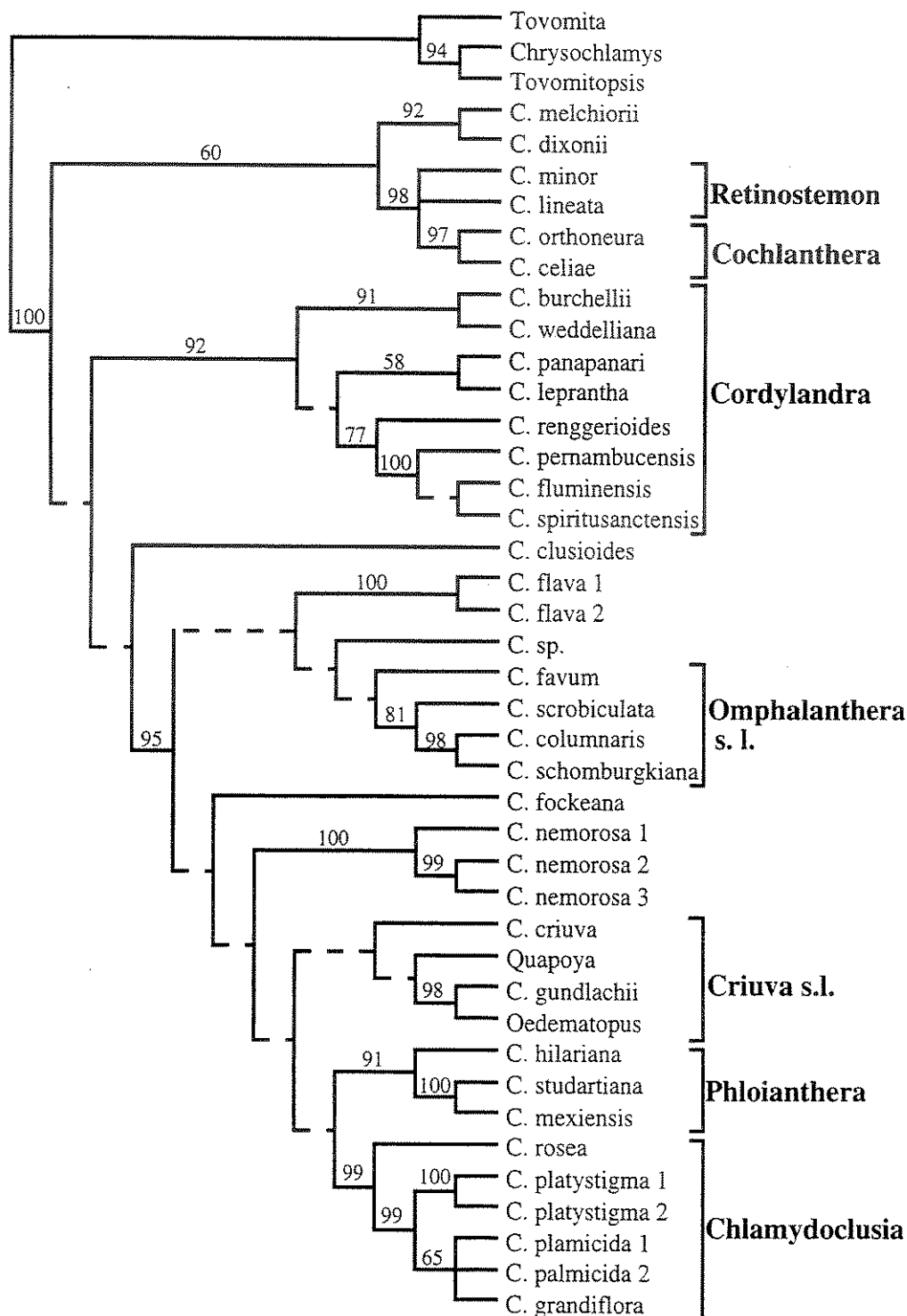


Figura 30. Cladograma mostrando relações filogenéticas entre as espécies usando caracteres de seqüenciamento de DNA nuclear (região ITS) (M. Gustafsson & V. Bittrich, ined.).

Parte 4

Função ecológica dos óleos florais de Tovomita

4. Função ecológica dos óleos florais de *Tovomita*[£]

4.1 Considerações gerais

O gênero neotropical *Tovomita* Aubl. (Guttiferae) compreende cerca de 80 espécies distribuídas pela América Central, Amazônia e toda floresta Atlântica brasileira até o Rio de Janeiro, com aproximadamente 40 espécies ocorrendo no Brasil. As plantas são dióicas, e as flores, de tamanho pequeno a médio, possuem estames numerosos (flores masculinas) ou estaminódios (flores femininas) de morfologia similar. A taxonomia e a biologia deste gênero são pouco conhecidas, e pouco se sabe a respeito da estrutura populacional das espécies de *Tovomita* de ocorrência simpátrica⁸⁵, especialmente em florestas de terra firme. A química de espécies de *Tovomita* foi pouco explorada e apenas alguns relatos sobre o estudo fitoquímico da madeira e das raízes de apenas 7 espécies de *Tovomita* são conhecidos^{86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93}, com os metabólitos secundários isolados pertencendo à classe das xantonas e benzofenonas (Figura 31). O presente trabalho é o primeiro relato sobre a composição química do óleo dos estames de *Tovomita* spp.⁹⁴.

Plantas do igapó de *Tovomita macrophylla* (Poepp. & Endl.) Walp. foram observadas crescendo próximas umas das outras e várias outras espécies de *Tovomita*

[£] Trabalho desenvolvido em colaboração com Dra. Maria do Carmo E. Amaral e Dr. Volker Bittrich (IB-UNICAMP).

⁸⁵ simpátrica : que ocupam ou ocorrem numa mesma área geográfica.

⁸⁶ Gabriel, S.J.; Gottlieb, O.R. *Phytochemistry*, 1972, **11**, 3035.

⁸⁷ De Oliveira, W.G.; Gottlieb, O.R.; Mesquita, A.A.L. *Phytochemistry*, 1972, **11**, 3323.

⁸⁸ Mesquita, A.A.L.; De Oliveira, W.G.; Neiva, R.M.T.; Gottlieb, O.R. *Phytochemistry*, 1975, **14**, 803.

⁸⁹ Marta, M.; Delle Monache, F.; Marini-Bettolo, G.B.; Lyra, D.A.; De Mello, J.F.; De Lima, O.G. *Gazz. Chim. Ital.*, 1976, **106**, 651.

⁹⁰ Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Marini-Bettolo, G.B.; Lyra, D.A.; Lwande, W. *Gazz. Chim. Ital.*, 1984, **114**, 55.

⁹¹ De Oliveira, W.G.; Mesquita, A.A.L.; De Lima, R.A.; Gottlieb, O.R.; Gottlieb, H.E. *Phytochemistry*, 1984, **23**, 2390.

⁹² Seo, E.-K.; Wall, M.E.; Wani, M.C.; Navarro, H.; Mukherjee, R.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D. *Phytochemistry*, 1999, **52**, 669.

⁹³ Marques, V.L.L.; De Oliveira, F.M.; Conserva, L.M.; Brito, R.G.L.; Guilhon, G.M.S.P. *Phytochemistry*, 2000, **55**, 815.

⁹⁴ Nogueira, P.C. de L.; Marsaioli, A.J.; Amaral, M.C.E.; Bittrich, V. *Phytochemistry*, 1999, **49**, 1009.

ocorrem de maneira simpátrica numa área relativamente pequena (ca. 100 Km²) de floresta de terra firme, a Reserva Ducke (Manaus-AM). Até o momento, somente 16 espécies foram encontradas, mas cada espécie ocorre com baixa densidade populacional.

Aromas florais são típicos em plantas polinizadas por animais, exceto aquelas polinizadas por pássaros. Diferentes aromas normalmente atraem grupos distintos de polinizadores e assim fazem parte das chamadas síndromes florais⁹⁵. Enquanto o agente atrativo é na maioria das vezes diferente da recompensa, geralmente pólen e néctar, em algumas flores são secretados óleos aromáticos que além de atrair os polinizadores constituem também a recompensa. As flores que oferecem esses óleos aromáticos são encontradas principalmente em Orchidaceae⁹⁶, onde já foram relatadas mais de 600 espécies que produzem estes óleos e o fenômeno de atração parece se restringir a machos de abelhas euglossini atuando como polinizadores. Foi também observado, como fenômeno raro, em algumas outras famílias de angiospermas^{97, 98}, mas nunca num gênero da família Guttiferae. Como outros aromas florais, os óleos aromáticos são, geralmente, misturas de várias substâncias orgânicas voláteis e os estudos em orquídeas mostraram que a composição dos óleos é, em muitos casos, espécie-específica. Este fato é importante para especificidade dos visitantes euglossine, pois funciona como um mecanismo de isolamento reprodutivo entre espécies simpátricas^{99, 100}.

⁹⁵ Faegri, K.; Van der Pijl, L. *The principles of pollination ecology*. 3rd. ed.: Pergamon Press, Oxford, 1979.

⁹⁶ Ackerman, J.D. *Biol. J. Linnean. Soc.*, 1983, 20, 301.

⁹⁷ Endress, P.K. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press, Cambridge, 1994.

⁹⁸ Schatz, G.E. In *Reproductive ecology of tropical forest plants*. In Bawa, K.S.; Hadley, M. (Eds.), Unesco, Paris, 1990, p. 69.

⁹⁹ Williams, N.H.; Dodson, C.H. *Evolution*, 1972, 26, 84.

¹⁰⁰ Hills, H.G.; Williams, N.H.; Dodson, C.H. *Biotropica*, 1972, 4, 61.

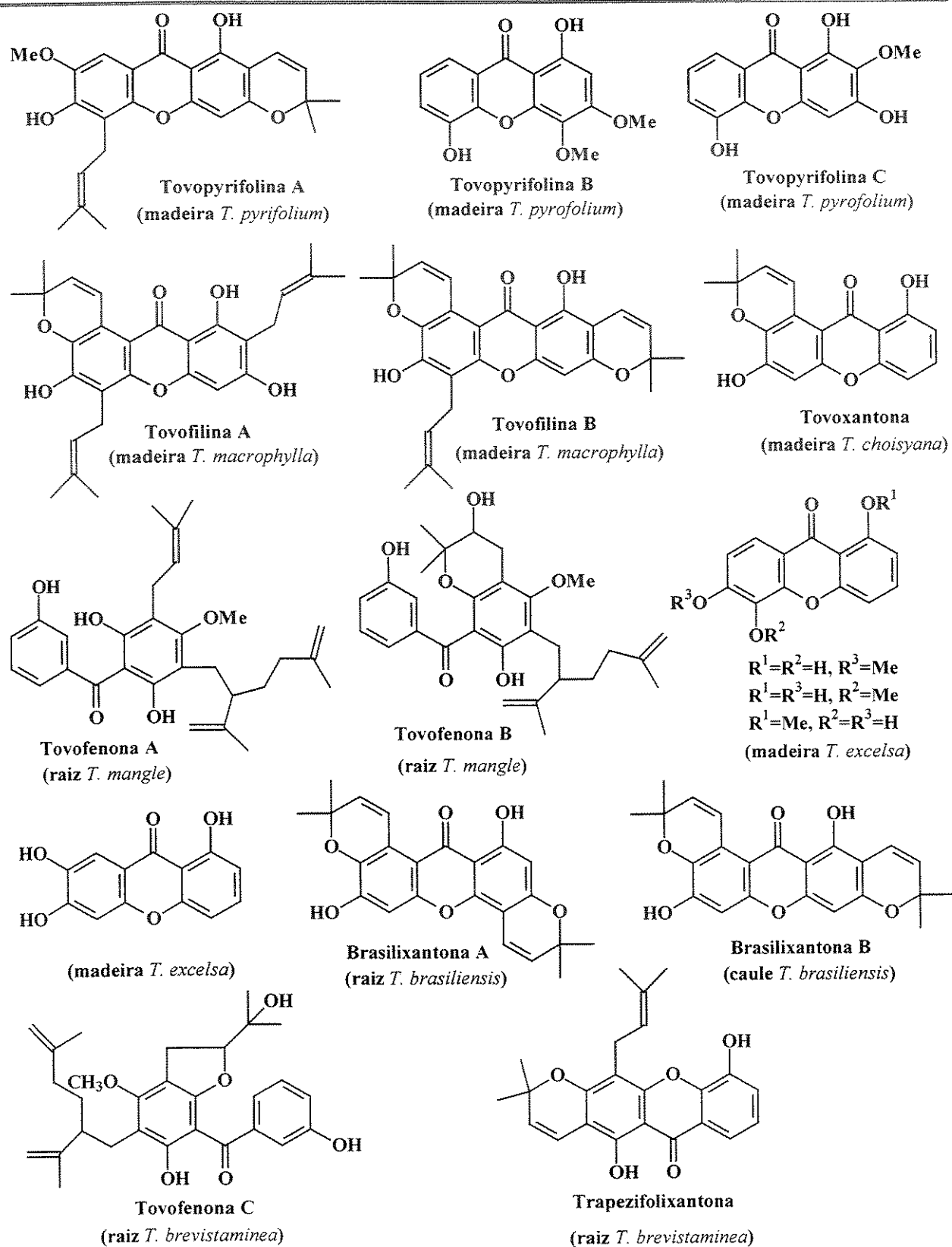


Figura 31. Principais compostos encontrados em estudos fitoquímicos de *Tovomita*.

Abelhas euglossini (Hymenoptera : Apidae : Euglossini) são membros notáveis da fauna de abelhas da América neotropical. São abelhas coloridas (azul, verde, bronze ou marrom/preto) com brilho metálico, distribuídas desde o norte do México até o norte da Argentina, exceto *Aglae* que ocorre apenas na bacia amazônica e no norte e sudoeste do Panamá¹⁰¹, sendo os machos desta tribo célebres pelo comportamento único de coletar fragrâncias, principalmente de flores de orquídeas e de outras plantas, além de madeira e frutos em putrefação. Dos 5 gêneros desta tribo (*Exaerete*, *Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema* e *Aglae*), três são de abelhas solitárias¹⁰² e dois são semi-sociais^{99, 103, 104} e os machos destas abelhas possuem várias especializações morfológicas relacionadas à coleta de fragrâncias. As pernas da frente são modificadas na forma de escovas do tipo esfregão e suas pernas traseiras possuem uma cavidade invaginada profunda e cheia de pêlos (Figura 32). Assim, os machos ao tocar a superfície de uma flor, por exemplo, com as escovas das pernas frontais transferem os óleos com fragrância, compostos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e benzenóides¹⁰⁵, para a cavidade da perna traseira.

¹⁰¹ Kimsey, L.S. *Syst. Entomol.*, 1987, **12**, 63.

¹⁰² Colônia de fêmeas de idades próximas que compartilham ninho e produzem a prole em cooperação.

¹⁰³ fêmeas que não desenvolvem prole em cooperação e os ninhos podem ou não ser compartilhados.

¹⁰⁴ Dressler, R.L. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 1982, **13**, 373.

¹⁰⁵ Williams, N.H.; Whitten, W.M. *Biol. Bull.*, 1983, **164**, 355.

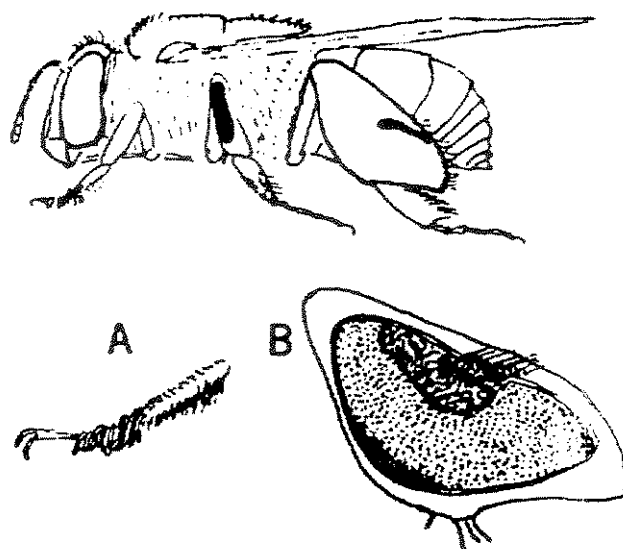


Figura 32. Macho de abelha euglossine. A) escovas da perna dianteira B) seção mostrando o interior glandular da perna traseira.

Até hoje, ainda não se sabe ao certo o motivo destas abelhas coletarem fragrâncias e qual a sua finalidade, no entanto, algumas idéias foram postuladas^{106, 107}. As principais hipóteses propõem que as fragrâncias atuem de alguma forma na atividade reprodutiva destas abelhas e as fragrâncias deverão ser usadas pelos machos para atrair outros machos conspecíficos. Outra hipótese é que os machos convertem as fragrâncias em feromônios sexuais para atração de fêmeas. Recentemente, Peruquetti¹⁰⁸ sugeriu que machos de euglossine coletam fragrâncias para atrair inicialmente outros machos e em seguida fêmeas. As fragrâncias coletadas pelos machos são armazenadas nas glândulas da perna traseira, onde podem ser alteradas e/ou misturadas com outras substâncias. O composto final é espécie-específico e usado para atrair machos de uma mesma espécie. Uma agregação de machos é formada e as fêmeas são atraídas para eles. Os estudos realizados por Eltz *et al.* em 3 espécies de *Euglossa* revelaram que as fragrâncias coletadas são eficientemente armazenadas no órgão da perna traseira e que sua composição química é complexa e específica¹⁰⁵ (Figura 33). Ao que parece, o conteúdo individual das substâncias tanto no aspecto qualitativo quanto quantitativo é usado como fonte de

¹⁰⁶ Kimsey, L.S. *Anim. Behav.*, 1980, **28**, 996.

¹⁰⁷ Eltz, T.; Whitten, W.M.; Roubik, D.W.; Linsenmair, K.E. *J. Chem. Ecol.*, 1999, **25**, 157.

informação pelas abelhas fêmeas para identificar a espécie do macho em questão (qualidade do genótipo) bem como sua eficiência em coletar óleos (qualidade do fenótipo). No entanto, as dúvidas sobre quais substâncias estão envolvidas na formação da agregação dos machos e como as fêmeas localizam a agregação e escolhem seus parceiros permanecem sem explicação.

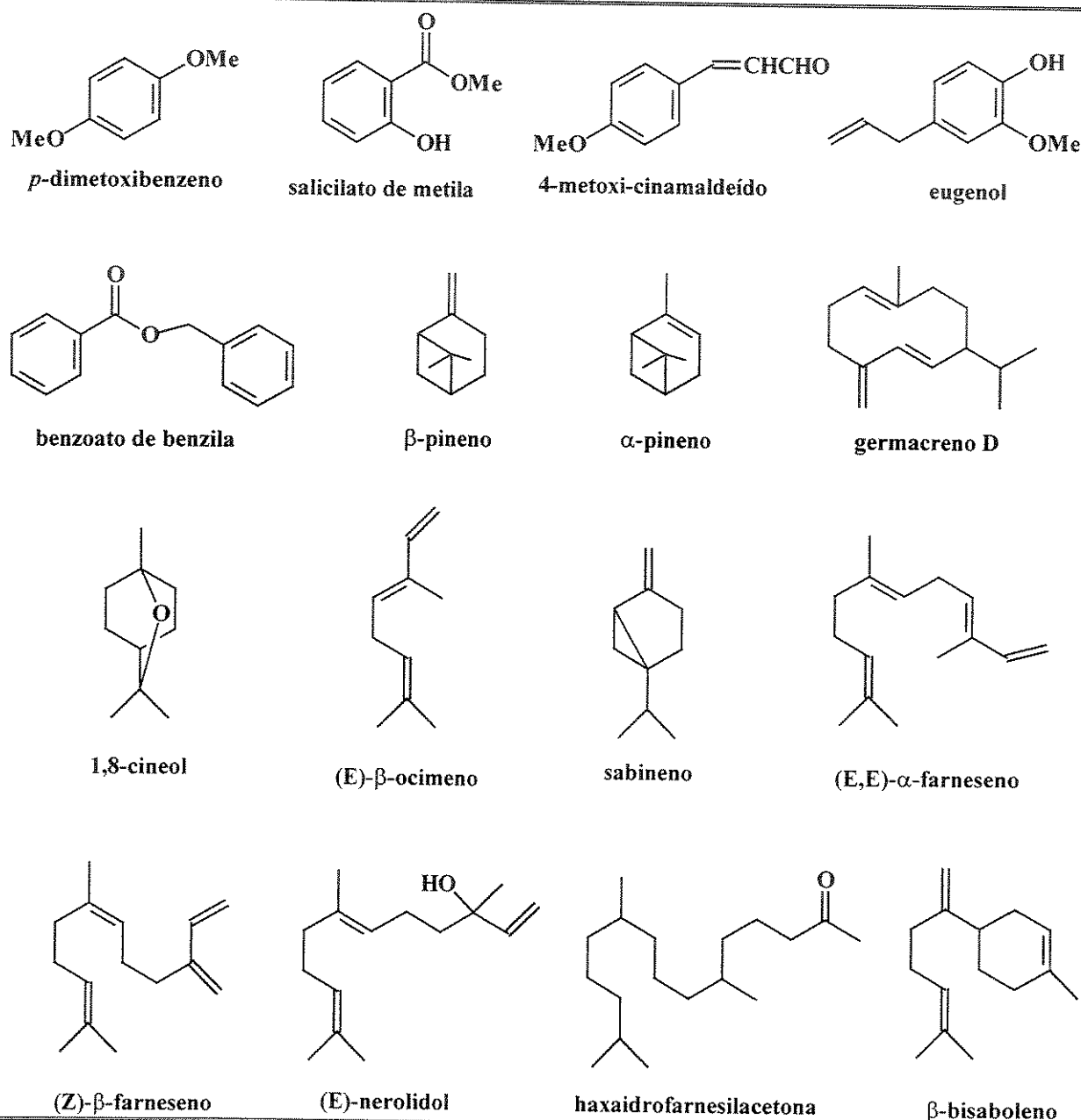


Figura 33. Principais compostos encontrados no órgão da perna traseira de 3 espécies de abelhas Euglossini (*Euglossa cognata*, *E. imperialis*, *E. tridentata*).

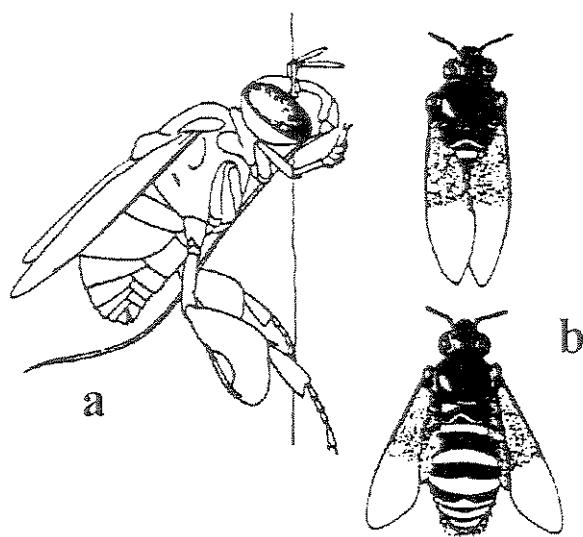


Figura 34. Posição do macho empoleirado na árvore em seu território. a) visão lateral de uma *Euglossa imperialis* b) visão do dorso de uma *Eulaema meriana* se exibindo (asas em forma de leque).

As abelhas da tribo Euglossini são fortes voadoras e bem conhecidas como polinizadores de longa distância de plantas tropicais¹⁰⁹, de forma que uma baixa densidade populacional não deveria impedir uma polinização bem sucedida. Como geralmente mais que uma espécie de *Tovomita* floresce simultaneamente, o problema para as plantas seria o de evitar a polinização cruzada interespecífica. Em *Tovomita*, as abelhas pousam nas anteras ou nos estigmas quando coletam o óleo estaminal e, desta forma, atuam como polinizadores, como foi observado em *Tovomita spruceana* Planch. & Triana¹¹⁰ (Figura 35).

¹⁰⁹ Janzen, D.H. *Science*, 1971, **171**, 203.

¹¹⁰ Amaral, M.C.E.; Bittrich, V. *XVI Reunião anual sobre evolução, sistemática e ecologia em micromoleculares*. Resumos, 1994, 15.

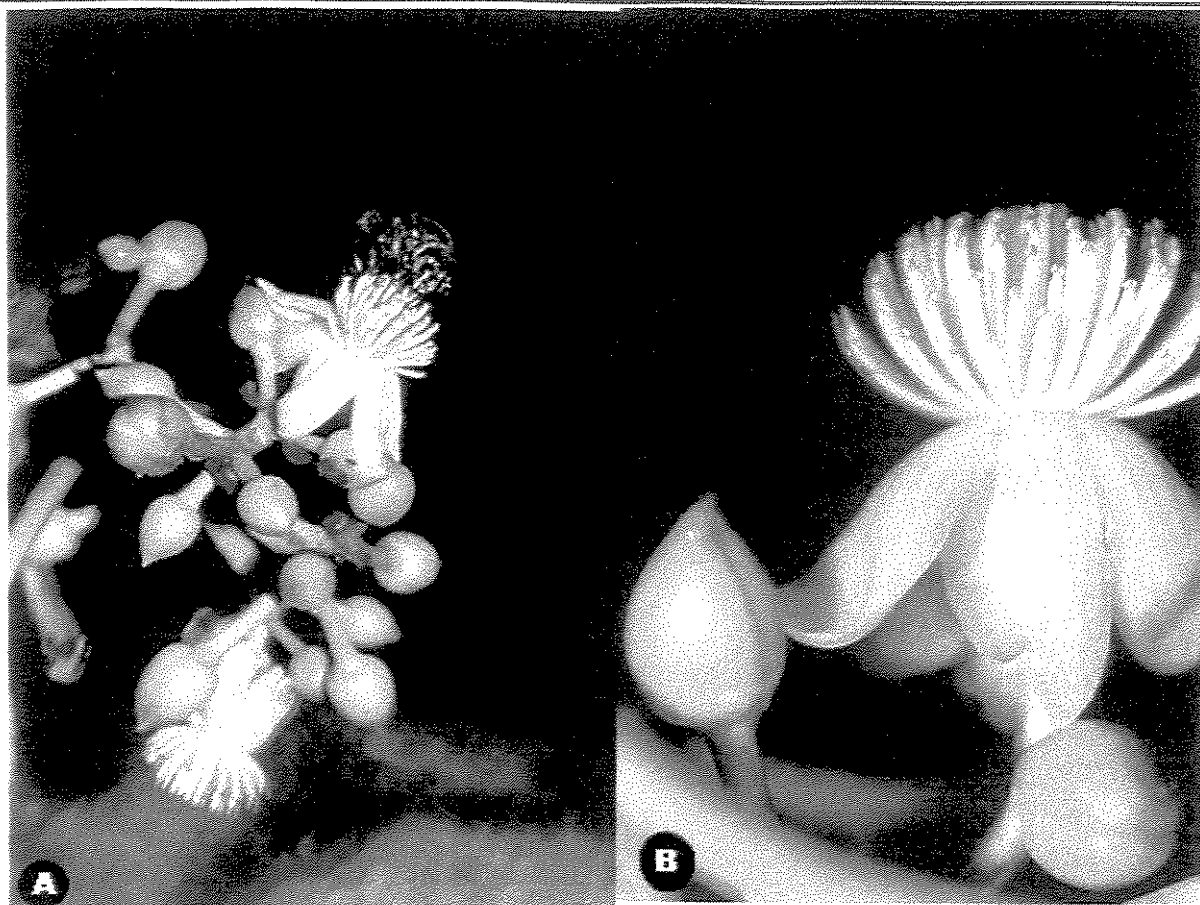


Figura 35. Flores de *Tovomita spruceana* Planch. & Triana. A) com uma abelha euglossini coletando óleo B) detalhe das gotículas de óleo aromático secretadas pelos estames.

4.2 Objetivos

O objetivo desta etapa do trabalho foi verificar a composição química dos óleos dos estames e estaminódios de *Tovomita* spp., com intuito de compará-las a fim de detectar diferenças que possam sugerir um mecanismo de isolamento entre as espécies simpátricas florescendo na mesma época do ano.

4.3 Resultados e discussão

As amostras do óleo dos estames de 4 espécies de *Tovomita*, florescendo na mesma época do ano (1996), foram coletadas na Reserva Ducke (Manaus-AM), sendo obtidos diretamente através de absorção em papel de filtro previamente tratado. Os óleos foram extraídos do papel com CH_2Cl_2 por exposição à ultra-som durante 1 minuto e então utilizados para análise através de CG e CG/EM (Tabela 3 e Figuras 36 e 37).

As flores de todas espécies investigadas são diurnas e duram um dia. No dia da antese¹¹¹, os filetes dos estames (flores masculinas) ou estaminódios (flores femininas) produzem gotículas de um óleo aromático (Figura 35). Em *Tovomita macrophylla*, observamos que abelhas macho de uma *Euglossa* sp. pousam nos estames das flores masculinas e nos grandes estigmas das flores femininas. Enquanto estão sobre as anteras ou estigmas, as abelhas coletam o óleo aromático com suas pernas dianteiras, transferindo-o, posteriormente, para as pernas traseiras enquanto pairam próximo às flores. Este processo é geralmente repetido algumas vezes antes das abelhas deixarem a flor. Algumas vezes, duas ou mais abelhas competem pela mesma flor. Como as abelhas pousam nos estames e coletam o óleo enquanto permanecem nas anteras, todo seu esterno fica polvilhado com pólen seco. Pousando posteriormente nos grandes estigmas das flores femininas para coletar o óleo dos estames, transferem o pólen assegurando a polinização.

Pequenos besouros também foram observados visitando as flores de *T. macrophylla*, pegando óleo dos filamentos, às vezes cortando-os com suas mandíbulas. Como sempre permaneciam na base dos filamentos e nunca tocavam as anteras, elas foram consideradas seqüestradoras de óleo e não polinizadoras.

¹¹¹ antese : desabrochar da flor

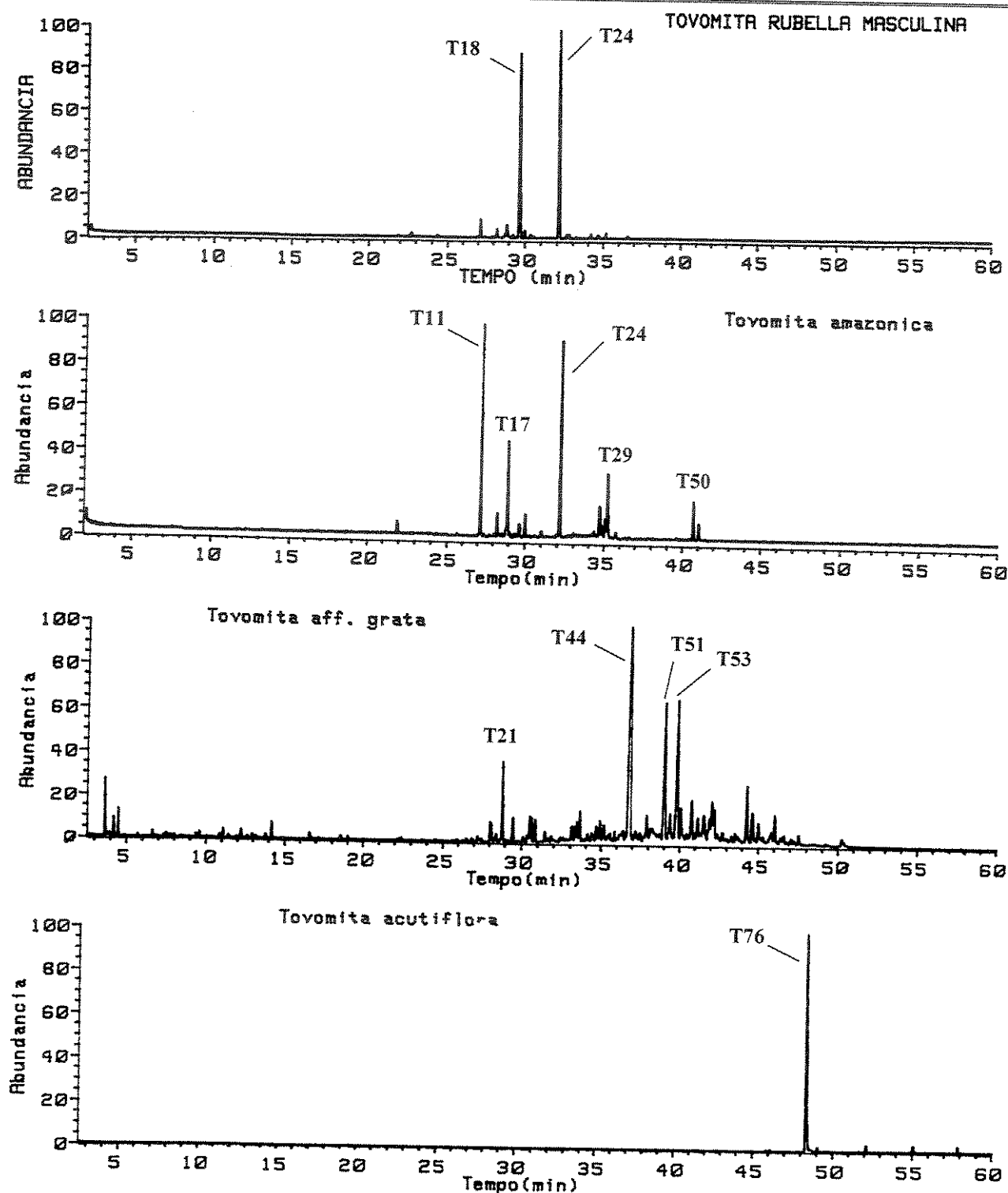


Figura 36. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por CG/EM (coluna DB-5 30m) das 4 espécies de *Tovomita* estudadas. Os n° sobre os picos estão relacionados com a identificação indicada na Tabela 3 e as estruturas da Figura 37.

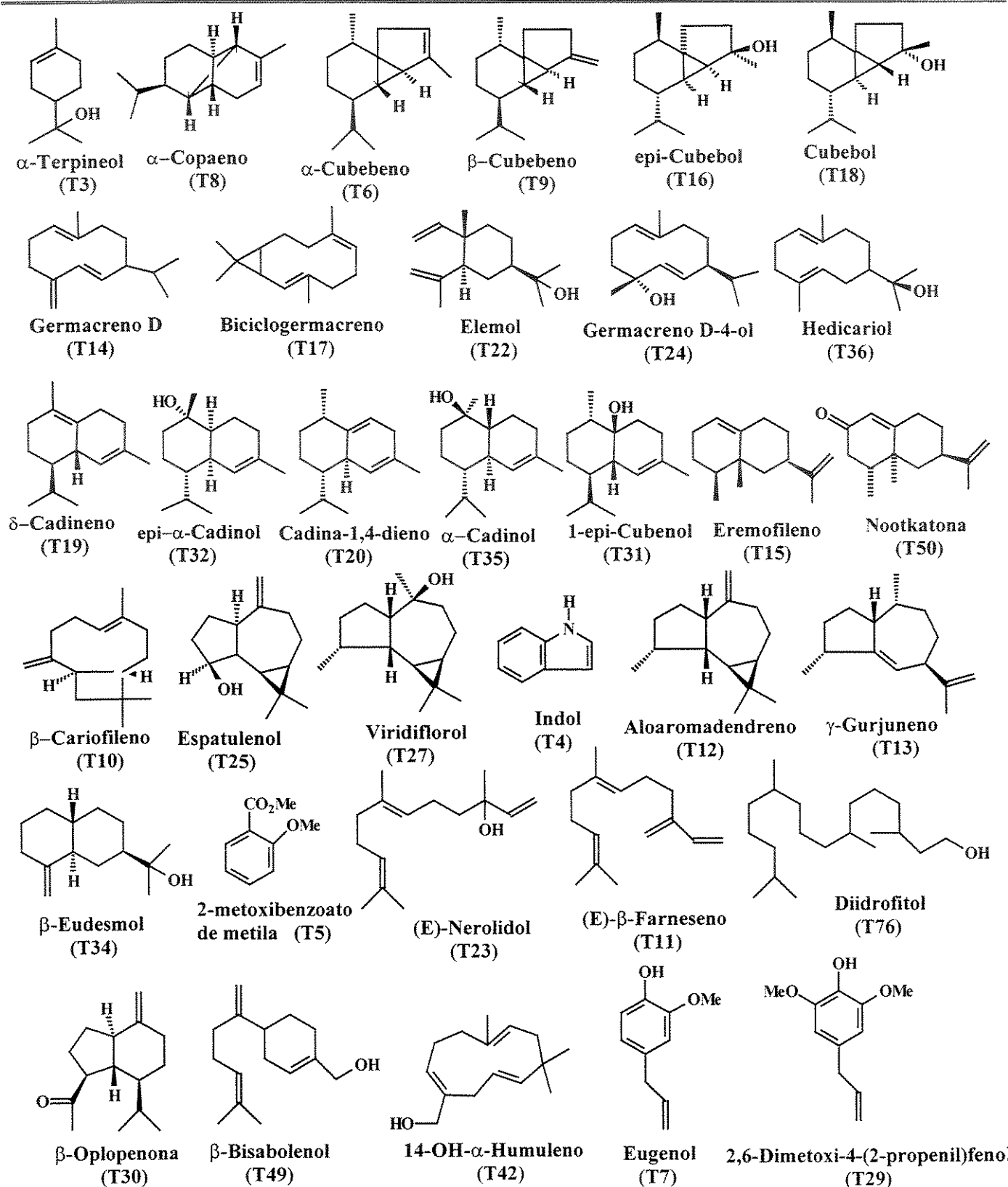


Figura 37. Principais compostos encontrados nos óleos dos estames das 4 espécies de *Tovomita*.

Tabela 3: Composição percentual relativa dos óleos dos estames de *Tovomita* spp.

Compostos	I _R ^c	I _R ^{lit}	<i>T. rubella</i>	<i>T. amazonica</i>	<i>T. aff. grata</i>	<i>T. acutiflora</i>
T1	2-Butanona?	943	-	-	1.4	-
T2	NI	962	-	-	0.7	-
T3	α-Terpineol	1190	1189	-	0.6	-
T4	Indol	1288	1288	-	0.9	-
T5	2-Metoxibenzoato de metila	1336	-	-	1.0	-
T6	α-Cubebeno	1349	1351	tr	-	-
T7	Eugenol	1353	1356	0.7	0.6	-
T8	α-Copaeno	1377	1376	-	tr	tr
T9	β-Cubebeno	1390	1390	tr	-	-
T10	β-Cariofileno	1420	1418	-	0.8	-
T11	(E)-β-Farneseno	1459	1458	3.2	24.8	-
T12	Alloaromadendreno	1462	1461	-	0.4	-
T13	γ-Gurjuneno	1471	1473	-	t	-
T14	Germacreno D	1481	1480	1.7	2.6	-
T15	Eremofileno	1489	-	-	0.8	-
T16	epi-Cubebol	1494	1493	0.5	-	0.2
T17	Biciclogermacreno	1496	1494	2.1	12.5	-
T18	Cubebol	1515	1514	39.1	tr	1.3
T19	δ-Cadineno	1524	1524	1.4	0.9	0.5
T20	Cadina-1,4-dieno	1533	1532	0.7	-	-
T21	NI	1533	-	-	3.6	-
T22	Elemol	1550	1549	-	1.7	1.1
T23	(E)-Nerolidol	1564	1564	-	-	0.3
T24	Germacreno D-4-ol	1576	1574	45.1	41.8	1.2
T25	Espatuleno	1576	1576	-	-	0.9
T26	NI	1583	-	-	-	0.9
T27	Viridiflorol	1589	1590	0.8	-	-
T28	NI	1597	-	-	-	0.5
T29	2,6-Dimetoxi-4-(2-propenil)fenol	1602	-	-	2.0	-
T30	β-Oplopenona	1608	1606	-	-	0.2
T31	1-epi-Cubenol	1628	1627	0.7	-	-
T32	epi-α-Cadinol	1641	1640	0.8	-	0.9
T33	NI	1646	-	-	-	0.6
T34	β-Eudesmol	1650	1649	-	-	0.9
T35	α-Cadinol	1655	1653	0.9	0.5	1.5
T36	Hediciariol?	1671	-	-	1.5	0.4
T37	neo-Cedran-5-ol ?	1677	1677	-	-	0.3
T38	NI	1683	-	-	-	0.8
T39	NI	1689	-	-	-	1.2
T40	NI	1695	-	-	-	1.1
T41	NI	1706	-	-	-	0.9
T42	14-OH-α-Humuleno ?	1714	1709	-	-	0.4
T43	NI	1730	-	-	-	1.6
T44	NI	1744	-	-	-	19.0
T45	NI	1751	-	-	-	0.3
T46	NI	1754	-	-	-	0.5
T47	NI	1762	-	-	-	0.5
T48	NI	1775	-	-	-	1.4
T49	β-Bisabolol ?	1785	1786	-	-	0.4

Compostos		I_R^c	I_R^{lit}	<i>T. rubella</i>	<i>T. amazonica</i>	<i>T. aff. grata</i>	<i>T. acutiflora</i>
T50	Nootkatona	1803	1800	-	6.0	-	-
T51	NI	1808	-	-	-	9.5	-
T52	NI	1818	-	-	-	1.9	-
T53	NI	1831	1832	-	-	9.3	-
T54	NI	1838	-	-	-	2.0	-
T55	NI	1849	-	-	-	0.3	-
T56	NI	1858	-	-	-	3.0	-
T57	NI	1870	-	-	-	1.2	-
T58	NI	1881	-	-	-	1.6	-
T59	NI	1892	-	-	-	1.5	-
T60	NI	1897	-	-	-	2.7	-
T61	NI	1901	-	-	-	2.0	-
T62	NI	1907	-	-	-	0.5	-
T63	NI	1916	-	-	-	0.5	-
T64	NI	1933	-	-	-	0.4	-
T65	NI	1940	-	-	-	0.5	-
T66	NI	1962	-	-	-	3.2	-
T67	NI	1971	-	-	-	1.8	-
T68	NI	1983	-	-	-	1.3	-
T69	Eicosano	2000	2000	-	-	-	tr
T70	NI	2007	-	-	-	1.4	-
T71	Acetato de haxadecila	2008	2009	-	-	-	tr
T72	NI	2013	-	-	-	1.6	-
T73	NI	2030	-	-	-	0.4	-
T74	NI	2043	-	-	-	0.4	-
T75	NI	2057	-	-	-	0.5	-
T76	Diidrofitol	2078	-	-	-	-	91.6
T77	Heneicosano	2100	2100	-	-	-	1.7
T78	NI	2139	-	-	-	0.7	-
T79	Docosano	2200	2200	-	-	-	2.3
T80	Tricosano	2300	2300	-	-	-	2.3
T81	Tetracosano	2400	2400	-	-	-	2.1
Total				97.5	98.8	94.5	100.0

I_R^c = Índice de retenção calculado¹¹², I_R^{lit} = Índice de retenção da literatura¹¹³, NI=Não Identificado, tr= traços

¹¹² Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J. *J. Chromatog.*, 1963, **11**, 463.

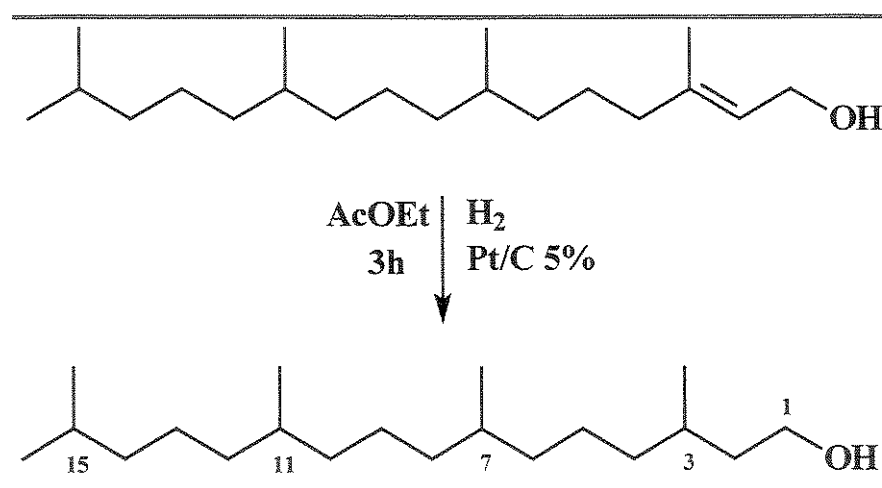
¹¹³ Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing, Illinois, 1995.

A análise dos óleos das 4 espécies de *Tovomita* revelaram que os principais constituintes são álcoois terpenoídicos. O óleo de *Tovomita rubella* Planch. & Triana masculina mostrou que numa mistura com cerca de 30 componentes sesquiterpênicos, apenas dois componentes, Cubebol (39,1%) (T18) e Germacreno D-4-ol (T24) (45,0%), contribuem com 84,2% do total do óleo. O álcool sesquiterpênico Germacreno D-4-ol (T24) é novamente o principal composto (41,8 %) do óleo de *T. amazônica*, mas ao contrário de *T. rubella*, este óleo contém uma maior variedade de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e também vários constituintes aromáticos minoritários, incluindo o indol (0,9%) (T3) e o eugenol (0,6%) (T7). Além de poucos hidrocarbonetos de cadeia longa, o único terpeno presente em *T. acutiflora* é o Diidrofitol (91,6%) (T76) e sua identificação foi obtida através de co-injeção com padrão sintético, cujos dados espectroscópicos obtidos através de EM, RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 90 e 135° (E1-E4) estão de acordo com os dados descritos na literatura^{114, 115}. Este padrão sintético foi obtido através de hidrogenação catalítica de uma amostra de fitol comercial (mistura 2:1 dos isômeros *E:Z*) (Esquema 2) como uma mistura de epímeros (3*R*/3*S*). De acordo com dados da literatura¹¹⁶, os produtos da hidrogenação catalítica dos isômeros *E* e *Z* são, respectivamente, 3*R* e 3*S*, mas como os dados espectroscópicos de RMN para os dois epímeros são idênticos torna-se inviável a distinção dos mesmos. Uma outra alternativa para diferenciá-los seria através de CG, mas relatos da literatura^{114, 117} nos alertaram para a complexidade do processo, o qual requer a utilização de derivações com auxiliares quirais, bem como o uso de colunas com fase estacionária específica, as quais não dispúnhamos. Nossas tentativas de separação dos compostos através de cromatografia em coluna ou em camada preparativa impregnada com 5% AgNO₃ também não lograram êxito e, portanto, decidimos não prosseguir com esta investigação, uma vez que a separação destes compostos não poderia nos auxiliar na investigação da estereoquímica absoluta do produto natural, pois a quantidade da amostra natural era insuficiente para derivações com auxiliares quirais, o que inviabiliza sua determinação.

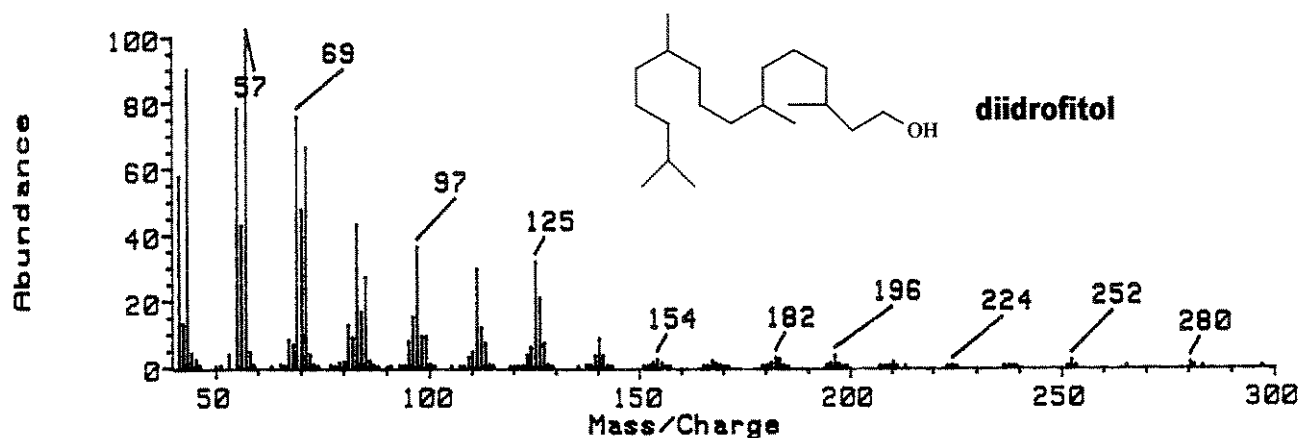
¹¹⁴ Jung, M.E.; Liu, C.-Y. *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 5446.

¹¹⁵ Heathcock, C.; Finkelstein, B.L.; Jarvi, E.T.; Radel, P.A. *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 1922.

¹¹⁶ Sita, L. R. *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 5285.

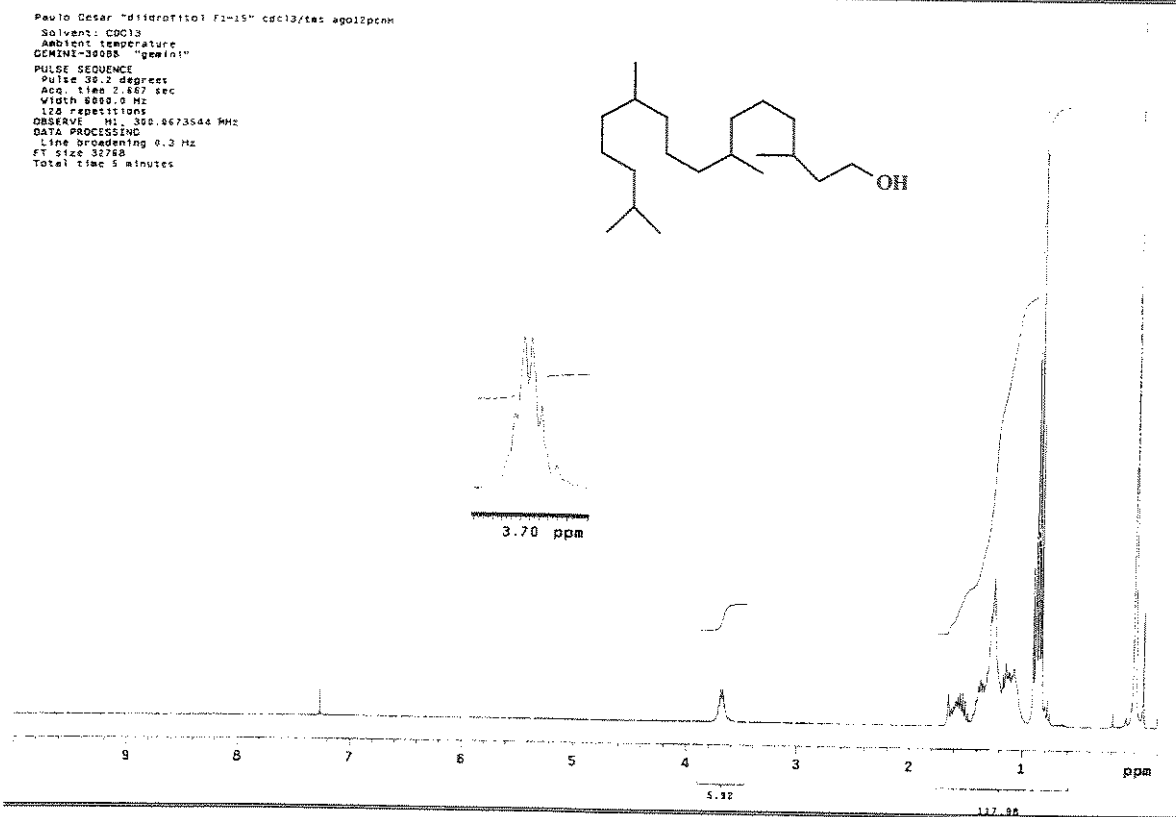


Esquema 2. Preparação do diidrofitol a partir da reação de hidrogenação catalítica do fitol comercial.

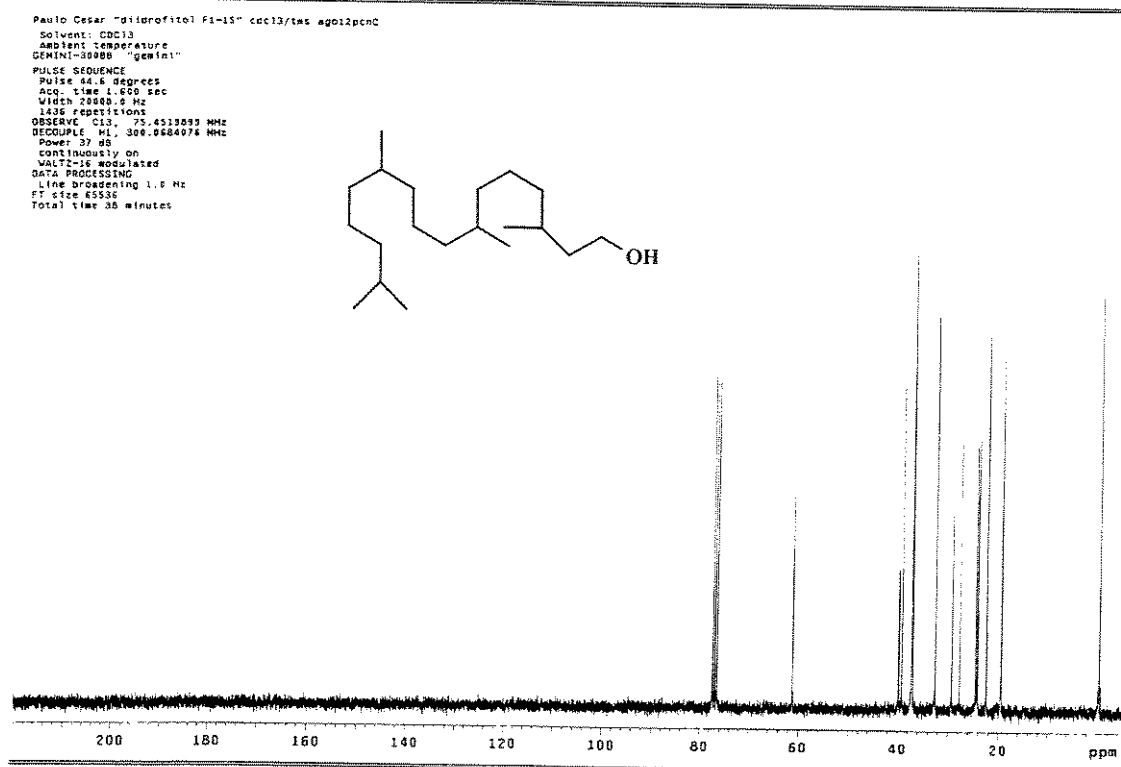


E1: Espectro de massas (IE, 70 eV) do 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecanol, diidrofitol (T76).

¹¹⁷ Rowland, S.J.; Maxwell, J.R. *J. Chromatog. Sci.*, 1983, **21**, 298.

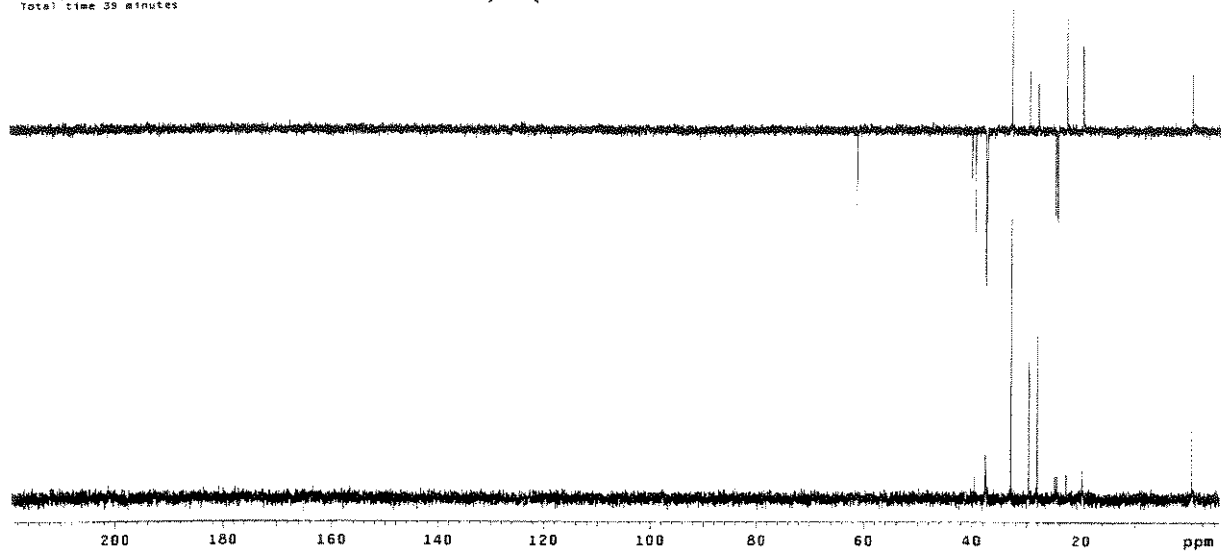
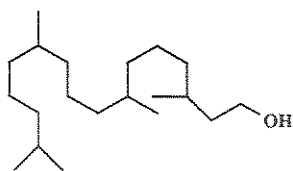


E2: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecanol (T76).



E3: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecanol (T76).

Paulo Cesar "diidrofitol f1-15" cdc13/tes agol2pcnd
 Solvent: cdc13
 Ambient temperature
 GEMINI-30000 "gemini"
 PULSE SEQUENCE: dept
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.600 sec
 Width 20000.0 Hz
 448 repetitions
 OBSERVE C13, 75.4519658 MHz
 DECOUPLE H1, 300.9504676 MHz
 Power 37 dB
 on during acquisition
 off during delay
 VOLT2-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 38 minutes



E4: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90 e 135°) (75,45 MHz, CDCl_3) do diidrofitol (T76).

O óleo de *Tovomita* aff. *grata* também foi investigado (Figura 36) e apresentou *ca.* de 70 compostos sendo 3 constituintes majoritários (37,8% do total do óleo) (**T43**, **T51** e **T53**) possuindo espectros de massas similares a alguns terpenos oxigenados da literatura¹¹⁸ (Figura 38), mas os índices de retenção relativos não foram compatíveis. Um outro aspecto deste óleo é que a maioria dos constituintes (*ca.* 80,0% do total) possui índices de retenção e espectros de massas compatíveis com sesquiterpenos mono e di-oxigenados. Embora as estruturas dos principais constituintes deste óleo não tenha sido determinada, pôde-se claramente observar com estas análises que os óleos das 4 espécies investigadas possuem diferenças óbvias em sua composição química, o que na nossa visão, está de acordo com a idéia de uma atração seletiva de abelhas euglossini.

Baseado no fato de que um derivado de hexadecanol atrai machos de abelhas euglossine^{119, 120}, nós sugerimos que 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecanol (diidrofitol, **T76**) seja o responsável pela atração do polinizador, macho de *Euglossa* sp., em *Tovomita acutiflora*, embora não possamos afirmar qual dos 8 possíveis isômeros está envolvido nesta interação.

¹¹⁸ Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing, Illinois, 1995.

¹¹⁹ Whitten, W.M.; Young, A.M.; Stern, D.L. *J. Chem. Ecol.*, 1993, **19**, 3017.

¹²⁰ Whitten, M.W.; Young, A.M.; Williams, N.H. *J. Chem. Ecol.*, 1989, **15**, 1285.

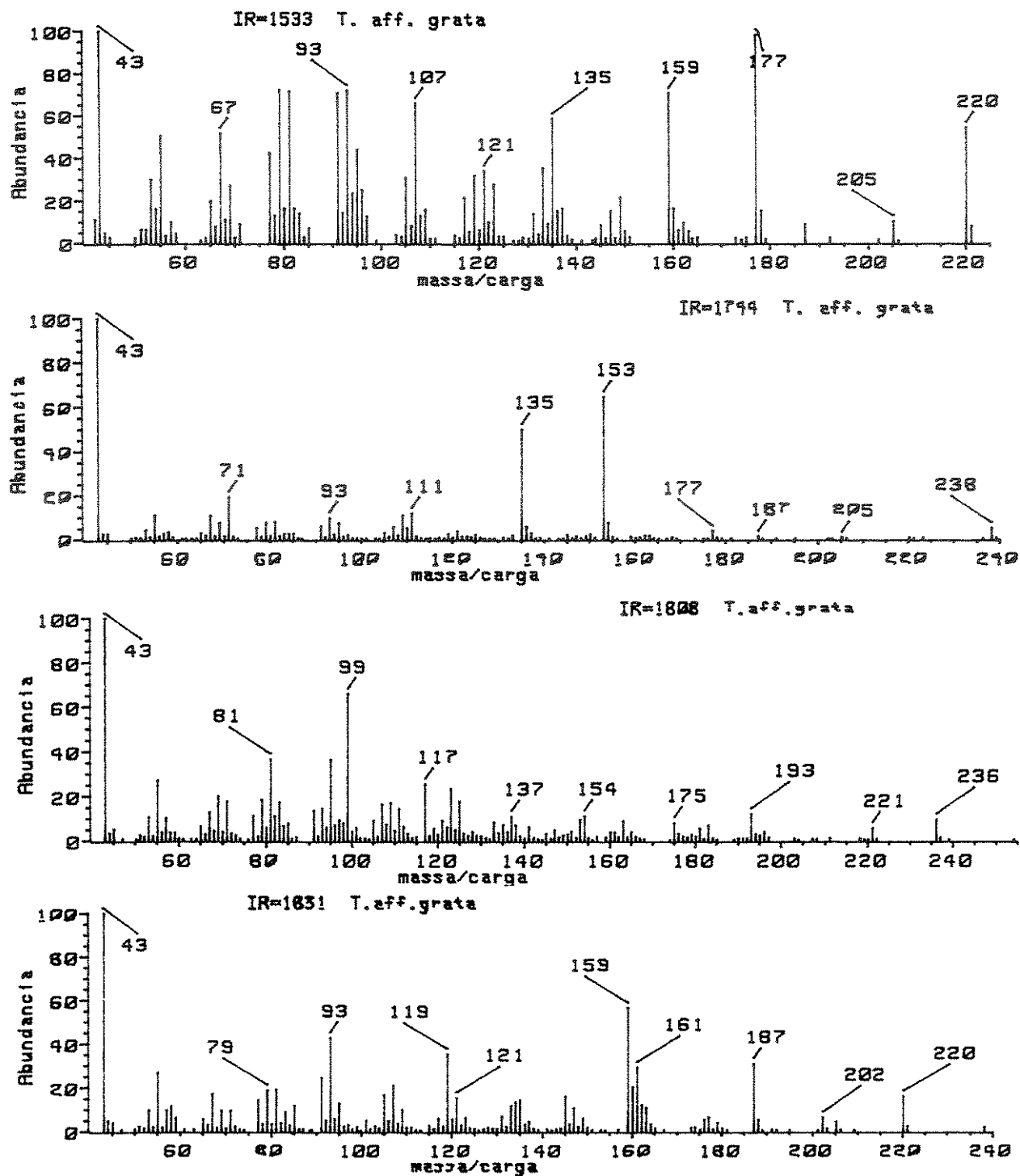


Figura 38. Espectros de massas dos compostos majoritários com $I_R=1533$ (T21), $I_R=1744$ (T43), $I_R=1808$ (T51) e $I_R=1831$ (T53) encontrados em *Tovomita aff. grata*.

4.4 Conclusões

Nossas observações das visitas de machos de abelhas euglossine em flores de *Tovomita macrophylla* para coletar óleos aromáticos representam o primeiro caso reportado para a família Guttiferae e, além disso, a morfologia floral e o comportamento das abelhas não deixam dúvidas que elas são polinizadores efetivos. A diversidade significativa dos perfis de distribuição molecular e estrutural na composição química destes óleos sugere que eles possam atrair diferentes espécies de abelhas machos de euglossine, e assim impedir a polinização cruzada interespecífica.

Parte 5

*Análises de voláteis
por CG/EM em suco
de laranja industrial
infectado por Alicyclobacillus spp.*

5. Análises de voláteis por CG/EM em suco de laranja industrial infectado por *Alicyclobacillus* spp.[£]

5.1 Considerações gerais

Suco de laranja é um dos sucos de fruta mais importantes consumido mundialmente e produzido em larga escala no Brasil¹²¹. Somente o estado de São Paulo, maior produtor mundial, é responsável por 95% da exportação nacional¹²² (1.126.810 ton. de Suco de Laranja Concentrado e Congelado - SLCC — safra 1999/2000) sendo a União Européia seu maior consumidor (725.361 ton.)¹²³. O desenvolvimento ocasional de compostos voláteis indesejáveis durante a armazenagem deste produto traz prejuízos para a indústria de sucos de laranja concentrados, congelados e reconstituídos. Análises microbiológicas revelaram que *Alicyclobacillus* foi o principal microrganismo responsável pela formação de substâncias com odor desagradável nos sucos de laranja durante os verões rigorosos de 1994 e 1995 na Europa¹²⁴. Estes eventos despertaram a consciência mundial sobre a existência destes organismos e também a preocupação dos produtores de suco de laranja e companhias de empacotamento para a detecção de bacilos acidotermofílicos em seus produtos.

O primeiro relato da existência destes microrganismos foi feita por Uchino & Doi (1967) com a detecção de bactérias aeróbicas, acidotermofílicas e formadoras de esporos a partir de fontes térmicas no Japão¹²⁵. Estes pesquisadores classificaram estas bactérias como *Bacillus coagulans*, pois seus estudos rudimentares mostraram similaridades entre os microrganismos. Em 1971, Darland & Brock reconheceram que o microrganismo em questão era, de fato, totalmente diferente de *B. coagulans* e após estudos extensos com

[£] Trabalho realizado em colaboração com Edna H. Azuma e Prof. Dr. Fumio Yokoya (Fundação André Tosello-Campinas-SP)

¹²¹ <http://www.fred.ifas.ufl.edu/citrus/trend795.html>

¹²² Fonte: Paranacitrus. <http://www.paranacitrus.com.br/>

¹²³ Fonte: Abecitrus. <http://www.abecitrus.com.br>

¹²⁴ Pinhatti, M.E.M.C.; Variane, S.; Eguchi, S.Y.; Manfio, G.P. *Fruit Processing*, 1997, 7, 350.

¹²⁵ Uchino, F.; Doi, S. *Agric. Biol. Chem.*, 1967, 31, 817.

base no DNA, recomendaram a criação de uma nova espécie de *Bacillus*: aeróbica, formadora de esporos requerendo calor e ambientes ácidos denominada de *Bacillus acidocaldarius*.¹²⁶ Neste mesmo ano, de Rosa *et al.* descobriram que ácidos graxos incomuns, ácidos ω -cicloexânicos, faziam parte da membrana celular destas bactérias.¹²⁷ Em 1981, Hippchen *et al.* isolaram *B. acidocaldarius* de solos e mostraram que estes poderiam se proliferar também em ambientes não térmicos e neutros.¹²⁸ Posteriormente, em 1983, Poralla & König detectaram uma bactéria ácido-dependente, formadora de esporos e termo-resistente contendo ácido ω -cicloheptânico em vez de ácido ω -cicloexânico na membrana celular.¹²⁹ Conseqüentemente, um outro grupo de microrganismos foi reconhecido. Deinhard *et al.*, em 1987, concluíram suas pesquisas taxonômicas e classificaram estes microrganismos como duas novas espécies: *Bacillus acidocaldarius* e *B. cycloheptanicus*.¹³⁰ Em 1992, foi criado o novo gênero *Alicyclobacillus* baseado na presença de ácidos ω -alicíclicos e nas evidências da sequência de DNA¹³¹ feitas por Wisotzkey *et al.* Atualmente, apenas 3 espécies de *Alicyclobacillus* são reconhecidas: *A. acidocaldarius*; *A. acidoterrestris* e *A. cycloheptanicus*, além de uma nova subespécie descoberta recentemente num vulcão na Antártica (*A. acidocaldarius* ssp. *rittmannii*)¹³².

As células de *A. acidoterrestris* possuem tamanho de 2,9-4,3 μ m em comprimento e 0,6-0,8 μ m em largura, esporulam muito rapidamente, geralmente dentro de 24 horas em líquidos, meios sólidos ou sucos. Crescem em temperaturas ótimas de 42-53°C podendo variar de 12°C até 80°C e com pH podendo variar de 2,5-6,0, sendo a faixa de pH ótimo entre 3,5-5,0. Os esporos de *A. acidoterrestris* são resistentes a aquecimento e sobrevivem ao tratamento de pasteurização dado a maioria dos sucos. A pasteurização, um tratamento de choque térmico, pode estimular a germinação dos esporos, bem como originá-los,

¹²⁶ Darland, G.; Brock, T.D. *J. Gen. Microbiol.*, 1971, **67**, 9.

¹²⁷ de Rosa, M.; Gambacorta, A.; Minale, L. *Chem. Comm.*, 1971, 1334.

¹²⁸ Hippchem, B.; Röhl, A.; Poralla, K. *Arch. Microbiol.*, 1981, **129**, 53.

¹²⁹ Poralla, K.; König, W.A. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1983, **16**, 303.

¹³⁰ Deinhard, G.; Blanz, P.; Poralla, K. *System. Appl. Microbiol.*, 1987, **10**, 47.

¹³¹ Wisotzkey, J.D.; Jurtshuk, P.; Fox, G.E.; Deinhard, G.; Poralla, K. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1992, **42**, 263.

¹³² Nicolaus, B.; Improtta, R.; Manca, M.C.; Lama, L.; Esposito, E.; Gambacorta, A. *Polar Biol.*, 1998, **19**, 133.

de choque térmico, pode estimular a germinação dos esporos, bem como originá-los, podendo gerar odores quando as condições de incubação são apropriadas. As condições para o desenvolvimento de odores ainda não foram claramente definidas, mas fatores como aquecimento brusco, temperatura de incubação e a disponibilidade de oxigênio parecem ser importantes. Para se ter uma idéia, os odores desagradáveis podem ser percebidos 24 horas após a incubação de frascos contendo sucos armazenados sob atmosfera de oxigênio a 45 °C.

Atualmente, *A. acidoterrestris* é a única espécie de *Alicyclobacillus* associada com a deterioração dos sucos e alguns grupos de pesquisa despendem esforços para encontrar soluções para este problema, tanto do ponto de vista do processamento industrial¹³³ quanto acadêmico, no intuito de achar respostas para a formação dos compostos responsáveis pelo odor desagradável nos sucos. Há controvérsias quanto aos prováveis responsáveis pelo odor, bem como o tipo de odor produzido: tipo “leite azedo” ou, segundo Jansen¹³⁴, a qual relatou que a deterioração não está associada com uma grande produção de gás ou ácido, mas sim com um odor desagradável forte do tipo “produto medicinal”, o qual se desenvolve esporadicamente nos recipientes dos produtos. No entanto, os resultados publicados até o momento não descrevem com clareza a metodologia utilizada para identificação destas substâncias, pois nenhuma análise química precisa foi efetuada^{135, 136}.

Compostos aromáticos como o 4-vinil-guaiacol (PVG) (Figura 39) e outros fenóis vinílicos são compostos que, em geral, contribuem para a formação de odores desagradáveis, mas que também podem compor aromas desejáveis de produtos alimentícios importantes¹³⁷. PVG foi o primeiro composto associado com o mau odor (odor de fruta velha ou podre) de sucos de laranja enlatados, impropriamente armazenado, juntamente com α -terpineol e 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona (DHMF, Furaneol®)¹³⁸. Particularmente, em sucos de laranja e uva armazenados, 4-vinil-guaiacol

¹³³ Silva, F.M.; Gibbs, P.; Vieira, M.C.; Silva, C.L.M. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **51**, 95.

¹³⁴ Jansen, N. *Food Australia*, 1999, **51**, 33.

¹³⁵ Pettipher, G.L.; Osmundson, M.E. *Food Australia*, 2000, **52**, 293.

¹³⁶ Pettipher, G.L.; Osmundson, M.E.; Murphy, J.M. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1997, **24**, 185.

¹³⁷ Peleg, H.; Naim, M.; Zehavi, U.; Rouseff, R.L.; Nagy, S. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 764.

¹³⁸ Tatum, J.H.; Nagy, S.; Berry, R.E. *J. Food Sci.*, 1975, **40**, 707.

(PVG) pode ser originado a partir da descarboxilação do ácido ferúlico presente nos sucos, tanto por meios abióticos quanto por espécies de leveduras (Esquema 3), como mostrou Sutherland *et al.* em 1995, quando testava a descarboxilação do ácido ferúlico com linhagens de *Rhodotorula* sp., *Candida lambica*, *Trichosporon pullans* e *Candida intermedia* encontradas em SLCC, sendo esta uma das primeiras tentativas de explicação para a origem deste mau cheiro em sucos de frutas cítricas mal armazenadas¹³⁹.

Atualmente, as principais suspeitas recaem sobre outras duas substâncias: 2,6-dibromo-fenol e o guaiacol¹⁴⁰ (Figura 39). Yamazaki *et al.*, em 1996, apontaram a produção de guaiacol pelo microrganismo como a causa da deterioração em várias bebidas ácidas, descrevendo o mau odor como do tipo “fermentado” associando-o ao odor de “leite azedo”¹⁴¹. Um ano depois, Pettipher *et al.* também indicaram o guaiacol e outros compostos como responsáveis pela produção do odor desagradável¹⁴². Porém, Borlinghaus & Engel, neste mesmo ano (1997), associaram o mau cheiro à produção de 2,6-dibromo-fenol¹⁴³. É importante mencionar que os eventos de deterioração associados ao 2,6-dibromo-fenol foram registrados apenas em sucos de maçã, abacaxi e maracujá e não em sucos de laranja, onde o guaiacol é formado em maiores quantidades.

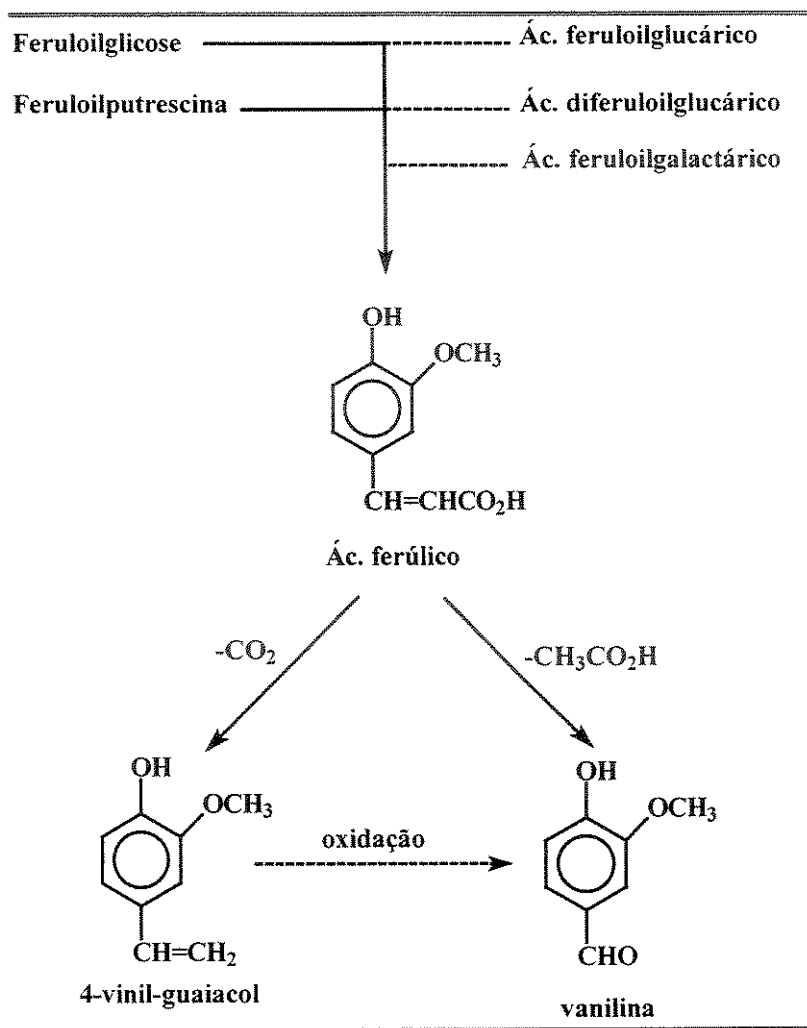
¹³⁹ Sutherland, J.B.; Tanner, L.A.; Jennifer, D.M.; Freeman, J.P.; Deck, J.; Williams, A.J. *J. Food Protection*, 1985, **58**, 1260.

¹⁴⁰ Jansen, N. *Food Australia*, 1999, **51**, 33. *ibid*, 2000, **52**, 282.

¹⁴¹ Yamazaki, K.; Tekuda, H.; Shinano, H. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1996, **60**, 543.

¹⁴² Pettipher, G.L.; Osmundson, M.E.; Murphy, J.M. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1997, **24**, 185.

¹⁴³ Borlinghaus, A.; Engel, R. *Fruit Processing*, 1997, **7/97**, 262.



Esquema 3. Proposta de formação do 4-vinil-guaiacol.

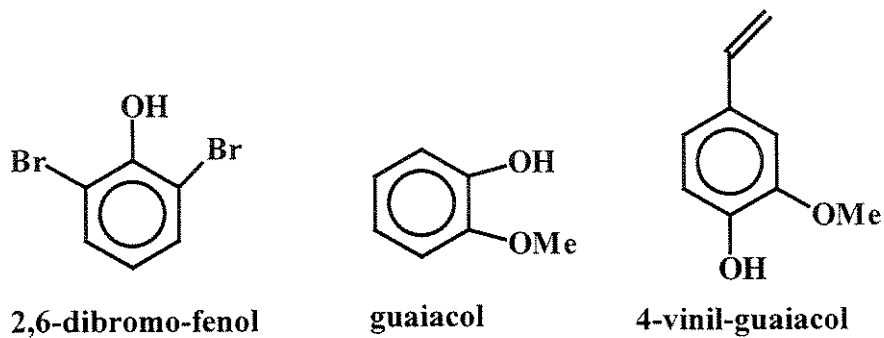


Figura 39. Principais compostos associados ao mau odor em sucos infectados.

Geralmente, percebe-se o mau cheiro em suspensões de células com níveis de 10^5 UFC/mL ou acima (UFC = unidade formadora de colônia) e o guaiacol é detectado em quantidades de 1-100 ppb¹⁴⁴. Apesar da habilidade de sobreviver à pasteurização, *A. acidoterrestris* não cresce em todos os tipos de meio. Geralmente, é o que ocorre em sucos concentrados onde sobrevive, principalmente, como esporos. No entanto, quando o suco concentrado é diluído, rapidamente *A. acidoterrestris* inicia sua multiplicação. Um precursor em potencial para a produção do guaiacol é o aminoácido tirosina, presente tanto em sucos de laranja (3,4-13,5 µg/mL de suco) quanto em outros sucos como os sucos de maçã (4,1 µg de tirosina/mL de suco). Se as condições são adequadas para crescimento, estas quantidades de tirosina parecem ser suficientes para permitir a síntese de quantidades apreciáveis de guaiacol e, portanto, da formação de odores desagradáveis.

Os resultados das pesquisas realizadas na Fundação André Tosello (Eguchi *et al.*, 1999) publicados recentemente¹⁴⁵ revelaram que das 16 linhagens brasileiras de *Alicyclobacillus* testadas, apenas duas produziram odores desagradáveis e seis não cresceram em suco de laranja. O que não se sabe ainda é se isto também se aplica às linhagens isoladas em outras partes do mundo, uma vez que testes bioquímicos indicaram que existem algumas variações entre as linhagens deste microrganismo.

Algumas soluções para o problema de deterioração nos sucos de frutas por *Alicyclobacillus* foram propostas e uma delas ocorreria através da refrigeração dos sucos, uma vez que estes microrganismos não crescem em temperaturas abaixo de 20°C, no entanto, como os sucos pasteurizados não são distribuídos refrigerados, o processo de resfriamento destes produtos significaria um aumento considerável nos custos. Uma solução alternativa seria aumentar a temperatura de pasteurização até a região de esterilização, isto é, acima de 100°C, em detrimento da qualidade. Há ainda uma outra possibilidade para limpeza dos sucos de frutas usando uma filtração para remover os esporos de *Alicyclobacillus* dos produtos.

¹⁴⁴ Pettipher, G.L.; Osmundson, M.E. *Food Australia*, 2000, **52**, 293.

¹⁴⁵ Eguchi, S.Y.; Manfio, G.P.; Pinhatti, M.E.; Azuma, E.; Variane, S.F. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice: Detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. *ABECitrus*, São Paulo, March, 1999.

Estes aspectos nos mostram a importância de se compreender melhor todo o processo de deterioração por *Alicyclobacillus* para encontrar uma solução viável para o problema.

5.2 Objetivos

Neste sentido, o principal objetivo do presente estudo foi determinar os microrganismos responsáveis por este fenômeno através da análise dos ácidos graxos das membranas celulares, bem como os constituintes voláteis presentes nos sucos de laranja deteriorados responsáveis pela adulteração do aroma.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Identificação dos microrganismos

A nossa primeira preocupação foi identificar os microrganismos responsáveis pela deterioração dos sucos. Esta etapa é tão importante quanto a análise química dos voláteis produzidos pelos sucos, sendo fundamental para assegurarmos quais os organismos responsáveis pela formação do mau odor.

Os organismos vivos, de acordo com a estrutura celular, podem ser divididos em procariontes e eucariontes, mas num contexto evolucionário baseado em estudos de sequenciamento genético do RNA, foram divididos em três grupos chamados de *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*, sendo as duas primeiras procariontes e a última eucarionte na sua estrutura celular. Acredita-se que estes três grupos possam ter sido originados a partir de um organismo precursor comum, o “ancestral universal”¹⁴⁶ (Figura 40).

¹⁴⁶ Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. *Brock biology of microorganisms*. 9th Ed. Prentice Hall, New Jersey, 2000, p. 10.

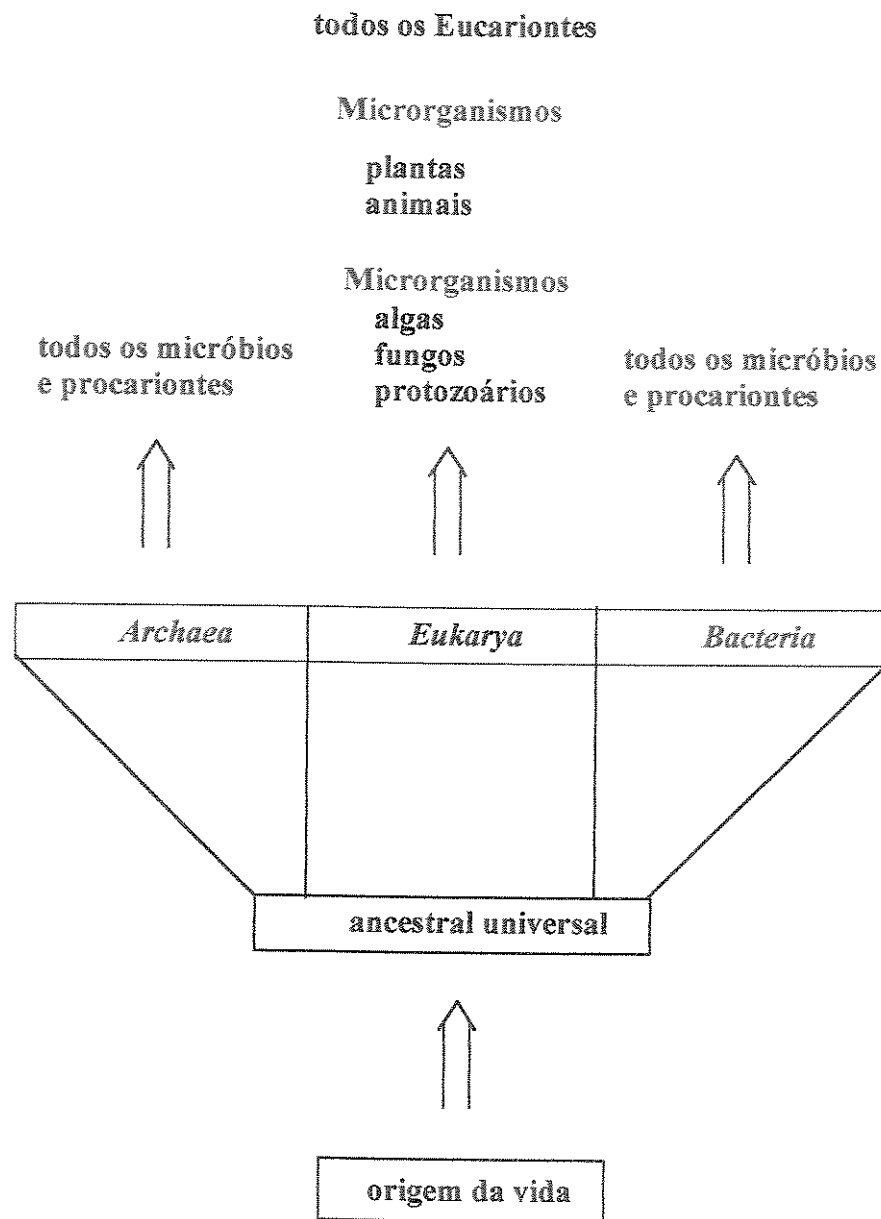


Figura 40. Diagrama mostrando a origem da vida.

Por vários motivos, torna-se importante identificar e classificar os microrganismos e para este fim, tanto as características genéticas quanto as não genéticas são atualmente empregadas. Após uma análise detalhada tanto da função como da estrutura de um microrganismo, o que inclui seu metabolismo, comportamento e outras propriedades importantes, é possível se reconhecer um conjunto de caracteres intrínsecos àquele organismo. Por exemplo, os organismos procariontes chamados de *Archaea* são células incapazes de sobreviver em exposição ao ar (anaeróbicos), prosperam sob condições de crescimento anormais, habitando o que nós humanos consideramos ambientes extremos, ou seja, fontes quentes (temperaturas acima do ponto de ebulição da água), águas congeladas como o mar gelado da Antártica, ambientes aquosos extremamente salinos, além de solos e águas altamente ácidos ou alcalinos e, atualmente, são estas as espécies que definem os limites de tolerância biológica para os extremos químicos e fisiológicos. Uma vez definido o organismo pelo tal conjunto de características e identificada sua posição filogenética, pode ser dado um nome ao mesmo.

Uma outra maneira de se classificar microrganismos se dá através da determinação da composição química de sua membrana celular. Os lipídios são componentes importantes da estrutura da membrana das células de *Bacteria* e *Eukarya*, diferindo das outras macromoléculas, principalmente pela presença de ácidos graxos (Figura 41).

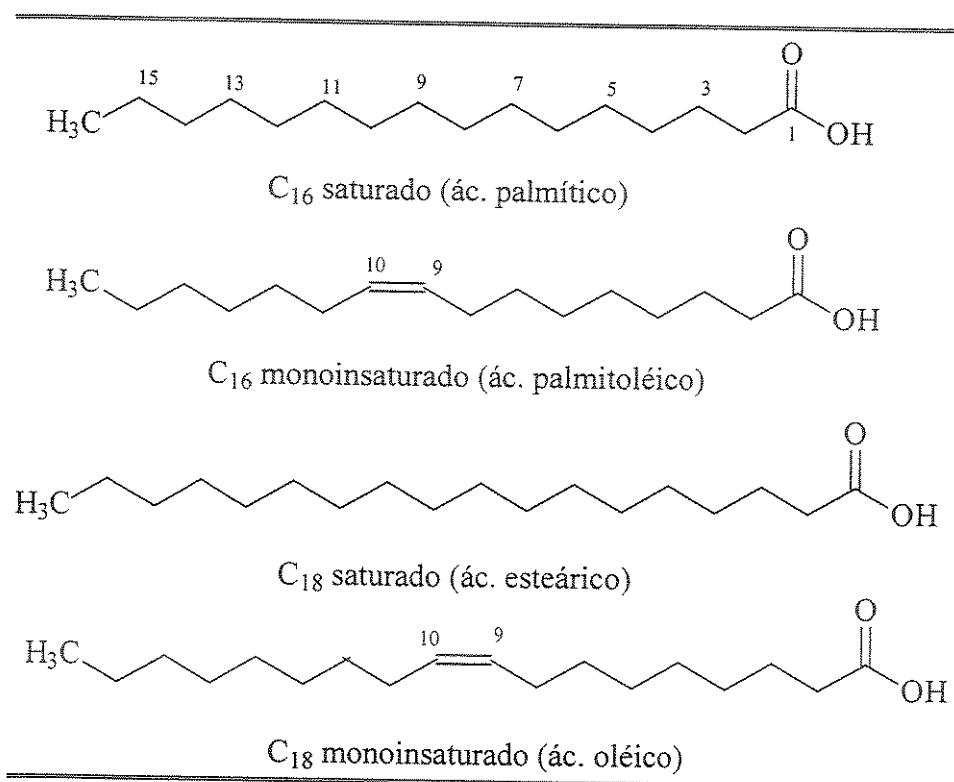


Figura 41. Principais ácidos graxos encontrados na membrana celular de *Bacteria* e *Eukarya*.

Os lipídios não estão ligados entre si através de ligações covalentes, em vez disso, no caso dos lipídios simples (gorduras), consistem de ácidos graxos ligados a um glicerol (álcool C_3), motivo pelo qual também são chamados de triglicerídeos (três moléculas de ácido graxo ligadas a uma molécula de glicerol) (Figura 42). No caso dos lipídios complexos, aqueles que possuem um grupo fosfato (chamados de fosfolipídios) (Figura 42) constituem uma classe muito importante de lipídios, pois fazem parte da estrutura geral da maioria das membranas biológicas (tipo bicamada fosfolipídica). A atuação como barreira para a difusão de substâncias dentro e fora da célula devido apresentarem tanto as propriedades de hidrofobicidade quanto de hidrofiliicidade, tornam os lipídios os componentes ideais para formação destas membranas.

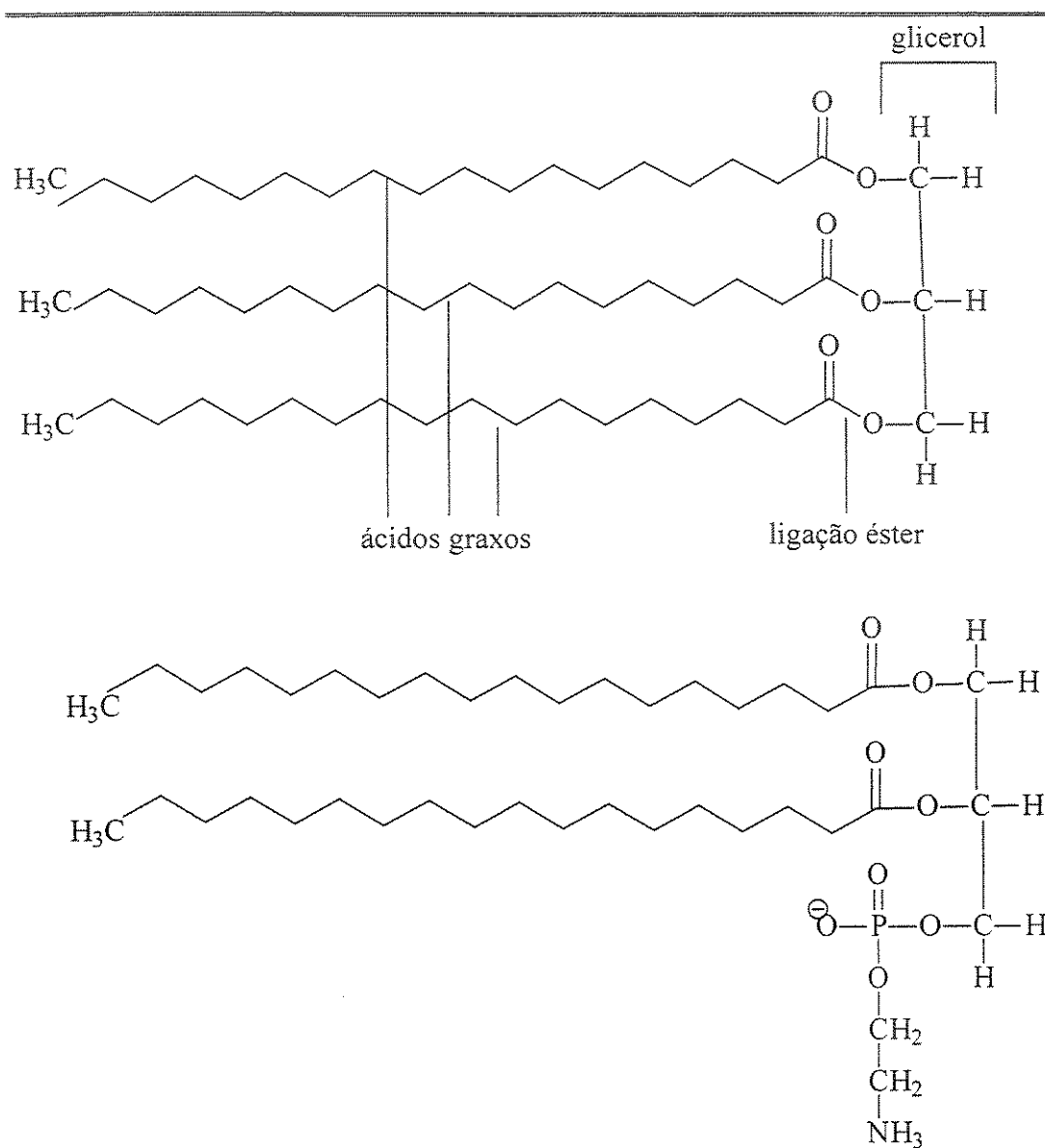


Figura 42. Principais tipos de lipídios encontrados na membrana celular das bactérias.

A principal diferença na composição química das membranas das células eucariontes e procariontes é a presença de esteróides nas membranas das células dos membros do primeiro grupo e ausência nos procariontes (exceto as bactérias metanotróficas). Uma outra particularidade química ocorre com os lipídios que constituem a membrana celular das bactérias tipo *Archaea*, pois diferente dos lipídios de *Bacteria* e *Eukarya* que possuem ligações do tipo éster entre o ácido graxo e o glicerol (Figura 43a), apresentam ligações etéreas entre o glicerol e suas cadeias laterais hidrofóbicas (Figura 43b). Além disso, as cadeias laterais hidrofóbicas são compostas por unidades repetidas da molécula de isopreno (Figura 43c) em vez de ácidos graxos, embora isto não altere a estrutura total da membrana, pois são mantidas as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas.

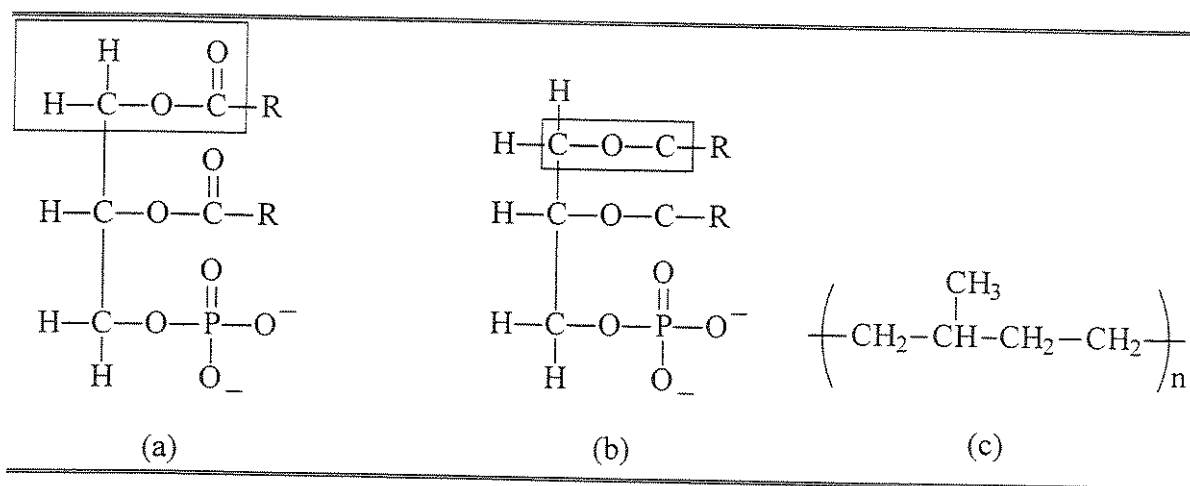


Figura 43. Principais tipos de ligações encontradas nos lipídios da membrana celular. a) éster acílico que é encontrado na maioria das bactérias b) ligação etérea presente no grupo *Archaea* c) unidade repetida derivada do isopreno encontrada na cadeia lateral dos lipídios de *Archaea*.

Desta forma, os ácidos graxos que são componentes básicos dos lipídios de todos os microrganismos, exceto nas bactérias do grupo *Archaea*, podem ser utilizados como marcadores taxonômicos devido sua distribuição descontínua nos diferentes grupos de microrganismos. Portanto, a análise dos componentes químicos da membrana celular através dos derivados metilados de ácidos graxos (EMAG = Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos) utilizando CG/EM é uma das metodologias mais difundidas para a classificação taxonômica de microrganismos^{147, 148}.

Como vimos, as bactérias podem ser divididas em 3 grupos de acordo com a composição lipídica de suas membranas¹⁴⁹. Um primeiro grupo, que abrange a maioria das bactérias, é caracterizado pela presença de ácidos graxos de cadeias lineares. O segundo grupo inclui bactérias cujas membranas consistem de ácidos graxos de cadeia ramificada e de ácidos graxos com alicíclicos. Este grupo contém cerca de 10% das espécies de bactérias, dentre as quais encontram-se os *Alicyclobacillus*. Já as bactérias do terceiro grupo possuem as membranas celulares compostas de éteres isoprenóides, incluindo-se aqui poucas espécies, sendo todas *Archaea*.

Os lipídios da membrana celular dos *Alicyclobacillus* são, portanto, caracterizados por ésteres derivados de ácidos graxos cíclicos, cujo grupo cíclico encontra-se no final da cadeia de carbonos, na posição “ ω ” (ômega). Taxonomicamente, os ácidos graxos ω -cicloexânicos e ω -cicloeptânicos são componentes característicos das espécies de *Alicyclobacillus* diferindo do perfil de ácidos graxos de outras espécies do gênero *Bacillus*, onde os ácidos graxos de cadeias ramificadas *iso* e *anteiso* são os componentes principais.

O perfil de ácidos graxos das espécies *Alicyclobacillus acidoterrestris* e *Alicyclobacillus acidocaldarius* são compostos, principalmente, de ácidos ω -cicloexânicos de cadeias C₁₇ e C₁₉ (11-cicloexilundecanóico e 13-cicloexiltridecanóico), representando 90% e 65% da membrana celular, respectivamente (Figura 44).

¹⁴⁷ Eder, K. *J. Chromatogr. B*, 1995, **671**, 113.

¹⁴⁸ Asselineau, C.; Asselineau, J. Fatty acids and complex lipids. In Odham, G.; Larsson, L.; Mårdh, P.-A. (Eds.). *Gas chromatography/ mass spectrometry: Applications in microbiology*. Plenum Press, New York, 1984, p. 57.

¹⁴⁹ Kaneda, T. *Microbiol. Reviews*, 1991, **55**, 288.

Alicyclobacillus cycloheptanicus é o único microrganismo descrito até agora que possui ácidos graxos cicloeptânicos, com comprimento da cadeia C₁₈ e C₂₀. Os ácidos ω -cicloeptilundecanóico, ω -cicloeptiltridecanóico e ω -cicloeptil- α -hidroxi-undecanóico compreendem cerca de 80% do total de ácidos graxos desta espécie. Segundo a literatura^{150, 151}, existem outros grupos de microrganismos, os quais, embora possuam ácidos graxos ω -cicloexânicos, são muito distintos dos *Alicyclobacillus* tanto fenotipicamente quanto em relação ao requerimento nutricional.

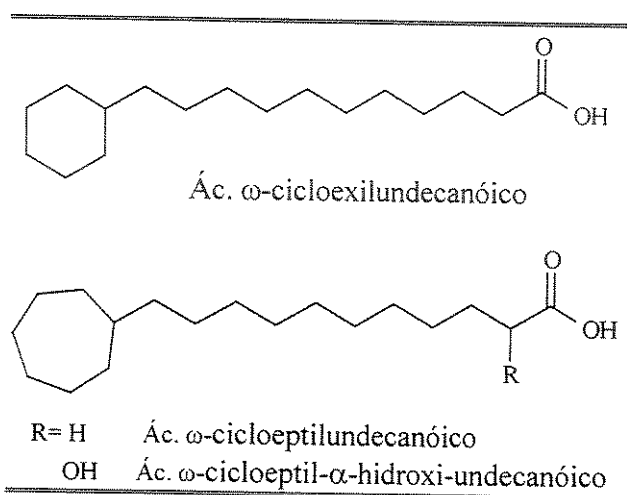


Figura 44. Principais ácidos graxos encontrados nas membranas celulares dos *Alicyclobacillus*.

Desta forma, a análise através de CG/EM das amostras de EMAG extraídos de 03 linhagens de *Alicyclobacillus* (CCT6280, CCT6281 e CCT4384) (Figura 45) apresentaram perfil similar ao de *Alicyclobacillus acidocaldarius* e *A. acidoterrestris*, ou seja, com presença de ácidos ω -cicloexilundecanóico e ω -cicloexiltridecanóico. Enquanto a linhagem CCT4382 apresentou perfil similar ao *A. cycloheptanicus*, com predomínio de ácidos ω -cicloeptilundecanóico e ω -cicloeptil- α -hidroxi-undecanóico, bem como presença de ác. ω -cicloeptildecanoico, ω -cicloeptildodecanoico e ω -cicloeptiltridecanoico¹⁵² (Figura 45). A linhagem CCT0199 revelou presença apenas de

¹⁵⁰ Kannenberg, E.; Blume, A.; Poralla, K. *FEBS lett.*, 1984, **172**, 331.

¹⁵¹ Kusano, K.; Yamada, H.; Niwa, M.; Yamasato, K. *J. Syst. Bacteriol.*, 1997, **47**, 825.

¹⁵² Moore, B.D.; Floss, H.G.; Poralla, K. *J. Nat. Prod.*, 1995, **58**, 590.

presença apenas de ácidos graxos ramificados *iso* e *anteiso* similar ao perfil da linhagem de referência *Bacillus coagulans* (Padrão, Figura 45). Estes resultados confirmaram que as linhagens utilizadas para deterioração dos sucos eram, de fato, *Alicyclobacillus*.

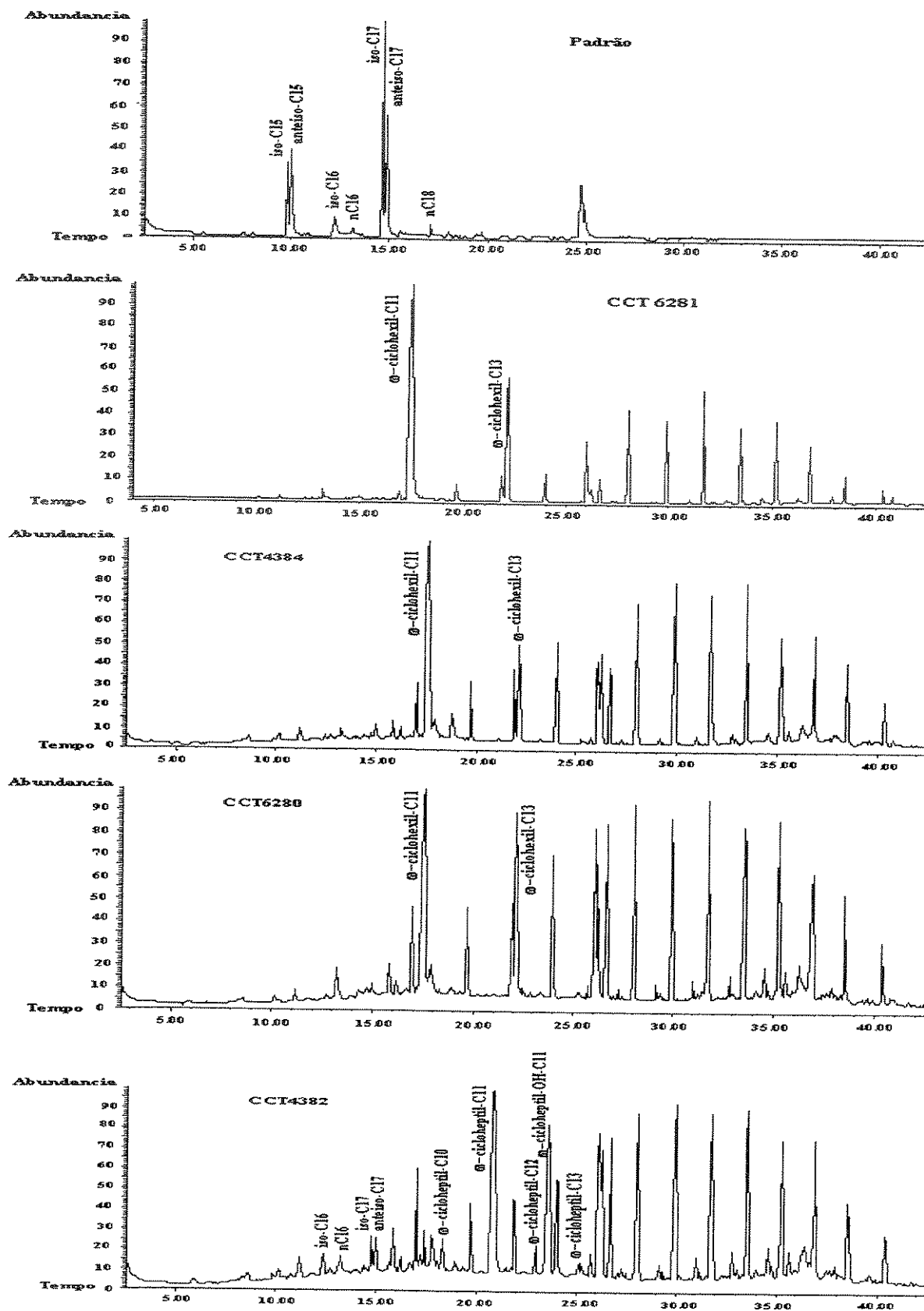


Figura 45. TIC (CG/EM: coluna DB-5 30m) dos EMAG obtidos a partir de *Alicyclobacillus* sp.

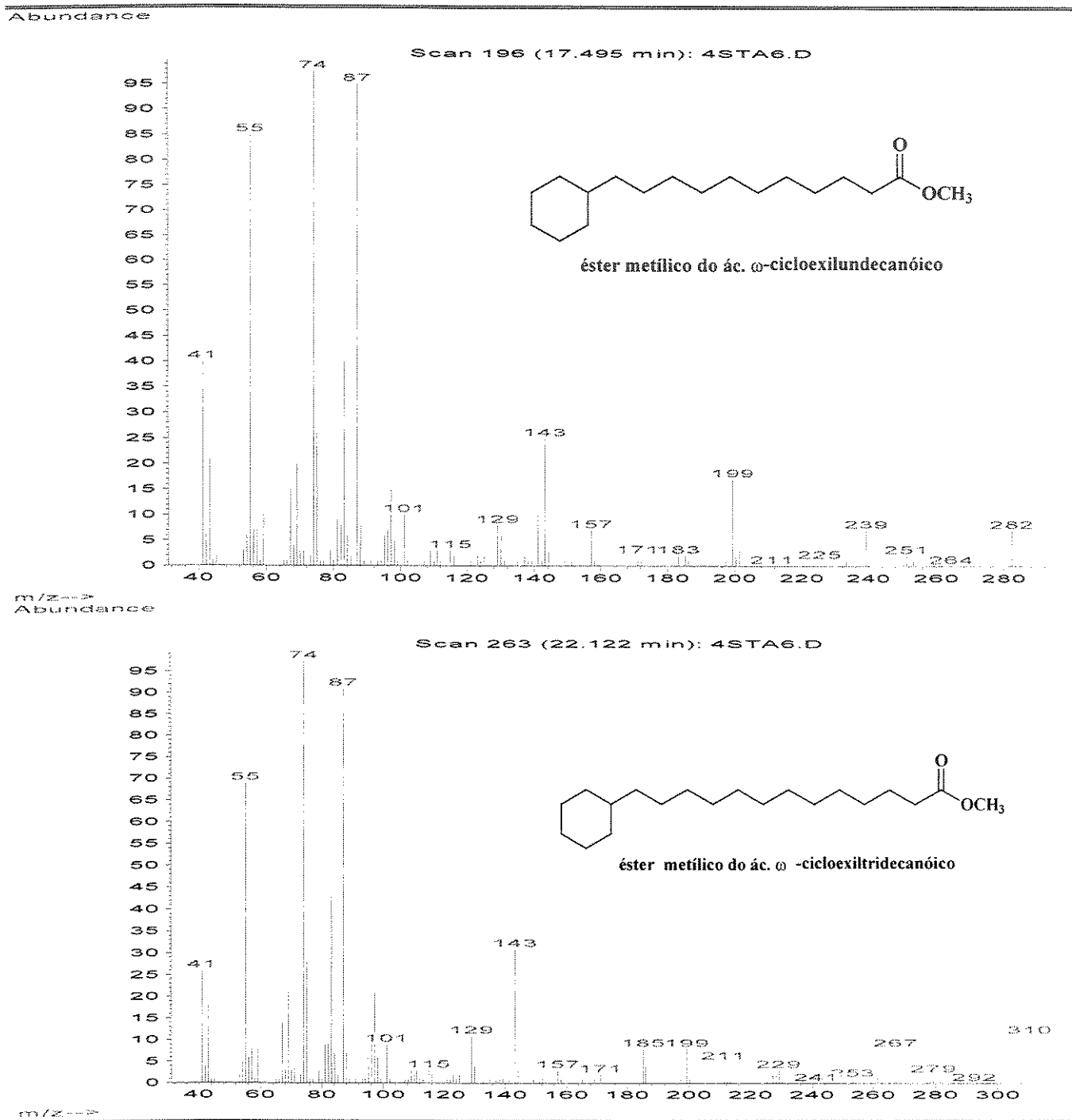


Figura 46. Espectros de massas (IE, 70ev) dos ésteres metílicos dos ácidos ω -cicloexilundecanóico e ω -cicloexiltridecanóico obtidos a partir da membrana celular dos *Alicyclobacillus*.

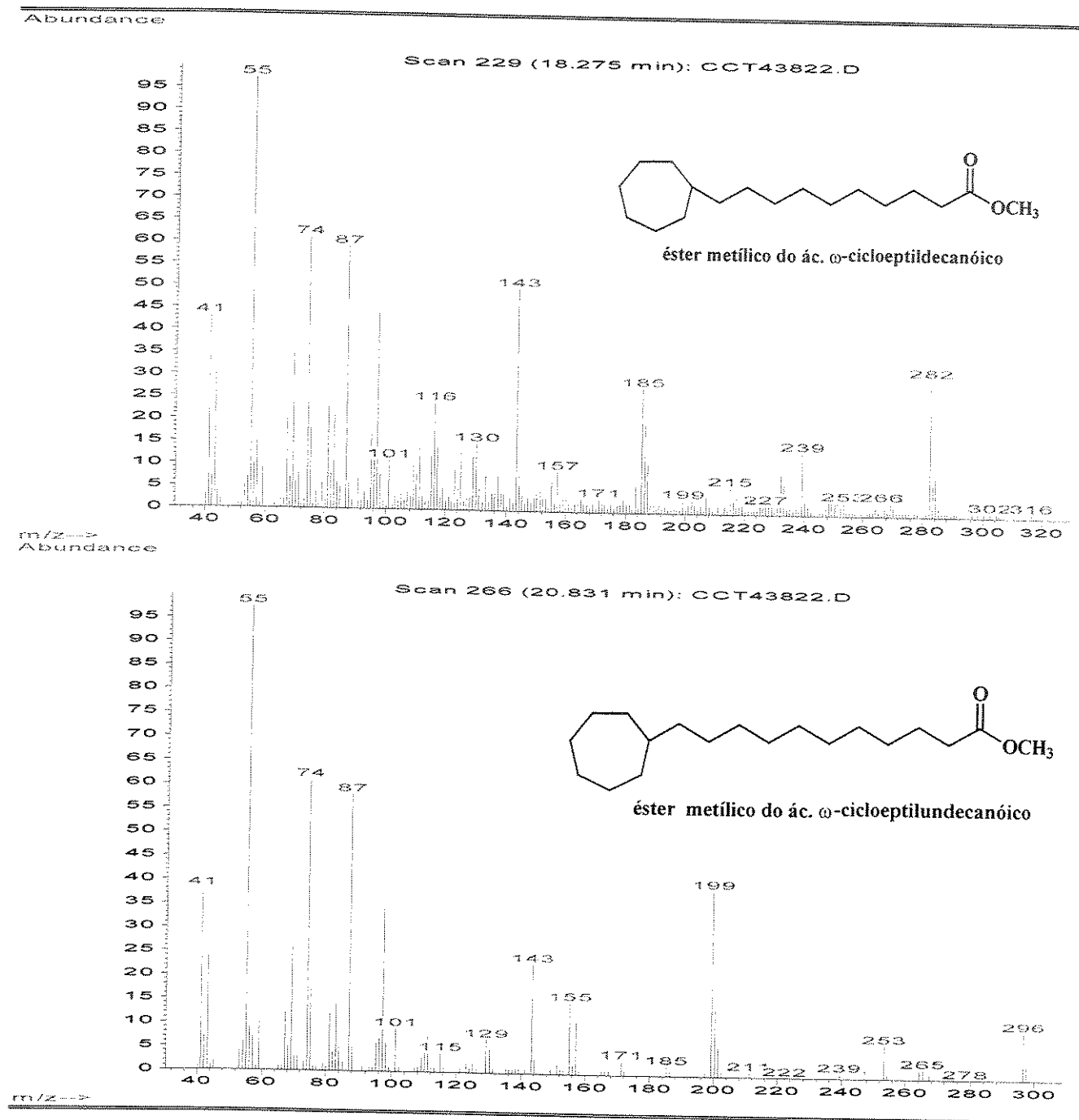


Figura 47. Espectros de massas (IE, 70ev) dos ésteres metílicos dos ácidos ω -cicloeptildecanoico e ω -cicloeptilundecanoico obtidos a partir da membrana celular dos *Alicyclobacillus*.

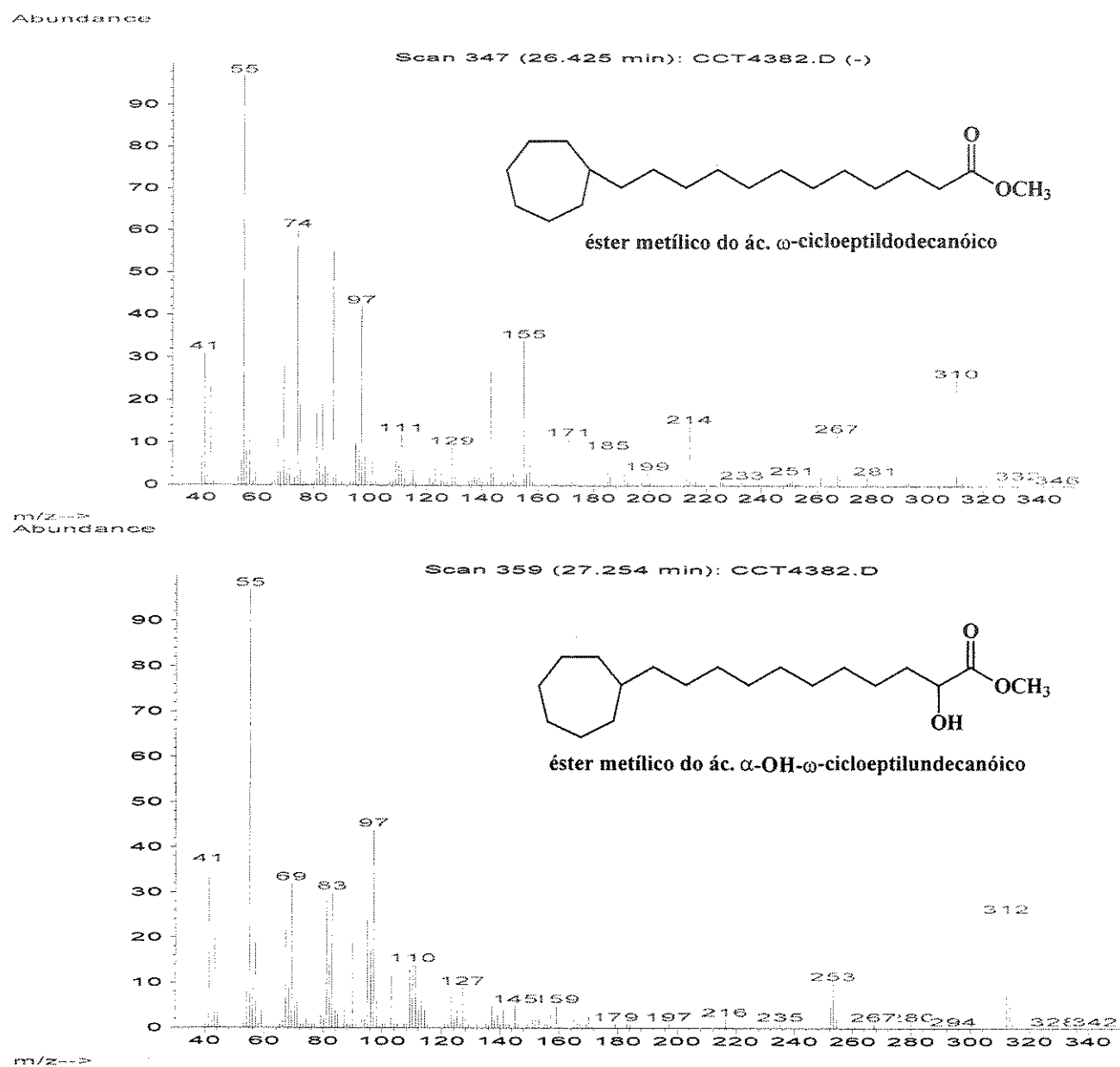


Figura 48. Espectros de massas (IE, 70ev) dos ésteres metílicos dos ácidos ω-cicloeptildodecanóico e α-OH-ω-cicloeptilundecanóico obtidos a partir da membrana celular dos *Alicyclobacillus*.

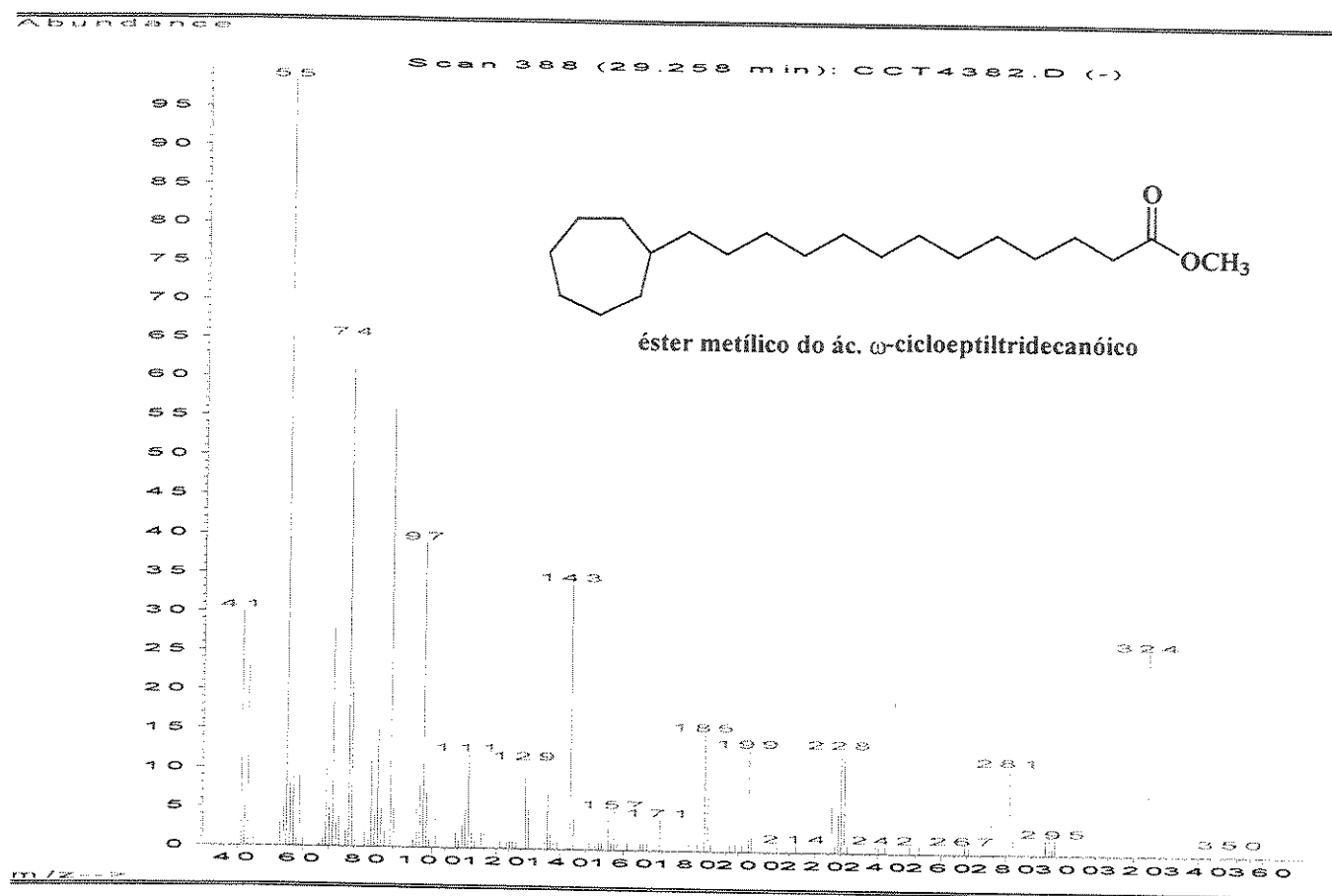


Figura 49. Espectro de massas (IE, 70ev) do éster metílico do ácido ω-cicloheptiltridecanóico obtido a partir da membrana celular dos *Alicyclobacillus*.

5.3.2 Análise dos sucos de laranja

Após a identificação dos microrganismos, buscou-se averiguar as condições propícias para o crescimento otimizado das bactérias, bem como determinar um método eficiente para a recuperação dos voláteis produzidos através de uma técnica convencional, a hidrodestilação¹⁵³; e uma técnica mais recente, livre de solvente, SPME^{154, 155}. Portanto, as análises dos voláteis foram simultaneamente efetuadas nas amostras de suco de laranja

¹⁵³ Sauri, E.; Nadal, I.; Alberola, J.; Sendra, J.M.; Izquierdo, L. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 1980, **20**, 220.

¹⁵⁴ Steffen, A.; Pawliszyn, J. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 2187.

¹⁵⁵ Jia, M.; Zhang, Q.H.; Min, D.B. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 2744.

fresco coletado diretamente do fabricante e nas amostras deterioradas obtidas de acordo com o procedimento abaixo¹⁵⁶:

Experimento I: Porções do suco (1:5), pasteurizado a 80°C por 5 min foram inoculadas com um conjunto de 3 linhagens de *Alicyclobacillus* com potencial deteriorante variando-se a concentração do inóculo (0, 10, 10² e 10³ UFC/mL) incubados a 37°C por 48 horas.

Experimento II: 20,0 mL de suco a 12° Brix, inoculado com um conjunto de 3 linhagens de *Alicyclobacillus* com potencial deteriorante a 10⁴ UFC/mL foi incubado a 42°C por 72 horas.

Nestes experimentos avaliamos as concentrações do inóculo, bem como temperatura e tempo de incubação com um mesmo conjunto de linhagens de *Alicyclobacillus*. Dos métodos usados para recuperar os voláteis dos sucos, a captura de voláteis com fibras cobertas com 30µm PDMS ou 85µm PA ou 75µm Carboxen-PDMS (SPME, Microextração em Fase Sólida) apresentou baixa reprodutibilidade, e os melhores resultados foram obtidos através da técnica de hidrodestilação seguida por extração com solvente orgânico.

Nestas análises de sucos de laranja contaminados com *Alicyclobacillus* foram detectados *ca.* 100 compostos através CG/EM (Tabela 4), mas apenas o experimento II mostrou uma diferença mais óbvia entre os voláteis dos sucos frescos e deteriorados obtidos por hidrodestilação (Figuras 50 e 51). Neste experimento foi possível observar que o ácido isovalérico (SL2, Tabela 4), o ácido 2-metil-butírico (SL4, Tabela 4), o 3-hidroxi-hexanoato de etila (SL17, Tabela 4) e dois compostos (co-eluídos) não identificados (SL68 e SL68', Tabela 4) (Figuras 50 e 51), cujos espectros de massas apresentam padrão de fragmentação compatível com o de derivados aromáticos (Figura 52), foram detectados apenas no suco deteriorado. Além disso, 4-vinil-guaiacol (SL35, Tabela 4), outro componente indesejável, foi detectado em todas as amostras (fresca e

¹⁵⁶ Experimentos realizados por Edna H. Azuma – Fundação André Tosello.

deteriorada) e portanto, neste caso, não está relacionado com o problema de adulteração de aroma como sugerido por Sutherland *et al.*¹⁵⁷. Também observamos, apenas no experimento I, um incremento na abundância relativa de α -terpineol (SL23, Tabela 4) no suco deteriorado, o qual também é considerado responsável por adulteração de aroma¹⁵⁸. Finalmente, o valenceno (SL60) (precursor da nootkatona através de processos oxidativos) e a nootkatona (SL98), um componente desejável do suco de laranja por suas propriedades organolépticas e medicinais¹⁵⁹, parecem ter sido consumidos pelos *Alicyclobacillus*. É importante mencionar que o guaiacol, principal suspeito do mau odor em sucos de laranja, não foi detectado em nenhuma das amostras destes experimentos.

Estes experimentos, principalmente o experimento II, permitiram uma boa diferenciação entre sucos deteriorados e não deteriorados e nos indicou as condições adequadas para o crescimento dos microrganismos e a metodologia mais apropriada para a recuperação dos voláteis.

¹⁵⁷ Sutherland, J.B.; Tanner, L.A.; Jennifer, D.M.; Freeman, J.P.; Deck, J.; Williams, A.J. *J. Food Protection*, 1985, **58**, 1260.

¹⁵⁸ Tatum, J.H.; Nagy, S.; Berry, R.E. *J. Food Science*, 1975, **40**, 707.

¹⁵⁹ Sime, J.T. *Chem. Britain*, 1998, **34**, 26.

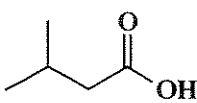
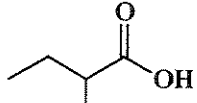
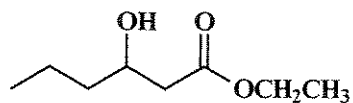
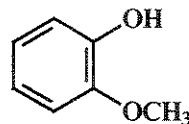
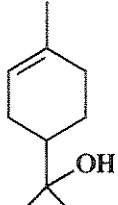
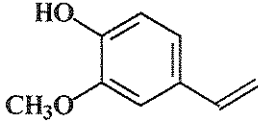
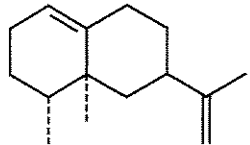
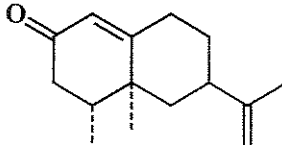
 (SL2) ácido isovalérico			 (SL4) ácido 2-metil-butírico			 (SL17) 3-hidroxi-hexanoato de etila		
Experimento	I	II	Experimento	I	II	Experimento	I	II
suco fresco	tr	nd	suco fresco	tr	nd	suco fresco	0,3%	nd
deteriorado	tr	2,4%	deteriorado	tr	3,8%	deteriorado	0,3%	6,1%
 guaiacol			 (SL23) α-terpineol			 (SL35) 4-vinil-guaiacol		
Experimento	I	II	Experimento	I	II	Experimento	I	II
suco fresco	nd	nd	suco fresco	0,7%	0,3%	suco fresco	7,2%	3,4%
deteriorado	nd	nd	deteriorado	2,1%	0,3%	deteriorado	7,3%	4,1%
 (SL60) valenceno			 (SL68 e SL68')			 (SL98) nootkatona		
Experimento	I	II	Experimento	I	II	Experimento	I	II
suco fresco	10,6%	6,8%	suco fresco	nd	nd	suco fresco	5,1%	4,1%
deteriorado	4,1%	4,9%	deteriorado	0,5%	23,7%	deteriorado	3,1%	3,8%

Figura 50. Variações nos percentuais relativos de compostos importantes encontrados nos experimentos para otimização do crescimento dos microrganismos e método de extração dos voláteis em SLCC. nd= não detectado. Os n° dos compostos estão de acordo com a Tabela 4.

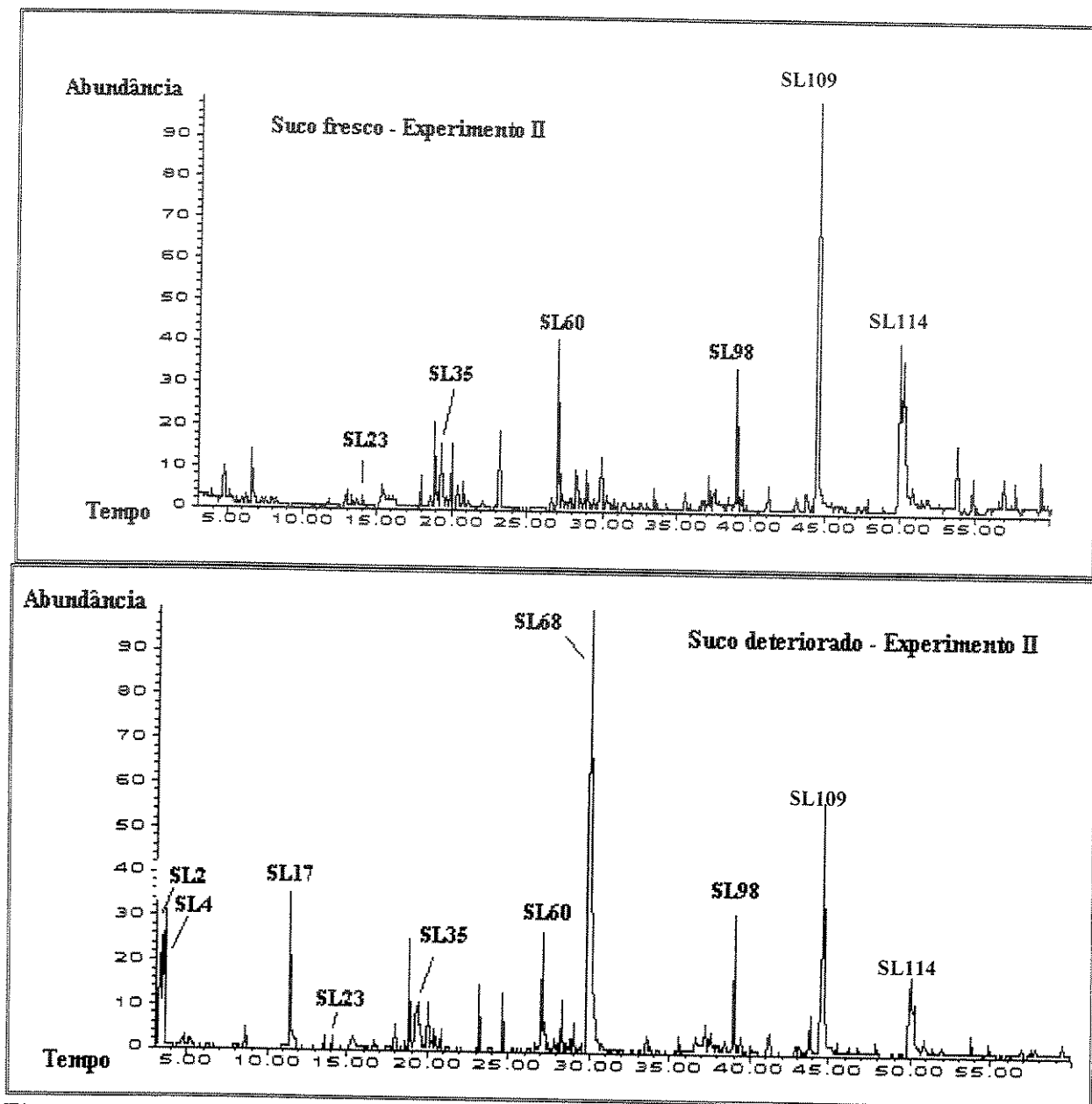


Figura 51. Cromatogramas de íons totais (TIC) (CG/EM: coluna DB-5 30m, 0,25mm, 0,25µm) dos voláteis dos sucos de laranja fresco e deteriorado obtidos através do experimento II. Os n° sobre os picos estão de acordo com a Tabela 4.

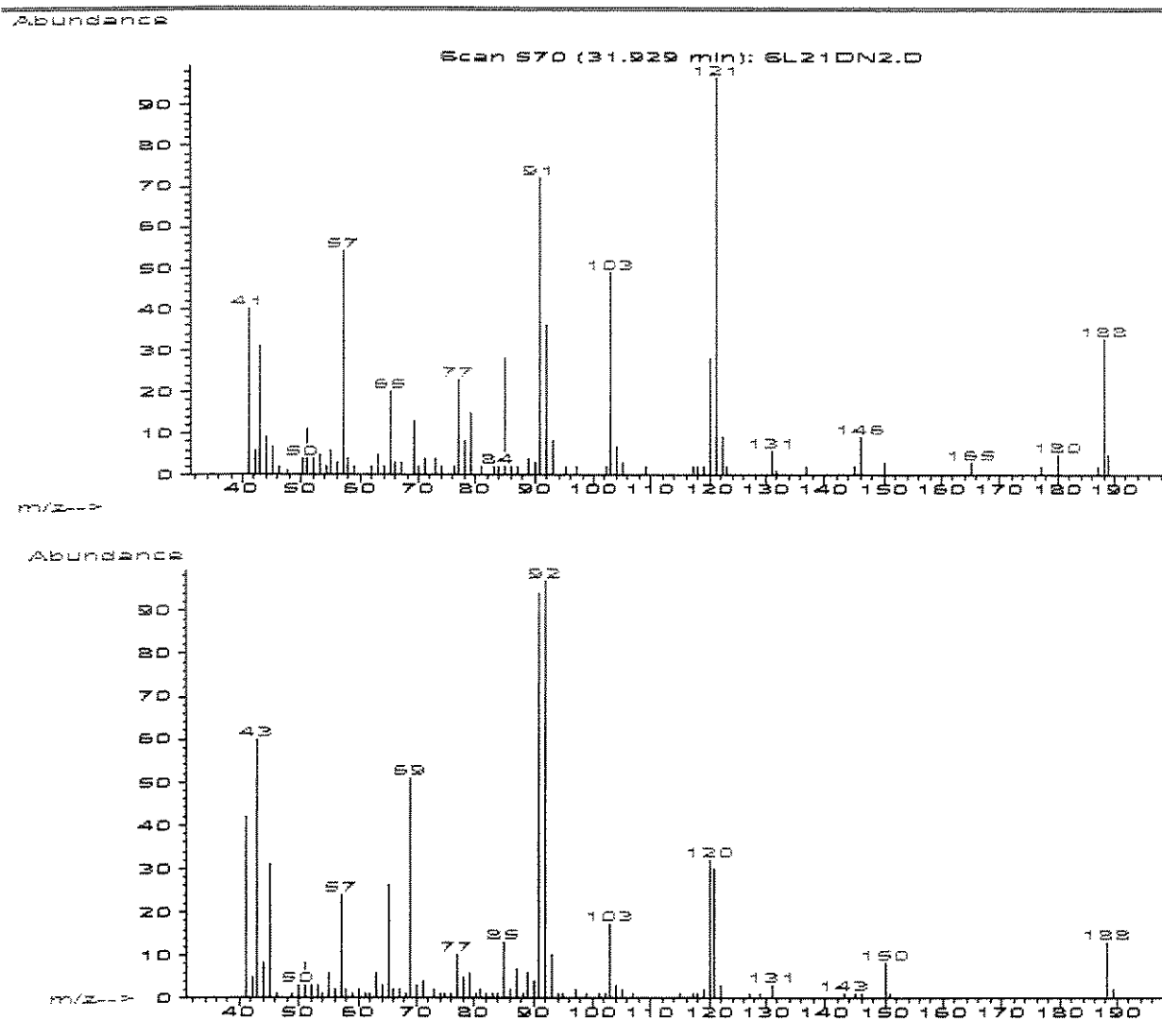


Figura 52. Espectros de massas dos compostos co-eluidos (SL68 e SL68') com $I_R=1562$ encontrados apenas nos sucos deteriorados.

Tabela 4: Percentagem relativa dos compostos voláteis obtidos a partir dos sucos de laranja frescos (SF) e deteriorados (SD) por hidrodestilação nos experimentos I e II.

COMPOSTOS		I _R ^c	I _R ^{lit}	SF I	SD I	SF II	SD II
Furfural	SL1*	830	830	tr*	1.2	-	-
Acido isovalérico	SL2*	841	834	tr*	tr*	-	2.4
2-Furanometanol	SL3*	845	-	tr*	0.7*	-	-
Acido 2-metil-butírico?	SL4*	850	-	tr*	tr*		3.8
2-Acetilfurano	SL5	903	910	-	0.1	-	-
NI	SL6	925	-	-	-	0.4	-
Ac. 2-metil-2-butenóico	SL7	928	-	1.6	4.6	1.8	-
5-Metil-furfural	SL8	954	962	-	tr	-	-
3-Etoxipirazol?	SL9	970	-	-	-	1.9	-
Acido hexanóico	SL10	985	-	1.0	0.7	-	-
NI	SL11	1037	-	-	-	-	0.8
Benzenoacetaldéido	SL12	1037	1043	0.2	0.2	-	-
Óxido de <i>cis</i> -linalool	SL13	1069	1074	0.2	0.6	-	-
Óxido de <i>trans</i> -linalool	SL14	1086	1088	0.1	0.1	-	-
Undecano	SL15	1100	1100	0.2	0.1	-	-
Isoforona	SL16	1117	1118	0.2	0.4	-	-
3-Hidroxi-hexanoato de etila	SL17	1125	-	0.3	0.3	-	6.1
<i>cis</i> -β-Terpineol	SL18	1142	-	tr	0.2	-	-
NI	SL19	1156	-	0.2	0.2	-	-
Benzoato de etila?	SL20	1164	-	-	-	0.7	-
1,8-Mentadien-4-ol	SL21	1173	-	0.1	tr	-	-
<i>m</i> -Cimen-8-ol	SL22	1181	1180	0.3	tr	-	0.4
α-Terpineol	SL23	1188	1189	0.7	2.1	0.3	0.3
<i>trans</i> -Carveol	SL24	1217	1217	4.6	2.8	4.1	1.3
5-Hidroxi-metil-furfural?	SL25	1224	-	0.1	tr	-	-
<i>cis</i> -Carveol	SL26	1228	1229	0.6	1.4	-	-
1-Fenoxi-2-propanol	SL27	1241	-	0.2	0.1	-	-
<i>p</i> -Menta-1(7),8-dien-2-ol	SL28	1250		-	0.1	-	0.3
Pirilaldeído	SL29	1269	1271	0.3	0.3	-	-
Acido nonanóico	SL30	1269	1280	tr	0.5	-	-
NI	SL31	1285	-	0.4	0.2	0.8	0.6
Timol	SL32	1291	1290	0.2	0.2	0.5	tr
Tridecano	SL33	1300	1300	0.4	tr	-	-

COMPOSTOS		I _R ^c	I _R ^{lit}	SF I	SD I	SF II	SD II
N,N-Dibutil-formamida?	SL34	1300	-	-	-	2.4	2.9
4-Vinil-guaiacol	SL35	1309	-	7.2	7.3	3.4	4.1
NI	SL36	1326	-	1.8	tr	1.8	1.1
NI	SL37	1330	-	-	0.8	-	-
NI	SL38	1335	-	0.9	0.5	0.9	0.6
NI	SL39	1345	-	0.8	0.4	0.9	0.7
NI	SL40	1353	-	0.4	0.2	-	-
Eugenol	SL41	1354	1356	-	-	-	tr
NI	SL42	1357	-	0.2	0.1	-	-
Ácido decanóico	SL43	1369	-	-	0.5	-	-
α-Copaeno	SL44	1375	1376	0.6	tr	-	-
β-Elemeneno	SL45	1392	1391	0.4	-	-	-
Vanilina	SL46	1393	1391	-	tr	-	tr
Tetradecano	SL47	1400	1400	2.2	0.9	2.5	1.7
(Z)-Cariofileno	SL48	1406	1404	0.2	-	-	-
1,3,5-Trimetoxibenzeno	SL49	1406	-	-	1.1	-	-
β-Cariofileno	SL50	1419	1418	0.3	tr	-	-
β-Gurjuneno	SL51	1429	1432	0.2	tr	-	-
NI	SL52	1435	-	-	-	-	1.5
Aromadendreno	SL53	1436	1439	0.1	-	-	-
NI	SL54	1444	-	0.3	0.3	-	-
α-Himachaleno?	SL55	1450	1447	0.5	0.3	-	-
β-Chamigreno	SL56	1477	1475	1.4	0.7	-	-
β-Selineno	SL57	1485	1485	1.7	tr	-	-
NI	SL58	1485	-	-	-	0.4	0.3
cis-β-Guaieno	SL59	1485	1490	-	0.7	-	-
Valenceno	SL60	1491	1491	10.6	4.1	6.8	4.9
BHT	SL61	1512	1512	0.5	tr	0.7	0.5
7-epi-α-Selineno	SL62	1518	1517	1.2	0.6	-	tr
4-Etoxi-benzoato de etila	SL63	1522	-	tr	0.7	1.8	1.5
δ-Cadineno	SL64	1524	1524	1.6	tr	-	-
NI	SL65	1530	-	0.3	0.1	tr	-
NI	SL66	1542	-	1.2	0.6	1.3	1.2
2,6-Dimetil-3-(metoximetil)-p-benzoquinona?	SL67	1562	-	0.8	tr*	1.7	-

COMPOSTOS		I _R ^c	I _R ^{lit}	SF I	SD I	SF II	SD II
NI	SL68*	1562	-	-	0.5*	-	23.7
NI	SL69	1552	-	0.8	0.3	0.5	-
NI	SL70	1573	-	1.0	0.8	0.6	-
Ácido dodecanóico	SL71	1578	-	1.0	-	-	-
NI	SL72	1582	-	-	0.2	0.4	-
Hexadecano	SL73	1600	1600	0.6	0.2	-	-
Tetradecanal	SL74	1611	1611	0.4	tr	-	-
NI	SL75	1618	-	0.8	0.6	-	-
γ-Eudesmol	SL76	1632	1630	0.6	0.6	-	-
epi-α-Muurolo	SL77	1640	1641	0.7	tr	-	-
6-Acetil-2,2-dimetilcromeno	SL78	1642	1642	-	0.4	-	-
Selin-11-en-4-α-ol	SL79	1653	1652	1.4	1.2	0.8	0.9
1,2,3,4,5,6,7,8-Octaidro-1-metil-fenantreno?	SL80	1660	-	0.5	-	-	-
14-OH-9-epi-β-Cariofileno?	SL81	1668	1664	0.5	-	-	-
Tetradecanol	SL82	1676	1676	0.3	0.4	-	-
NI	SL83	1681	-	-	0.2	-	-
Valeranal?	SL84	1689	-	0.6	tr	-	-
β-Sinensal	SL85	1694	1695	tr	0.4	-	-
14-OH-α-Humuleno?	SL86	1709	1709	0.9	0.4	tr	0.5
Acetato de (E)-nerolidila?	SL87	1719	1714	1.2	0.6	-	-
Isolongifolol?	SL88	1730	1726	0.4	0.5	-	-
Khusimol?	SL89	1739	1736	0.5	0.6	-	0.7
γ-Costol	SL90	1746	-	0.7	tr	-	-
NI	SL91	1752	-	0.7	1.2	1.0	0.8
NI	SL92	1764	-	-	-	1.9	1.0
NI	SL93	1766	-	3.1	2.5	-	-
Pentadecanol	SL94	1779	1778	tr	0.3	-	-
Ácido tetradecanóico?	SL95	1777	-	0.2	-	-	-
NI	SL96	1790	-	0.3	tr	-	-
1-Octadeceno	SL97	1793	1793	0.8	0.9	-	-
Nootkatona	SL98	1802	1800	5.1	3.1	4.1	3.8
6-isopropenil-4,8a-dimetil-4a,5,6,7,8,8a-hexaidro-2(1H)-naftalenona?	SL99	1816	-	0.6	0.3	tr	0.3
Ciclopentadecanolídeo?	SL100	1826	1828	0.2	0.2	-	-
Acetato de (E,E)-farnesila	SL101	1835	1843	0.2	-	-	-

COMPOSTOS		I _R ^c	I _R ^{lit}	SF I	SD I	SF II	SD II
NI	SL102	1846	-	0.3	tr	-	-
Ácido pentadecanóico	SL103	1864	-	1.6	5.0	1.3	1.2
Hexadecanol	SL104	1878	1879	0.5	0.4	-	-
Nonadecano	SL105	1900	1900	0.2	0.2	-	-
Ciclohexadecanolídeo?	SL106	1918	1928	1.5	0.8	-	-
(Z)-9-Hexadecenoato de metila?	SL107	1941	-	-	-	-	1.4
15-Hexadecanolídeo?	SL108	1951	-	1.8	tr	-	-
Ácido hexadecanóico	SL109	1963	-	3.6	21.3	20.9	13.0
Octadecanol	SL110	2083	2082	-	0.9	-	-
Heneicosano	SL111	2100	2100	0.7	0.7	-	-
Octadecanoato de metila	SL112	2124	2128	-	1.4	-	-
Ostol	SL113	2134	2138	0.4	0.7	-	-
Ácido linoléico + ác. Oléico?	SL114	2134	-	6.8	4.2	18.6	7.2
Ácido esteárico?	SL115	2166	-	-	-	-	0.7
Nonadecanol?	SL116	2180	-	0.5	tr	-	-
1-Docoseno	SL117	2193	2195	0.4	2.1	-	-
Docosano	SL118	2200	2200	0.6	tr	-	-
NI	SL119	2265	-	1.6	1.1	1.8	0.7
Tricosano	SL120	2300	2300	1.5	0.8	1.4	0.5
NI	SL121	2362	-	0.2	tr	-	-
Heneicosanol?	SL122	2375	-	0.8	0.4	0.8	-
1-Tetracoseno?	SL123	2394	-	0.6	tr	-	-
Tetracosano	SL124	2400	2400	0.6	0.4	0.7	tr
TOTAL				95.6	94.1	89.9	93.4

NI= Não Identificado, I_R^c= Índice de retenção calculado¹⁶⁰, I_R^{lit}= Índice de retenção da literatura¹⁶¹

* picos co-eluídos, SL68*=SL68+SL68' co-eluídos.

¹⁶⁰ Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J. *J. Chromatog.*, 1963, **11**, 463.

¹⁶¹ Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing, Illinois, 1995.

A análise sensorial olfativa (CG/O, monitoramento dos efluentes do CG através do olfato) foi o método escolhido para a identificação dos compostos que podem ser os verdadeiros responsáveis pelo odor desagradável encontrado nos sucos. No entanto, como não dispúnhamos de métodos mais sofisticados tais como AEDA e CHARM, foi necessário adaptarmos o experimento às nossas condições e, mesmo sem um sistema para umidificar os efluentes do CG, adotamos a descrição de odor para nos fornecer as informações sobre os compostos com odor mais pronunciado nas amostras. Para este fim, uma coluna DB-1 (60 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μ m de espessura do filme) foi dividida em 2 partes iguais de 30 m de comprimento cada e as duas colunas foram conectadas ao mesmo injetor com uma anilha de vespel com dois orifícios, sendo uma extremidade de uma coluna conectada a um detector de ionização em chama (FID) e a outra com saída para análise dos efluentes pelos analistas (Figura 53). Os tempos de retenção entre as 2 colunas foram aferidos através da injeção de padrões sintéticos disponíveis em nosso laboratório (ácido isovalérico, indol, mentol, eucaliptol e *p*-anisaldeído).

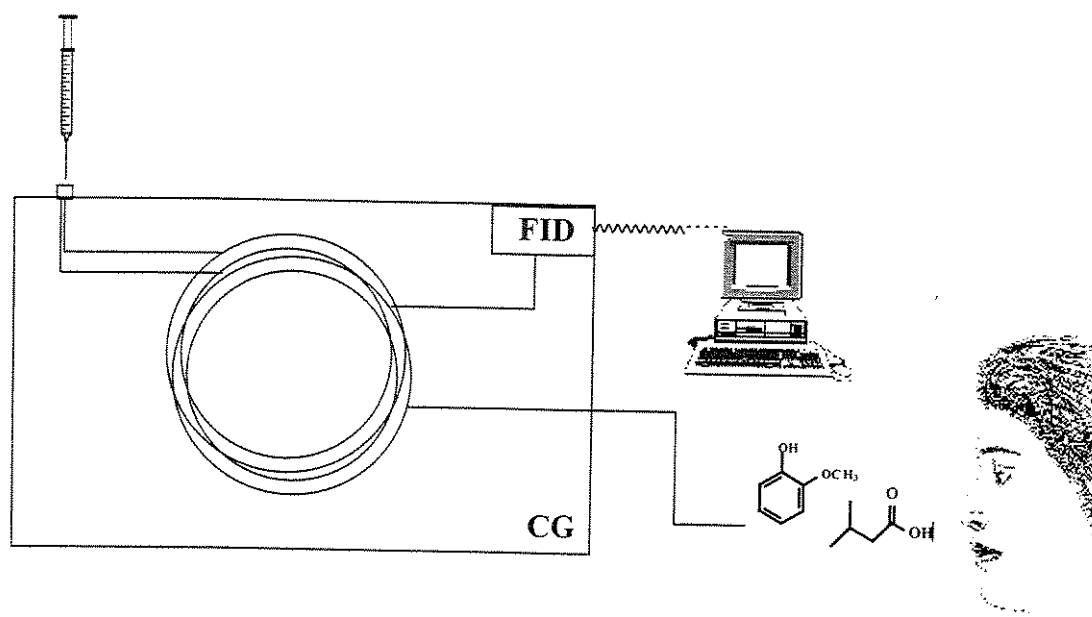


Figura 53. Esquema representativo da adaptação das 2 colunas DB-1 (30m, 0,25mm, 0,25 μ m) no CG para as análises olfativas (CG/O) realizadas nas amostras de suco de laranja.

Assim, as substâncias com odor desagradável foram detectadas através deste experimento (CG/O) adotando-se o método qualitativo da descrição do odor associado ao seu tempo de retenção no CG, os quais foram correlacionados com as estruturas determinadas através dos respectivos espectros de massas e índices de retenção (I_R) obtidos através de CG/EM (Figura 50). Desta forma, pôde-se indicar os ácidos isovalérico (SL2) e 2-metil-butírico (SL4) como os principais responsáveis pelo mau odor nestas amostras, os quais, de acordo com a literatura^{162, 163}, são bem conhecidos por produzirem odor desagradável do tipo putrefação.

Uma nova série de experimentos foram realizados buscando-se determinar alguns parâmetros associados com deterioração dos sucos de laranja reconstituído contaminado por *Alicyclobacillus* sp., bem como confirmar os resultados obtidos nos experimentos iniciais. Desta forma, reavaliamos o nível de inóculo, a temperatura e o tempo de armazenamento do suco processado e envasado por preenchimento a quente. Avaliou-se também a influência da atmosfera de gases presentes no espaço livre da embalagem sobre o metabolismo dos *Alicyclobacillus* e conseqüentemente, o processo de deterioração, uma vez que os resultados obtidos nesta etapa podem ser fortemente afetados pelo comportamento do microrganismo em relação ao micro-ambiente formado nessas condições de embalagem, as quais podem não favorecer o crescimento das bactérias.

Nestes experimentos, realizados em duplicata, os sucos de laranja reconstituídos foram inoculados com o mesmo conjunto de 3 linhagens de *Alicyclobacillus* sp. dos experimentos iniciais, submetido a choque térmico (80°C/10 min e resfriamento), seguido de tratamento por aspersão com gás (N_2 , O_2 ou mantido sob ar atmosférico). Posteriormente, os sucos foram armazenados por período de 21 dias com monitoramento microbiológico (enumeração de *Alicyclobacillus*, bactérias heterotróficas totais e bolores e leveduras) e, desta vez, avaliados por teste sensorial de diferença de controle, seguidos pela captura dos compostos voláteis, análise em CG/EM e por olfatometria (CG/O).

¹⁶² Charalambous, G. (Ed.). *Off-flavors in foods and beverages*. Elsevier, Amsterdam, 1992, p. 27.

Os resultados indicaram que o preenchimento com ar atmosférico foi a condição mais favorável ao crescimento dos microrganismos, atingindo níveis de 10^7 UFC/mL após 7 dias. Em presença de oxigênio como gás de preenchimento do espaço livre da embalagem, observou-se a ocorrência de uma fase de latência que durou 2 dias (não observada em presença de nitrogênio), com taxa de crescimento logarítmica após este período. As amostras contendo oxigênio e nitrogênio apresentaram a mesma taxa de crescimento entre 7 e 14 dias, atingindo a fase estacionária com 10^5 a 10^6 UFC/mL. Após esse período, o crescimento foi favorecido pela presença de oxigênio e nitrogênio, pelo menos até 21 dias.

Alicyclobacillus acidoterrestris são microrganismos estritamente aeróbicos, ou seja, necessitam de oxigênio para seu desenvolvimento. Em experimentos de crescimento em 2 sistemas diferentes de empacotamento de suco realizados recentemente¹⁶⁴, verificou-se que os sistemas embalados sem espaço livre (sem “headspace”) ou preenchidos sob atmosfera de N₂/CO₂ com 0,84% O₂ residual a 30°C, impediram o crescimento de *A. acidoterrestris* em sucos de maçã, prevenindo assim a deterioração. No entanto, a utilização de N₂/0,1% de O₂ residual foi suficiente para o crescimento dos microrganismos. No caso dos sucos de laranja, a deterioração só foi prevenida com condições anaeróbicas. É interessante mencionar que o comportamento dos microrganismos também foi diferente com os sucos de uva branca e vermelha, sendo o último tipo o mais resistente à deterioração. Nestes estudos, ficou evidenciado que o suco de laranja é o que oferece as melhores condições para o crescimento dos *Alicyclobacillus*.

De acordo com os testes sensoriais por diferença de controle realizados com painelistas na Fundação André Tosello, as amostras de sucos dos três tratamentos (ar, O₂ e N₂) já apresentaram alterações olfativas significativas a partir do segundo dia de armazenamento (incubação) quando comparadas ao controle; e o odor foi descrito pela

¹⁶³ Tamura, H.; Yang, R.-H.; Sugisawa, H. Aroma profile of peel oils of acid citrus. In Teranishi, R.; Buttery, R.G.; Sugisawa, H. (Eds.). *Bioactive volatile compounds from plants*. ACS symposium series, 525. ACS, Washington, 1993, p. 121.

¹⁶⁴ Cerny, G.; Duong, H.-A.; Henlich, W.; Miller, S. *Food Australia*, 2000, **52**, 289.

maioria dos painelistas como desagradável, ácido e/ou pútrido¹⁶⁵ sem que nenhum deles tenha percebido um odor mais pronunciado do tipo “produto medicinal”. Além disso, quando abrimos os frascos para efetuarmos as análises, verificamos que o odor desagradável (cheiro pútrido do tipo “suor”), bem como a aparência das amostras (turbidez e escurecimento) variavam de acordo com o tempo de incubação e gás de preenchimento, sendo mais pronunciada nos sucos preenchidos com ar atmosférico com 7 e 21 dias de incubação. As amostras preenchidas com N₂ apresentaram uma menor turbidez e escurecimento, bem como menor intensidade do odor desagradável. Este resultado não foi surpresa, uma vez que os estudos realizados por Peleg *et al.*¹⁶⁶ em 1992, já indicavam uma redução nos níveis de acúmulo de PVG, vanilina, 5-hidroxi-metil-furfural (HMF), furfural, bem como a redução do escurecimento da amostra quando se utilizou N₂. De maneira geral, nos parece que a utilização deste gás no espaço livre das embalagens reduz o potencial deteriorante dos *Alicyclobacillus*.

Os resultados das análises através de CG/EM (Tabela 5, Figuras 54-56) mostraram que o guaiacol (SL140, Tabela 5) não foi detectado em nenhuma amostra a t₀ e nos demais controles, apenas traços nos sistemas com 2 e 7 dias de incubação com ar atmosférico; detectando-se 0,2% na amostra de 7 dias preenchida com O₂. Nas amostras com 21 dias de incubação detectou-se 0,2%, 0,7% e 0,4% com ar, O₂ e N₂, respectivamente. Ou seja, houve um aumento proporcional ao longo dos dias, mais pronunciado nas amostras preenchidas com oxigênio.

A abundância relativa dos ácidos isobutírico (SL125, Tabela 5), isovalérico (SL2, Tabelas 4 e 5) e 2-metil-butírico (SL4, Tabelas 4 e 5) aumentou progressivamente nas amostras preenchidas com ar atmosférico, avaliados após 7 e 21 dias. O composto 3-hidroxi-hexanoato de etila (SL17, Tabelas 4 e 5) está presente em todas as amostras com um aumento mais pronunciado nas amostras preenchidas com ar atmosférico com 7 e 21 dias de incubação. O 4-vinil-guaiacol (SL35, Tabelas 4 e 5) novamente foi detectado em todas as amostras e os compostos não identificados (SL68 e SL68', Tabelas 4 e 5) foram

¹⁶⁵ Eguchi, S.Y.; Manfio, G.P.; Pinhatti, M.E.; Azuma, E.; Variane, S.F. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice: Detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. *ABECitrus*, São Paulo, March, 1999.

detectados nas amostras com ar atmosférico a partir de 2 dias de incubação com aumento progressivo da abundância relativa e nas amostras de suco preenchidos com O₂ e N₂ a partir de 7 dias. Estes compostos, por sua vez, não foram detectados em nenhum dos controles (Tabela 5), o que é um indicativo que são provenientes do metabolismo dos microrganismos ou produtos de biotransformação de componentes do suco.

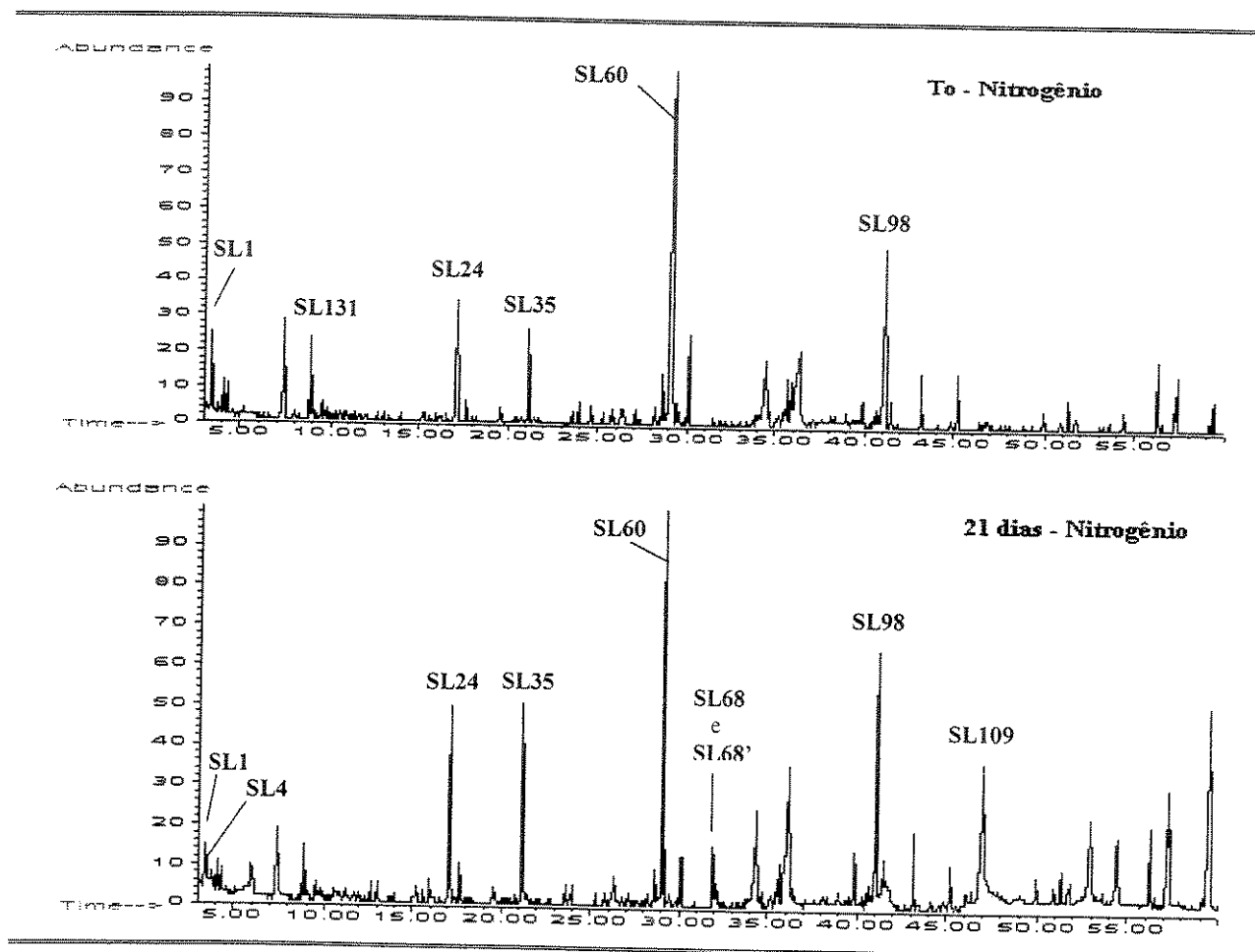


Figura 54. TIC (CG/EM: DB-5 30m) dos voláteis produzidos nas amostras de suco de laranja preenchidas com nitrogênio. Os n° sobre os picos corresponde aos compostos das Tabelas 4 e 5.

¹⁶⁶ Peleg, H.; Naim, M.; Zehavi, U.; Rouseff, R.L.; Nagy, S. *J.Agric.Food Chem.*, 1992, **40**, 764.

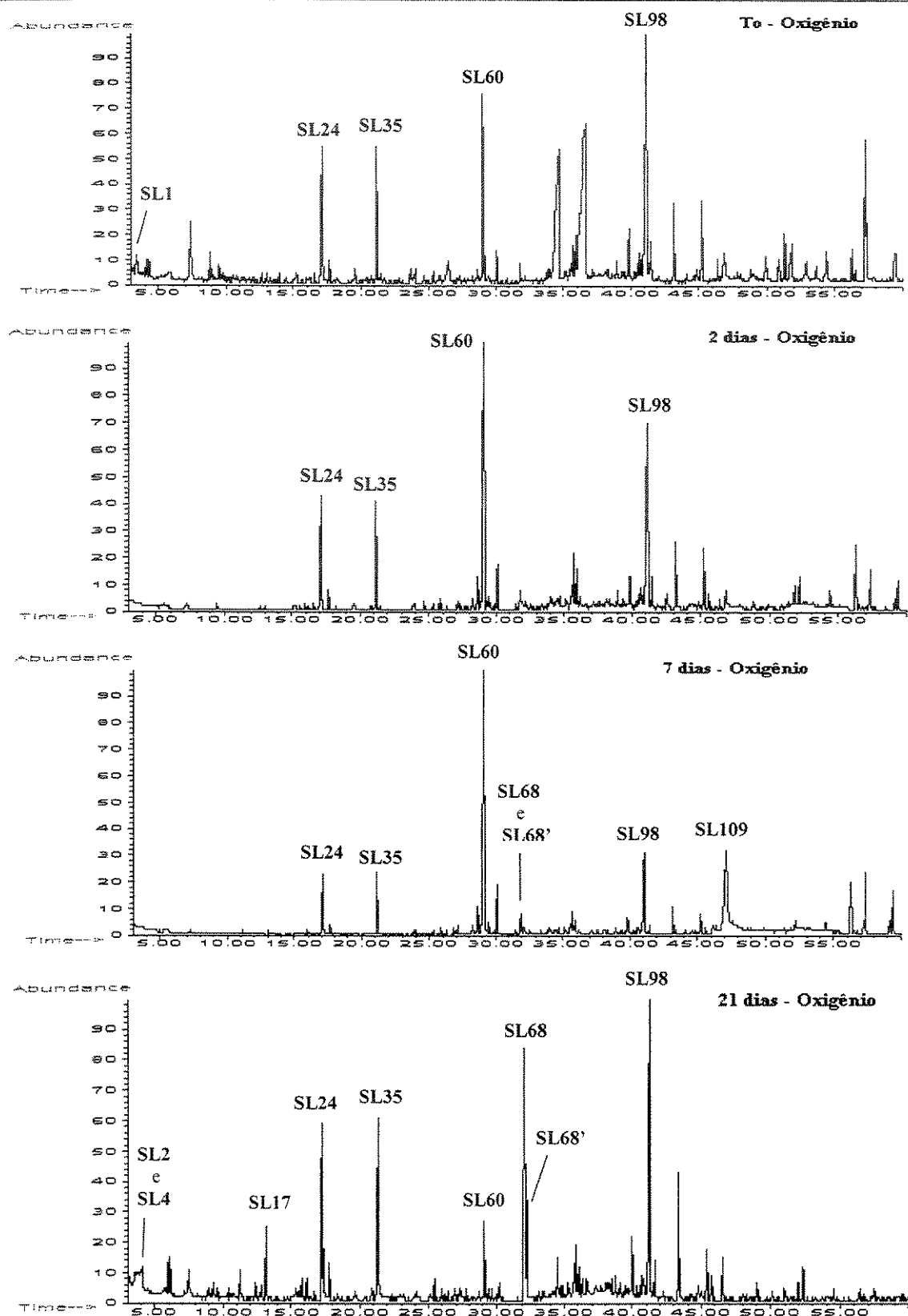


Figura 55. TIC (CG/EM: DB-5 30m) dos voláteis produzidos nas amostras de suco de laranja preenchidas com oxigênio. Os nº sobre os picos corresponde aos compostos das Tabelas 4 e 5.

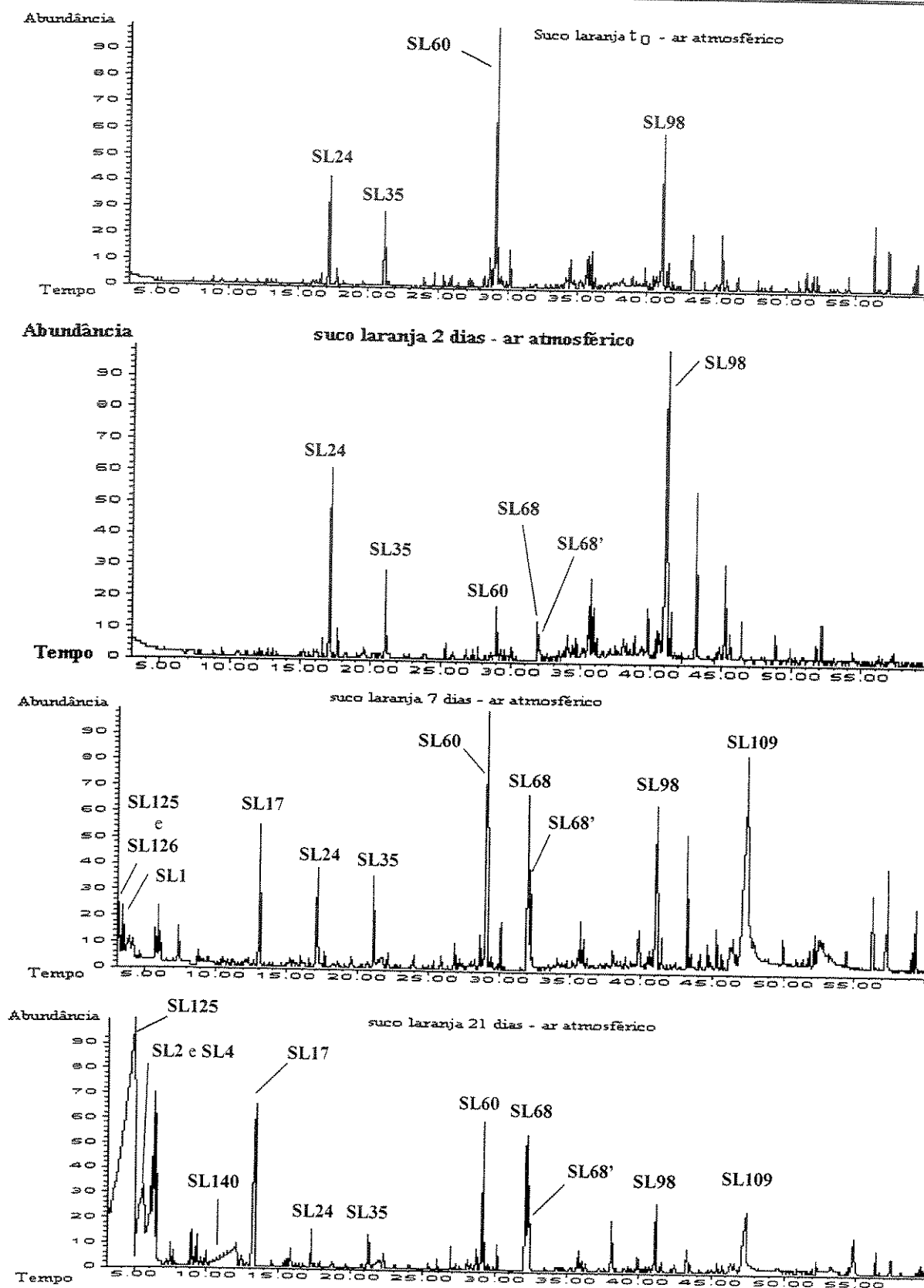


Figura 56. TIC (CG/EM: DB-5 30m) dos voláteis produzidos nas amostras de suco de laranja preenchidas com ar atmosférico. Os n° sobre os picos corresponde aos compostos das Tabelas 4 e 5.

Tabela 5: Composição percentual relativa dos voláteis de suco laranja contaminados com *Alicyclobacillus* variando-se o gás de preenchimento (ar atmosférico, oxigênio e nitrogênio).

Compostos	α	β	T ₀				2 dias			7 dias			21 dias			
			Ctl	Ar	O ₂	N ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂	N ₂
SL125	820	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	39.6*	*	-
SL126	823	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	*	-
SL1	830	830	0.4	-	0.8	1.9	-	-	-	-	0.4	-	0.5	*	*	1.1
SL2	841	834	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	5.4	1.4*	-
SL4	850	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	3.8	1.6	0.6
SL127	856	-	0.2	-	0.4	0.8	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	0.5
SL5	896	910	-	-	tr	0.3	-	-	-	-	tr	-	-	tr	tr	tr
SL7	918	-	tr	-	1.2	-	-	-	tr	0.9	tr	tr	0.8	tr	0.7	tr
SL128	928	-	-	-	-	-	-	-	-	2.2	-	-	-	5.9*	1.2	2.1
SL129	932	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	tr*	0.6	tr
SL130	981	978	1.0	tr	3.1	3.1	tr	tr	tr	1.0	-	-	1.3	0.4	2.0	2.3
SL131	1027	1031	0.7	0.3	1.5	2.8	-	-	-	0.4	tr	tr	0.5	1.0	0.6	1.3
SL132	1035	1032	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	0.3	0.7	0.6	-
SL12	1043	1043	0.3	tr	0.8	0.8	tr	tr	0.3	0.4	tr	tr	0.2	0.1	0.3	0.4
SL133	1053	-	tr	-	0.5	0.6	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	0.2
SL134	1059	1060	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
SL135	1065	1065	tr	-	tr	tr	-	-	tr	0.2	tr	tr	0.4	0.1	0.2	tr
SL136	1072	1072	0.2	tr	tr	0.3	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.5
SL137	1072	1072	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	0.4	-

Compostos			α	β	T ₀				2 dias				7 dias				21 dias			
					Ctl	Ar	O ₂	N ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂
SL138	Octanol	1073	-	-	tr	0.3	-	tr	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	tr
SL139	NI	1079	-	-	tr	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2
SL140	Guaiacol	1084	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2
SL141	<i>p</i> -Cimeneno	1090	tr	tr	tr	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.2	-	0.2	0.7	0.5
SL15	Undecano	1100	-	-	tr	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
SL142	Nonanal	1105	tr	tr	tr	0.4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
SL143	Benzenoetanol	1112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	tr	-	2.2	-	tr
SL16	Isoforona	1120	0.4	0.3	0.4	0.4	tr	0.3	0.2	0.2	tr	tr	tr	tr	0.2	tr	-	0.4	0.5	tr
SL17	3-OH-Hexanoato de etila	1128	-	0.2	tr	0.3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	3.6	0.2	0.3	5.8	1.4	0.5
SL144	4-Ceto-isoforona	1144	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
SL145	Ác. octanóico + Pinocanfeol	1176	0.3	tr	0.8	0.6	tr	tr	tr	0.5	0.4	0.4	tr	tr	0.1	0.7	0.2	0.7	0.6	0.6
SL22	<i>m</i> -Cimen-8-ol	1182	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	0.3	0.7	0.9	0.3	0.7	0.2
SL18	α -Terpineol	1192	0.4	0.3	tr	0.7	0.2	0.4	0.5	0.5	0.2	0.2	0.8	0.1	0.7	0.7	0.8	0.1	0.7	0.6
SL146	<i>cis</i> -Piperitol + Dodecano	1199	0.3	0.4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	0.1	-	tr
SL147	Decanal	1207	0.3	0.5	0.4	0.3	0.1	0.6	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.1	0.3	tr
SL24	<i>trans</i> -Carveol	1217	4.6	5.5	5.2	5.6	3.4	7.6	5.0	5.0	2.6	3.2	5.8	0.8	6.4	6.4	5.8	0.8	6.4	4.0
SL148	Benzotiazol	1220	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
SL26	<i>cis</i> -Carveol	1230	0.6	0.8	0.6	0.7	0.4	1.0	0.7	0.7	0.4	0.5	0.8	0.2	0.9	0.5	0.8	0.2	0.9	0.8
SL27	1-Fenoxi-2-propanol?	1242	-	tr	tr	tr	tr	-	0.3	0.3	tr	-	0.4	tr	-	-	0.4	tr	-	tr
SL30	Ác. nonanóico + Decanol	1270	0.6	0.4	0.8	0.7	tr	0.8	0.7	0.7	0.5	0.4	0.4	0.1	0.5	0.5	0.4	0.1	0.5	0.6
SL149	1-Trideceno	1297	0.3	-	tr	0.3	-	-	0.2	0.2	tr	tr	-	0.3	0.1	0.5	0.3	0.1	0.5	0.2
SL35	4-Vinil-guaiacol	1306	-	3.7	4.8	3.5	3.1	3.1	4.9	4.9	2.1	3.1	3.1	7.5	0.8	5.7	7.5	0.8	5.7	4.8

Compostos		α_D^{20}	n_D^{20}	T ₀				2 dias				7 dias		21 dias			
				Ctl	Ar	O ₂	N ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂	N ₂	
SL150	Ácido ciclohexanopropânico?	1311	-	0.4	tr	0.5	0.3	tr	-	tr	1.0	-	0.3	-	-	tr	
SL151	3-OH-Octanoato de etila	1328	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	1.0	tr	tr	
SL152	NI	1360	-	0.5	-	0.6	0.4	-	-	-	-	-	0.5	-	-	0.4	
SL43	Ácido decanóico	1366	-	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	
SL44	α -Copaeno	1369	1376	0.8	0.4	0.8	0.7	0.5	tr	0.5	0.5	0.6	0.8	0.1	0.6	0.7	
SL45	β -Elemeno	1383	1391	0.8	0.6	0.4	0.6	0.3	-	0.3	tr	0.1	-	-	-	-	
SL47	Tetradecano	1400	1400	0.4	0.5	0.5	0.3	0.3	0.6	0.3	0.2	0.2	0.3	0.1	0.5	0.3	
SL153	Dodecanal	1408	1407	tr	tr	0.3	0.3	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	
SL50	β -Cariofileno	1411	1418	0.8	0.9	tr	0.4	0.6	tr	0.7	0.3	0.5	0.3	0.2	0.3	0.4	
SL154	NI	1418	-	0.8	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	
SL155	NI	1420	-	-	-	2.2	1.4	-	-	-	-	-	1.0	-	0.2	1.4	
SL51	β -Gurjuneno	1422	1432	tr	tr	-	tr	0.2	-	tr	tr	0.2	-	tr	-	-	
SL156	Benzil isobutil cetona?	1433	-	-	-	-	-	-	0.4	-	0.5	0.3	-	0.4	0.4	0.3	
SL157	Butanoato de 2-fenil-etila	1440	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	0.7	-	
SL53	Aromadendreno	1441	1439	1.0	0.5	tr	0.8	0.4	-	0.4	0.5	0.4	-	0.1	-	tr	
SL158	Gerani acetona	1445	1453	tr	0.4	tr	tr	0.3	0.7	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	
SL159	α -Humuleno	1450	1454	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	0.1	tr	tr	
SL160	NI	1461	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.3	-	0.4	0.2	0.4	-	
SL161	γ -Selineno?	1467	-	1.1	0.8	0.4	0.9	0.9	-	0.6	0.4	0.8	-	0.2	-	0.6	
SL56	β -Chamigreno	1477	1475	2.7	1.9	0.9	2.1	1.8	0.5	1.5	0.9	1.7	0.6	0.4	tr	0.8	
SL60	Valenceno	1487	1491	29.2	17.8	7.9	21.8	20.5	2.9	17.3	9.7	19.6	5.6	3.8	2.2	9.1	
SL162	α -Selineno	1489	1494	-	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	

Compostos		°C	m/z	T ₀						2 dias			7 dias			21 dias		
				Ctl	Ar	O ₂	N ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂	N ₂	
SL79	Selin-11-en-4-α-ol	1651	1652	2.1	3.3	2.4	2.5	2.9	5.3	3.5	2.4	0.5	2.9	2.4	0.5	2.9	1.6	
SL80	1,2,3,4,5,6,7,8-Octaidro-1-metil-fenantreno?	1657	-	-	1.8	1.6	1.5	1.3	2.6	1.4	-	0.2	1.1	-	0.2	1.1	tr	
SL81	14-OH-9-epi-β-Cariofileno?	1664	1664	-	0.8	-	-	0.7	1.2	0.9	0.4	0.4	0.9	-	0.2	0.9	-	
SL176	NI	1688	1695	0.5	1.0	1.5	0.8	0.8	1.3	1.1	-	0.1	-	-	0.1	-	0.3	
SL177	Selin-7(11)-en-4-ol	1690	1691	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	1.2	-	
SL178	NI	1699	-	1.2	1.7	-	1.0	1.3	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	
SL86	NI	1708	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	1.0	-	-	1.0	-	
SL179	(Z,Z)-Farnesol?	1713	1711	-	0.9	-	-	-	-	-	0.9	tr	-	-	0.9	tr	-	
SL86	14-OH-α-Humuleno?	1715	1709	1.4	-	1.7	1.4	1.3	1.5	1.2	-	-	1.9	tr	-	1.9	0.5	
SL87	Acetato de (E)-nerolidila?	1719	1714	-	1.0	tr	tr	tr	1.5	tr	0.2	tr	0.9	1.5	0.1	0.9	0.5	
SL88	Isolongifolol?	1728	1726	-	-	-	-	0.6	tr	-	-	-	0.9	-	0.1	0.9	-	
SL89	Khusimol	1737	1736	1.3	1.4	1.3	1.0	1.2	2.0	0.9	0.6	0.6	0.7	1.2	tr	1.2	0.7	
SL90	γ-Costol?	1744	-	-	0.6	0.6	-	0.5	0.8	0.8	0.3	tr	0.6	0.5	0.1	0.6	-	
SL180	(E,Z)-Farnesol?	1751	1742	-	tr	0.9	0.7	0.5	1.7	-	tr	-	1.0	0.8	-	1.0	-	
SL93	NI	1761	-	1.6	2.1	2.5	1.4	1.9	3.0	1.9	1.8	0.6	2.1	2.4	0.6	2.1	1.4	
SL94	Pentadecanol	1772	1778	tr	tr	0.6	tr	0.4	tr	0.3	tr	tr	0.5	0.5	tr	0.5	0.3	
SL95	Ácido tetradecanóico?	1779	-	0.6	0.9	0.9	0.6	0.7	1.5	0.7	0.5	0.5	1.0	0.6	0.1	0.8	0.3	
SL96	NI	1783	-	0.8	1.1	1.3	0.8	1.0	1.8	tr	0.6	tr	1.0	0.9	0.1	1.0	0.6	
SL98	Nootkatona	1796	1800	7.8	12.5	11.8	6.5	9.8	19.0	12.0	6.0	5.8	7.7	7.7	1.7	9.9	6.1	
SL99	6-isopropenil-4,8a –dimetil-4a,5,6,7,8,8a –hexaidro-2(1H)-naftalenona?	1807	-	1.1	1.7	2.3	1.0	1.2	2.6	1.5	0.8	0.7	1.2	0.2	0.2	1.6	3.6	

Compostos	°C	t _R	T ₀						2 dias			7 dias			21 dias		
			Ctl	Ar	O ₂	N ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ar	O ₂	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂	N ₂
SL100																	
	Ciclopentadecanolídeo?	1815	1828	0.3	0.5	-	tr	0.5	-	-	-	-	-	0.5	0.1	0.5	-
SL101	Acetato de (E,E)-farnesila ?	1836	1843	-	tr	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-
SL103	Ácido pentadecanóico	1862	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	0.2	-	-
SL104	Hexadecanol	1879	1879	0.4	0.7	0.4	0.3	0.4	tr	1.0	tr	0.5	tr	tr	0.1	0.3	tr
SL181	7,9-di-tert-Butil-1-oxaspiro-[4,5]deca-6,9-dieno-2,9-diona?	1896	-	-	-	0.2	-	0.2	tr	tr	tr	0.5	tr	tr	0.1	0.5	tr
SL182	NI	1903	-	0.4	0.9	0.7	0.4	0.6	1.3	0.6	0.4	-	-	tr	0.1	0.5	-
SL106	Ciclohexadecanolídeo?	1915	1928	1.4	2.4	2.2	1.5	1.8	3.3	2.2	0.9	0.9	0.9	1.2	0.2	1.3	0.8
SL183	Hexadecanoato de metila	1925	1925	-	0.6	-	-	0.4	1.1	0.5	0.3	0.3	0.3	-	0.1	0.6	-
SL108	15-hexadecanolídeo?	1943	-	-	-	-	-	tr	-	-	2.2	1.0	0.6	0.6	0.5	-	0.8
SL109	Ácido hexadecanóico	1977	-	-	-	2.6	0.7	4.4	-	2.4	19.2	14.5	8.9	4.3	-	-	9.2
SL184	Heptadecanol?	1982	-	-	-	-	-	0.8	-	-	-	1.7	-	-	-	-	-
SL185	1-Eicoseno	1993	1994	-	0.5	0.5	-	1.3	-	-	2.4	2.7	tr	tr	tr	tr	0.6
SL186	Eicosano	2000	2000	-	tr	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.7
SL187	NI	2022	-	-	-	0.7	-	1.1	1.1	0.5	-	-	-	-	-	0.5	1.9
SL188	NI	2043	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0	0.3	tr	-
SL110	Octadecanol	2082	2082	0.4	0.7	1.1	0.4	0.5	0.6	-	tr	-	-	0.9	tr	0.5	0.9
SL111	Heneicosano	2100	2100	1.1	1.0	1.8	0.9	0.6	-	1.5	-	0.6	0.6	1.8	-	-	1.1
SL113	Ostol	2115	2138	0.9	0.8	2.2	0.7	0.6	0.9	1.5	0.3	0.6	0.6	1.3	tr	0.6	1.2
SL112	Octadecanoato de metila	2124	2128	-	1.0	-	-	1.0	1.8	5.3	0.6	0.8	-	-	0.3	1.1	-
SL114	Ácido linoléico	2141	-	-	-	-	-	-	-	-	3.5	2.3	2.1	-	-	-	-
SL115	Ácido esteárico?	2151	-	-	-	1.9	-	-	-	-	-	1.4	2.5	0.6	-	-	5.0

Compostos		α	$\frac{\alpha}{\beta}$	T ₀				2 dias			7 dias			21 dias		
				Ctl	Ar	O ₂	N ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ctl	Ar	O ₂	Ctl	Ar	N ₂
SL118	Docosano	2200	2200	0.6	0.8	1.4	0.6	1.3	0.4	2.1	0.6	0.6	1.0	0.9	0.1	3.8
SL119	NI	2263	-	2.5	2.7	1.1	1.8	3.6	0.3	2.5	2.0	2.0	3.2	0.8	0.3	1.4
SL189	Eicosanol?	2272	-	0.3	-	0.4	0.3	-	tr	-	-	-	-	0.4	-	0.3
SL120	Tricosano	2300	2300	3.5	2.7	5.8	2.9	3.4	0.8	2.5	2.9	2.9	3.2	4.5	0.4	5.0
Total				91.1	92.0	93.4	92.2	86.6	88.4	90.9	90.0	85.4	84.3	94.0	89.9	89.8

NI= Não Identificado, I_R^c= Índice de retenção calculado¹⁶⁷, I_R^{lit} = Índice de retenção da literatura¹⁶⁸, ND = presente, mas abundância relativa Não Determinada. *picos co-eluidos

¹⁶⁷ Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J. *J. Chromatog.*, 1963, **11**, 463.

¹⁶⁸ Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing, Illinois, 1995.

As análises sensoriais olfativas (CG/O) (utilizando-se 3 analistas, um deles foi integrante dos testes sensoriais por diferença de controle realizados na Fundação André Tosello) nestes experimentos com preenchimentos de gás (Figura 57), revelaram a incidência de um odor forte pútrido do tipo “suor” que se iniciava em torno do tempo de retenção de 3,0 min e perdurava por alguns segundos, coincidindo com as regiões dos tempos de retenção dos ácidos isobutírico, isovalérico e 2-metil-butírico. Um cheiro forte semelhante a produto medicinal (tipo “penicilina”) foi percebido no tempo de retenção *ca.* 10,5 min e um odor tipo “laranja velha” em torno de 21 min, os quais foram associados com os tempos de retenção do guaiacol e do 4-vinil-guaiacol, respectivamente. As intensidades percebidas para os odores, nos tempos de retenção *ca.* 10,5 min e 21 min, foram praticamente as mesmas nas amostras analisadas, contudo, na região dos tempos de retenção dos ácidos isobutírico, isovalérico e 2-metil-butírico, a intensidade do odor variou de acordo com a amostra, ou seja, de acordo com o tempo de incubação e o tipo de gás de preenchimento. O que ficou evidente nestes experimentos associados com a análise sensorial olfativa foi que os ácidos isovalérico e 2-metil-butírico são, de fato, os responsáveis pela adulteração nos sucos de laranja, uma vez que o odor característico percebido nas análises por diferença de controle e produzido nas amostras de suco, principalmente com 7 e 21 dias de incubação sob ar atmosférico e oxigênio, era pútrido do tipo “suor”, análogo ao odor produzido pelo ácido isovalérico (SL2, Tabelas 4 e 5).

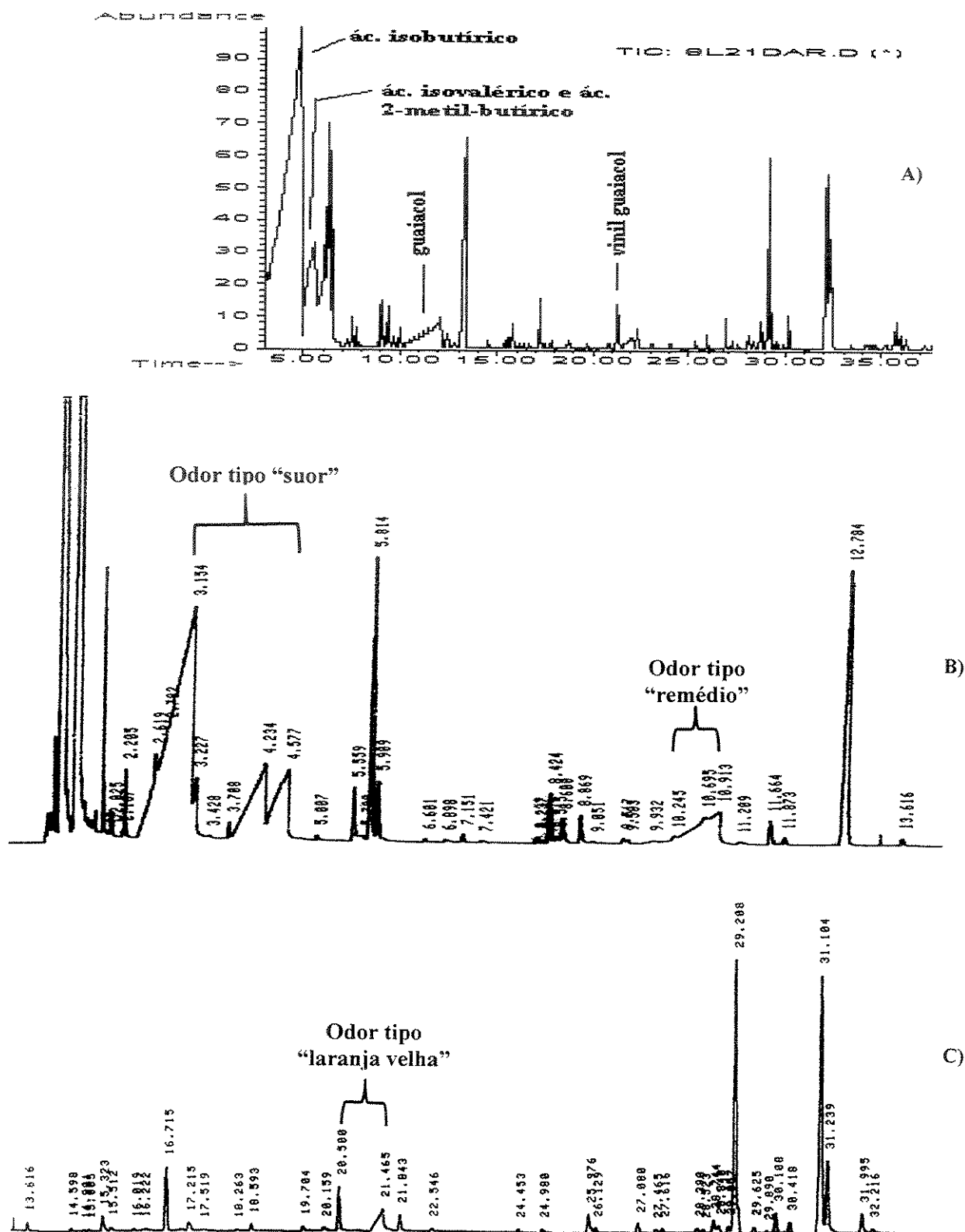


Figura 57. Cromatogramas do experimento CG/O realizado com amostra de suco de laranja com 21 dias de incubação preenchida com ar atmosférico. A) TIC (CG/EM: DB-5 30m) B) e C) expansões dos cromatogramas (CG-FID: DB-1 30m) na análise de CG/O associando t_r e odor percebido.

5.4 Conclusões

Os resultados obtidos indicaram que *Alicyclobacillus* são, de fato, os microrganismos responsáveis pela formação dos odores desagradáveis. Além disso, tanto hidrodestilação/extração com solvente, quanto as análises sensoriais olfativas provaram ser úteis para discriminação entre sucos de laranja frescos e deteriorados e na detecção de compostos importantes para a formação do aroma em sucos deteriorados. Os ácidos isobutírico, isovalérico e 2-metil-butírico são compostos responsáveis pelo problema de adulteração do aroma provocado por *Alicyclobacillus* nos sucos de laranja aqui estudados. As análises com melhor controle de deterioração pelos microrganismos confirmaram os efeitos sobre a composição dos voláteis provocados por estes microrganismos, principalmente nas amostras preenchidas com ar atmosférico.

Parte 6

*Estudos sintéticos visando obtenção
de benzofenonas isoladas de
Chusia spp.*

6. Estudos sintéticos visando obtenção de benzofenonas isoladas de *Clusia* spp.

6.1 Considerações Gerais

Os principais compostos encontrados nos gêneros de Guttiferae são xantonas e benzofenonas e, por conseqüência, são considerados marcadores taxonômicos desta família. Algumas destas benzofenonas possuem estruturas relativamente complexas^{169, 170}, e atividade biológica interessante^{167, 171, 172}, inclusive atividade anti-HIV. Parte destas benzofenonas foram isoladas em nosso grupo de pesquisa a partir das resinas florais de *Clusia* spp.^{173, 174, 175} (Figura 58) e, até o momento, nenhuma síntese total foi publicada. Estes fatos despertaram nosso interesse na obtenção de benzofenonas poliisopreniladas do tipo I e II (Figura 58) através de reações químicas.

Segundo dados publicados na literatura^{176, 177, 178}, as benzofenonas simples (sem substituintes alquílicos) são raras em Guttiferae sendo encontradas no caule de apenas 6 espécies (Figura 59).

¹⁶⁹ Gustafson, K.R.; Blunt, J.W.; Munro, M.H.G.; Fuller, R.W.; McKee, T.C.; Cardellina II, J.H.; McMahon, J.B.; Cragg, G.M.; Boyd, M.R. *Tetrahedron*, 1992, **48**, 10093.

¹⁷⁰ a) Fuller, R.W.; Westergaard, C.K.; Collins, J.W.; Cardellina II, J.H.; Boyd, M.R. *J. Nat. Prod.*, 1999, **62**, 67; b) Fuller, R.W.; Blunt, J.W.; Boswell, J.L.; Cardellina II, J.H.; Boyd, M.R. *ibid*, 1999, **62**, 130.

¹⁷¹ Roux, D.; Hadi, H.A.; Thoret, S.; Guénard, D.; Thoison, O.; Païs, M.; Sévenet, T. *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 1070.

¹⁷² Fukuyama, Y.; Kuwayama, A.; Minami, H. *Chem. Pharm. Bull.*, 1997, **45**, 947.

¹⁷³ de Oliveira, C.M.A. Tese de Doutorado. IQ/UNICAMP, 1997.

¹⁷⁴ Porto, A.L.M. Dissertação de Mestrado. IQ/UNICAMP, 1997.

¹⁷⁵ Machado, S.M.F. Tese de Doutorado. IQ/UNICAMP, em redação.

¹⁷⁶ Bennett, G.J.; Lee, H.-H. *Phytochemistry*, 1989, **28**, 967.

¹⁷⁷ Minami, H.; Kinoshita, M.; Fukuyama, Y.; Kodama, M.; Yoshizawa, T.; Sugiura, M.; Nakagawa, K.; Tago, H. *Phytochemistry*, 1994, **36**, 501.

¹⁷⁸ Minami, H.; Hamaguchi, K.; Kubo, M.; Fukuyama, Y. *Phytochemistry*, 1998, **49**, 1783.

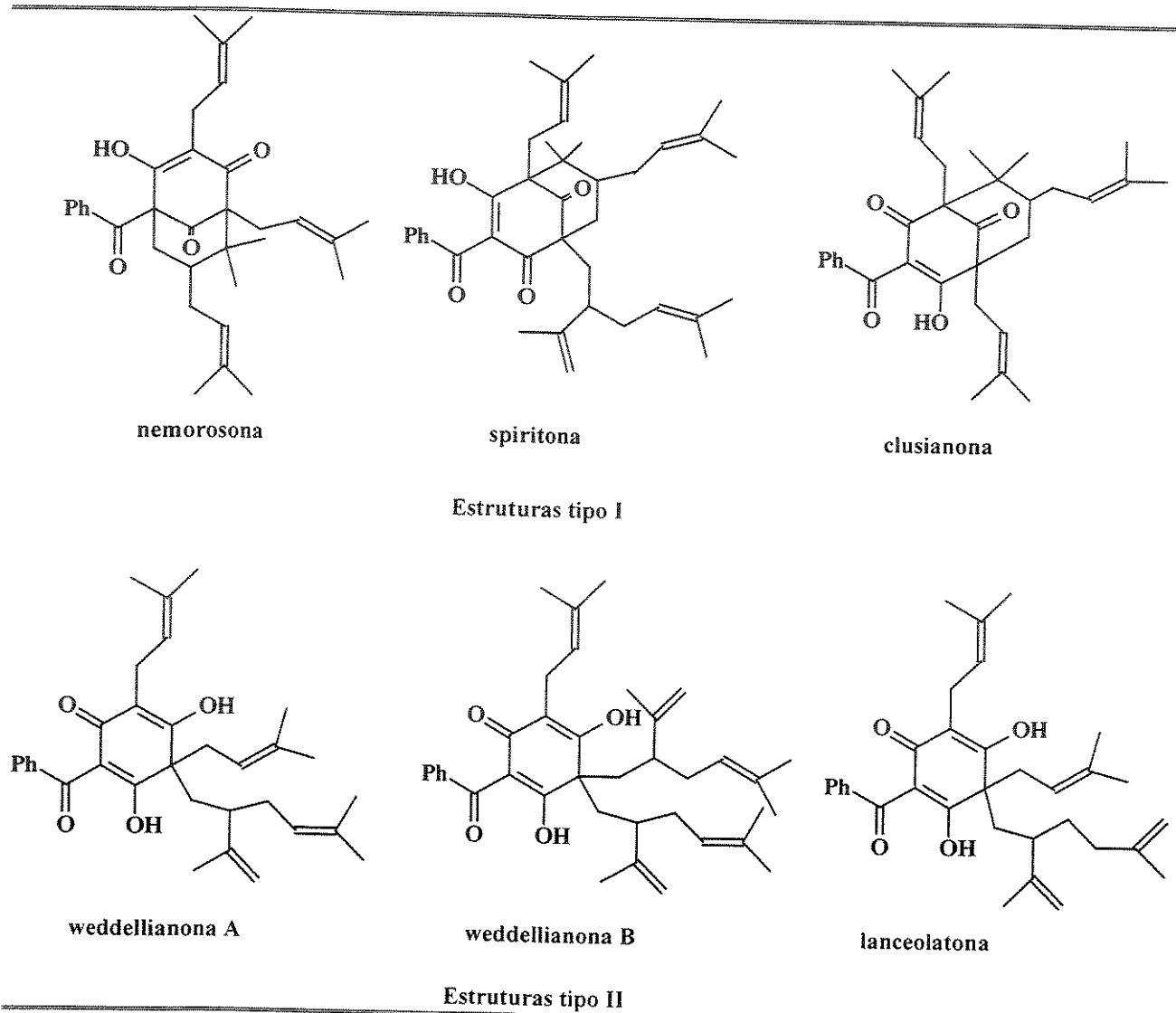


Figura 58. Benzofenonas poliisopreniladas isoladas da resina floral de *Clusia* spp.

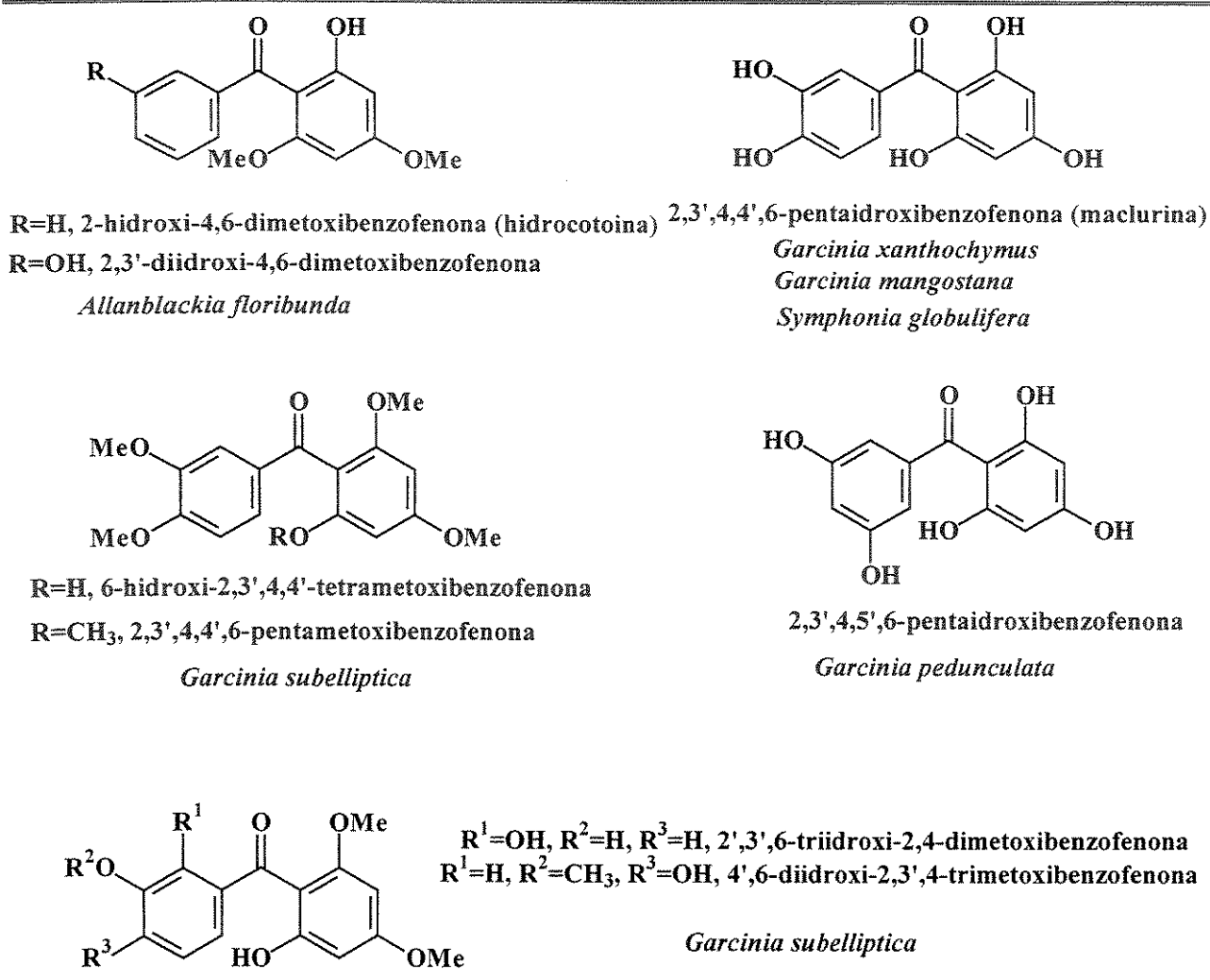


Figura 59. Benzofenonas simples encontradas em Guttiferae.

Já as benzofenonas preniladas podem ser divididas em 2 grupos: as benzofenonas verdadeiras (Figura 60 e 61) e as chamadas benzofenonas poliisopreniladas, ou seja, aquelas com o anel A reduzido. Os membros mais conhecidos do primeiro grupo são as clusianonas e as vismiafenonas, cujos nomes são originados a partir dos gêneros onde foram inicialmente isoladas, *Clusia* e *Vismia* respectivamente. De maneira geral, apresentam os grupos isoprenilas tanto na forma livre quanto ciclizados na forma de 2,2-dimetilcromenos e a síntese de alguns destes compostos foram obtidas através da

prenilação de derivados do floroglucinol¹⁷⁹. Outras benzofenonas verdadeiras conhecidas são as tovoftenonas A e B, as quais contêm uma rara cadeia lateral lavandulila, e a marupona que possui um grupo geranila na cadeia lateral.

¹⁷⁹ a) Ahluwalia, V.K.; Khanna, M.; Singh, R.P. *Indian J. Chem.*, 1981, **20B**, 990. b) Pathak, V.P.; Khanna, R.N. *Indian J. Chem.*, 1982, **21B**, 253. c) *ibid*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1982, **55**, 2264. d) *ibid*, *Indian J. Chem.*, 1984, **23B**, 571.

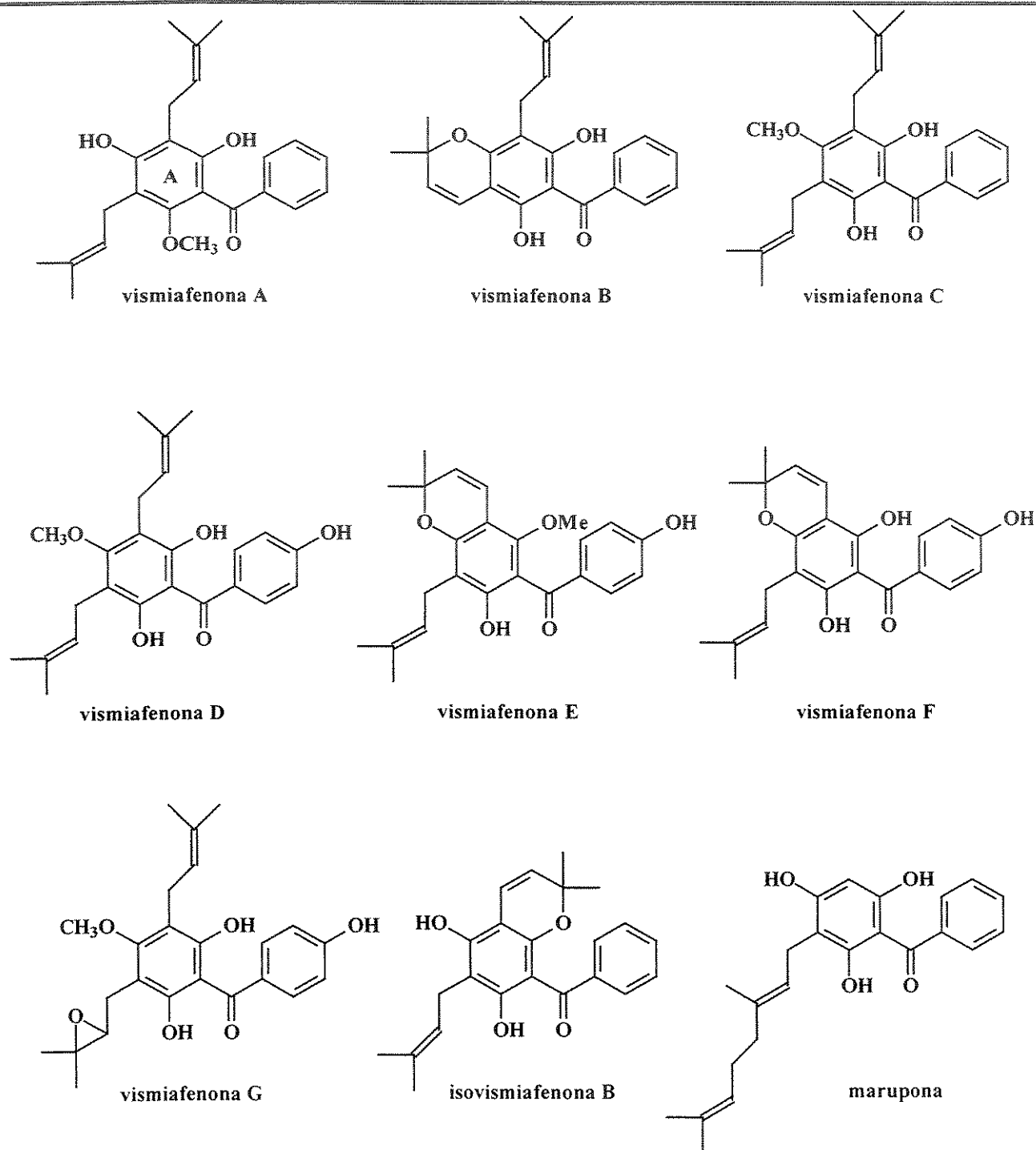


Figura 60. Algumas benzofenonas verdadeiras encontradas em Guttiferae.

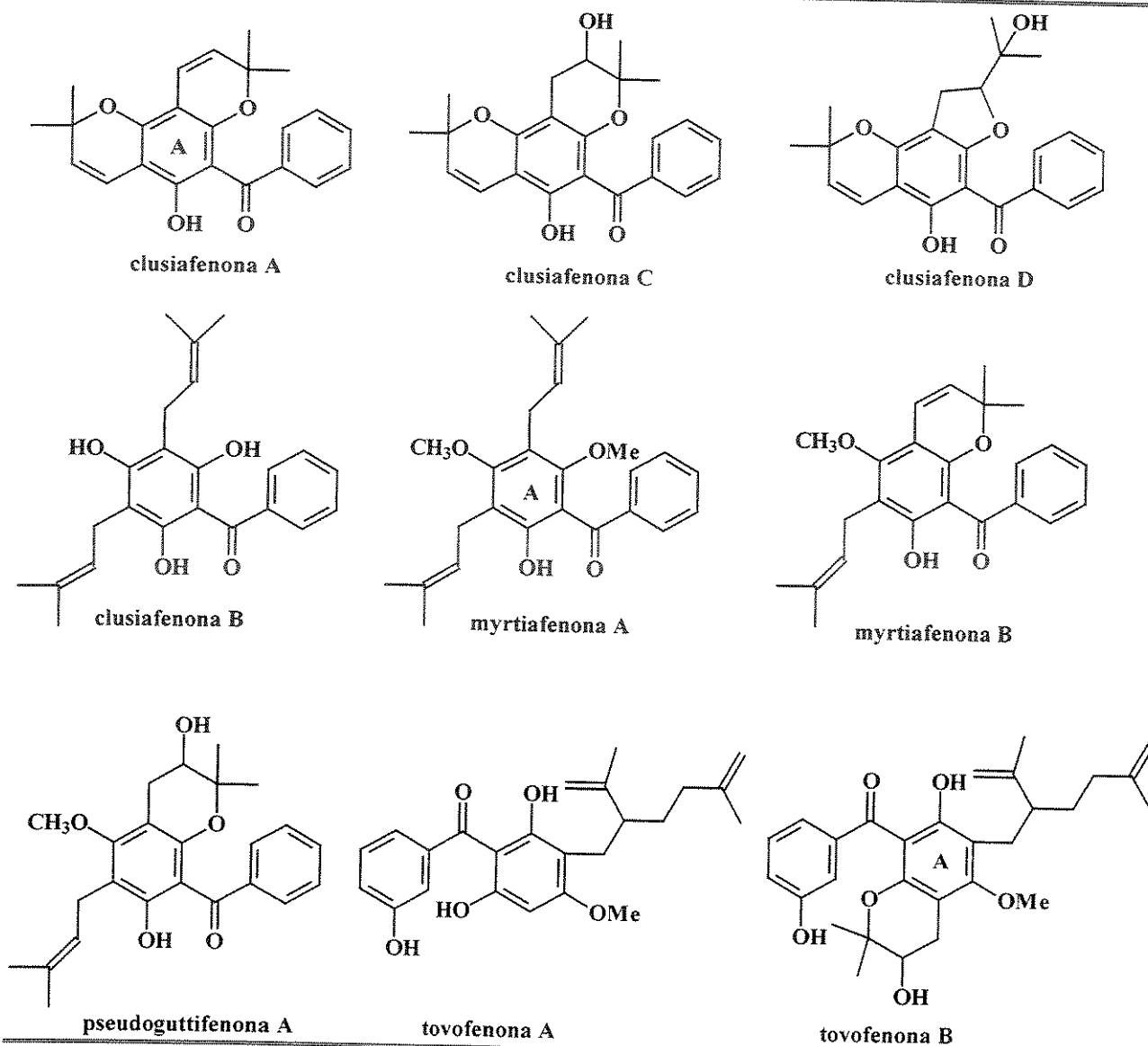


Figura 61. Algumas benzofenonas verdadeiras isoladas de Guttiferae.

Dentre as benzofenonas poliisopreniladas (possuem anel A reduzido) (Figuras 58, 62 e 63), as mais comuns são aquelas que possuem um esqueleto do tipo biciclo[3.3.1]noneno (Figuras 58 e 63), que tem sido isoladas de vários gêneros de Guttiferae: *Garcinia*, *Clusia*, etc. No entanto, alguns compostos apresentam grupos prenila ou geranila geminados como a machuona¹⁸⁰, encontrada nos frutos de *Clusia*

¹⁸⁰ Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Gacs-Baitz, E. *Phytochemistry*, 1991, **30**, 2003.

sandiensis; a grandona¹⁸¹, isolada da resina floral de *Clusia grandiflora* e a kolanona, oriunda dos frutos comestíveis de *Garcinia kola* que apresentou uma ampla atividade antimicrobial¹⁸² (Figura 62).

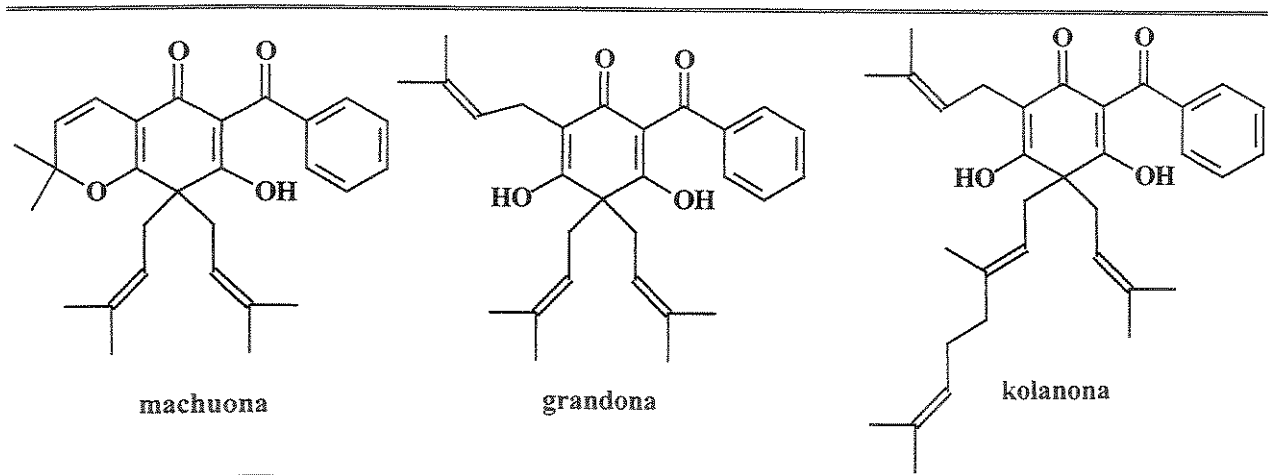


Figura 62. Benzofenonas poliisopreniladas isoladas de Guttiferae.

Do ponto de vista biossintético, as benzofenonas tricíclicas como o nemorosonol e as benzofenonas bicíclicas como a clusianona e estruturas análogas, são estruturalmente próximas e a diferença entre elas pode consistir apenas no número de etapas de ciclização de um provável precursor comum¹⁸³ (ciclização entre C-1 e C-6 para formar os compostos bicíclicos e entre C-10-C-1 e C-6-C-7 formando compostos tricíclicos) (Figura 63).

¹⁸¹ de Oliveira, C.M.A.; Porto, A.M.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A.J. *Tetrahedron Lett.*, 1996, **36**, 6427.

¹⁸² Hussain, R.A.; Owegby, A.G.; Parimoo, P.; Waterman, P.G. *Planta Med.*, 1982, **44**, 78.

¹⁸³ Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Pinheiro, R.M.; Radics, L. *Phytochemistry*, 1988, **27**, 2305.

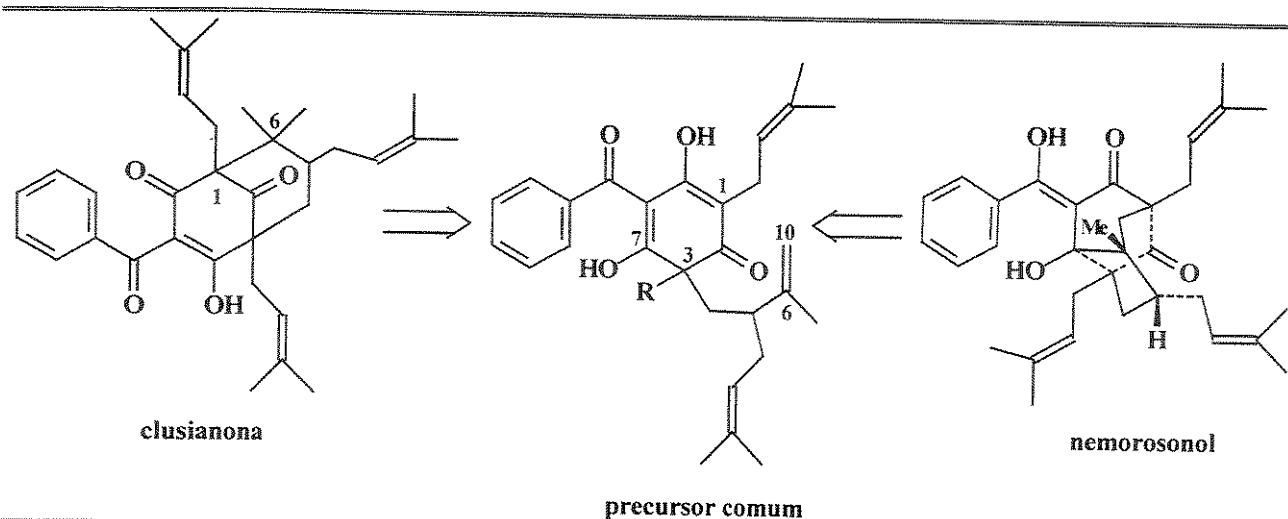


Figura 63. Proposta de formação das benzofenonas poliisopreniladas bi- e tricíclicas.

Embora não haja um estudo sobre a rota biossintética das benzofenonas poliisopreniladas é possível fazer uma analogia com os estudos sobre a biossíntese dos componentes do lúpulo (*Humulus lupulus*-Cannabaceae), os chamados α -ácidos e β -ácidos, como humulona e lupulona respectivamente (Figura 64). Algumas propostas foram descritas na literatura, inspiradas nos trabalhos pioneiros de Collie¹⁸⁴ (1907) e Birch *et al.*¹⁸⁵ (1953), os quais sugeriram uma possível biogênese de compostos aromáticos derivados do floroglucinol através da ciclização de Dieckmann de um poli- β -ceto-ácido (Esquema 4).

¹⁸⁴ Collie, J.N. *Proc. Chem. Soc. (London)*, 1907, **23**, 230.

¹⁸⁵ Birch, A.J.; Donovan, F.W. *Austral. J. Chem.*, 1953, **6**, 360.

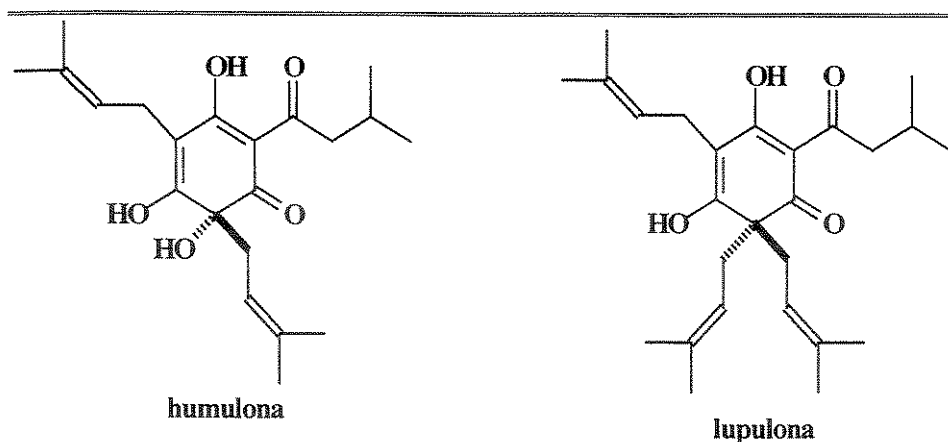
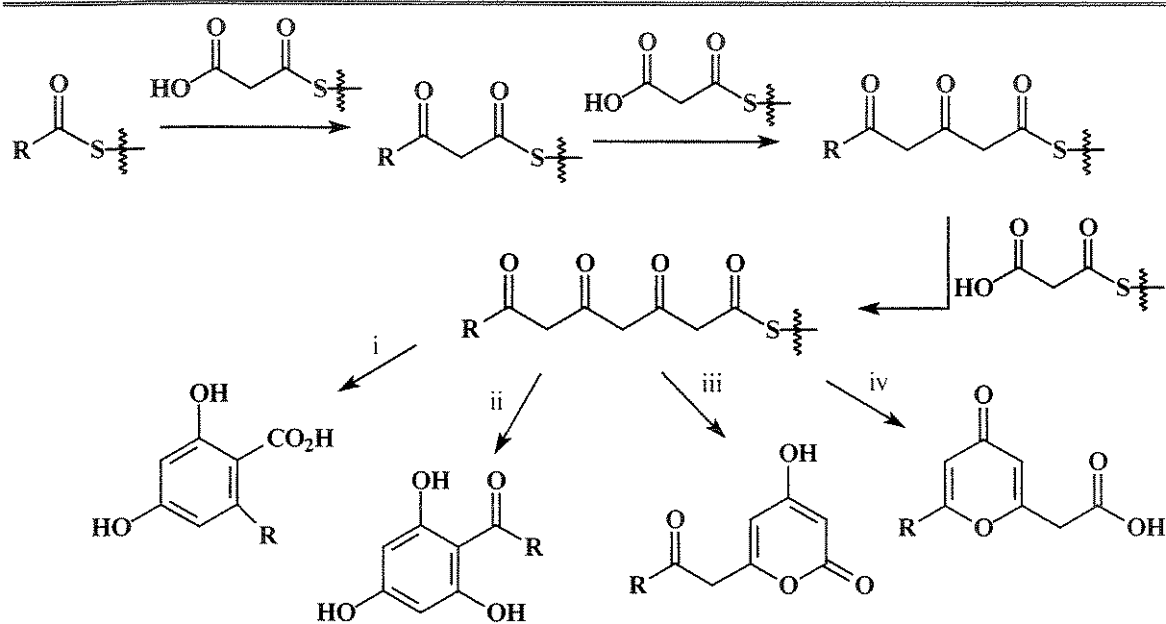


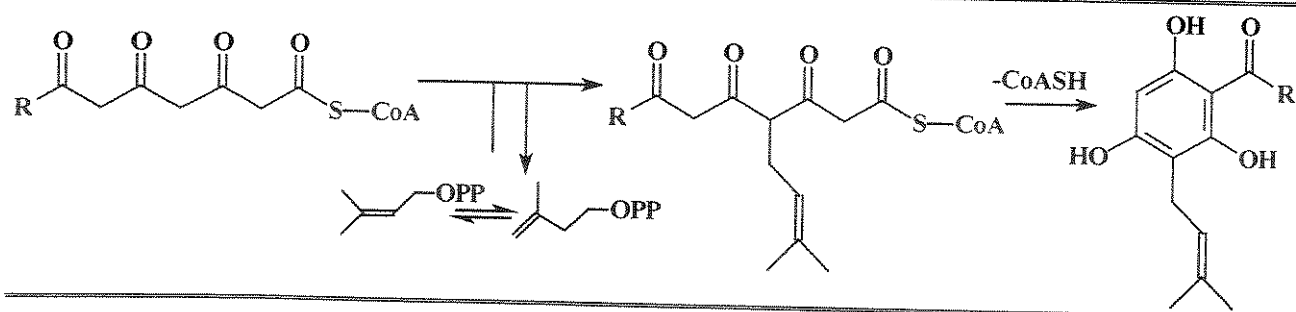
Figura 64. Estrutura dos compostos lupulona e humulona.



Esquema 4. Caminho biossintético para os polifenóis a partir de um policetídeo.

Uma das primeiras idéias foi publicada por Drawert e Beier¹⁸⁶ em 1976, os quais sugeriram que a primeira prenilação poderia ocorrer no policetídeo num estágio anterior a ciclização (Esquema 5).

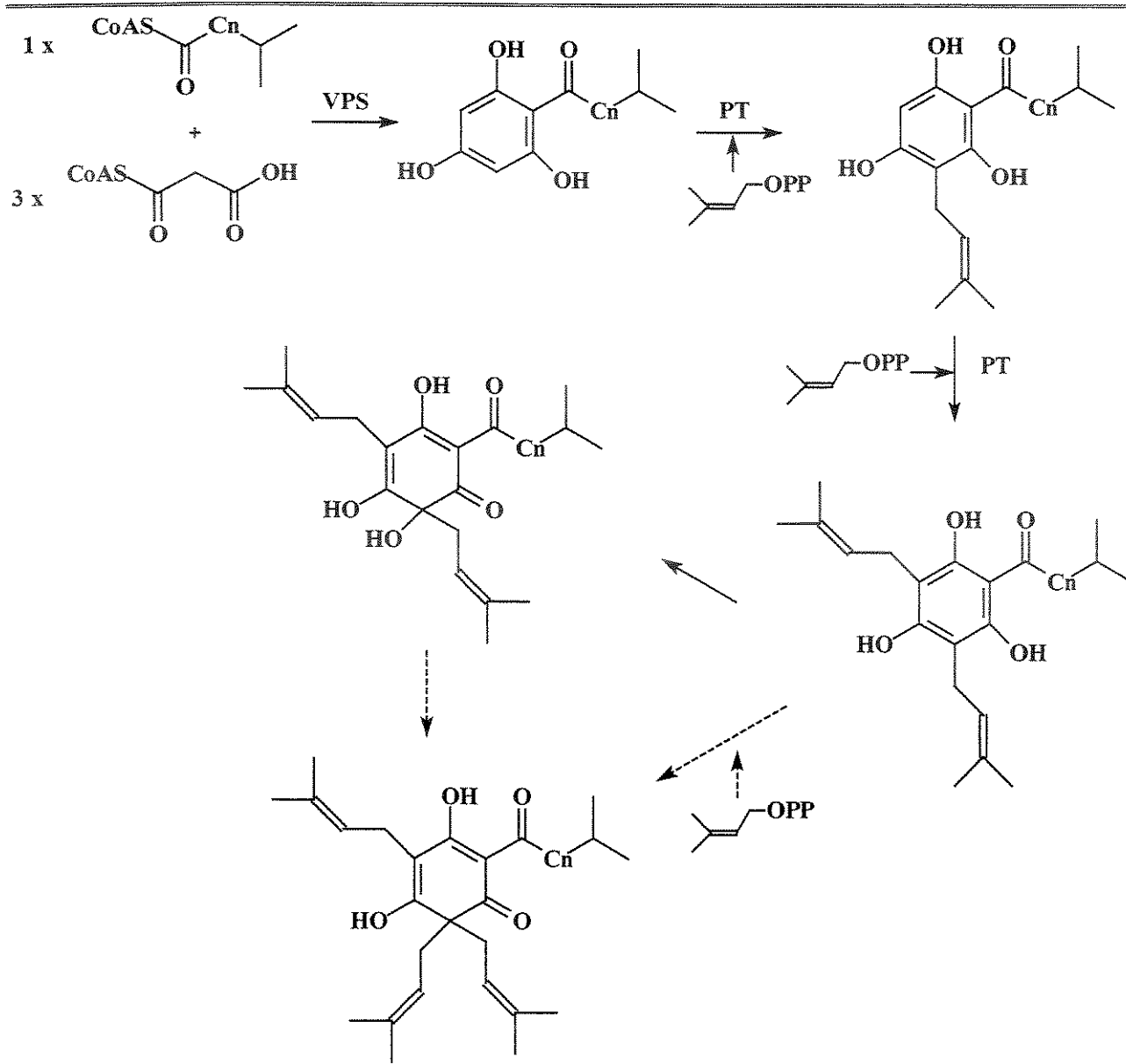
¹⁸⁶ Drawert, F.; Beier, J. *Phytochemistry*, 1976, **15**, 1695.



Esquema 5. Caminho biossintético proposto por Drawert e Beier.

Verpoorte *et al.*¹⁸⁷, posteriormente, sugeriram que a prenilação poderia ocorrer após a ciclização do poliketídeo num intermediário acilfloroglucinol. Esta hipótese foi recentemente comprovada através do isolamento da enzima valerofenona sintase (VPS) a partir do lúpulo, bem como através de experimentos de prenilação *in vitro*^{187d} com seus extratos de proteínas (Esquema 6).

¹⁸⁷ a) Fung, S.-Y.; Brusse, J.; Van der Hoeven, R.A.M.; Niessen, W. M.A.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *J. Nat.Prod.*, 1994, **57**, 452. b) Zuurbier, K.W.M.; Fung, S.-Y.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *Phytochemistry*, 1995, **38**, 77. c) Fung, S.-Y.; Zuurbier, K.W.M.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *ibid*, 1997, **44**, 1047. d) Zuurbier, K.W.M.; Fung, S.-Y.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *ibid*, 1998, **49**, 2315.



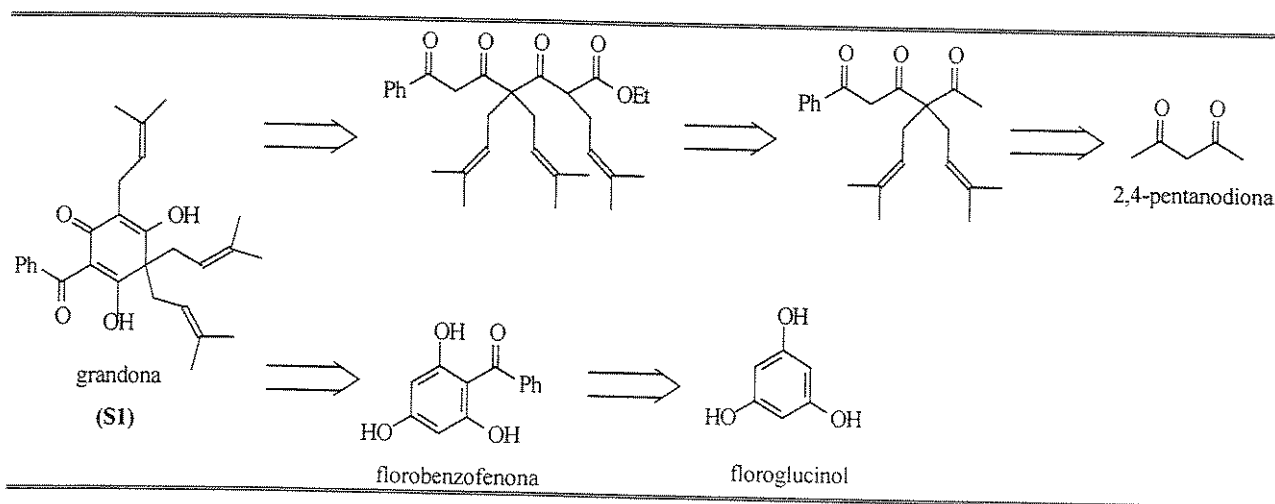
Esquema 6. Rota biossintética para lupulona proposta por Verpoorte *et al.*

6.2 Objetivos

Nosso objetivo nesta última etapa do trabalho era desvendar uma rota sintética viável, que permitisse o fácil acesso aos diversos isômeros das benzofenonas poliisopreniladas isoladas de Guttiferae. Nesta etapa somente racematos seriam produzidos para, posteriormente, elaborar a síntese enantiosseletiva.

6.3 Resultados e discussão

Com as hipóteses propostas por Drawert e Beier¹⁸⁸ e Verpoorte¹⁸⁹ *et al.* em mente, propusemos duas estratégias sintéticas (Esquema 7), mimetizando as possíveis rotas biossintéticas para os compostos tipo II (Figura 58) isolados de *Clusia*:



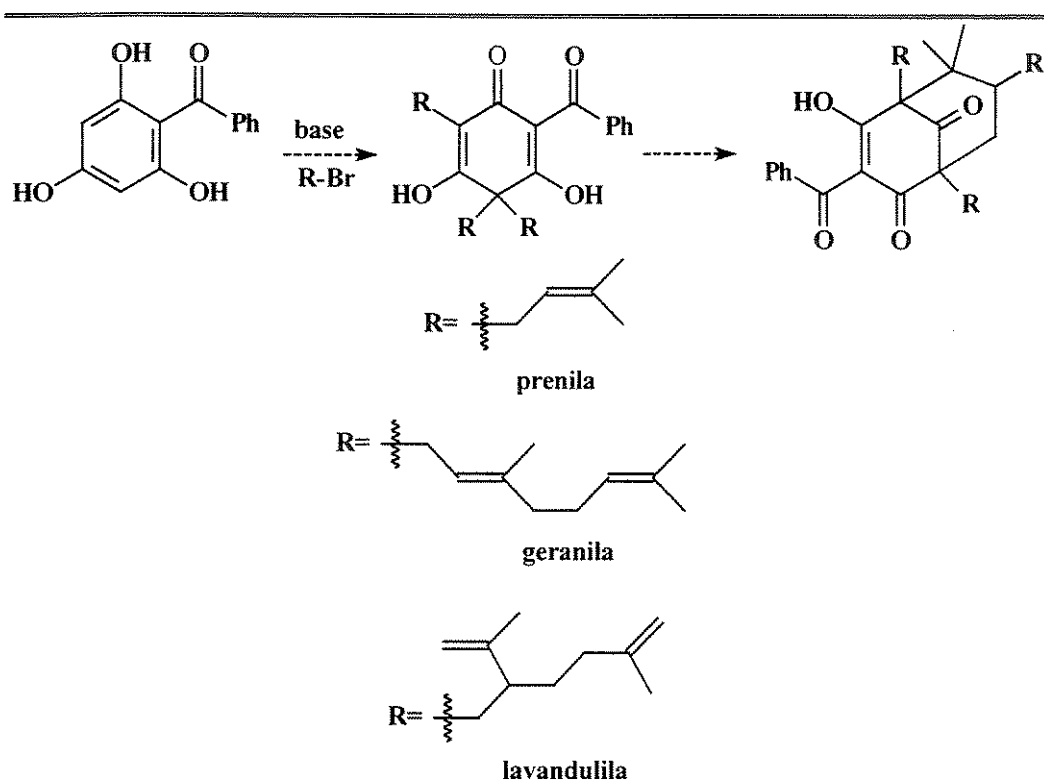
Esquema 7. Proposta de retróssíntese para as benzofenonas poliisopreniladas via 2 caminhos biomiméticos.

¹⁸⁸ Drawert, F.; Beier, J. *Phytochemistry*, 1976, **15**, 1695.

¹⁸⁹ a) Fung, S.-Y.; Brusse, J.; Van der Hoeven, R.A.M.; Niessen, W. M.A.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *J. Nat. Prod.*, 1994, **57**, 452. b) Zuurbier, K.W.M.; Fung, S.-Y.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *Phytochemistry*, 1995, **38**, 77. c) Fung, S.-Y.; Zuurbier, K.W.M.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *ibid*, 1997, **44**, 1047. d) Zuurbier, K.W.M.; Fung, S.-Y.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *ibid*, 1998, **49**, 2315.

- 1) De acordo com Drawert e Beier, a alquilação seria realizada nos compostos policetídicos, imaginando que a 2,4-pentanodiona poderia sofrer reações de alquilação e condensação sequencialmente, produzindo um tricetoéster. Este, posteriormente, forneceria após ciclização, a benzofenona desejada (S1).
- 2) Com base na proposta de Verpoorte *et al.*, partir-se-ia do floroglucinol, o qual após reações de acilação e alquilação produziria o composto alvo, a grandona (S1), um produto natural isolado da resina floral de *Clusia grandiflora*¹⁹⁰.

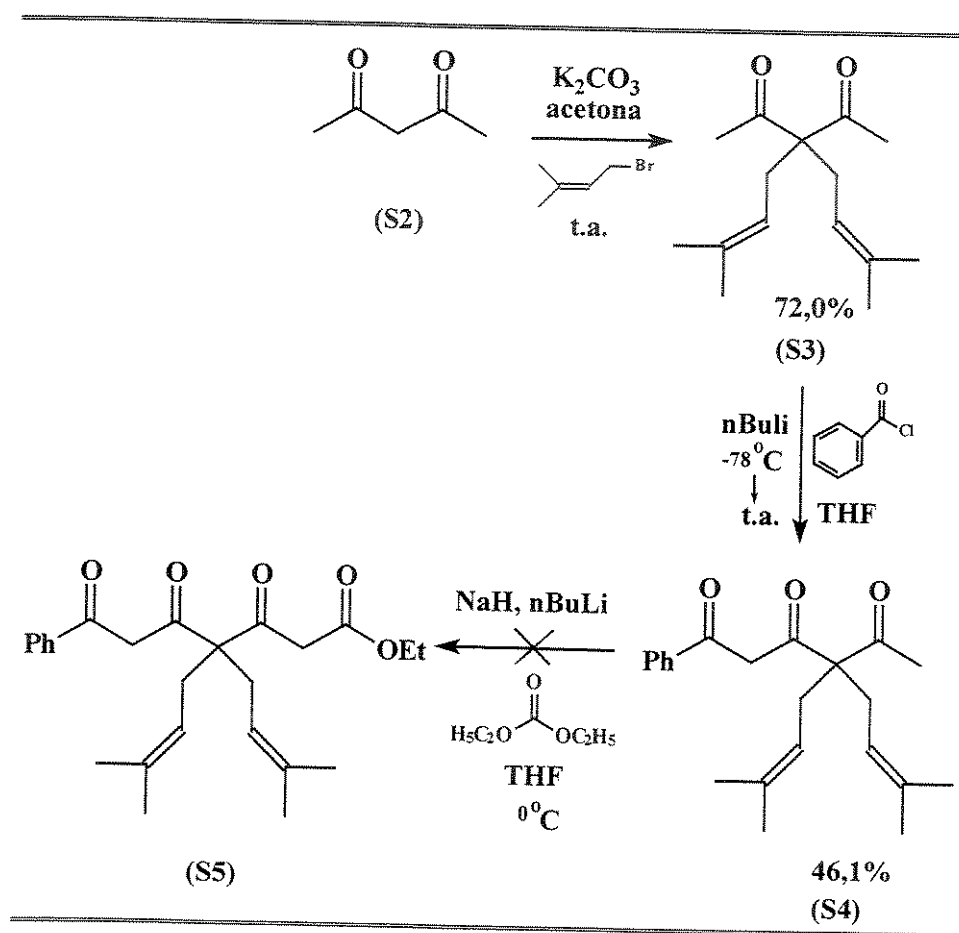
Estas idéias poderiam nos levar a um caminho sinteticamente viável, através do qual, variando-se as cadeias laterais (grupos prenila, geranila, lavandulila), obteríamos os precursores das ciclizações desejadas (estruturas tipo II, Figura 58) e as benzofenonas com esqueleto biciclo[3.3.1]noneno (estrutura tipo I, Figura 58) (Esquema 8).



Esquema 8. Proposta para obtenção dos precursores das benzofenonas bicíclicas.

¹⁹⁰ de Oliveira, C.M.A.; Porto, A.M.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A.J. *Tetrahedron Lett.*, 1996, **36**, 6427.

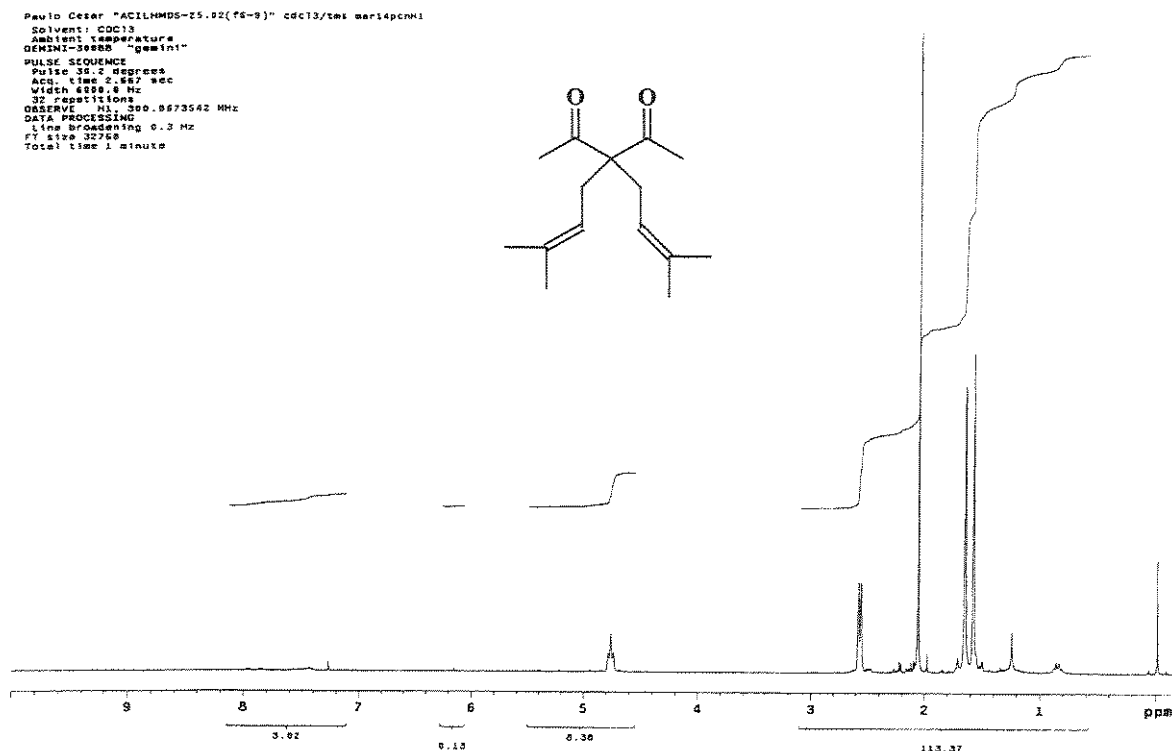
Assim, as duas rotas foram desenvolvidas simultaneamente visando a otimização das condições reacionais, ou seja, a rota sintética mais viável. Por uma questão didática, a estratégia 1 (Esquema 7) será discutida inicialmente. Assim, a dialquilação da 2,4-pentanodiona^{191, 192} (S2) foi realizada sob condições brandas usando K₂CO₃, brometo de prenila (1-bromo-3-metil-2-buten-1-ol) em acetona, a temperatura ambiente, obtendo-se o composto 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3) com 72,0% rendimento (Esquema 9), o qual foi caracterizado através de RMN de ¹H, de ¹³C, DEPT 90 e 135° e EM (E5-E8).



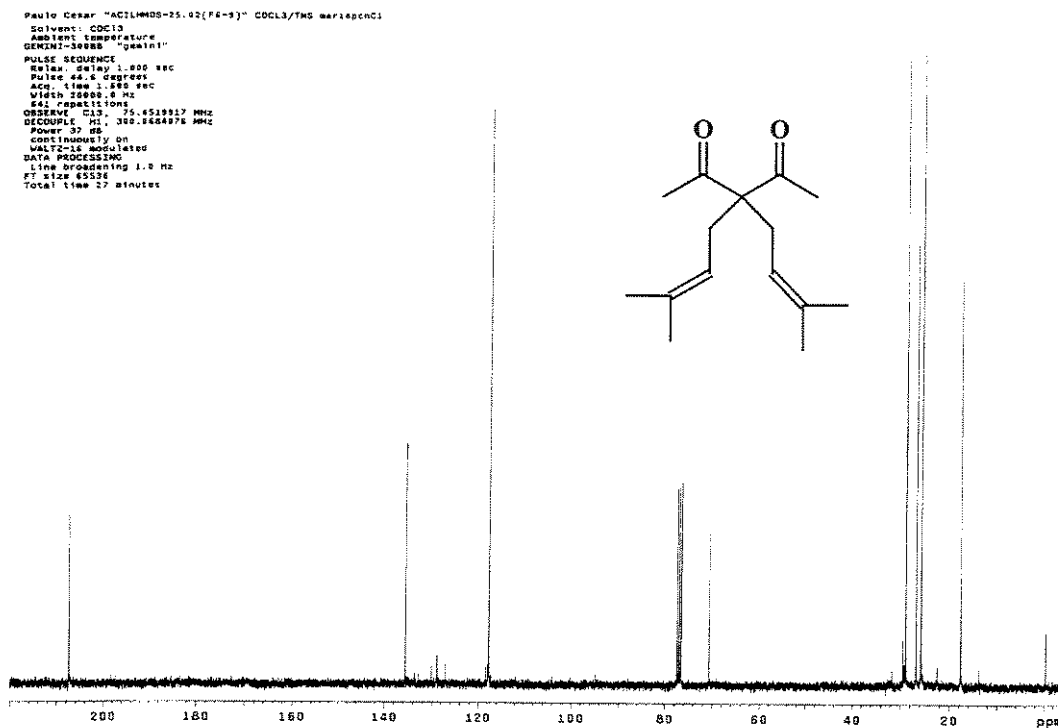
Esquema 9. Tentativa de obtenção do tricetoéster (S5).

¹⁹¹ Ranu, B.C.; Bhar, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1992, (3), 365.

¹⁹² De Araújo, A.C.V.; de Almeida, F.V.; Bieber, L.W. *Quim.Nova*, 1996, **19**, 79.

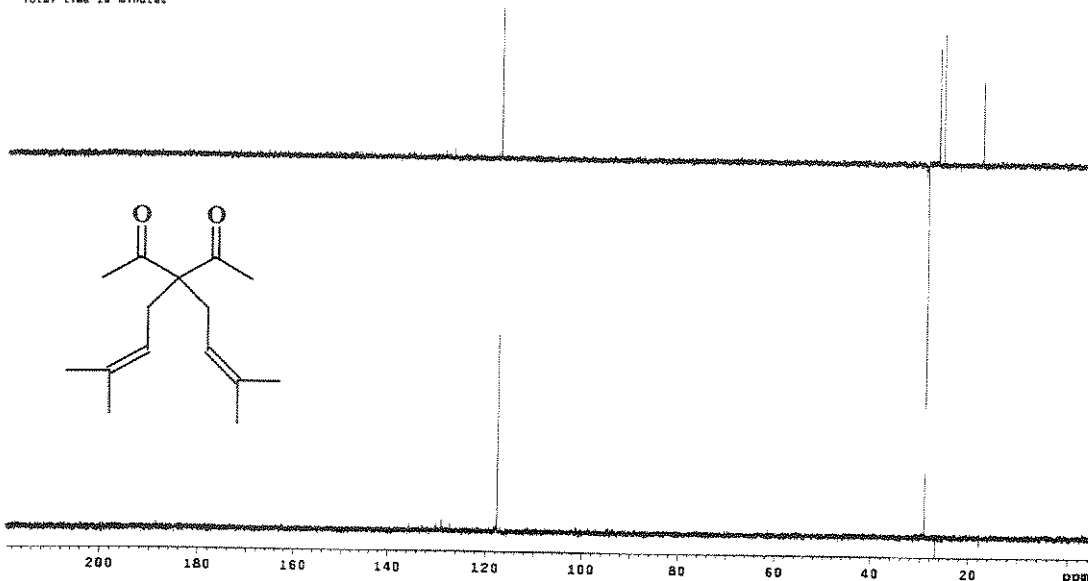


E5: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3).



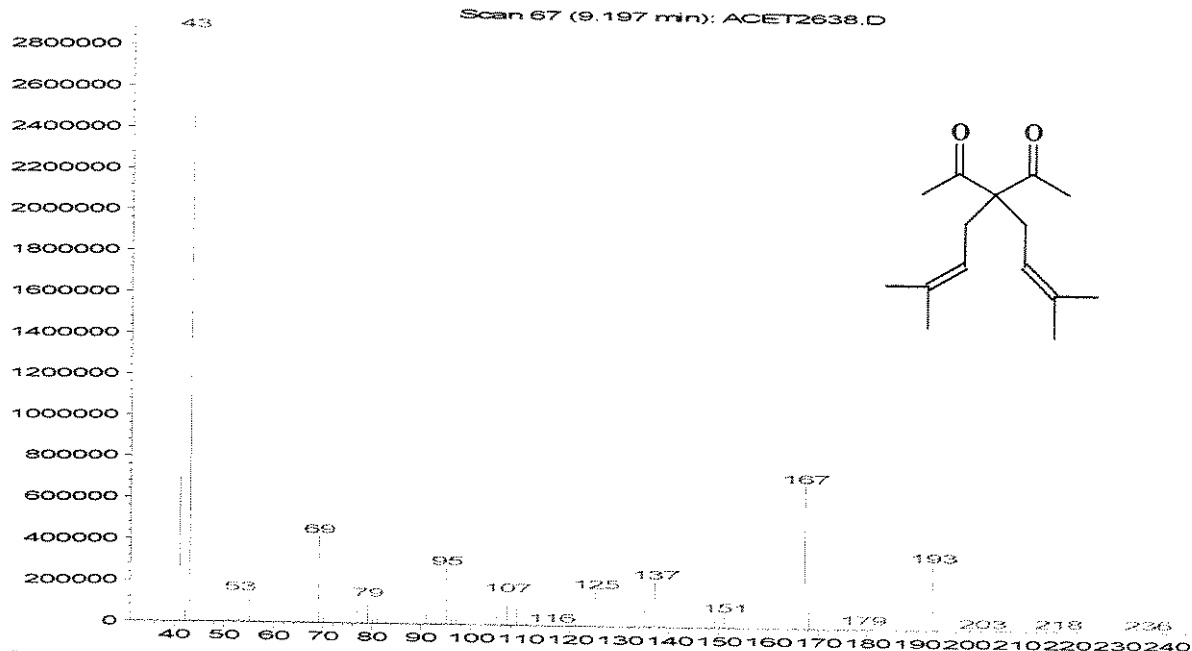
E6: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3).

Paulo Cesar "ACILHMDS-25.02(F6-9)" CQCL3/TMS mar14pcn01
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 GEMINI-3000B "gemin1"
 PULSE SEQUENCE: dept
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 35.0 degrees
 Acq. time 1.000 sec
 Width 17354.4 Hz
 132 repetitions
 DESSAVE CL3, 75.451890 MHz
 DECOUPLE H1, 300.0604970 MHz
 Power 37 dB
 on during acquisition
 off during delay
 VALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 15 minutes



E7: Espectro de DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl₃) da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3).

Abundance



E8: Espectro de massas (IE, 70 eV) da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3).

Na etapa seguinte, a condensação do enolato formado a partir do composto dialquilado (**S3**) com cloreto de benzoíla foi efetuada (Tabela 6) variando-se as bases utilizadas (nBuLi, LHMDs, NHMDs, LDA ou NaH).

Tabela 6: Condições usadas para na reação de acilação da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona.

	base	produto	%
1	nBuLi	1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (S4)	46,1
2	LHMDs	1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (S4)	31,5
3	NHMDs	Produto da clivagem retro-Claisen (S6)	-
4	LDA	subproduto não identificado	86,5
5	NaH	Produto da clivagem retro-Claisen (S6)	-

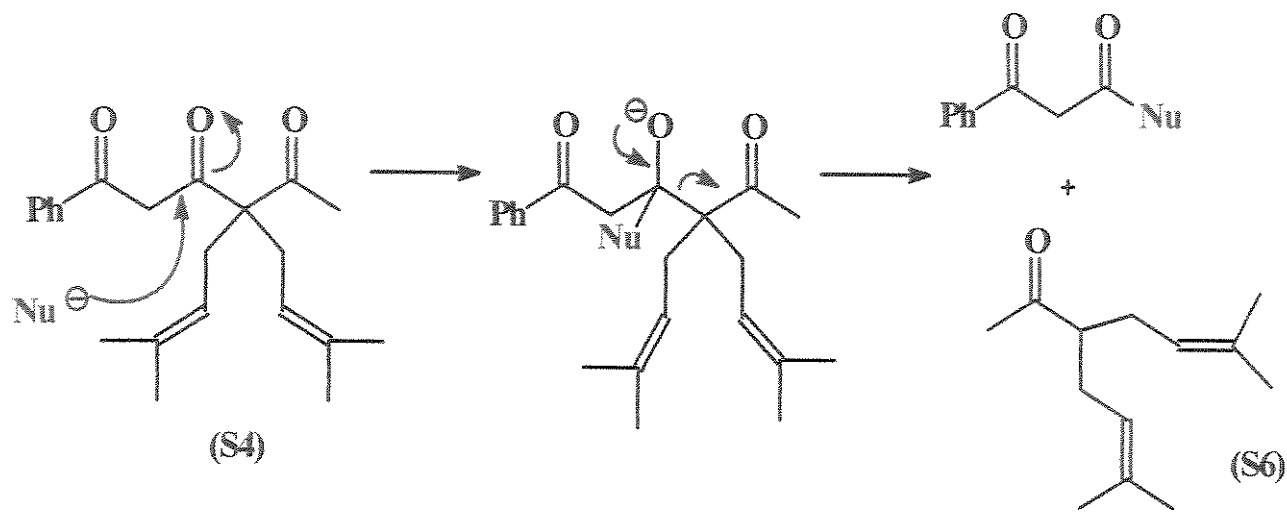
Nossos melhores resultados foram obtidos apenas quando utilizamos nBuLi e LHMDs, obtendo-se o produto 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (**S4**) com os rendimentos variando entre 30 a 50% (Esquema 9). Este composto foi identificado através de RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT 90 e 135° e EM de uma mistura tautomérica (E9-E12). Quando utilizamos nBuLi como base, os resultados foram mais reprodutíveis e com menor formação do subproduto oriundo da clivagem retro-Claisen¹⁹³ (**S6**) (Esquema 10, E13-E16). Para nossa surpresa, quando utilizamos LDA como base, obtivemos 13,5% do material de partida e 86,5% de uma mistura não elucidada, entretanto, com base nos relatos publicados por Harris *et al.*¹⁹⁴, poderia ser um produto oriundo do ataque da diisopropilamina à carbonila do composto (**S3**). As tentativas de obtenção do tricetoéster através da condensação da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (**S4**) com carbonato de dietila^{195, 196} falharam tanto na presença de NaH/nBuLi (Esquema 9) quanto NaH/KH, produzindo novamente apenas o produto da clivagem retro-Claisen (**S6**).

¹⁹³ Ward, R.S. *Bifunctional compounds*. Oxford Univ. Press, Oxford, 1994, p. 51.

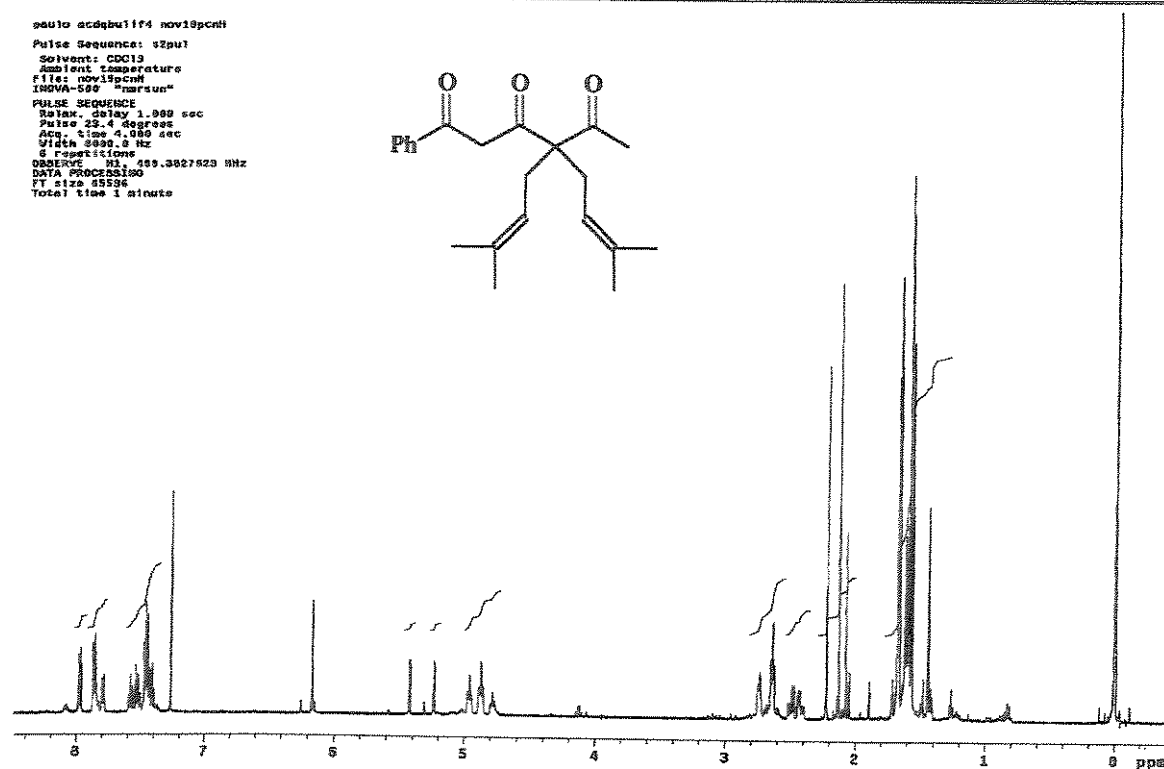
¹⁹⁴ Harris, T.M.; Murphy, G.P.; Poje, A.J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 7733.

¹⁹⁵ Sandifer, R.M.; Battacharya, A.K.; Harris, T.M. *J. Org. Chem.*, 1971, **46**, 2260.

¹⁹⁶ Alderdice, M.; Sum, F.W.; Weiler, L. *Org. Synth.*, 1984, **62**, 14.

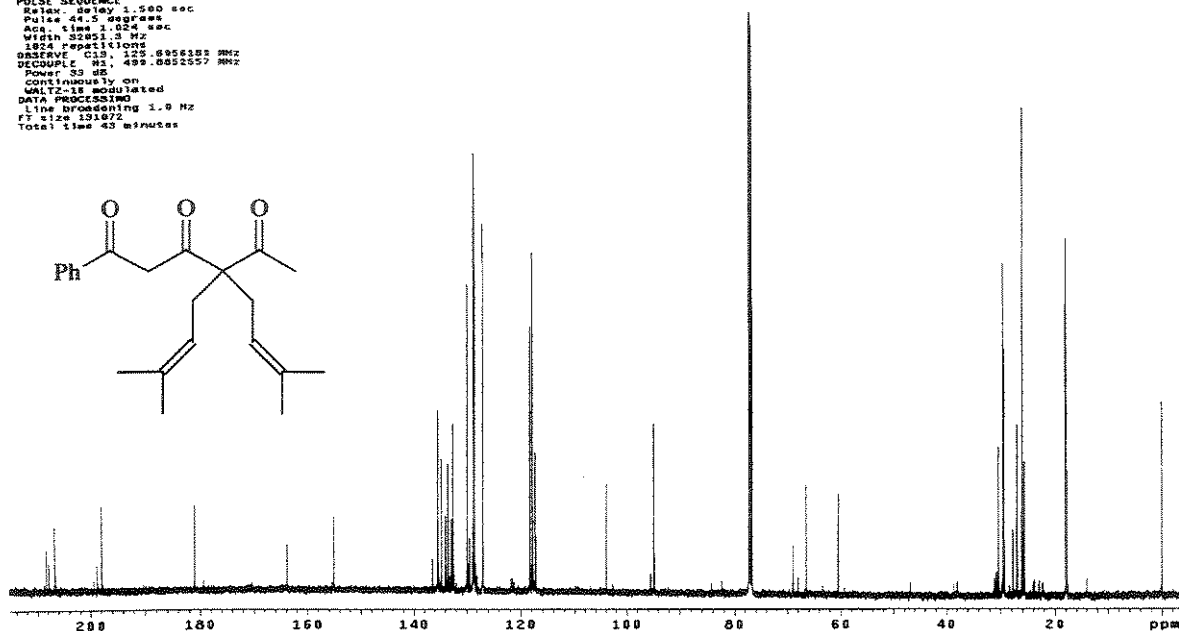


Esquema 10. Proposta de mecanismo para formação do produto retro-Claisen (S6).



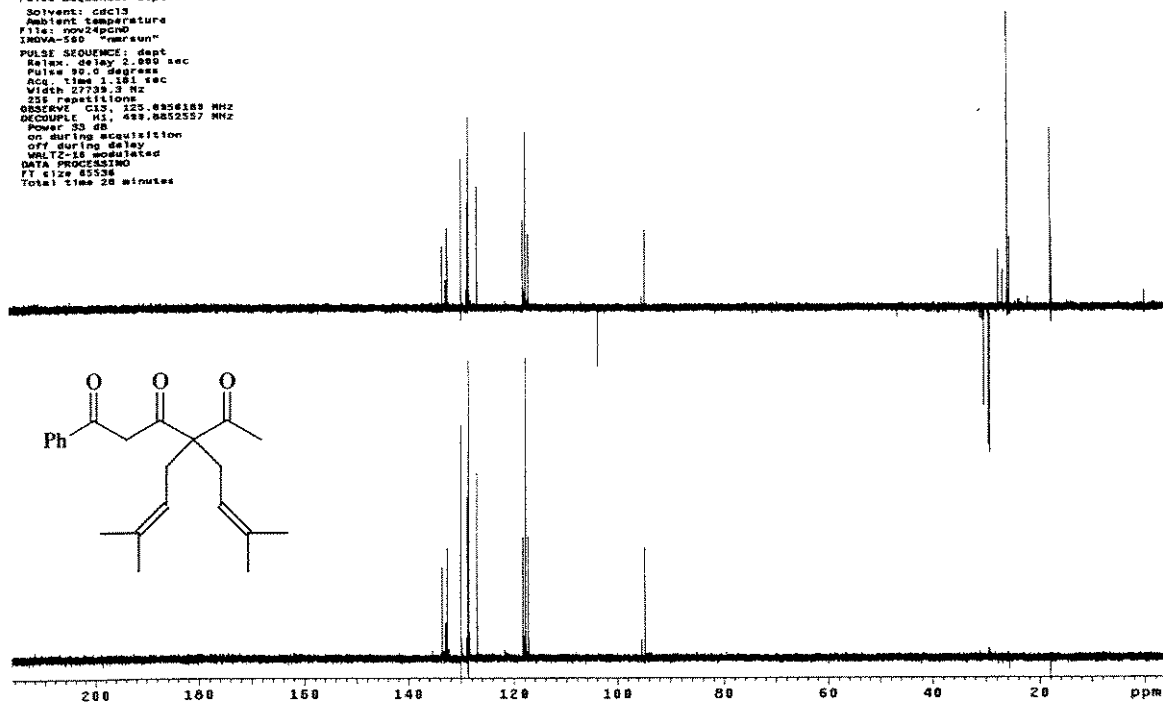
E9: Espectro RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotrião (S4).

Paulo "ACD05ULIF4" nov24pcnC
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 User: 1-14-87
 File: nov24pcnC
 INOVA-500 "nmrsum"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.500 sec
 Pulse 44.5 degrees
 Acq. time 1.024 sec
 Width 32851.3 Hz
 1024 Repetitions
 OBSERVE C13, 125.6956189 MHz
 DECOUPLE H1, 499.8052557 MHz
 Power 33 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 131072
 Total time 45 minutes



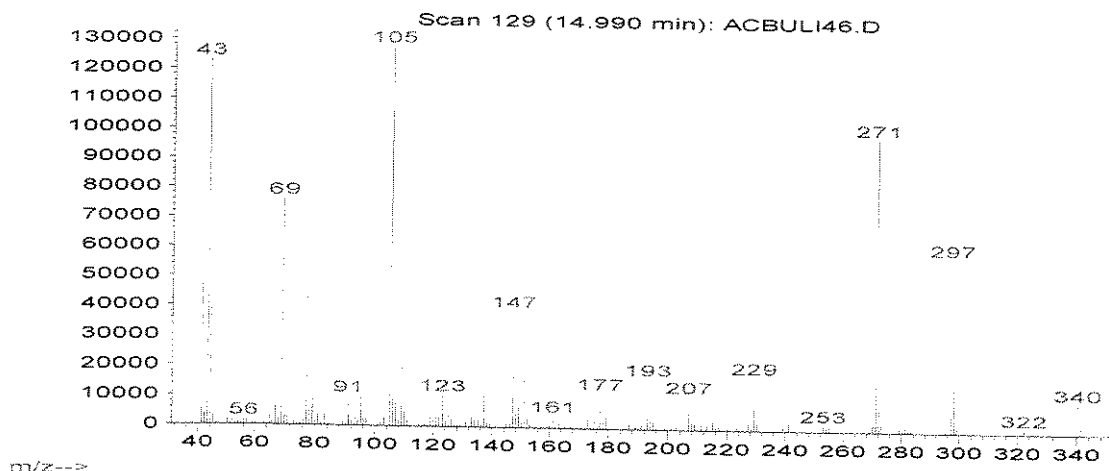
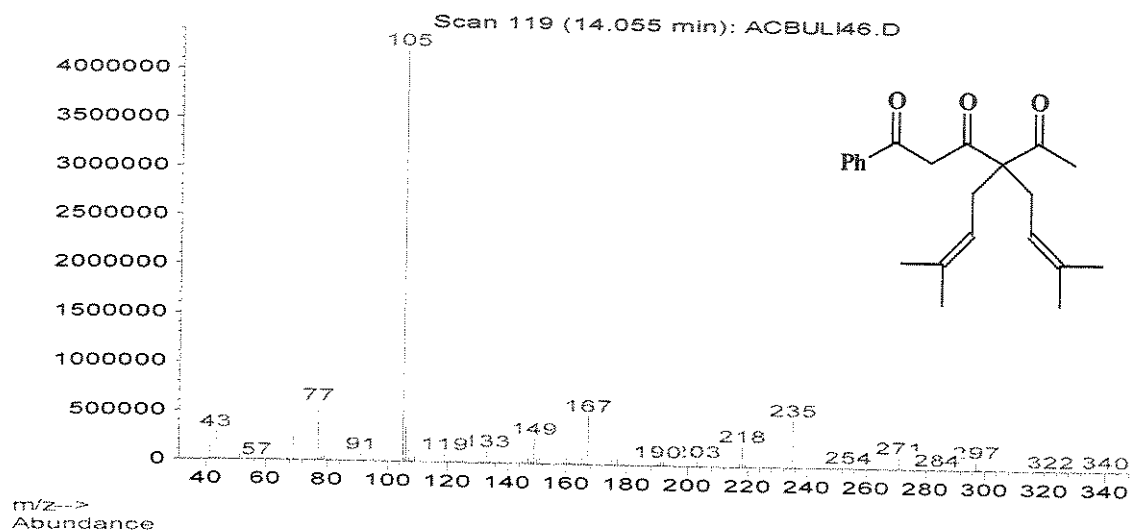
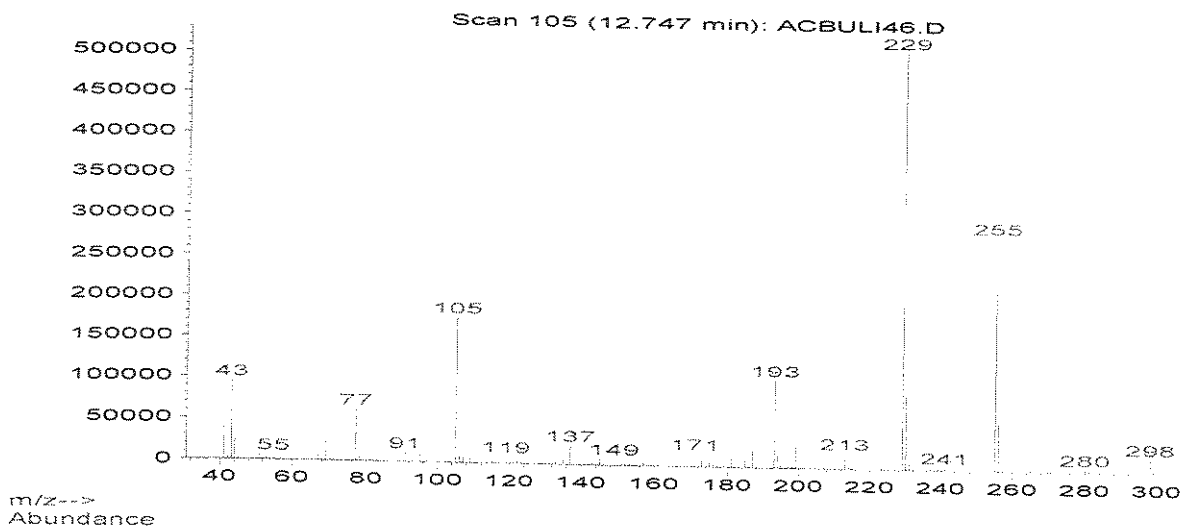
E10: Espectro RMN de ¹³C (125,70 MHz, CDCl₃) da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (S4).

Paulo "ACD05ULIF4" nov24pcnD
 Pulse Sequence: dept
 Solvent: cdcl3
 Ambient temperature
 User: 1-14-87
 File: nov24pcnD
 INOVA-500 "nmrsum"
 PULSE SEQUENCE: dept
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.101 sec
 Width 27739.3 Hz
 256 Repetitions
 OBSERVE C13, 125.6956189 MHz
 DECOUPLE H1, 499.8052557 MHz
 Power 33 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 FT size 45536
 Total time 28 minutes



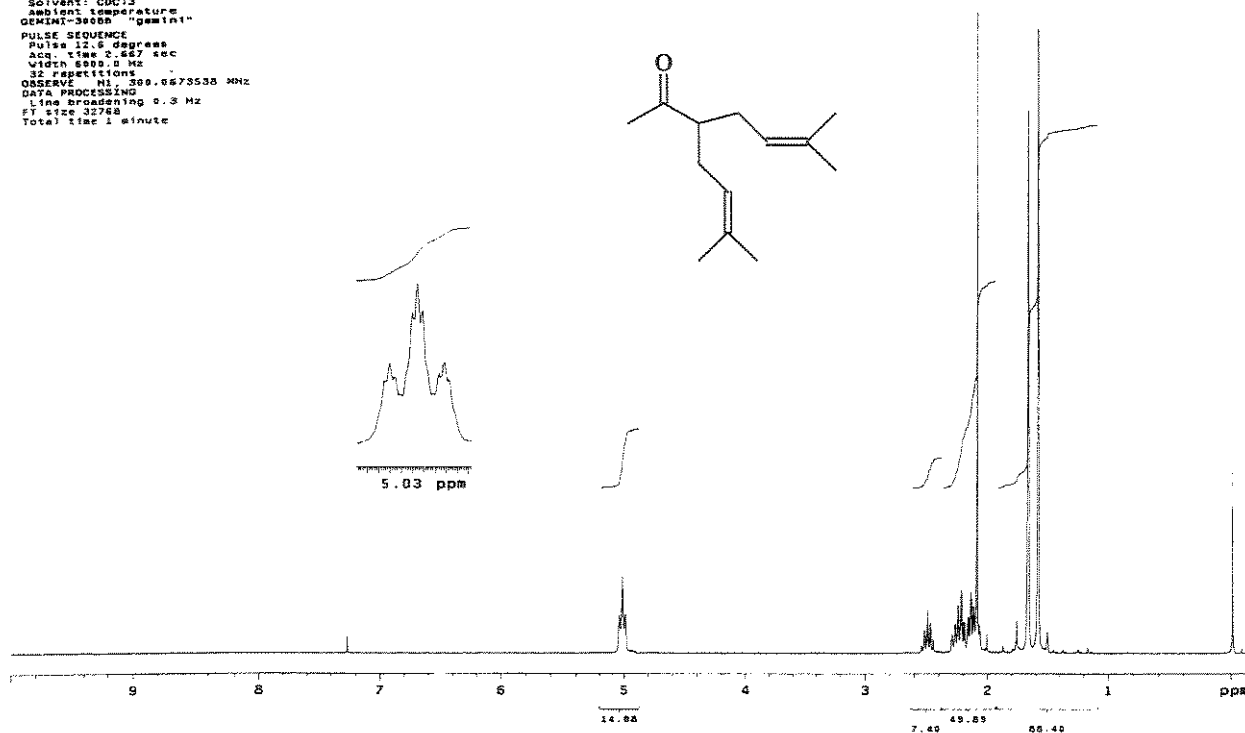
E11: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, CDCl₃) da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (S4).

Abundance



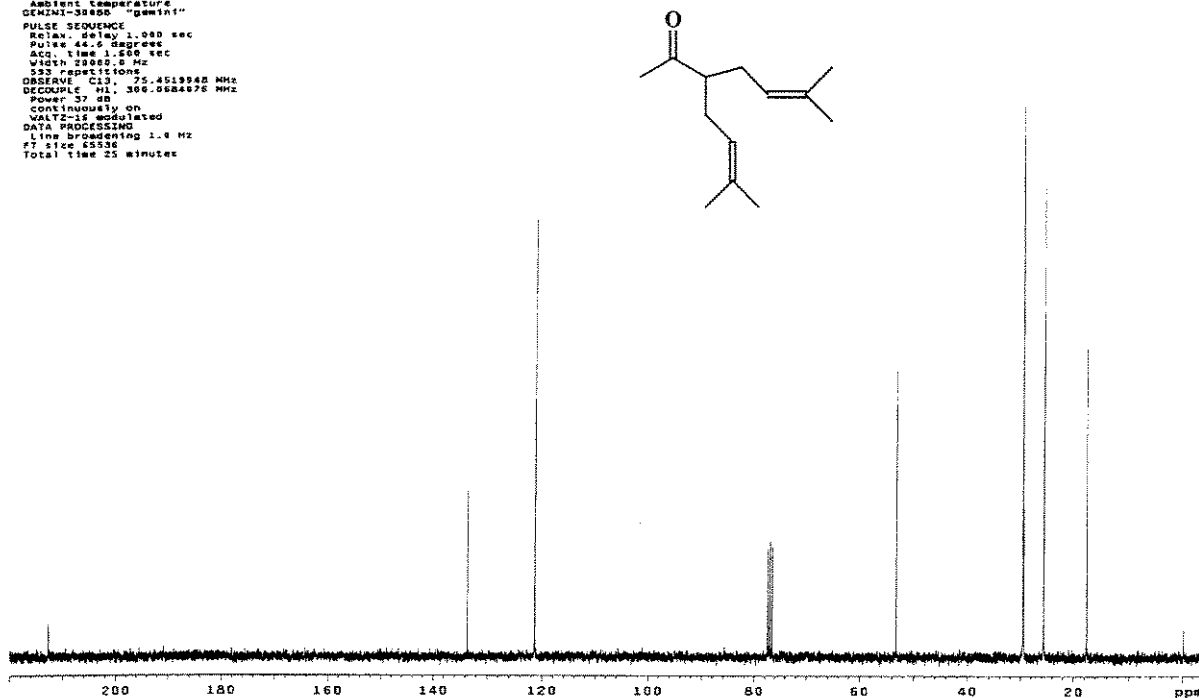
E12: Espectros de massas (IE, 70 eV) da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotri-3-one (S4) (3 tautômeros).

Paulo Cesar "ALQACET.20.01.F17-15" CDCL3/TMS fav07pcnH
 Solvent: CDCL3
 Ambient temperature
 GEMINI-30000 "gemin1"
 PULSE SEQUENCE
 Pulse 12.0 degrees
 Acq. time 3.667 sec
 Width 6000.0 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE N1 300.0673538 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.3 Hz
 FT size 32768
 Total time 1 minute

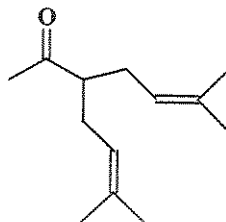


E13: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do produto da clivagem retro-Claisen (S6).

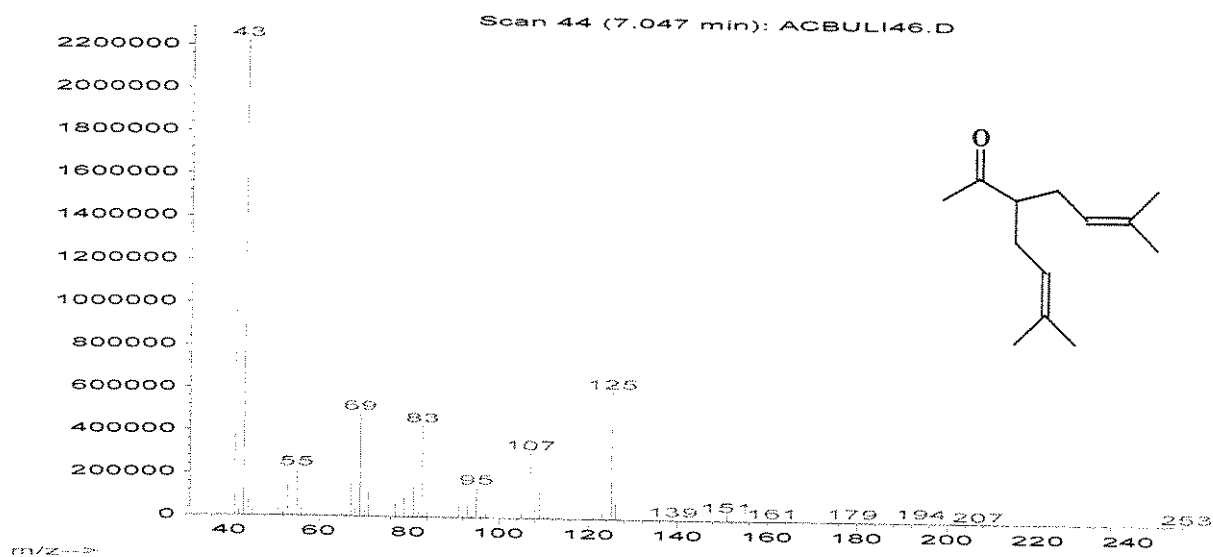
Paulo Cesar "ALQACET.20.01.F1719" CDCL3/TMS fav07pcnH
 Solvent: CDCL3
 Ambient temperature
 GEMINI-30000 "gemin1"
 PULSE SEQUENCE
 Relax delay 1.000 sec
 Pulse 40.0 degrees
 Acq. time 1.600 sec
 Width 20000.0 Hz
 500 repetitions
 OBSERVE C13 75.4519948 MHz
 DECOUPLE H1 300.0684678 MHz
 Power 37 dB
 continuously on
 VOLTAGE-15 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 25 minutes



E14: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do produto da clivagem retro-Claisen (S6).



Abundance



E16: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto da clivagem retro-Claisen (**S6**).

Estes resultados, de maneira geral, não foram surpreendentes, pois analisando o trabalho de Harris *et al.*¹⁹⁷, podemos observar que embora a natureza fabrique com sucesso compostos aromáticos a partir de policetídeos, no laboratório tem sido extremamente difícil obter evidências sobre esta intermediação. Vale ressaltar que embora Harris *et al.* tenham sintetizados várias policetonas, bem como estudado amplamente suas condensações aldólicas intramoleculares, em nenhum exemplo, estes compostos possuíam cadeias laterais alquílicas (grupos alila, prenila, etc.).

As dificuldades encontradas nesta estratégia sintética e a formação de produtos originados da reação retro-Claisen (S6), nos levaram a crer que a alquilação num policetídeo no estágio anterior a ciclização é quimicamente desfavorável tanto em laboratório quanto na natureza, o que está de acordo com a proposta biossintética sugerida por Verpoorte *et al.*¹⁹⁸.

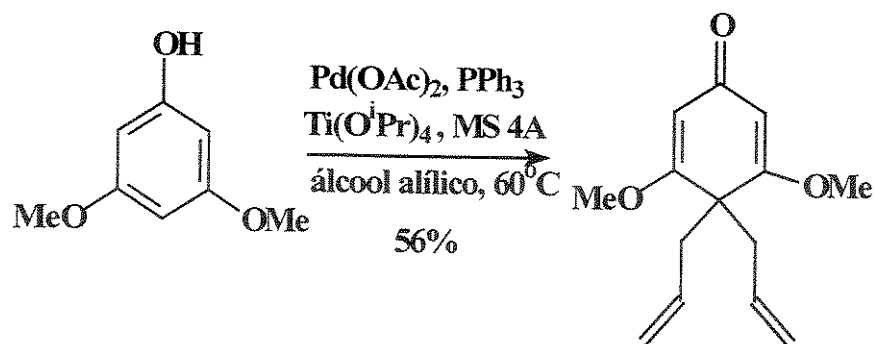
Na segunda estratégia sintética, a idéia de utilização do floroglucinol (S7) como material de partida possuía um inconveniente, ou seja, a necessidade de quebra da aromaticidade para a formação de compostos com grupos alquílicos C,C-geminados. Algumas metodologias são descritas na literatura¹⁹⁹, porém de pouca eficiência, produzindo misturas de produtos em baixos rendimentos e, por isso, nossa idéia de solução foi elaborada inicialmente através do trabalho de Miura *et al.*²⁰⁰ (Esquema 11), o qual utilizou Pd(OAc)₂, PPh₃, Ti(OⁱPr)₄ como catalisadores para produzir produtos de dialquilação C,C-geminal com bons rendimentos.

¹⁹⁷ Harris, T.M.; Harris, C.M. *Pure Appl. Chem.*, 1986, **58**, 283.

¹⁹⁸ a) Fung, S.-Y.; Brusse, J.; Van der Hoeven, R.A.M.; Niessen, W. M.A.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *J. Nat.Prod.*, 1994, **57**, 452. b) Zuurbier, K.W.M.; Fung, S.-Y.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *Phytochemistry*, 1995, **38**, 77. c) Fung, S.-Y.; Zuurbier, K.W.M.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *ibid.*, 1997, **44**, 1047. d) Zuurbier, K.W.M.; Fung, S.-Y.; Scheffer, J.J.C.; Verpoorte, R. *ibid.*, 1998, **49**, 2315.

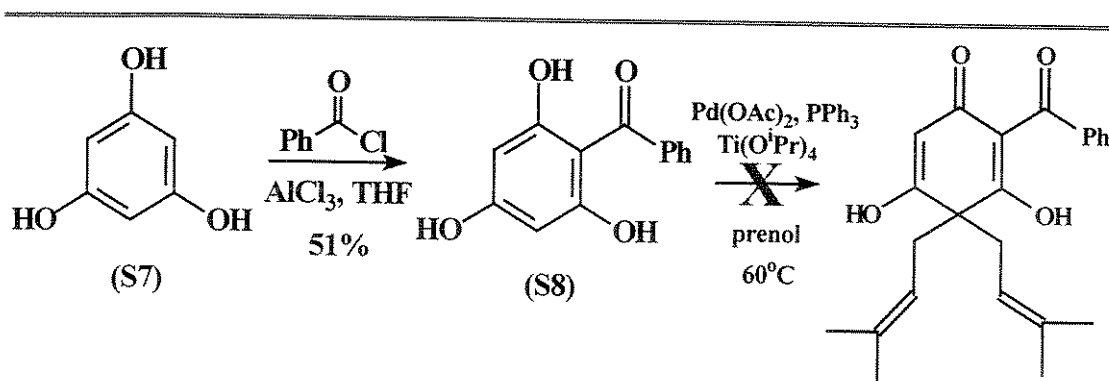
¹⁹⁹ Crombie, L.; Jones, R.C.F.; Palmer, C.J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1987, 317.

²⁰⁰ Satoh, T.; Ikeda, M.; Miura, M.; Nomura, M. *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4877.



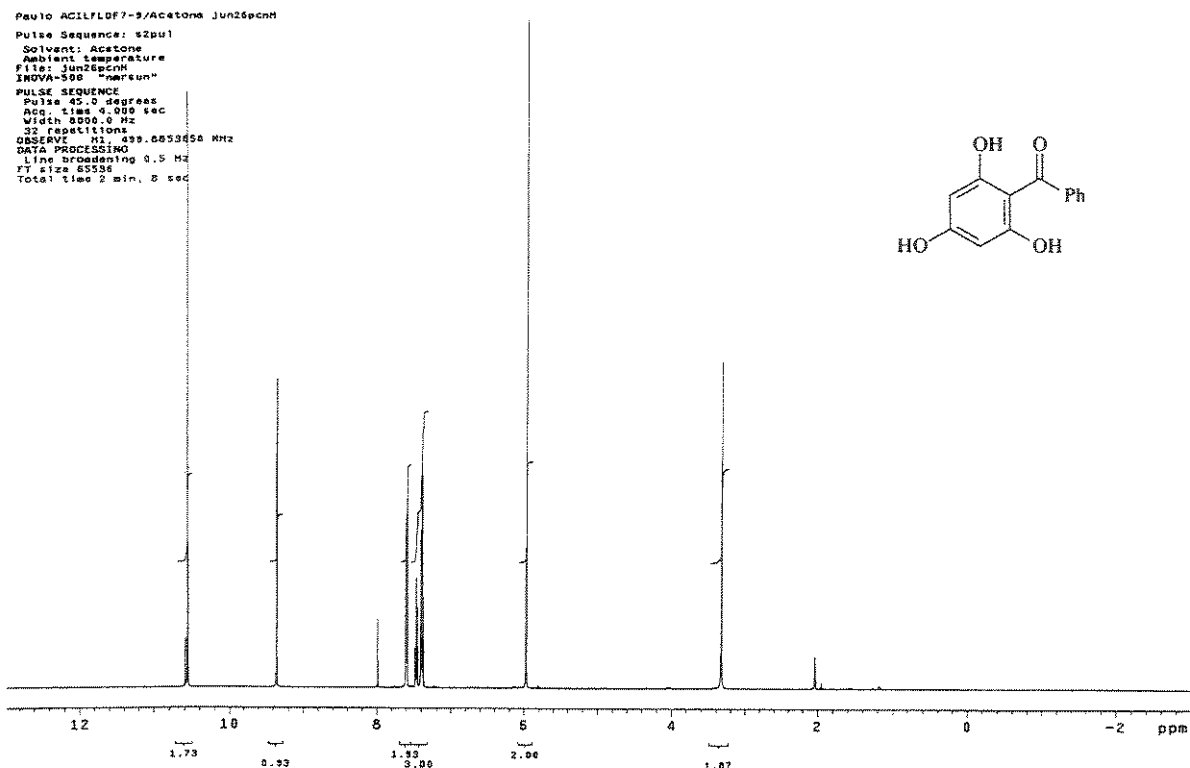
Esquema 11. Reação de alquilação descrita por Miura *et al.*

Colocando em prática esta idéia, iniciamos nossos experimentos com a reação de Friedel-Crafts entre o floroglucinol desidratado (S7) e o cloreto de benzoila na presença de um ácido de Lewis (AlCl_3) em nitrobenzeno como solvente, conforme o método clássico²⁰¹. O produto de C-acilação, a florobenzofenona (S8) (E17-E21), foi obtido, porém com rendimento modesto (12,8%). A troca do solvente por THF e o uso de AlCl_3 de melhor qualidade, proporcionou uma melhora significativa do rendimento (51,1%) e um manuseio mais fácil para purificação do produto da reação (Esquema 12).

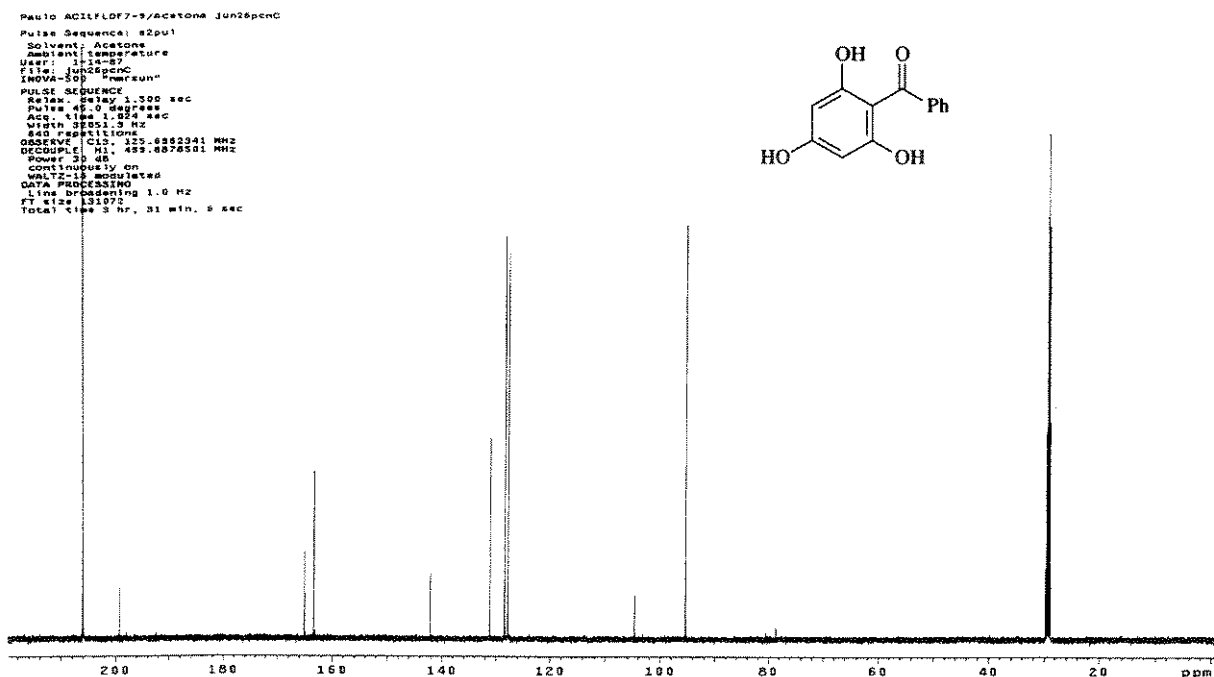


Esquema 12. Reação de acilação de Friedel-Crafts do floroglucinol (S7).

²⁰¹ Rosenmund, K.W.; Rosenmund, M. *Chem. Ber.*, 1928, 2608.



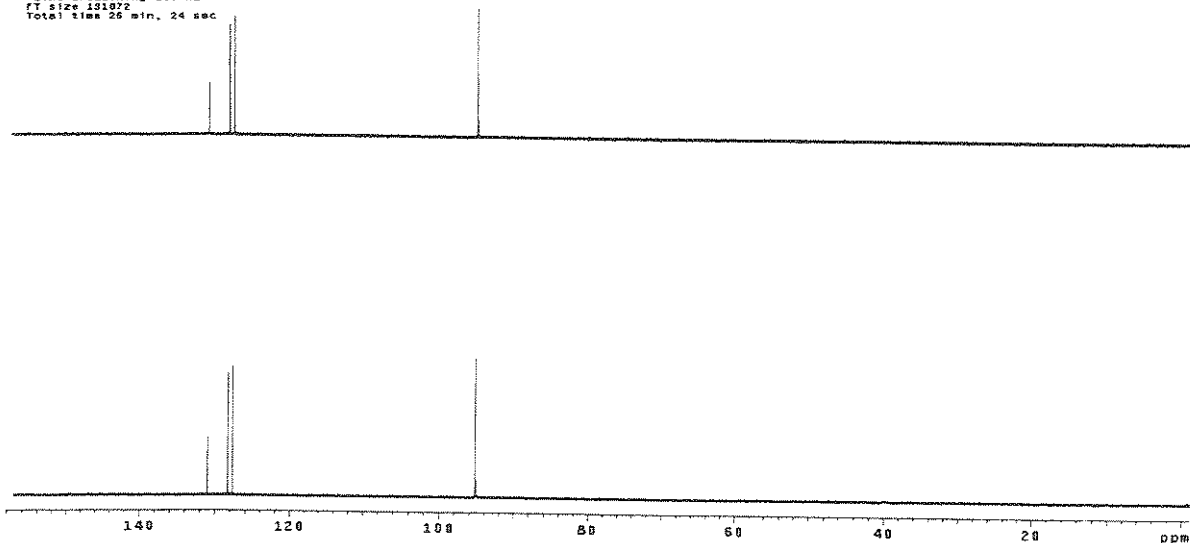
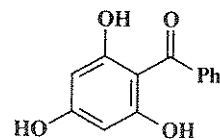
E17: Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, acetona- d_6) da florobenzofenona (S8).



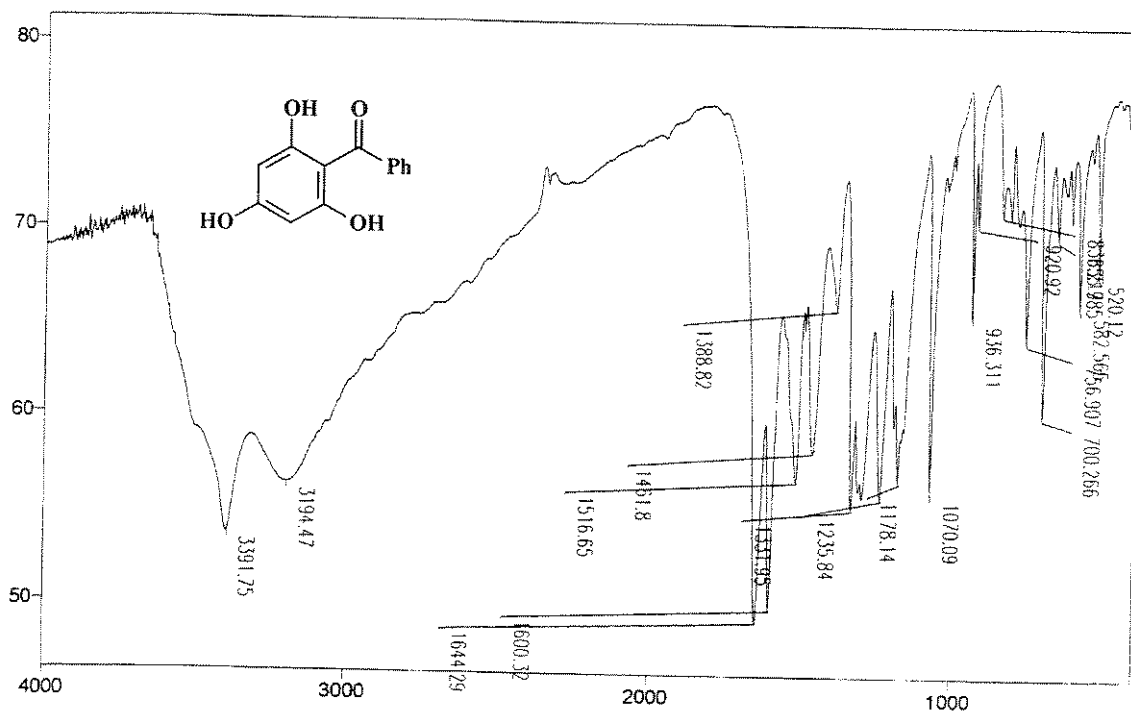
E18: Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, acetona- d_6) da florobenzofenona (S8).

Paulo ACILF07-3/acetona Jun26pcnd

Pulse Sequence: dept
Solvent: cdc13
Ambient temperature
File: Jun26pcnd
INOVA-500 "marsun"
PULSE SEQUENCE: dept
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.054 sec
Width 32051.3 Hz
236 F2 acquisitions
OBSERVE C13, 125.6955890 MHz
DECOUPLE H1, 499.8632357 MHz
Power 20 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 26 min, 24 sec

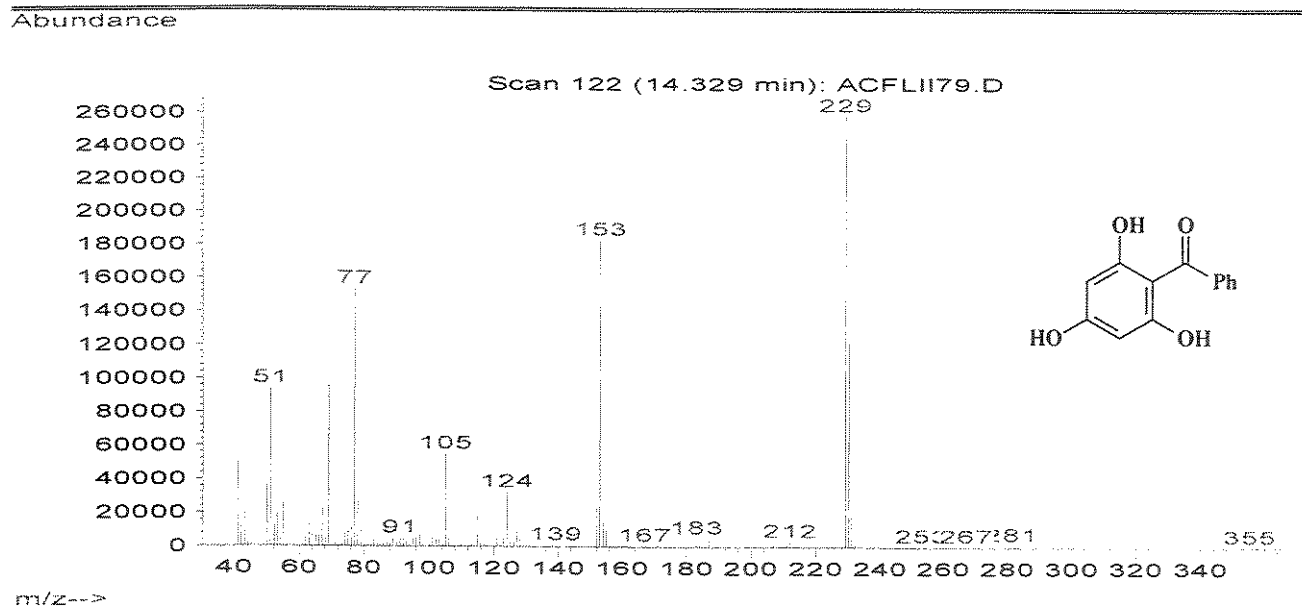


E19: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, acetona-d₆) da florobenzofenona (S8).



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

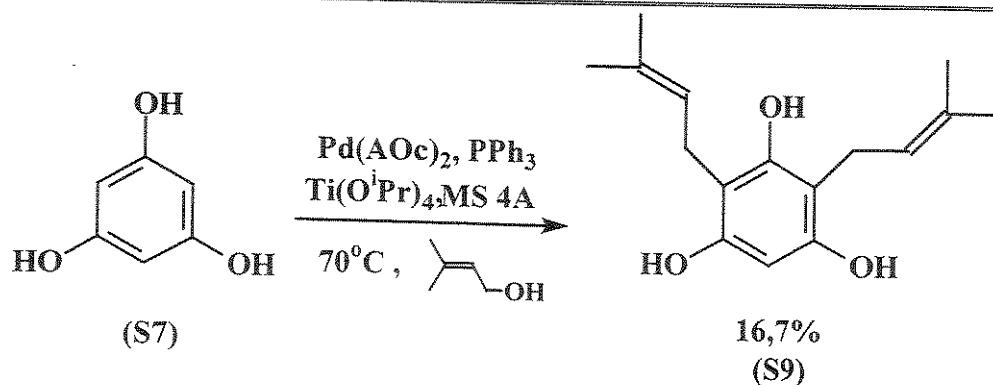
E20: Espectro no Infravermelho (pastilha KBr) da florobenzofenona (S8).



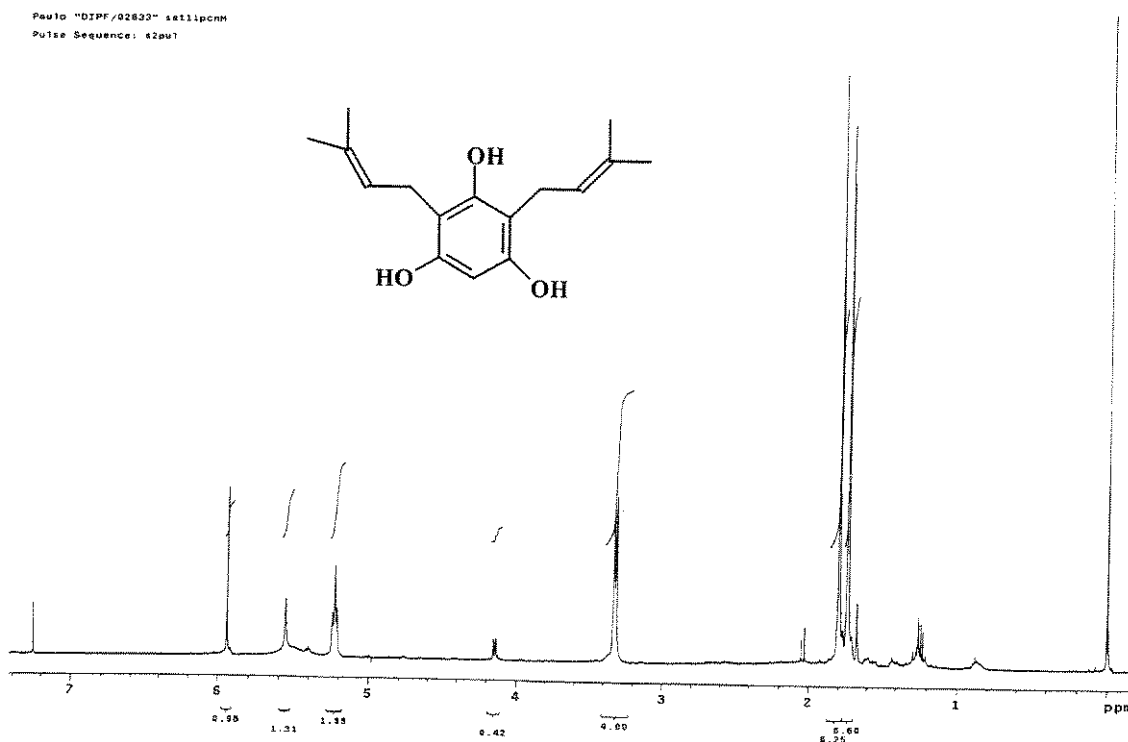
E21: Espectro de massas (IE, 70 eV) da florobenzofenona (S8).

De posse da florobenzofenona (S8), partimos para a reação de alquilação deste produto intermediário. A reação da florobenzofenona com 3-metil-2-buten-1-ol (prenol) sob as condições de Miura *et al.*²⁰² (Esquema 12), não produziu o composto C,C-geminado desejado, provavelmente devido a influência retiradora de elétrons do grupo benzoíla no anel aromático. Novas tentativas foram feitas, sob as mesmas condições, utilizando-se desta vez o 3,5-dimetoxifenol, mas novamente o resultado foi insatisfatório. Quando utilizamos o floroglucinol desidratado (S7) (sem a presença do grupo benzoíla) (Esquema 13), obtivemos uma mistura de produtos de difícil separação, na qual apenas o produto 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (majoritário) (S9) foi identificado com base nos dados de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 90° e 135° e EM (E22-E25).

²⁰² Satoh, T.; Ikeda, M.; Miura, M.; Nomura, M. *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4877.



Esquema 13. Tentativa de obtenção do produto de alquilação C,C-geminal sob as condições de Miura *et al.*



E22: Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (S9).

Standard parameters C13

Pulse Sequence: zgpg30

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

User: 1-14-87

INNOVA-500 "Innova500"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 2.000 sec

Pulse 46.0 degrees

Acq. time 1.024 sec

Width 32000.0 Hz

3000 repetitions

OBSERVE C13, 125.6250124 MHz

DECOUPLE H1, 499.8452557 MHz

Power 33 dB

CONTINUITY ON

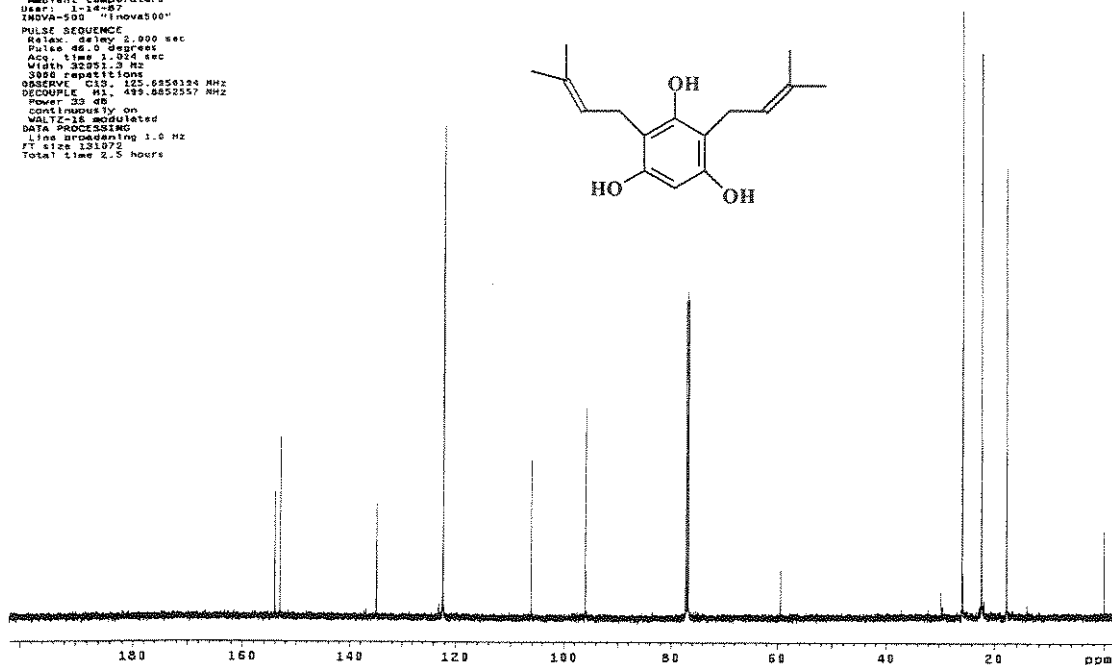
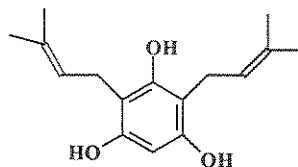
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 131072

Total time 2.5 hours



E23: Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (S9).

Paulo "DIPF/02833" setilipond

Pulse Sequence: dept

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

INNOVA-500 "Innova500"

PULSE SEQUENCE: dept

Relax. delay 2.000 sec

Pulse 10.0 degrees

Acq. time 1.024 sec

Width 32000.0 Hz

236 repetitions

OBSERVE C13, 125.6250124 MHz

DECOUPLE H1, 499.8452557 MHz

Power 33 dB

ON during acquisition

OFF during delay

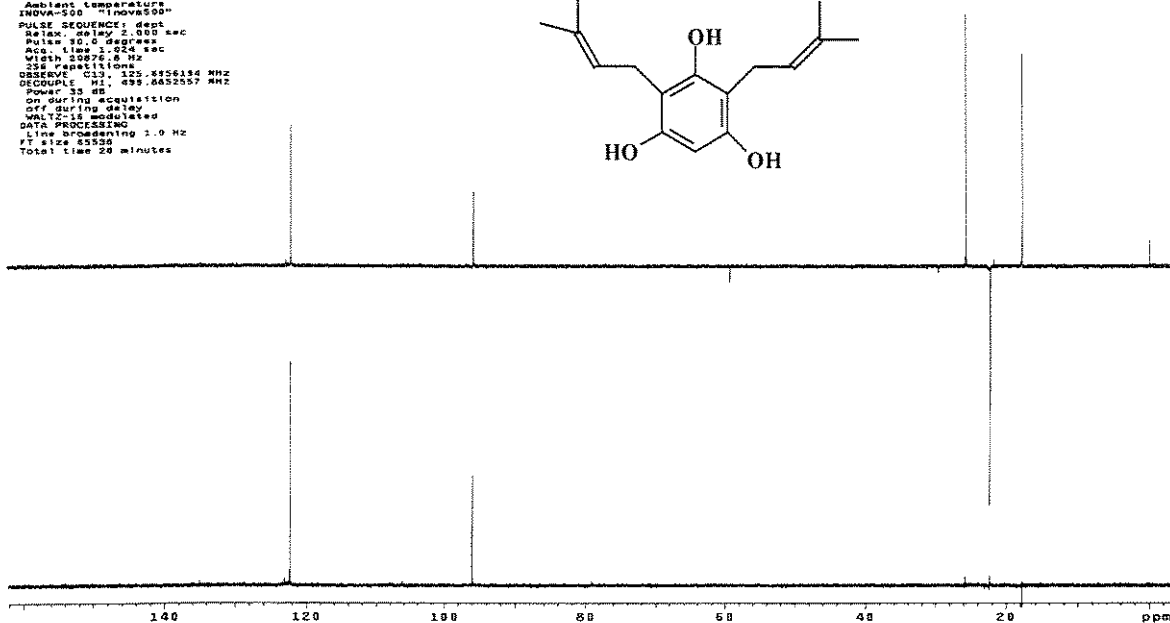
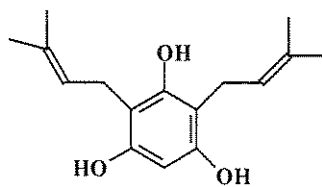
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

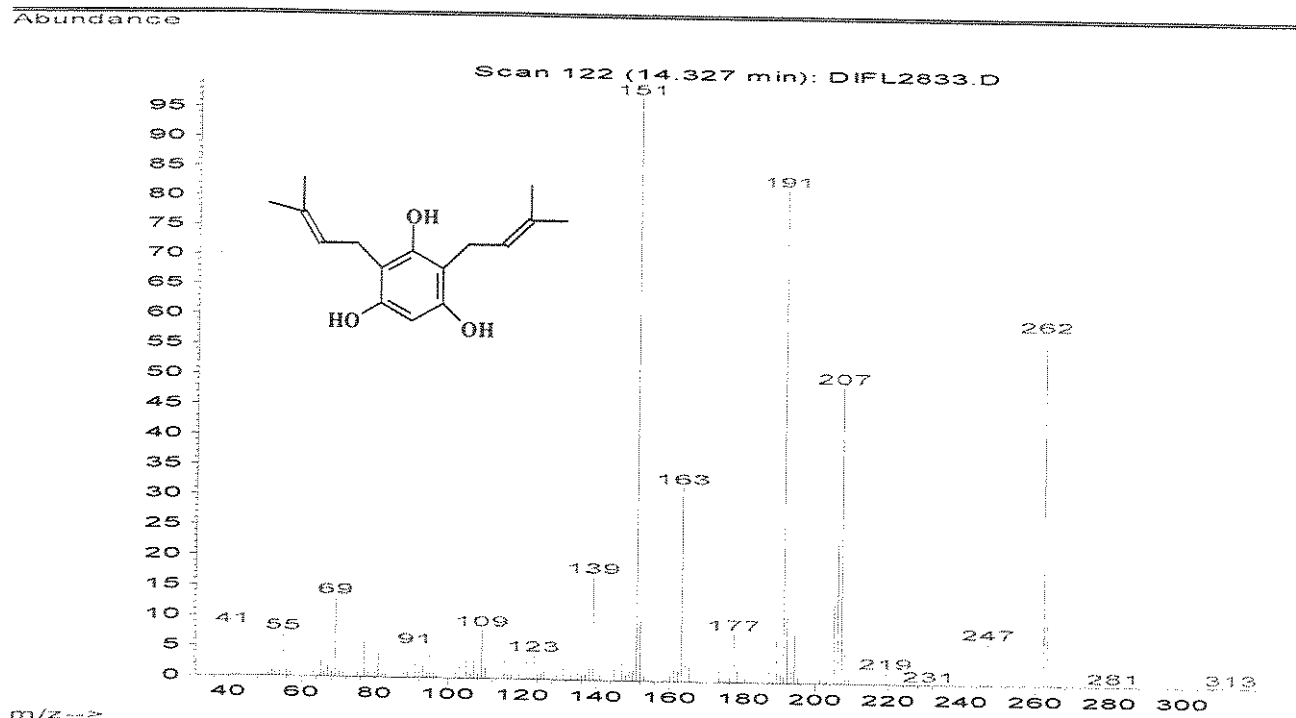
Line broadening 1.0 Hz

FT size 65536

Total time 20 minutes



E24: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, CDCl_3) do 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (S9).



E25: Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (**S9**).

Decidimos testar um outro método^{203, 204}, mais usual, no qual utiliza-se como base KOH em MeOH ou H₂O como solvente para a reação de alquilação da florobenzofenona (**S8**) utilizando brometo de prenila (Esquema 14). Os produtos obtidos foram uma mistura de compostos de mono e di-alquilação, além do material de partida recuperado. O produto C,C-dialquilado (não geminado) 2-benzoil-4,6-bis(3-metil-2-butenil)floroglucinol (**S10**) (Esquema 14) é um produto natural isolado de Guttiferae²⁰⁵,²⁰⁶ e com síntese já publicada^{207, 208b, c} (melhor rendimento 11,0%), no entanto,

²⁰³ Crombie, L.; Jones, R.C.F.; Palmer, C.J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1987, 317.

²⁰⁴ Xiao, L.; Tan, W.; Li, Y. *Synth. Commun.*, 1998, **28**, 2861.

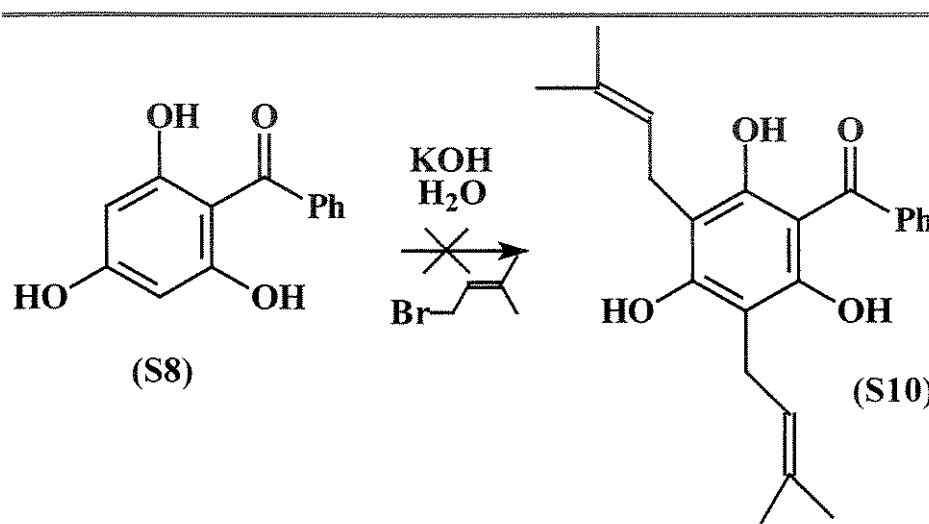
²⁰⁵ Delle Monache, F.; Mac-Quhae, M.M.; Delle Monache, G.; Marini-Bettolo, G.B.; De Lima, R.A. *Phytochemistry*, 1983, **22**, 227.

²⁰⁶ Delle Monache, G.; Gonzalez, J.G.; Delle Monache, F.; Marini-Bettolo, G.B. *Phytochemistry*, 1980, **19**, 2025.

²⁰⁷ Cann, M.R.; Davies, A.-M.; Shannon, P.V.R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1984, 1413.

²⁰⁸ a) Ahluwalia, V.K.; Khanna, M.; Singh, R.P. *Indian J. Chem.*, 1981, **20B**, 990. b) Pathak, V.P.; Khanna, R.N. *Indian J. Chem.*, 1982, **21B**, 253. c) *ibid*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1982, **55**, 2264. d) *ibid*, *Indian J. Chem.*, 1984, **23B**, 571.

caracterizamos apenas os produtos oriundos da ciclização dos grupos prenils na forma de 2,2-dimetilcromanos (**S11-S13**) (Figura 65) (E26-E40). Os dados obtidos através de RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT 90 e 135° e EM destes compostos foram compatíveis com os dados da literatura^{206c} e também por associação com os dados dos derivados metilados²⁰⁶. O modo de fragmentação para os produtos (**S11**) e (**S12**) também foram consistentes com aqueles dos sistemas 2,2-dimetilcromano²⁰⁹ (2 anéis diidropirano fundidos ao anel aromático), nos quais a fragmentação do produto simétrico (**S11**) e do produto não simétrico (**S12**) são similares, exceto pela intensidade de seus íons (Esquema 15, E30 e E35).



Esquema 14. Alquilação da florobenzofenona (**S8**) usando KOH como base.

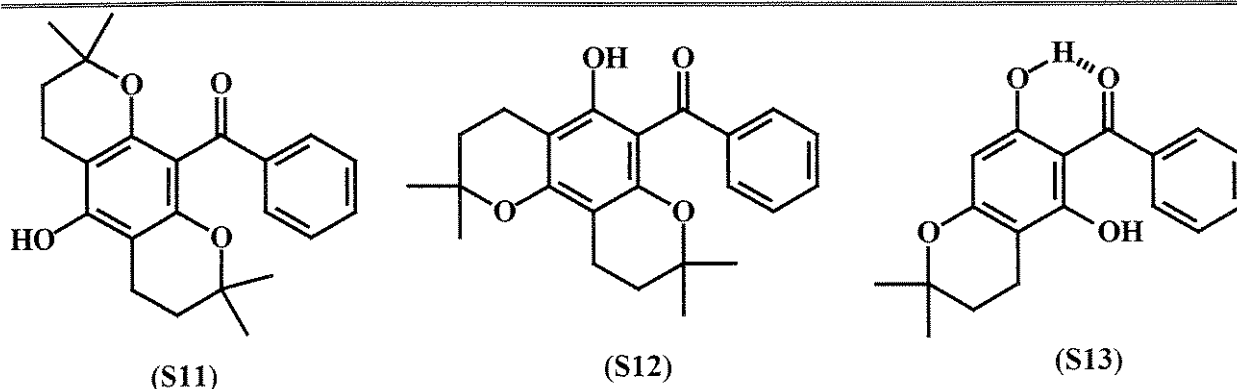
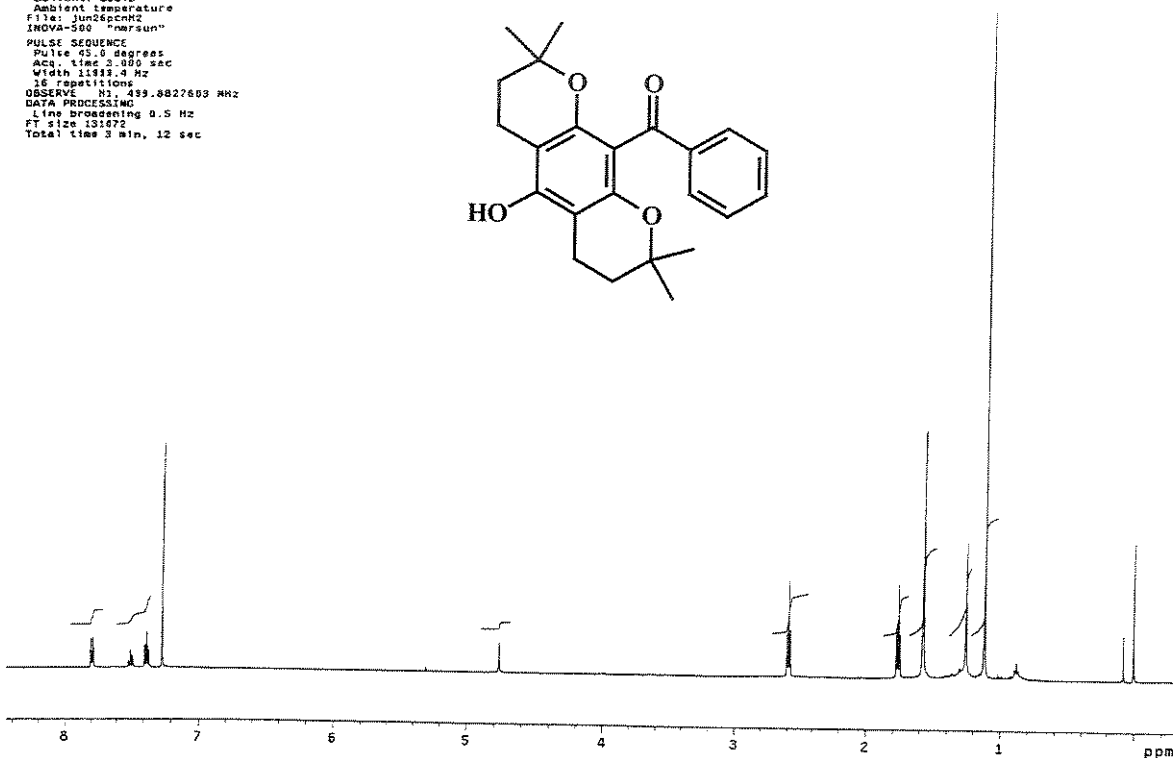
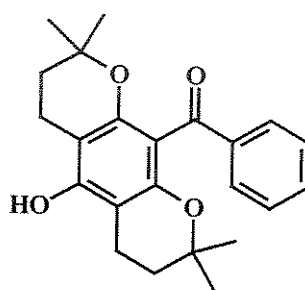


Figura 65. Produtos obtidos da reação de alquilação da florobenzofenona (**S8**) usando KOH como base.

²⁰⁹ Shaw, S.J.; Shannon, P.V.R. *Org. Mass Spectrom.*, 1970, 3, 941.

A formação destes compostos pode ser racionalizada como artefatos provenientes do tratamento da reação²¹⁰. Entretanto, ao reavaliar o comportamento cromatográfico (CCD), observa-se que tanto o controle da reação antes do seu processamento quanto após (pH 2), apresentaram um comportamento idêntico, indicando que os cromanos se formam em meio básico. Uma explicação plausível para o fato é que o HBr gerado “*in situ*” pode ser o catalisador desta ciclização.

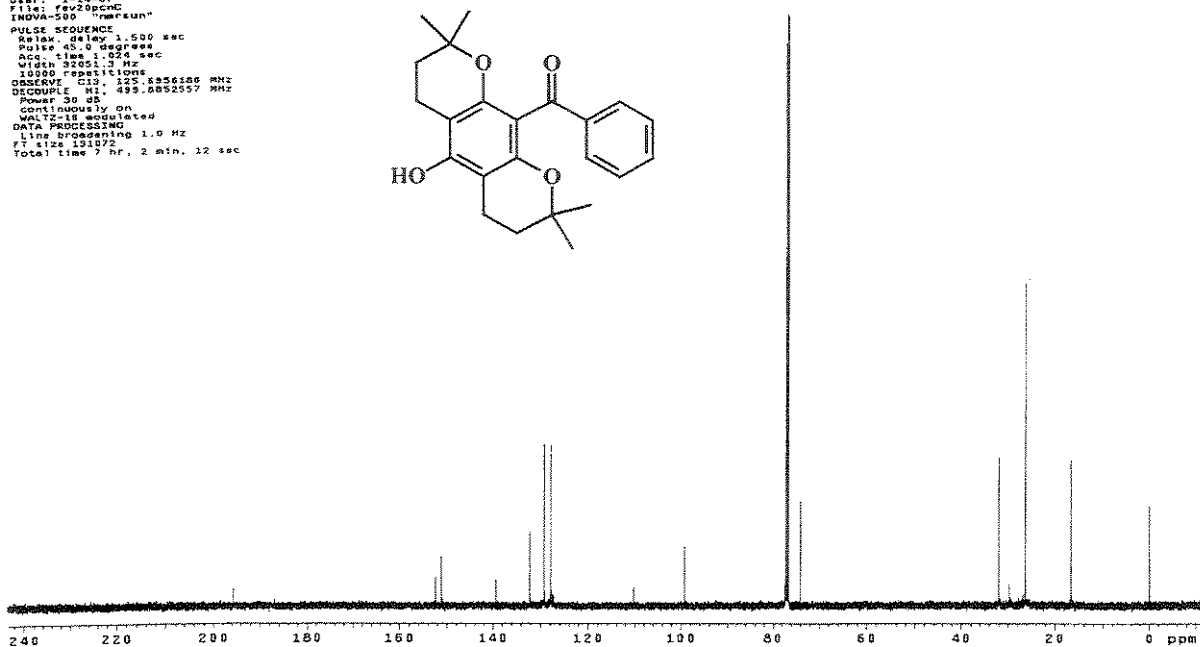
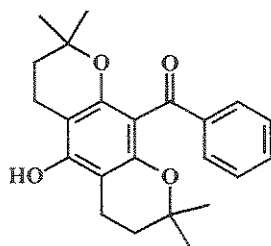
Paulo ACFLDOKH F7(2-3)(1-2)PS cdc13 Jun26pcnH2
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
File: Jun26pcnH2
INOVA-500 "nursun"
PULSE SEQUENCE
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.000 sec
Width 11812.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE N1, 499.8827689 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 131775
Total time 3 min, 12 sec



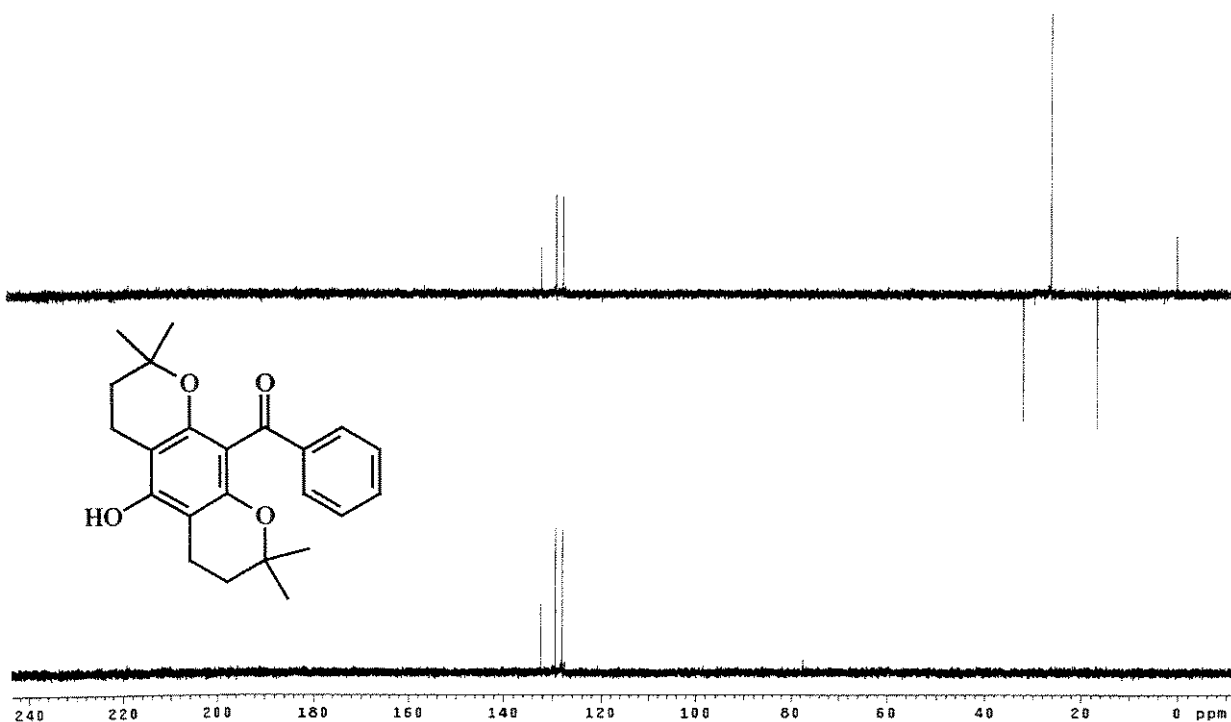
E26: Espectro de RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) do produto 2,2-dimetilcromano (S11).

²¹⁰ Molyneux, R.J.; Jurd, L. *Tetrahedron*, 1970, **26**, 4743.

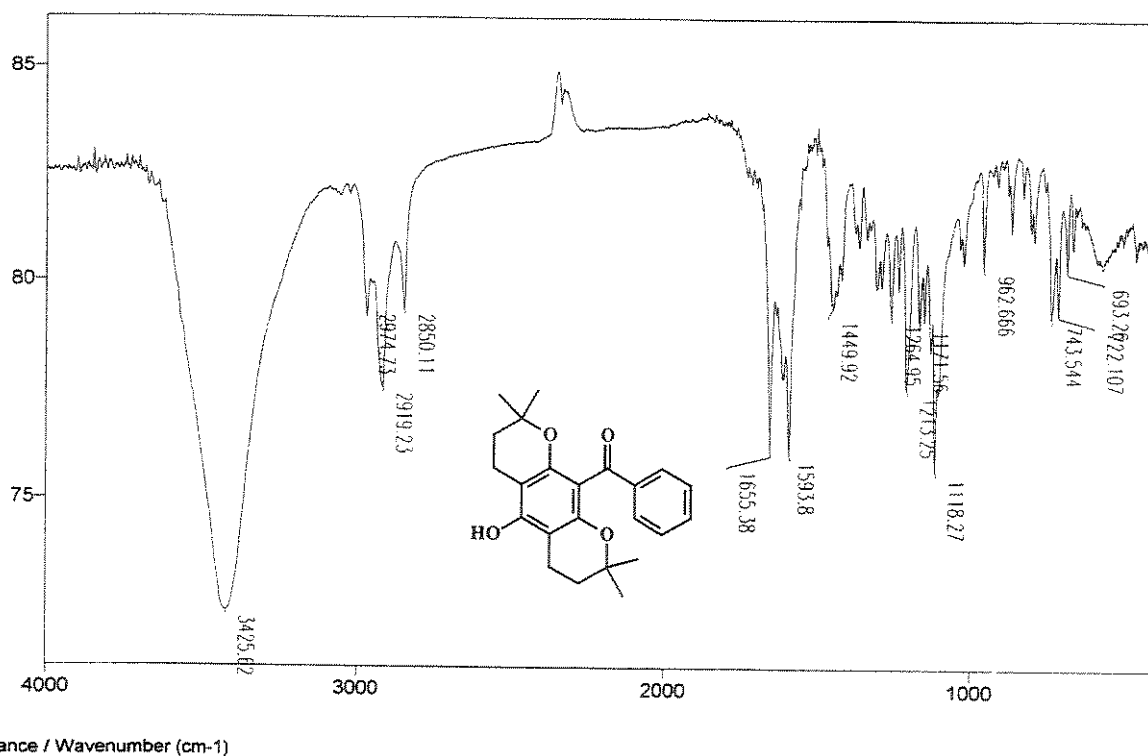
Paulo "prensafio f2-3(7)" rev20pcnC
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-10-87
 File: rev20pcnC
 INOVA-500 "rnfsum"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 3.500 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.024 sec
 Width 32051.3 Hz
 10000 repetitions
 OBSERVE G31, 125.1356186 MHz
 DECOUPLE H1, 499.8852557 MHz
 Power 50 dB
 Continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 191972
 Total time 7 hr, 2 min, 12 sec



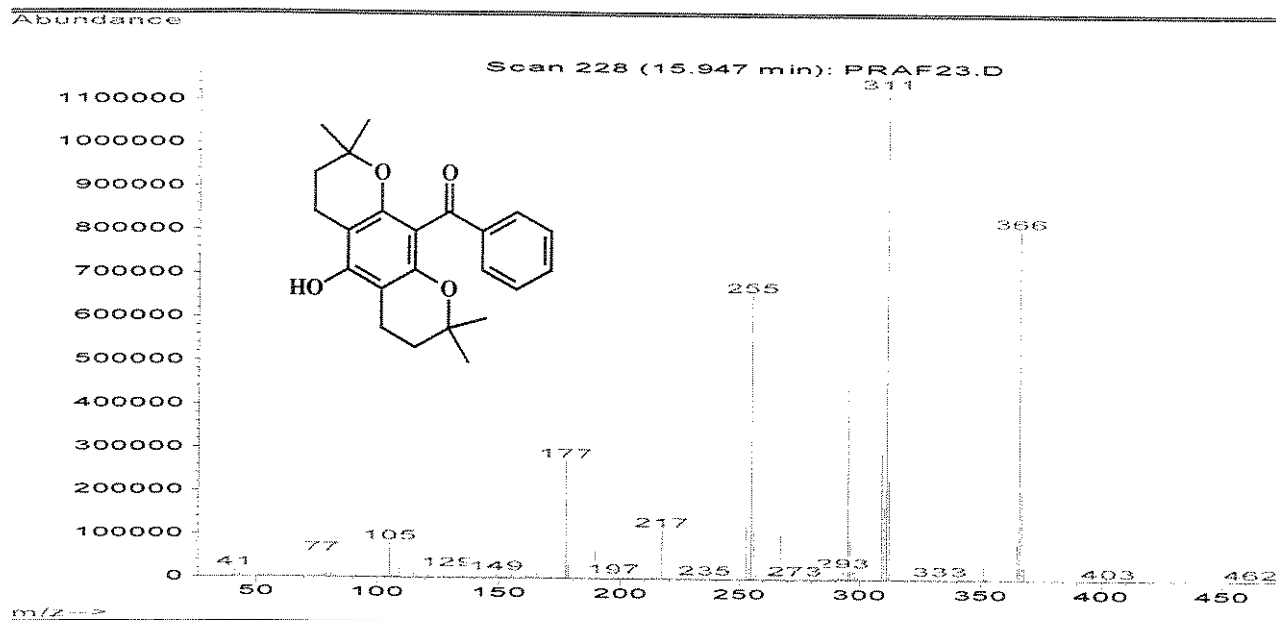
E27: Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S11).



E28: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S11).

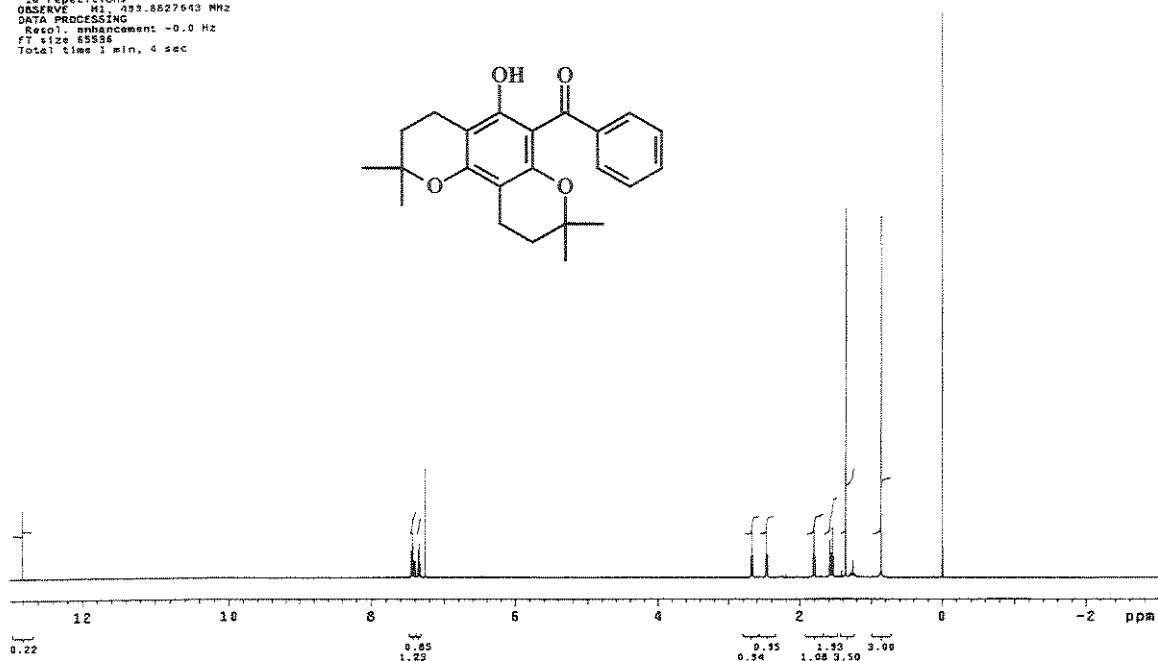
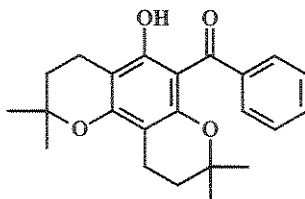


E29: Espectro no Infravermelho (pastilha KBr) do produto 2,2-dimetilcromano (S11).



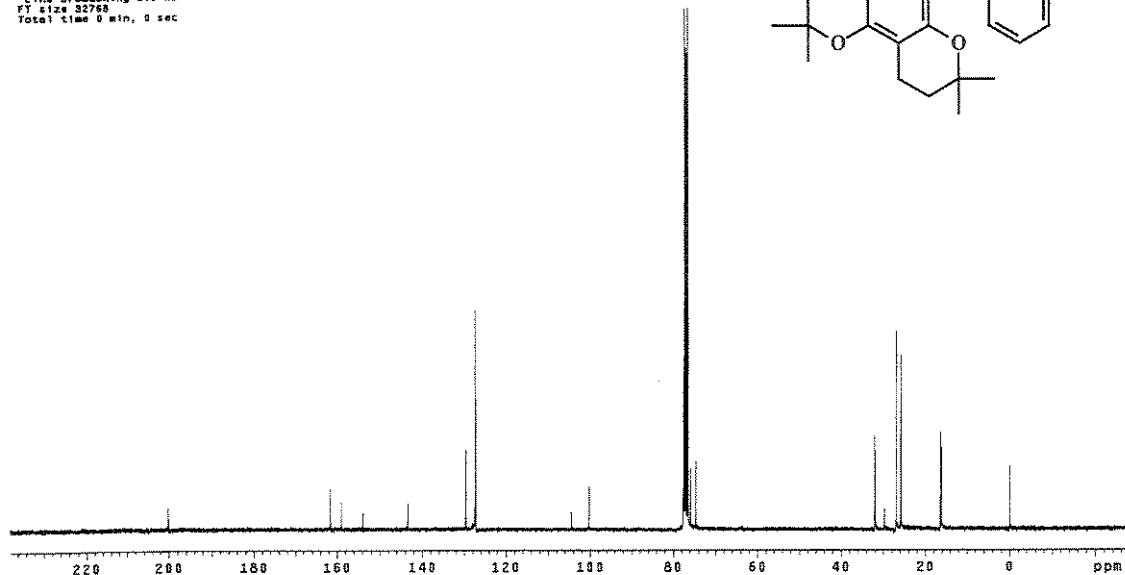
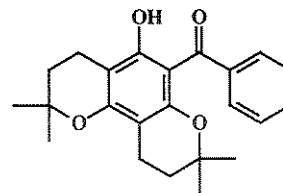
E30: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto 2,2-dimetilcromano (S11).

Paulo "prenaclof5-7(2-3)" fev17pcnH1
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
File: fev17pcnH1
INOVA-500 "nmrsun"
PULSE SEQUENCE
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 4.000 sec
Width 8000.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1 499.8827643 MHz
DATA PROCESSING
Resol. enhancement -0.0 Hz
FT size 65558
Total time 3 min, 4 sec



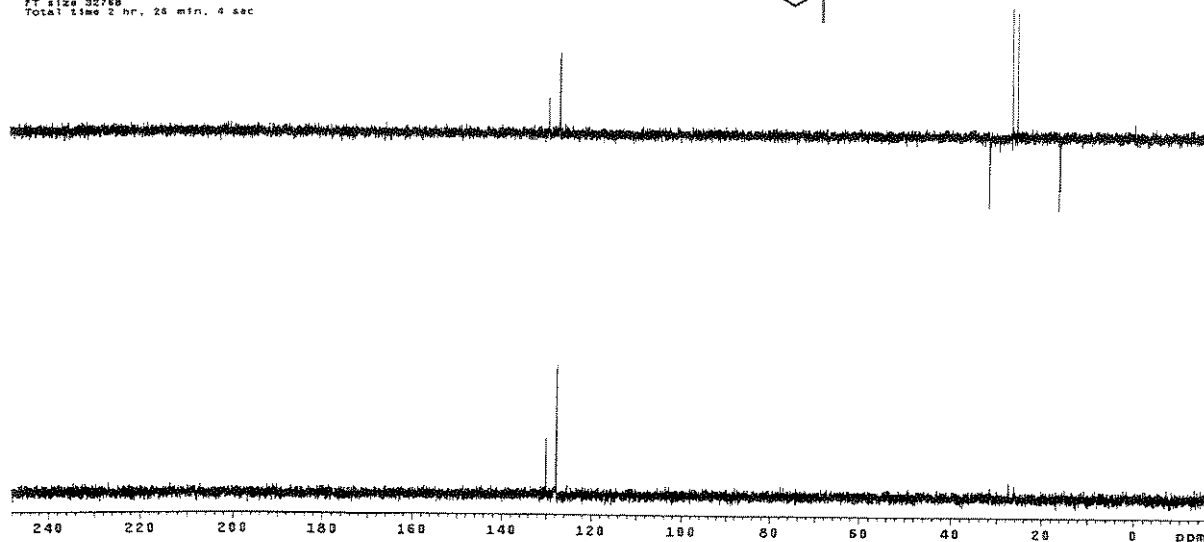
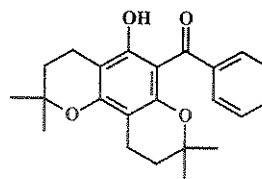
E31: Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S12).

p.cesar, prenaclof5-7(2-3).Carbono 13, cdcl3, fv22pcn.002.cv
Pulse Sequence: bruker
Temp. 24.0 C / 297.1 K
File: fv22pcn.002.cv
INOVA-500 "nmrsun"
PULSE SEQUENCE: bruker
Relax. delay 5.001 sec
1st pulse 90.0 degrees
2nd pulse 20.0 degrees
Acq. time 0.819 sec
Width 20000.0 Hz
13523 repetitions
OBSERVE UNKNOWN, 75.4671897 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 0 min, 0 sec

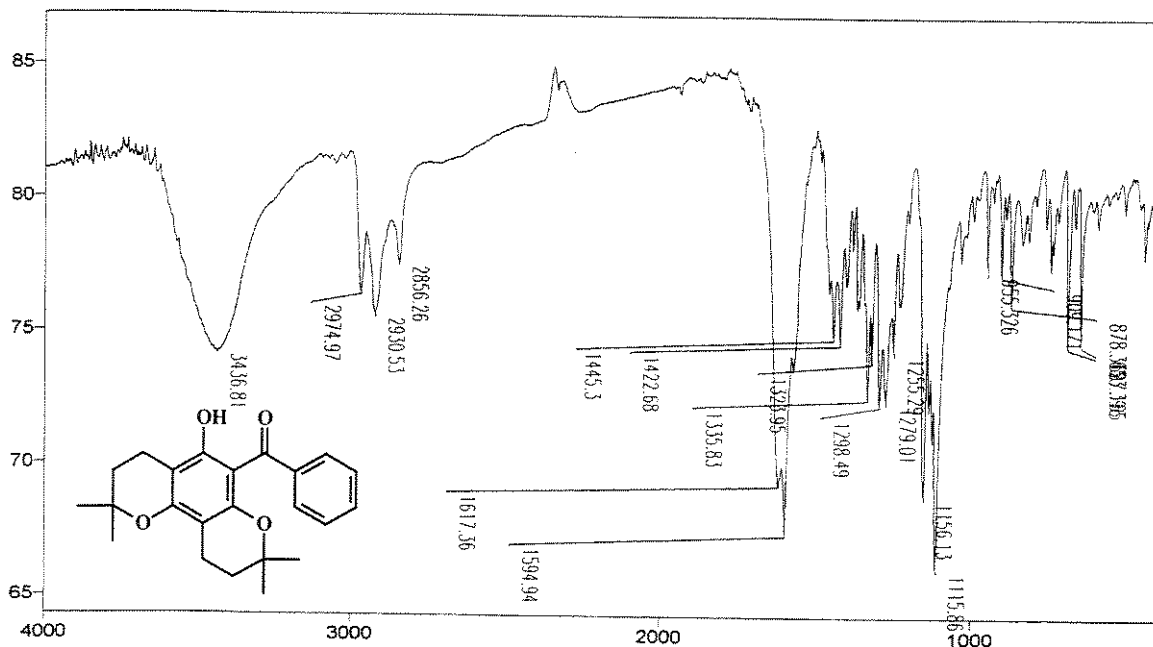


E32: Espectro de RMN de ^{13}C (125,70 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S12).

Paulo.prenac1of3-7(2-3).fex24pcn0
Pulse Sequence: dept
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
File: fex24pcn0
INNOVA-500 "nmrsum"
PULSE SEQUENCE: dept
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 30.0 degree
Acq. time 8.800 sec
Width 20000.0 Hz
2400 repetitions
OBSERVE C13, 75.4519635 MHz
DECOUPLE H1, 300.0605576 MHz
Power 41 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 2 hr, 28 min, 4 sec



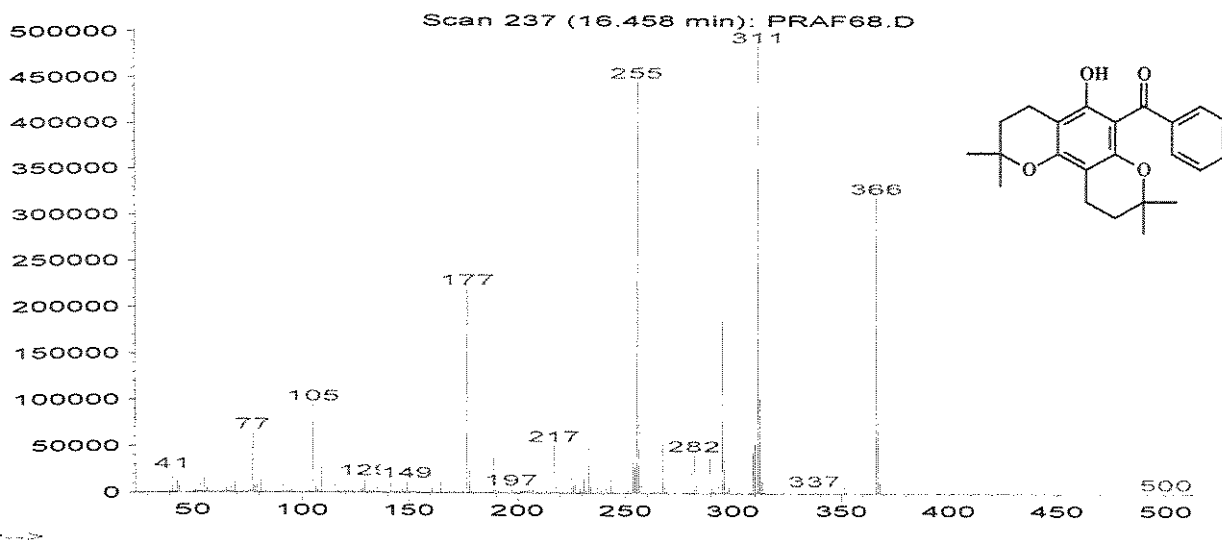
E33: Espectro de DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, CDCl_3) do 2,2-dimetilcromano (S12).



Transmittance / Wavenumber (cm^{-1})

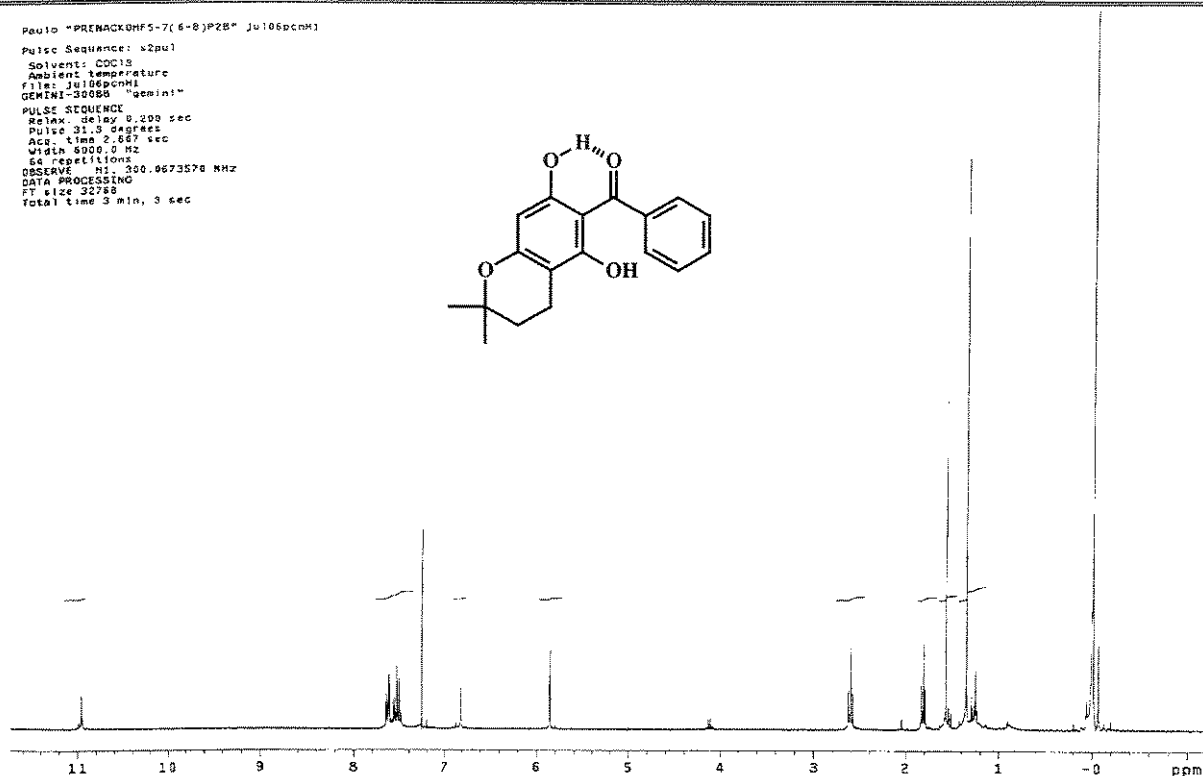
E34: Espectro no Infravermelho (pastilha KBr) do produto 2,2-dimetilcromano (S12).

Abundance

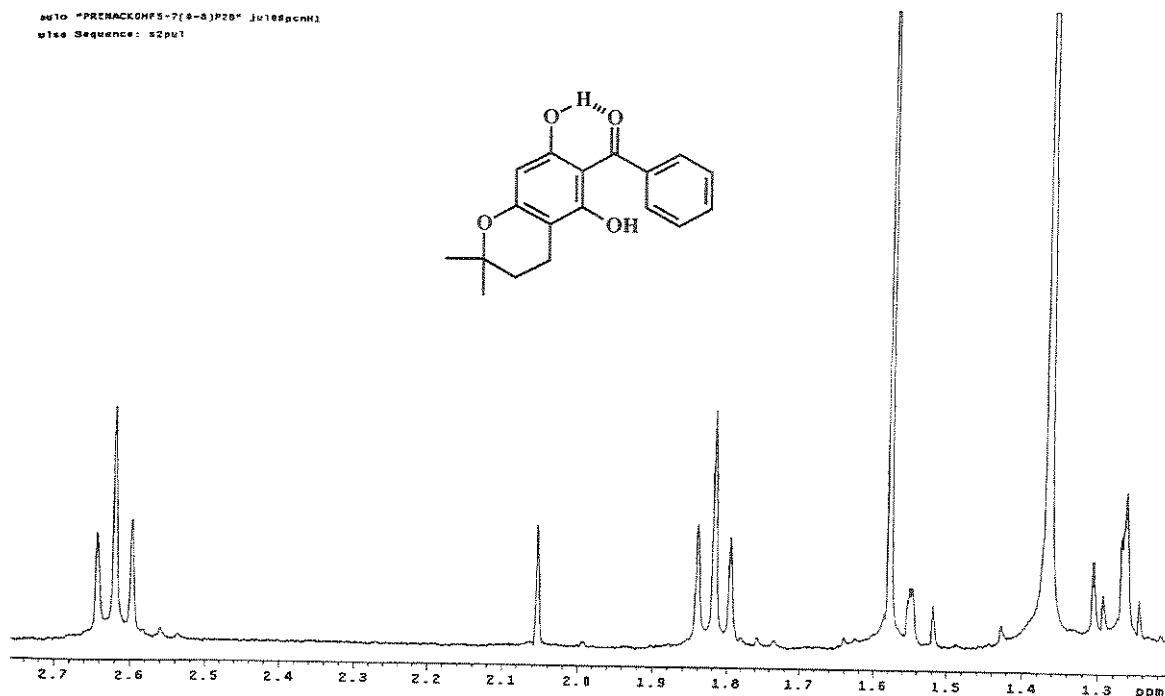


E35: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto 2,2-dimetilcromano (S12).

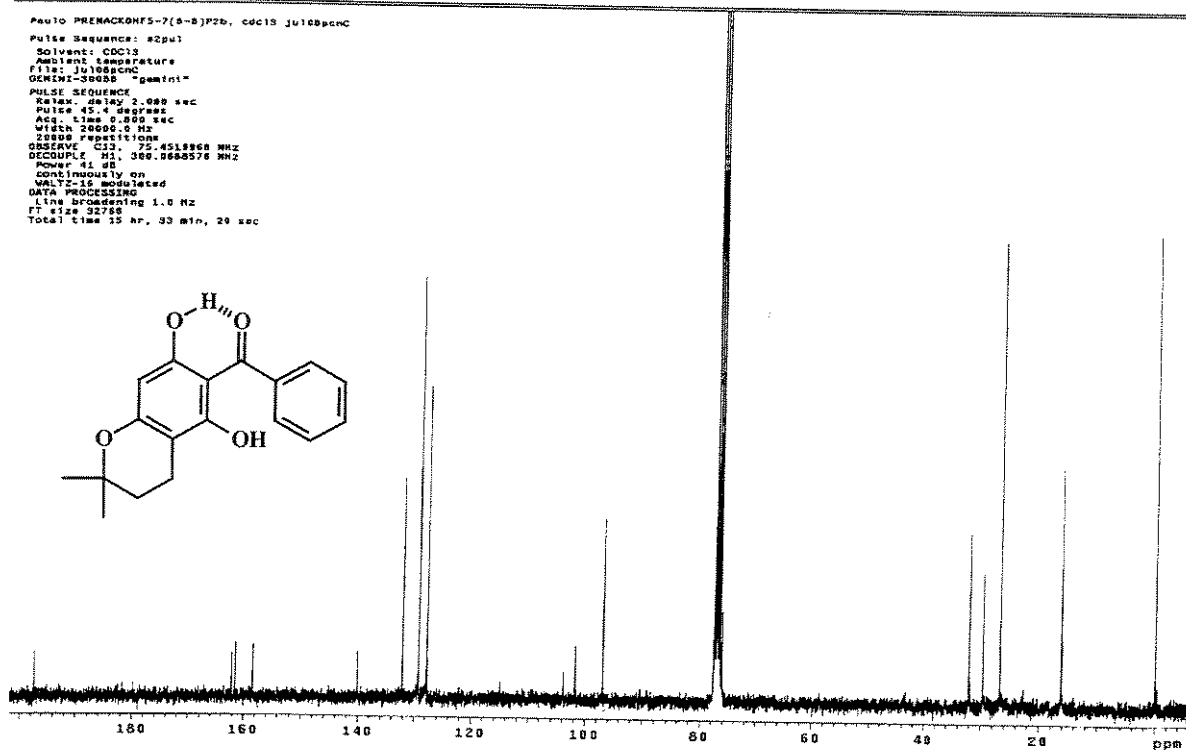
Paulo "PRENACKOHF5-7(6-8)P2B" Ju106pcmh1
Pulse Sequence: x2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
file: ju106pcmh1
GEMINI-30080 "gemini"
PULSE SEQUENCE
Relax: delay 0.200 sec
Pulse 31.3 degrees
Acq. time 2.667 sec
Width 5000.0 Hz
64 repetitions
OBSERVE H1 300.6673576 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 5 min, 3 sec



E36: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S13).

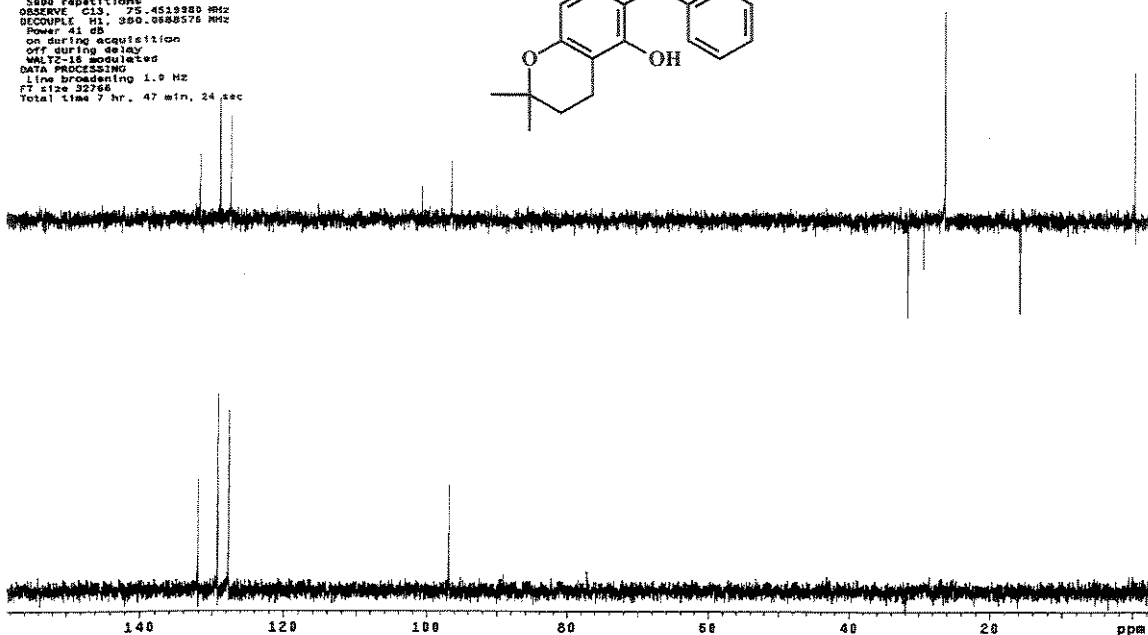
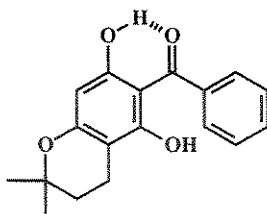


E37: Expansão do espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do 2,2-dimetilcromano (S13).



E38: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do produto 2,2-dimetilcromano (S13).

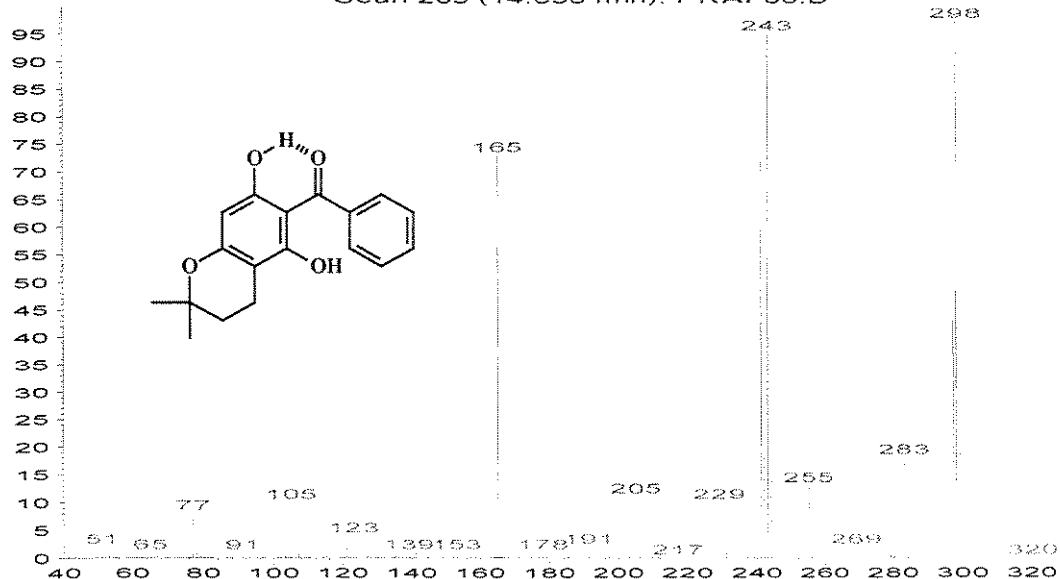
Paulo PRINACONF5-7(8-8)P2D, cdc13 Jul198pcnd
Pulse Sequence: dept
Solvent: cdc13
Ambient temperature
File: Jul198pcnd
GERINI-30000 "gemin1"
PULSE SEQUENCE: dept
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acc. time 0.500 sec
Width 20000.0 Hz
SFO repetitions
OBSERVE C13, 75.4519380 MHz
DECOUPLE H1, 300.0980575 MHz
Power 41 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 simulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 7 hr., 47 min., 24 sec



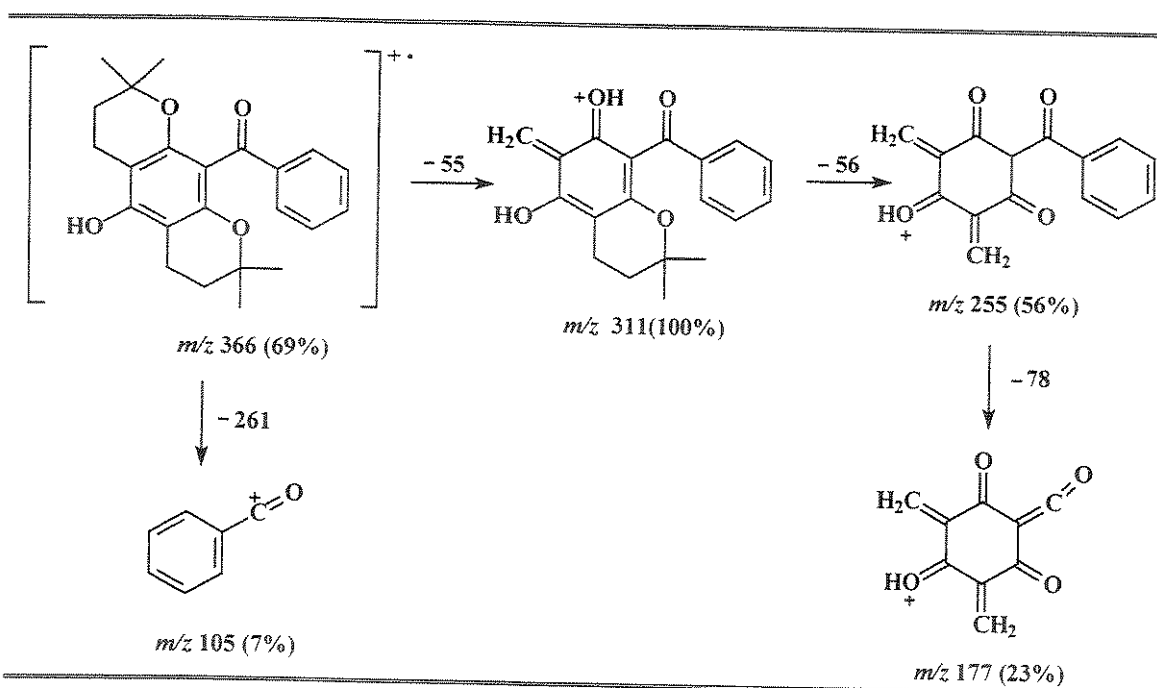
E39: Espectro de DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, CDCl_3) do 2,2-dimetilcromano (S13).

Abundance

Scan 205 (14.638 min): PRAF68.D



E40: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto 2,2-dimetilcromano (S13).



Esquema 15. Proposta de fragmentação para o produto 2,2-dimetilcromano (S11).

Uma análise mais detalhada da literatura nos revelou que reações envolvendo alquenilações em sistemas polifenólicos são descritos com escassez e que os exemplos bem sucedidos, é o caso da síntese de componentes do lúpulo como a lupulona (Figura 64), estão sob a forma de patentes²¹¹. Isto nos alertou para as dificuldades em promover alquenilações C,C-geminal e o interesse comercial para tais reações.

Verificamos também que nos exemplos descritos com sucesso para obtenção do composto tri-alquenilado a partir da florobenzofenona (S8) com 1-bromo-2-buten²¹² e com brometo de prenila²¹³ [benzolupulona, grandona (S1)], a base utilizada no processo tem importância capital para esta reação, pois a utilização de Na^0 em éter a baixas temperaturas fornece o produto C,C-geminal^{214, 215} (S1) com apenas 27,0% rendimento,

²¹¹ a) Riedel, W. German Patent 899, 198; b) Chem. Abstr., 1958, **52**, 300.; c) Pfeninger, H.B.; Schur, F.; Vaterlaus, B.P.; Sigg, T.; Wild, J. D.O.S. 2 333 580 PAT Anm. CH 12 156/74; d) Sigg-Grutter, T.; Wild, J. Swiss Patent, 1458 343 (1974).

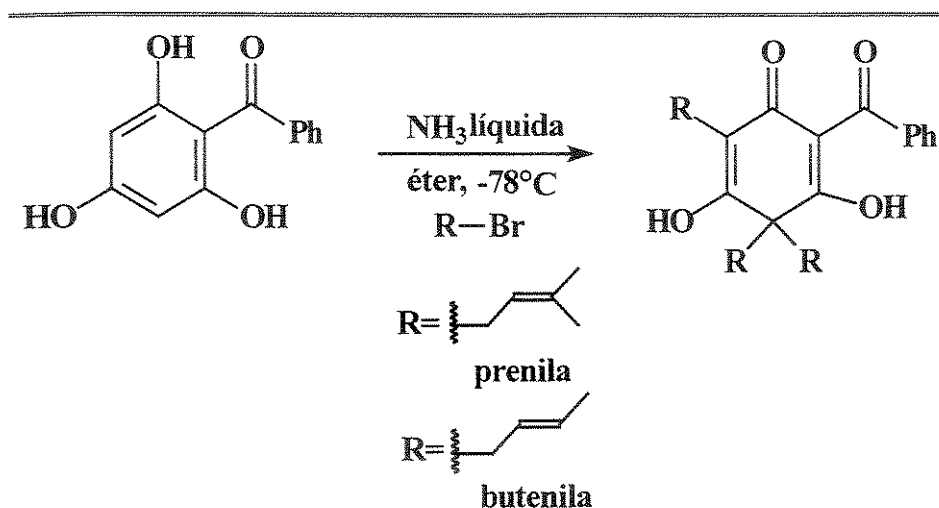
²¹² Collins, M.; Laws, D.R.J.; McGuinness, J.D.; Elvidge, J.A. *J. Chem. Soc. (C)*, 1971, 3814.

²¹³ Drewert, K.G.; Laws, D.R. *J. Inst. Brew.*, 1970, **76**, 188.

²¹⁴ Riedl, W. *Chem. Ber.*, 1952, **85**, 692.

²¹⁵ Verzele, M.; De Keukeleire, D. *Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids*. Elsevier, Amsterdam, 1991.

enquanto com NH_3 líquida em éter os rendimentos foram bem mais satisfatórios (65-88%)^{216, 217, 218} (Esquema 16).



Esquema 16. Síntese bem sucedida do composto tri-alquenilado
R=prenila, 65%; R=butenila, 88%).

Em nossa busca pela metodologia mais satisfatória, testamos a reação da florobenzofenona (**S8**) com brometo de alila, em vez de brometo de prenila (devido as dificuldades de obtenção), em amônia líquida sob as condições descritas na literatura^{214,215,216}, porém além da baixa reprodutibilidade, obtivemos uma mistura de produtos, na qual o produto de mono-alquilação (**S14**) foi o composto majoritário e obtido com baixo rendimento (7,6%) (E41-E45). Outras tentativas foram feitas usando-se NaH ²¹⁹ ou $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ²²⁰ como base, mas novamente os resultados obtidos não foram satisfatórios. Desta forma, nossos resultados estão mais próximos das observações descritas por Crombie *et al.*²²¹, os quais num artigo crítico, demonstraram as dificuldades destas alquilações em sistemas polifenólicos, nos levando a questionar a eficácia das metodologias como descritas na literatura.

²¹⁶ Collins, M.; Laws, D.R.J.; McGuinness, J.D.; Elvidge, J.A. *J. Chem. Soc. (C)*, 1971, 3814.

²¹⁷ Drewert, K.G.; Laws, D.R. *J. Inst. Brew.*, 1970, **76**, 188.

²¹⁸ Verzele, M.; De Keukeleire, D. *Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids*. Elsevier, Amsterdam, 1991.

²¹⁹ Kuhnke, J.; Bohlmann, F. *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 3955.

²²⁰ Pathak, V.P.; Khanna, R.N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1982, **55**, 2264.

²²¹ Crombie, L.; Jones, R.C.F.; Palmer, C.J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1987, 317.

Paulo ACFLONH3 F20-21P2/CDCL3 jul20pcnH1

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCL3

Ambient temperature
GEMINI-300BS "gemini"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 0.200 sec

Pulse 31.3 degrees

Acq. time 2.667 sec

Width 6000.0 Hz

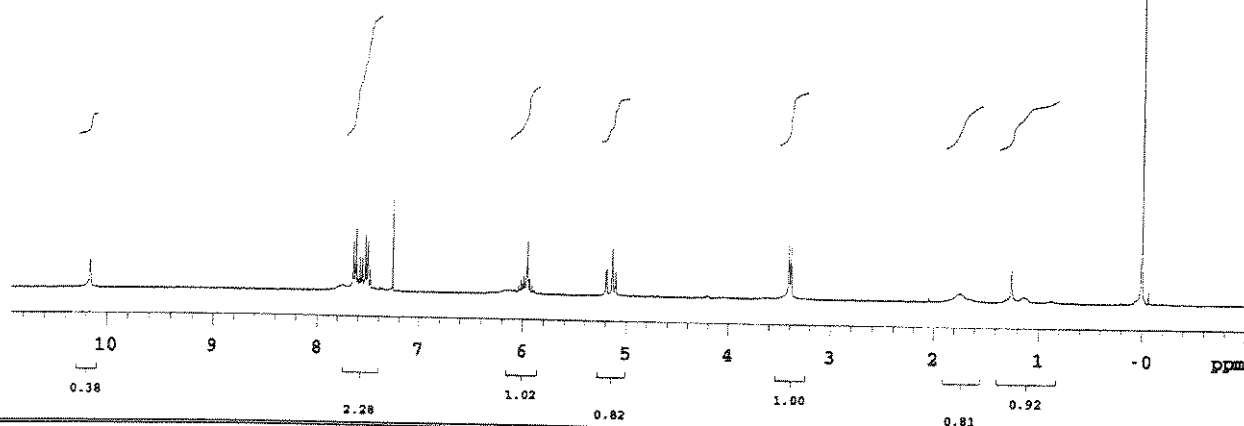
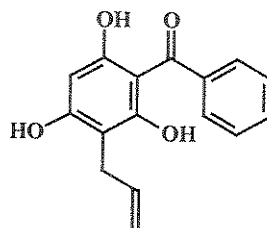
32 repetitions

OBSERVE H1, 300.0673570 MHz

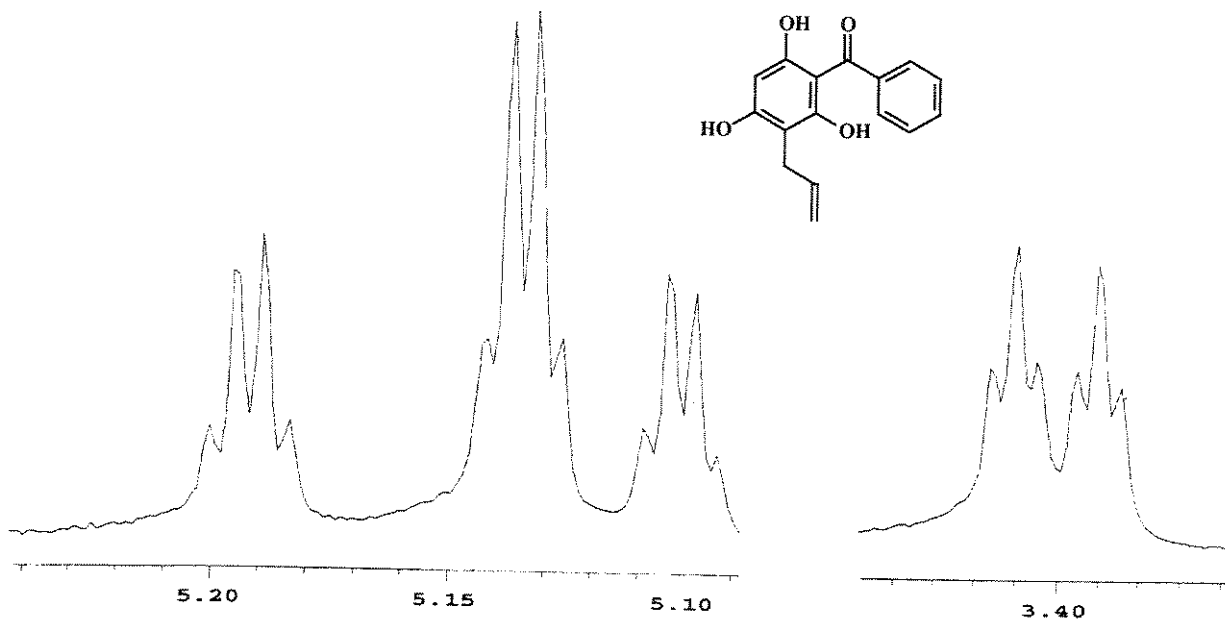
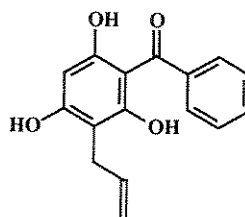
DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 1 min, 31 sec



E41: Espectro de RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do produto alilflorobenzofenona (S14).



E42: Expansões do espectro RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) do produto alilflorobenzofenona (S14).

Paulo ALKNH3 F2021/cdc13 mar16pcnC

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

GEMINI-300BB "gemin1"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 2.000 sec

Pulse 45.4 degrees

Acq. time 0.800 sec

Width 20000.0 Hz

784 repetitions

OBSERVE C13, 75.4519980 MHz

DECOUPLE H1, 300.0688576 MHz

Power 41 dB

continuously on

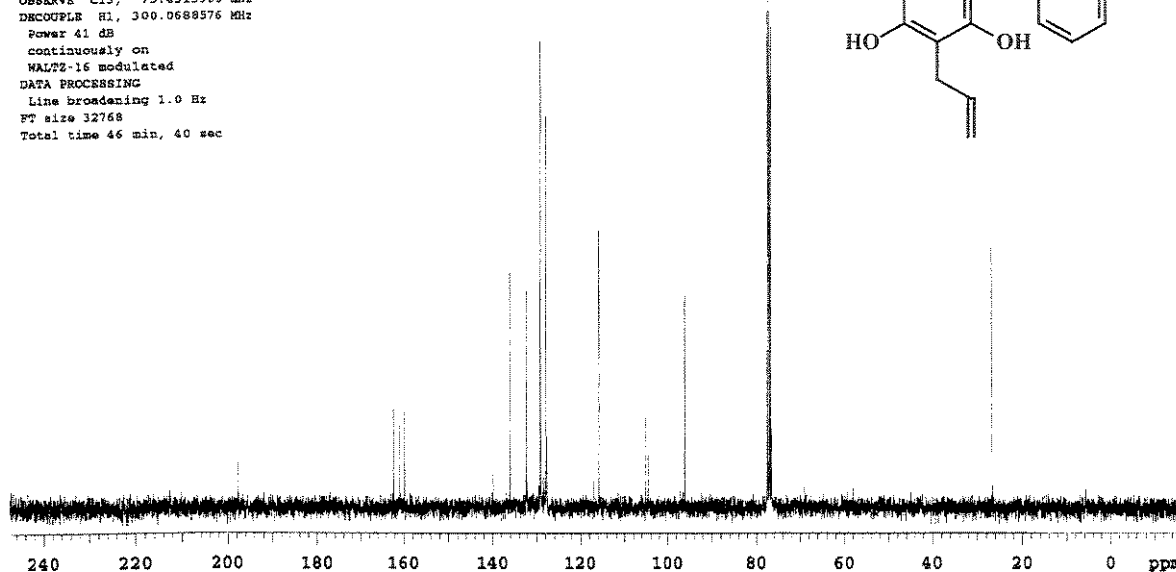
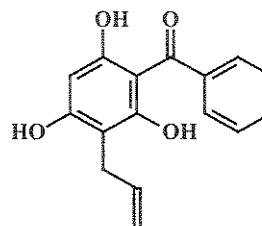
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 32768

Total time 46 min, 40 sec



E43: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do produto alilflorobenzofenona (S14).

Paulo ALKNH3 F2021/cdc13 mar16pcnD

Pulse Sequence: dept

Solvent: cdcl3

Ambient temperature

GEMINI-300BB "gemin1"

PULSE SEQUENCE: dept

Relax. delay 2.000 sec

Pulse 90.0 degrees

Acq. time 0.799 sec

Width 14851.0 Hz

256 repetitions

OBSERVE C13, 75.4519980 MHz

DECOUPLE H1, 300.0688576 MHz

Power 41 dB

on during acquisition

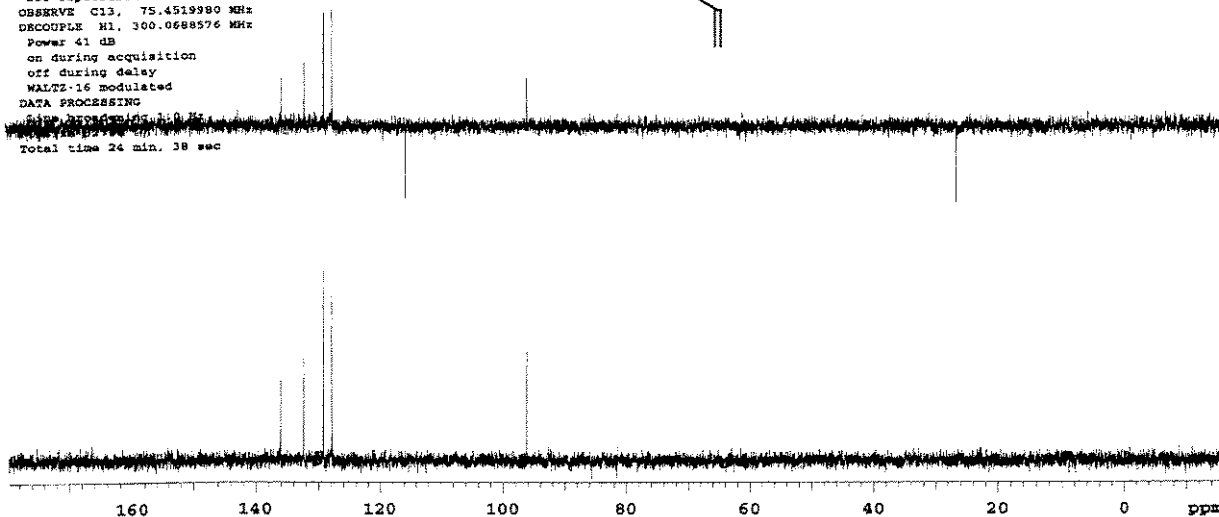
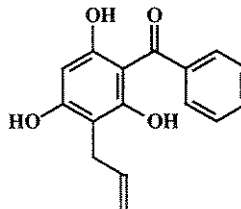
off during delay

WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

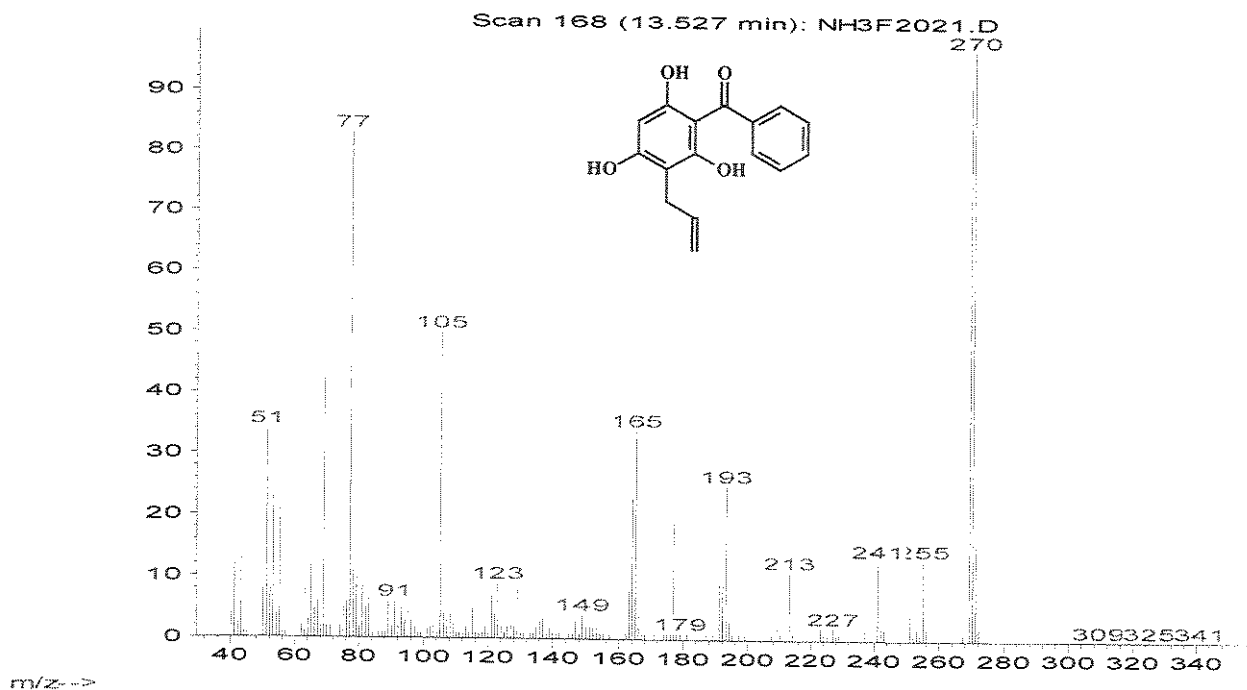
Line broadening 1.0 Hz

Total time 24 min, 38 sec



E44: Espectro de DEPT 90 e 135 °C (75,45 MHz, CDCl_3) do produto alilflorobenzofenona (S14).

Abundance



E45: Espectro de massas (IE, 70 eV) do produto alilflorobenzofenona (**S14**).

O êxito nestas etapas abriria caminho para se testar a reatividade da reação frente a outros haletos de alquila, como brometo de lavandulila e, desta forma, produzir compostos modelos para a realização das reações de ciclização para obtenção das benzofenonas do tipo biciclo[3.3.1]noneno (Esquema 8). Estas novas tentativas, utilizando várias bases e variando-se as condições reacionais já descritas na literatura, estão sendo testadas pela doutoranda Samísia Machado e os seus resultados serão divulgados oportunamente.

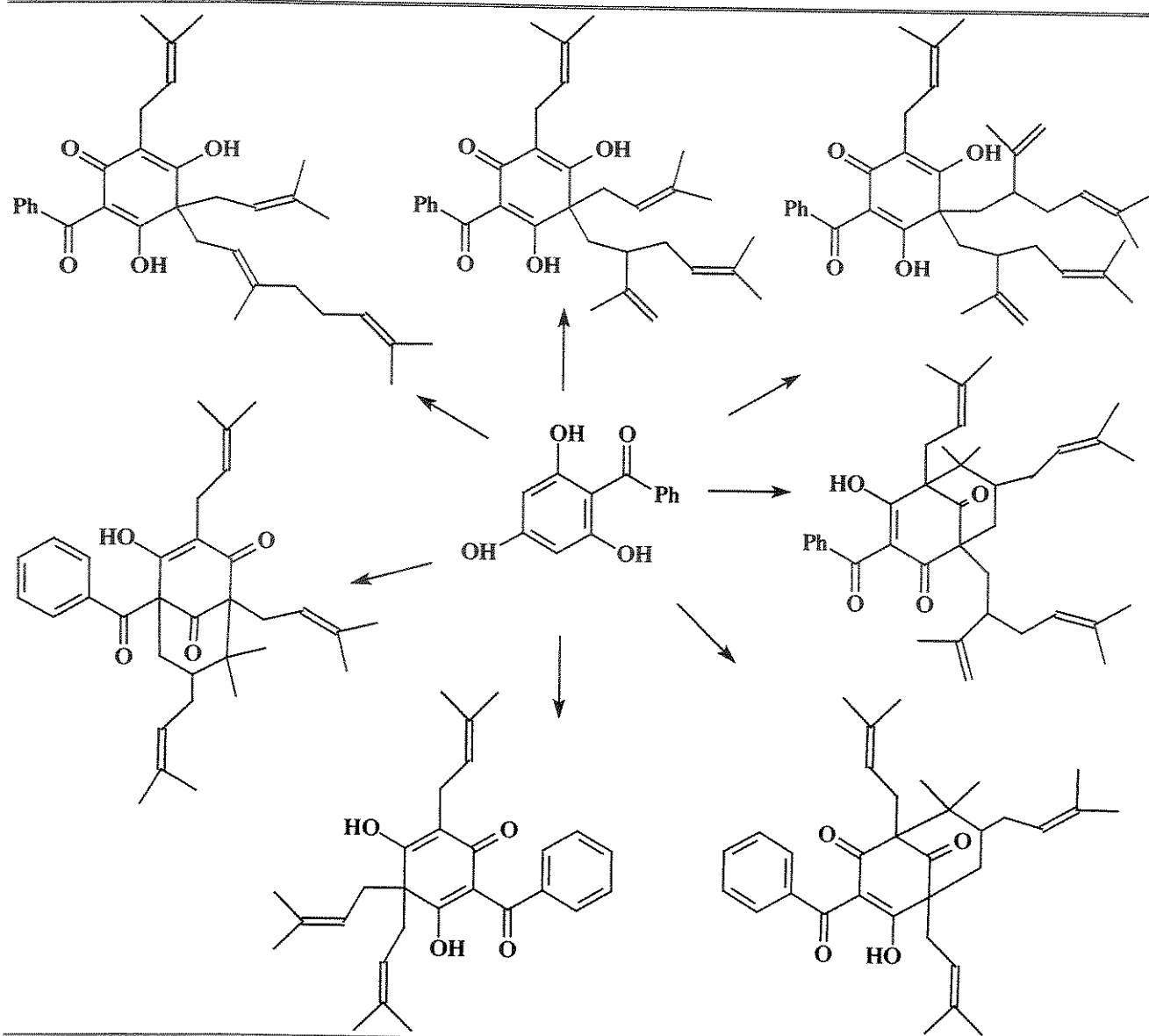
6.4 Conclusões

Nossas tentativas de obtenção das benzofenonas mais simples (tipo II) (Figura 58) foram feitas a partir de duas rotas biomiméticas. As dificuldades encontradas em laboratório na estratégia de alquilação da policetona num estágio anterior a ciclização sugere que a natureza prefere a outra alternativa, ou seja, a hipótese de Verpoorte *et al.* Por outro lado, partindo-se do floroglucinol, mesmo sem ter encontrado as condições ideais, acreditamos que esta seja uma rota viável e embora não tenhamos logrado êxito nesta estratégia, vale ressaltar que além da experiência adquirida, obtivemos a síntese de análogos de produtos naturais com número de etapas e rendimentos mais satisfatórios que os já publicados na literatura²²².

Por fim, seguindo o pensamento de Albert Eschenmoser²²³: “Todas as vezes que tentamos ir contra a natureza, nos deparamos com dificuldades e caminhos muito mais longos de reação”, acreditamos que encontrando a base ideal, se desvendará um acesso fácil aos dois tipos de benzofenonas isoladas de Guttiferae (Esquema 17), mimetizando desta forma, as condições da natureza.

²²² a) Ahluwalia, V.K.; Khanna, M.; Singh, R.P. *Indian J. Chem.*, 1981, **20B**, 990. b) Pathak, V.P.; Khanna, R.N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1982, **55**, 2264. c) *ibid*, *Indian J. Chem.*, 1984, **23B**, 571.

²²³ Heathcock, C.H. *NATO Workshop*, Ravello, May, 1994.



Esquema 17. Florobenzofenona (S8) como intermediário pivotal aos dois tipos de benzofenonas isoladas de Guttiferae.

Parte 7

Conclusões finais

7. Conclusões finais

O estudo dos componentes voláteis das pétalas de 16 espécies de *Clusia* obtidos através da técnica de micro-hidrodestilação revelou que existe alguma correlação entre os polinizadores, os grupos taxonômicos e a composição química dos voláteis florais. O desacordo entre os grupos nos dendrogramas e as seções taxonômicas das espécies, pode estar relacionado à necessidade de atrair polinizadores distintos para garantir a integridade das espécies, na tentativa de evitar a polinização cruzada interespecífica.

As visitas de machos de abelhas euglossine em flores de *Tovomita macrophylla* para coletar óleos aromáticos foi o primeiro caso descrito para a família Guttiferae. A clara distinção entre os perfis químicos dos óleos dos estames das quatro espécies estudadas sugere que eles possam, de fato, atrair diferentes espécies de abelhas machos de euglossine e, desta forma, impedir a polinização cruzada interespecífica. Foi sugerido que o 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecanol, diidrofitol, seja o responsável pela atração do polinizador, macho de *Euglossa* sp., em *Tovomita acutiflora*.

Este trabalho também mostrou que *Alicyclobacillus* são de fato os microrganismos responsáveis pela formação dos odores desagradáveis em suco de laranja. Além disso, as técnicas de hidrodestilação/extração com solvente seguido pelas análises sensoriais olfativas (CG/O) foram úteis para detecção dos compostos importantes para a formação do aroma em sucos deteriorados que, neste caso, foi associado aos ácidos isobutírico, isovalérico e 2-metil-butírico.

Por fim, embora a busca por um rota sintética viável para a obtenção de benzofenonas poliisopreniladas isoladas de *Clusia* não tenha sido alcançada, acreditamos que a rota que utiliza o floroglucinol seja mais viável que a rota do policetídeo, um vez que este é o caminho preferido pela natureza. Além da experiência adquirida, também foram obtidos análogos de produtos naturais com número de etapas e rendimentos mais satisfatórios que os já publicados na literatura.

Parte 8

Experimental

8. Experimental

8.1 Notas gerais

- Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr (sólidos), empregando-se um espectrofotômetro Perkin-Elmer 298 e 1660 FTIR. Como padrão de referência, utilizou-se a absorção em 1601 cm^{-1} , de um filme de poliestireno, fornecido pelo fabricante.
- Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (300,1 MHz) ou INOVA 500 (499,98 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ 0,00) ou CHCl_3 (δ 7,27). Os sinais obtidos foram caracterizados como: s= singlete, sl= singlete largo, d= dubleto, dl= dubleto largo, t= triplete, q= quarteto, quint.= quinteto, sexteto, hepteto, m= multipletto, dd= duplo dubleto, dm= duplo multipletto, dt= duplo triplete, dq= duplo quarteto, td= triplo dubleto, tl= triplete largo, tm= triplo multipletto, tt= triplo triplete, ddd= duplo duplo dubleto, ddm= duplo duplo multipletto, ddt= duplo duplo triplete. As constantes de acoplamento (J) foram citadas em Hz.
- Os espectros de RMN de ^{13}C foram registrados em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (75,45 MHz), ou INOVA 500 (125,70 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ , tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ 0,00) ou CDCl_3 (δ 77,00).
- O número de hidrogênios ligados aos átomos de carbono foi determinado através dos espectros de RMN de ^{13}C , com auxílio das técnicas de RMN de ^{13}C -DEPT (90 e 135° , onde CH_3/CH = sinal positivo, CH_2 = sinal negativo e $\text{C}_{\text{quater.}}$ = ausente).
- As análises por CG foram realizadas empregando-se um cromatógrafo Hewlett Packard – VCD 5890A, com detector de ionização em chama (FID), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-1 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura do filme) ou DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25

μm), usando-se H_2 como gás de arraste (*ca.* $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas foi *ca.* $1,0 \mu\text{L}$ e as condições empregadas foram: (1) 60°C , $3^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 240°C ou (2) 50°C , $3^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 230°C . As temperaturas do injetor e detector foram 220°C e 280°C , respectivamente.

➤ As análises por CG/EM foram realizadas empregando-se um cromatógrafo Hewlett Packard 5890B SERIES II, acoplado a um detector seletivo de massas HP 5970, operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de 70 eV. As colunas capilares de sílica fundida empregadas foram: J&W Scientific DB-5 ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$) ou HP-5 ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$). O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas, foi *ca.* $1,0 \mu\text{L}$ e as condições empregadas foram: (1) 60°C , $3^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 240°C , (2) 50°C , $3^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 230°C , no modo “splitless”, nas quais as temperaturas do injetor e detector foram 220°C e 280°C , respectivamente; ou (3) 80°C , $15^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 290°C (10 min), no modo “split”, com as temperaturas do injetor e detector sendo 280°C e 285°C , respectivamente. O espectrômetro de massas operou com velocidade de $0,84 \text{ scans} \cdot \text{s}^{-1}$ na faixa de m/z 40-550.

➤ As separações de compostos por cromatografia “flash” em coluna foram efetuadas utilizando-se sílica gel 60 (Merck, $0,040\text{-}0,063 \text{ mm}$, 230-400 mesh ASTM) e solventes destilados.

➤ As cromatografias em camada delgada (CCD) analíticas, para o monitoramento das reações e acompanhamento da purificação dos produtos por cromatografia em coluna, foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio ($4 \times 1 \text{ cm}$), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em UV_{254} , das marcas Macherey-Nagel (folha padrão, $4 \times 8 \text{ cm}$) ou Merck (Darmstadt) (folha padrão, $20 \times 20 \text{ cm}$).

➤ A revelação dos compostos nas placas cromatográficas foi feita por irradiação com lâmpada UV_{254} seguida da imersão das mesmas, geralmente numa solução de *p*-anisaldeído²²⁴. (preparada pela mistura de *p*-anisaldeído, H_2SO_4 , HOAc e EtOH, na

²²⁴ Casey, M.; Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G. *Advanced practical organic chemistry*. Chapman & Hall, New York, 1990, p. 264.

proporção de 1:2:1:100 em volumes, respectivamente) e subsequente aquecimento a 300°C, com pistola aquecedora.

- Os pontos de fusão das amostras sólidas foram obtidos através de aparelho MQAPF-301 da Microquímica Ind. e Com. Ltda. e não foram corrigidos.
- Os reagentes e os solventes anidros, em geral, foram preparados e purificados conforme as metodologias descritas por Perrin & Armarego²²⁵.

8.2 Experimental referente à parte 3: Importância ecológica e taxonômica dos voláteis florais de *Clusia*

8.2.1 Obtenção do material vegetal

Os óleos essenciais das pétalas foram obtidos a partir de espécies cultivadas na Fazenda Santa Elisa do Instituto Agrônomo (IAC) em Campinas, São Paulo, Brasil. *Voucher specimens* das espécies foram depositadas no Herbário da UNICAMP (UEC) (coll. nrs. M.C.E. Amaral & V. Bittrich). *C. burchellii* Engl. (#97/3 masc.), *C. criuva* Cambess. (#97/247 masc.), *C. flava* Jacq. (#97/6 masc.), *C. fluminensis* Planch. & Triana (#97/249 masc.), *C. grandiflora* Splitg. (#95/152 masc., 95/153 fem.), *C. hilariana* Schltldl. (#97/248 masc.), *C. lanceolata* Cambess. (#96/27 masc., #96/27a, fem.), *C. nemorosa* G. Mey. (#95/151 masc., 95/150 hermafrodita), *C. panapanari* (Aubl.) Choisy (#95/156 fem.), *C. paralicola* G. Mariz. (#97/5 masc., #97/5a fem.), *C. parviflora* Engl. nom. illeg. (#97/7 fem., #97/7a masc.), *C. pernambucensis* G. Mariz (#95/186 masc.), *C. rosea* Jacq. (#95/154 fem.), *C. renggerioides* Planch. & Triana (#97/1 masc.), *C. spiritus-sanctensis* G. Mariz & B. Weinberg (#95/185 masc., #95/185a fem.), *C. weddelliana* Planch. & Triana (#97/4 masc.).

²²⁵ Perrin, D.D.; Armarego, W.L. *Purification of laboratory chemicals*. 3ed., Pergamon, New York, 1988.

8.2.2 Métodos de extração dos voláteis

8.2.2.1 Micro-hidrodestilação

Pétalas frescas (ca. 5,0 g em 40,0 mL de H₂O) das 16 espécies de *Clusia* estudadas foram submetidas à técnica de micro-hidrodestilação por ca. 1h30min. Os óleos foram extraídos da água (ca. 25,0 mL) com diclorometano (3 x 10,0 mL), seco sobre sulfato de sódio anidro e reduzido até ca. 1,0 mL a temperatura ambiente sob pressão reduzida num evaporador rotatório. Duas ou três análises em replicatas foram utilizadas para algumas espécies (*C. grandiflora*, *C. nemorosa* masc., *C. paralicola*, *C. spiritu-sanctensis*, *C. fluminensis*, *C. weddelliana*, *C. parviflora*, *C. lanceolata* e *C. hilariana*).

8.2.2.2 SPME

As pétalas de *C. grandiflora*, *C. nemorosa*, *C. paralicola*, *C. weddelliana*, *C. fluminensis*, *C. parviflora*, *C. flava*, *C. hilariana* e *C. lanceolata* condicionadas em frascos de vidro (erlenmeyer de 125,0 mL) fechados com septo de borracha foram mantidas a temperatura ambiente por um período de 1 hora ou aquecidos a 40°C ou 70°C. A fibra de SPME (Supelco Co., Bellefonte, PA) coberta com 30µm PDMS ou 85µm Poliacrilato (PA) ou 75µm Carboxen-PDMS foi colocada no espaço livre dos frascos ficando expostas por 30 min. Após este período a fibra foi recolhida e em seguida inserida no injetor do CG/EM através de “liner” próprio por 3 min a 250°C para completa dessorção dos voláteis capturados.

8.2.2.3 CO₂ líquido (EFSC)

Um extrator soxhlet de alta pressão J&W Scientific (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) (Figura 7, página 24) foi usado para obter os extratos das pétalas de *C. weddelliana* masc. (7,1 g), *C. grandiflora* masc. (4,9 g) e *C. parviflora* masculina (4,0 g) usando CO₂ supercrítico (gerado a partir de 170,0 g de gelo seco), mantido a 35-40°C e pressão de 700, 650 e 600 psi, respectivamente. Os extratos obtidos após 1-2 horas de recirculação de CO₂ seguido por despressurização foram dissolvidos em 2,0 mL de CH₂Cl₂.

bidestilado, seco sobre Na_2SO_4 anidro e o solvente foi concentrado sob fluxo nitrogênio e, em seguida, uma alíquota de 1,0 μL foi injetada no CG/EM.

8.2.2.4 “headspace” dinâmico com Porapak Q®

As pétalas de *C. lanceolata* feminina recém abertas (flores de primeiro dia) e abertas no dia anterior (flores de segundo dia) foram colocadas separadamente em recipientes de vidro apropriado. Porapak Q® (30,0-60,0 mg de Porapak Q 80-100 mesh) colocado em tubos de vidro (5 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro interno) com as extremidades fechadas com lã de vidro silanizada, os quais foram previamente tratados com solvente bidestilado, aquecidos a 150°C sob vácuo e resfriados sob fluxo de N_2 , foi usado como adsorvente. Um fluxo de ar atmosférico (400,0 mL/min, por *ca.* 3 horas) foi passado através dos frascos contendo as flores de *Clusia* a temperatura ambiente e os voláteis capturados foram eluídos do polímero com 2,0 mL de CH_2Cl_2 bidestilado e o solvente foi concentrado sob um leve fluxo de N_2 até *ca.* 20,0 μL antes da análise por CG/EM.

8.2.3 CG e CG/EM

As análises foram realizadas utilizando-se um sistema HP-5990/5970 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); as condições empregadas foram: (1) 60°C, 3°C.min⁻¹, 240 °C, para os voláteis obtidos por hidrodestilação, Porapak Q e por extração com CO_2 líquido e (2) 60°C (3min), 3 °C.min⁻¹, 240°C, para as análises de SPME, nas quais, as temperaturas do injetor e detector foram 220°C e 280°C, respectivamente. Os índices de retenção foram obtidos através da co-injeção da amostra de óleo com uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia normal C_{11} - C_{24} e calculados de acordo com a Equação 1. Os índices de retenção na faixa de 900 a 1099 foram obtidos por extrapolação.

CG: Análises foram feitas usando cromatógrafo a gás HP5890A, detector de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e detetor foram 220°C e 285°C,

respectivamente. Hidrogênio foi usado como gás de arraste, com fluxo de 1,16 mL/min, no modo “split”. O volume de injeção, 1,0 µL de uma solução de *ca.* 10,0 mg do óleo essencial em CH₂Cl₂ ou acetato de etila.

CG/EM: O gás de arraste foi hélio e o programa de temperatura foi o mesmo utilizado para os experimentos de CG. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV. A velocidade de varredura foi 0,84 scan.s⁻¹ de *m/z* 40 to 550.

Os óleos foram analisados por CG e CG/EM e a identificação foi feita com base na comparação dos índices de retenção²²⁶, co-injeção com compostos padrão (tanto comercial quanto sintético, caracterizados através dos espectros de IV e RMN de ¹H e ¹³C) bem como através da comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectros de massas Wiley/NBS (275.000 espectros) do sistema CG/EM e outros espectros de massas publicados²²⁷.

8.3 Experimental referente à parte 4: Função ecológica dos óleos florais de *Tovomita*

8.3.1 Métodos e obtenção do material vegetal

As observações da polinização de *Tovomita macrophylla* foram feitas pelo Dr. Volker Bittrich e pela Dra. Maria do Carmo E. do Amaral (IB-UNICAMP) em vários dias durante a época de floração (1996) numa floresta de igapó num aflgente do rio Tarumã-açu, nas proximidades de Manaus (Amazônia Central). O óleo dos estames das quatro espécies de *Tovomita* estudadas que ocorrem na Reserva Ducke próximo a Manaus foram coletados diretamente dos filamentos das flores frescas, utilizando papel de filtro com alto grau de pureza. *Voucher specimens* das espécies foram depositadas nos Herbários do INPA e da UNICAMP (UEC). *Tovomita* cf. *acutiflora* M.S. Barros & G. Maritz (voucher # J.E.L.S. Ribeiro 1840 *et al.*). *Tovomita amazonica* (Poepp. & Endl.)

²²⁶ Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J. *J. Chromatog.*, 1963, **11**, 463.

²²⁷ Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing, Illinois, 1995.

Walp. (voucher # J.E.L.S. Ribeiro 1745 *et al.*). *Tovomita* aff. *grata* Sandwith (voucher # J.R. Nascimento 517). *Tovomita rubella* Planch. & Triana (voucher # A. Vicentini 1081).

8.3.2 CG e CG/EM

As análises foram feitas usando-se um sistema HP-5990/5970 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); as condições empregadas foram 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C. Os índices de retenção foram obtidos através da co-injeção da amostra de óleo com uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia normal C₁₁-C₂₄ e calculados de acordo com a Equação 1. Os índices de retenção na faixa de 900 a 1099 foram obtidos por extrapolação.

CG: Análises foram feitas usando cromatógrafo a gás HP5890A, detector de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e detector foram 220°C e 285°C, respectivamente. Hidrogênio foi usado como gás de arraste, com fluxo de 1,16 mL/min, no modo “split”. O volume de injeção, 0,5 μ L de uma solução de *ca.* 10,0 mg do óleo estaminal em acetato de etila.

CG/EM: O gás de arraste foi hélio (velocidade linear de 33,0 cm.s⁻¹) e o programa de temperatura foi o mesmo utilizado para os experimentos de CG. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV. A velocidade de varredura foi 0,84 scan.sec⁻¹ de *m/z* 40 to 550.

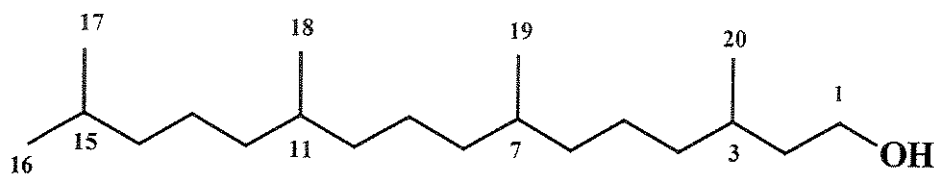
Os óleos foram analisados por CG e CG/EM e a identificação foi feita com base na co-injeção de compostos padrão (tanto comercial quanto sintético, caracterizados através dos espectros de EM e RMN de ¹H e ¹³C) e comparação dos índices de retenção²²⁸, bem como através comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectros de massas Wiley/NBS do sistema CG/EM e outros espectros de massas publicados²²⁹.

²²⁸ Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J. *J. Chromatog.*, 1963, **11**, 463.

²²⁹ Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing, Illinois, 1995.

8.3.3 Reação de hidrogenação do fitol comercial (obtenção do diidrofitol)

Fitol [gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Francisco Reis (IQ-UNICAMP) (obtido da Fluka como mistura 2:1 dos isômeros *E:Z*, 1,7 mmol, 0,5 g)] em acetato de etila (5,0 mL) foi tratado com Pt/C (50,0 mg) na presença de H₂ (30 psi) a temperatura ambiente por 2 horas. A mistura reacional foi filtrada sob uma fina camada de Celite® e o solvente evaporado sob pressão reduzida. A análise por CG do bruto da reação revelou a formação de dois picos que após purificação através de cromatografia em coluna de sílica gel usando hexano : AcOEt : MeOH (8 : 1,5 : 0,5) como eluente produziu 50,0 mg do diidrofitol (mistura de 3*RS*,7*R*,11*R*,15-tetrametil-1-hexadecanol) e 450,0 mg de uma mistura de diidrofitol e um outro subproduto.



Dados para o diidrofitol ²³⁰:

Aspecto físico: líquido incolor.

EM *m/z* (%): 298 (*M*⁺, 1), 280 (*M*⁺-H₂O, 2), 140 (7), 126 (15), 125 (26), 111 (21), 97 (25), 96 (11), 85 (17), 84 (13), 83 (30), 71 (37), 70 (37), 69 (46), 57 (56), 56 (26), 55 (48), 43 (100), 41 (33).

RMN de ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ: 0,85 (d, 6H, *J*=6,6, 2 CH₃, H-16 e H-17), 0,87 (d, 6H, *J*=6,6, 2 CH₃, H-18 e H-19), 0,90 (d, 3H, *J*=6,6, CH₃, H-20), 1,07-1,65 (m, 23H, H-2 a H-15 e OH-1), 3,66-3,71 (m, 2H, H-1).

RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃) δ: 19,38(CH₃), 19,46(CH₃), 19,53(CH₃), 22,41(CH₃), 22,51(CH₃), 24,17(CH₂), 24,26(CH₂), 24,28(CH₂), 24,61(CH₂), 27,79(CH), 29,32(CH),

²³⁰ a) Jung, M.E.; Liu, C.-Y. *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 5446. b) Heathcock, C.; Finkelstein, B.L.; Jarvi, E.T.; Radel, P.A. *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 1922.

29,33(CH), 32,60(CH), 32,62(CH), 37,16(CH₂), 37,23(CH₂), 37,29(CH₂), 37,34(CH₂), 39,23(CH₂), 39,82(CH₂), 39,91(CH₂), 61,20(CH₂).

8.4 Experimental referente à parte 5: Análises de voláteis por CG/EM em suco de laranja industrial infectado por *Alicyclobacillus* spp.

8.4.1 Método de análise dos ácidos graxos dos microrganismos[#]

As análises dos ácidos graxos dos microrganismos foram realizadas conforme o método descrito por De Rosa *et al.*²³¹ e os protocolos do sistema MIDI²³². As células cresceram em meio BAT a 50°C sob agitação (1500 rpm) por 24-48 horas. A biomassa foi coletada por centrifugação, lavada 2 vezes com água destilada e liofilizada. As amostras assim obtidas, foram diluídas em acetato de etila e uma amostra de 1,0 µL foi injetada no CG/EM, um sistema HP 5990/5970 equipado com coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); com a temperatura do forno programada de 160°C (5 min) a 290°C (5 min) a 3°C/min. As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 285°C, respectivamente. A identificação foi feita com base na comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectros de massas Wiley/NBS do sistema CG/EM e outros espectros de massas publicados²³³.

8.4.2 Procedimento para obtenção dos sucos de laranja deteriorados[#]

As amostras de sucos de laranja utilizados na etapa de seleção de linhagens foram suco integral da marca VitaSuco e suco reconstituído (1:6) a partir de suco concentrado

[#] Experimentos realizados por Edna H. Azuma – Fundação André Tosello.

²³¹ De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Minale, L. *Chem. Commun.*, 1971, (12), 619.

²³² Microbial ID, Newark, DE.

²³³ a) Moore, B.S.; Floss, H.G. *J. Nat. Prod.*, 1995, **58**, 590. b) Deinhard, G.; Blanz, P.; Poralla, K.; Altan, E.; *Syst. Appl. Microbiol.*, 1987, **10**, 47.

[#] Experimentos realizados por Edna H. Azuma – Fundação André Tosello.

congelado processado pela Sucocítrico Cutrale Ltda. de Colina (SP). O suco concentrado apresentou as seguintes características: sólidos solúveis, 66°Brix; ratio, 16,84; ácido ascórbico, 420 mg/L; pH do suco reconstituído, 3,86 e número de cor, 38,1. A contagem inicial de ATSB (do inglês, “Acid Thermophilic Sporeforming Bacterium”) no suco concentrado foi de 10 UFC/mL. O Meio para cultivo das linhagens utilizado foi BAM (“Bacillus Acidocaldarius Medium”)²³⁴ e os meios utilizados para enumeração de bactérias heterotróficas totais foram PCA (“Plate Count Agar”, marca Difco) e OSA (“Orange Serum Agar”, marca Difco). Já para enumeração de bolores e leveduras utilizou-se o meio PDA (“Potato Dextrose Agar”, marca Difco).

Foram utilizadas 13 linhagens de ATSB depositadas no acervo da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, selecionadas aleatoriamente a partir de isolados de plantas de processamento de cítricos. As culturas foram mantidas em meio BAM e 16 linhagens foram testadas com relação à capacidade de crescimento em suco de laranja reconstituído e produção de odor desagradável. A preparação das amostras foram obtidas seguindo-se os protocolos abaixo:

Experimento I: Porções de suco de laranja reconstituído (1:5) a partir de SLCC (Suco de Laranja Concentrado e Congelado) foram inoculados com diferentes concentrações do inóculo constituído de 03 linhagens de *Alicyclobacillus* selecionadas com potencial deteriorante. Pasteurização foi efetuada a 80°C por 5 minutos e o suco foi envasado pelo processo “Hot-Fill” em garrafas de vidro de 500,0 mL. Os frascos foram resfriados após processamento até a temperatura de incubação de acordo com:

Amostra	Nível do inóculo (UFC/mL)	Tratamento
Controle	0	Reconstituído, pasteurizado e incubado a 4°C
1	10	Reconstituído, inoculado, pasteurizado e incubado a 37°C
2	10 ²	Reconstituído, inoculado, pasteurizado e incubado a 37°C
3	10 ³	Reconstituído, inoculado, pasteurizado e incubado a 37°C

²³⁴ Deinhard, G.; Blanz, P.; Poralla, K.; Altan, E. *System. Appl. Microbiol.*, 1987, **10**, 47.

Experimento II: 20,0 mL suco reconstituído até 12°Brix, em frascos de 50,0 mL foram inoculados com 1,0 mL de uma suspensão de esporos (10^4 UFC/mL) constituída de um conjunto de 03 linhagens de *Alicyclobacillus* com 48 horas de crescimento. Os frascos foram incubados a 42°C por 72 horas. Suco reconstituído, não inoculado e incubado a 4°C foi usado como controle. As amostras utilizadas foram:

A: inoculado com 03 linhagens (CCT4384 + CCT6280 + CCT6281)

B: suco reconstituído não inoculado

8.4.3 Procedimento para a extração dos componentes voláteis dos sucos de laranja

SPME (Microextração em Fase Sólida): Uma alíquota de 5,0 mL de suco de laranja foi transferida para um frasco de 20,0 mL contendo uma micro barra magnética. O frasco foi hermeticamente fechado com septo de teflon e tampa de alumínio. A fibra de SPME (Supelco Co.) coberta com 30µm de Polidimetilsiloxano (PDMS) ou 85µm Poliacrilato (PA) ou 75µm Carboxen-PDMS foi manualmente inserida no espaço livre do frasco (mantido a 40°C ou 70°C por 30 minutos). Os compostos do aroma adsorvidos na fibra foram injetados na porta de injeção do CG a 250°C e mantidos por 3 minutos para completa dessorção dos mesmos.

Hidrodestilação/Extração: Uma alíquota do suco (20,0 mL) foi colocada num balão acoplado a um condensador sob agitação, a mistura foi destilada e os voláteis extraídos da fase aquosa com CH_2Cl_2 bidestilado (3 x 10,0 mL), seco sobre Na_2SO_4 anidro, o solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo analisado através CG e CG/EM.

8.4.4 CG e CG/EM

CG: Análises foram feitas usando cromatógrafo a gás HP5890A, detector de ionização de chama (FID), equipado com 2 colunas capilares de sílica fundida J&W Scientific DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); temperaturas programadas foram: (1) 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C e (2) 50°C, 3°C.min⁻¹, 230°C, para as análises dos efluentes do CG (CG/O), nos experimentos I e II e experimentos com atmosfera modificada de gases, respectivamente. Temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 300°C, respectivamente. Hidrogênio foi usado como gás de arraste, fluxo de 1,2 mL.min⁻¹, modo “split”.

CG/EM: utilizou-se um sistema HP 5990/5970 equipado com coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); as condições empregadas foram: (1) 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C, para os voláteis obtidos por hidrodestilação nos sucos dos experimentos I e II e (2) 50°C, 3 °C.min⁻¹, 230°C, para as análises dos experimentos com atmosfera modificada de gases. As temperaturas do injetor e detector foram 220°C e 280°C, respectivamente; temperaturas do injetor e detector foram 220°C e 285°C, respectivamente. O gás de arraste foi Hélio a 33,0 cm.s⁻¹ e o programa de temperatura foi o mesmo dos experimentos em CG. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV, 0,84 scan.s⁻¹ de m/z 40 até 550.

Os índices de retenção foram obtidos através da co-injeção da amostra de óleo com uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia normal C₁₁-C₂₄ e calculados de acordo com a Equação 1. Os índices de retenção na faixa de 900 a 1099 foram obtidos por extrapolação. Os óleos foram analisados por CG e CG/EM e a identificação foi feita com base na co-injeção de compostos padrão (sintético, caracterizados através dos espectros de EM e RMN de ¹H e ¹³C) e comparação dos índices de retenção²³⁵, bem como através comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectros de massas Wiley/NBS do sistema CG/EM e outros espectros de massas publicados²³⁶.

²³⁵ Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J. *J. Chromatog.*, 1963, **11**, 463.

²³⁶ Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing, Illinois, 1995.

8.4.5 Preparação do inóculo[#]

O inóculo consistiu de uma suspensão celular (escala 01 MacFarland) de culturas cultivadas em meio BAM por 48 horas a 50°C, a qual foi adicionada na proporção de 1,0 mL para cada 100,0 mL de suco.

8.4.6 Protocolo do teste com atmosfera de gases modificada[#]

O inóculo consistiu de uma suspensão de esporos de um conjunto de 03 (três) linhagens de *Alicyclobacillus*, sendo adicionado aos frascos contendo o suco reconstituído para obter concentração final de 10^2 UFC/mL.

8.4.7 Preparo das amostras[#]

O suco foi reconstituído na proporção de 500,0 g de suco de laranja concentrado congelado para 2,5 L de água destilada estéril (1:6). Foram preparados 05 lotes de 2,5 L de suco reconstituído. Em seguida, o suco foi distribuído em alíquotas de 100,0 mL, em frascos Schott de 250,0 mL, com a finalidade de se proporcionar um amplo espaço livre. Este espaço livre foi destinado a ser preenchido com diferentes gases, proporcionando uma atmosfera modificada, a fim de se estudar o comportamento das linhagens potencialmente deteriorantes nas condições fornecidas. A tabela 7, a seguir, apresenta as fases do experimento:

[#] Experimentos realizados por Edna H. Azuma – Fundação André Tosello.

Tabela 7: Fases da análise das amostras de suco inoculado com *Alicyclobacillus* e armazenados em diferentes condições de atmosfera de gases.

Etapas do processamento para o teste com atmosfera de gases modificada

- 1-Reconstituição do suco (1:6)
 - 2-Inoculação: 1,0 mL da suspensão de esporos do conjunto de *Alicyclobacillus*
 - 3-Pasteurização a 80°C durante 10 minutos
 - 4-Resfriamento da amostra com injeção e aspersão de gás (nitrogênio ou oxigênio)
 - 5-Armazenamento das amostras a 40°C
 - 6-Coleta de amostras em cinco etapas: tempo zero, 2, 7, 14 e 21 dias
 - 7-Análise microbiológica e avaliação sensorial de odor
-

Os cinco lotes foram submetidos à pasteurização a 80°C em banho-maria durante 10 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo até a temperatura de aproximadamente 25°C. Durante o resfriamento, as amostras dos cinco lotes foram borbulhadas com nitrogênio, utilizando-se uma canaleta. No espaço livre dos frascos, foi feita aspersão de gases seguindo os seguintes critérios: nitrogênio, nos dois lotes de padrões e em um dos lotes inoculados, oxigênio em outro lote e um lote permaneceu exposto ao ar atmosférico. Dois lotes não foram inoculados e serviram como padrões para a avaliação sensorial. Os três demais lotes foram inoculados com 1,0 mL do inóculo.

8.4.8 Análises Olfativas (CG/O)

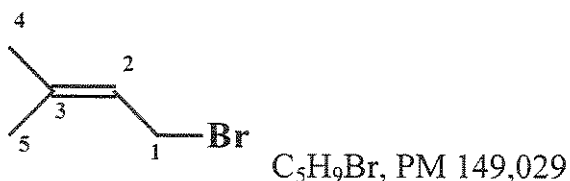
Duas mulheres e um homem sentados confortavelmente na frente de um cromatógrafo Hewlett Packard modelo VCD 5890A, equipado com duas colunas capilares de sílica fundida J&W Scientific DB-1 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) conectadas ao mesmo injetor com uma anilha de vespel com dois orifícios, uma delas conectada a um detector de ionização em chama (FID) e a outra com saída para análise dos efluentes pelos analistas. Os odores foram marcados de acordo com o tipo de odor percebido e assinalados através dos respectivos tempos de retenção. A análise da amostra com maior nível de deterioração,

suco preenchido com ar atmosférico com 21 dias de incubação, foi realizada em réplica por cada analista.

8.5 Experimental referente à parte 6: Estudos sintéticos para obtenção das benzofenonas isoladas de *Clusia*

8.5.1 Rota via acetilacetona

8.5.1.1 Preparação do 1-bromo-3-metil-2-butenos (brometo de prenila)

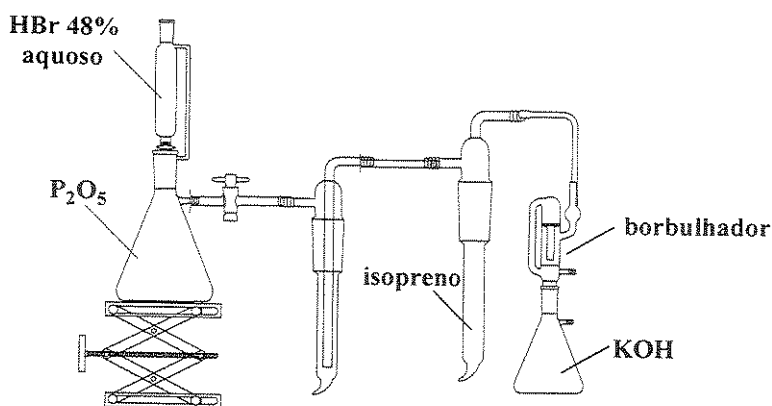


Método A²³⁷: À solução de HBr 30% em ácido acético (0,30 mol, $d=1,354$, 18,0 mL) adicionou-se, lentamente sob agitação a 0°C em atmosfera de Argônio, isopreno (0,30 mol, $d=0,681$, 30,0 mL). O frasco com a mistura foi fechado e deixado em repouso no freezer por 15 dias e após este período, a reação foi tratada com 400,0 mL de H₂O gelada, separando-se um óleo amarelo, o qual foi destilado sob pressão reduzida (59-60°C/60 mmHg). O produto, brometo de prenila, foi obtido em baixo rendimento (1,45 g, 3,3%) devido a perda de material durante o processo de destilação, portanto seu rendimento não pôde ser calculado corretamente.

Método B²³⁸: Uma solução de HBr 48% aquoso (50,6 g, 34,0 mL) foi adicionada, gota a gota, sobre P₂O₅ (0,58 mol, 82,0 g). Os vapores resultantes passaram através de um frasco contendo isopreno (0,30 mol, 30,0 mL). Após o término da adição, o material foi transferido para um balão e após ter permanecido 24 horas em freezer foi destilado sob vácuo (ca. 60 mmHg, trompa de vácuo). O produto, brometo de prenila, foi obtido junto com outro isômero (15,5 g, 35,0%).

²³⁷ a) Nascimento, L. R. Dissertação de Mestrado. IQ/UNICAMP, 1991, 119. b) Slaudinger, H.; Krees, W.; Schilt, W. *Helv. Chim. Acta*, 1922, **5**, 743.

²³⁸ Vogel, A.I. *Textbook of practical organic chemistry*. 5th Ed. Longman Inc., New York, 1989, p. 575.



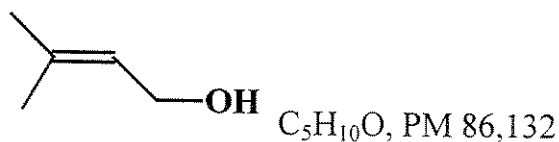
Aspecto físico: líquido levemente amarelado.

EM m/z (%): 150 ($M^+ + 2$, 3), 148 (3), 69 (88), 41 (100).

RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) δ : 1,73 (s, 3H, H-4), 1,78 (s, 3H, H-5), 4,01 (d, 2H, $J=8,4$, H-1), 5,53 (tm, 1H, $J=8,4$ e 1,4, H-2).

RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) δ : 17,5 (CH_3 , C-4), 25,7 (CH_3 , C-5), 29,7 (CH_2 , C-1), 120,9 (CH , C-2), 140,2 (C_0 , C-3).

8.5.1.2 Obtenção do prenol a partir do 2-metil-3-buten-2-ol (rearranjo alílico)²³⁹



O álcool terciário 2-metil-3-buten-2-ol (11,4 mmol, 984,3 mg, 1,2 mL) em ácido acético glacial (25,0 mL) foi adicionado de forma rápida sobre uma mistura de ácido acético (25,0 mL), anidrido acético (10,0 mL) e PTSA (643,6 mg) a 0°C. A reação foi interrompida após 10 min despejando-se a mistura reacional sobre H_2O (500,0 mL). O produto, acetato de prenila, foi extraído com pentano e utilizado sem purificação para etapa seguinte.

²³⁹ Babler, J.H.; Olsen, D.O. *Tetrahedron Lett.*, 1974, (4), 351.

8.5.1.2.1 Hidrólise do acetato de prenila²³⁵

Sobre a mistura de acetato de prenila (bruto da reação anterior) em MeOH (10,0 mL) adicionou-se lentamente sob agitação em banho de gelo uma solução de KOH/MeOH/H₂O (20,0 mmol, 1,1 g KOH/10,0 mL H₂O/10,0 mL MeOH). Após 15 min, adicionou-se H₂O gelada (50,0 mL) e a fase orgânica foi extraída com éter etílico (4 x 50,0 mL). A fase etérea foi lavada com HCl (0,5 mL em 50,0 mL H₂O) e em seguida por uma solução saturada de NaHCO₃, seca sobre Na₂SO₄ anidro e concentrada sob vácuo. O produto foi destilado, obtendo-se 955,3 mg do prenol (97,1%).

Aspecto físico: líquido incolor, aroma característico de folha verde.

EM *m/z* (%): 86(M⁺, 22), 71(100), 68(15), 67(14), 53(28), 43(48), 41 (54).

8.5.1.3 Reação de alquilação da acetilacetona

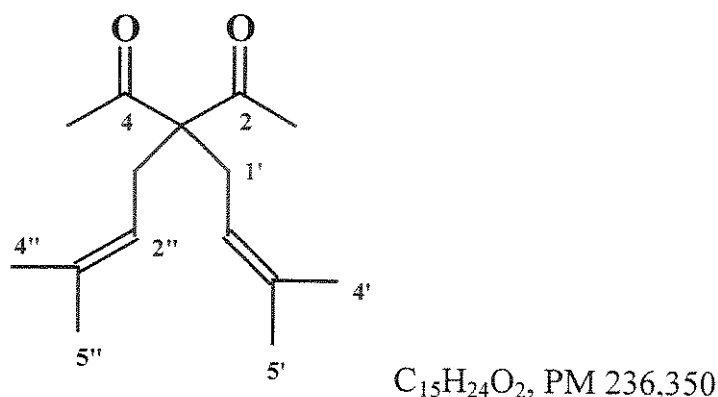
Método 1 (Alumina)²⁴⁰: Sódio metálico em hexano (12,5 mmol, 28,7 mg) foi transferido para um balão com etanol (20,0 mL) num banho de gelo. Após a dissolução do metal, a solução foi colocada em outro balão contendo de alumina (5,0 g ativada a 140°C por 6 horas sob vácuo) e a mistura permaneceu sob agitação por 10 min a temperatura ambiente. Logo depois, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo, um pó branco, foi utilizado no mesmo dia.

A acetilacetona (5,0 mmol, 500,0 mg, 0,5 mL) foi então adicionada na superfície da alumina impregnada com NaOEt (12,5 mmol) permanecendo sob agitação por 30 min sob atmosfera de Argônio. Em seguida, foi adicionado brometo de prenila (7,0 mmol, 1,03 g, 0,80 mL) e a agitação continuou até o final da reação (16 horas). A massa sólida foi colocada numa coluna contendo uma fina camada de sílica gel e lavada com várias porções de CH₂Cl₂. O solvente foi evaporado e o resíduo (746,6 mg) foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel eluída com hexano : acetato de etila 1-5%, fornecendo do produto (S3) (465,0 mg, 39,0%).

²⁴⁰ Ranu, B.C.; Bhar, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1992, (3), 365.

Método 2 (K_2CO_3)²⁴¹: Uma mistura de acetilacetona (5,0 mmol, 0,5 mL) em acetona tratada (10,0 mL), K_2CO_3 anidro (15,0 mmol, 2,1 g) e brometo de prenila (11,0 mmol, $d=1,293$, 1,6 mL) foram agitados a temperatura ambiente por 75 horas. Após este período, adicionou-se cicloexano (10,0 mL) deixando a mistura em agitação por mais 15 minutos e em seguida filtrou-se o material sob uma fina camada de Celite®. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado por cromatografia “flash” em sílica gel obtendo-se o produto 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (S3) (849,6 mg, 72,0%).

Dados para 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona:



Aspecto físico: líquido levemente amarelo.

EM m/z (%): 236 (M^+ , 1), 193(11), 167(24), 137 (8), 95(9), 69(14), 43(100), 41(24).

RMN de 1H (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,57 (s, 6H, H-4' e H-4'')*, 1,64 (s, 6H, H-5' e H-5'')*, 2,05 (s, 6H, H-1 e H-5), 2,56 (d, $J=7,1$, 4H, H-1' e H-1''), 4,76 (tl, $J=7,1$, 2H, H-2' e H-2''). (*) valores intercambiáveis.

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3$) δ : 17,6 (2 CH_3 , C-4' e C-4''), 25,7 (2 CH_3 , C-5' e C-5''), 26,7 (2 CH_3 , C-1 e C-5), 28,9 (2 CH_2 , C1' e C-2''), 70,6 (C_0 , C-3), 117,7 (2 CH , C-2' e C-2''), 135,6 (2 C_0 , C-3' e C-3''), 207,4 (2 C_0 , C-2 e C-4).

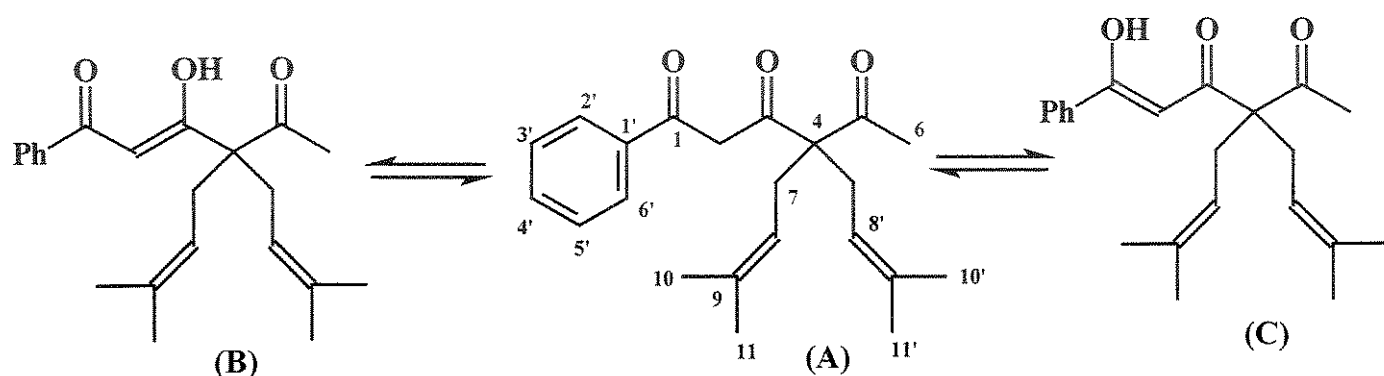
8.5.1.4 Reação de acilação da 3,3-diprenil-1,4-pentanodiona

Método 1 (nBuLi): Uma solução contendo 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (0,628 mmol, 147,0 mg) em THF seco (15,0 mL) foi tratada com nBuLi 1,7M (0,628 mmol, 370,0 μ L) e deixada sob agitação por 20 min. Após este período, uma solução de cloreto de benzoíla

²⁴¹ De Araújo, A.C.V.; de Almeida, F.V.; Bieber, L.W. *Química Nova*, 1996, **19**, 79.

(0,525 mmol, 61,0 μ L) em THF seco (10,0 mL) foi lentamente adicionada através de um funil de adição e a mistura permaneceu sob agitação por mais 4h36min a 0°C. Ao final, a reação foi tratada com solução saturada de NH_4Cl , acidificada com HCl 1N e extraída com CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO_3 e NaCl , seca sobre Na_2SO_4 anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Após purificação do produto bruto (204,9 mg) por cromatografia “flash” em coluna sobre sílica gel eluída com hexano: acetato de etila 2% obtivemos a 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona desejada (**S4**) (98,7 mg, 46,1%).

Dados para o produto (**S4**):



$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_3$, PM 340,456

Aspecto físico: líquido amarelo pálido.

EM m/z (%): 340(6), 297(51), 271(100), 229(19), 193(17), 151(27), 147(33), 105(78), 77(19), 69(35), 43(44) (tautômero A, B ou C).

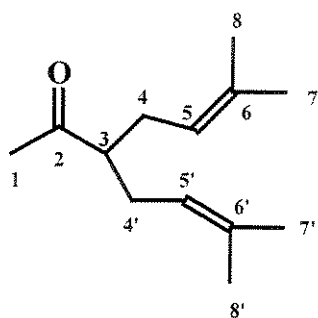
RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) da mistura dos tautômeros ceto-enólicos δ : 1,57 (s, 6H, H-10 e H-10'), 1,59 (s, 6H, H-10 e H-10'), 1,60 (s, 6H, H-10 e H-10'), 1,62 (s, 6H, H-11 e H-11'), 1,67 (s, 6H, H-11 e H-11'), 1,68 (s, 6H, H-11 e H-11'), 2,07 (s, 3H, H-6), 2,13 (s, 3H, H-6), 2,22 (s, 3H, H-6), 2,46 (m, 4H, H-7 e H-7'), 2,64 (m, 4H, H-7 e H-7'), 2,74 (m, 4H, H-7 e H-7'), 4,78 (tl, 2H, $J=6,8$, H-8 e H-8'), 4,87 (tl, 2H, $J=6,8$, H-8 e H-8'), 4,96 (tl, 2H, $J=6,8$, H-8 e H-8'), 5,23 (d, 1H, $J=2,5$, H-2 em A), 5,42 (d, 1H, $J=2,5$, H-2 em A), 6,16 (s, 2H, H-2 em B e C), 7,97-7,41 (m, 15H, H-2' a H-6').

RMN de ^{13}C (125,7 MHz, CDCl_3) δ : 17,7 (CH_3), 17,97 (CH_3), 17,98 (CH_3), 25,6 (CH_3), 26,03 (CH_3), 26,05 (CH_3), 26,9 (CH_3), 27,7 (CH_3), 29,3 (CH_2), 29,5 (CH_2), 30,4 (CH_2),

60,5 (C₀), 66,5 (C₀), 68,9 (C₀), 94,8 (CH), 103,9 (CH₂), 117,3 (CH), 117,8 (CH), 118,3 (CH), 127,0 (CH), 128,5 (CH), 128,6 (CH), 128,7 (CH), 129,5 (C₀), 129,9 (CH), 132,5 (CH), 132,9 (C₀), 133,5 (CH), 133,9 (C₀), 134,7 (C₀), 135,4 (C₀), 135,5 (C₀), 136,5 (C₀), 155,1 (C₀), 163,8 (C₀), 181,0 (C₀), 197,9 (C₀), 198,8 (C₀), 206,7 (C₀), 207,8 (C₀), 208,3 (C₀).

Método 2 (NaH): NaH em 60% óleo mineral (1,3 mmol, 53,7 mg) foi lavado com 2 porções de THF seco (4,0 mL). Então THF seco (3,0 mL) foi adicionado e a suspensão branca resultante foi resfriada a 0°C. A solução da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (1,1 mmol, 232,3 mg) em THF seco (2,0 mL) foi adicionada sob atmosfera de N₂ e solução amarela resultante foi mantida sob agitação por 30 min a 0°C. Após este período foi adicionada, gota a gota, uma solução de cloreto de benzoíla (1,1 mmol, 130,0 µL) em THF (1,0 mL). A agitação continuou por mais 3 horas a temperatura ambiente e ao final deste período adicionou-se solução saturada de NH₄Cl. A fase orgânica foi extraída com CH₂Cl₂, lavada com solução de NaHCO₃ seguida por solução saturada de NaCl, seca com NaSO₄ anidro e o solvente concentrado sob pressão reduzida. Após cromatografia em coluna sobre sílica gel recuperou-se parte do material de partida e o produto oriundo da clivagem retro-Claisen (**S6**).

Dados para o composto (**S6**):



C₁₃H₂₂O, PM 194,313

Aspecto físico: líquido incolor.

EM *m/z* (%): 194 (M⁺, 3), 179(2), 151(3), 125(45), 107(22), 83(23), 69(25), 43(100), 41(55).

RMN de ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 1,58 (s, 6H, H-8 e H-8'), 1,66 (s, 6H, H-7 e H-7'), 2,08 (s, 3H, H-1), 2,29-2,06 (m, 4H, H-4 e H-4'), 2,52-2,44 (m, 1H, H-3), 5,01 (tl, $J=7,3$ e 1,3, 2H, H-5 e H-5').

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 17,6 (2 CH_3 , C-8 e C-8'), 25,6 (2 CH_3 , C-7 e C-7'), 29,4 (CH, C-3), 29,6 (2 CH_2 , C-4 e C-4'), 53,2 (CH_3 , C-1), 121,3 (2 CH, C-5 e C-5'), 133,6 (2 C_0 , C-6 e C-6'), 212,7 (C_0 , C-2).

Método 3 (LHMDs): Num balão de 3 bocas foi colocado THF seco (1,0 mL) e HMDS (Merck) (0,57 mmol, $d=0,78$, 120,0 μL) sem tratamento prévio sob atmosfera de N_2 a -78°C . Em seguida, adicionou-se, gota a gota, $n\text{BuLi}$ em hexano 1,96M (0,57 mmol, 300,0 μL). A solução a -78°C foi agitada por 10 min e então se adicionou a solução da 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (0,49 mmol, 115,7 mg) em THF seco (1,0 mL). A solução amarelada foi agitada por 30 min a -78°C sob N_2 e após este período adicionou-se através de funil de adição cloreto de benzoíla (0,49 mmol, 60,0 μL) em THF (2,0 mL). A solução ficou turva e a agitação continuou por mais 1h30min e após este período permitiu-se que a temperatura elevasse de -78°C até temperatura ambiente. Ao final, após a adição de HCl 1,2 mol.L^{-1} aquoso, extraiu-se a fase orgânica com CH_2Cl_2 (15,0 mL), a qual foi tratada com solução saturada de NaHCO_3 e NaCl , seca sobre Na_2SO_4 anidro e o solvente concentrado sob vácuo. Após purificação do material bruto (202,5 mg) por cromatografia “flash” em sílica gel eluída com hexano: acetato de etila 1%, obtivemos a 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (**S4**) (52,4 mg, 31,5%).

Método 4 (LDA): Num balão de 3 bocas a 0°C sob N_2 colocou-se a diisopropilamina (0,97 mmol, 98,0 mg, 130,0 μL) recém destilada em THF seco (2,0 mL) seguido pela adição de $n\text{BuLi}$ 1,82 M (1,0 mmol, 550,0 μL), deixando-se que a mistura ficasse sob agitação por 20 min. Em seguida baixou-se a temperatura para -78°C e adicionou-se a 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (0,97 mmol, 205,7 mg) em THF (1,0 mL) deixando a mistura continuasse sob agitação por mais 1 hora. Após este período, adicionou-se, gota a gota, cloreto de benzoíla em THF (2,0 mL) e deixou-se a -78°C por mais 15 min, após

este período, permitiu-se que a temperatura subisse até temperatura ambiente e ao final da reação, adicionou-se HCl $1,2 \text{ mol.L}^{-1}$, seguido de extração da fase orgânica com acetato de etila, lavando-a em seguida com solução saturada de NaHCO_3 e NaCl , secou-se sobre Na_2SO_4 anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A reação, após purificação por cromatografia “flash” em sílica gel eluída com hexano : acetato de etila 5%, forneceu 31,0 mg do material de partida e 163,9 mg de uma mistura que não foi identificada.

Método 5 (NHMDS): Num balão de 3 bocas sob atmosfera de N_2 , NaH 60% em óleo mineral (0,87 mmol, 34,8 mg) foi lavado 2 vezes com THF seco (5,0 mL) e em seguida adicionou-se THF (5,0 mL) e a suspensão foi resfriada a 0°C . Em seguida, adicionou-se HMDS (Merck) e a solução ficou sob agitação por 1 hora a 0°C . Após este período, adicionou-se, gota a gota, a 3,3-diprenil-2,4-pentanodiona (0,81 mmol, 191,1 mg) em THF (3,0 mL) permitindo-se que a agitação continuasse por mais 40 min (solução amarela) a 0°C . Então adicionou-se, gota a gota, cloreto de benzoíla (0,87 mmol, 107,0 μL) em THF (2,0 mL) e agitou-se a mistura por mais 30 min a 0°C . Após este período, deixou-se a temperatura elevar-se até temperatura ambiente (solução ficou amarela turva) e ao final da reação, adicionou-se solução saturada de NH_4Cl , extraiu-se a fase orgânica com CH_2Cl_2 e em seguida lavou-se com solução saturada de NaCl , secou-se sobre Na_2SO_4 anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Após purificação do material bruto (320,7 mg) por cromatografia “flash” em sílica gel eluída com hexano: acetato de etila 1%, obtivemos o produto retro-Claisen (**S6**) (61,4 mg).

8.5.1.5 Tentativa de carbetoxilação da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona²⁴²

Num balão de 3 bocas sob atmosfera de N_2 , sob a suspensão de NaH (60% óleo mineral, 0,12 mmol, 4,8 mg) em THF (3,0 mL) foi adicionada, gota-gota, via funil de adição a solução da 1-fenil-4,4-diprenil-1,3,5-hexanotriona (0,12 mmol, 41,6 mg) em THF (2,0 mL) a 0°C . A suspensão resultante foi agitada por 30 min e então adicionou-se

nBuLi 2,63M (0,12 mmol, 46,0 μ L). A solução amarelada continuou sob agitação a 0°C por mais 30 min e após este período, adicionou-se lentamente uma solução de carbonato de dietila (0,12 mmol, 14,2 mg, $d=0,975$, 14,6 μ L) em THF. Após adição, permitiu-se que a temperatura se elevasse até temperatura ambiente e ao final da reação, adicionou-se NH_4Cl sat., acidificou-se com HCl 1N e extraiu-se com CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi lavada com solução saturada NaHCO_3 , seguido por solução saturada NaCl e seca sobre Na_2SO_4 anidro. Após cromatografia em coluna, apenas o produto de retro-Claisen (S6) foi obtido.

8.5.2 Rota via floroglucinol

8.5.2.1 Reação de acilação do floroglucinol (Acilação de Friedel-Crafts)

Método 1 (AlCl_3 e nitrobenzeno)²⁴³: À solução de floroglucinol desidratado (3,2 mmol, 405,1 mg), cloreto de alumínio (9,6 mmol, 1,28 g) em nitrobenzeno (2,0 mL) foi adicionado, gota a gota, cloreto de benzoíla (3,2 mmol, $d=1,211$, 371,0 μ L) em banho-maria. Após verificar-se que HCl parou de ser liberado, o conteúdo do frasco reacional foi despejado sobre uma solução HCl/ H_2O gelada e a mistura foi imediatamente destilada. O resíduo (um precipitado amarelo) foi solubilizado e a fase orgânica foi extraída com várias porções de CH_2Cl_2 , o solvente foi seco sobre Na_2SO_4 anidro e concentrado sob pressão reduzida. O material obtido foi submetido à cromatografia “flash” em coluna de sílica gel eluída com CH_2Cl_2 : hexano 10% produzindo a florobenzofenona desejada (215,9 mg, 29,3%).

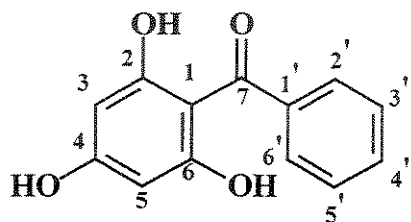
Método 2 (AlCl_3 e THF): À solução de floroglucinol desidratado (15,9 mmol, 2,0 g), AlCl_3 (45,1 mmol, 6,4 g) em THF (20,0 mL) foi adicionado, gota a gota, cloreto de benzoíla (15,7 mmol, 2,2 g, $d=1,211$, 1,8 mL) a temperatura ambiente. Após o término da reação, o solvente foi evaporado, o resíduo lavado com HCl diluído em H_2O gelada e

²⁴² a) Sandifer, R.M.; Battacharya, A.K.; Harris, T.M. *J. Org. Chem.*, 1971, **46**, 2260. b) Alderdice, M.; Sum, F.W.; Weiler, L. *Org. Synth.*, 1984, **62**, 14.

²⁴³ Rosenmund, K.W.; Rosenmund, M. *Chem. Ber.*, 1928, 2608.

extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro e o solvente concentrado sob vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel obteve-se a florobenzofenona (1,87g, 51,1%).

Dados para o produto (**S8**):



$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_4$, PM 230,216

Aspecto físico: sólido amarelo pálido.

p.f.: 120-122 °C (lit.²⁴⁴: 165 °C)

EM m/z (%): 230(48), 229(100), 153(62), 105(19), 77(51), 69(31), 51(30), 41(16).

IV (pastilha KBr), ν_{max} (cm^{-1}): 3392, 3194, 1644, 1600, 1517, 1462, 1389, 1332, 1236, 1178, 1070, 936, 921, 838, 757, 700, 656, 582, 520.

RMN de ^1H (499,88 MHz, acetona- d_6) δ : 5,97 (s, 2H, H-3 e H-5), 7,39 (tl, 2H, $J=7,5$, H-3' e H-5'), 7,47 (tl, 1H, $J=7,5$, H-4'), 7,60 (dl, 2H, $J=7,5$, H-2' e H-6'), 9,35 (s, 1H, OH-4), 10,56 (s, 2H, OH-2 e OH-6).

RMN de ^{13}C (125,69 MHz, acetona- d_6) δ : 95,3 (2 CH, C-3 e C-5), 104,6 (C_0 , C-1), 127,8 (2 CH, C-2' e C-6'), 128,4 (2 CH, C-3' e C-5'), 131,1 (CH, C-4'), 142,1 (C_0 , C-1'), 163,4 (2 C_0 , C-2 e C-6), 165,0 (C_0 , C-4), 199,3 (C_0 , C-7).

8.5.2.2 Reação de metilação do floroglucinol²⁴⁵

Num balão de 3 bocas (50,0 mL) equipado com agitador magnético, funil de adição e condensador de refluxo, contendo floroglucinol desidratado (11,0 mmol, 1,37 g) adicionou-se uma solução de NaOH (940,0 mg em 10,0 mL de H_2O) sob agitação num

²⁴⁴ Rosenmund, K.W.; Rosenmund, M. *Chem. Ber.*, 1928, 2608.

²⁴⁵ a) Vogel, A.I. *Textbook of Practical Organic Chemistry*. 4th Ed., Longman Inc., New York, 1978, 123.
b) Vyas, G.N.; Shah, N.M. *Org. Synth.*, 1951, 31, 90.

banho de gelo. Em seguida adicionou-se, gota a gota, sulfato de dimetila (22,0 mmol, $d=1,325$, 2,1 mL) sob agitação vigorosa por *ca.* 1 hora e após este período, a mistura foi aquecida sob refluxo por mais 2 horas com agitação. Após resfriar, adicionou-se H_2O (10,0 mL) e transferiu-se o conteúdo para um funil de separação. Separou-se a fase orgânica e a fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3 x 10,0 mL). A fase orgânica combinada foi lavada com H_2O , H_2SO_4 diluído e por fim H_2O até pH neutro. Secou-se sobre Na_2SO_4 anidro e o solvente foi destilado. Do material bruto (363,0 mg), após cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano : acetato de etila 20% obteve-se 3,5-dimetoxifenol (267,3 mg, 16,0 %).

Dados para o 3,5-dimetoxifenol:

Aspecto físico: sólido avermelhado

EM m/z (%): 154(100), 125(72), 111(15), 95(18), 94(25), 93(11), 69(33), 55(12).

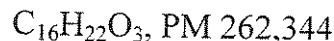
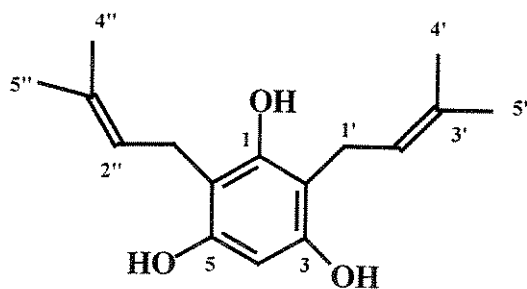
8.5.2.3 Reação de prenilação do 3,5-dimetoxifenol (Método de Miura *et al.*)

$Ti(O^iPr)_4$ (0,25 mmol, 75,0 μL) foi adicionado sob agitação à uma mistura de 3,5-dimetoxifenol (0,4 mmol, 61,0 mg), trifenilfosfina (0,04 mmol, 10,0 mg), $Pd(OAc)_2$ (0,01 mmol, 2,2 mg), peneira molecular 4A (200,0 mg) e 3-metil-2-buten-1-ol (prenol) (1,6 mmol, $d=0,848$, 165,0 μL) dissolvidos em benzeno (5,0 mL) à 60 °C sob atmosfera de N_2 . A reação foi acompanhada por CCD (eluída em hexano : acetona 1:1) e após seu término (19 horas), a mistura foi jogada sobre HCl diluído, posteriormente a fase orgânica foi extraída com CH_2Cl_2 , seca sobre sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o bruto da reação (96,3 mg) foi purificado através de cromatografia “flash” em coluna de sílica gel eluída com hexano : acetato de etila 10% forneceu apenas parte do material de partida e uma mistura de produtos de difícil separação.

8.5.2.4 Reação de prenilação do floroglucinol desidratado²⁴⁶

Adicionou-se à mistura de floroglucinol desidratado (1,2 mmol, 150,0 mg), trifetilfosfina (0,04 mmol, 10,0 mg), acetato de paládio (0,01 mmol, 2,2 mg), peneira molecular (200,0 mg) e 3-metil-2-buten-1-ol (prenol) (4,8 mmol, d=0,848, 483,0 μ L) em benzeno seco (5,0 mL), tetraisopropóxido de titânio (0,25 mmol, 75,0 μ L). Deixou-se a mistura sob agitação e atmosfera de N₂ a 70°C. A reação foi acompanhada por CCD (hexano : acetato de etila 1:1) e após término da reação (20 horas), a mistura foi filtrada sob uma fina camada de Celite® e sílica gel eluída com acetato de etila, em seguida seca sobre Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo (403,8 mg) foi submetido à cromatografia “flash” em coluna de sílica gel eluída com hexano : acetato de etila 20%, produzindo várias frações com misturas de produtos de mono, di- e tri-prenilação. O produto 2,6-diprenil-1,3,5-triidroxibenzeno (S9) foi o composto majoritário (53,5 mg, 16,7%).

Dados para o produto (S9):



Aspecto físico: sólido branco.

EM *m/z* (%): 262 (M⁺, 58), 247 (9), 207 (49), 206 (23), 205 (13), 192 (11), 191 (82), 177 (8), 163 (32), 151 (100), 139 (17), 109 (8), 69 (13), 55 (7), 41 (8).

RMN de ¹H (499,88 MHz, CDCl₃) δ : 1,74 (s, 6H, H-4' e H-4'')*, 1,80 (s, 6H, H-5' e H-5'')*, 3,33 (d, 4H, *J*=7,2, H-1' e H-1''), 5,23 (tm, 2H, *J*=7,2, H-2' e H-2''), 5,56 (s, 1H), 5,94 (s, 1H, H-5). (*) valores intercambiáveis.

²⁴⁶ Satoh, T.; Ikeda, M.; Miura, M.; Nomura, M. *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4877.

RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) δ : 17,8 (2 CH_3 , C-4' e C-4''), 22,3 (2 CH_2 , C-1' e C-1''), 25,8 (2 CH_3 , C-5' e C-5''), 96,0 (CH, C-5), 106,2 (2 C_0 , C-1 e C-3), 122,3 (2 CH, C-2' e C-2''), 134,9 (2 C_0 , C-3' e C-3''), 153,0 (2 C_0 , C-4 e C-6), 154,0 (C_0 , C-2).

8.5.2.5 Tentativa de obtenção da grandona (S1) (Método de Miura *et al.*)²⁴⁷

Adicionou-se à mistura de florobenzofenona (**S8**) (0,41 mmol, 95,4 mg), trifenilfosfina (0,04 mmol, 10,0 mg), acetato de paládio (0,01 mmol, 2,2 mg), peneira molecular (200,0 mg) e prenol (2,05 mmol, 176,3 mg) em benzeno seco (5,0 mL), tetraisopropóxido de titânio (0,10 mmol, 30,0 μL) sob agitação em atmosfera de N_2 à 50°C por 20 horas. A reação foi acompanhada por CCD (hexano : acetato de etila 1:1) e após término da reação, a mistura foi jogada sobre HCl diluído, extraída com CH_2Cl_2 , seca sob Na_2SO_4 anidro. O solvente foi evaporado e o resíduo (66,4 mg) submetido à coluna cromatográfica em sílica gel, obtendo-se apenas parte do material de partida (**S8**).

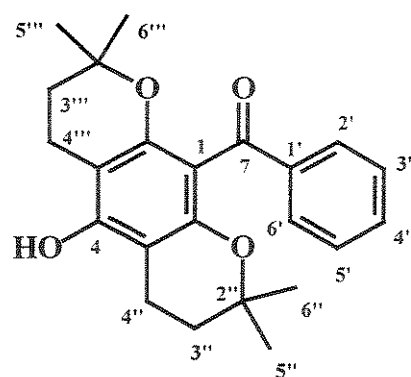
8.5.2.6 Reação de prenilação da florobenzofenona com KOH²⁴⁸

A solução da florobenzofenona (**S8**) (1,54 mmol, 355,0 mg) em KOH 10% aquoso (3,1 mmol, 172,5 mg em 2,0 mL H_2O) foi resfriada a 0°C e então adicionou-se, gota a gota, brometo de prenila (3,1 mmol, $d=1,293$, 33,0 μL) sob agitação. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por mais 1 hora e então jogada sobre uma mistura de água-gelo picado, acidificada a pH 2, e a fase orgânica foi extraída com acetato de etila, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado. O resíduo obtido (393,2 mg) foi purificado por cromatografia “flash” em coluna de sílica gel eluída com hexano : acetato de etila 5%, obtendo-se 220,1 mg do material de partida (**S8**) e os produtos (**S11**) (58,6 mg, 10,4%), (**S12**) (72,1 mg, 12,8%) e (**S13**) (8,5 mg, 1,9%).

²⁴⁷ Satoh, T.; Ikeda, M.; Miura, M.; Nomura, M. *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4877.

²⁴⁸ Crombie, L.; Jones, R.C.F.; Palmer, C.J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1987, 317.

Dados para o produto (S11):



$C_{23}H_{26}O_4$, PM 366,450

Aspecto físico: sólido amarelo pálido.

p.f.: 149,2-154,4°C

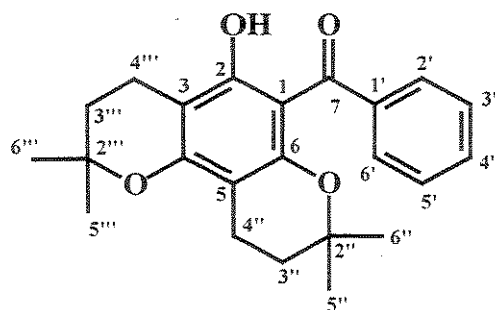
EM m/z (%): 366 (M^+ , 69), 311 (100), 310 (14), 309 (25), 295 (41), 255 (56), 177 (23), 105 (7), 77 (4).

IV (pastilha KBr), $\nu_{\max}$ (cm^{-1}): 3426, 2975, 2919, 2850, 1655, 1594, 1450, 1265, 1213, 1171, 1118, 963, 743, 722, 693.

RMN de 1H (499,88 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,11 (s, 12H, H-5'', H-5''', H-6'' e H-6'''), 1,75 (t, 4H, $J=6,8$, H-3'' e H-3'''), 2,58 (t, 4H, $J=6,8$, H-4'' e H-4'''), 7,37 (tl, 2H, $J=7,4$, H-3' e H-5'), 7,49 (tt, 1H, $J=7,4$ e 1,2, H-4'), 7,79 (dl, 2H, $J=7,4$, H-2' e H-6').

RMN de ^{13}C (125,69 MHz, $CDCl_3$) δ : 16,6 (2 CH_2 , C-4'' e C-4'''), 26,3 (4 CH_3 , C-5'', C-5''', C-6'' e C-6'''), 32,0 (2 CH_2 , C-3'' e C-3'''), 74,1 (2 C_0 , C-2'' e C-2'''), 99,2 (2 C_0 , C-3 e C-5), 110,2 (C_0 , C-1), 129,1 (2 CH , C-2' e C-6'), 129,2 (2 CH , C-3' e C-5'), 132,1 (CH , C-4'), 139,3 (C_0 , C-1'), 151,2 (2 C_0 , C-2 e C-6), 152,4 (C_0 , C-4), 195,6 (C_0 , C-7).

Dados para o produto (S12):



$C_{23}H_{26}O_4$, PM 366,450

Aspecto físico: sólido amarelo.

p.f. : 139,8-145,5°C (lit.²⁴⁹: 176 °C)

EM m/z (%): 366 (M^+ , 66), 311 (100), 309 (28), 295 (43), 255 (64), 177 (42), 105 (22), 77 (16).

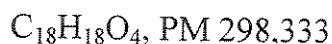
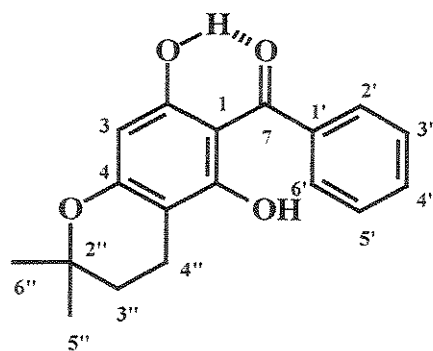
IV (pastilha KBr), ν_{max} . (cm^{-1}): 3437, 2975, 2930, 2856, 1617, 1595, 1445, 1423, 1336, 1324, 1298, 1279, 1255, 1156, 955, 909, 878, 697, 653.

RMN de 1H (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,86 (s, 6H, H-5''' e H-6'''), 1,36 (s, 6H, H-5'' e H-6''), 1,54 (t, 2H, $J=6,8$, H-3'''), 1,81 (t, 2H, $J=6,8$, H-3''), 2,47 (t, 2H, $J=6,8$, H-4'''), 2,67 (t, 2H, $J=6,8$, H-4''), 7,45-7,32 (m, 5H, H-2' a H-6'), 12,79 (s, 1H, OH-2). (*) valores intercambiáveis.

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) δ : 16,1 (2 CH_2 , C-4'''), 16,4 (2 CH_2 , C-4''), 25,8 (2 CH_3 , C-5''' e C-6'''), 26,9 (2 CH_3 , C-5'' e C-6''), 31,9 (2 CH_2 , C-3'''), 32,0 (2 CH_2 , C-3''), 74,6 (C_0 , C-2'''), 75,8 (C_0 , C-2''), 100,2 (C_0 , C-5), 100,3 (C_0 , C-3), 104,4 (C_0 , C-1), 127,2 (2 CH, C-2' e C-6'), 127,3 (2 CH, C-3 e C-5), 129,6 (CH, C-4), 143,4 (C_0 , C-1'), 153,9 (C_0 , C-6), 158,9 (C_0 , C-4), 161,6 (C_0 , C-2), 200,1 (C_0 , C-7). (*) valores intercambiáveis.

²⁴⁹ Pathak, V.P.; Khanna, R.N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1982, **55**, 2264.

Dados para o produto (S13):



Aspecto físico: sólido branco.

EM m/z (%): 298 (M^+ , 100), 297 (43), 283 (19), 255 (14), 243 (100), 241 (31), 205 (14), 165 (73), 105 (14), 77 (13).

RMN de 1H (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,37 (6H, s, H-5'' e H-6''), 1,82 (2H, t, $J=6,8$, H-3''), 2,62 (2H, t, $J=6,8$, H-4''), 5,88 (1H, s, H-3), 7,66-7,49 (5H, m, 2', 3', 4', 5' e 6'), 10,97 (1H, s, OH-2).

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) δ : 16,2 (CH_2 , C-4'')*, 26,7 (2 CH_3 , C-5'' e C-6''), 32,0 (CH_2 , C-3'')*, 76,1 (C_0 , C-14), 96,9 (CH, C-3), 101,8 (C_0 , C-5), 103,8 (C_0 , C-1), 127,7 (2CH, C-3' e C-5'), 129,2 (2 CH, C-2' e C-6'), 132,1 (CH, C-4'), 140,1 (C_0 , C-1'), 158,4 (C_0 , C-6), 161,5 (C_0 , C-4), 162,1 (C_0 , C-2), 197,3 (C_0 , C-7). (*) Deslocamentos confirmados através do experimento de HMQC (J^1_{H-C}).

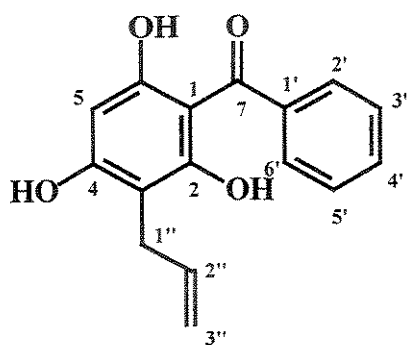
8.5.2.7 Reação de alquenação da florobenzofenona em NH_3 líquida²⁵⁰

A florobenzofenona (S8) (0,49 mmol, 113,5 mg) dissolvida em éter seco (2,0 mL) foi adicionada à amônia líquida (25,0 mL) durante 5 min, sendo a mistura resfriada em MeOH- CO_2 (s). Após 5 min de agitação vigorosa, brometo de alila (3,9 mmol, 470,0 mg, $d=1,43$, 330,0 μL) diluído em éter seco (2,0 mL) foi adicionado durante 5 min. A mistura

²⁵⁰ a) Collins, M.; Laws, D.R.J.; McGuinness, J.D.; Elvidge, J.A. *J. Chem. Soc. (C)*, 1971, 3814. b) Drewert, K.G.; Laws, D.R. *J. Inst. Brew.*, 1970, **76**, 188.

permaneceu sob agitação por mais 5 horas e, a partir de então, a amônia foi permitida evaporar. O resíduo amarelo foi dissolvido em éter e a solução lavada com 2 porções de HCl 2N (10,0 mL), seguido por H₂O e seco sobre Na₂SO₄ anidro. Do material obtido (92,0 mg) após cromatografia “flash” em coluna de sílica eluída com CH₂Cl₂ : hexano 10% obteve-se o produto (**S14**) (10,0 mg, 7,6 %).

Dados para o produto:



Aspecto físico: sólido amarelo pálido.

EM *m/z* (%): 270 (M⁺, 100), 269 (91), 255 (13), 241 (13), 213 (11), 193 (25), 177 (19), 165 (34), 164 (23), 105 (50), 77 (83), 69 (46), 55 (20), 53 (23), 43 (13), 41 (12).

RMN de ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ: 3,40 (2H, dt, *J*=5,8 e 1,6, H-1''), 5,12 (dq, 1H, *J*=12,0 e 1,8, H-3''), 5,17 (dq, 1H, *J*=17,4 e 1,8, H-3''), 6,04-5,89 (ddt, 1H, *J*=17,4, 12,0 e 9,6, H-2''), 5,95 (s, 1H, CH-5), 7,65-7,48 (m, 5H, H-2' a H-6'), 10,16 (s, 1H, OH-6).

RMN de ¹³C (75, 45 MHz, CDCl₃) δ: 26,7 (CH₂, C-1''), 96,1 (CH, C-5), 104,6 (Co, C-1), 105,1 (Co, C-3), 115,8 (CH₂, C-3''), 127,8 (2 CH, C-2' e C-6'), 129,1 (2 CH, C-3' e C-5'), 132,2 (CH, C-4'), 135,9 (CH, C-2''), 139,8 (Co, C-1'), 159,7 (Co, C-6), 160,9 (Co, C-2), 162,3 (Co, C-4), 197,8 (Co, C-7).