



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

FELIPE CHRISTOFF WOUTERS

**SEMIOQUÍMICOS DE OPILIÕES DA FAMÍLIA GONYLEPTIDAE
(ARACHNIDA: OPILIONES)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA
NA ÁREA DE QUÍMICA ORGÂNICA.**

ORIENTADOR: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR FELIPE CHRISTOFF
WOUTERS E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

W915s Wouters, Felipe Christoff (1989-).
Semioquímicos de opiliões da família *Gonyleptidae*
(*Arachnida: Opiliones*) / Felipe Christoff Wouters. –
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli.
Mestrado (dissertação) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Ecologia química. 2. Defesas químicas.
3. Opiliões. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Harvestmen semiochemicals of the family *Gonyleptidae* (*Arachnida: Opiliones*)

Palavras-chave em inglês:

Chemical ecology
Chemical defenses
Harvestmen

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química

Banca examinadora:

Anita Jocelyne Marsaioli [Orientador]
José Roberto Trigo
Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda

Data de defesa: 16/12/2011

Programa de pós-graduação: Química

“The scientist does not study nature because it is useful to do so. He studies it because he takes pleasure in it, and he takes pleasure in it because it is beautiful. If nature were not beautiful it would not be worth knowing, and life would not be worth living. I am not speaking, of course, of the beauty which strikes the senses, of the beauty of qualities and appearances. I am far from despising this, but it has nothing to do with science. What I mean is that more intimate beauty which comes from the harmonious order of its parts, and which a pure intelligence can grasp.”

Henri Poincaré

*Dedico este trabalho
aos meus pais Ivone e Celso
e aos meus irmãos Marcelo e Fernando.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais e meus irmãos, por todo o carinho e amor demonstrados sempre, e que, mesmo longe, nunca deixaram de me apoiar.

À professora Anita Jocelyne Marsaioli pela orientação, amizade, confiança e incentivo ao longo desse trabalho.

Aos colaboradores que contribuíram com esse trabalho: Prof. Dr. Glauco Machado (IB-USP), Jobert Sobczak (UFSCar), Dra. Caroline Gonçalves, Dra. Dávila Zampieri e Daniele Rocha, por todas as discussões que sempre geraram muito conhecimento e tornaram possível a realização desse trabalho.

Ao Prof. Timothy Brocksom (UFSCar) por ter gentilmente cedido padrões sintéticos de alguns dos componentes de secreções de opiliões.

Aos colegas de laboratório: Adriana, Bruna, Carlinha, Carol, Célio, Dani, Dávila, Diana, Eduardo, Fran, Haleem, Lair, Lucas, Marcelo, Raphael, Simone e Thiago (e, por que não, Arnaldo e Sílvio?), pela convivência, companheirismo, companhia e auxílio prestado.

Àqueles que não ficaram contentes em serem apenas colegas, e se tornaram grandes amigos: Francine (a bióloga), um exemplo de força e superação e que me mostrou que a ecologia química, assim como toda a ciência, tem várias facetas e todos temos a contribuir de alguma forma; Carol (a eterna “Pós-doc”), que sempre confiou mais em mim do que eu mesmo e me ensinou a ser um cientista melhor; Daniele (a opilióloga), a mãezona que, além de sempre me ajudar e incentivar, contribuiu com boa parte das divagações que estão escritas neste trabalho; Silvão, um exemplo de vida e uma pessoa fantástica, que me ensinou a ser uma pessoa melhor e sempre me ajudou, principalmente com milhares de caronas e lanches nos fins de semana no laboratório; Carlinha e Duda, por sempre ajudarem a todos incansavelmente e por sempre me fazerem lembrar da nossa terra, seja com um churrasco, com um chimarrão ou com uma boa conversa sobre os tempos de Santa Maria; e Bruna e Arnaldo, por todas as conversas, filosóficas ou não, no café, no bandeirão ou no bar e por todas as risadas, que não foram poucas.

Aos colegas de casa: Aleksei, Antônio, Beatriz, Beto, Bruna, Bruninha, Cauê, Caio, Carlos, Chárbel, Davi, Dudu, Fernando, Gabriel, Jaime, Júlio, Júnior, Larissa, Léo, Marilha, Marilinha, Mery e Paula, pela ótima convivência e por não termos dividido somente uma casa, mas também muitas conversas, cervejas, festas e pizzas.

Aos grandes amigos: Paula e Jaime, por todo o apoio, companheirismo, risadas e por sempre compartilhar as experiências de se fazer um curso em um lugar estranho e ficar longe da família; e Mery, Fernanda e Thuany, companheiras incansáveis de Starclean e IFCH, que sempre estavam prontas pra me lembrar que existe um mundo inteiro do lado de fora do IQ, por toda a amizade e diversão e por todas as ótimas conversas de bar, fossem elas sobre antropologia, futilidades ou conflitos existenciais em geral.

A todos os amigos que estão longe.

A Dona Maria, Simone Dias, Fabiana, Raphael e Lea, por todo o auxílio na rotina do laboratório.

Aos funcionários do Instituto de Química por toda a ajuda prestada, em especial ao pessoal do laboratório de RMN: Anderson, Paula e Sônia; e ao pessoal da Coordenação de Pós-Graduação: Bel, Gabriela e Miguel.

À FAPESP pela concessão da bolsa e das verbas que viabilizaram a execução desse trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Instituto de Química pela infraestrutura e pela oportunidade da realização desse trabalho e aos professores do Departamento de Química Orgânica por todos os conhecimentos transmitidos.

Muito Obrigado!

CURRICULUM VITAE

Felipe Christoff Wouters

Formação Acadêmica

2010 – 2011 Mestrado em Química.

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Projeto: Semioquímicos de opiliões da família Gonyleptidae
(Arachnida: Opiliones)

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

2006 - 2010 Graduação em Química Bacharelado

Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

Projeto: Síntese da octaquis(6-ciano-6-deoxi-2,3-di-O-etil)- γ -ciclodextrina

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Burrow, R. A.; **Wouters, F. C.**; De Castro, L. B.; Peppe, C. Redetermination of bis(diphenylphosphino) methane at 293 (2) K. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, E63, o2559, **2007**.

Resumo de trabalhos científicos apresentados em congressos

Wouters, F. C.; Gonçalves, C.C.S.; Machado, G.; Marsaioli, A. J. Characterization of vinyl ketones in the defensive secretions of harvestmen (Arachnida: Opiliones) Em: 3rd Brazilian Conference on Natural Products, 2011, Ouro Preto-MG. Book of Abstracts.

Wouters, F. C.; Machado, G.; Marsaioli, A. J. Chemical characterization of defensive secretions from harvestmen (Arachnida: Opiliones) Em: São Paulo Advanced School on Chemistry, 2011, Campinas-SP. Book of Abstracts.

Wouters, F. C.; Machado, G.; Marsaioli, A. J. Caracterização da secreção de defesa dos opiliões *Gonyleptes gonyleptoides* e *Progonyleptoidellus striatus* (Arachnida: Opiliones) Em: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis-SC. Livro de resumos.

Wouters, F. C.; Machado, G.; Marsaioli, A. J. Chemical investigation of harvestmen defensive secretions (Arachnida: Opiliones: Laniatores) Em: 1st Latin American Meeting of Chemical Ecology, 2010, Colonia del Sacramento-Uruguay. Book of abstracts.

Wouters, F. C.; Pedroso, M.; Stüker, C.; Maldaner, G.; Morel, A. F. Atividade antimicrobiana do ácido betulínico e seus derivados. Em: 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia-SP. Livro de resumos.

Wouters, F. C.; Morel, A. F. Síntese da octaquis(6-ciano-6-deoxi-2,3-di-O-etil)-g-ciclodextrina Em: 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia-SP. Livro de resumos.

RESUMO

Semioquímicos de opiliões da família Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones)

Esse trabalho consiste no estudo de secreções defensivas de 18 espécies de opiliões da família Gonyleptidae. A composição química das secreções dessas espécies foi investigada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os compostos encontrados nas espécies estudadas se dividem em três classes principais: cetonas, quinonas e fenóis. Análises de ressonância magnética nuclear (RMN) das secreções de três dessas espécies (*Gonyleptes saprophilus*, *Magnispina neptunus* e *Progonyleptoidellus striatus*) permitiram a caracterização de cinco compostos: 4-metilex-1-en-3-ona, 2-metil-1,4-benzoquinona, 2-etil-1,4-benzoquinona, 2,5-dimetilfenol e 2,3,6-trimetilfenol. Foram sintetizadas duas vinil cetonas encontradas nas secreções estudadas: 4-metilex-1-en-3-ona e 5-metilex-1-en-3-ona. Essas cetonas foram caracterizadas e confirmou-se sua presença nas secreções de seis das espécies estudadas. Os demais compostos tiveram suas estruturas sugeridas baseando-se nos dados de espectrometria de massas e/ou coinjeção em CG-EM com padrões. Além disso, foram realizados ensaios de atividade inibitória frente a diversos micro-organismos usando padrões sintéticos de compostos presentes nas secreções, representativos das três classes químicas encontradas.

Palavras-chave: ecologia química, defesas químicas, opiliões

ABSTRACT

Harvestmen semiochemicals of the family Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones)

This work consists on the study of defensive secretions from 18 harvestmen species belonging to the family Gonyleptidae. The chemical composition of these secretions was investigated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The identified compounds can be divided in three main classes: ketones, quinones and phenols. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyses of secretions from three species (*Gonyleptes saprophilus*, *Magnispina neptunus* and *Progonyleptoidellus striatus*) allowed the characterization of five compounds: 4-methylhex-1-en-3-one, 2-methyl-1,4-benzoquinone, 2-ethyl-1,4-benzoquinone, 2,5-dimethylphenol, and 2,3,6-trimethylphenol. Two vinyl ketones found in the studied secretions were synthesized: 4-methylhex-1-en-3-one and 5-methylhex-1-en-3-one. These ketones were characterized and their presence in secretions of six species was confirmed. The other compounds had their structures suggested based on mass spectrometry data and/or GC-MS coinjection with standart samples. Moreover, inhibitory activity assays against microorganisms were performed with synthetic standarts of compounds found in the secretions, representatives of the three identified chemical classes.

Key-words: chemical ecology, chemical defenses, harvestmen

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE ESQUEMAS	xxvii
LISTA DE ANEXOS	xxix
INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos da biologia de opiliões	4
1.2. Estratégias de defesa de opiliões	5
1.2.1. Defesas químicas em opiliões	6
1.3. Quimiosistemática, quimiotaxonomia e evolução de defesas químicas .	11
OBJETIVOS	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
3.1. Caracterização química das secreções de defesa	15
3.1.1. Considerações sobre a biossíntese de cetonas, fenóis e quinonas ..	24
3.1.2. Cetonas identificadas	26
3.1.3. Quinonas identificadas	45
3.1.4. Fenóis identificados	57
3.2. Síntese de 5-metilex-1-en-3-ona (2) e 4-metilex-1-en-3-ona (3)	63
3.2.1. Rota para a obtenção de 2 e 3 a partir de aminoácidos	63
3.2.2. Rota para a obtenção de 2 e 3 a partir de ácidos carboxílicos	64
3.3. Atividade antimicrobiana de componentes das secreções.....	66
3.3.1. Difusão em disco:	67
3.3.2. Microdiluição em caldo	70
3.3.3. Mecanismos de toxicidade de quinonas, cetonas e fenóis	74
CONCLUSÕES	78
PARTE EXPERIMENTAL.....	81
5.1. Métodos cromatográficos	81
5.1.1. Cálculo dos índices de retenção	82
5.2. Espectroscopia de RMN.....	83

5.3. Coleta das secreções.....	84
5.4. Reagentes e solventes.....	85
5.5. Testes de atividade antimicrobiana.....	85
5.5.1. Procedimento geral para o cultivo de bactérias.....	86
5.5.2. Procedimento geral para o cultivo de leveduras.....	86
5.5.3. Difusão em disco.....	86
5.5.4. Microdiluição em caldo.....	87
5.6. Procedimentos sintéticos.....	88
ANEXOS.....	96
6.1. Cromatogramas de secreções de opiliões.....	96
6.2. Espectros de RMN de secreções de opiliões.....	102
6.3. Espectros de massas e RMN dos compostos sintetizados.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CG-DIC	Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMF	Dimetilformamida
DMS	Dimetilsulfeto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massa
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
m/v	Massa/volume
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
PCC	Clorocromato de piridínio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
THF	Tetraidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
v/v	Volume/volume

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos identificados nas secreções das espécies estudadas	16
Tabela 2. Composição das secreções defensivas segundo as classes químicas e subfamílias	23
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 4-metilex-1-en-3-ona (3)	28
Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 2-metil-1,4-benzoquinona (22)	48
Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 2-etil-1,4-benzoquinona (23)	48
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 2,5-dimetilfenol (34)	59
Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 2,3,6-trimetilfenol (36)	60
Tabela 8. Diâmetro dos halos de inibição (cm) do teste de difusão em disco	69
Tabela 9. Valores de CIM para os compostos testados	71
Tabela 10. Número de indivíduos amostrados por espécie	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de liberação da secreção de <i>Acanthopachylus aculeatus</i>	7
Figura 2. Mecanismos de liberação da secreção em opiliões	8
Figura 3. Cromatograma da secreção de <i>Gonyleptes saprophilus</i>	27
Figura 4. Espectro de massas do composto 3 e fragmentação proposta.....	27
Figura 5. Espectro de RMN de ¹ H da secreção de <i>G. saprophilus</i>	28
Figura 6. Análises de CG-DIC quiral	29
Figura 7. Espectro de massas do dímero 19 e fragmentação proposta	30
Figura 8. Cromatograma da secreção de <i>Sodreana barbiellini</i>	31
Figura 9. Cromatograma da secreção de <i>Sodreana sodreana</i>	32
Figura 10. Cromatograma da secreção de <i>Cadeadoius niger</i>	32
Figura 11. Separação dos picos dos dímeros de <i>G. saprophilus</i> e racemização ..	33
Figura 12. Separação dos picos do dímero 21 da secreção de <i>C. niger</i>	33
Figura 13. Espectro de massas do composto 1 e fragmentação proposta.....	34
Figura 14. Espectro de massas do composto 2 e fragmentação proposta.....	35
Figura 15. Espectro de massas do composto 4 e fragmentação proposta.....	35
Figura 16. Espectro de massas do composto 5 e fragmentação proposta.....	36
Figura 17. Espectro de massas do composto 6 e fragmentação proposta.....	36
Figura 18. Espectro de massas do composto 7 e fragmentação proposta.....	37
Figura 19. Espectro de massas do composto 8 e fragmentação proposta.....	37
Figura 20. Espectro de massas do composto 9 e fragmentação proposta.....	38
Figura 21. Espectro de massas do composto 10 e fragmentação proposta.....	39
Figura 22. Espectro de massas do composto 11 e fragmentação proposta.....	39
Figura 23. Espectro de massas do composto 12 e fragmentação proposta.....	40
Figura 24. Espectro de massas do composto 13 e fragmentação proposta.....	40
Figura 25. Espectro de massas do composto 14 e fragmentação proposta.....	41
Figura 26. Espectro de massas do composto 16 e fragmentação proposta.....	42
Figura 27. Espectro de massas do composto 18 e fragmentação proposta.....	42
Figura 28. Espectro de massas do composto 15 e fragmentação proposta.....	43
Figura 29. Espectro de massas do composto 17 e fragmentação proposta.....	43

Figura 30. Espectro de massas do composto 19 e fragmentação proposta.....	44
Figura 31. Espectro de massas do composto 20 e fragmentação proposta.....	44
Figura 32. Espectro de massas do composto 21 e fragmentação proposta.....	45
Figura 33. Cromatograma da secreção de <i>Magnispina neptunus</i>	46
Figura 34. Espectro de massas do composto 22 e fragmentação proposta.....	47
Figura 35. Espectro de massas do composto 23 e fragmentação proposta.....	47
Figura 36. Espectro de RMN de ¹ H da secreção de <i>M. neptunus</i>	49
Figura 37. Espectro de massas do composto 24 e fragmentação proposta.....	50
Figura 38. Espectro de massas do composto 25 e fragmentação proposta.....	50
Figura 39. Espectro de massas do composto 26 e fragmentação proposta.....	51
Figura 40. Espectro de massas do composto 27 e fragmentação proposta.....	52
Figura 41. Espectro de massas do composto 28 e fragmentação proposta.....	53
Figura 42. Espectro de massas do composto 29 e fragmentação proposta.....	54
Figura 43. Espectro de massas do composto 30 e fragmentação proposta.....	55
Figura 44. Espectro de massas do composto 31 e fragmentação proposta.....	55
Figura 45. Espectro de massas do composto 32 e fragmentação proposta.....	56
Figura 46. Espectro de massas do composto 33 e fragmentação proposta.....	56
Figura 47. Cromatograma da secreção de <i>Progonyleptoidellus striatus</i>	57
Figura 48. Espectro de massas do composto 34 e fragmentação proposta.....	58
Figura 49. Espectro de massas do composto 36 e fragmentação proposta.....	59
Figura 50. Espectro de RMN de ¹ H da secreção de <i>P. striatus</i>	60
Figura 51. Experimento de NOE diferencial com a secreção de <i>P. striatus</i>	61
Figura 52. Espectro de massas do composto 35 e fragmentação proposta.....	61
Figura 53. Espectro de massas do composto 37 e fragmentação proposta.....	62
Figura 54. Espectro de massas do composto 38	62
Figura 55. Compostos testados nos ensaios de atividade antimicrobiana.....	67
Figura 56. Padrões antibióticos utilizados como controle positivo.....	67
Figura 57. Leitura do teste de difusão em disco.....	68
Figura 58. Placas do teste de difusão em disco.....	68
Figura 59. Placa mostrando as CIMs dos compostos 22 e 47 frente a bactérias..	72
Figura 60. Placa mostrando as CIMs dos compostos 24 e 34 frente a bactérias..	72

Figura 61. Placa mostrando as CIMs dos compostos **22** e **47** frente a leveduras. 73
Figura 62. Placa mostrando as CIMs dos compostos **24** e **34** frente a leveduras. 73
Figura 63. Estrutura da glutathiona na sua forma reduzida..... 75

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Classificação de semioquímicos	2
Esquema 2. Indivíduo da espécie <i>Sodreana sodreana</i> e classificação taxonômica da ordem Opiliones	5
Esquema 3. Compostos característicos de secreções de opiliões das sub-ordens Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi e Laniatores	9
Esquema 4. Cladograma de subfamílias de Gonyleptidae baseado em caracteres morfológicos	23
Esquema 5. Rota biossintética proposta para a formação de fenóis e quinonas a partir de policetídeos	25
Esquema 6. Possibilidades de formação de fenóis e benzoquinonas a partir de policetídeos	26
Esquema 7. Dimerização de vinil cetonas por reação de Hetero Diels-Alder	30
Esquema 8. Possibilidades de formação de dímeros de vinil cetonas	31
Esquema 9. Rota sintética proposta para a obtenção das vinil cetonas 2 e 3 a partir de aminoácidos	63
Esquema 10. Rota sintética proposta para a obtenção das vinil cetonas 2 e 3 a partir de ácidos carboxílicos	65
Esquema 11. Reação de redução do MTT com formação da formazana	70
Esquema 12. Redução de um ou dois elétrons de quinonas	74
Esquema 13. Adição de Michael a quinonas.....	75

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma da secreção de <i>Acanthogonyleptes pulcher</i>	96
Anexo 2. Cromatograma da secreção de <i>Bourguyia hamata</i>	96
Anexo 3. Cromatograma da secreção de <i>Cadeadoius niger</i>	96
Anexo 4. Cromatograma da secreção de <i>Chavesincola inexpectabilis</i>	97
Anexo 5. Cromatograma da secreção de <i>Discocyrtus oliverioi</i>	97
Anexo 6. Cromatograma da secreção de <i>Gonyleptes saprophilus</i>	97
Anexo 7. Cromatograma da secreção de <i>Liogonyleptes tetracanthus</i>	98
Anexo 8. Cromatograma da secreção de <i>Magnispina neptunus</i>	98
Anexo 9. Cromatograma da secreção de <i>Metarthrodes longipes</i>	98
Anexo 10. Cromatograma da secreção de <i>Mischonyx cuspidatus</i>	99
Anexo 11. Cromatograma da secreção de <i>Mitoperoides variabilis</i>	99
Anexo 12. Cromatograma da secreção de <i>Multumbo terrenus</i>	99
Anexo 13. Cromatograma da secreção de <i>Pachylospeleus strinati</i>	100
Anexo 14. Cromatograma da secreção de <i>Pachylus paessleri</i>	100
Anexo 15. Cromatograma da secreção de <i>Progonyleptoidellus striatus</i>	100
Anexo 16. Cromatograma da secreção de <i>Pseudotrogulus funebris</i>	101
Anexo 17. Cromatograma da secreção de <i>Sodreana barbiellini</i>	101
Anexo 18. Cromatograma da secreção de <i>Sodreana sodreana</i>	101
Anexo 19. Espectro de RMN de ^1H da secreção de <i>G. saprophilus</i>	102
Anexo 20. Espectro de RMN de ^{13}C da secreção de <i>G. saprophilus</i>	102
Anexo 21. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° da secreção de <i>G. saprophilus</i>	103
Anexo 22. Mapa de contornos de RMN 2D de correlações ^1H , ^1H (COSY) da secreção de <i>G. saprophilus</i>	103
Anexo 23. Mapa de contornos de RMN 2D (CDCl_3 , TMS) de correlações ^1H , ^{13}C ^1J HSQC da secreção de <i>G. saprophilus</i>	104
Anexo 24. Ampliações do mapa de contornos de RMN 2D (CDCl_3 , TMS) de correlações ^1H , ^{13}C ^1J HSQC da secreção de <i>G. saprophilus</i>	104
Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H da secreção de <i>M. neptunus</i>	105

Anexo 26. Espectro de RMN de ^{13}C da secreção de <i>M. neptunus</i>	105
Anexo 27. Mapa de contornos de RMN 2D de correlações ^1H , ^1H (COSY) da secreção de <i>M. neptunus</i>	106
Anexo 28. Mapa de contornos de RMN 2D (CDCl_3 , TMS) de correlações ^1H , ^{13}C ^1J HSQC da secreção de <i>M. neptunus</i>	106
Anexo 29. Ampliações do mapa de contornos de RMN 2D (CDCl_3 , TMS) de correlações ^1H , ^{13}C ^1J HSQC da secreção de <i>M. neptunus</i>	107
Anexo 30. Espectro de RMN de ^1H da secreção de <i>P. striatus</i>	108
Anexo 31. Espectro de RMN de ^{13}C da secreção de <i>P. striatus</i>	108
Anexo 32. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° da secreção de <i>P. striatus</i>	109
Anexo 33. Mapa de contornos de RMN 2D de correlações ^1H , ^1H (COSY) da secreção de <i>P. striatus</i>	109
Anexo 34. Mapa de contornos de RMN 2D (CDCl_3 , TMS) de correlações ^1H , ^{13}C ^1J HSQC da secreção de <i>P. striatus</i>	110
Anexo 35. Ampliações do mapa de contornos de RMN 2D (CDCl_3 , TMS) de correlações ^1H , ^{13}C ^1J HSQC da secreção de <i>P. striatus</i>	110
Anexo 36. Espectros de RMN de ^1H (NOESY 1D) da secreção de <i>P. striatus</i> ...	111
Anexo 37. Espectro de massas do composto 42a	112
Anexo 38. Espectro de RMN de ^1H do composto 42a	112
Anexo 39. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 42a	113
Anexo 40. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° do composto 42a .	113
Anexo 41. Espectro de massas do composto 43a	114
Anexo 42. Espectro de RMN de ^1H do composto 43a	114
Anexo 43. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 43a	115
Anexo 44. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° do composto 43a .	115
Anexo 45. Espectro de massas do composto 44a	116
Anexo 46. Espectro de RMN de ^1H do composto 44a	116
Anexo 47. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 44a	117
Anexo 48. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° do composto 44a .	117
Anexo 49. Espectro de massas do composto 48a	118

Anexo 50. Espectro de RMN de ^1H do composto 48a	118
Anexo 51. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 48a	119
Anexo 52. Espectro de massas do composto 48b	119
Anexo 53. Espectro de RMN de ^1H do composto 48b	120
Anexo 54. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 48b	120
Anexo 55. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° do composto 48b .	121

INTRODUÇÃO

Em um ecossistema, no qual vários organismos vivos interagem entre si, é fundamental a comunicação entre os mesmos. A comunicação entre diferentes indivíduos requer o uso de sinais que se classificam basicamente em três grupos: mecânicos (acústicos e vibracionais), visuais e químicos.¹ A comunicação química permeia todos os níveis de organização biológica, desde a regulação de células e órgãos que compõem um organismo, até as interações ecológicas entre indivíduos.²

A ecologia química é a disciplina responsável pelo estudo dos sinais químicos envolvidos nas interações entre os organismos, contemplando tanto a caracterização química dessas moléculas quanto a informação que as mesmas transmitem.³

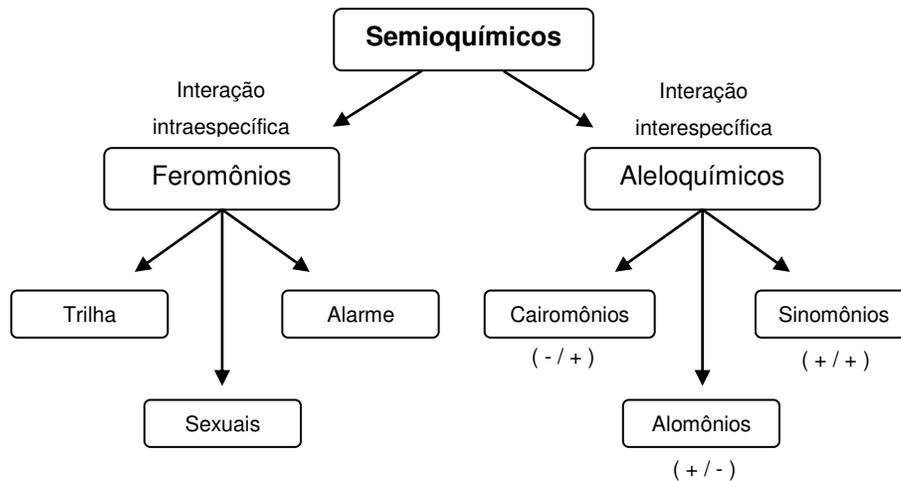
Os compostos químicos envolvidos na comunicação são chamados de semioquímicos (do grego *semeion* = sinal) e normalmente são subdivididos de acordo com sua ação intraespecífica (feromônios) ou interespecífica (aleloquímicos). Os feromônios (do grego *pherein* = carregar, e *horman* = excitar) são divididos de acordo com sua função (sexuais, de alarme, de trilha, entre outros), enquanto os aleloquímicos são classificados de acordo com os custos e benefícios relativos ao emissor e ao receptor. Alomônios são benéficos somente para o emissor e incluem compostos de camuflagem e defesa em geral. Cairomônios apresentam benefícios somente para o receptor e abrangem sinais usados para a seleção de hospedeiros e localização de presas. Sinomônios beneficiam ambos emissores e receptores e estão envolvidos em interações simbióticas (Esquema 1).⁴

¹ Greenfield, M.D. Communication in a Lilliputian World pp. 3-8. In: *Signalers and Receivers – mechanisms and evolution of arthropod communication*. New York: Oxford University Press, **2002**.

² Penn, D.J. Chemical communication: five major challenges in the post-genomic age pp 9-18. In: *Chemical Ecology From Gene to Ecosystem*. Dordrecht: Springer, **2006**.

³ Eisner, T.; Meinwald, J. Preface In: *Chemical Ecology: The Chemistry of Biotic Interaction*. Washington: National Academy Press, **1995**.

⁴ Francke, W.; Schulz, S. Pheromones pp. 197-261. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Vol. 8 *Miscellaneous Natural Products Including Marine Natural Products, Pheromones, Plant Hormones, and Aspects of Ecology*. Amsterdam: Pergamon Press, **1999**.



Esquema 1. Classificação de alguns semioquímicos pela sua função (feromônios) e benefícios (+) e custos (-) para emissor e receptor (emissor/receptor) (aleloquímicos)

A classificação tradicional de semioquímicos⁵ representa um sistema útil, mas que pode ser confuso uma vez que repousa na função biológica dos sinais químicos. Um predador pode localizar a sua presa se orientando pelos seus feromônios (que agiriam também cairomônios nesse caso). Um feromônio de uma espécie de presa também pode ser produzido por predadores para atraí-la (constituindo assim um alomônio)⁴. Essa classificação também tem como critério a origem dos sinais, o que pode torná-la ambígua especialmente em interações que envolvem mais de dois níveis tróficos.⁶

Dicke e Sabelis⁶ sugeriram uma nova terminologia, substituindo “semioquímicos” por “infoquímicos”. Segundo os autores, a classificação dos infoquímicos deve ser baseada nos custos e benefícios da interação para ambos os organismos, em vez de levar em conta a origem dessas substâncias. Dessa maneira, deve-se avaliar se o infoquímico evoca no receptor uma resposta comportamental e/ou fisiológica que é adaptativamente favorável ou não para cada um dos dois organismos envolvidos. Esse critério já vinha sendo usado na classificação de aleloquímicos, mas pode ser estendido para os feromônios, uma vez que a seleção natural atua no nível dos indivíduos, e não da espécie. Além

⁵ Nordlund, D.A.; Lewis, W.J. *J. Chem. Ecol.* **1976**, 2, 211-220.

⁶ Dicke, M.; Sabelis, W.M. *Functional Ecology* **1988**, 2, 131-139.

disso, esse sistema não considera a origem dos compostos e, portanto inclui o papel de outros organismos além dos produtores/emissores ou receptores na produção dos infoquímicos. Essa terminologia é especialmente útil em casos onde os infoquímicos são produzidos por micro-organismos e medeiam interações entre outros dois organismos.

Tradicionalmente, o metabolismo dos organismos é dividido em dois grupos: metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário engloba o conjunto de rotas responsáveis pela síntese e degradação de compostos envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução normais de um organismo, como carboidratos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros. O metabolismo secundário é responsável pela produção de compostos envolvidos em interações com outros organismos (semioquímicos) e sinalização, apesar de muitos metabólitos secundários terem funções ainda desconhecidas. Outro conceito é de que o metabolismo primário compreende todas as reações e compostos essenciais para a vida da célula, e o metabolismo secundário é responsável pelos processos e compostos necessários para manter a vida do organismo como um todo⁷.

Os metabólitos primários são comumente encontrados em todos os organismos⁸, enquanto os produtos do metabolismo secundário apresentam distribuição muito mais restrita do ponto de vista taxonômico.⁹ No entanto, a distinção entre metabólitos primários e secundários nem sempre é muito clara. Por exemplo, os ácidos graxos, açúcares e esteróides encontram-se amplamente distribuídos em estruturas fundamentais e deveriam ser considerados metabólitos primários. Porém, alguns desses têm distribuição mais restrita e atividades biológicas específicas, o que os caracterizaria como metabólitos secundários⁸.

Alguns autores modernos rejeitam essa divisão do metabolismo por não levar em consideração os mecanismos evolutivos envolvidos. Segundo Firn e Jones¹⁰, o metabolismo deve ser visto como um todo e englobar a biossíntese de

⁷ Morgan, D. *Biosynthesis in insects: Advanced Edition*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.

⁸ Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*. 3^ª ed. New York: John Wiley & Sons, 2009.

⁹ Berenbaum, M.R. The Chemistry of Defense: Theory and Practice. pp. 1-16. In: *Chemical Ecology: The Chemistry of Biotic Interaction*. Washington: National Academy Press, 1995.

¹⁰ Firn, R.D.; Jones, C.G. *J. Exp. Botany* 2009, 60, 719-726.

todas as estruturas químicas. Esses autores afirmam que as diferenças entre as várias rotas metabólicas existentes devem-se às diferentes pressões evolutivas sobre as mesmas.

Tendo em vista as divergências na literatura, torna-se necessário definir a terminologia usada nesse trabalho. Será empregado o termo “semioquímicos”, no sentido tradicional de “composto envolvido nas interações químicas entre organismos”¹¹, mas com a flexibilidade para incluir os conceitos de custos e benefícios propostos por Dicke e Sabelis⁶. Também será utilizado o termo “metabolismo secundário” relacionando-se ao conjunto de rotas e compostos com ocorrência mais restrita entre os organismos, dando destaque para os semioquímicos.

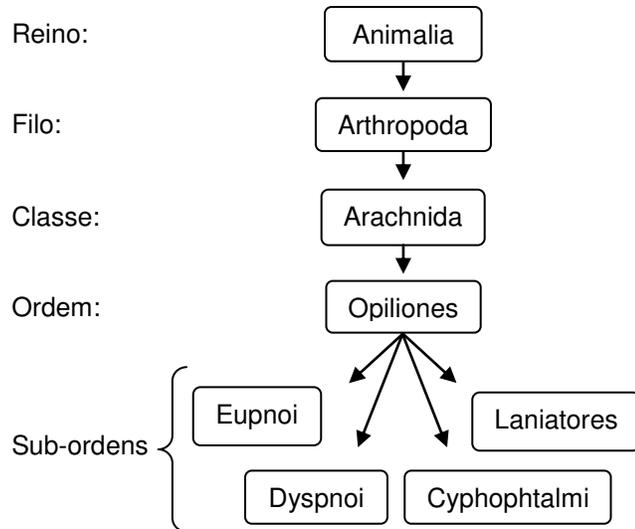
1.1. Aspectos da biologia de opiliões

A classe dos aracnídeos (Arachnida) faz parte do filo Arthropoda e do sub-filo Chelicerata, reunindo mais de 100.000 espécies entre aranhas, escorpiões, ácaros, carrapatos, opiliões e outros. Os representantes dessa classe se caracterizam por possuírem quatro pares de pernas, dois pares de apêndices (quelíceras e pedipalpos) adaptados para alimentação, defesa e/ou percepção e apresentarem o corpo dividido em dois segmentos: prossoma (ou cefalotórax) e opistossoma (ou abdômen).

A ordem Opiliones compreende cerca de 6.000 espécies descritas, distribuídas em 45 famílias e 1.500 gêneros e divididas em quatro sub-ordens: Cyphophthalmi, Laniatores, Eupnoi e Dyspnoi (Esquema 2). Ela também constitui, depois das ordens Acari (ácaros e carrapatos) e Araneae (aranhas), a terceira maior ordem da classe Arachnida. Entretanto, a fauna das regiões tropicais da Ásia, África e América Latina provavelmente engloba várias outras espécies desconhecidas, de modo que a diversidade dessa ordem pode ultrapassar 10.000 espécies¹².

¹¹ Nordlund, D.A.; Lewis, W.J. *J. Chem. Ecol.* **1976**, *2*, 211-220.

¹² Machado, G.; Pinto-Da-Rocha, R.; Giribet, G. What are harvestmen? pp. 1-13. In: *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Massachusetts: Harvard University Press, **2007**.



Esquema 2. Indivíduo da espécie *Sodreana sodreana* e classificação taxonômica da ordem Opiliones, com sua divisão em quatro sub-ordens¹²

Os opiliões geralmente vivem em habitats úmidos e sombreados: sob pedras ou toras, na serrapilheira, na vegetação ou em cavernas. A maioria das espécies de opiliões apresenta hábitos noturnos, escondendo-se durante o dia. A sua dieta consiste basicamente de pequenos artrópodes e outros invertebrados, carcaças de animais, plantas ou fungos^{12,13}.

Enquanto os demais aracnídeos secretam enzimas sobre suas presas e posteriormente sugam o alimento pré-digerido, os opiliões ingerem a comida diretamente em pequenas partículas após a mastigação. Essa forma de alimentação dos opiliões, juntamente com sua dieta onívora, é responsável pela exposição dos mesmos a diversos parasitas e patógenos. Além desses, os opiliões ainda apresentam uma vasta gama de inimigos naturais como pássaros, sapos, mamíferos, aranhas e formigas.¹²

1.2. Estratégias de defesa de opiliões

Frente à grande diversidade de inimigos naturais, os opiliões desenvolveram diversas formas de defesas comportamentais, morfológicas e

¹³ Eisner, T.; Alsop, D.; Meinwald, J. Secretions of opilionids, whip scorpions and pseudoscorpions. pp. 87–99. In: *Handbook of Experimental Pharmacology (Arthropod Venoms)*, vol. 48. Berlin: Springer-Verlag, 1978.

químicas¹⁵. Essas defesas têm como objetivo diminuir a chance de encontro com um predador e/ou aumentar as chances de sobrevivência em tais encontros¹⁴.

Uma das características exploradas por diversas espécies de opiliões é a coloração críptica, que consiste na semelhança do animal com parte do seu ambiente de modo a dificultar sua localização pelos predadores. Algumas espécies apresentam coloração escura ou irregular que serve como camuflagem quando o animal está em repouso¹⁵.

Por outro lado, algumas espécies apresentam padrões de coloração vibrantes e conspícuos, que alertam os potenciais predadores da sua impalatabilidade ou toxicidade. Esse mecanismo, chamado aposematismo, depende do aprendizado dos predadores que a espécie de opilião é impalatável (normalmente devido a suas defesas químicas), relacionando isso com suas características conspícuas memoráveis, reconhecendo a presa e evitando-a em futuros encontros¹⁴. Muitas das espécies de opiliões que apresentam essas características possuem hábitos diurnos¹⁵.

Outros mecanismos de defesa de opiliões incluem a tanatose, na qual o animal simula sua morte, mantendo-se rígido e com suas pernas retraídas ou esticadas de maneira característica; e a autotomia de pernas, que consiste na separação voluntária de uma perna, sem extravazamento de hemolinfa, sendo que a perna autotomizada mantém um movimento rítmico, distraindo o predador e permitindo a fuga do opilião¹⁵.

1.2.1. Defesas químicas em opiliões

Os integrantes de todas sub-ordens da ordem Opiliones (Cyphophthalmi, Laniatores, Eupnoi e Dyspnoi) apresentam um par de glândulas exócrinas nas laterais dorsais do cefalotórax¹³. Essas glândulas são responsáveis pela produção de secreções constituídas majoritariamente por compostos voláteis e que apresentam função defensiva, embora outras funções sejam propostas, como

¹⁴ Townsend, C.R.; Begon, M.; Harper, J.L. *Fundamentos em Ecologia*. Porto Alegre: Artmed, 2ª Ed., 2006.

¹⁵ Gnaschini, P.; Hara, M.R. Defense mechanisms pp. 374-399. In: *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Massachusetts: Harvard University Press, 2007.

agregação e alarme¹⁶. A liberação de compostos químicos é a estratégia de defesa mais estudada dos opiliões e é considerada a mais efetiva dentre as subordens Cyphophthalmi e Laniatores¹⁵.

Dentre os Laniatores, geralmente um fluido entérico composto basicamente por água é liberado pela boca e escorre até as aberturas das glândulas por capilaridade através de canais nas laterais do corpo (Figura 1). Os compostos armazenados nas glândulas são então liberados e dissolvidos nesse fluido, formando gotículas que podem ser posteriormente espalhadas pelo corpo, formando um “escudo químico” ou então pinceladas diretamente no agressor com o auxílio das pernas.¹⁷ É possível também o controle da quantidade de secreção liberada, permitindo que o opilião responda de acordo com a intensidade do estímulo.¹⁸ Além disso, em alguns casos a secreção pode ser liberada na forma de um jato direcionado ao agressor, não havendo a diluição prévia das substâncias de defesa (Figura 2).¹⁵

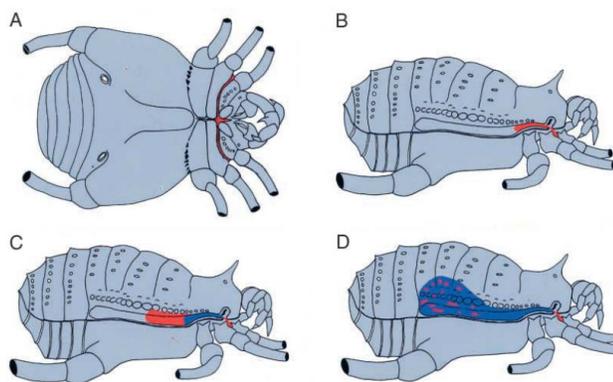


Figura 1. Mecanismo de liberação da secreção de *Acanthopachylus aculeatus*. (a) o fluido entérico (vermelho) é liberado e dirigido por canais até as laterais do corpo; (b) o fluido passa ao longo da carapaça pela abertura das glândulas exócrinas; (c) a secreção defensiva (azul) é liberada sobre o efluente oral; (d) a mistura se acumula nos canais da carapaça.¹⁹

¹⁶ Machado, G.; Bonato, V.; Oliveira, P.S. *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 357-360.

¹⁷ Acosta, L.E.; Poretti, T.I.; Mascarelli, P.E. *Bonn. Zool. Beitr.* **1993**, 44, 19-31.

¹⁸ Eisner, T.; Kluge, F.; Carrel, J.E.; Meinwald, J. *Science* **1971**, 173, 650-652.

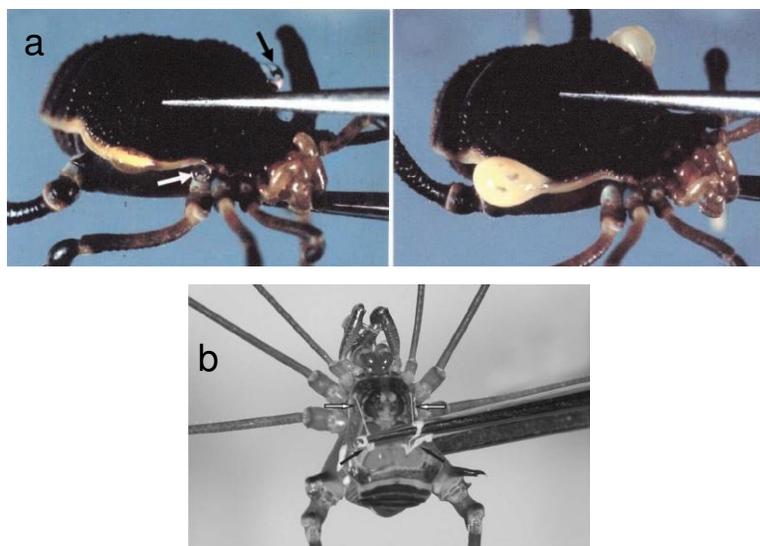


Figura 2. Mecanismos de liberação da secreção em opiliões: (a) formação de gotas em *Acanthopachylus aculeatus*¹⁹ e (b) liberação de jato em *Goniosoma spelaenum*.¹⁵

Embora os primeiros relatos da liberação de defesas químicas por opiliões e estudos morfológicos das glândulas datem do início do século XVIII, a natureza química dessas secreções defensivas permaneceu desconhecida até a metade do século XX. Em 1955, Estable e colaboradores^{20,21} caracterizaram quimicamente a secreção defensiva de *Acanthopachylus aculeatus* (Laniatores: Gonyleptidae), identificando a quinona 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona como composto majoritário, além de 2,5-dimetil-1,4-benzoquinona e 2,3,5-trimetil-1,4-benzoquinona como minoritários.

A composição química das secreções de defesa de opiliões varia de acordo com os diversos táxons. Os membros da sub-ordem Cyphophthalmi apresentam diversas metil cetonas saturadas e insaturadas e naftoquinonas.^{22,23} Entre os Eupnoi foram identificadas cetonas e alcoóis ramificados²⁴, bem como naftoquinonas.²⁵ A sub-ordem Dyspnoi somente recentemente teve a natureza química das secreções defensivas estudada, sendo reveladas naftoquinonas e

¹⁹ Eisner, T.; Rossini, C.; González, A.; Eisner, M. *J. Exp. Biol.* **2004**, 1313-1321.

²⁰ Estable, C.; Ardao, M.I.; Brasil, N.P.; Fieser, L.F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77,4942.

²¹ Fieser, L.F.; Ardao, M.I. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 774-781.

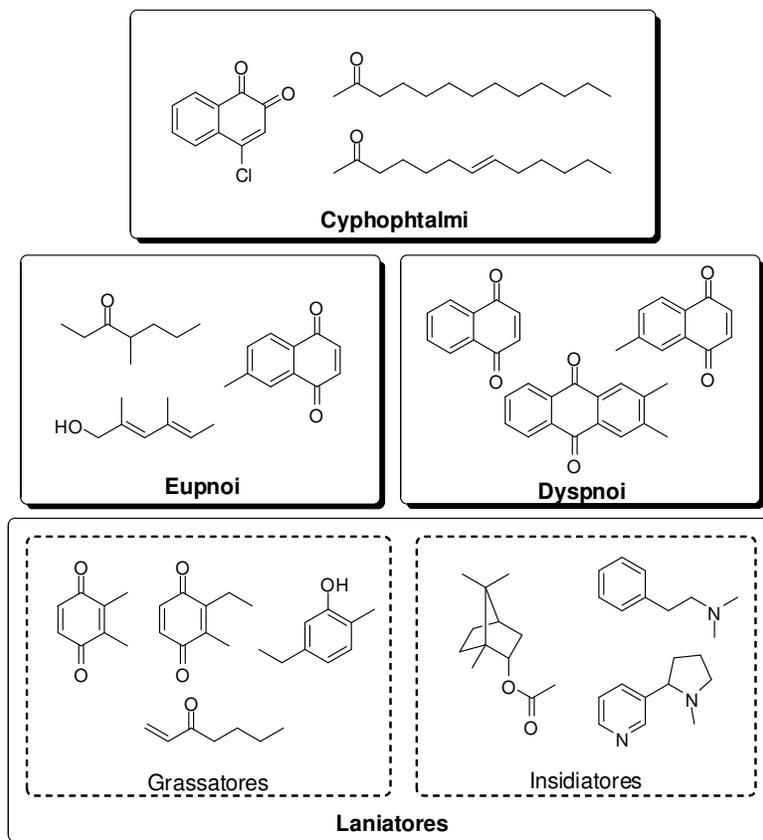
²² Raspotnig, G.; Fauler, G.; Leis, M.; Leis, H. *J. Chem. Ecol.* **2005**, 31, 1353-1368.

²³ Jones, T.H.; Shear, W.A.; Giribet, G. *J. Arachnol.* **2009**, 37, 147-150.

²⁴ Ekpa, O.; Wheeler, J.W.; Cokendolpher, J.C; Duffield, R.M. *Comp. Biochem. Physiol.* **1985**, 81B, 555-557.

²⁵ Wiemer, D.F.; Hicks, K.; Meinwald, J.; Eisner, T. *Experientia* **1978**, 34, 969-970.

antraquinonas como constituintes dessas.²⁶ As duas infra-ordens dentro da subordem Laniatores (Grassatores e Insidiatores) podem ser distinguidas pelas classes de compostos encontrados em suas secreções. De maneira geral os Grassatores apresentam majoritariamente benzoquinonas, fenóis e cetonas como compostos de defesa^{15,27}, enquanto os Insidiatores produzem diversos terpenóides e alcalóides (Esquema 3).^{28,29}



Esquema 3. Compostos característicos de secreções de opiliões das sub-ordens Cyphoptalmi^{22,23}, Eupnoi^{13,25}, Dyspnoi²⁶ e Laniatores^{28,29,30,31,32,33}

²⁶ Raspotnig, G.; Leutgeb, V.; Schaider, M.; Komposch, C. *J. Chem. Ecol.* **2010**, 36, 158-162.

²⁷ Hara, M.R.; Cavalheiro, A.J.; Gnaspi, P.; Santos, D.Y.A.C. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, 33, 1210-1225.

²⁸ Ekpa, O.; Wheeler, J.W.; Cokendolpher, J.C.; Duffield, R.M. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1315-1318.

²⁹ Raspotnig, G.; Schaider, M.; Föttinger, P.; Komposch, C.; Karaman, I. *J. Chem. Ecol.* **2011**, 37, 912-921.

³⁰ Machado, G.; Carrera, P.C.; Pomini, A.M.; Marsaioli, A.J. *J. Chem. Ecol.* **2005**, 31, 2519-2539.

³¹ Machado, G.; Pomini, A. M. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2008**, 36, 369-376.

³² Pomini, A. M.; Machado, G.; Pinto-Da-Rocha, R.; Macías-Ordóñez, R.; Marsaioli, A. J. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2010**, 38, 300-308.

³³ Rocha, D.F.O.; Hamilton, K.; Gonçalves, C.C.S.; Machado, G.; Marsaioli, A.J. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 658-663.

O mecanismo de liberação das secreções de defesa normalmente inclui sua mistura com o fluido entérico aquoso, o que é favorável uma vez que causa a diluição de compostos que requerem custos elevados de produção. Além disso, alguns compostos, como as quinonas, são instáveis em solução aquosa e, portanto, não podem ser armazenados nessa forma^{15,18}.

Vários estudos já foram realizados para testar a eficácia das secreções de opiliões como mecanismo de defesa. Experimentos comprovaram a ação repelente dessas defesas frente a formigas, aranhas, sapos e lagartos^{18,19,30,34}, mas estas não se mostraram efetivas frente a gambás, cuja dieta inclui opiliões. Em vários casos, juntamente com a repelência, foram observadas também respostas aversivas como limpeza da boca e pernas.

Eisner e colaboradores¹⁹ testaram a eficácia da secreção do opilião *Acanthopachylus aculeatus* frente à aranha *Lycosa ceratiola*. O predador alimentou-se normalmente ao serem oferecidas larvas de besouro com secreção do opilião adicionadas à sua superfície. Porém, ao confrontar as aranhas com o próprio *A. aculeatus*, observou-se a rejeição deste como presa após a aranha tocá-lo com as pernas, mesmo sem haver liberação de secreção. Os autores sugerem que possa haver outros sinais químicos presentes no tegumento que são responsáveis por essa repelência. Outra possibilidade é uma ação residual da secreção e/ou sua liberação em quantidades pequenas constantemente, o que criaria um “escudo químico” persistente, embora visualmente não detectável³⁰.

Também é proposto que essas secreções defensivas possam oferecer proteção frente a micro-organismos, uma vez que a exposição aos mesmos é maior nos habitats úmidos e escuros preferidos por opiliões^{35,36}. Entretanto, há relativamente poucos relatos sobre patógenos de opiliões na literatura. Estable e colaboradores²⁰, em seu trabalho pioneiro de caracterização química da secreção defensiva de *Acanthopachylus aculeatus*, mostraram que essa secreção apresenta atividade contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e protozoários. Além disso, ao administrar essa secreção composta por quinonas a

³⁴ Duffield, R.M.; Olubajo, O.; Wheeler, J.W.; Shear, W.A. *J. Chem. Ecol.* **1981**, 7, 445-452.

³⁵ Cokendolpher, J.C.; Mitov, P.G. Natural Enemies pp. 339-373. In: *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Massachusetts: Harvard University Press, **2007**.

³⁶ Cokendolpher, J.C. *J. Arachnol.* **1993**, 21, 120-146.

ratos infectados com parasitas intestinais, os ratos toleraram as substâncias enquanto os protozoários foram destruídos. Cole e colaboradores³⁷ demonstraram a atividade antifúngica da 4-metil-3-heptanona, cetona encontrada nas secreções defensivas de opiliões da sub-ordem Eupnoi.

1.3. Quimiosistemática, quimiotaxonomia e evolução de defesas químicas

A gama de metabólitos secundários de um organismo depende do seu arsenal enzimático, que por sua vez está definido pelo genoma do mesmo. Desta maneira, o perfil de metabólitos secundários carrega consigo uma “assinatura” química que representa um determinado fenótipo. Assim como a morfologia, a ecologia e a genética de uma espécie podem constituir parâmetros para classificá-la, a química também pode representar um caráter taxonômico. Além disso, assim como esses demais parâmetros, os semioquímicos e as enzimas envolvidas estão sujeitos a pressões seletivas que promovem sua evolução, a qual está relacionada com a história natural do organismo. Portanto, o perfil de semioquímicos apresenta um grande potencial para a taxonomia (nomenclatura, descrição e classificação de organismos) e para a sistemática (história natural e relações entre organismos), constituindo as áreas da quimiotaxonomia e quimiosistemática.

Inicialmente pensava-se que os metabólitos secundários de plantas eram somente subprodutos do metabolismo primário e, pela sua variável distribuição natural, poderiam servir como marcadores para fins de classificação. No entanto, com o desenvolvimento da área da ecologia química, em especial das interações animal-planta, percebeu-se que os metabólitos secundários são de grande importância na ecologia das espécies. Assim, passou-se a reconsiderar o papel dos metabólitos secundários de animais e plantas em termos da sua importância funcional e relacioná-los com o seu valor na taxonomia e na sistemática³⁸.

O uso de ferramentas químicas é especialmente útil na distinção de espécies muito parecidas morfologicamente, o que também pode ocorrer entre

³⁷ Cole, L.K.; Blum, M.S.; Roncadori, R.W. *Mycologia* **1975**, 67, 701-708.

³⁸ Harborne, J.B. *Pure Appl. Chem.* **1977**, 49, 1403-1421.

castas de uma mesma espécie de insetos sociais³⁹ ou diferentes estágios larvais de insetos⁴⁰.

A evolução de defesas químicas de artrópodes e os fatores ecológicos que a influenciam são relativamente pouco estudados. Sabe-se que o investimento em defesas químicas pode ter custos que envolvem o crescimento mais demorado de indivíduos, pois recursos são exigidos para metabolizar, estocar ou sintetizar toxinas de maneira a evitar a autotoxicidade. A desaceleração do crescimento e a diminuição do tamanho final de insetos adultos podem reduzir o sucesso reprodutivo de uma espécie. Por outro lado, indivíduos que investem em defesas químicas normalmente sofrem menos predação que aqueles que não investem⁴¹. A evolução de defesas químicas pode ser mais bem entendida considerando-se a razão entre os custos e benefícios envolvidos. Esses parâmetros, entretanto, são difíceis de medir em termos de perda ou ganho de aptidão⁹.

As pressões seletivas sobre as defesas químicas tendem a torná-las mais complexas em relação à diversidade de seus constituintes. Dessa maneira, defesas compostas por várias substâncias apresentam atividade sobre uma vasta gama de predadores. Além disso, torna-se mais difícil para um predador desenvolver resistência frente a secreções defensivas complexas. Outra pressão seletiva que atua sobre a composição de defesas químicas refere-se à otimização das propriedades físico-químicas dessas secreções (volatilidade, molhabilidade, lipofilicidade). É possível variar os níveis de repelência e toxicidade dessas defesas pela adição de solventes, o que aumenta a eficácia das mesmas por ação sinérgica. Logo, enquanto uma espécie consome menores níveis de componentes ativos da sua secreção (tóxicos com alto custo de produção), também pode reduzir sua volatilidade pela adição de fixadores⁴².

No caso específico de opiliões que secretam quinonas, é sugerido que a ocorrência de misturas das mesmas aperfeiçoa os parâmetros físico-químicos da secreção, uma vez que as quinonas individualmente são cristalinas à temperatura

³⁹ Nelson, L.J.; Cool, L.G.; Forschler, B.T.; Haverty, M.I. *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27, 1449-1479.

⁴⁰ Bagnères, A.G.; Wicker-Thomas, C. Chemical taxonomy with hydrocarbons. pp. 121-162. In: *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, **2010**.

⁴¹ Skelhorn, J.; Ruxton, G.D. *Behav. Ecol.* **2008**, 19, 146-153.

⁴² Dettner, K. *Ann. Rev. Entomol.* **1987**, 32, 17-48.

ambiente. A mistura, por outro lado, apresenta menor ponto de fusão e encontra-se no estado líquido, sendo mais facilmente estocada e liberada¹⁸.

Vários autores apontam a importância da natureza química das secreções de opiliões para o estudo da sua filogenia.^{22,23,24,26,27,29,43} Porém, há relativamente pouca informação referente à composição das secreções defensivas de opiliões, mesmo para a sub-ordem Laniatores (infra-ordem Grassatores) que, apesar de apresentar mais estudos, é consideravelmente mais diversa que as demais.¹²

Hara e colaboradores²⁷ avaliaram a composição das secreções de 22 espécies de opiliões da família Gonyleptidae e exploraram seu uso para a taxonomia e sistemática. Foram detectados 37 diferentes compostos, dos quais 18 tiveram sua estrutura sugerida. Segundo os autores, as substâncias defensivas das espécies estudadas são muito diversas para permitir o reconhecimento de linhagens filogenéticas. É sugerido que análises comparativas de secreções defensivas podem fornecer sinal filogenético com a identificação apropriada de alguns desses compostos, com o estudo de um maior número de espécies e com o conhecimento das relações entre os grupos de substâncias (grupos que se interconvertem ou presentes na mesma rota metabólica).

Como alternativa ao uso das moléculas individuais como caracteres, é possível usar as classes químicas dos constituintes das secreções como fonte de informação, sendo possível assim definir subfamílias e grandes grupos formados por várias subfamílias.⁴⁴

⁴³ Roach, B.; Eisner, T.; Meinwald, J. *J. Chem. Ecol.* **1980**, 6, 511-516.

⁴⁴ Silva, D.C. **2010**. *Reconstruindo parentesco e desfazendo preconceitos: filogenia de Gonyleptidae (Arachnida, Opiliones) usando caracteres ecológicos, comportamentais e químicos*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é investigar quimicamente as secreções de defesa de opiliões de várias espécies da família Gonyleptidae (Laniatores). Para isso, os objetivos específicos desse trabalho são:

- Caracterizar quimicamente as secreções de defesa de diversas espécies de opiliões por meio de técnicas de CG-EM e RMN;
- Sintetizar compostos relevantes encontrados nessas secreções;
- Testar a atividade antimicrobiana de componentes representativos das secreções.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização química das secreções de defesa

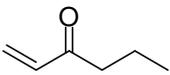
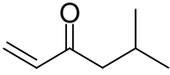
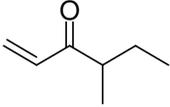
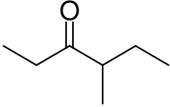
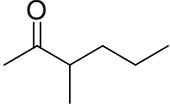
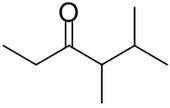
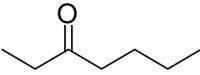
Ao todo foram analisadas as secreções de opiliões de dezoito espécies: *Acanthogonyleptes pulcher*, *Bourguyia hamata*, *Cadeadoius niger*, *Chavesincola inexpectabilis*, *Discocyrtus oliverioi*, *Gonyleptes saprophilus*, *Liogonyleptoides tetracanthus*, *Magnispina neptunus*, *Metarthrodes longipes*, *Mischonyx cuspidatus*, *Mitopernoides variabilis*, *Multumbo terrenus*, *Pachylospeleus strinati*, *Pachylus paessleri*, *Progonyleptoidellus striatus*, *Pseudotrogulus funebris*, *Sodreana sodreana*, *Sodreana barbiellini*.

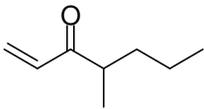
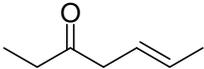
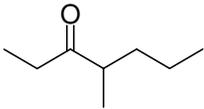
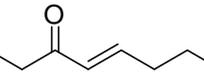
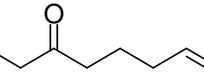
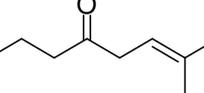
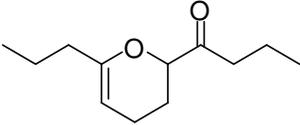
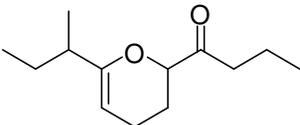
Amostras de secreção dessas espécies foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), enquanto que as amostras de quatro dessas espécies (*G. saprophilus*, *L. tetracanthus*, *M. neptunus* e *P. striatus*) foram também analisadas por diversas técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) (^1H , ^{13}C , DEPT 90° e 135°, COSY, HSQC e NOE).

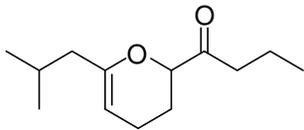
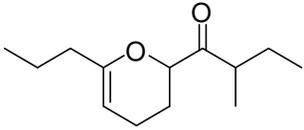
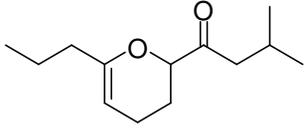
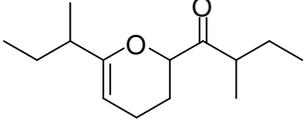
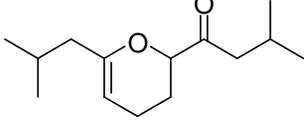
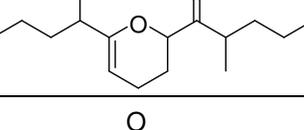
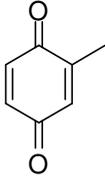
As análises de CG-EM permitiram detectar 38 compostos, bem como suas abundâncias relativas nas misturas (Tabela 1). Dentre estes, 30 tiveram suas estruturas sugeridas pelos dados de espectrometria de massas e 8 foram caracterizados com base em análises de RMN e/ou coinjeção com padrões. Os cromatogramas obtidos por CG-EM encontram-se na seção Anexos.

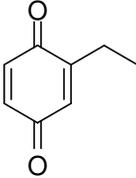
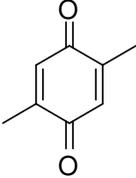
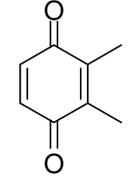
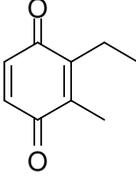
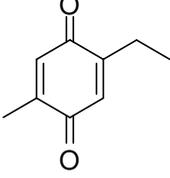
Para facilitar a discussão dos resultados, a Tabela 1 apresenta os compostos encontrados nas secreções separados em três grupos: cetonas + diidropiraniol cetonas; benzoquinonas + hidroquinonas; e fenóis. Dentro de cada grupo, os compostos são organizados em ordem crescente de índice de retenção.

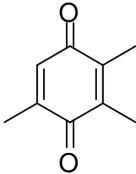
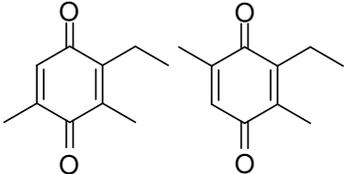
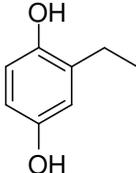
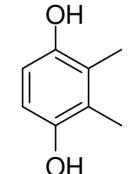
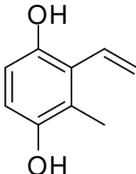
Tabela 1. Compostos identificados nas secreções das espécies estudadas

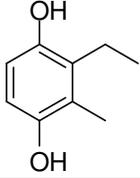
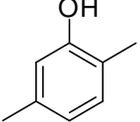
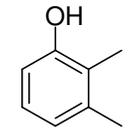
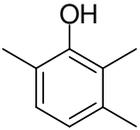
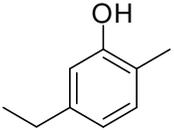
Composto	Estrutura	Índice de retenção	Caracterização estrutural	Principais fragmentos (m/z (abundância))	Espécies	Int. relativa
1		742	EM	98(M ⁺ ,13), 70(14), 55(100), 43(16), 41(14)	<i>Gonyleptes saprophilus</i> <i>Sodreana barbiellini</i> <i>Sodreana sodreana</i>	5,2% 3,4% 2,0%
2		828	EM, coinjeção com padrão	112(M ⁺ ,11), 97(24), 70(71), 57(16), 55(100), 43(10), 41(20)	<i>Sodreana sodreana</i> <i>Sodreana barbiellini</i>	69,1% 31,4%
3		831	EM, RMN, coinjeção com padrão	112(M ⁺ ,15), 97(12), 84(35), 83(12), 69(12), 58(28), 56(23), 55(100), 41(29)	<i>Acanthogonyleptes pulcher</i> <i>Gonyleptes saprophilus</i> <i>Cadeadoius niger</i> <i>Pachylus paessleri</i> <i>Sodreana barbiellini</i>	100,0% 69,0% 12,8% 0,9% 0,1%
4		835	EM	114(M ⁺ ,14), 85(10), 57(100), 41(14)	<i>Mischonyx cuspidatus</i> <i>Gonyleptes saprophilus</i> <i>Sodreana barbiellini</i>	7,0% 0,1% 0,1%
5		845*	EM	72(64), 71(19), 70(17), 57(19), 55(14), 43(100), 41(21)	<i>Mischonyx cuspidatus</i>	0,2%
6		856*	EM	86(6), 58(42), 57(100), 55(11), 43(10), 41(24)	<i>Gonyleptes saprophilus</i>	0,1%
7		878*	EM	114(M ⁺ ,14), 85(38), 72(21), 57(100), 41(16)	<i>Cadeadoius niger</i>	1,0%

8		922	EM	126(M ⁺ ,1), 84(97), 83(31), 71(14), 70(11), 56(16), 55(100), 43(58), 41(19)	<i>Cadeadoius niger</i> <i>Gonyleptes saprophilus</i>	83,7% 0,2%
9		930	EM	112(M ⁺ ,35), 83(91), 55(100)	<i>Pseudotrogulus funebris</i>	96,4%
10		929	EM	128(M ⁺ ,3), 99(11), 86(60), 71(82), 57(100), 55(13), 43(64), 41(16)	<i>Mischonys cuspidatus</i> <i>Cadeadoius niger</i>	2,8% 0,7%
11		956*	EM	126(M ⁺ ,26), 111(49), 97(100), 83(21), 69(43), 67(21), 56(26), 55(63), 43(73), 41(78)	<i>Pachylus paessleri</i>	0,1%
12		973*	EM	99(59), 72(51), 71(48), 57(77), 44(20), 43(100), 41(23)	<i>Cadeadoius niger</i>	1,0%
13		1000*	EM	97(100), 69(94), 44(6), 41(52)	<i>Pseudotrogulus funebris</i>	3,6%
14		1299	EM	196(M ⁺ ,48), 125(100), 107(27), 97(15), 83(19), 81(22), 79(22), 69(15), 55(75), 43(49), 41(24)	<i>Sodreana barbiellini</i>	0,7%
15		1376	EM	210(M ⁺ ,76), 139(100), 125(90), 121(30), 95(90), 93(35), 83(33), 81(28), 69(60), 57(39), 55(76), 43(68), 41(45)	<i>Gonyleptes saprophilus</i>	1,6%

16		1378	EM	210(M ⁺ ,62), 139(100), 125(65), 97(18), 95(53), 93(33), 83(22), 79(25), 69(29), 67(17), 55(44), 43(49), 41(31)	<i>Sodreana barbiellini</i> <i>Sodreana sodreana</i>	9,5% 0,5%
17		1386	EM	210(M ⁺ ,65), 139(62), 125(100), 107(30), 83(24), 81(30), 79(26), 69(23), 57(40), 55(92), 43(40), 41(40)	<i>Gonyleptes saprophilus</i>	1,5%
18		1388	EM	210(M ⁺ ,64), 139(83), 125(100), 107(31), 97(23), 83(29), 81(27), 79(27), 69(20), 57(25), 55(88), 43(42), 41(31)	<i>Sodreana barbiellini</i> <i>Sodreana sodreana</i>	8,1% 0,5%
19		1462	EM	224(M ⁺ ,41), 140(11), 139(100), 121(17), 95(22), 93(17), 83(13), 81(11), 69(24), 57(36), 55(30), 43(12), 41(21)	<i>Gonyleptes saprophilus</i>	21,7%
20		1479	EM	224(M ⁺ ,31), 140(10), 139(100), 97(10), 95(25), 93(16), 85(11), 83(11), 79(11), 69(12), 57(16), 55(18), 41(16),	<i>Sodreana barbiellini</i> <i>Sodreana sodreana</i>	46,7% 27,9%
21		1589*	EM	252(M ⁺ ,35), 153(100), 71(36), 69(30), 55(33), 43(46), 41(25)	<i>Cadeadoius niger</i>	0,8%
22		1010	EM, RMN, coinjeção com padrão	124(45), 123(27), 122(M ⁺ ,100), 94(64), 82(55), 68(31), 66(46), 54(55), 40(24)	<i>Chavesincola inexpectabilis</i> <i>Magnispina neptunus</i>	10,1% 9,2%

23		1103	EM, RMN	136(M ⁺ ,67), 123(16), 108(100), 107(42), 82(42), 80(18), 79(73), 77(15), 54(52), 53(30)	<i>Magnispina neptunus</i> <i>Chavesincola inexpectabilis</i>	90,8% 80,2%
24		1104	EM, coinjeção com padrão	138(14), 137(13), 136(M ⁺ ,100), 108(25), 96(20), 80(19), 79(37), 68(67)	<i>Multumbo terrenus</i> <i>Pachylus paessleri</i> <i>Mischonyx cuspidatus</i>	24,2% 10,3% 8,7%
25		1119	EM	136(M ⁺ ,100), 108(47), 107(47), 82(39), 80(17), 79(41), 54(37), 53(16)	<i>Mischonyx cuspidatus</i> <i>Bourguyia hamata</i> <i>Pachylospeleus strinati</i> <i>Liogonyleptoides tetracanthus</i> <i>Discocyrtus oliverioi</i> <i>Pachylus paessleri</i> <i>Chavesincola inexpectabilis</i>	68,3% 65,0% 60,3% 58,6% 57,4% 53,2% 2,4%
26		1182	EM	150(M ⁺ ,100), 135(10), 122(31), 121(16), 107(69), 82(20), 79(32), 77(16), 67(10), 54(18), 53(11)	<i>Discocyrtus oliverioi</i> <i>Liogonyleptoides tetracanthus</i> <i>Bourguyia hamata</i> <i>Pachylus paessleri</i> <i>Chavesincola inexpectabilis</i> <i>Mischonyx cuspidatus</i> <i>Multumbo terrenus</i>	41,4% 39,9% 17,1% 4,6% 2,7% 1,3% 0,9%
27		1197	EM	151(10), 150(M ⁺ ,100), 137(14), 122(45), 121(14), 107(41), 82(13), 79(54), 77(17), 68(24), 54(13), 53(19)	<i>Multumbo terrenus</i> <i>Mischonyx cuspidatus</i> <i>Pachylus paessleri</i>	38,4% 9,3% 0,6%

28		1216	EM	150(M ⁺ ,100), 122(35), 121(19), 107(55), 96(11), 79(39), 77(13), 68(29), 54(16), 53(14)	<i>Pachylospeleus strinati</i> <i>Multumbo terrenus</i> <i>Pachylus paessleri</i> <i>Bourguyia hamata</i> <i>Mischonyx cuspidatus</i> <i>Liogonyleptoides tetracanthus</i>	39,7% 27,6% 27,2% 15,8% 1,5% 0,1%
29		1280	EM	165(12), 164(M ⁺ ,100), 136(23), 135(13), 121(82), 93(24), 91(15), 77(13), 68(18), 67(13)	<i>Multumbo terrenus</i> <i>Pachylus paessleri</i> <i>Bourguyia hamata</i>	8,9% 2,0% 1,3%
30		1409*	EM	138(M ⁺ ,58), 123(100), 107(4), 95(6), 67(10)	<i>Chavesincola inexpectabilis</i>	4,6%
31		1433*	EM	139(10), 138(M ⁺ ,100), 137(29), 123(50), 95(12), 91(13)	<i>Pachylus paessleri</i> <i>Bourguyia hamata</i> <i>Liogonyleptoides tetracanthus</i> <i>Mischonyx cuspidatus</i> <i>Discocyrtus oliverioi</i>	1,1% 0,8% 0,8% 0,9% 0,5%
32		1467*	EM	151(10), 150(M ⁺ ,100), 149(21), 121(17), 107(37), 77(15)	<i>Discocyrtus oliverioi</i> <i>Liogonyleptoides tetracanthus</i>	0,4% 0,1%

33		1487*	EM	152(M ⁺ ,53), 151(11), 138(9), 137(100), 107(8), 79(10), 77(8)	<i>Liogonyleptoides tetracanthus</i> <i>Discocyrtus oliverioi</i>	0,5% 0,3%
34		1138	EM, RMN, coinjeção com padrão	122(M ⁺ ,100), 121(42), 107(96), 91(21), 79(15), 77(27)	<i>Progonyleptoidellus striatus</i> <i>Mitopernoides variabilis</i>	67,4% 24,5%
35		1172*	EM	122(M ⁺ ,91), 121(32), 107(100), 91(19), 79(16), 77(29)	<i>Progonyleptoidellus striatus</i>	1,3%
36		1220	EM, RMN	136(M ⁺ ,81), 135(20), 121(100), 91(26), 77(13)	<i>Metarthrodes longipes</i> <i>Progonyleptoidellus striatus</i>	97,1% 31,3%
37		1230	EM, coinjeção com padrão	136(M ⁺ ,43), 121(100), 91(15), 77(13)	<i>Mitopernoides variabilis</i>	75,5%
38	(C ₄ H ₉)-fenol	1315*	EM	150(M ⁺ ,48), 135(100)	<i>Metarthrodes longipes</i>	2,9%

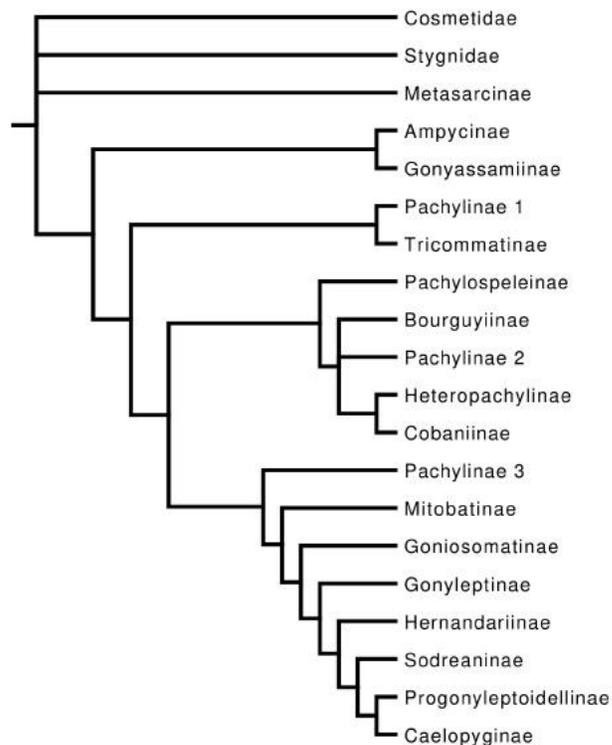
* Valores de índice de retenção calculados por regressão linear a partir dos demais compostos (ver Parte Experimental)

Observa-se que dentre os constituintes das secreções encontram-se cetonas (**1-13**), diidropiranil cetonas (**14-21**), benzoquinonas (**22-29**), hidroquinonas (**30-33**) e fenóis (**34-38**). As cetonas presentes em maiores quantidades são cetonas vinílicas, embora também tenham sido encontradas análogas saturadas. As alquilbenzoquinonas e os alquilfenóis encontrados apresentam diferentes padrões de substituição e são análogos ou iguais aos relatados em secreções de opiliões.^{27,30,31,32} Hidroquinonas já foram identificadas em secreções de opiliões²⁷ e podem ser consideradas precursoras de quinonas (ver item 3.1.1). Uma diidropiranil cetona foi relatada recentemente em duas espécies da família Gonyleptidae e os representantes dessa classe podem ser considerados dímeros de vinil cetonas³² (ver item 3.1.2).

Devido à relativa escassez de dados de espectrometria de massas e índices de retenção na literatura, é difícil caracterizar conclusivamente os compostos normalmente encontrados em secreções de opiliões. Em grande parte dos trabalhos de investigação química dessas secreções, as estruturas são sugeridas com base nos dados de EM e relativamente poucos caracterizam os constituintes com análises de RMN e coinjeção de padrões.

Levando em conta a filogenia proposta para essas espécies (Esquema 4)⁴⁴, pode-se representar a composição das secreções em termos das classes de compostos e dividir as espécies estudadas segundo suas subfamílias dentro da família Gonyleptidae (Tabela 2).

Na Tabela 2, as subfamílias estão dispostas de acordo com a filogenia da família Gonyleptidae, ou seja, as subfamílias mais próximas na tabela são mais próximas evolutivamente do que as mais distantes. Tendo isso em vista, é possível observar tendências nas classes de compostos produzidos por diferentes subfamílias. Nessa tabela as hidroquinonas encontradas foram contabilizadas como benzoquinonas, uma vez que são possíveis precursoras das mesmas, enquanto as diidropiranil cetonas foram consideradas cetonas, já que são prováveis dímeros dessas.



Esquema 4. Cladograma de subfamílias de Gonyleptidae baseado em caracteres morfológicos⁴⁴

Tabela 2. Composição das secreções defensivas segundo as classes químicas e subfamílias

Subfamília	Espécie	Cetonas	Fenóis	Quinonas
Pachylospeleinae	<i>Pachylospeleus strinati</i>	-	-	100%
Bourguyiinae	<i>Bourguyia hamata</i>	-	-	100%
Pachylinae 3	<i>Pachylus paessleri</i>	1,0%	-	99,0%
Heteropachylinae	<i>Chavesincola inexpectabilis</i>	-	-	100%
	<i>Magnispina neptunus</i>	-	-	100%
Pachylinae 4	<i>Discocyrtus oliverioi</i>	-	-	100%
	<i>Liogonyleptoides tetracanthus</i>	-	-	100%
Gonyleptinae	<i>Gonyleptes saphophilus</i>	100%	-	-
	<i>Mischonyx cuspidatus</i>	10,0%	-	90,0%
	<i>Pseudotrogulus funebris</i>	100%	-	-
	<i>Acanthogonyleptes pulcher</i>	100%	-	-
Hernandariinae	<i>Multumbo terrenus</i>	-	-	100%
Sodreaninae	<i>Sodreana barbiellini</i>	100%	-	-
	<i>Sodreana sodreana</i>	100%	-	-
Progonyleptoidellinae	<i>Progonyleptoidellus striatus</i>	-	100%	-
	<i>Cadeadoius niger</i>	100%	-	-
	<i>Mitopernoides variabilis</i>	-	100%	-
Caelopyginae	<i>Metarthrodes longipes</i>	-	100%	-

As benzoquinonas estão amplamente distribuídas na família Gonyleptidae e algumas das suas famílias irmãs, como Cosmetidae e Manaosbiidae.^{27,30} A presença de fenóis é descrita em algumas espécies das famílias Gonyleptidae, Cosmetidae e Stygnommatidae.³² Há relatos de cetonas encontradas em secreções de opiliões da família Gonyleptidae, aparentemente ocorrendo no clado composto pelas subfamílias Gonyleptinae, Hernandariinae, Sodreaninae, Progonyleptoidellinae e Caelopyginae.^{27,33}

De uma maneira geral, o perfil químico das secreções investigadas nesse trabalho condiz com as informações da literatura referentes à sub-ordem Laniatores. O perfil da ocorrência das diversas classes de compostos ao longo da história natural dessa família pode trazer informações sobre a evolução das rotas biossintéticas.

3.1.1. Considerações sobre a biossíntese de cetonas, fenóis e quinonas

Nas secreções defensivas de opiliões da família Gonyleptidae é usual a presença de alquilbenzoquinonas, alquilfenóis e cetonas como componentes majoritários. Apesar das características estruturais bastante distintas dessas classes de moléculas, a literatura apresenta casos de aparentes homoplasias (características semelhantes em dois grupos que não são resultado de ancestralidade comum) em relação a constituintes de secreções de opiliões²⁷. Portanto, pode-se supor que as rotas biossintéticas envolvidas na produção dessas três classes estejam consideravelmente interligadas ou em grande parte superpostas, permitindo que haja convergência na natureza química das secreções de grupos distantes com relativa facilidade.

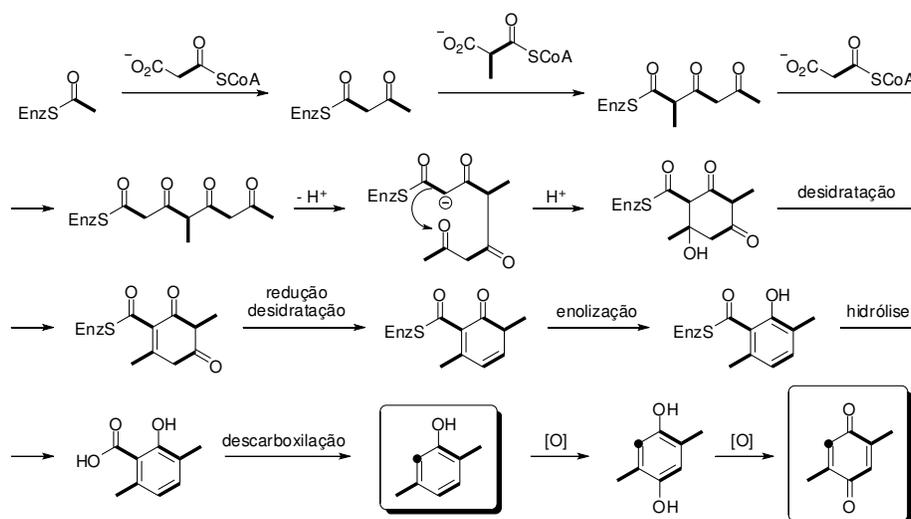
Pela natureza estrutural das cetonas já descritas na família Gonyleptidae, é natural sugerir que a rota dos policetídeos seja responsável pela biossíntese desses compostos. Os fenóis e benzoquinonas são mais parecidos entre si e podem ser originados da rota do chiquimato, embora também possam ser resultado da ciclização de policetídeos^{7,8}. Partindo da hipótese de que esses fenóis e quinonas se originam da rota dos policetídeos, é aceitável que pequenas

modificações na expressão enzimática (silenciamento de genes ou surgimento de novas enzimas) possam ser responsáveis pela variação das classes químicas presentes nessas secreções ao longo do tempo evolutivo dessa família.

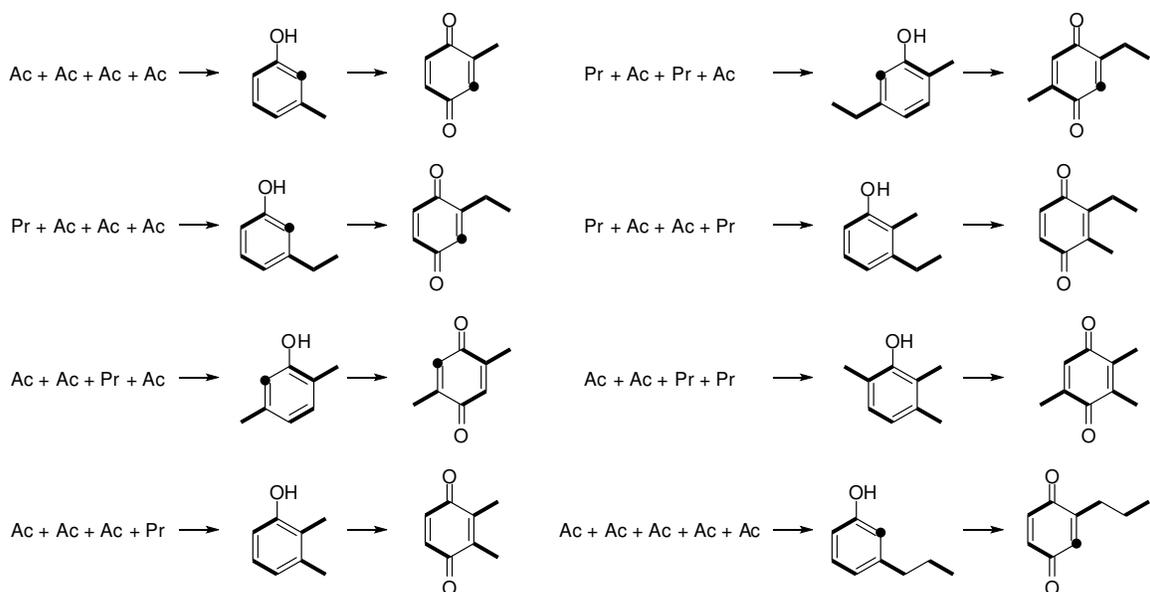
Tendo essas considerações em vista, pode-se propor uma rota biossintética para a formação de fenóis a partir de policetídeos (Esquema 5). Essa rota pode utilizar de forma mista unidades acetato e/ou propionato para gerar os diferentes padrões de substituição observados nos alquilfenóis de defesas de opiliões. Após a formação do fenol, é possível a oxidação do mesmo para uma hidroquinona e a posterior oxidação desta para uma benzoquinona. Cetonas podem ser originadas a partir de policetídeos, a partir de várias etapas de redução e desidratação seguidas de hidrólise, sem que ocorra a ciclização.

Essa hipótese é reforçada pela identificação de hidroquinonas juntamente com as benzoquinonas correspondentes em algumas espécies de opiliões²⁷, inclusive no presente trabalho.

Além do exemplo ilustrado no Esquema 5, há várias outras possibilidades de formação do policetídeo e, conseqüentemente, de alquilfenóis e alquilbenzoquinonas com diferentes padrões de substituição (Esquema 6). Grande parte dos compostos encontrados nesse trabalho poderia ser formada por essa rota, assim como a maioria dos compostos descritos na literatura em secreções de opiliões da sub-ordem Laniatores (infra-ordem Grassatores).¹⁵



Esquema 5. Rota biossintética proposta para a formação de fenóis e quinonas a partir de policetídeos



Esquema 6. Possibilidades de formação de fenóis e benzoquinonas a partir de policetídeos

Observa-se que a incorporação de uma unidade propionato como primeira unidade extensora (por exemplo, Ac + Pr + Ac + Ac) teria como resultado um substituinte metila na posição 4 do fenol resultante. Isso impossibilitaria a formação da hidroquinona e benzoquinonas correspondentes.

A hipótese das rotas biossintéticas aqui apresentada foi usada juntamente com os dados de espectrometria de massas para a sugestão das estruturas dos compostos encontrados. São necessários experimentos de alimentação de opiliões com compostos isotopicamente marcados para um melhor entendimento das rotas biossintéticas envolvidas na produção de compostos de defesa em opiliões.

3.1.2. Cetonas identificadas

Seis das dezoito espécies abordadas nesse trabalho apresentaram exclusivamente cetonas (e seus dímeros) como componentes de suas secreções. A secreção de uma dessas espécies (*Gonyleptes saprophilus*) foi estudada por RMN.

A espécie *G. saprophilus* apresenta dois compostos com alta abundância em sua secreção (Figura 3), e foi realizada a caracterização do seu componente majoritário: a cetona α,β -insaturada 4-metilex-1-en-3-ona (**3**).

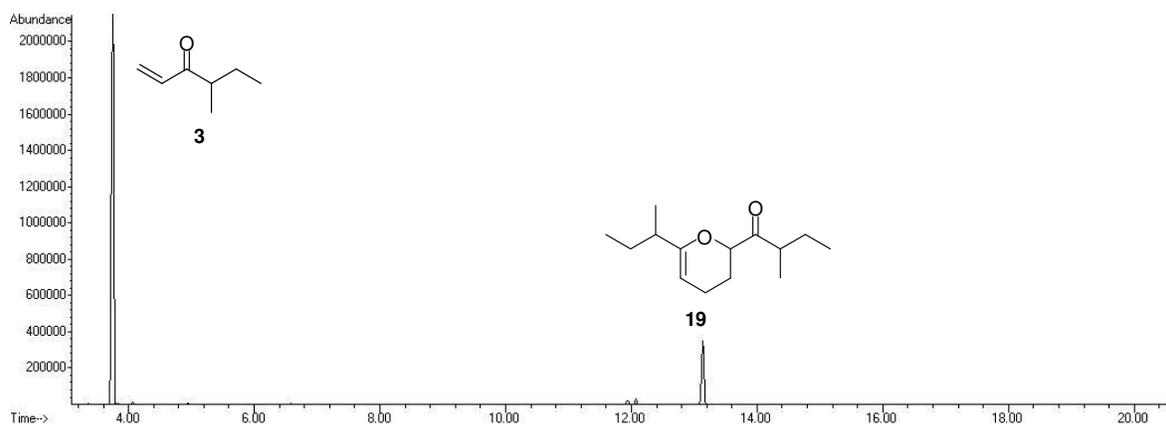


Figura 3. Cromatograma da secreção de *Gonyleptes saprophilus*

No espectro de massas da cetona **3** (Figura 4) observa-se o íon molecular de m/z 112 e os sinais de m/z 55 e 84 intensos, correspondentes à clivagem α da cetona e ao rearranjo de McLafferty respectivamente. O espectro de RMN de ^1H (Figura 5, Tabela 3) apresenta os sinais e acoplamentos característicos da ligação dupla terminal (δ 5,77; δ 6,27 e δ 6,44). O centro quiral da posição 4 faz com que os hidrogênios da posição 5 sejam diastereotópicos e acoplem entre si, além dos hidrogênios vizinhos, gerando duplos quintetos que no espectro se assemelham a septetos devido à superposição parcial dos sinais.

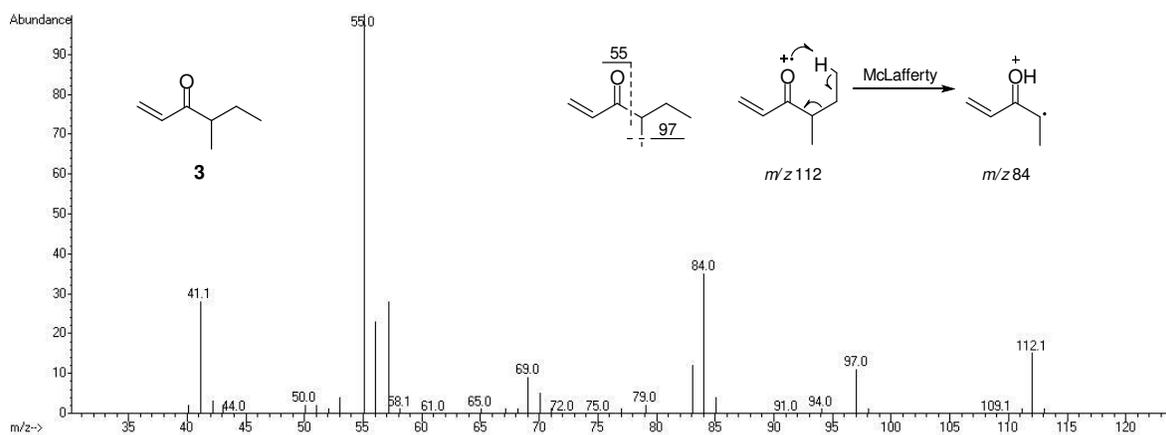
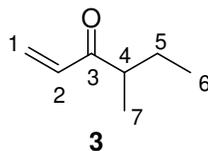


Figura 4. Espectro de massas do composto **3** e fragmentação proposta

Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 4-metilex-1-en-3-ona (**3**) (CDCl₃, TMS, 400,13 MHz para RMN de ¹H, 100,61 MHz para RMN de ¹³C)



Posição	δ_H	δ_C	DEPT
1	6,27 (1H, dd, ³ J = 17,5; ² J = 1,4 Hz) 5,77 (1H, dd, ³ J = 10,5; ² J = 1,4 Hz)	128,07	CH ₂
2	6,44 (1H, dd, ³ J = 17,5; 10,5 Hz)	135,49	CH
3	-	204,39	-
4	2,42 (1H, sexteto, ³ J = 8 Hz)	45,21	CH
5	1,72 (1H, septeto*, ³ J = 7,1 Hz; ² J = 14 Hz) 1,42 (1H, septeto*, ³ J = 7,1 Hz; ² J = 14 Hz)	26,20	CH ₂
6	0,89 (3H, t, ³ J = 7,5 Hz)	11,84	CH ₃
7	1,10 (3H, d, ³ J = 6,9 Hz)	16,13	CH ₃

* Esses sinais são duplos quintetos que, devido à superposição parcial, apresentam a aparência de septetos.

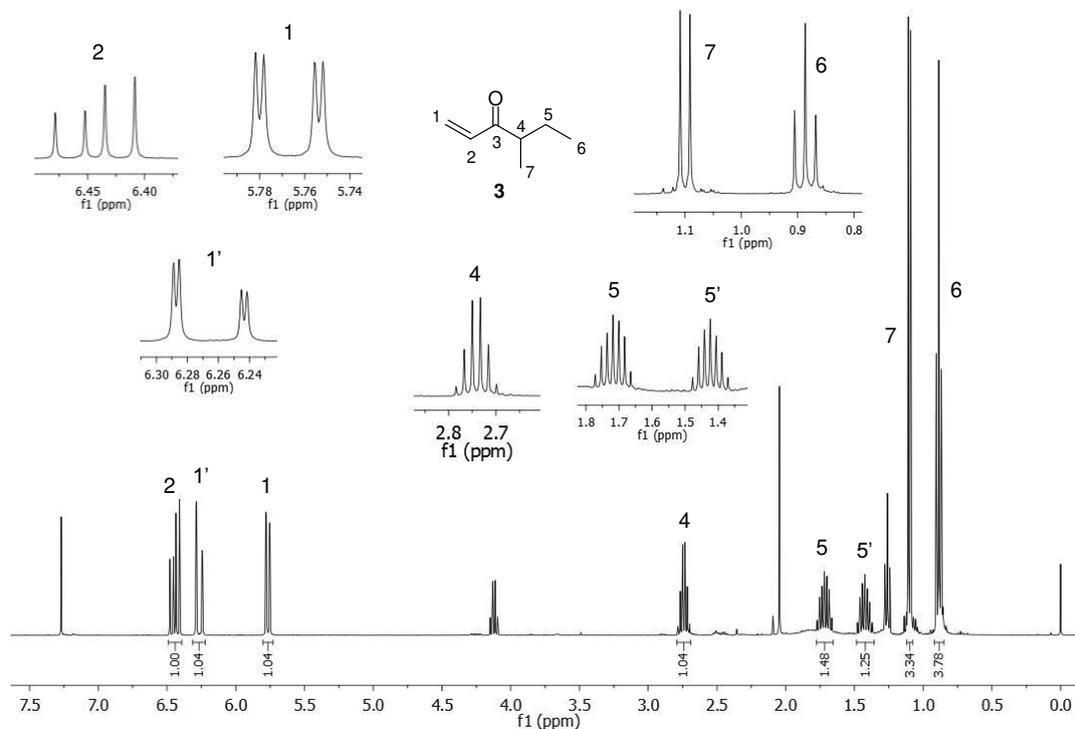


Figura 5. Espectro de RMN de ¹H (400,13 MHz, CDCl₃, TMS) da secreção de *G. saprophilus*

A vinil cetona 4-metilex-1-en-3-ona (**3**) foi sintetizada em sua forma racêmica (seção 3.2.2). A partir de análises de CG-DIC com coluna quiral, foi possível promover a separação cromatográfica dos enantiômeros de **3**. Foram realizadas análises de CG-DIC quiral coinjectando-se as amostras de secreções contendo **3** (*C. niger*, *G. saprophilus*, *P. paessleri*, *S. barbiellini* e *S. pulcher*) com a vinil cetona sintética (\pm)-**3**, constatando-se que esse composto ocorre na forma enantiomericamente pura e com a mesma estereoquímica em todas essas espécies (Figura 6). Entretanto, essas análises não permitem determinar a configuração do centro quiral da cetona **3** presente nas secreções (*R* ou *S*), sendo para isso necessária a síntese da vinil cetona **3** na forma enantiomericamente pura e novas análises por CG-DIC quiral.

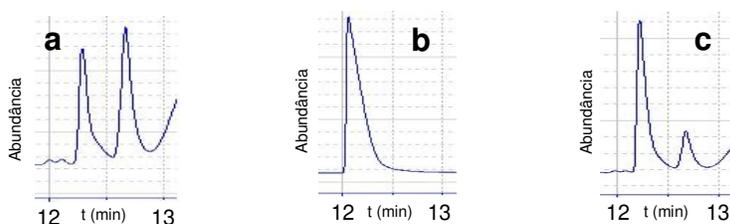


Figura 6. Análises de CG-DIC quiral: (a) cetona (\pm)-**3** sintética; (b) cetona **3** de secreção de *G. saprophilus*; (c) coinjeção da cetona (\pm)-**3** sintética com a amostra natural.

Pela análise do cromatograma obtido para a secreção de *G. saprophilus* (Figura 3), observa-se a presença do composto **19** com tempo de retenção de 13,153 min. Segundo o espectro de massas do mesmo (Figura 7) e de informações da literatura, pode-se dizer que se trata de um possível dímero da cetona **3**.

Rocha e colaboradores³³ identificaram nas secreções das espécies de opiliões *Iporangaia pustulosa* e *Neosadocus maximus* (também pertencentes à família Gonyleptidae) a vinil cetona hept-1-en-3-ona (**39**), um isômero de **2** e **3**, juntamente com o seu dímero (**40**), o qual teve sua estrutura confirmada por co-injeção de padrão sintético e análises de RMN. O mecanismo de dimerização proposto foi uma reação de hetero Diels-Alder, provavelmente mediada por uma

enzima (Esquema 7). Com base nesses dados, foi proposta uma estrutura análoga para o dímero **19** encontrado na secreção de *G. saprophilus*.

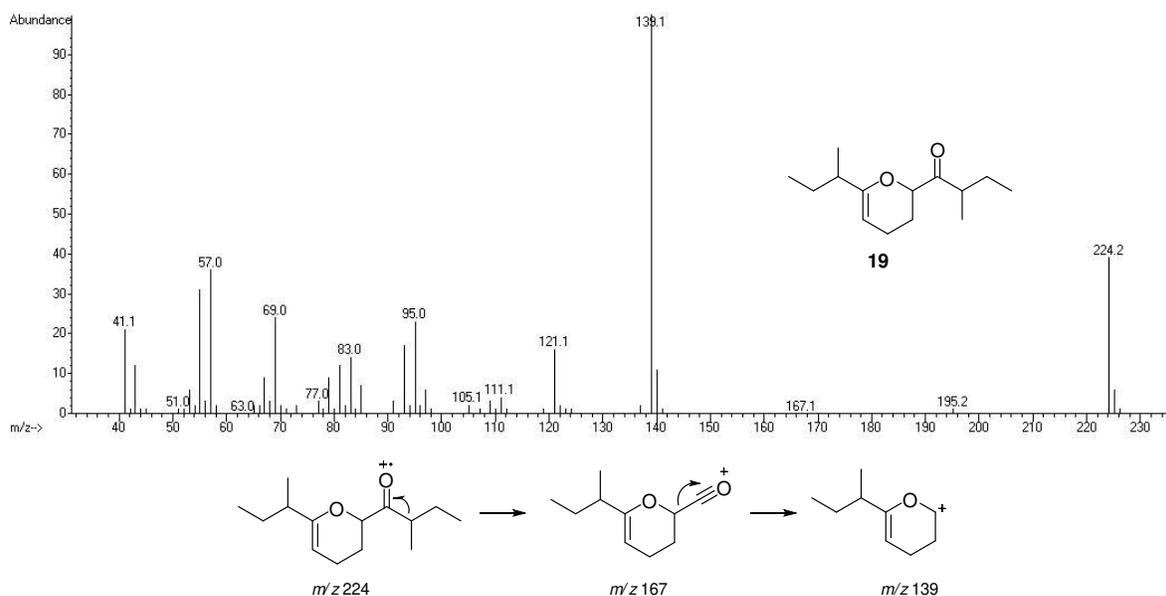
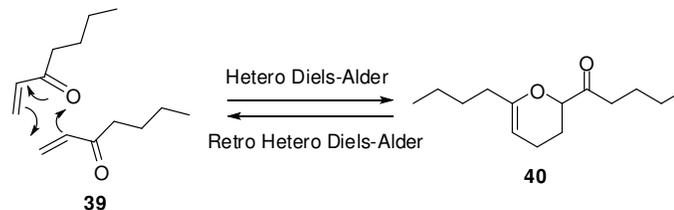


Figura 7. Espectro de massas do dímero **19** e fragmentação proposta



Esquema 7. Dimerização de vinil cetonas por reação de Hetero Diels-Alder³³

Após a análise por RMN da secreção total, tentou-se analisar o dímero **19** evaporando o composto **3**. O que se observou, porém, foi a decomposição do dímero **19**, restando somente o composto **3** (a decomposição foi verificada por CG-EM). Essa decomposição pode ter sido causada pela acidez residual do CDCl_3 usado para a análise de RMN.

Segundo a análise dos cromatogramas individuais, há a presença de dímeros também nas secreções das espécies *C. niger*, *S. barbiellini* e *S. sodreana*. Nessas secreções observa-se a presença das vinil cetonas 4-metilept-1-en-3-ona (**8**) (*C. niger*) ou 5-metilex-1-en-3-ona (**2**) (*S. barbiellini* e *S. sodreana*) como componentes majoritários.

Na espécie *S. barbiellini* observa-se a presença da hex-1-en-3-ona (**1**) juntamente com a vinil cetona majoritária **2**. Nessa secreção, além do dímero majoritário **20**, constata-se a presença de outros três dímeros diferentes (**14**, **16** e **18**) (Figura 8). Como a reação de Hetero Diels Alder proposta requer que uma molécula de vinil cetona aja como dieno e outra como dienófilo, há quatro possibilidades de formação de dímeros (Esquema 8), desde que essa reação seja regioseletiva, conforme observado para o dímero **40**.³³

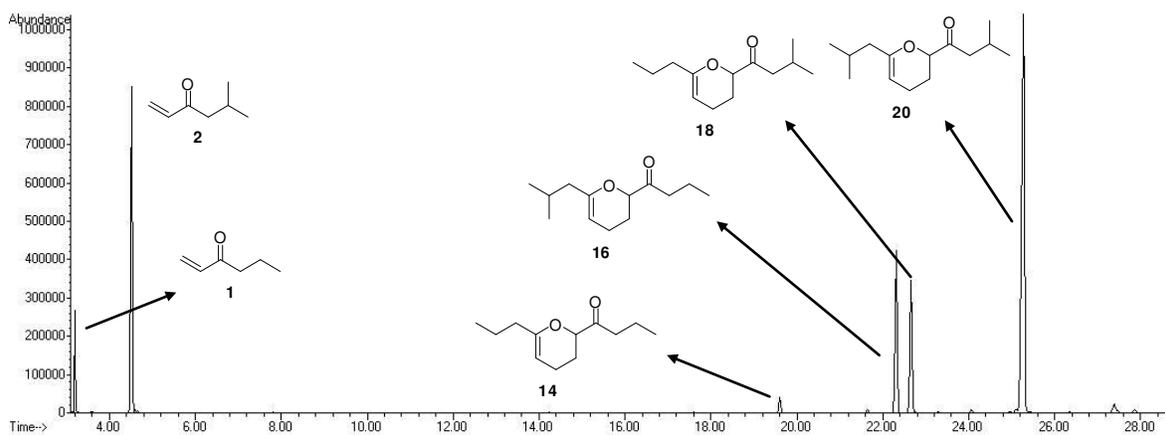
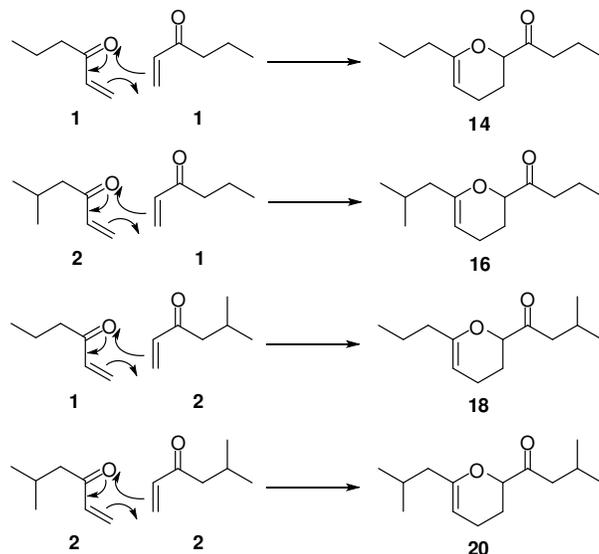


Figura 8. Cromatograma da secreção de *Sodreana barbiellini*



Esquema 8. Possibilidades de formação de dímeros de vinil cetonas

De maneira análoga, na secreção de *S. sodreana* pode-se observar a presença das vinil cetonas **1** e **2** e dos dímeros **16**, **18** e **20** (Figura 9). Na secreção de *G. saprophilus*, verifica-se a presença das vinil cetonas **1** e **3**, assim como os dímeros **15**, **17** e **19** (Figura 3) (as possibilidades de formação de dímeros são análogas àquelas mostradas no Esquema 8). A espécie *C. niger* apresenta a vinil cetona **8** como componente majoritário e o composto **21** como único dímero detectado (Figura 10).

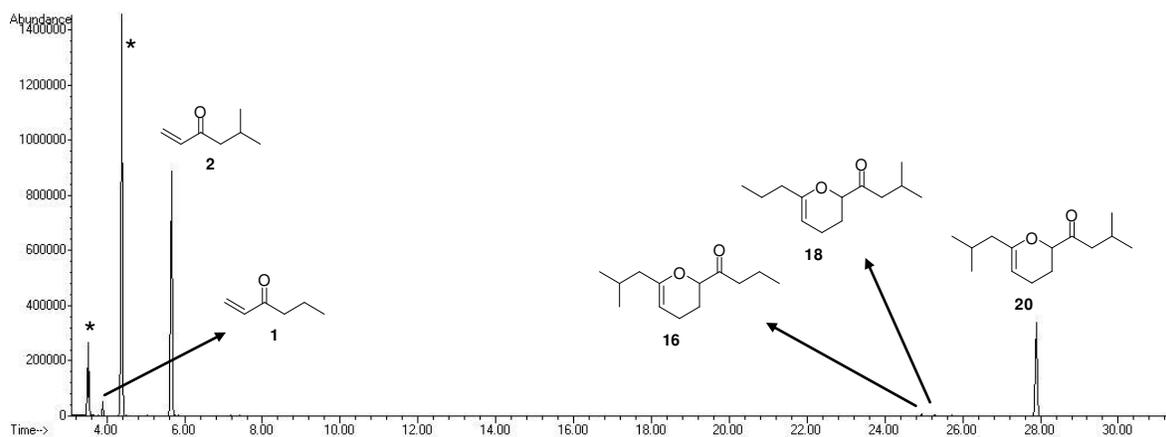


Figura 9. Cromatograma da secreção de *Sodreana sodreana*

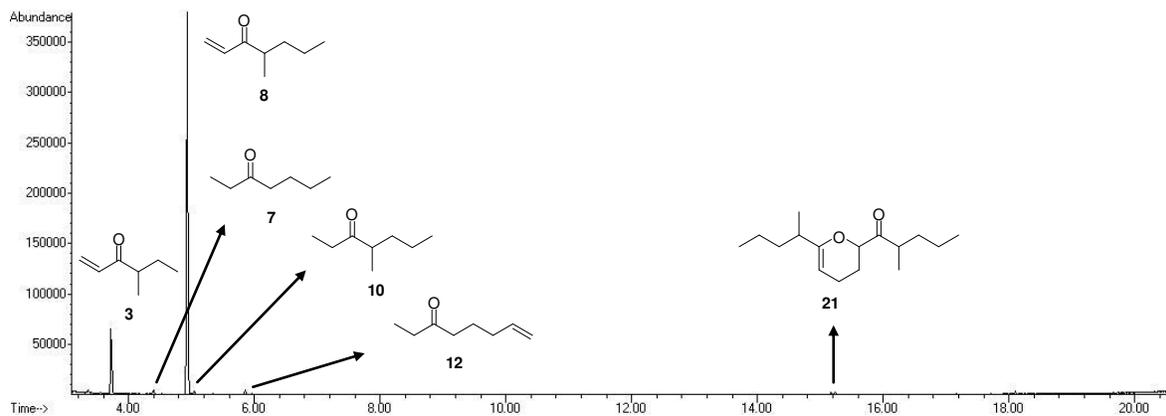


Figura 10. Cromatograma da secreção de *Cadeadobius niger*

É interessante observar que as vinil cetonas **3** e **8**, encontradas nas espécies *G. saprophilus* e *C. niger*, respectivamente, apresentam um centro quiral. Ao analisar essas amostras por CG-EM com programações de temperatura lentas (50 a 290 °C a 4 °C/min), é possível observar uma separação parcial dos picos

correspondentes aos dímeros (Figura 11). O dímero **40** foi detectado na forma racêmica, fato atribuído à racemização do centro quiral formado na reação de Diels-Alder, que apresenta um hidrogênio relativamente ácido³³. A racemização desse centro e a manutenção da estereoquímica do(s) centro(s) restante(s) nos dímeros **15**, **17**, **19** e **21** geram pares de diastereoisômeros que podem ser separados normalmente por colunas de CG regulares. A separação parcial nos picos relativos aos dímeros **16**, **18** e **20** não ocorre nas espécies *S. barbiellini* e *S. sodreana*, que apresentam vinil cetonas aquirais como monômeros.

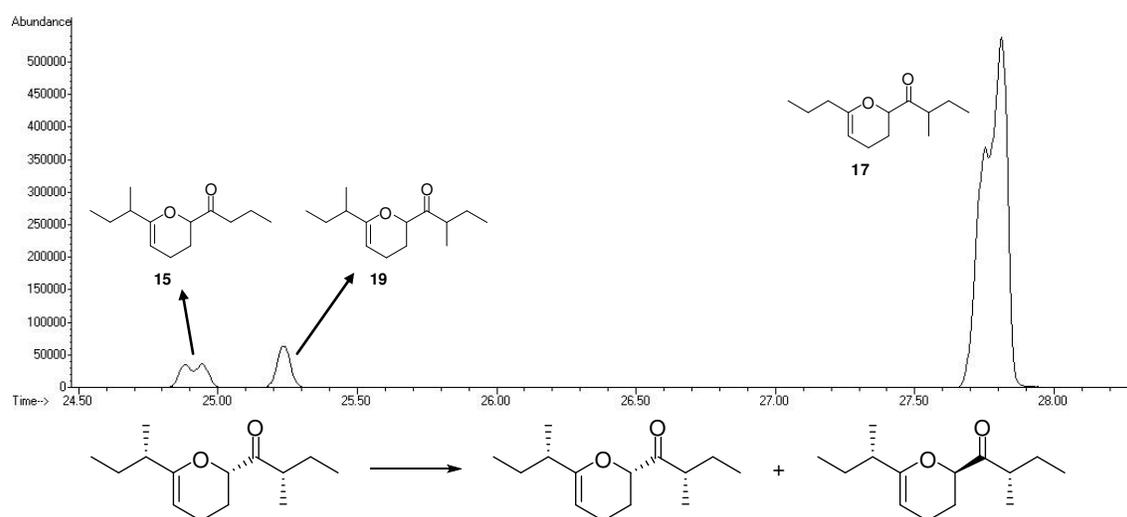


Figura 11. Separação dos picos dos dímeros de *G. saprophilus* e racemização de um dos centros quirais (a estereoquímica atribuída aos centros é arbitrária e ainda não é conhecida)

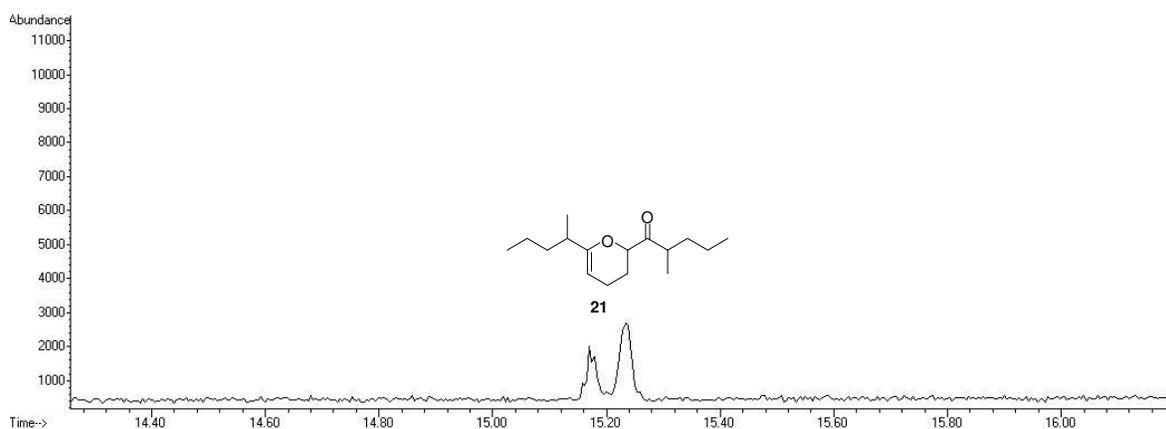


Figura 12. Separação dos picos do dímero **21** da secreção de *C. niger*

A hex-1-en-3-ona (**1**) não havia sido detectada na programação de temperatura do CG-EM usada para as secreções em geral, devido à sua alta volatilidade. A presença desse composto foi sugerida a partir da observação dos dímeros **14-18** e o mesmo somente foi detectado em uma programação de temperatura mais lenta (iniciando de 40 °C e com rampa de 4 °C/min). Essa vinil cetona apresenta em seu espectro de EM (Figura 13) o fragmento referente ao rearranjo de McLafferty de m/z 70, o que confirma sua estrutura linear.

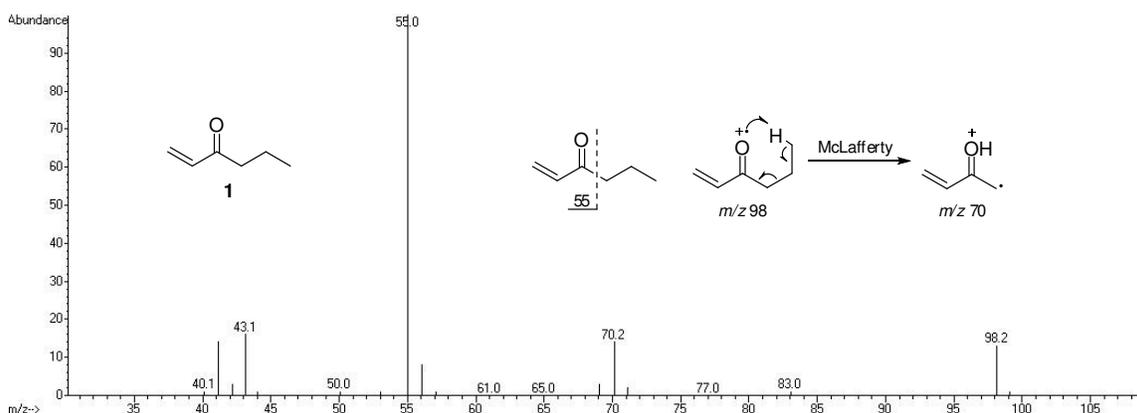


Figura 13. Espectro de massas do composto **1** e fragmentação proposta

A substância **2** foi encontrada como composto majoritário na secreção das espécies *S. barbiellini* e *S. sodreana*. O espectro de EM desta vinil cetona (Figura 14) apresenta o fragmento de m/z 70 resultante do rearranjo de McLafferty, confirmando que não há ramificação metila na posição 4. Esse composto apresenta tempo de retenção menor e íon molecular mais intenso que a vinil cetona linear hept-1-en-3-ona³³, o que confirma que o mesmo corresponde à 5-metilex-1-en-3-ona. A partir da síntese da vinil cetona **2** (item 3.2.2), foi possível confirmar a estrutura deste composto por coinjeção em CG-EM.

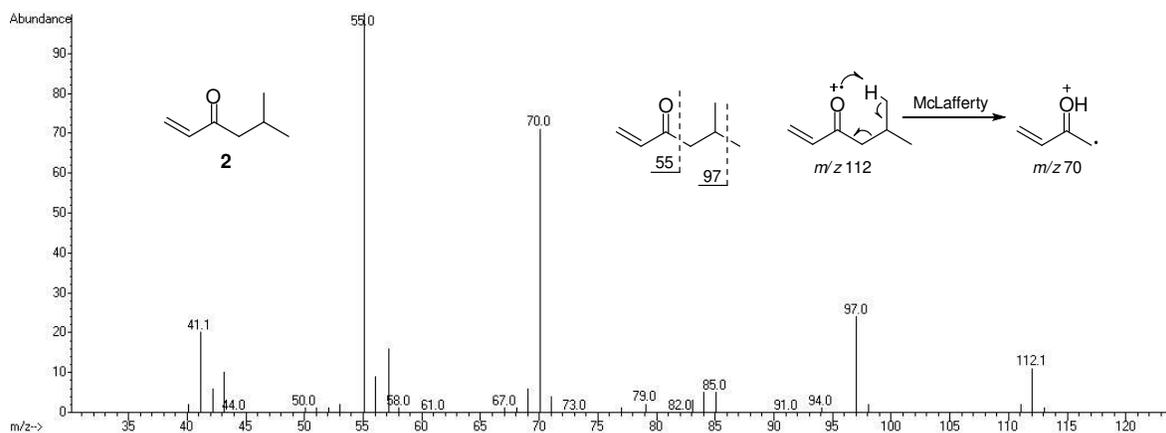


Figura 14. Espectro de massas do composto **2** e fragmentação proposta

A substância **4** apresenta o íon molecular com duas unidades de massa a mais em relação aos compostos **2** e **3**, o que sugere que o mesmo é um análogo saturado. O espectro de EM (Figura 15) apresenta sinais de m/z 85 e 57, que podem corresponder às duas possibilidades de clivagem α em relação à carbonila, sugerindo tratar-se da 4-metilexan-3-ona.

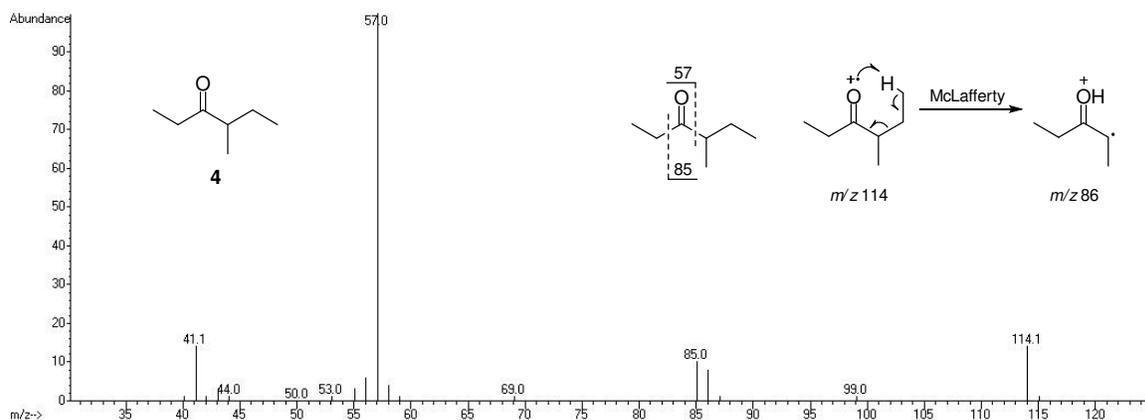


Figura 15. Espectro de massas do composto **4** e fragmentação proposta

A cetona **5** apresenta os dados de EM (Figura 16) de acordo com a 3-metilexan-2-ona, com os fragmentos de m/z 72 e 43 correspondentes ao rearranjo de McLafferty e clivagem α carbonílica, respectivamente. Devido à sua baixa abundância não foi observado o íon molecular de m/z 114.

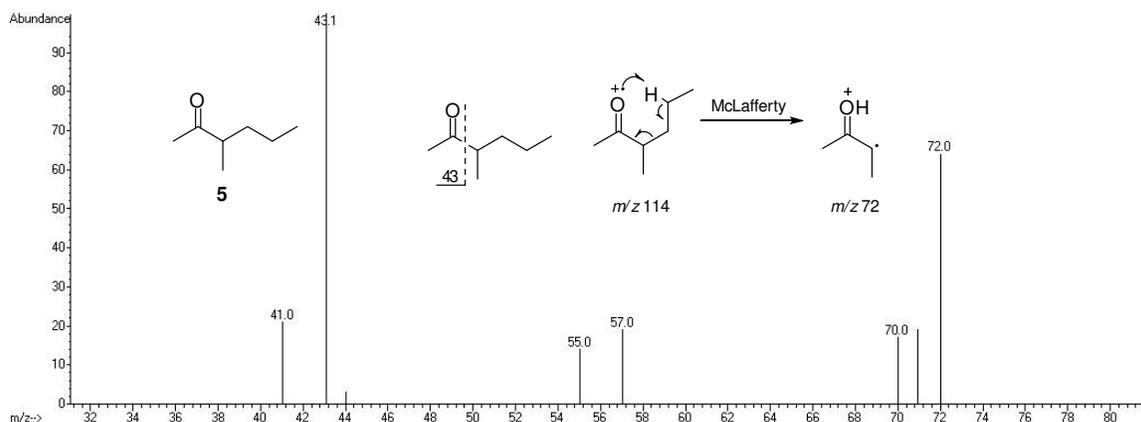


Figura 16. Espectro de massas do composto **5** e fragmentação proposta

O espectro de EM do composto **6** (Figura 17) apresenta sinais de m/z 86 e 57 provenientes de rearranjo de McLafferty e clivagem α carbonílica respectivamente. Podem ser sugeridas as estruturas 4,5-dimetilexan-3-ona e 4-metileptan-3-ona. Como esse composto apresenta um tempo de retenção relativamente baixo (4,065 min) para uma cetona de oito carbonos, foi sugerida a estrutura 4,5-dimetilexan-3-ona para o composto **6**, que é mais ramificada e por isso tende a ser mais volátil.

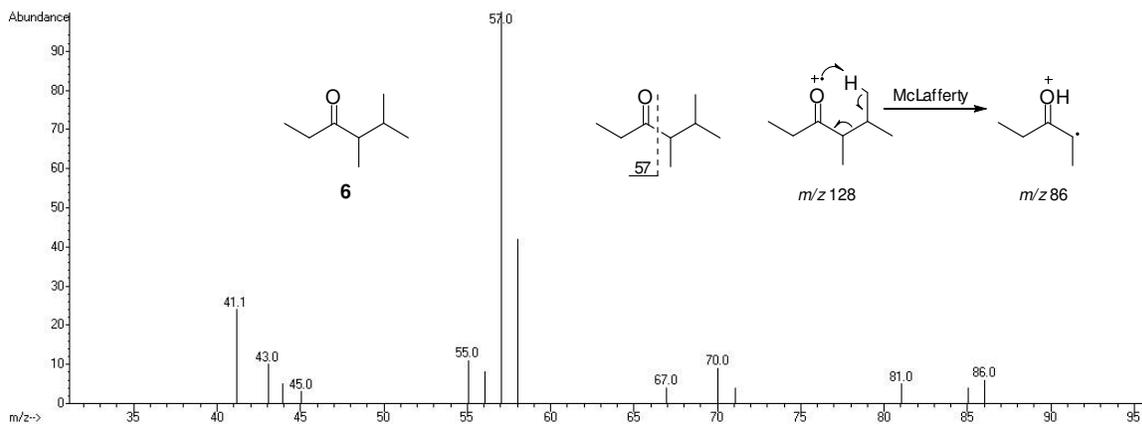


Figura 17. Espectro de massas do composto **6** e fragmentação proposta

A heptan-3-ona (**7**) foi sugerida com base nos fragmentos de m/z 114 do seu íon molecular, m/z 72 oriundo do rearranjo de McLafferty e m/z 85 e 57 resultantes de clivagens α carbonílicas (Figura 18).

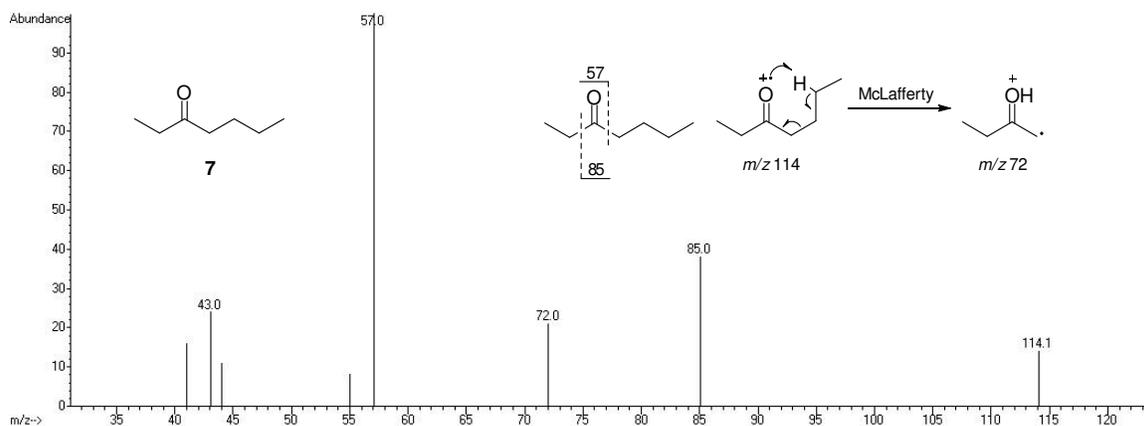


Figura 18. Espectro de massas do composto **7** e fragmentação proposta

A substância **8** representa o componente majoritário da secreção de *C. niger*. A presença do dímero **21** nessa secreção sugere que o composto **8** seja uma vinil cetona terminal. O espectro de EM de **8** (Figura 19) apresenta um sinal de m/z 126 correspondente ao íon molecular e que sugere que trata-se de uma cetona de oito carbonos. O fragmento de m/z 84 relativo ao rearranjo de McLafferty confirma a presença de uma metila na posição 4 e o de m/z 55 correspondente a clivagem α carbonílica confirma a estrutura da 4-metilept-1-en-3-ona para o composto **8**.

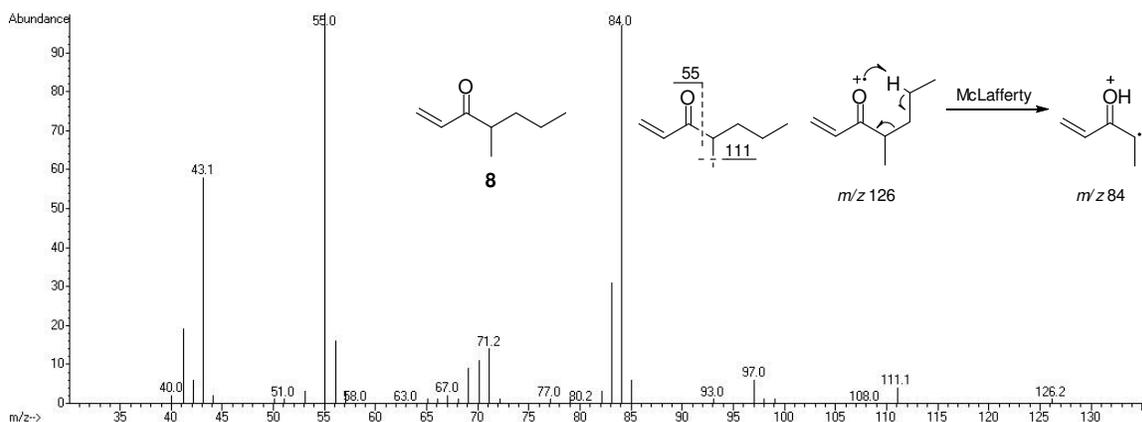


Figura 19. Espectro de massas do composto **8** e fragmentação proposta

Dentre as espécies aqui estudadas que apresentam predominantemente cetonas, o composto **9** é o único constituinte majoritário (*P. funebris*) que aparentemente não é uma vinil cetona terminal. O espectro de EM desse

composto (Figura 20) mostra um íon molecular de m/z 112 que sugere uma cetona de sete carbonos e uma insaturação, mas que não apresenta rearranjo de McLafferty. O fragmento de m/z 83 representa uma clivagem α carbonílica com a perda de uma etila, enquanto a perda consecutiva de monóxido de carbono dá origem ao fragmento de m/z 55. Esse último fragmento apresenta intensidade bastante alta, o que sugere uma estabilização do cátion formado, possivelmente por conjugação com uma ligação dupla (cátion alílico). Portanto, a estrutura sugerida para o composto **9** é a hept-5-en-3-ona.

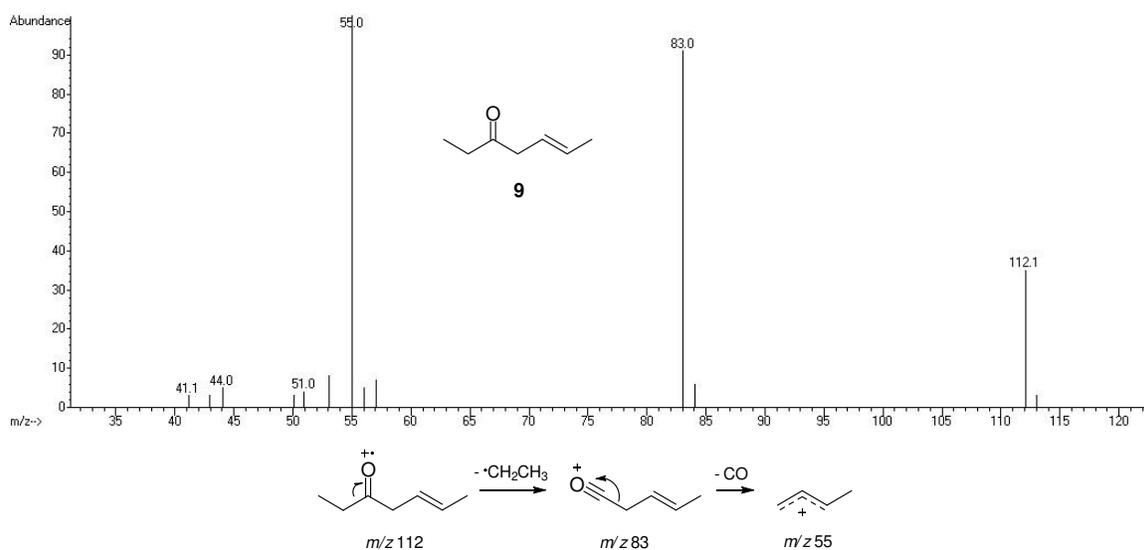


Figura 20. Espectro de massas do composto **9** e fragmentação proposta

A 4-metileptan-3-ona (**10**) teve sua estrutura sugerida com base no íon molecular de m/z 128, no fragmento de m/z 86 correspondente ao rearranjo de McLafferty e nos fragmentos de m/z 57 e 99 resultantes das duas possibilidades de clivagem α carbonílica (Figura 21).

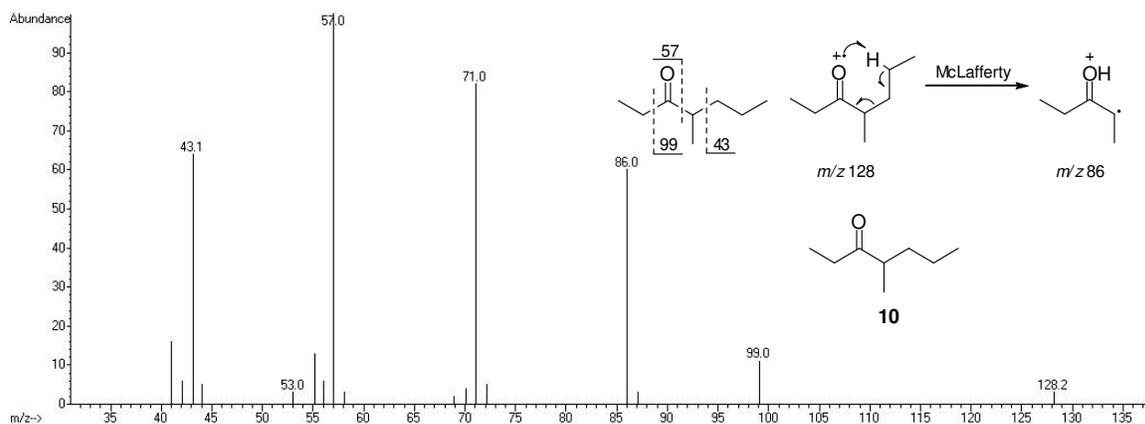


Figura 21. Espectro de massas do composto **10** e fragmentação proposta

A substância **11** apresenta um íon molecular de m/z 126, o que sugere uma cetona de oito carbonos e uma insaturação. Baseando-se na ausência de rearranjo de McLafferty e a presença de um fragmento muito intenso de m/z 97 pode-se sugerir a estrutura oct-4-en-3-ona. Nesse caso o fragmento de m/z 97 pode ser gerado tanto por uma clivagem α carbonílica como por uma clivagem alílica, ambos gerando cátions estabilizados por ressonância (Figura 22).

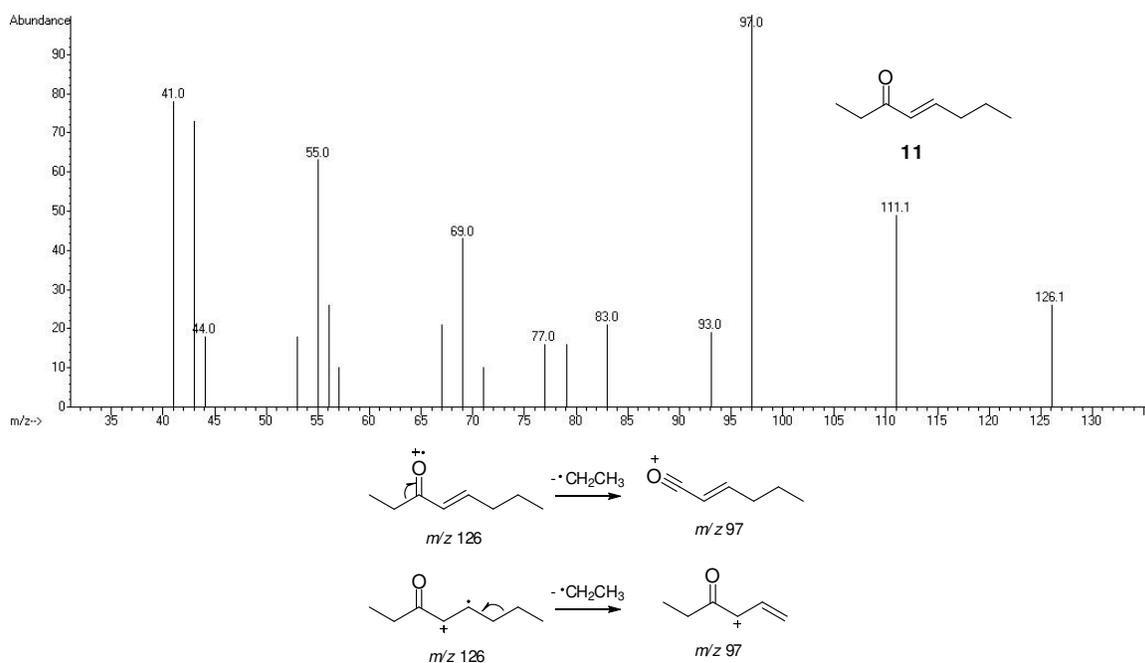


Figura 22. Espectro de massas do composto **11** e fragmentação proposta

O espectro de EM da cetona **12** não mostra um íon molecular, o que dificulta a interpretação do mesmo. O fragmento de m/z 72 corresponde ao rearranjo de McLafferty, enquanto o de m/z 57 representa a clivagem α carbonílica (Figura 23). A oct-7-en-3-ona é a estrutura proposta para o composto **12**.

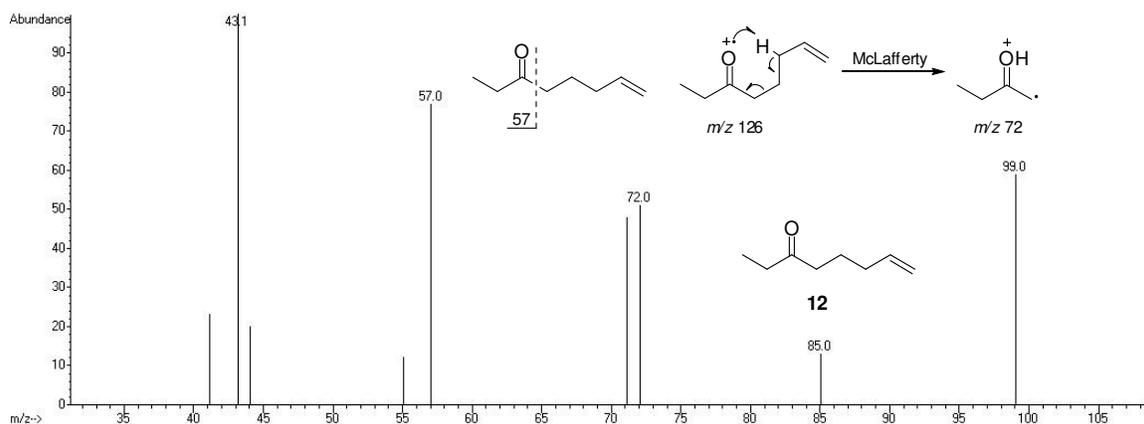


Figura 23. Espectro de massas do composto **12** e fragmentação proposta

O composto **13** também não apresenta o íon molecular em seu espectro de EM (Figura 24) e não realiza rearranjo de McLafferty. A estrutura sugerida para essa cetona é a 7-metiloct-6-en-4-ona, o que explica os fragmentos de m/z 97 a partir de uma clivagem α carbonílica e o de m/z 69 pela subsequente perda de monóxido de carbono. O cátion formado é estabilizado por ressonância com a ligação dupla vizinha, de maneira análoga ao composto **9**.

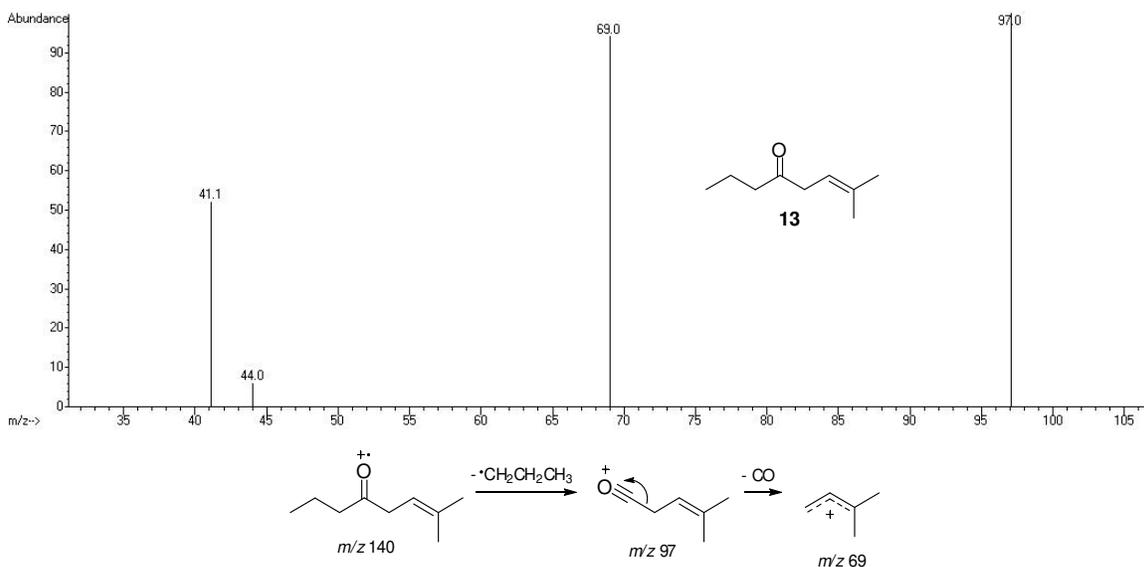


Figura 24. Espectro de massas do composto **13** e fragmentação proposta

As diidropiranil cetonas **14-21** tiveram suas estruturas propostas de acordo com a razão m/z do íon molecular observado no espectro de EM e nas fragmentações resultantes de clivagem α carbonílica seguida de perda de monóxido de carbono.

O composto **14** é provavelmente um dímero da vinil cetona hex-1-en-3-ona (**1**) devido ao seu íon molecular de m/z 196 (o dobro de 98, a massa do monômero) e o fragmento intenso de m/z 125 correspondente à clivagem α carbonílica seguida por perda de CO (Figura 25).

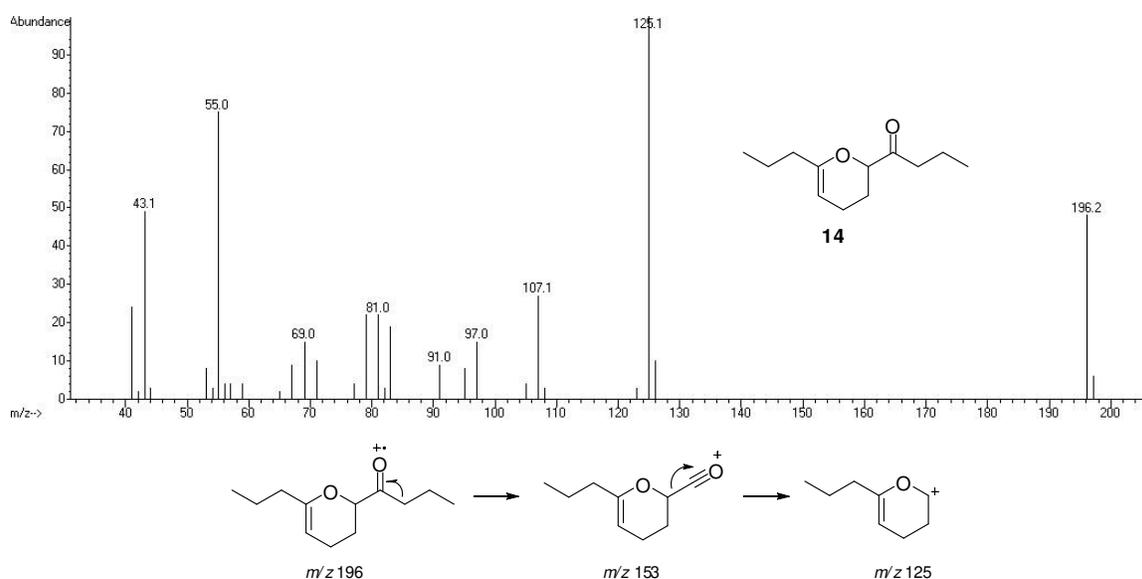


Figura 25. Espectro de massas do composto **14** e fragmentação proposta

As diidropiranil cetonas **16** e **18** representam as duas possibilidades de formação de dímero a partir da reação de hetero Diels-Alder uma molécula de hex-1-en-3-ona (**1**) e uma de 5-metilex-1-en-3-ona (**2**), conforme demonstrado na Figura X. O íon molecular de ambos os compostos **16** e **18** apresentam a mesma razão m/z , sendo diferentes principalmente na proporção entre os fragmentos de m/z 125 e 139. Considerou-se que o mais abundante dentre esses dois fragmentos indica a clivagem α carbonílica e perda de CO esperadas na diidropiranil cetona em questão. Dessa maneira, o composto **16** (Figura 26), que apresenta o fragmento de m/z 139 mais intenso, corresponde ao dímero formado

por uma unidade de **1** agindo como dieno e uma unidade de **2** agindo como dienófilo, enquanto o composto **18** (Figura 27), com o fragmento de m/z 125 mais intenso, representa o dímero formado por uma unidade de **2** atuando como dieno e uma unidade de **1** atuando como dienófilo (conforme o Esquema 8). Esse mesmo raciocínio foi aplicado para atribuir as estruturas às diidropiranyl cetonas **15** e **17** (Figura 28 e Figura 29), formadas por uma molécula de hex-1-en-3-ona (**1**) e uma de 4-metilex-1-en-3-ona (**3**).

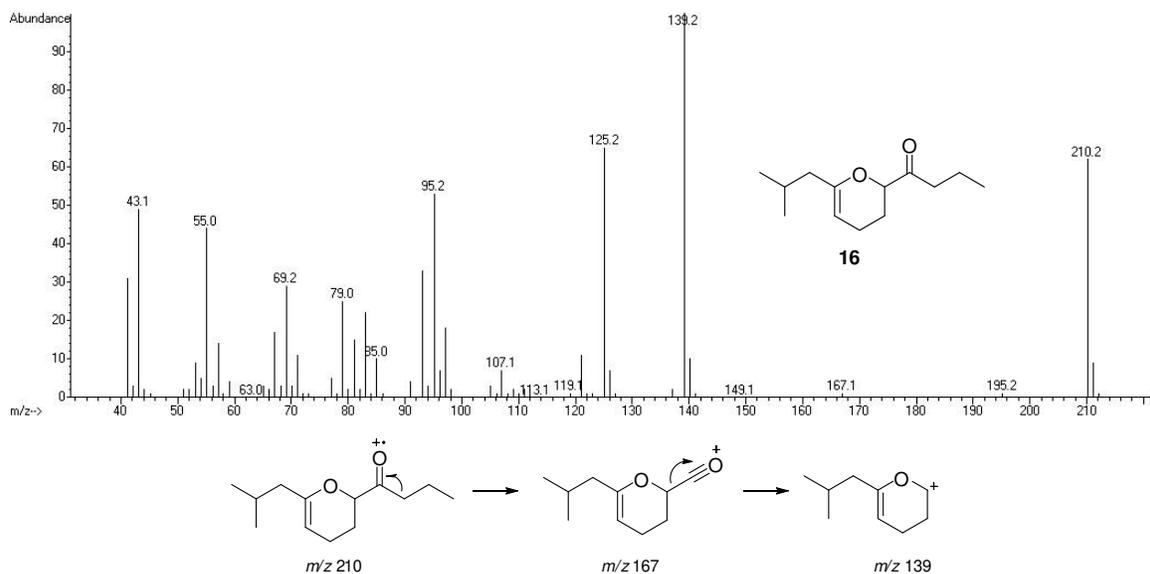


Figura 26. Espectro de massas do composto **16** e fragmentação proposta

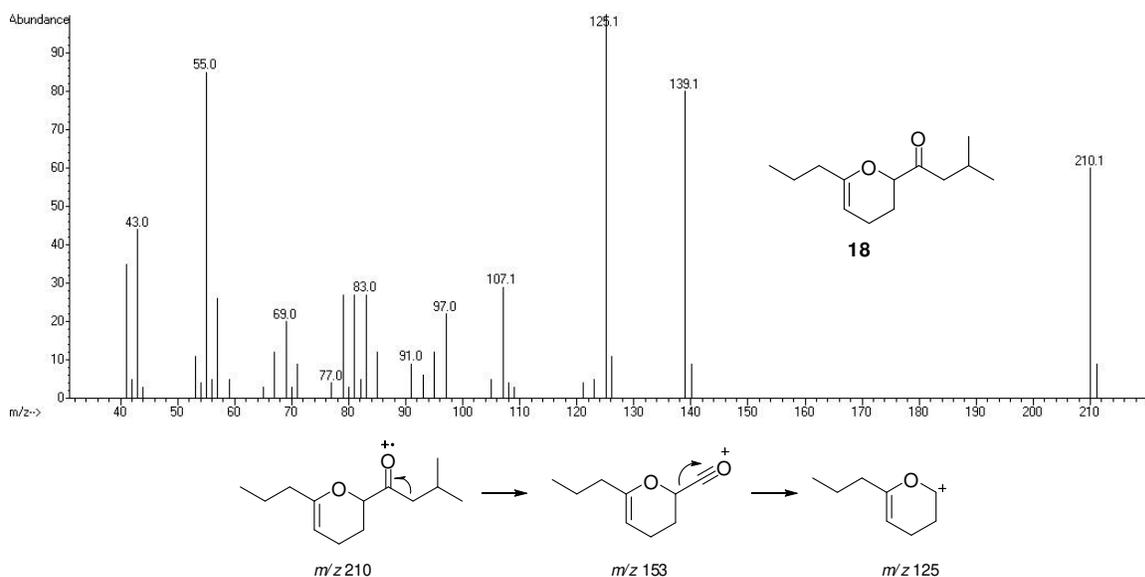


Figura 27. Espectro de massas do composto **18** e fragmentação proposta

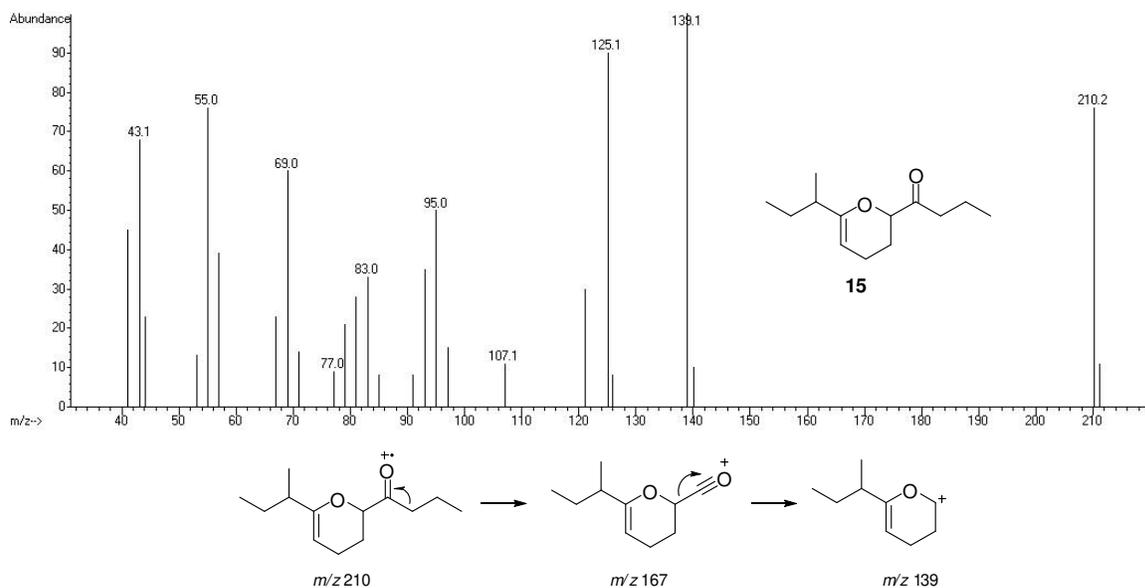


Figura 28. Espectro de massas do composto **15** e fragmentação proposta

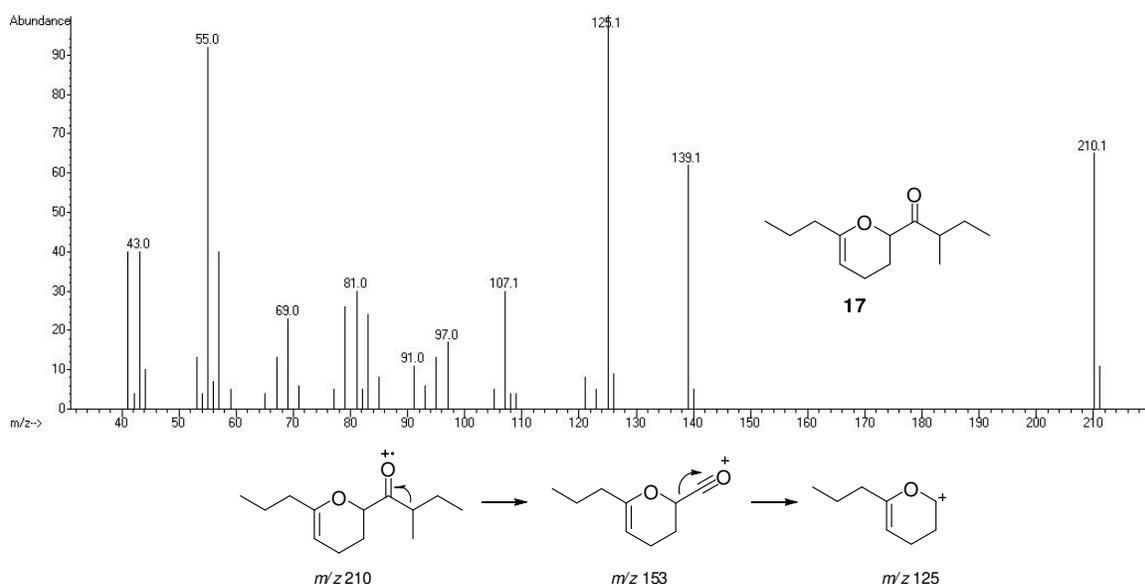


Figura 29. Espectro de massas do composto **17** e fragmentação proposta

O dímero **19**, por ocorrer juntamente com o composto majoritário metilex-1-en-3-ona (**3**) na secreção de *G. saprophilus*, teve sua estrutura correspondente ao dímero desta vinil cetona. O íon molecular de m/z 224, o fragmento intenso de m/z 139, correspondente à clivagem α carbonílica seguida de perda de CO, e o de m/z 181, que dá origem a um cátion alílico estável, estão de acordo com a estrutura

proposta (Figura 30). As estruturas dos dímeros **20** e **21** também foram atribuídas levando essas informações em consideração (Figura 31 e Figura 32).

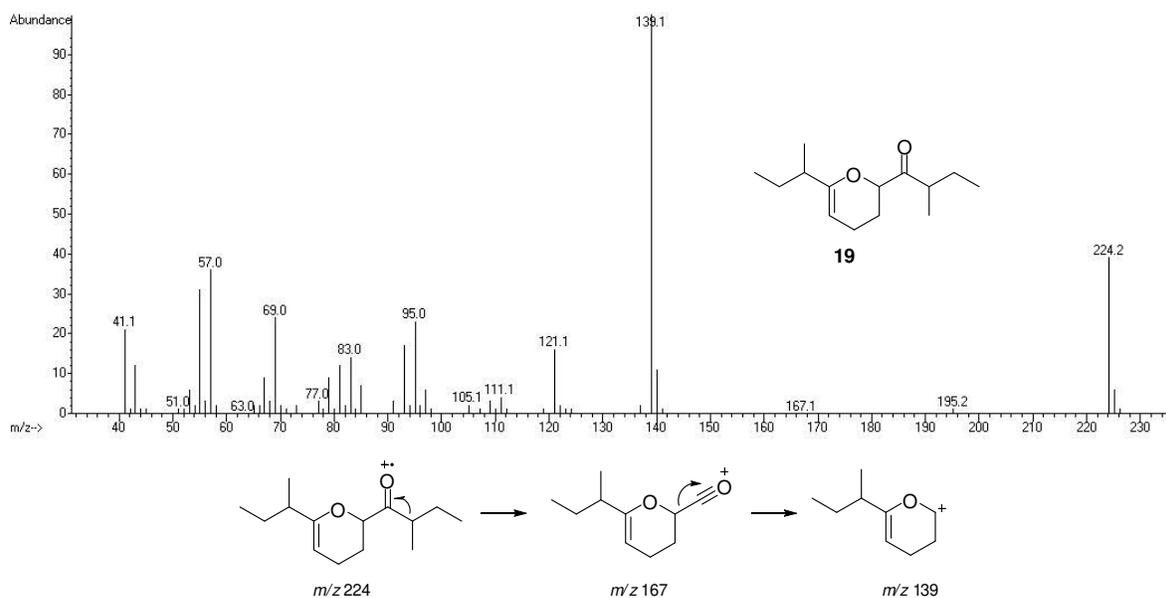


Figura 30. Espectro de massas do composto **19** e fragmentação proposta

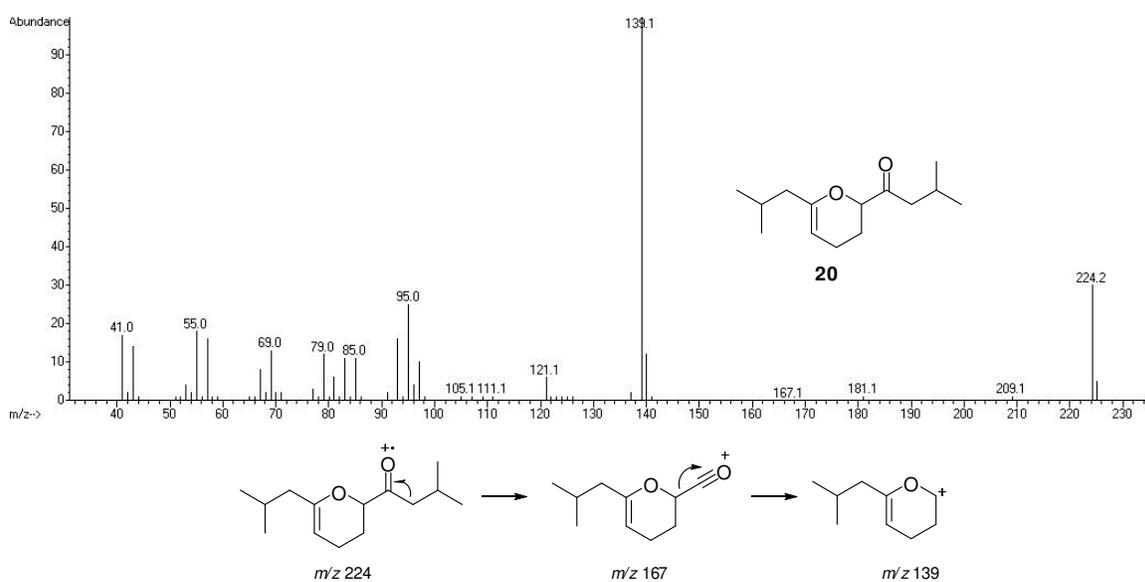


Figura 31. Espectro de massas do composto **20** e fragmentação proposta

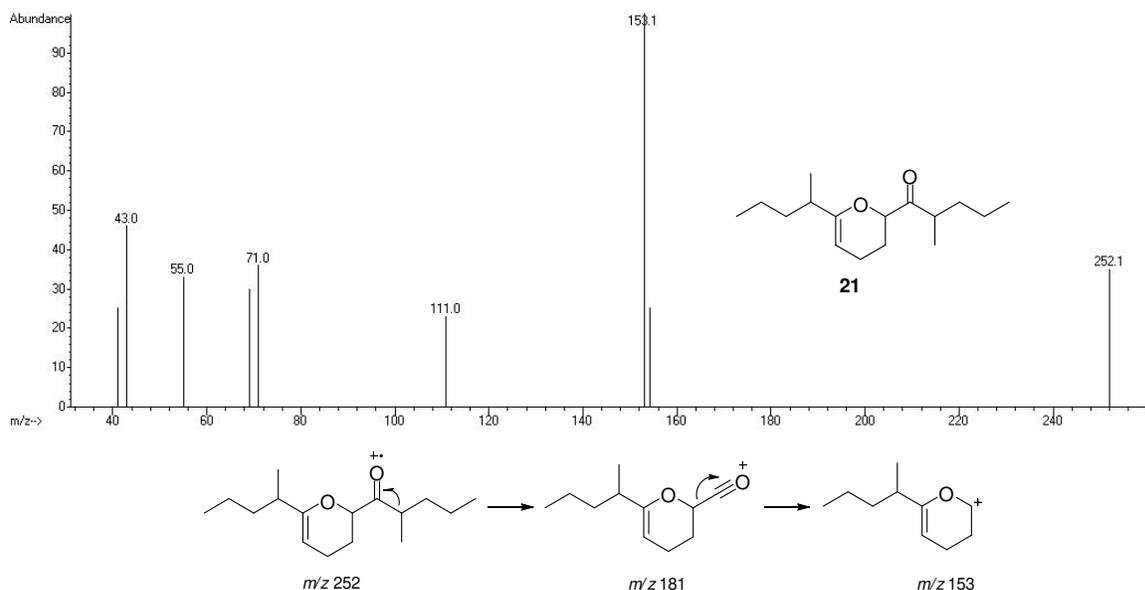


Figura 32. Espectro de massas do composto **21** e fragmentação proposta

A espécie *Sodreana sodreana* teve a composição de sua secreção descrita por Hara e colaboradores²⁷, os quais relataram a presença de 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona (**25**), (C₃H₉)-1,4-benzoquinonas e, como composto majoritário, 2,3-dimetil-1,4-hidroquinona (**31**), mas não foram identificadas cetonas.

3.1.3. Quinonas identificadas

Das dezoito espécies estudadas, nove apresentam 1,4-benzoquinonas como classe majoritária, sendo que algumas ainda apresentaram pequenas quantidades de cetonas e/ou hidroquinonas. A espécie *Magnispina neptunus* teve sua secreção analisada por RMN. Observa-se em todos os casos a ocorrência de misturas de quinonas.

A secreção de *M. neptunus* apresentou duas benzoquinonas, que foram caracterizadas através de RMN e dos dados de CG-EM como sendo 2-metil-1,4-benzoquinona (**22**) e 2-etil-1,4-benzoquinona (**23**) (Figura 33).



Figura 33. Cromatograma da secreção de *Magnispina neptunus*

Ambas as benzoquinonas apresentam os sinais dos íons moleculares (m/z 122 e 136) bastante intensos, bem como fragmentações características de quinonas, envolvendo perdas consecutivas de CO e/ou C_2H_2 (ou C_2R_2)⁴⁵ (Figura 34 e Figura 35). Um fragmento importante na determinação estrutural de alquil benzoquinonas é aquele de m/z 54, correspondente ao fragmento iônico ciclopropenona. Ambas as benzoquinonas **22** e **23** apresentam esse fragmento relativamente intenso, indicando que os grupos alquílicos estão restritos às posições 2 e 3. Além disso, no espectro de massas da quinona **23**, o fragmento correspondente à perda de m/z 15 (perda de $\cdot CH_3$) sugere a presença de um grupo etila, o qual foi confirmado através do espectro de RMN de 1H (um tripleto em δ 1,15 e um quarteto em δ 2,47). Pode-se observar também por RMN de 1H o acoplamento do hidrogênio da posição 3 de cada composto (**22** e **23**) com o grupo vizinho correspondente na posição 2 (Figura 36).

A estrutura da benzoquinona **22** também foi confirmada pela coinjeção das secreções com um padrão sintético desse composto cedido pelo Prof. Timothy Brocksom.⁴⁶

⁴⁵ Gross, J. H. *Mass Spectrometry – A Textbook* Heidelberg: Springer-Verlag, 2ª ed, 2011.

⁴⁶ Uliana, M.P.; Vieira, Y.W.; Donatoni, M.C.; Corrêa, A.G.; Brocksom, U.; Brocksom, T.J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, 19, 1484-1489.

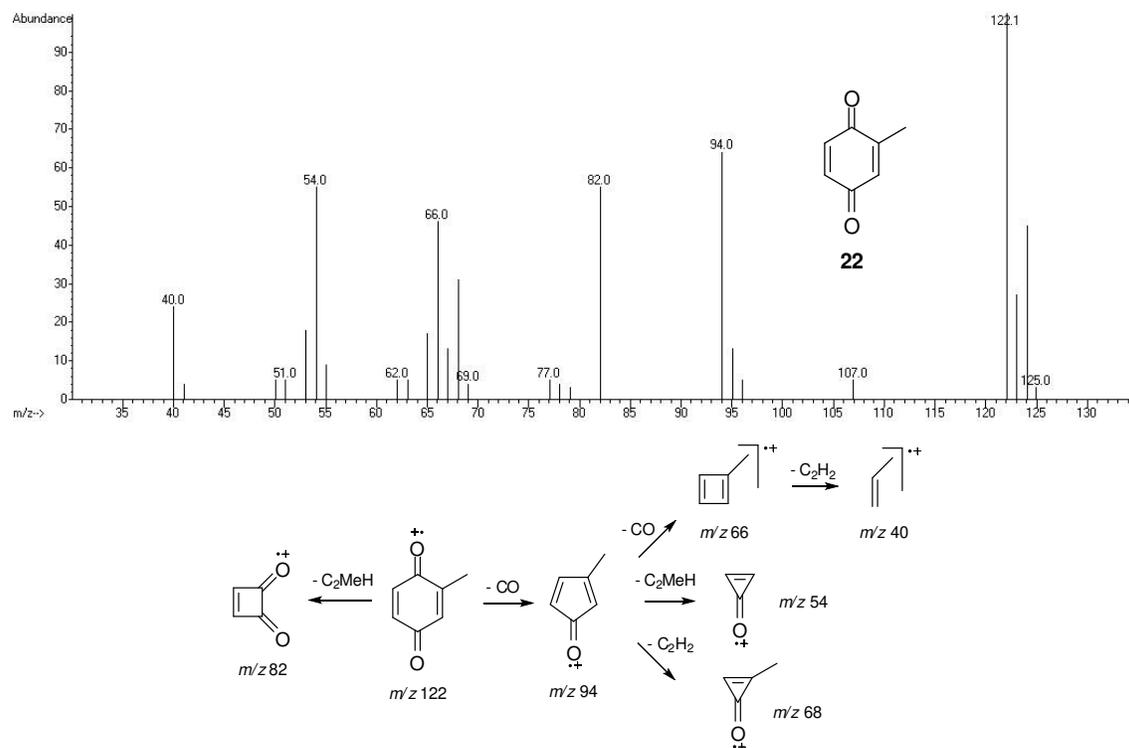


Figura 34. Espectro de massas do composto **22** e fragmentação proposta

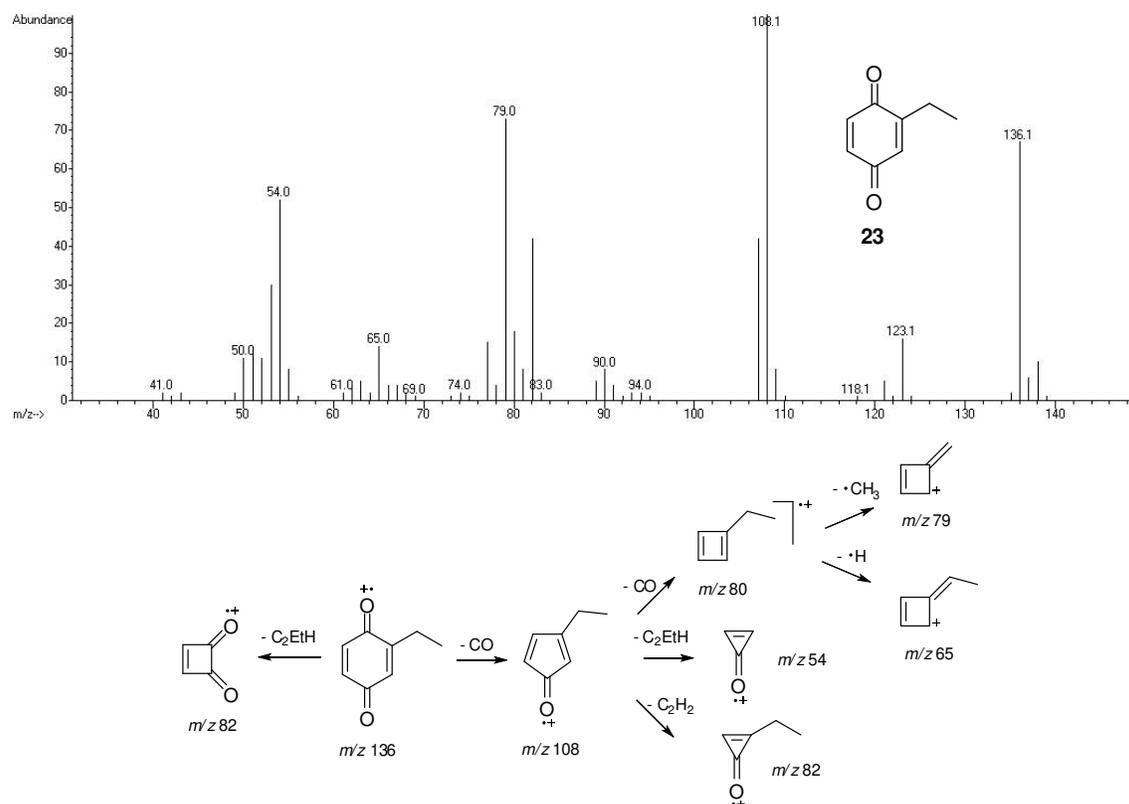
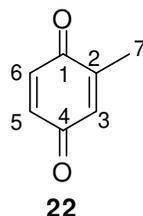


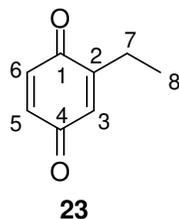
Figura 35. Espectro de massas do composto **23** e fragmentação proposta

Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 2-metil-1,4-benzoquinona (**22**) (CDCl₃, TMS, 400,13 MHz para RMN de ¹H, 100,61 MHz para RMN de ¹³C)



Posição	δ_H	δ_C	DEPT
1	-	-	-
2	-	-	-
3	6,62 (1H, m)	133,38	CH
4	-	-	-
5	6,71 (1H, dd, ³ J = 10 Hz; ⁴ J = 2,25 Hz)	136,62	CH
6	6,77 (1H, d, ³ J = 10 Hz)	136,52	CH
7	2,07 (3H, d, ⁴ J = 1,5 Hz)	15,84	CH ₃

Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 2-etil-1,4-benzoquinona (**23**) (CDCl₃, TMS, 400,13 MHz para RMN de ¹H, 100,61 MHz para RMN de ¹³C)



Posição	δ_H	δ_C	DEPT
1	-	187,89	-
2	-	150,89	-
3	6,57 (1H, m)	131,68	CH
4	-	187,52	-
5	6,71 (1H, dd, ³ J = 10 Hz; ⁴ J = 2,25 Hz)	136,82	CH
6	6,77 (1H, d, ³ J = 10 Hz)	136,28	CH
7	2,47 (2H, qd, ³ J = 7,5 Hz; ⁴ J = 1,5 Hz)	22,12	CH ₂
8	1,15 (3H, t, ³ J = 7,5 Hz)	11,61	CH ₃

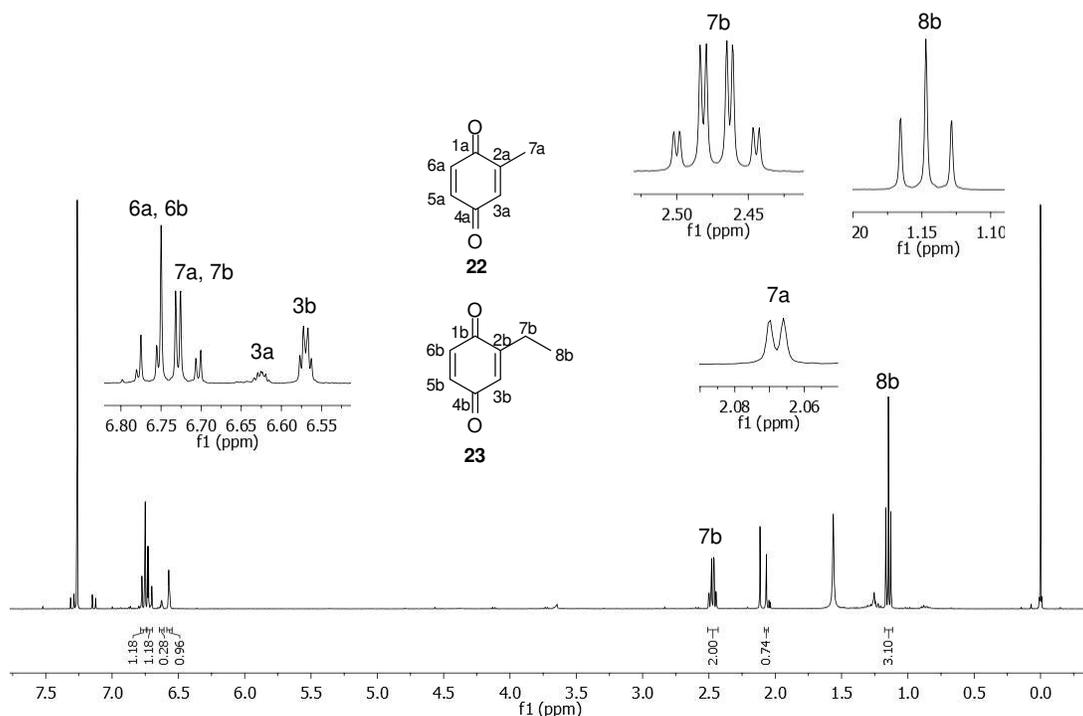


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (400,13 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *M. neptunus*

O composto 2,5-dimetil-1,4-benzoquinona (**24**) (Figura 37), encontrado nas secreções de *M. terrenus*, *P. paessleri* e *M. cuspidatus* teve sua identificação confirmada por coinjeção dessas secreções com um padrão sintético desse composto.

As substâncias 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona (**25**) e 2-etil-3-metil-1,4-benzoquinona (**26**) foram encontradas em oito das espécies estudadas e a identificação desses compostos foi feita a partir da comparação dos dados de espectrometria de massas (Figura 38 e Figura 39) com a literatura. Essas benzoquinonas foram identificadas previamente por técnicas de RMN e EM na secreção da espécie *Goniosoma longipes*⁴⁷.

⁴⁷ Pomini, A.M. 2006. *Semioquímicos produzidos por bactérias fitopatogênicas e opiliões brasileiros*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

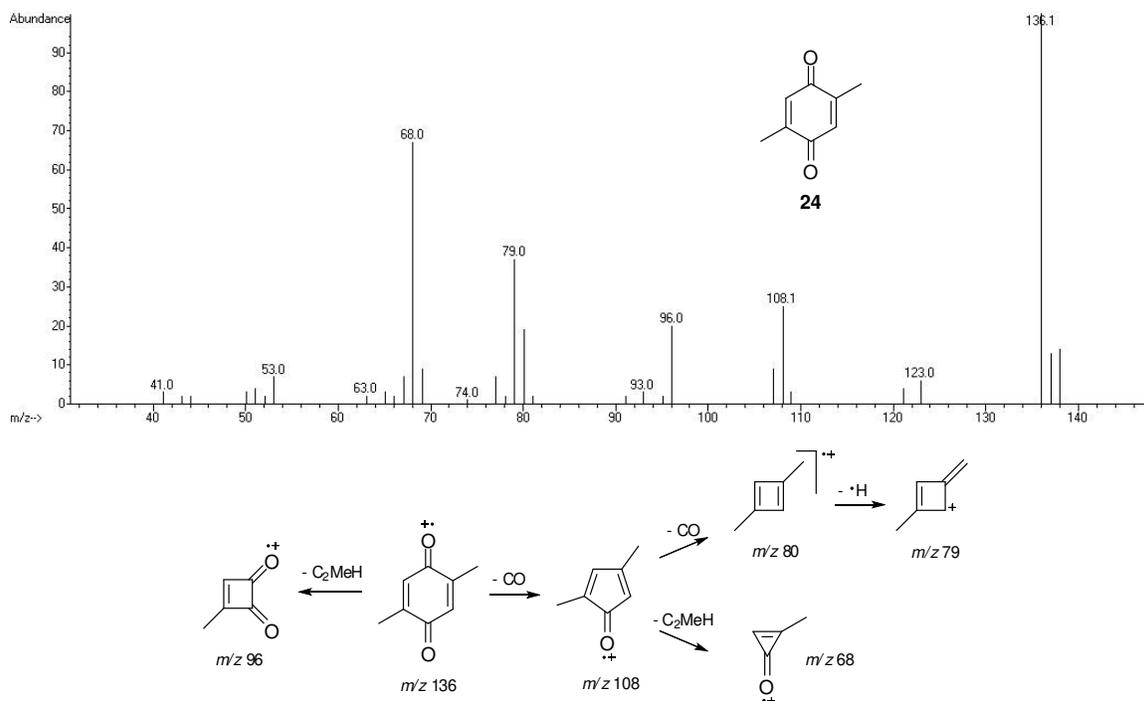


Figura 37. Espectro de massas do composto **24** e fragmentação proposta

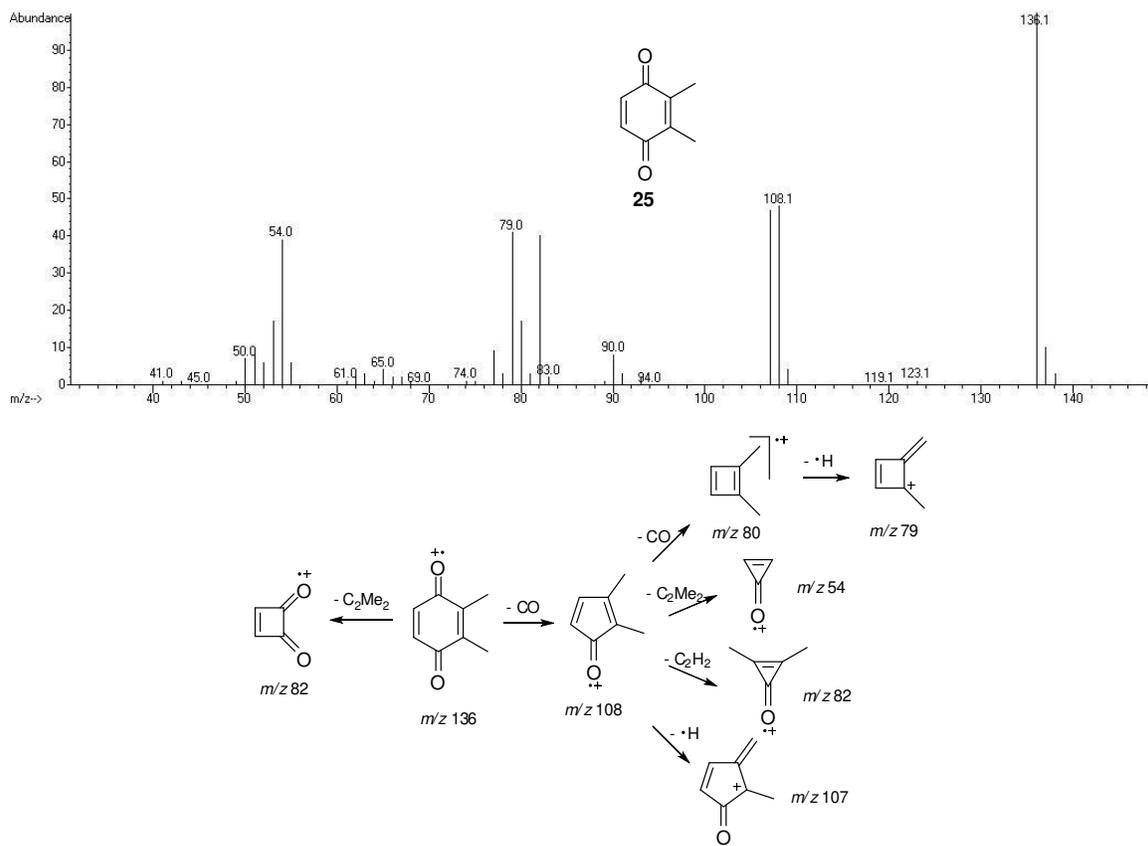


Figura 38. Espectro de massas do composto **25** e fragmentação proposta

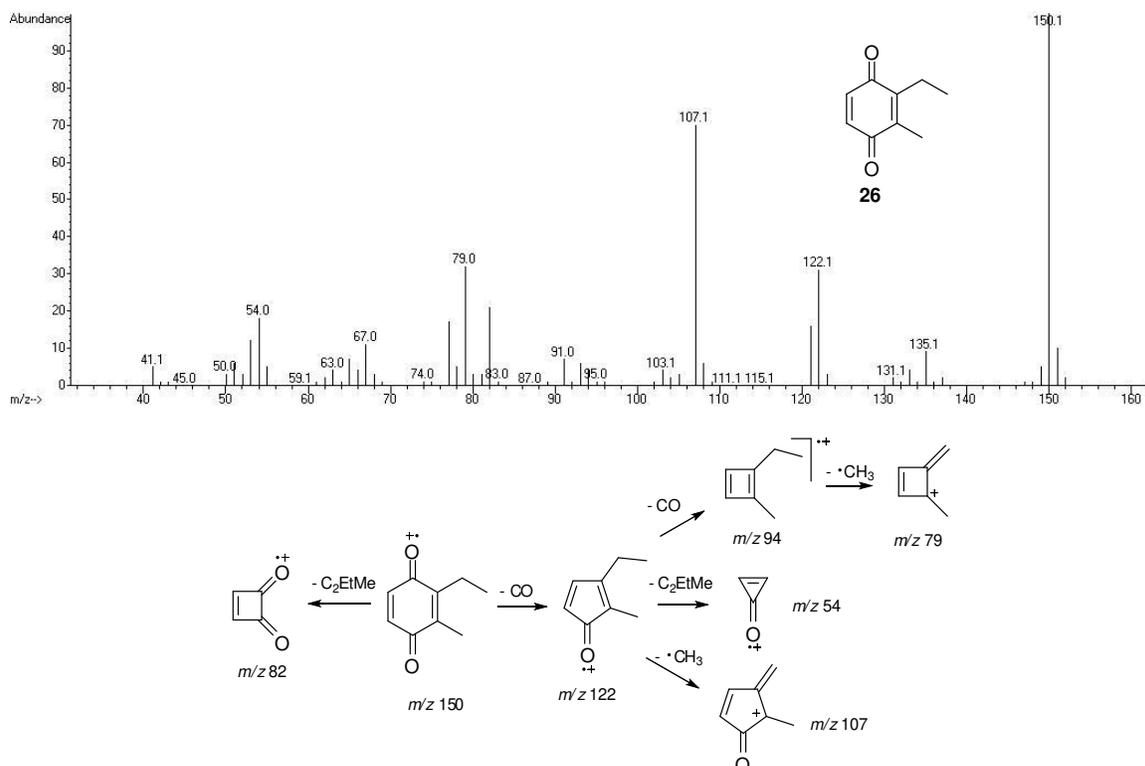


Figura 39. Espectro de massas do composto **26** e fragmentação proposta

A benzoquinona **27** foi encontrada nas secreções de *M. terrenus*, *M. cuspidatus* e *P. paessleri*. A partir dos dados de EM (Figura 40), pode ser proposta uma (C_3H_7) 1,4-benzoquinona, mas seus substituintes e o seu padrão de substituição não podem ser deduzidos conclusivamente. Analisando as benzoquinonas capazes de se originarem da rota biossintética proposta (item 3.1.1) e considerando a baixa intensidade do fragmento de m/z 54, esse composto pode ser identificado como 2-etil-5-metil-1,4-benzoquinona. Observa-se também a presença de um fragmento de m/z 135, correspondente a uma perda de metila que é facilitada na presença de um grupamento etil.

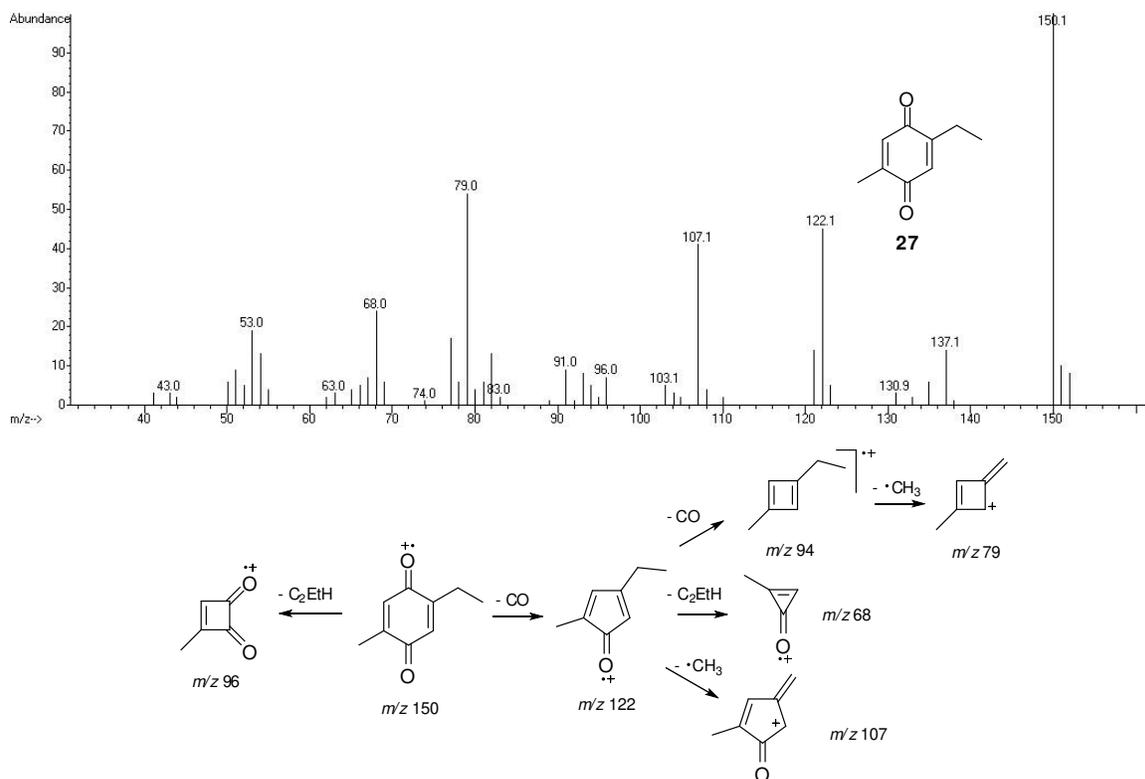


Figura 40. Espectro de massas do composto **27** e fragmentação proposta

De acordo com os dados de EM, a substância **28** também é uma (C₃H₇)-1,4-benzoquinona (Figura 41). O espectro de EM da 2,3,5-trimetil-1,4-benzoquinona presente na literatura⁴⁸ coincide com os dados espectrais do composto **28**, confirmando a sua identificação. É importante ressaltar que o espectro de massas deste composto também apresenta um pico relativamente intenso de m/z 54, mesmo este contendo substituintes nas posições 2, 3 e 5. Esse fragmento é resultante das perdas de duas unidades CO e uma unidade CHMe.

⁴⁸ Stenhagen, E.; Abrahamsson, S.; McLafferty, F.W. pp. 391 *Registry of Mass Spectral Data*, Vol. 1, New York: Wiley, 1974.

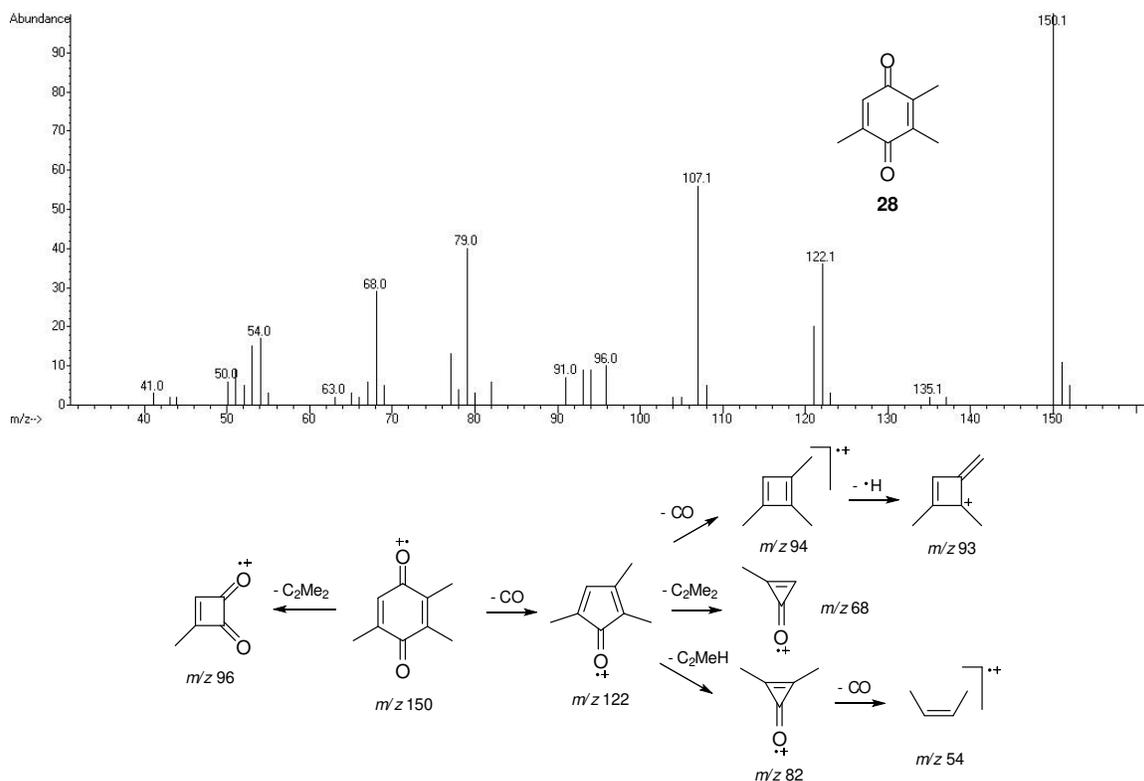


Figura 41. Espectro de massas do composto **28** e fragmentação proposta

O espectro de massas da substância **29** sugere que o mesmo é uma (C_4H_9) -1,4-benzoquinona (Figura 42). Levando em conta as possibilidades permitidas pela biossíntese e a ausência de um sinal de m/z 54 intenso, restam três possibilidades: 2-etil-3,5-dimetil-1,4-benzoquinona, 2-etil-3,6-dimetil-1,4-benzoquinona e 2-propil-5-metil-1,4-benzoquinona. Uma análise mais aprofundada dos dados de EM revela os fragmentos de m/z 93 e 107 relativamente intensos, os quais provavelmente se originam da fragmentação da 2-etil-3,5-dimetil-1,4-benzoquinona ou da 2-etil-3,6-dimetil-1,4-benzoquinona, as quais são as estruturas propostas para o composto **29**.

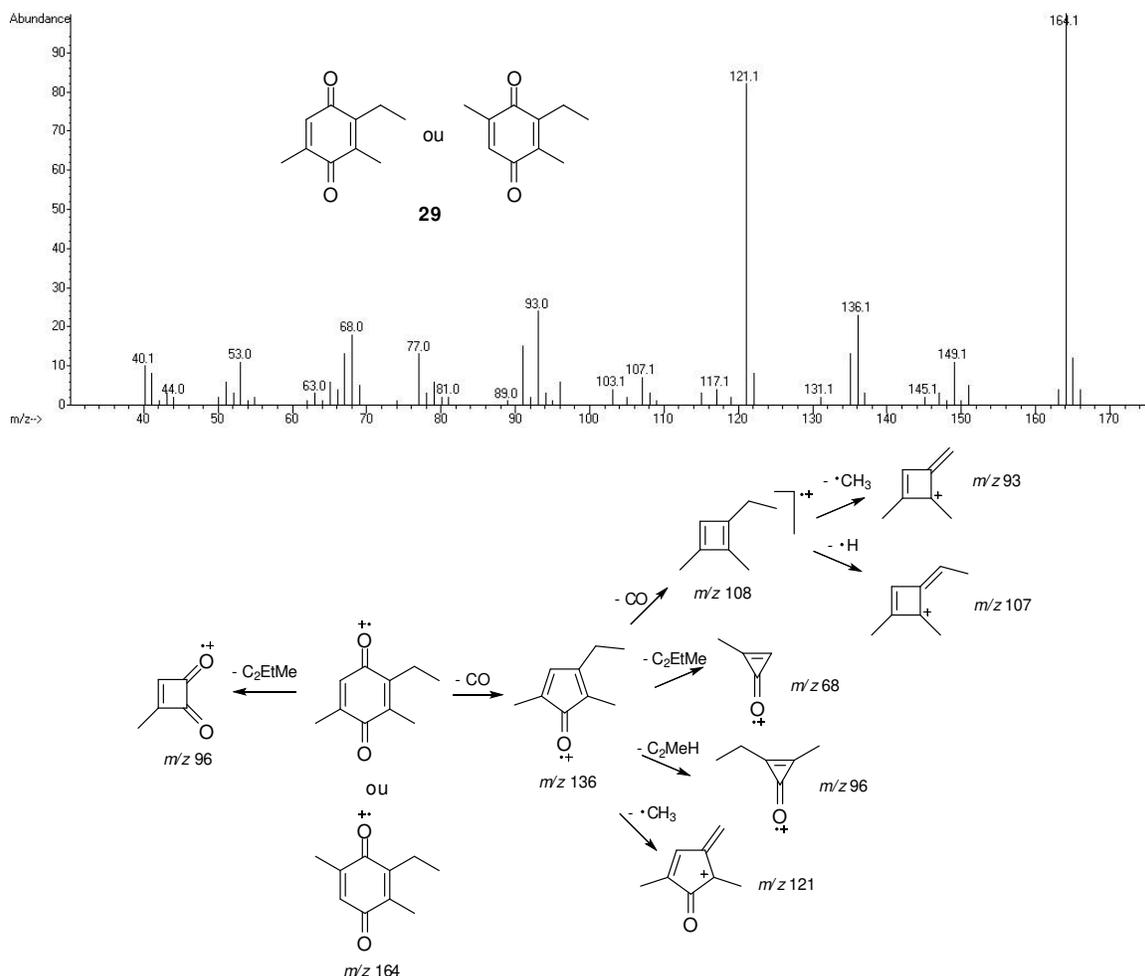


Figura 42. Espectro de massas do composto **29** e fragmentação proposta

Juntamente com as benzoquinonas, pequenas quantidades de hidroquinonas foram encontradas. Apesar de não ter sido possível sua identificação por RMN ou coinjeção com padrões, as hidroquinonas detectadas tiveram suas estruturas sugeridas com base nos dados de EM. A presença de fragmentos de m/z 77 e 91 característica de anéis aromáticos alquil substituídos e a m/z do íon molecular duas unidades a maior que as benzoquinonas análogas sugerem que se trata de hidroquinonas, além do fragmento resultante da perda de CO seguida por perda de $\cdot\text{H}$ observada em alguns desses compostos. Em todos os casos de ocorrência de hidroquinonas é possível observar que suas estruturas correspondem à(s) benzoquinona(s) majoritária(s) de cada secreção.

A 2-etil-1,4-hidroquinona (**30**), presente na espécie *C. inexpectabilis* apresenta estrutura similar a 2-etil-1,4-benzoquinona (**23**), composto majoritário dessa espécie. A presença do grupo etila é evidenciada pelo fragmento intenso correspondente a perda de metila (m/z 123), uma vez que esta representa uma clivagem de ligação benzílica (Figura 43).

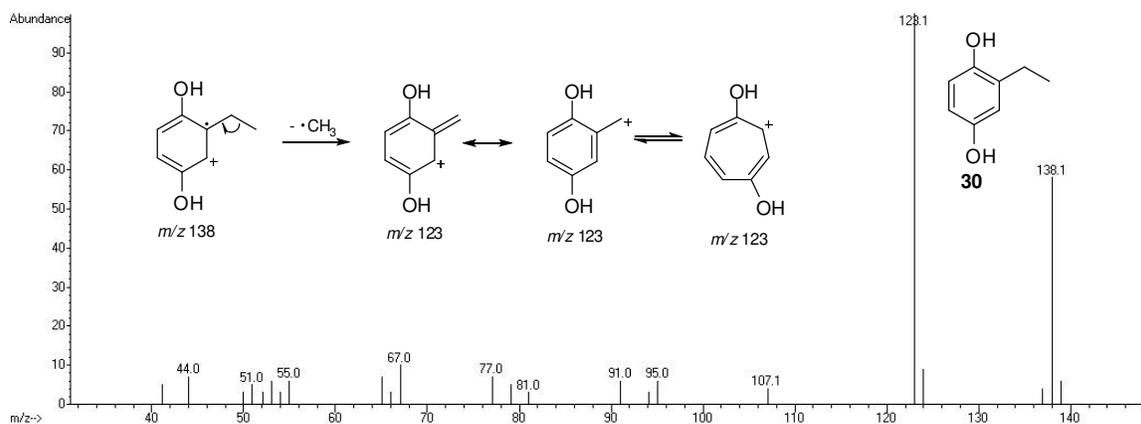


Figura 43. Espectro de massas do composto **30** e fragmentação proposta

A 2,3-metil-1,4-hidroquinona (**31**) (Figura 44) foi encontrada em cinco espécies, as quais apresentam a 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona (**25**) como componente em comum e majoritário. As demais hidroquinonas (**32** e **33**, Figura 45 e Figura 46) aparentemente apresentam a mesma substituição encontrada nas benzoquinonas majoritárias, o que pode reforçar a hipótese de que aquelas são precursoras das benzoquinonas (Esquema 5).

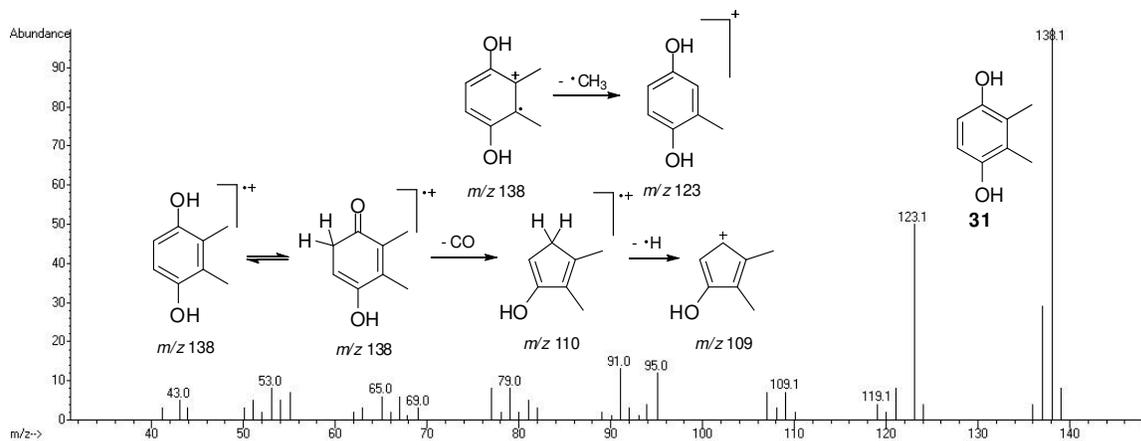


Figura 44. Espectro de massas do composto **31** e fragmentação proposta

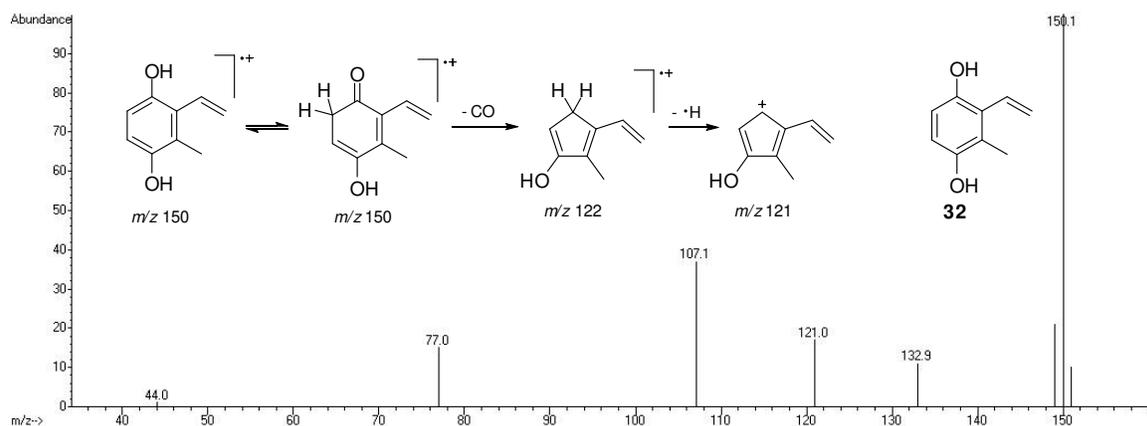


Figura 45. Espectro de massas do composto **32** e fragmentação proposta

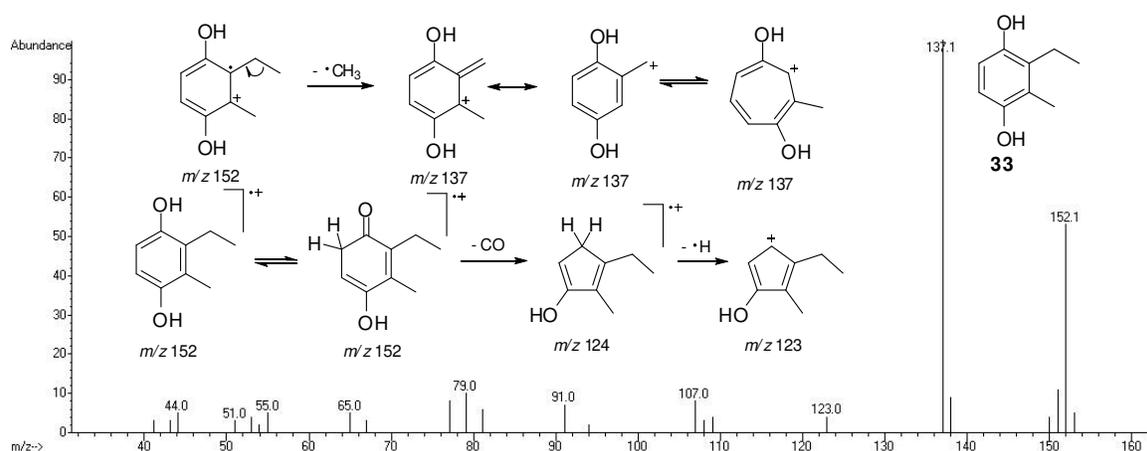


Figura 46. Espectro de massas do composto **33** e fragmentação proposta

A espécie *M. cuspidatus* já teve sua secreção estudada por Hara e colaboradores²⁷, que relatam a presença dos compostos **25** (46,8%) e **28** (3,4%), bem como a hidroquinona **31** com intensidade relativa de 41,5%, muito maior do que a encontrada neste trabalho, que foi de 0,9%. Esse fato poderia ser explicado pela possível oxidação de hidroquinonas para benzoquinonas durante o tempo entre a coleta e as análises. Porém, seriam necessários estudos comprovando se o tempo e as condições de estocagem entre a coleta e a análise das secreções podem influenciar significativamente a composição das mesmas.

Föttinger e colaboradores⁴⁹ analisaram a secreção de *P. paessleri* e relataram uma composição muito similar à descrita neste trabalho, com os compostos **24** (12%), **25** (40%), **26** (8%), **27** (1,5%), **28** (35%) e **29** (5%), mas sem a presença de cetonas e hidroquinonas.

3.1.4. Fenóis identificados

Dentre as dezoito espécies contempladas nesse trabalho, três apresentaram secreções compostas exclusivamente por fenóis. Uma dessas espécies (*Progonyleptoidellus striatus*) teve sua secreção analisada por RMN.

A partir dos dados de CG-EM e RMN, foi possível caracterizar os dois compostos mais abundantes da secreção de *P. striatus*: 2,5-dimetilfenol (**34**) e 2,3,6-trimetilfenol (**36**) (Figura 47).

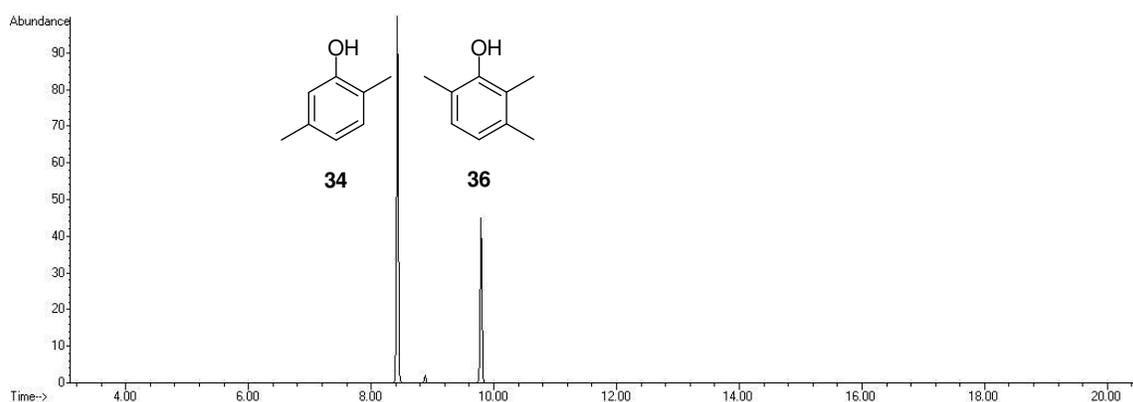


Figura 47. Cromatograma da secreção de *Progonyleptoidellus striatus*

Nos espectros de massas dos compostos **34** e **36** (Figura 48 e Figura 49) é possível observar os sinais dos íons moleculares (m/z 122 e 136) intensos, juntamente com os sinais correspondentes à perda de uma metila e os fragmentos de m/z 77 e 91 relativos a anéis aromáticos alquil substituídos.

As análises por RMN revelaram a presença de grupos metila como substituintes em ambos os compostos e as multiplicidades relativas aos hidrogênios aromáticos forneceram informações sobre os padrões de substituição

⁴⁹ Föttinger, P.; Acosta, L.E.; Leis, H.; Raspotnig, G. *J. Arachnol.* **2010**, 38, 584-587.

dos mesmos (Figura 50). No caso do composto **36**, no entanto, o padrão observado nos sinais de RMN de ^1H não permitiu distinguir entre o 2,3,6-trimetilfenol e o 2,3,4-trimetilfenol. Foi realizado um experimento de NOE diferencial irradiando os dois hidrogênios aromáticos em δ 6,66 e δ 6,86 alternativamente, observando-se um incremento de, respectivamente, 0,13% e 0,62% nos sinais das duas metilas vizinhas (posições 3 e 6 em δ 2,24 e δ 2,22 respectivamente), comprovando assim o padrão de substituição do 2,3,6-trimetilfenol (Figura 51) (devido à falta de seletividade na irradiação do hidrogênio em δ 6,66, a porcentagem de incremento observada de 0,13% não é precisa). Se o composto **36** fosse o 2,3,4-trimetilfenol, teria sido observado incremento em somente uma metila, uma vez que um dos hidrogênios seria vizinho ao grupo hidroxila e não estaria próximo espacialmente de nenhum grupo metila.

Hara e colaboradores²⁷ já haviam relatado a presença de 2,5-dimetilfenol (**34**) e 2,3,6-trimetilfenol (**36**) nessa mesma espécie de opilião (*Progonyleptoidellus striatus*). Entretanto, nesse trabalho a caracterização desses compostos foi feito com base em dados de espectrometria de massas, pelos quais é difícil inferir o padrão de substituição de alquilfenóis de forma conclusiva.

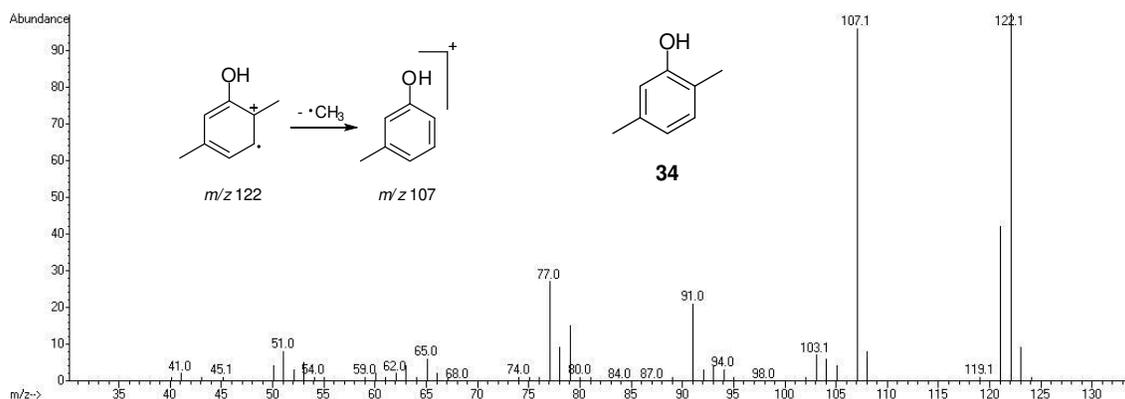


Figura 48. Espectro de massas do composto **34** e fragmentação proposta

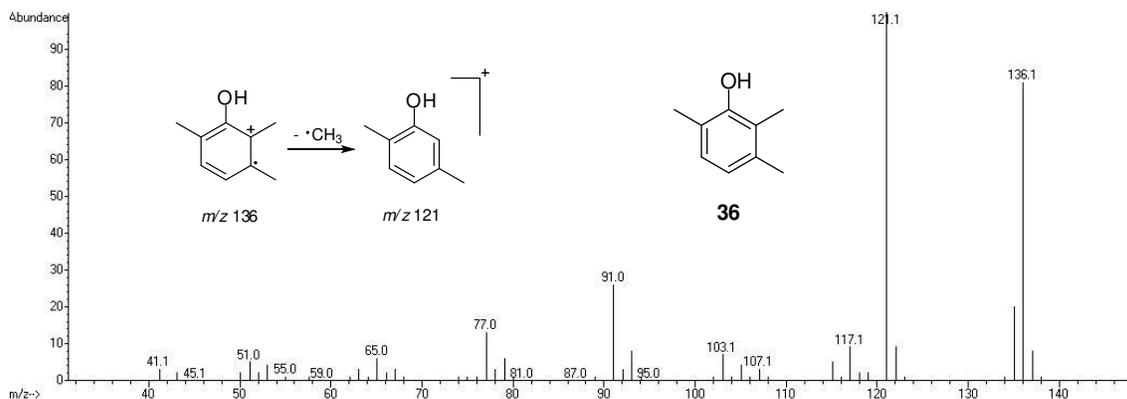
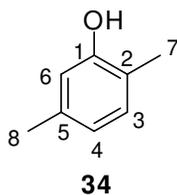


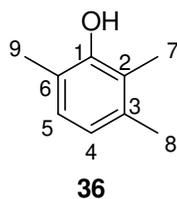
Figura 49. Espectro de massas do composto **36** e fragmentação proposta

Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 2,5-dimetilfenol (**34**) (CDCl_3 , TMS, 499,89 MHz para RMN de ^1H , 125,71 MHz para RMN de ^{13}C)



Posição	δ_{H}	δ_{C}	DEPT
1	-	153,78	-
2	-	120,60	-
3	6,99 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz)	130,96	CH
4	6,66 (1H, d, $^3J = 7,5$ Hz)	121,62	CH
5	-	137,28	-
6	6,60 (1H, s)	115,84	CH
7	2,20 (3H, s)	15,48	CH_3
8	2,27 (3H, s)	21,17	CH_3

Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN para a substância 2,3,6-trimetilfenol (**36**) (CDCl₃, TMS, 499,89 MHz para RMN de ¹H, 125,71 MHz para RMN de ¹³C)



Posição	δ_H	δ_C	DEPT
1	-	152,10	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	6,66 (1H, d, ³ J = 7,5 Hz)	121,93	CH
5	6,86 (1H, d, ³ J = 7,6 Hz)	127,59	CH
6	-	-	-
7	2,16 (3H, s)	11,87	CH ₃
8	2,24 (3H, s)	20,21	CH ₃
9	2,22 (3H, s)	16,06	CH ₃

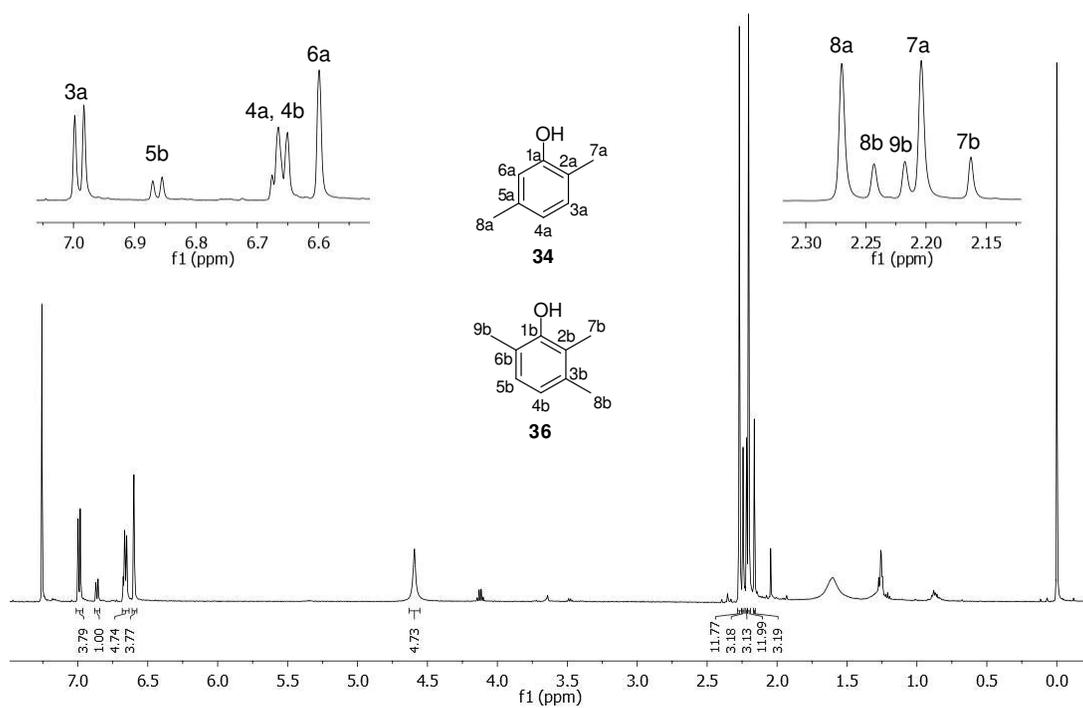


Figura 50. Espectro de RMN de ¹H (499,89 MHz, CDCl₃, TMS) da secreção de *P. striatus*

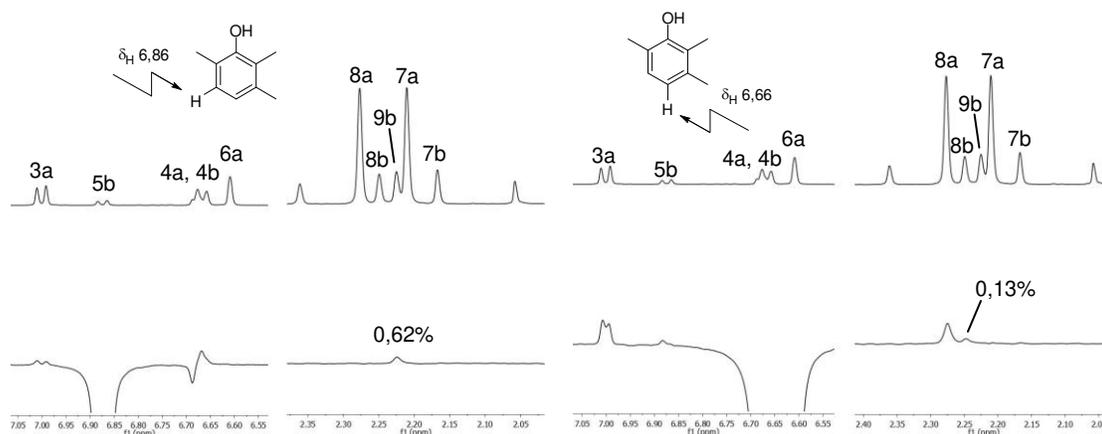


Figura 51. Experimento de NOE diferencial com a secreção de *P. striatus*

Não foi possível analisar o fenol **35** presente na secreção de *P. striatus* pelas técnicas de RMN devido a sua baixa concentração. O espectro de massas desse composto (Figura 52) é muito similar ao do 2,5-dimetilfenol, mesmo tendo um padrão de substituição diferente. Levando em conta a rota biossintética sugerida para esses fenóis (Esquema 5 e Esquema 6), foi proposta a estrutura 2,3-dimetilfenol para o composto **35**.

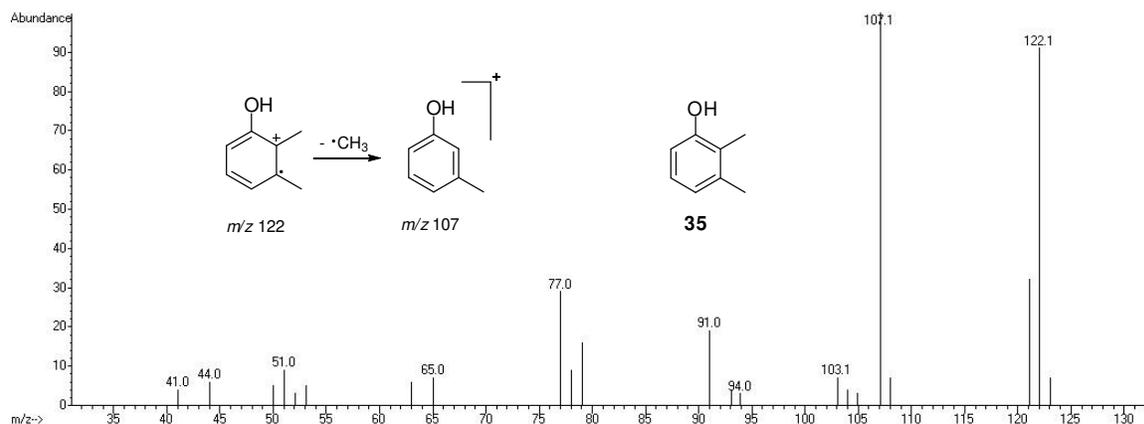


Figura 52. Espectro de massas do composto **35** e fragmentação proposta

A substância 2-metil-4-etilfenol (**37**) apresenta em seu espectro de massas o fragmento m/z 121 bastante intenso, correspondente à perda de uma metila por clivagem da ligação benzílica (Figura 53). A identidade desse composto foi

confirmada por coinjeção com uma amostra de secreção da espécie *Hoplobunus mexicanus*³², na qual o composto **37** já havia sido caracterizado por técnicas de RMN.

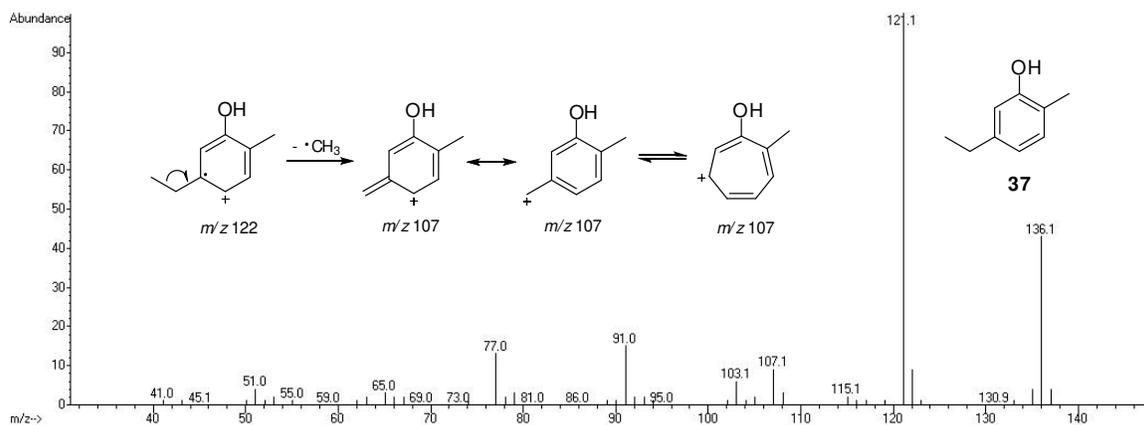


Figura 53. Espectro de massas do composto **37** e fragmentação proposta

Com base somente nos dados de EM, não foi possível sugerir uma estrutura o composto **38**, uma vez que o mesmo encontrou-se muito diluído na amostra analisada. A presença de um fragmento intenso de m/z 135 sugere um substituinte etila, devido à perda facilitada de um grupo metila, mas não dá informações sobre o padrão de substituição desse composto. A presença do íon molecular de m/z 150 sugere que a substância **38** é um (C_4H_9) -fenol (Figura 54).

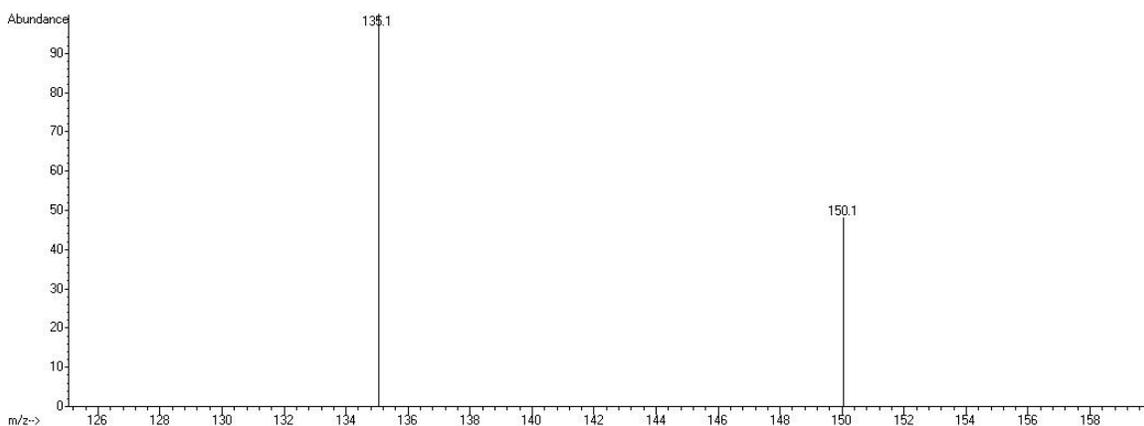


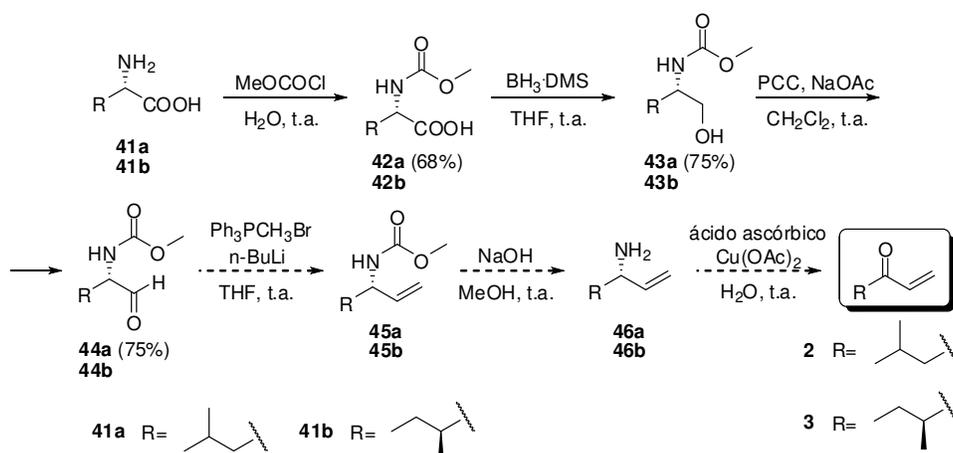
Figura 54. Espectro de massas do composto **38**

3.2. Síntese de 5-metilex-1-en-3-ona (2) e 4-metilex-1-en-3-ona (3)

Para a confirmação estrutural e determinação de estereoquímica, foi sugerida a síntese de duas vinil cetonas encontradas nas secreções de opiliões: 5-metilex-1-en-3-ona (2) e 4-metilex-1-en-3-ona (3). Foram propostas duas rotas sintéticas: uma a partir de aminoácidos e outra a partir de ácidos carboxílicos. A síntese das cetonas 2 e 3 foi feita em colaboração com a Dra. Caroline Gonçalves.

3.2.1. Rota para a obtenção de 2 e 3 a partir de aminoácidos

Primeiramente foi proposta uma rota para a obtenção das vinil cetonas 2 e 3, partindo dos aminoácidos L-leucina (41a) e L-isoleucina (41b), respectivamente (Esquema 9). A rota consiste em 6 etapas: (i) proteção do grupo amina com a formação do carbamato de metila⁵⁰; (ii) redução do ácido para álcool com borana; (iii) oxidação do álcool para aldeído com PCC; (iv) reação de Wittig para a formação do grupo vinila; (v) desproteção do grupo amina⁵¹; e (vi) transaminação oxidativa da amina, dando origem a uma carbonila⁵². Um aspecto atrativo dessa metodologia é que, quando aplicada usando a L-isoleucina como precursor, a configuração do centro quiral do aminoácido pode ser mantida, produzindo-se assim a vinil cetona enantiomericamente pura (4S)-4-metilex-1-en-3-ona.



Esquema 9. Rota sintética proposta para a obtenção das vinil cetonas 2 e 3 a partir de aminoácidos

⁵⁰ Itaya, T.; Mizutani, A.; Watanabe, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37(5), 1221-1225.

⁵¹ Yang, D.; Kim, S.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4715-4716.

⁵² Srogl, J.; Voltrova, S. *Org. Lett.* **2009**, 11, 843-845.

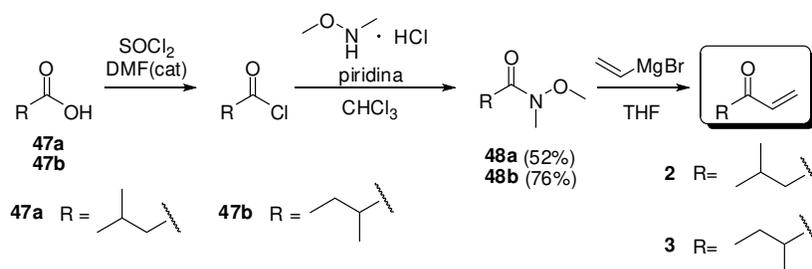
A rota foi empregada somente usando-se a L-leucina (**41a**), visando a obtenção da vinil cetona **2**. Os produtos **42a**, **43a** e **44a** foram obtidos com rendimentos moderados, observando-se a cada etapa as mudanças esperadas nos espectros de RMN: aparecimento do sinal correspondente à metoxila em δ 3,70 no espectro de RMN de ^1H do composto **42a**; desaparecimento do sinal do carbono carboxílico (δ 177,53) no RMN de ^{13}C do composto **43a**; e aparecimento dos sinais correspondentes ao aldeído (δ 9,60 no RMN de ^1H e δ 199,86 no RMN de ^{13}C) no composto **44a**.

Entretanto, após a reação de Wittig para a formação de **45a**, observou-se como produto o álcool **43a**. Uma possível explicação para o insucesso dessa etapa seria o fato de que o átomo de nitrogênio, embora protegido com o grupo carbamato, esteja ligado a um hidrogênio relativamente ácido capaz de ser retirado pelo ílideo de fósforo, impedindo assim o ataque nucleofílico deste à carbonila. Como possível solução para esse problema, a reação poderia ser feita novamente usando dois equivalentes de n-butilítio, promovendo assim a retirada do hidrogênio ácido do carbamato e a formação do ílideo de fósforo.

3.2.2. Rota para a obtenção de **2** e **3** a partir de ácidos carboxílicos

Devido aos problemas com a primeira rota proposta, foi sugerida uma nova rota sintética mais simples para a obtenção das vinil cetonas **2** e **3**, partindo do ácido 3-metilbutanóico (**47a**) e do ácido 2-metilbutanóico (**47b**), respectivamente. Essa rota sintética (Esquema 10) consiste em três etapas: (i) a formação do cloreto do ácido carboxílico; (ii) a obtenção da amida de Weinreb⁵³ a partir do cloreto do ácido; e (iii) a reação da amida de Weinreb com o brometo de vinilmagnésio. Optou-se pela alquilação da amida de Weinreb por esta permitir a inserção de somente um grupo alquila, impedindo assim a possível formação de alcoóis terciários resultantes da dialquilação.

⁵³ Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetr. Lett.*, **1981**, 22, 3815-3815.



Esquema 10. Rota sintética proposta para a obtenção das vinil cetonas **2** e **3** a partir de ácidos carboxílicos

As reações para a formação do cloreto de acila e da amida de Weinreb foram realizadas no mesmo frasco reacional. As amidas de Weinreb **48a** e **48b** foram purificadas por cromatografia em coluna, sendo recuperadas em 52% e 76% de rendimento, respectivamente, e tiveram suas estruturas confirmadas por RMN. As amidas apresentaram nos espectros de RMN de ^1H os singletos correspondentes às metilas ligadas aos átomos de nitrogênio (δ 3,18 em **48a** e δ 3,19 em **48b**) e oxigênio (δ 3,68 em **48a** e δ 3,69 em **48b**).

O brometo de vinilmagnésio foi sintetizado a partir da reação entre magnésio metálico e brometo de vinila e foi imediatamente adicionado ao balão contendo a amida de Weinreb correspondente. As vinil cetonas **2** e **3** foram obtidas juntamente com impurezas, e não foi possível purificá-las devido a volatilidade das mesmas.

Mesmo com os compostos não purificados, foi possível confirmar a identidade dessas cetonas a partir dos dados de espectrometria de massas. Através de análises de CG-EM e coinjeções com as secreções naturais de opiliões, confirmou-se a presença das vinil cetonas **2** e/ou **3** em sete espécies. Análises de CG-DIC com coluna quiral também permitiram verificar que as secreções naturais de cinco espécies apresentam a cetona **3** na forma enantiomericamente pura (ver item 3.1.2).

A metodologia proposta pode ser aplicada utilizando-se o ácido (2S)-2-metilbutanóico ((2S)-**47b**) como precursor, obtendo-se assim a cetona (4S)-**3** enantiomericamente pura. A obtenção desse composto permitirá determinar a

estereoquímica da cetona **3** presente nas secreções de opiliões analisadas neste trabalho.

Com a purificação das vinil cetonas **2** e **3** será possível prosseguir com a síntese dos dímeros correspondentes (**20** e **19**) usando métodos já descritos na literatura.³³ A obtenção desses dímeros e sua posterior caracterização e determinação da estereoquímica são importantes uma vez que os mesmos são compostos inéditos e constituem uma nova classe presente em secreções defensivas de opiliões. Além disso, a obtenção desses dímeros permitirá testar a atividade repelente dos mesmos em relação aos seus monômeros, o que pode trazer informações sobre a evolução dessa classe de compostos nas secreções dessas espécies.

3.3. Atividade antimicrobiana de componentes das secreções

Considera-se que as secreções glandulares de opiliões apresentam função defensiva, sendo que a ação repelente da secreção de algumas espécies já foi verificada frente a predadores.^{18,19,30,34} Porém, a dieta e os hábitos de opiliões em geral também podem ocasionar sua exposição a diversos micro-organismos patogênicos. São escassos os estudos na literatura que investigam a ação de secreções de opiliões ou seus componentes frente a micro-organismos^{20,37}. Portanto, foi sugerida a realização de testes para verificar a ação de alguns compostos das espécies aqui estudadas contra bactérias Gram positivas (*Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis*), Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) e leveduras (*Candida albicans* e *Rhodotorula glutinis*). Foram realizados dois ensaios para verificar a atividade antimicrobiana dos compostos testados: difusão em disco e microdiluição em caldo.

Foram usados padrões sintéticos de quatro substâncias representativas das classes de compostos encontrados nas espécies estudadas nesse trabalho: 2-metil-1,4-benzoquinona (**16**), 2,5-dimetil-1,4-benzoquinona (**18**), 2,5-dimetilfenol (**25**) e 1-hepten-3-ona (**39**). Nos testes de difusão em disco, foi usado também uma amostra sintética do dímero (**40**) da 1-hepten-3-ona, presente na secreção de

*Iporangaia pustulosa*³³ (Figura 55). Em ambos os testes foram usados padrões de antibióticos como controle positivo: cloranfenicol 4 mg/mL para bactérias e ciclopirox olamina 10 mg/mL para leveduras (Figura 56). Os testes de atividade antimicrobiana foram feitos em colaboração com a Dra. Dávila Zampieri.

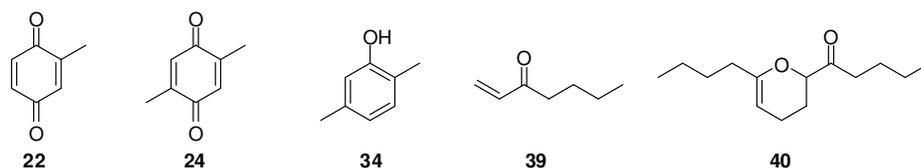


Figura 55. Compostos testados nos ensaios de atividade antimicrobiana

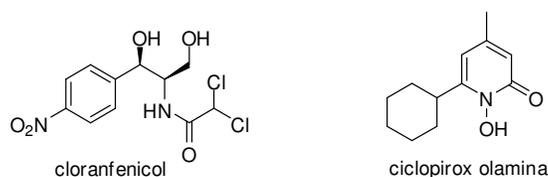


Figura 56. Padrões antibióticos utilizados como controle positivo: cloranfenicol para bactérias e ciclopirox olamina para leveduras

3.3.1. Difusão em disco:

O teste de difusão em disco é essencialmente qualitativo e baseia-se na aplicação das substâncias a serem testadas em discos de papel, os quais são colocados sobre a superfície de um meio de cultura inoculado com o micro-organismo. Os compostos aplicados nos discos de papel se difundem através do meio sólido. O micro-organismo cresce até encontrar um limiar de concentração da amostra que não permite o seu desenvolvimento, o que é caracterizado pela ausência de crescimento ao redor do disco (halo de inibição). O diâmetro dos halos de inibição é usado como indicador da atividade antimicrobiana da amostra testada (Figura 57).

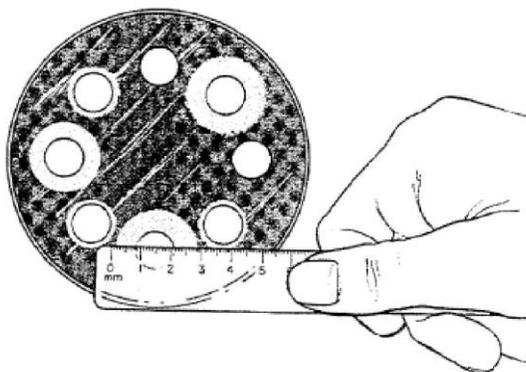


Figura 57. Leitura do teste de difusão em disco

Neste ensaio foram usadas as bactérias *B. subtilis* e *P. aeruginosa* e as leveduras *C. albicans* e *R. glutinis*. Para os compostos **22**, **34** e **47** foram testadas concentrações de 24, 18, 12 e 6 mg/mL, para o composto **24**, as concentrações de 12 e 6 mg/mL e para o composto **48**, somente a concentração de 26 mg/mL. Em cada disco foi adicionado 5 μ L da solução de amostra a ser testada. Os diâmetros dos halos de inibição formados estão descritos na Tabela 8. Algumas das placas feitas durante a realização deste teste são mostradas na Figura 58.

Nas placas da bactéria *B. subtilis* a visualização dos halos foi dificultada pela pequena quantidade de células. No teste com a cetona 47 com esse micro-organismo não foi possível visualizar os halos de inibição formados.

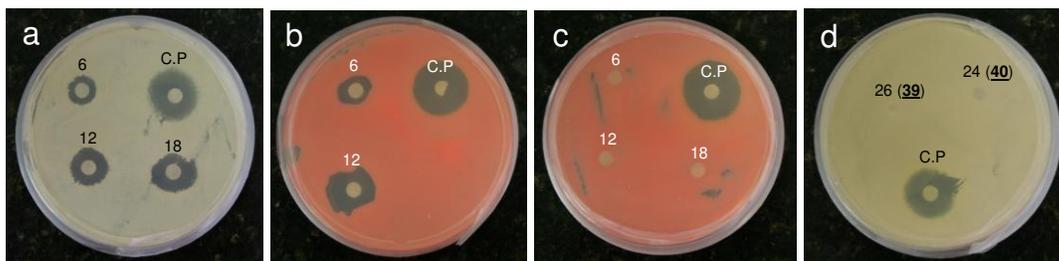
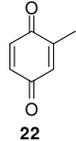
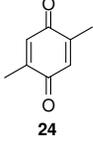
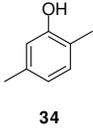
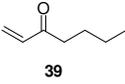
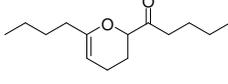


Figura 58. Placas do teste de difusão em disco (as concentrações estão indicadas na figura): (a) composto **22** frente a *C. albicans*; (b) composto **24** frente a *R. glutinis*; (c) composto **34** frente a *R. glutinis*; (d) compostos **39** e **40** frente a *C. albicans* (o número dos compostos está indicado entre parênteses na figura)

Tabela 8. Diâmetro dos halos de inibição (cm) do teste de difusão em disco

Composto	Conc. (mg/mL)	Micro-organismo			
		<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>R. glutinis</i>
 22	6	2,4	-	1,0	1,5
	12	2,6	1,5	1,4	1,8
	18	2,7	2,2	1,7	2,3
	24	3,0	2,2	1,6	2,3
	Controle	1,2	2,3	2,0	2,7
 24	6	2,2	3,0	0,7	1,0
	12	2,5	3,0	1,1	1,3
	Controle	1,8	3,0	2,0	2,1
 34	6	-	-	-	-
	12	-	0,7	-	-
	18	-	0,7	-	-
	24	-	0,9	-	-
	Controle	-	2,4	-	-
 39	6	-	-	-	-
	12	*	-	-	-
	18	-	-	-	-
	24	-	-	-	1,3
 40	26	-	-	-	-
	Controle	2,5	2,5	2,0	2,8

* Não foi possível visualizar e medir os halos de inibição.

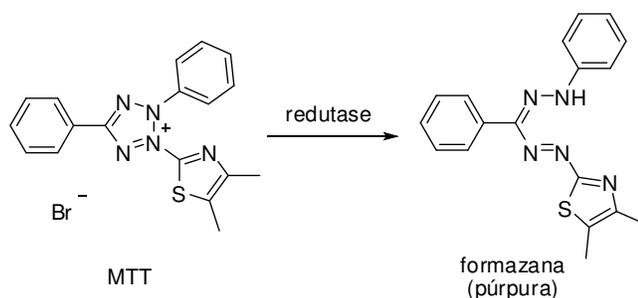
De maneira geral, os resultados mostram que os compostos que apresentaram maior atividade frente aos micro-organismos testados foram as benzoquinonas **22** e **24**. Esses compostos apresentaram atividade contra todos os micro-organismos testados, apresentando em alguns casos halos de inibição maiores que os dos antibióticos usados como controle positivo.

O fenol **34** apresentou uma pequena atividade inibitória contra a bactéria *P. aeruginosa*, e nenhuma frente aos demais micro-organismos testados. A cetona **39** apresentou somente ação antimicrobiana contra a levedura *R. glutinis* na maior concentração testada. O dímero (**40**) de **39** foi testado em uma concentração similar a mais alta na qual os demais compostos foram testados e não apresentou atividade inibitória frente a nenhum dos micro-organismos testados.

3.3.2. Microdiluição em caldo

O método de microdiluição em caldo consiste na diluição das substâncias a serem testadas em meio de cultura líquido inoculado com o micro-organismo teste. São testadas várias concentrações da amostra em microplacas de 96 poços e, após incubação, verifica-se em quais poços o micro-organismo foi inibido. Esse ensaio quantitativo permite a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de uma substância, isto é, a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento do micro-organismo em estudo.

O crescimento do micro-organismo é verificado pela adição de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) aos poços individuais. Esse composto pode sofrer a ação de redutases presentes em células vivas formando uma formazana que apresenta cor púrpura intensa (Esquema 11). Dessa maneira, o aparecimento da cor púrpura é um indicativo da viabilidade celular e nos poços onde essa coloração não se manifesta, houve inibição do micro-organismo.⁵⁴



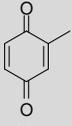
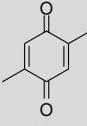
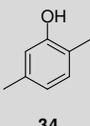
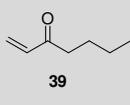
Esquema 11. Reação de redução do MTT com formação da formazana

O ensaio de microdiluição em caldo foi realizado com as bactérias *B. pumilus* e *P. aeruginosa* e com as leveduras *C. albicans* e *R. glutinis*. Foram testados os compostos **22**, **24**, **34** e **39** nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL para bactérias e nas concentrações de 500, 250, 125 e 82,5 µg/mL para leveduras, uma vez que as bactérias mostraram-se mais resistentes no ensaio de difusão em disco. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM)

⁵⁴ Hostettmann, K.; Queiroz, E.F.; Vieira, P.C. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. São Carlos: EdUFSCar, 2003.

encontrados estão descritos na Tabela 9. As microplacas usadas para a realização do teste são mostradas nas Figura 59, Figura 60, Figura 61 e Figura 62.

Tabela 9. Valores de CIM para os compostos testados

Micro-organismo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	 22	 24	 34	 39
<i>B. pumilus</i>	<125	<125	250	<125
<i>P. aeruginosa</i>	<125	<125	1000	500
<i>C. albicans</i>	125	<82,5	>500	>500
<i>R. glutinis</i>	<82,5	<82,5	<82,5	<82,5

Pode-se observar nos poços contendo a benzoquinona **22** o surgimento de uma cor alaranjada quando o mesmo entra em contato com o micro-organismo, enquanto o mesmo não ocorre com nenhum outro dos compostos testados. Isso pode estar ligado ao próprio mecanismo de toxicidade desse composto. O composto **24** também é uma benzoquinona e, provavelmente, apresenta o mesmo mecanismo de toxicidade. Entretanto essa mudança na coloração não ocorre, talvez devido ao seu maior impedimento estérico em relação ao composto **22**.

Os resultados de CIM apresentados na Tabela 9 mostram que as benzoquinonas **22** e **24** apresentaram maior atividade antimicrobiana, o que está de acordo com os resultados do teste de difusão em disco. Essas benzoquinonas mostram forte ação antimicrobiana frente a todos os micro-organismos testados e, na maioria dos casos, o valor de CIM encontra-se abaixo da faixa testada.

A cetona **39** apresenta atividade antimicrobiana intermediária, mostrando baixos valores de CIM para *B. pumilus* e *R. glutinis*, mas valores altos para *P. aeruginosa* e *C. albicans*. O fenol **35** mostrou-se o menos ativo frente aos micro-organismos testados, apresentando baixos valores de CIM somente frente a *R. glutinis*.

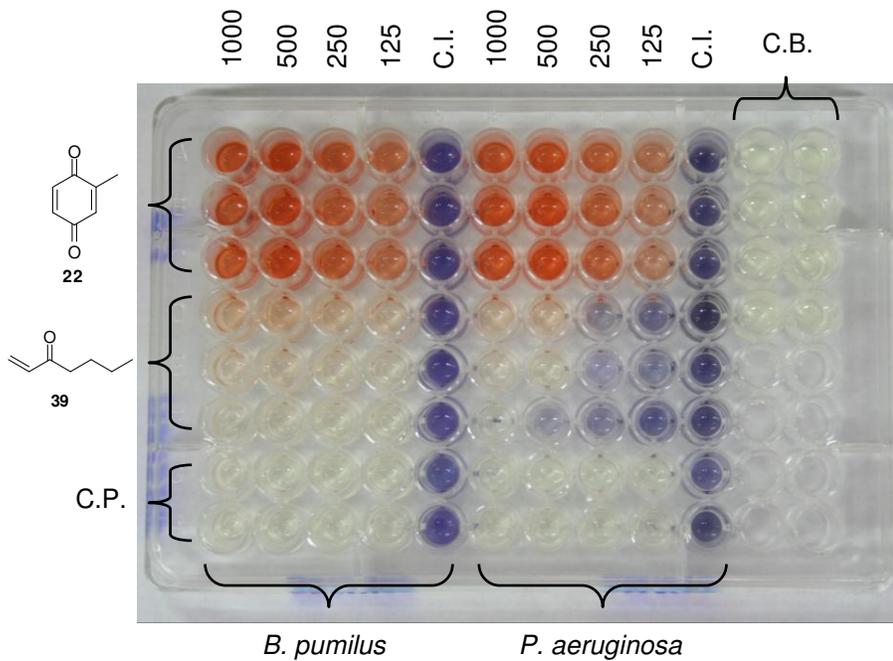


Figura 59. Placa mostrando as CIMs dos compostos **22** e **47** frente a bactérias (concentrações de 1000 a 125 µg/mL; C.P.: controle positivo; C.I.: controle do inóculo; C.B.: controle branco)

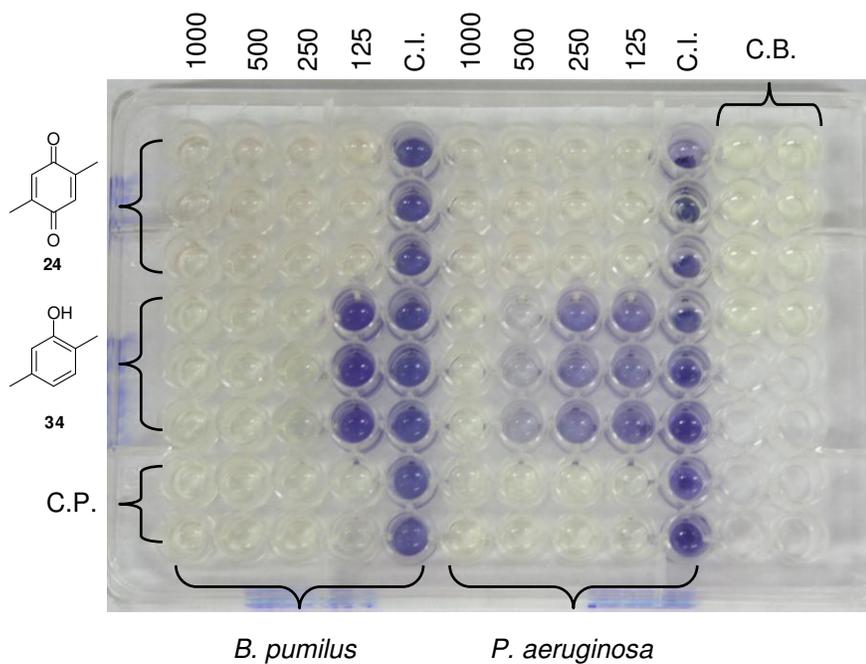


Figura 60. Placa mostrando as CIMs dos compostos **24** e **34** frente a bactérias (concentrações de 1000 a 125 µg/mL; C.P.: controle positivo; C.I.: controle do inóculo; C.B.: controle branco)

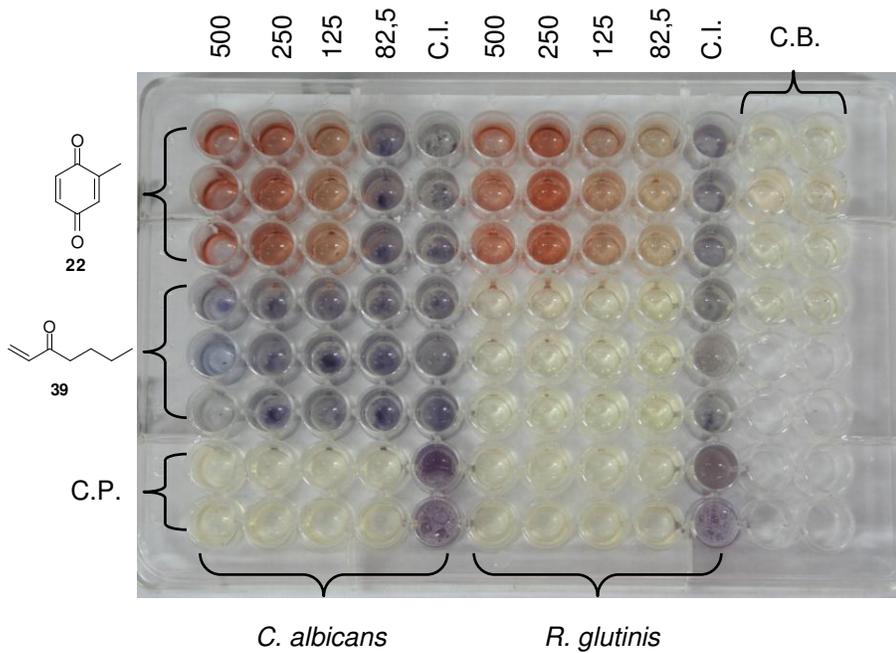


Figura 61. Placa mostrando as CIMs dos compostos **22** e **47** frente a leveduras (concentrações de 500 a 82,5 µg/mL; C.P.: controle positivo; C.I.: controle do inóculo; C.B.: controle branco)

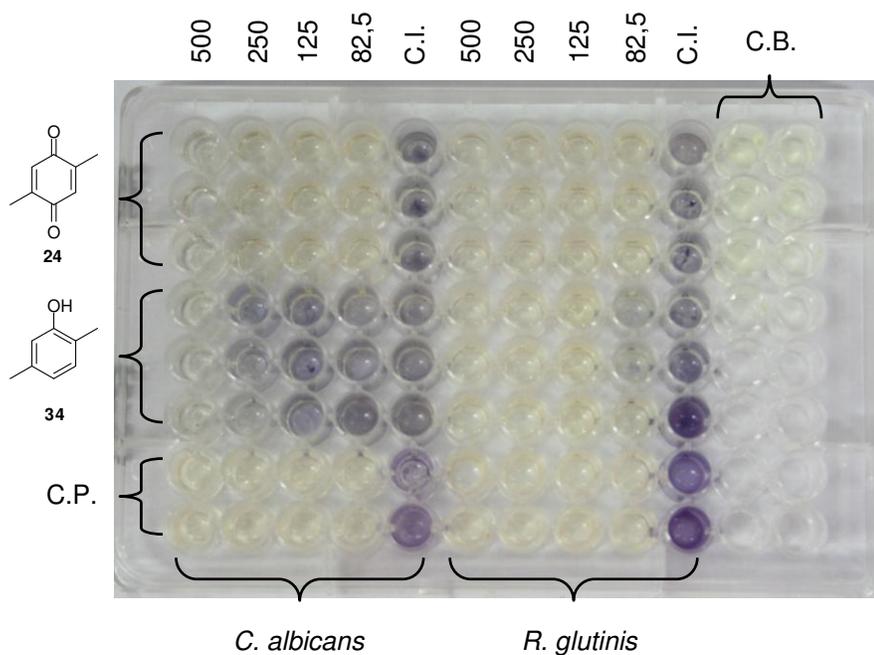


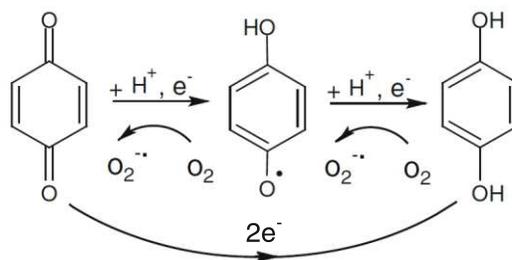
Figura 62. Placa mostrando as CIMs dos compostos **24** e **34** frente a leveduras (concentrações de 500 a 82,5 µg/mL; C.P.: controle positivo; C.I.: controle do inóculo; C.B.: controle branco)

Analisando os resultados obtidos em relação aos organismos, constata-se que a levedura *R. glutinis* é menos resistente em relação a *C. albicans*, apresentando inibição do crescimento com as menores concentrações testadas de todos os compostos usados. Dentre as bactérias, observa-se que *B. pumilus*, uma bactéria Gram positiva é menos resistente comparado a *P. aeruginosa*, uma bactéria Gram negativa. Possivelmente a presença de uma membrana externa em bactérias Gram negativas seja a responsável pela maior resistência de *P. aeruginosa* aos compostos aqui testados.

3.3.3. Mecanismos de toxicidade de quinonas, cetonas e fenóis

Os mecanismos de citotoxicidade de quinonas estão ligados à alta reatividade das mesmas, e seus efeitos biológicos podem ser atribuídos a duas das suas propriedades químicas: (i) possibilidade de reações reversíveis de oxidação-redução e (ii) caráter eletrofílico.⁵⁵

Em sistemas biológicos, as quinonas podem sofrer redução de um ou dois elétrons por redutases celulares, formando, respectivamente, semiquinonas e hidroquinonas (Esquema 12). As semiquinonas radicalares podem ser oxidadas em condições aeróbias à quinona inicial gerando o ânion radical superóxido (O_2^-). Em meio aquoso, a reação de semiquinonas com oxigênio molecular gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, na presença de ferro, forma radicais hidroxila ($\cdot OH$) altamente reativos. A toxicidade de quinonas pode ser atribuída à formação dessas espécies reativas de oxigênio.⁵⁵



Esquema 12. Redução de um ou dois elétrons de quinonas⁵⁵

⁵⁵ El-Najjar, N.; Gali-Muhtasib, H.; Ketola, R.A.; Vuorela, P.; Urtti, A.; Vuorela, H. *Phytochem. Rev.* **2011**, 10, 353-370.

Devido à conjugação de ligações duplas com grupos carbonila, as quinonas também apresentam caráter eletrofílico, podendo reagir com nucleófilos por meio de adição de Michael. Alguns nucleófilos passíveis de reagir dessa maneira são grupos amino, hidroxila e tiol, os quais podem ser encontrados em sistemas biológicos em resíduos de aminoácidos (lisina, serina e cisteína). No entanto, o principal composto que reage com quinonas é a glutathiona, que apresenta um grupo tiol (Figura 63). A glutathiona representa a primeira linha de defesa celular contra espécies reativas de oxigênio e constitui o antioxidante não-protéico mais abundante na célula. Na verdade, a formação de conjugados quinona-glutathiona representa um mecanismo de desintoxicação e pode ocorrer por adição redutiva espontânea ou catalisada por glutathiona-S-transferases, formando conjugados glutathionil hidroquinona (Esquema 13).

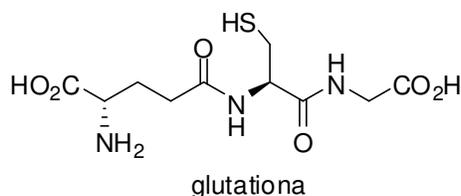
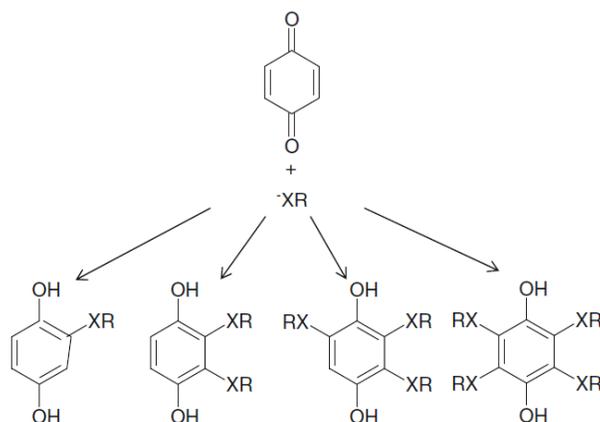


Figura 63. Estrutura da glutathiona na sua forma reduzida



Esquema 13. Adição de Michael a quinonas (X = S, N, O)⁵⁵

Entretanto, a formação de conjugados quinona-glutathiona pode aumentar a toxicidade da quinona. Em alguns casos, o ciclo redox da glutathionil hidroquinona pode ser facilitado em relação ao da quinona original, aumentando assim os danos

causados pelo estresse oxidativo discutidos anteriormente. Por outro lado, altas concentrações de quinonas podem levar à depleção significativa dos níveis de glutathione reduzida. Essa saturação do sistema de desintoxicação permite a adição de quinonas a proteínas dependentes de SH, causando mudanças irreversíveis que podem resultar na morte celular.⁵⁵

Compostos carbonílicos α,β -insaturados também têm sua toxicidade associada à conjugação de uma ligação dupla com um grupo carbonila, permitindo assim reações de adição de Michael. A atividade antimicrobiana desses compostos diminui conforme o aumento do número de substituintes na ligação dupla. Além disso, análogos saturados não apresentam a mesma atividade.⁵⁶

De maneira análoga a quinonas, cetonas α,β -insaturadas são capazes de inibir proteínas dependentes de SH. A atividade desses compostos parece ser melhor para compostos com baixos pesos moleculares e pequeno impedimento estérico, o que favorece a entrada do inibidor no sítio catalítico.⁵⁷

A ação antimicrobiana de fenóis é atribuída à capacidade destes compostos de permeabilização da membrana de micro-organismos, ocasionando danos à mesma e vazamento de conteúdo celular.^{58,59} Greenberg e colaboradores⁶⁰ analisaram a atividade antimicrobiana de diversos compostos fenólicos do ponto de vista da relação estrutura-atividade. Os autores sugerem que os fatores determinantes da atividade desses compostos são a lipofilicidade e o efeito estérico, e que os compostos fenólicos atuam como agentes surfactantes que rompem a interface lipídio-proteína da membrana.

Além disso, a atividade diferenciada sobre bactérias Gram positivas e negativas pode ser explicada pelas diferenças na composição da parede celular. As bactérias Gram negativas apresentam até 25% de conteúdo lipídico na parede celular, enquanto que nas Gram positivas essa proporção varia de 0 a 3%. Dessa maneira, os compostos fenólicos se ligam à parede celular de bactérias Gram

⁵⁶ Stack, V. *Ind. Eng. Chem.* **1957**, 49, 913-917.

⁵⁷ Tanaka, T.; Kawasi, M.; Tani, S. *Life Sciences* **2003**, 73, 2895-2990.

⁵⁸ Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. *Microbiology: an introduction* 10th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, **2010**.

⁵⁹ Shapiro, S.; Guggenheim, B. *Oral Microbiol. Immunol.* **1995**, 10, 241-246.

⁶⁰ Greenberg, M.; Dodds, M.; Tian, M. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 11151-11156.

negativas mais fortemente em relação a Gram positivas e não conseguem penetrá-la tão facilmente.⁶⁰

CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi relatada a composição química das secreções defensivas de dezoito espécies de opiliões da família Gonyleptidae, dentre as quais quatorze ainda não haviam sido estudadas por essa perspectiva. As análises realizadas levaram à detecção de 38 compostos, dos quais 8 tiveram sua caracterização confirmada e 30 tiveram suas estruturas propostas a partir da análise detalhada dos dados de espectrometria de massas obtidos. Com as análises de RMN das secreções de três espécies (*Magnispina neptunus*, *Progonyleptoidellus striatus* e *Gonyleptes saprophilus*), cinco compostos foram caracterizados: 4-metilex-1-en-3-ona (**3**), 2-metil-1,4-benzoquinona (**22**), 2-etil-1,4-benzoquinona (**23**), 2,5-dimetilfenol (**34**), 2,3,6-trimetilfenol (**36**). De maneira geral, os 38 compostos encontrados são representativos de cinco classes químicas e se dividem em três grandes grupos: cetonas (juntamente com diidropiranil cetonas); benzoquinonas (com hidroquinonas); e fenóis. Compostos pertencentes a essas três classes já foram descritos em várias espécies da família Gonyleptidae, bem como da sub-ordem Laniatores.

Foi proposta uma rota sintética para a obtenção de duas vinil cetonas encontradas nas secreções estudadas: 5-metilex-1-en-3-ona (**2**) e 4-metilex-1-en-3-ona (**3**). Essa rota foi aplicada com sucesso e os produtos obtidos foram usados para confirmar a identidade desses compostos presentes nas secreções. Com o padrão sintético racêmico da 4-metilex-1-en-3-ona (**3**), foi possível observar que essa vinil cetona ocorre na forma enantiomericamente pura e com a mesma estereoquímica em cinco das espécies estudadas. Essa metodologia pode ser usada com materiais de partida enantiomericamente puros para a obtenção de vinil cetonas com estereoquímica definida, as quais podem ser usadas para a confirmação da configuração dos centros quirais nesses produtos naturais.

Por fim, foram realizados testes de atividade antimicrobiana de compostos representativos dos três grupos encontrados como constituintes das secreções estudadas: 2-metil-1,4-benzoquinona (**22**), 2,5-dimetil-1,4-benzoquinona (**24**), 2,5-dimetilfenol (**34**) e hept-1-en-3-ona (**39**). Os testes foram realizados frente aos

micro-organismos *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Rhodotorula glutinis*. De maneira geral, as quinonas mostraram atividade mais pronunciada frente a todos os micro-organismos testados, seguidos pela vinil cetona e pelo fenol, que teve a menor atividade inibitória. A bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* mostrou maior resistência frente aos compostos testados em relação à Gram-positiva *B. subtilis*, enquanto a levedura *C. albicans* mostrou-se mais resistente frente aos compostos testados em comparação com a levedura *R. glutinis*.

Estudos da composição de secreções defensivas de opiliões são relativamente escassos na literatura. Mesmo dentro da sub-ordem Laniatores, o maior número de estudos não representa a enorme diversidade desse grupo. Esse trabalho contribui com o atual conhecimento de componentes de secreções de opiliões e fornece dados que podem ser utilizados em estudos de outras espécies de artrópodes, tais como índices de retenção e espectros de massas dos compostos caracterizados. Essas informações são importantes uma vez que o conhecimento sobre a ecologia química de opiliões e aracnídeos em geral é relativamente escassa, em comparação com insetos.

Do ponto de vista da Química de Produtos Naturais, a identificação de compostos similares presentes em diversas espécies cria oportunidades para futuros estudos visando à elucidação das rotas biossintéticas envolvidas na produção dessas substâncias. Neste trabalho foi discutida a possível origem biossintética das diferentes classes de substâncias identificadas e prováveis relações entre essas rotas. O conhecimento sobre os componentes que cada espécie produz e a caracterização completa dos mesmos permite, por exemplo, o desenho de experimentos para monitorar a incorporação de precursores isotopicamente marcados nos compostos de defesa. Esses estudos podem trazer informações importantes sobre os mecanismos pelos quais a diversidade dessas defesas químicas evoluiu, não se restringindo somente ao contexto da ordem Opiliones, mas resultando também em um melhor entendimento da evolução de defesas químicas em geral. Além disso, há poucos estudos biossintéticos na literatura com aracnídeos, e, até o momento, nenhum com opiliões.

Por outro lado, a partir de um enfoque da Ecologia Química, a identificação de diferentes classes de compostos nessas secreções defensivas imediatamente traz questões sobre os benefícios e custos associados ao uso de diferentes substâncias e como as mesmas estão relacionadas com a ecologia das espécies. Com o conhecimento da composição dessas secreções defensivas é possível formular hipóteses e realizar experimentos para investigar qual o valor adaptativo associado a cada classe de composto ou substância individual. Um ponto relevante que merece uma investigação mais detalhada é a finalidade da formação de dímeros de vinil cetonas observados em algumas espécies, que são sintetizados quimicamente apenas sob condições especiais e com a presença de catalisadores.

Os dímeros de vinil cetonas encontrados nesse trabalho são representantes de uma classe recém-descoberta de compostos presentes em secreções de opiliões e são necessários mais estudos sobre os mesmos. A rota sintética para a obtenção de vinil cetonas apresentada nesse trabalho contribui nesse ponto, uma vez que a metodologia de dimerização já é descrita na literatura.

Os ensaios de atividade antimicrobiana realizados trazem um novo aspecto das estratégias defensivas de opiliões. Enquanto existem vários trabalhos que discutem a ação das secreções defensivas de opiliões na repelência de predadores, tais como insetos, aracnídeos e mamíferos, pouca atenção é dada à possível ação dessas secreções na defesa contra micro-organismos patogênicos.

A investigação do ponto de vista químico de secreções defensivas de opiliões apresenta um valor quimiotaxonômico e quimiosistemático relevante, mas para isso são necessários trabalhos que englobem um grande número de espécies. Nesse trabalho foi analisado um número considerável de espécies distribuídas em várias subfamílias dentro da família Gonyleptidae. Dentro desse contexto, esse trabalho representa uma contribuição para as pesquisas desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do professor Glauco Machado, do Laboratório de Comportamento e Evolução de Artrópodes, pertencente ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Métodos cromatográficos

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio (folha padrão 20 x 20 cm), cobertas com sílica gel com indicador de fluorescência (Merck). A revelação dos compostos foi realizada por irradiação com lâmpada UV_{254nm}, pulverização com solução reveladora de *p*-anisaldeído (*p*-anisaldeído, H₂SO₄, ácido acético e etanol na proporção de 1:2:1:100), ou pulverização com solução reveladora de ácido fosfomolibdico (10% m/v de ácido fosfomolibdico em etanol), ambas com posterior aquecimento a 300 °C com pistola aquecedora.

As purificações dos compostos sintetizados foram realizadas por cromatografia “flash” em coluna, sendo utilizada sílica gel 60 µm (ACROS – 0,035-0,070 mm com poros de 6 nm) como fase estacionária e solventes destilados como eluentes. As frações coletadas foram comparadas por CCD e agrupadas por perfil de semelhança.

As cromatografias gasosas acopladas a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo Agilent 6890 acoplado a detector seletivo de massas HP 5973, operando por impacto de elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV, na faixa de *m/z* 40-400. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com 5% de fenil-metilsiloxano para a separação dos compostos analisados. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o detector a 280 °C. As demais condições de análise (rampas de aquecimento, pressão de gás, modo de injeção) variaram de acordo com cada experimento.

As análises de CG quiral para a discriminação de enantiômeros foi realizada em cromatógrafo Agilent 6850, acoplado com detector de ionização de chama (CG-DIC), equipado com injetor automático e coluna capilar de sílica fundida Chirasil-dex (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As análises foram realizadas com fluxo constante de H₂ de 0,5 mL/min, com injetor a 180 °C e detector a 250 °C, sendo as injeções feitas no modo splitless (sem divisão de fluxo), utilizando 1 µL da

amostra. A programação da temperatura do forno foi a seguinte: rampa de 40 a 100 °C a taxa de 3 °C/min, de 100 a 180 °C a taxa de 30 °C/min e permanência a 180 °C por 20 min.

5.1.1. Cálculo dos índices de retenção

Os índices de retenção expressos na Tabela 1 foram calculados analisando-se as amostras por CG-EM com as seguintes programações: (i) temperatura iniciando a 40 °C e variando até 290 °C a uma taxa de 4 °C/min, com pressão constante de 7,07 psi de He e (ii) temperatura iniciando a 50 °C e variando até 290 °C a uma taxa de 4 °C/min, com pressão constante de 7,62 psi de He. A primeira programação foi usada para as secreções de *G. saprophilus*, *S. barbiellini* e *S. sodreana* (que apresentam o composto **1**, consideravelmente volátil), enquanto a segunda programação foi usada para as secreções das demais espécies.

Separadamente, foi injetado com essas programações de temperatura um padrão de hidrocarbonetos saturados lineares de C₈ a C₂₀ (Sigma-Aldrich). Para o cálculo do índice de retenção do composto **1**, foi necessário adicionar heptano (C₇) ao padrão de hidrocarbonetos. Para o cálculo dos índices de retenção, foi utilizada a seguinte equação:

$$IR = 100 \times \left(n + (N - n) \frac{t_a - t_n}{t_N - t_n} \right)$$

Onde: n = número de carbonos do alcano que elui imediatamente antes de **a**

N = número de carbonos do alcano que elui imediatamente após **a**

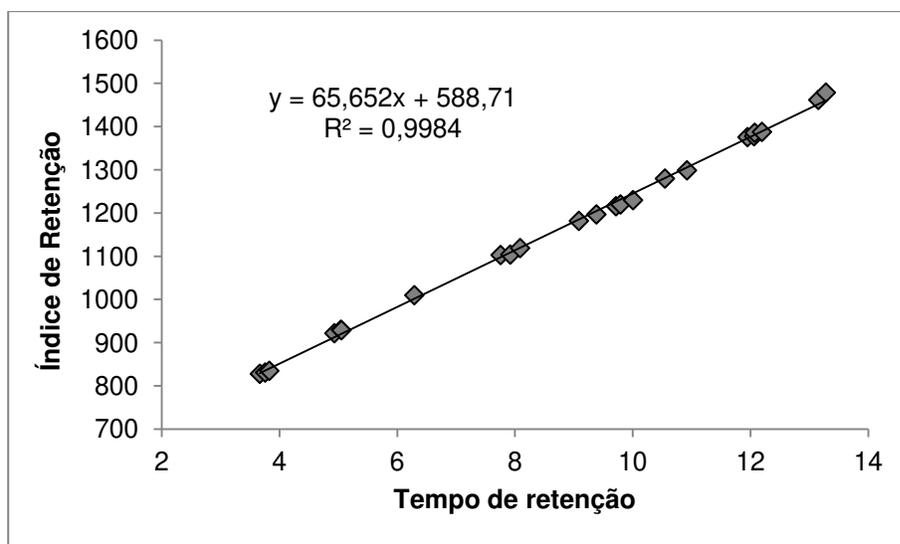
t_a = tempo de retenção do composto **a**

t_n = tempo de retenção do alcano que elui imediatamente antes de **a**

t_N = tempo de retenção do alcano que elui imediatamente após **a**

Alguns compostos apresentaram abundância muito baixa ou sofreram decomposição após as primeiras análises, o que impossibilitou sua detecção nas análises para cálculo de índice de retenção. Uma vez que os tempos de retenção

dos compostos mostrados na Tabela 1 foram obtidos com uma rampa uniforme de temperatura no CG (ver item 5.3), os mesmos apresentam uma relação linear com os índices de retenção correspondentes. Foi feita uma regressão linear com os dados dos compostos para os quais foi possível calcular o índice de retenção pela equação anterior, gerando o gráfico que encontra-se a seguir.



Os índices de retenção dos compostos 5, 6, 7, 11, 12, 13, 21, 30, 31, 32, 33, 35 e 38 foram calculados segundo a equação descrita no gráfico anterior, onde x é o tempo de retenção na análise de CG-EM (segundo o método descrito em 5.3) e y é o índice de retenção.

5.2. Espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian Inova – 500, operando a 499,89 MHz para o ^1H e 125,71 MHz para o ^{13}C , em espectrômetro Bruker Avance III 400, operando a 400,13 MHz para o ^1H e 100,61 MHz para o ^{13}C ou em espectrômetro Bruker Avance 250, operando a 250,13 MHz para o ^1H e 62,90 MHz para o ^{13}C .

As amostras foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. Utilizou-se CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão

de referência interna (0,0 ppm). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). Os espectros foram processados utilizando o software MestReNova 7.1.0.

5.3. Coleta e análise das secreções

A coleta das secreções de opiliões foi feita pelo colaborador desse projeto, Prof. Dr. Glauco Machado, do Instituto de Biociências da USP. As secreções defensivas das espécies estudadas foram coletadas pressionando-se as aberturas das glândulas produtoras com algodão tratado (obtido a partir da lavagem extensiva de algodão comum com clorofórmio destilado) com o auxílio de pinça. O número de indivíduos utilizados na coleta variou de acordo com a espécie e estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Número de indivíduos amostrados por espécie

Espécie	N	Espécie	N
<i>Acanthogonyleptes pulcher</i>	5	<i>Mischonyx cuspidatus</i>	29
<i>Bourguyia hamata</i>	22	<i>Mitopernoides variabilis</i>	9
<i>Cadeadoius niger</i>	5	<i>Multumbo terrenus</i>	30
<i>Chavesincola inexpectabilis</i>	31	<i>Pachylospaleus strinati</i>	34
<i>Discocyrtus oliverioi</i>	11	<i>Pachylus paessleri</i>	24
<i>Gonyleptes saphophilus</i>	15	<i>Progonyleptoidellus striatus</i>	10
<i>Liogonyleptoides tetracanthus</i>	9	<i>Pseudotrogulus funebris</i>	12
<i>Magnispina neptunus</i>	20	<i>Sodreana barbiellini</i>	11
<i>Metarthrodes longipes</i>	3	<i>Sodreana sodreana</i>	5

Os pedaços de algodão foram usados para coletar as secreções de vários indivíduos de cada espécie. Ao final da coleta, as secreções absorvidas em algodão foram extraídas com cerca de 5 mL de acetato de etila bidestilado. Essa solução foi usada nas análises de CG-EM e CG-DIC das secreções.

A programação de temperatura para as análises de CG-EM das secreções de opiliões foi a seguinte: de 50 °C a 200 °C a uma taxa de 10 °C/min e de 200 a 290 °C a uma taxa de 16 °C/min. As análises foram realizadas com fluxo

constante de 7,62 psi de He. O volume de injeção foi de 1 μ L, no modo *splitless* (sem divisão de fluxo).

As secreções das três espécies que foram analisadas por RMN (*G. saprophilus*, *M. neptunus* e *P. striatus*) encontravam-se dissolvidas em acetato de etila. Para permitir a análise por RMN, esse solvente foi evaporado lentamente mantendo o frasco aberto sob a bancada. Após a evaporação do acetato de etila, adicionou-se aproximadamente 0,6 mL de CDCl_3 a essas amostras e as mesmas foram analisadas por RMN.

5.4. Reagentes e solventes

Os reagentes usados nas sínteses orgânicas foram adquiridos comercialmente e utilizados sem tratamento prévio, com exceção da piridina, que foi tratada com hidreto de cálcio e destilada imediatamente antes do uso. O solvente THF foi tratado com sódio metálico e benzofenona e destilado imediatamente antes do uso, enquanto os demais solventes foram utilizados sem tratamento prévio.

Os padrões sintéticos de 2-metil-1,4-benzoquinona (**22**), 2-etil-1,4-benzoquinona (**24**) e 2,5-dimetilfenol (**34**) utilizados nos testes de atividade antimicrobiana e coinjeções em CG-EM foram gentilmente cedidos pelo professor Timothy Brocksom, da Universidade Federal de São Carlos.⁴⁶ A hept-1-en-3-ona (**47**) e seu dímero (**48**), utilizados nos testes de atividade antimicrobiana, foram sintetizadas em nosso laboratório.³³

5.5. Testes de atividade antimicrobiana

Todos os meios de cultura, soluções e materiais a serem utilizados em contato direto com os micro-organismos foram esterilizados a 121 °C, 1,5 Pa, por 15 minutos em autoclave.

Soluções de álcool 70% (v/v) e hipoclorito de sódio 1% (v/v) foram utilizadas para desinfetar bancadas de trabalho e fluxo laminar. A manipulação dos micro-organismos foi sempre realizada em câmara de fluxo laminar.

Todos os materiais e meios que tiveram contato direto com os micro-organismos foram autoclavados antes de serem descartados.

5.5.1. Procedimento geral para o cultivo de bactérias

Para o cultivo da linhagem das bactérias *Bacillus pumillus* (coleção do LaBioSin), *Bacillus subtilis* (CCT 089) e *Pseudomonas aeruginosa* (CCT 1987), utilizamos caldo NB – *Nutrient Broth* (10 g de peptona, 40 g de glicose e 15 g ágar-ágar todas de marca OXOID, completando-se o volume final para 1 L de água destilada. A esterilização do meio foi feita por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos.

5.5.2. Procedimento geral para o cultivo de leveduras

Para o cultivo das linhagens das leveduras *Candida albicans* (CCT 0776) e *Rhodotorula glutinis* (CCT 0783), utilizamos caldo nutriente YM (Yeast extract-malt extract) de marca Merck, de uso geral para o crescimento de leveduras, preparado pela mistura de 3 g de extrato de levedura, 3 g de extrato de malte, 5 g de peptona todas de marca Merck e 10 g de glucose e 20 g de ágar, completando-se o volume final para 1 L de água destilada. A esterilização do meio foi feita por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos

5.5.3. Difusão em disco

Os micro-organismos foram previamente inoculados por um período de 24 horas em 10 mL de meio NB (bactérias) ou YM (leveduras), conforme descrito nos itens 5.5.1 e 5.5.2. Em ambiente estéril (capela de fluxo laminar) foram aplicados e espalhados, com auxílio de uma alça de Drigalski, 100 µL de uma dispersão de

cada microrganismo em placas de Petri distintas, e em seguida foram colocados 4 discos (feitos com papel de filtro estéril, de 5 mm de diâmetro) em cada placa, contendo 5 µL de soluções nas concentrações de 6, 12, 18 e 24 mg/mL em H₂O/DMSO 95:5 (v/v). Os padrões utilizados foram cloranfenicol 4 mg/mL (para bactérias) e ciclopirox olamina 10 mg/mL (para leveduras). O período de incubação foi de 24 horas a uma temperatura de 30 °C. Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos.

5.5.4. Microdiluição em caldo

Foram preparadas soluções estoque dos compostos a serem testados de 2000 µg/mL para os testes com bactérias e 1000 µg/mL para leveduras, em H₂O/DMSO 95:5 (v/v). Os micro-organismos foram previamente inoculados por um período de 24 horas em 10 mL de meio NB (bactérias) ou YM (leveduras), conforme descrito nos itens 5.5.1 e 5.5.2. Um padrão de Mc Farland 0,5 foi preparado em tubo de ensaio pela mistura de 0,05 mL de solução 1,0% de cloreto de bário e 9,95 mL de uma solução 1,0% de ácido sulfúrico.

Cada meio contendo os micro-organismos foi adicionado a água estéril até a turbidez coincidir com padrão 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, o que corresponde a uma densidade celular de aproximadamente $1,5 \cdot 10^8$ unidades formadoras de colônia. Essa solução de micro-organismo foi adicionada (1 mL) a 9 mL de meio de cultura líquido correspondente, para todos os micro-organismos (meio inoculado).

O teste foi feito em microplacas de 96 poços e cada concentração foi testada em triplicata. Em todos os poços correspondentes às amostras, adicionou-se 100 µL de meio inoculado. No primeiro poço (maior concentração de substrato) adicionou-se 100 µL da solução estoque, homogeneizou-se o sistema, e transferiu-se 100 µL desse para o poço seguinte. Esse processo foi repetido até o último poço com substrato, para o qual, após homogeneização, descartou-se 100 µL do seu conteúdo. Os poços correspondentes ao controle microbiano foram preenchidos com 200 µL do meio inoculado. Os poços correspondentes ao

controle positivo foram preenchidos com 20 µL do antibiótico correspondente (cloranfenicol 4 mg/mL para bactérias e ciclopirox olamina 10 mg/mL para leveduras) e 80 µL de meio inoculado. Foram feitos quatro controles do branco, cada um em duplicata, adicionando-se, a cada poço, 100µL de (i) solução estoque do substrato 1; (ii) solução estoque do substrato 2; (iii) H₂O/DMSO 95:5 (v/v); e (iv) meio estéril.

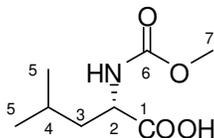
A placa foi incubada por 24 h a 30 °C em shaker e após esse período, adicionou-se 20 µL de solução 1 mg/mL de MTT em cada poço. Após incubação a 30 °C por mais 1h, observou-se o surgimento da coloração azul nos poços onde houve crescimento de micro-organismo.

5.6. Procedimentos sintéticos

Os produtos de síntese orgânica **42a** (na forma de éster metílico), **43a** e **44a** foram analisados por CG-EM com o seguinte método: temperatura de 50 a 200 °C com rampa de 10 °C/min e de 200 a 290 °C com rampa de 16 °C/min, permanecendo em 290 °C por 10 minutos.

Os produtos de síntese orgânica **48a** e **48b** foram analisados por CG-EM com o seguinte método: temperatura de 50 a 100 °C com rampa de 10 °C/min e de 100 a 290 °C com rampa de 30 °C/min, permanecendo em 290 °C por 10 minutos.

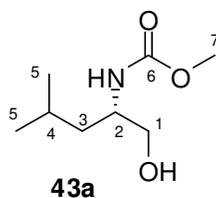
Em ambas as programações foi utilizada pressão constante de 7,62 psi de He. As amostras foram preparadas com concentração aproximada de 1 mg/mL, o volume de injeção foi de 1 µL no modo *split* (com divisão de fluxo 1:10).



42a

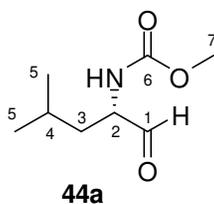
Obtenção do ácido (S)-2-(metoxicarbonilamino)-4-metilpentanóico (42a): Em um balão de 50 mL foram adicionados 2 g (15,3 mmol) de L-leucina (**41a**), 1,41 g (16,8 mmol) de bicarbonato de sódio e 20 mL de água destilada. Inicialmente observou-se a solubilização incompleta dos reagentes. Sob banho de gelo, adicionou-se lentamente 1,4 mL (18,3 mmol) de cloroformiato de metila. A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 90 minutos e adicionou-se mais 0,7 mL (9,2 mmol) de cloroformiato de metila. O sistema foi mantido sob agitação por mais 90 minutos a temperatura ambiente, sendo que o progresso da reação foi acompanhado por CCD (sistema eluente diclorometano/metanol 1:1 v/v; revelador ninidrina 10% em etanol). Após esse período não observou-se mais a presença de leucina na reação. O meio reacional foi acidificado com a adição de 1 mL de solução 10% de ácido clorídrico aquoso e a reação foi extraída com diclorometano (3 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporador. Obteve-se 1,9616 g de um óleo incolor, o que representa 68% de rendimento da reação. A análise por CG-EM (com prévia derivatização com diazometano, o que gera o éster metílico de **42a**) confirmou a pureza do produto e a sua identidade pelo espectro de massas. A caracterização desse composto foi realizada por RMN de ¹H e ¹³C.

Tempo de retenção (min) 11,466 (éster metílico do ácido **42a**). CG-EM *m/z* 203(1) [M⁺], 144(100), 128(16), 115(36), 112(56), 102(19), 88(55), 83(17), 70(18), 69(28), 59(32), 58(10), 56(10), 55(11), 43(45), 42(21), 41(36) (éster metílico do ácido **42a**). RMN de ¹H (CDCl₃, 250,13 MHz, TMS) δ 4,30-4,45 (1H, m, CH, H-C(2)), 3,70 (3H, s, CH₃, H₃C(7)-O), 1,46-1,84 (1H, m, CH₂, H-C(3)), 1,46-1,84 (1H, m, CH₂, H-C(3)), 1,46-1,84 (1H, m, CH, H-C(4)), 0,96 (6H, d, J = 6,0 Hz, 2x H₃C(5)); RMN de ¹³C (CDCl₃, 62,53 MHz) δ 177,55 (C(1)), 156,92 (C(6)), 52,49 (C(7)), 52,36 (C(2)), 41,42 (C(3)), 24,77 (C(5)), 23,22 (C(4)), 21,67 (C(5)).



Obtenção do (S)-2-(metoxicarbonilamino)-4-metilpentanol (43a): Em um balão de 100 mL previamente flambado adicionou-se 1,94 g (10,2 mmol) do ácido **42a** e 10 mL de THF anidro. Sob atmosfera de nitrogênio e banho de gelo, adicionou-se gota a gota 1 mL (10 mmol) de solução 10 mol/L de borana-dimetilsulfeto em THF. O sistema foi mantido sob agitação a temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 18 h. Após esse período foi adicionado, sob banho de gelo, 5 mL de água destilada para destruir o excesso de borana. A mistura foi concentrada em rotaevaporador e o sistema resultante foi diluído com 40 mL de acetato de etila e lavado com 10 mL (10 mmol) de solução aquosa 1 mol/L de hidróxido de sódio. A fase orgânica foi recolhida, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporador. Obteve-se 1,337 g de um óleo incolor, o que representa 75% de rendimento. A análise por CG-EM confirmou a pureza do produto e a sua identidade pelo espectro de massas. A caracterização do composto **43a** foi realizada por RMN de ¹H e ¹³C.

Tempo de retenção (min) 11,652. RMN de ¹H (CDCl₃, 250,13 MHz, TMS) δ 3,60-3,83 (1H, m, CH₂, H-C(1)), 3,60-3,83 (1H, m, CH, H-C(2)), 3,74 (3H, s, CH₃, H₃C(7)-O), 3,52 (1H, dd, J = 11 Hz, 5,8 Hz, CH₂, H'-C(1)), 1,52-1,76 (1H, m, CH, H-C(4)), 1,22-1,44 (1H, m, CH₂, H-C(3)), 1,22-1,44 (1H, m, CH₂, H'-C(3)), 0,93 (6H, d, J = 6,5 Hz, 2x H₃C(5)); RMN de ¹³C (CDCl₃, 62,53 MHz) δ 157,50 (C(6)), 66,14 (C(1)), 52,19 (C(7)), 51,42 (C(2)), 40,50 (C(3)), 24,77 (C(4)), 23,07 (C(5)), 22,13 (C(5)). CG-EM *m/z* 175(0) [M⁺], 144(100), 118(10), 102(26), 88(78), 86(43), 59(16), 58(18), 44(10), 43(21), 42(13), 41(16).

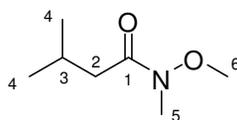


Obtenção do (S)-2-(metoxicarbonilamino)-4-metilpentanal (44a): Em um balão de 25 mL adicionou-se 0,55 g (2,65 mmol) de clorocromato de piridínio (PCC), 70 mg (0,85 mmol) de acetato de sódio e 15 mL de diclorometano. Preparou-se uma solução de 0,3 g (1,7 mmol) do álcool **43a** em 5 mL de diclorometano e adicionou-se lentamente sobre a suspensão de PCC. O sistema foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, o sistema foi imediatamente purificado em uma pequena coluna de sílica gel, primeiramente usando diclorometano como sistema eluente (no qual os sais de cromo permanecem na sílica) e partindo para a mistura diclorometano/acetato de etila 1:1 v/v, com o cuidado de não recolher os sais de cromo formados na reação. As soluções recolhidas da coluna foram concentradas em rotaevaporador, obtendo-se 0,219 g de um óleo incolor, o que representa um rendimento de 75%. A análise do produto por CG-EM confirmou a identidade do produto e revelou a presença de uma pequena proporção de ácido, produto da oxidação do aldeído pelo PCC. O composto **44a** foi ainda caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C .

Tempo de retenção (min) 9,993. RMN de ^1H (CDCl_3 , 250,13 MHz, TMS) δ 9,60 (1H, s, CH, H-C(1)), 3,65-3,79 (1H, m, CH, H-C(2)), 3,69 (3H, s, CH_3 , $\text{H}_3\text{C}(7)\text{-O}$), 1,58-1,90 (1H, m, CH_2 , H-C(3)), 1,58-1,90 (1H, m, CH_2 , H'-C(3)), 1,36-1,48 (1H, m, CH, H-C(4)), 0,97 (6H, d, $J = 4$ Hz, $2 \times \text{H}_3\text{C}(5)$); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 62,53 MHz) δ 200,05 (C(1)), 157,04 (C(6)), 59,02 (C(2)), 52,65 (C(7)), 38,31 (C(3)), 24,83 (C(4)), 23,27 (C(5)), 22,03 (C(5)). CG-EM m/z 173(0) [M^+], 145(11), 144(86), 102(39), 88(100), 59(23), 58(26), 44(13), 43(25), 41(17).

Obtenção do (S)-3-(metoxicarbonilamino)-5-metilex-1-eno (45a): Em um balão de 25 mL previamente flambado adicionou-se 393 mg (1,1 mmol) de brometo de metiltrifenilfosfônio e 3mL de THF anidro. A suspensão foi submetida a banho de -

78 °C e, sob atmosfera de nitrogênio, adicionou-se lentamente 0,8 mL (1,1 mmol) de solução 1,3 mol/L de n-butilítio em hexanos. O sistema foi mantido sob agitação em banho de gelo e atmosfera de nitrogênio por 1 hora. Após esse período a reação foi submetida novamente a banho de -78 °C e adicionou-se lentamente uma solução de 168 mg (1,0 mmol) do aldeído **44a** em 5 mL de THF anidro. O sistema foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por 20 horas. Após esse período, a reação foi finalizada adicionando-se, sob banho de gelo, 5 mL de solução aquosa 10% de cloreto de amônio. A mistura foi diluída com diclorometano e lavada com água (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporador, obtendo-se 100 mg de um óleo incolor. Entretanto, a análise por CG-EM mostrou que o produto obtido correspondia ao álcool **43a**.

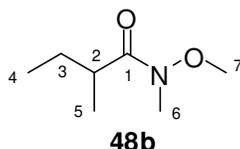


48a

Obtenção da N-metóxi-N,3-dimetilbutanamida (48a): Em um balão de 100 mL adicionou-se 1 mL (9,06 mmol) do ácido 3-metilbutanóico (**47a**), juntamente com 35 µL (0,45 mmol; 5 mol%) de DMF. O sistema foi resfriado com banho de gelo e adicionou-se lentamente 0,76 mL (10,42 mmol) de cloreto de tionila. Observou-se a formação de bolhas e liberação de gás. O sistema foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por 1h. Após esse período o sistema foi submetido a fluxo de N₂ para retirar parte do HCl formado (o fluxo foi mantido até cessar a liberação de fumaça). O líquido amarelo resultante foi dissolvido em 75 mL de CHCl₃ e adicionou-se ao balão 0,972 g (9,97 mmol) de hidrocloreto de N,O-dimetilhidroxilamina. Sob banho de gelo, adicionou-se lentamente 2,2 mL (22,65 mmol) de piridina destilada. A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1h. Após esse período a solução foi transferida para funil de extração e lavada com água (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporador. Após redução do volume, adicionou-se 20 mL de heptano ao balão, para a retirada completa da piridina. A

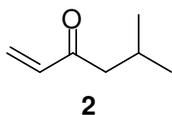
solução foi concentrada em rotaevaporador e foram realizadas mais duas adições de 20 mL de heptano. Ao fim desse processo obteve-se 1,08 g de um óleo amarelado, o qual mostrou contaminações quando analisado por CG-EM. O óleo obtido foi purificado em coluna cromatográfica com 60 g de sílica gel e usando como sistema eluente um gradiente de misturas hexano/acetato de etila 4:1 (v/v) até 1:1 (v/v). As frações contendo o produto desejado foram recolhidas e concentradas em rotaevaporador. Obteve-se 0,68 g de um óleo incolor, o que representa 52% de rendimento. A análise por CG-EM confirmou a pureza do produto e a sua identidade pelo espectro de massas. A caracterização do composto **48a** foi realizada por RMN de ^1H e ^{13}C .

Tempo de retenção (min) 6,577. RMN de ^1H (CDCl_3 , 250,13 MHz, TMS) δ 3,68 (3H, s, CH_3 , $\text{H}_3\text{C}(6)\text{-O}$), 3,18 (3H, s, CH_3 , $\text{H}_3\text{C}(5)\text{-N}$), 2,30 (2H, m, CH_2 , $\text{H}_2\text{C}(2)$), 2,09-2,25 (1H, m, CH, $\text{HC}(3)$), 0,97 (6H, d, CH_3 , $^3J = 7,5$ Hz, 2x $\text{H}_3\text{C}(4)$); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,61 MHz) δ 61,34 (C(6)), 40,87 (C(2)), 25,34 (C(3)), 22,88 (2x C(4)). CG-EM m/z 145(13) [M^+], 85(77), 61(40), 58(11), 57(100), 43(12), 41(35).



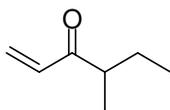
Obtenção da N-metóxi-N,2-dimetilbutanamida (48b): O procedimento para a obtenção desse composto é análogo àquele descrito para a obtenção do composto **48a**. Foi usado como precursor o ácido 2-metilbutanóico (**47b**) e todos os reagentes foram usados nas mesmas quantidades. Ao fim da reação obteve-se 1,13 g de um óleo levemente amarelado, o qual foi purificado da mesma maneira que o composto **48a**. Obteve-se 1,0 g do composto **48b** na forma de um óleo incolor, o que corresponde a um rendimento de 76%. A análise por CG-EM confirmou a pureza do produto e a sua identidade pelo espectro de massas. A caracterização do composto **48b** foi realizada por RMN de ^1H e ^{13}C .

Tempo de retenção (min) 6,372. RMN de ^1H (CDCl_3 , 250,13 MHz, TMS) δ 3,69 (3H, s, CH_3 , $\text{H}_3\text{C}(7)\text{-O}$), 3,19 (3H, s, CH_3 , $\text{H}_3\text{C}(6)\text{-N}$), 2,75-2,84 (1H, m, CH, $\text{HC}(2)$), 1,58-1,81 (1H, m, CH_2 , $\text{H-C}(3)$), 1,39-1,47 (1H, m, CH_2 , $\text{H}'\text{-C}(3)$), 1,11 (3H, d, CH_3 , $^3J = 6,9$ Hz, $\text{H}_3\text{C}(5)$), 0,89 (3H, t, CH_3 , $^3J = 7,4$ Hz, $\text{H}_3\text{C}(4)$); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 62,53 MHz) δ 171,30 (C(1)), 61,61 (C(7)), 36,97 (C(2)), 32,45 (C(6)), 26,99 (C(3)), 17,31 (C(5)), 12,18 (C(4)). CG-EM m/z 145(9) [M^+], 85(45), 61(16), 57(100), 41(22).



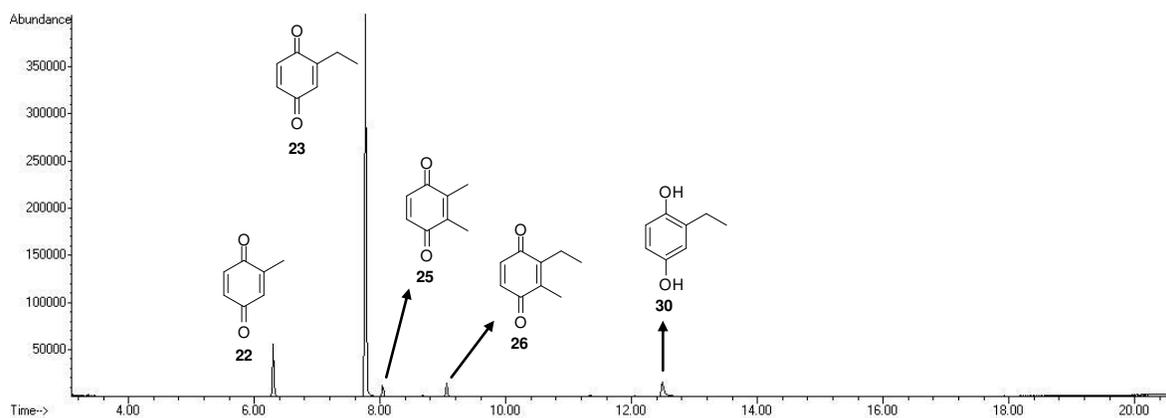
Obtenção da 5-metilex-1-en-3-ona (2): Um balão de 25 mL de duas bocas previamente flambado foi usado para o recolhimento do brometo de vinila gasoso. O balão foi mantido sob banho de gelo seco com acetona, com uma das bocas ligadas a um condensador com saída para um borbulhador com solução de NaOH e a outra boca ligada ao cilindro de brometo de vinila com mangueira de silicone. O cilindro foi aberto e observou-se a condensação do brometo de vinila no balão. Após o recolhimento de aproximadamente 3 mL de brometo de vinila, o cilindro foi desconectado do sistema e adicionou-se ao balão 20 mL de THF anidro. Essa solução foi transferida aos poucos, com o auxílio de seringa, para outro balão de 100 mL de duas bocas (ligado a um condensador) previamente flambado contendo 0,96 g (39,5 mmol) de raspas de magnésio metálico e 20 mL de THF anidro. O sistema foi aquecido a refluxo por 20 minutos e observou-se o início da reação pelo refluxo mais vigoroso. O aquecimento foi retirado e, pela reação ser muito exotérmica, o refluxo teve que ser controlado com banho de água e gelo. Após 20 min observou-se o consumo de todo o magnésio. Essa solução de brometo de vinil magnésio apresenta concentração esperada de 1,0 mol/L. Em um balão de 100 mL de uma boca, previamente flambado, contendo 300 mg (2,07 mmol) da amida de Weinreb **48a** dissolvida em 1 mL de THF anidro, adicionou-se, sob banho de gelo, 6 mL da solução 1,0 mol/L de brometo de vinil magnésio. O sistema foi mantido sob agitação e banho de gelo por 15h. Após esse período,

adicionou-se ao sistema, sob banho de gelo, 10 mL de solução saturada de cloreto de amônio. A mistura resultante foi extraída com éter etílico (2 x 5 mL) e a fase orgânica foi recolhida, seca com Na₂SO₄ anidro e filtrada. Devido à alta volatilidade do produto, não é possível concentrar a mistura em rotaevaporador. O éter etílico foi removido por destilação, mas a presença de THF tornou difícil o isolamento do produto. O composto **2** não foi purificado e quantificado, tendo sido somente identificado por CG-EM.

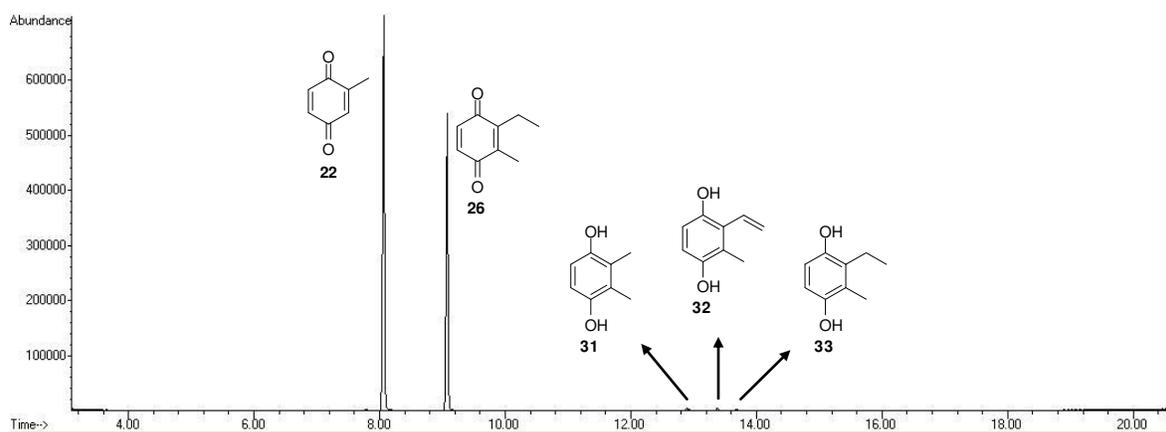


3

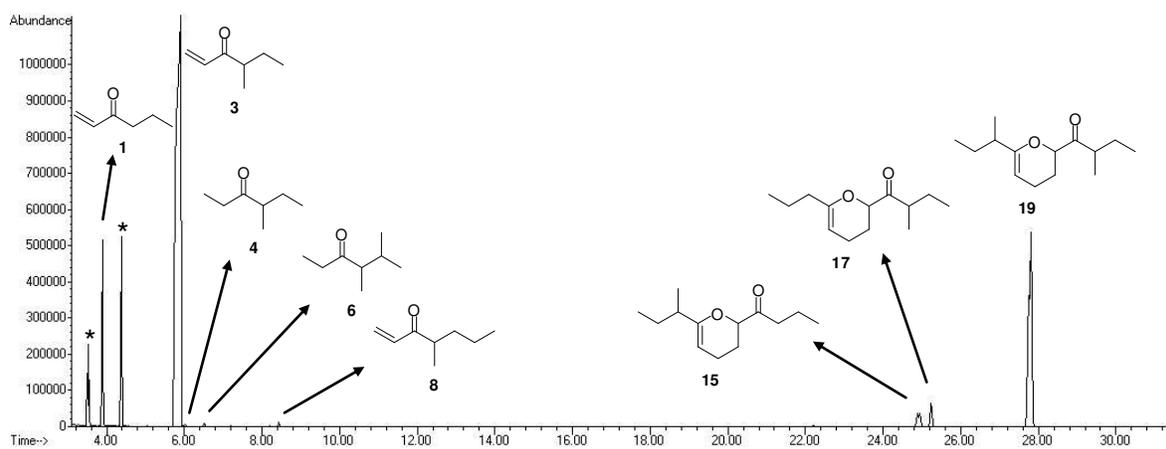
Obtenção da 4-metilex-1-en-3-ona (3): O procedimento para a obtenção desse composto é análogo àquele descrito para a obtenção do composto **2**. Foram usados 0,95 g (6,55 mmol) da amida de Weinreb **48b** dissolvidos em 3 mL de THF anidro. A essa solução de 48b adicionou-se 20 mL da solução 1,0 mol/L de brometo de vinil magnésio. Após 15h de agitação sob banho de gelo, a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de solução saturada de cloreto de amônio e extraída com éter etílico (2 x 5 mL). Da mesma forma que o composto 2, o a vinil cetona 3 não foi purificada devido a sua alta volatilidade, tendo sido identificado por CG-EM.



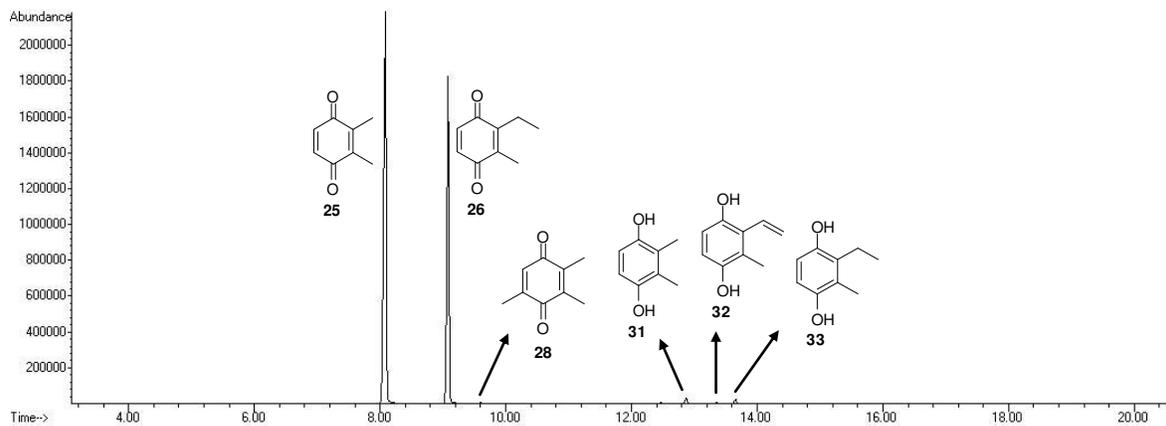
Anexo 4. Cromatograma da secreção de *Chavesincola inexpectabilis*



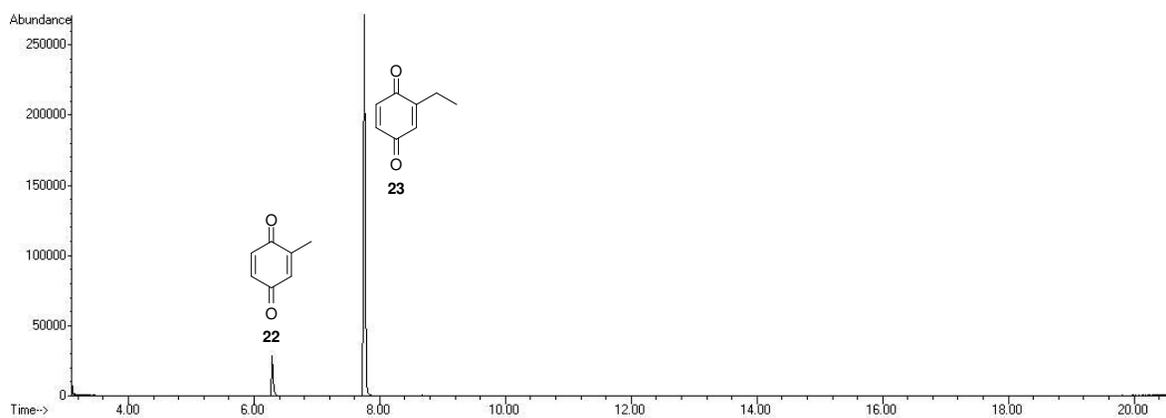
Anexo 5. Cromatograma da secreção de *Discocyrtus oliverioi*



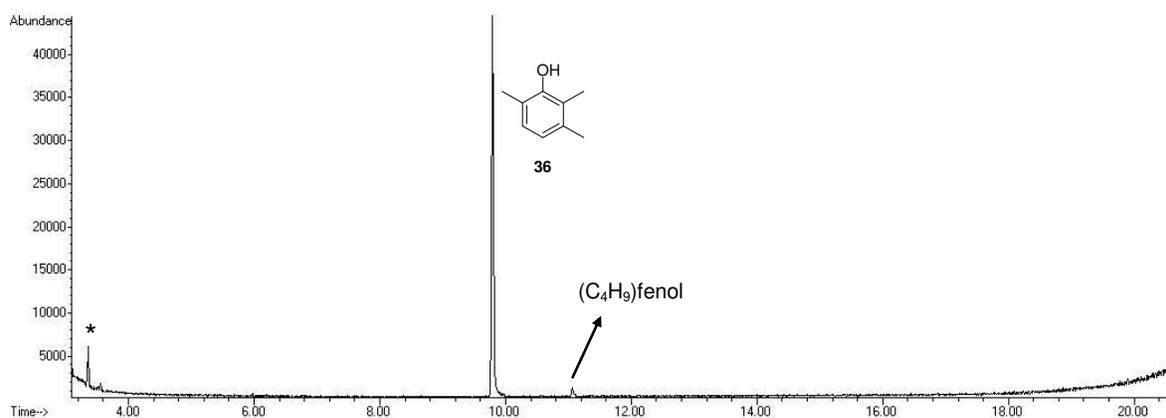
Anexo 6. Cromatograma da secreção de *Gonyleptes saprophilus*



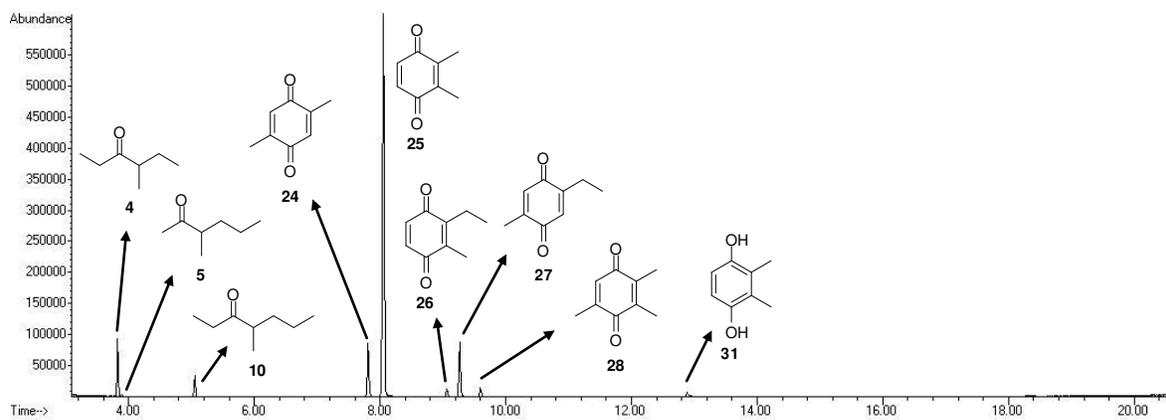
Anexo 7. Cromatograma da secreção de *Liogonyleptes tetracanthus*



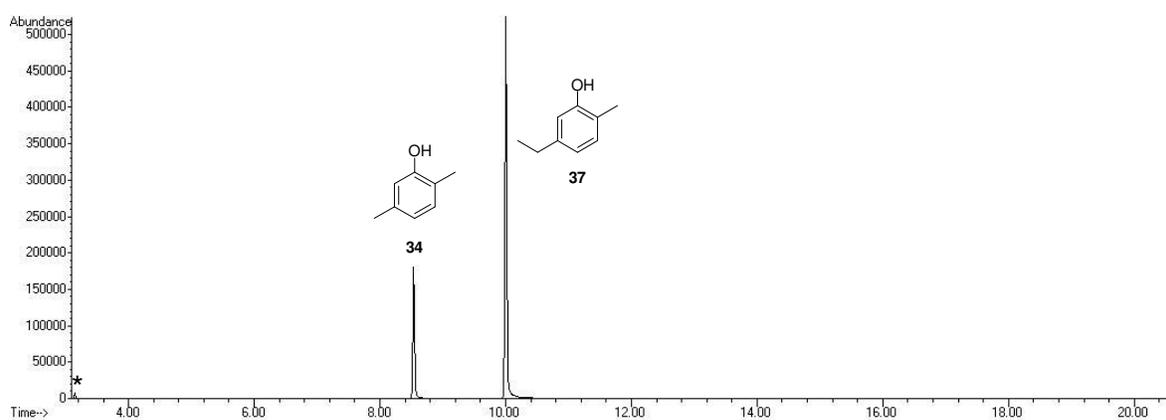
Anexo 8. Cromatograma da secreção de *Magnispina neptunus*



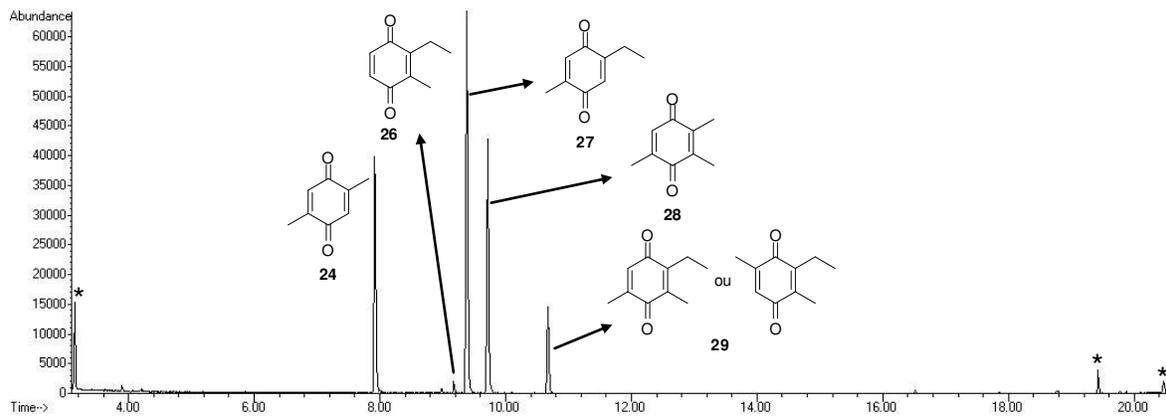
Anexo 9. Cromatograma da secreção de *Metarthrodes longipes*



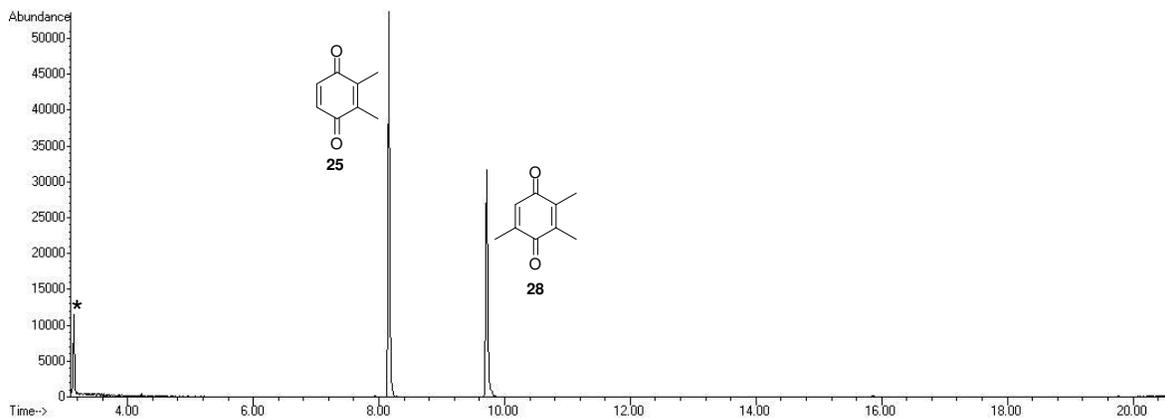
Anexo 10. Cromatograma da secreção de *Mischnonyx cuspidatus*



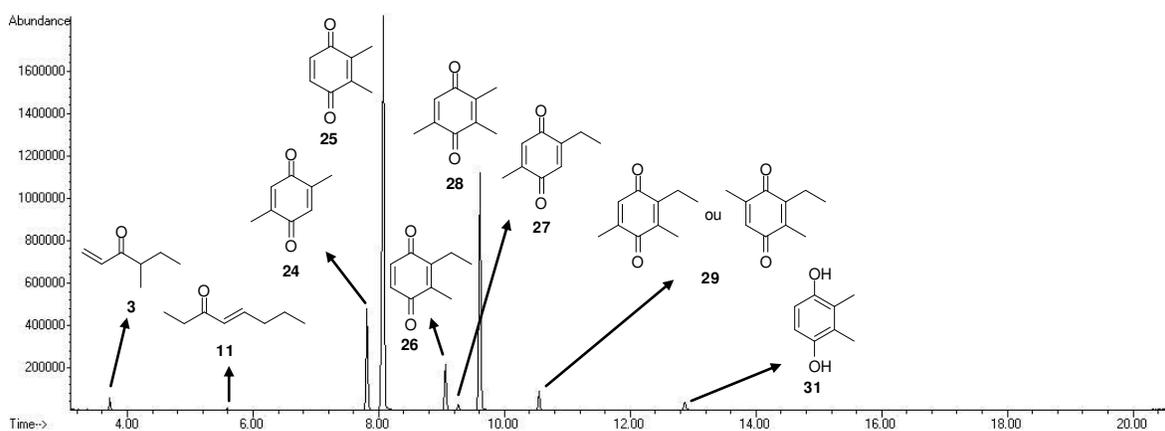
Anexo 11. Cromatograma da secreção de *Mitopernoides variabilis*



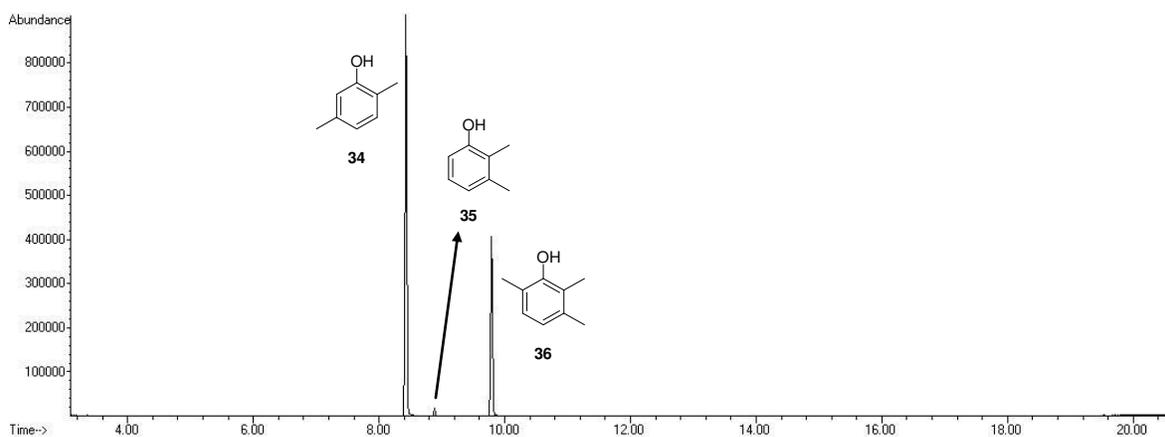
Anexo 12. Cromatograma da secreção de *Multumbo terrenus*



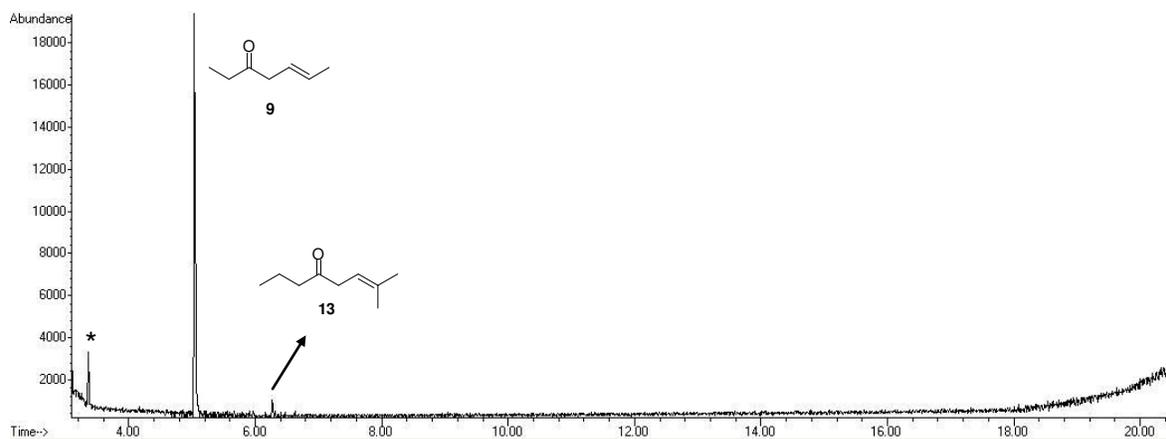
Anexo 13. Cromatograma da secreção de *Pachylospileus strinati*



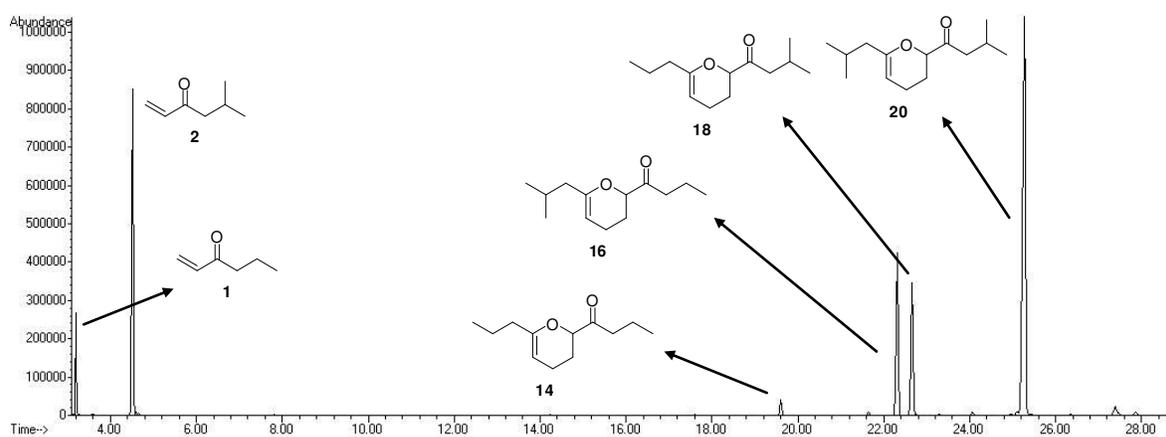
Anexo 14. Cromatograma da secreção de *Pachylus paessleri*



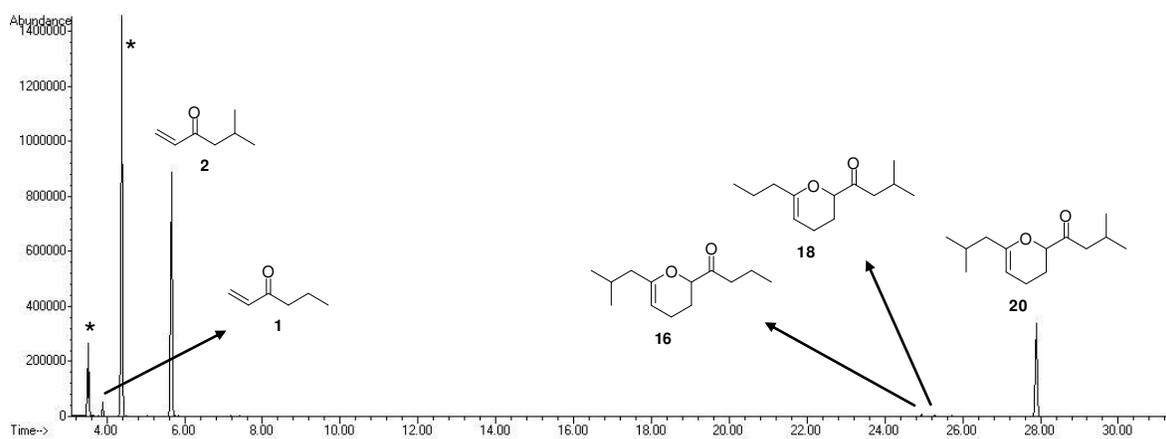
Anexo 15. Cromatograma da secreção de *Progonyleptoidellus striatus*



Anexo 16. Cromatograma da secreção de *Pseudotrogulus funebris*

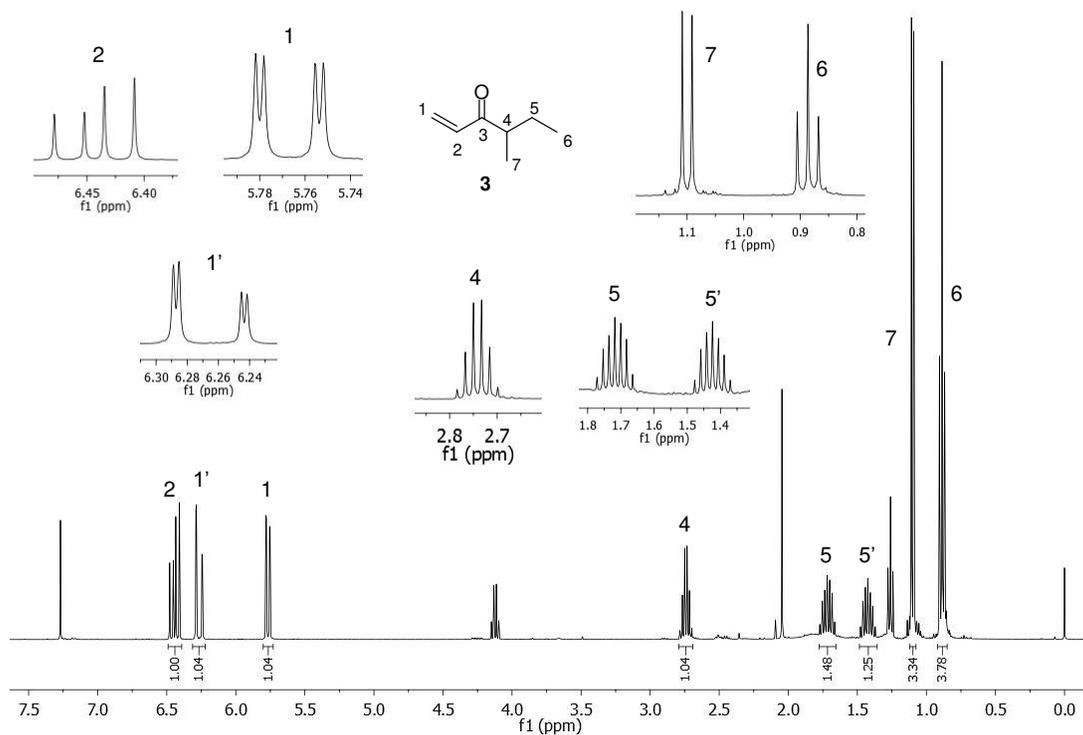


Anexo 17. Cromatograma da secreção de *Sodreana barbiellini*

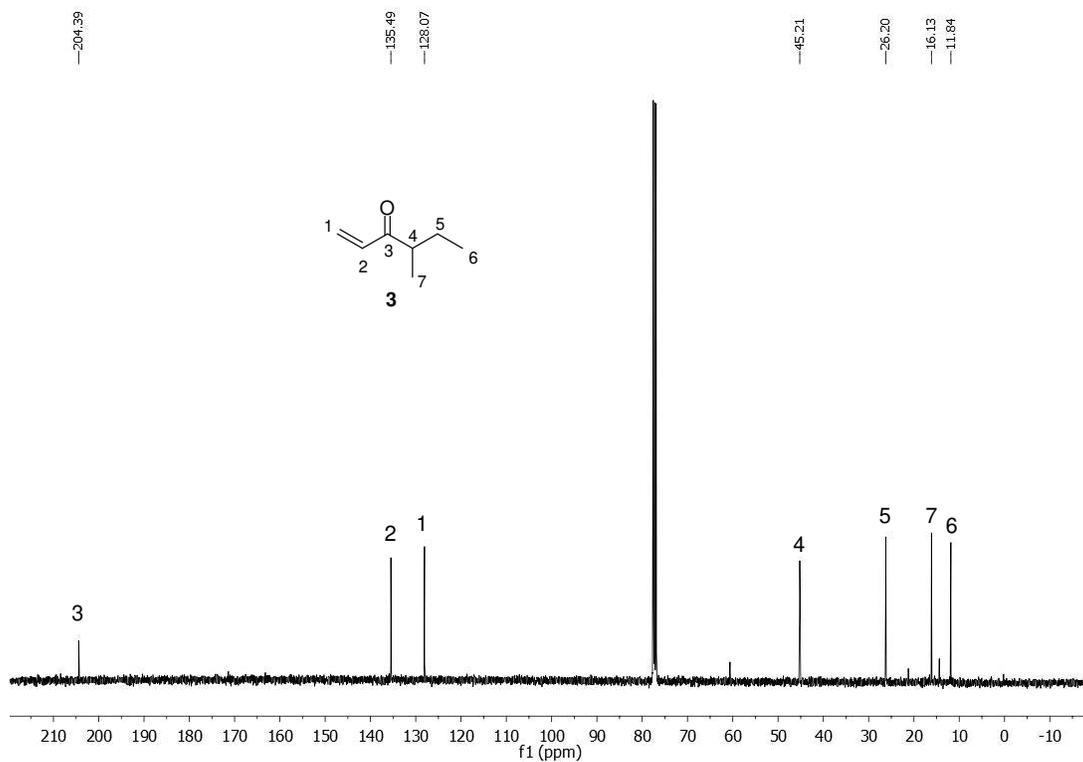


Anexo 18. Cromatograma da secreção de *Sodreana sodreana*

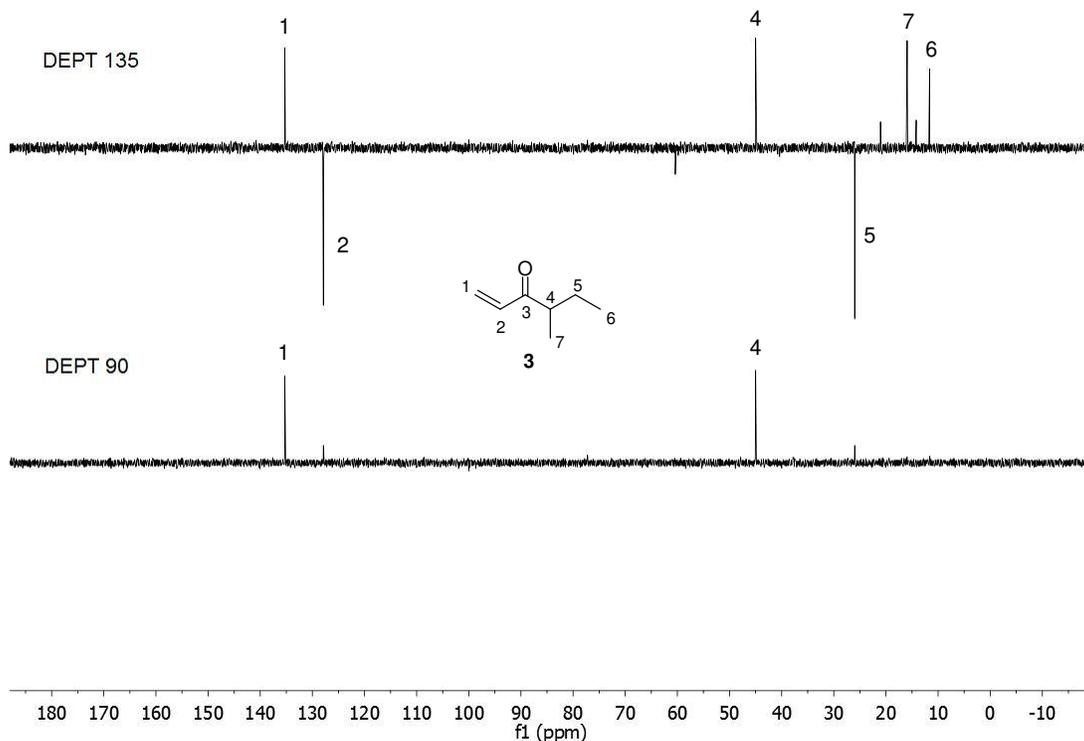
6.2. Espectros de RMN de secreções de opiliões



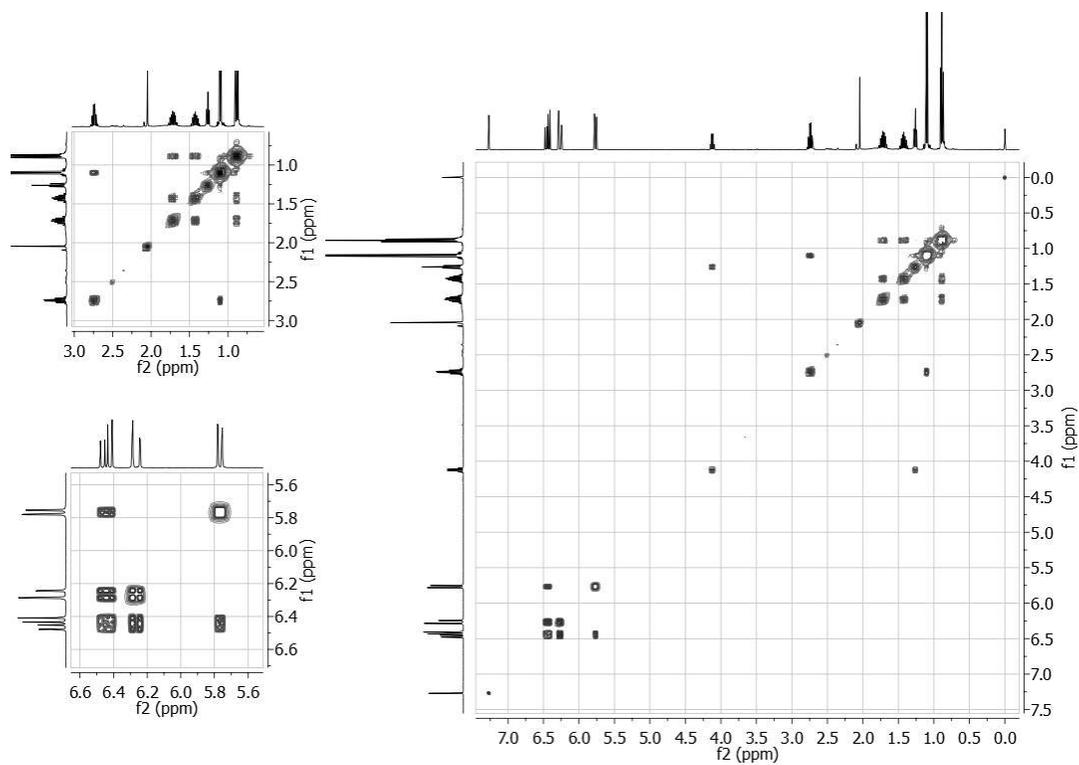
Anexo 19. Espectro de RMN de ^1H (400,13 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *G. saprophilus*



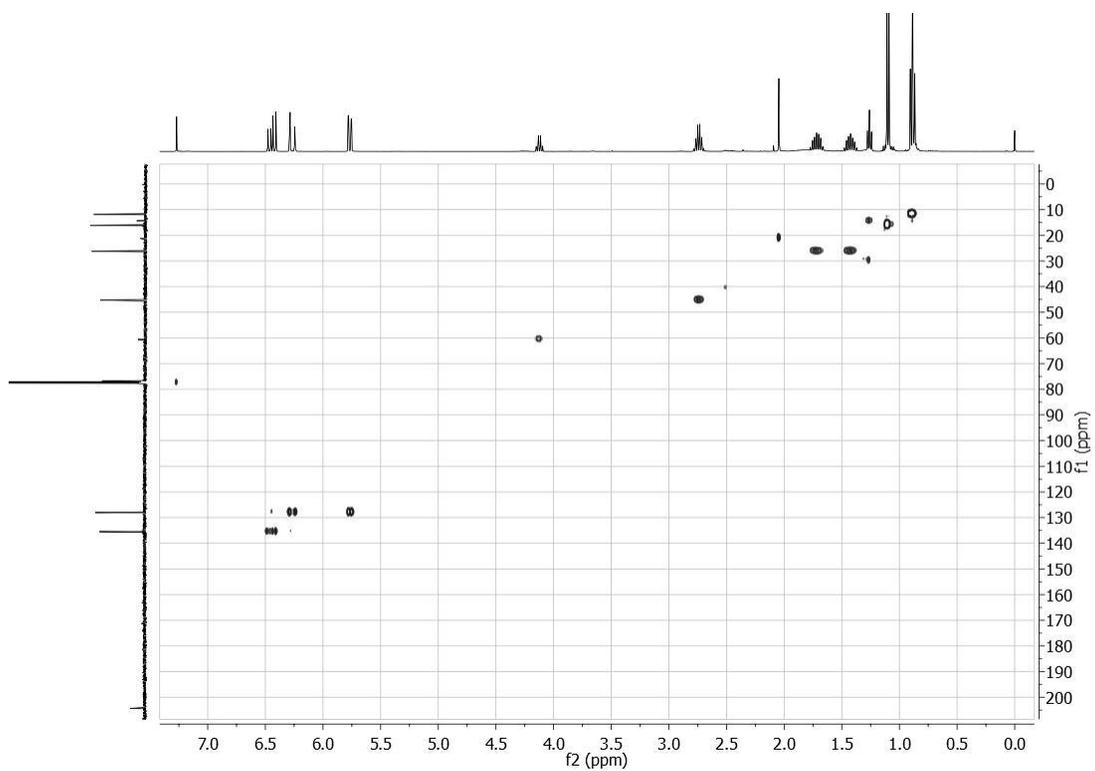
Anexo 20. Espectro de RMN de ^{13}C (100,61 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *G. saprophilus*



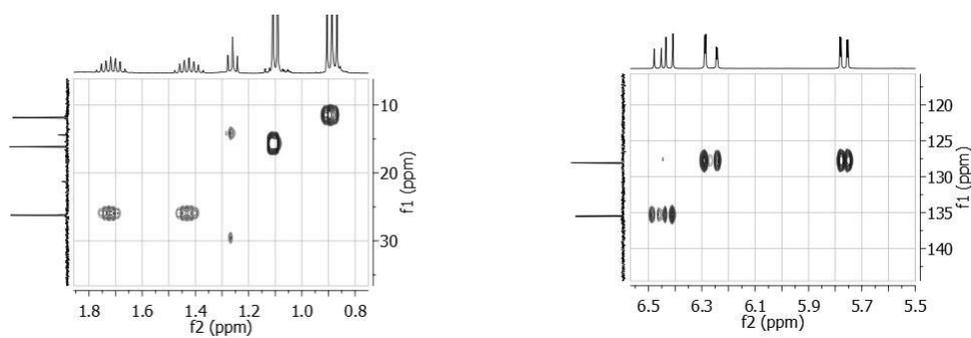
Anexo 21. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (100,61 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *G. saprophilus*



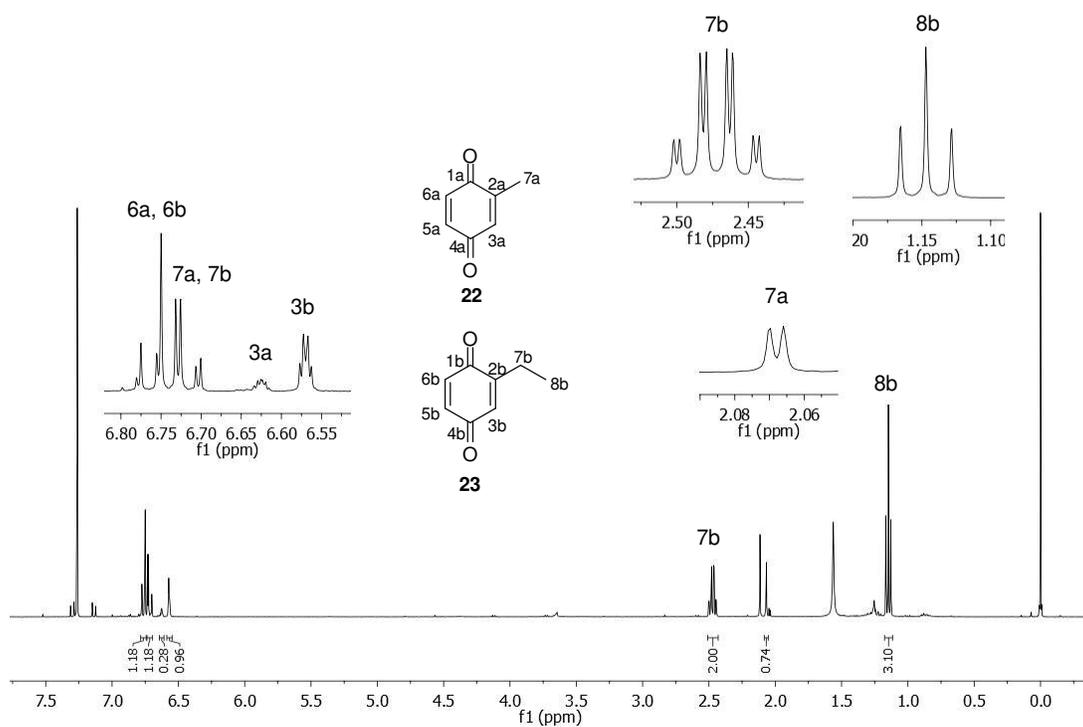
Anexo 22. Mapa de contornos de RMN 2D de correlações ^1H , ^1H (COSY) (400,13 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *G. saprophilus*



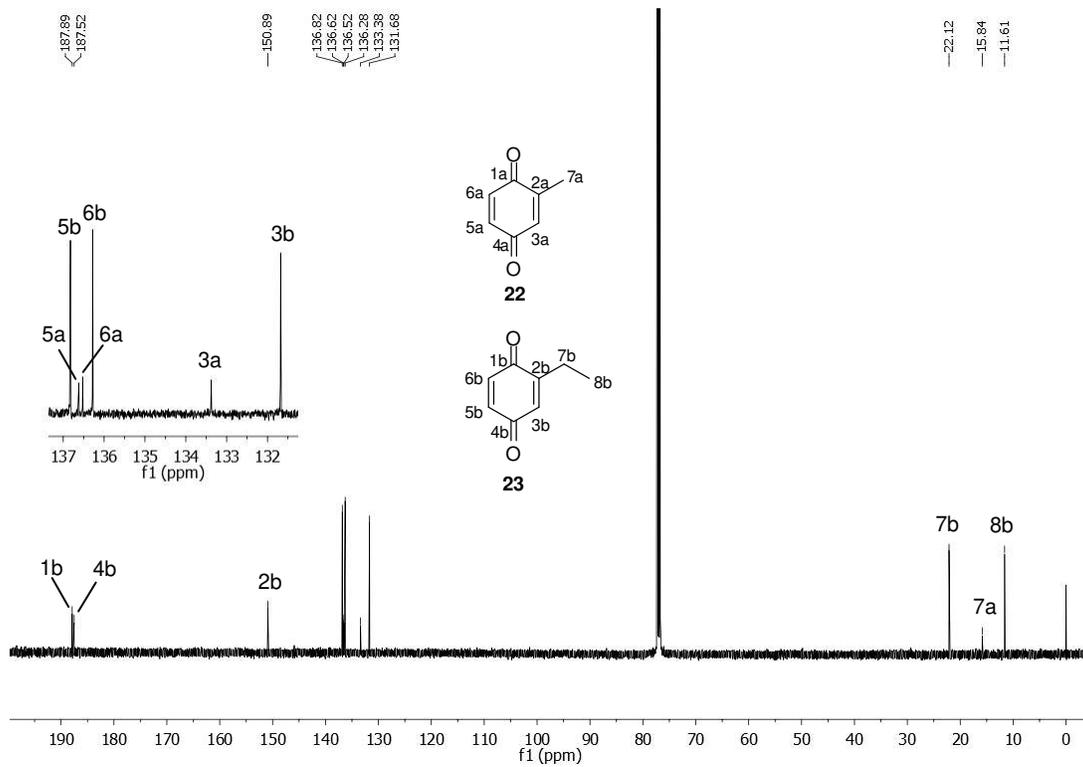
Anexo 23. Mapa de contornos de RMN 2D (CDCl₃, TMS) de correlações ¹H (400,13 MHz), ¹³C (100,61 MHz) ¹J_{HSQC} da secreção de *G. saprophilus*



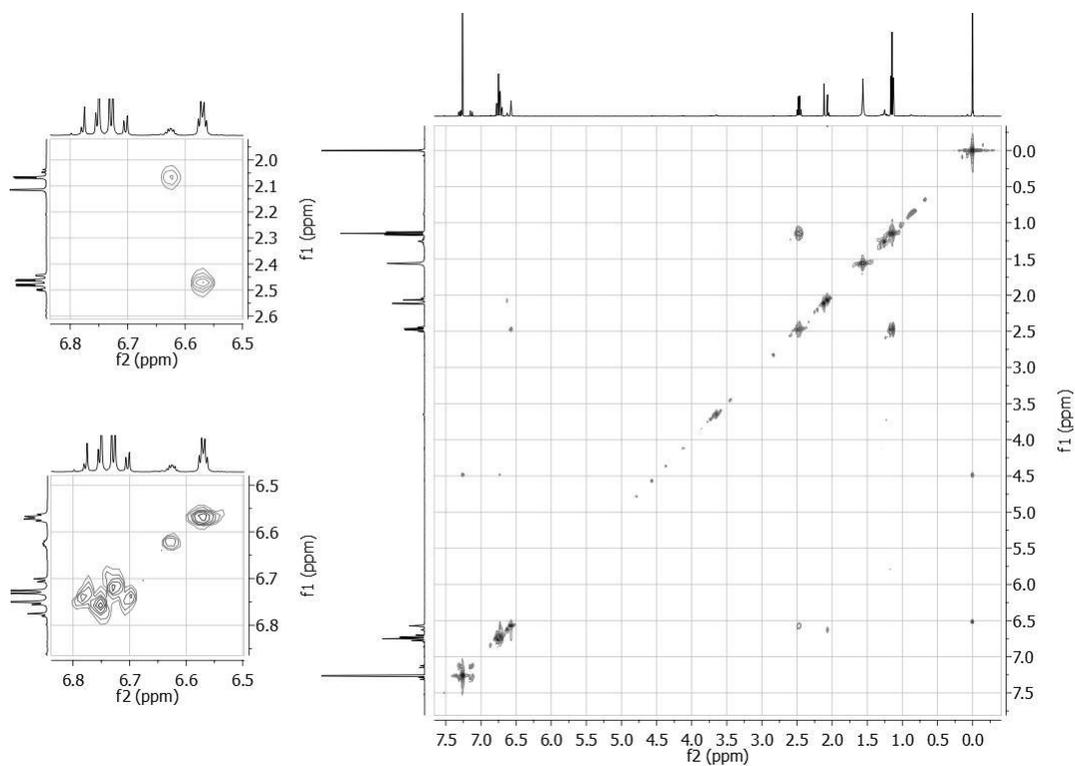
Anexo 24. Ampliações do mapa de contornos de RMN 2D (CDCl₃, TMS) de correlações ¹H (400,13 MHz), ¹³C (100,61 MHz) ¹J_{HSQC} da secreção de *G. saprophilus*



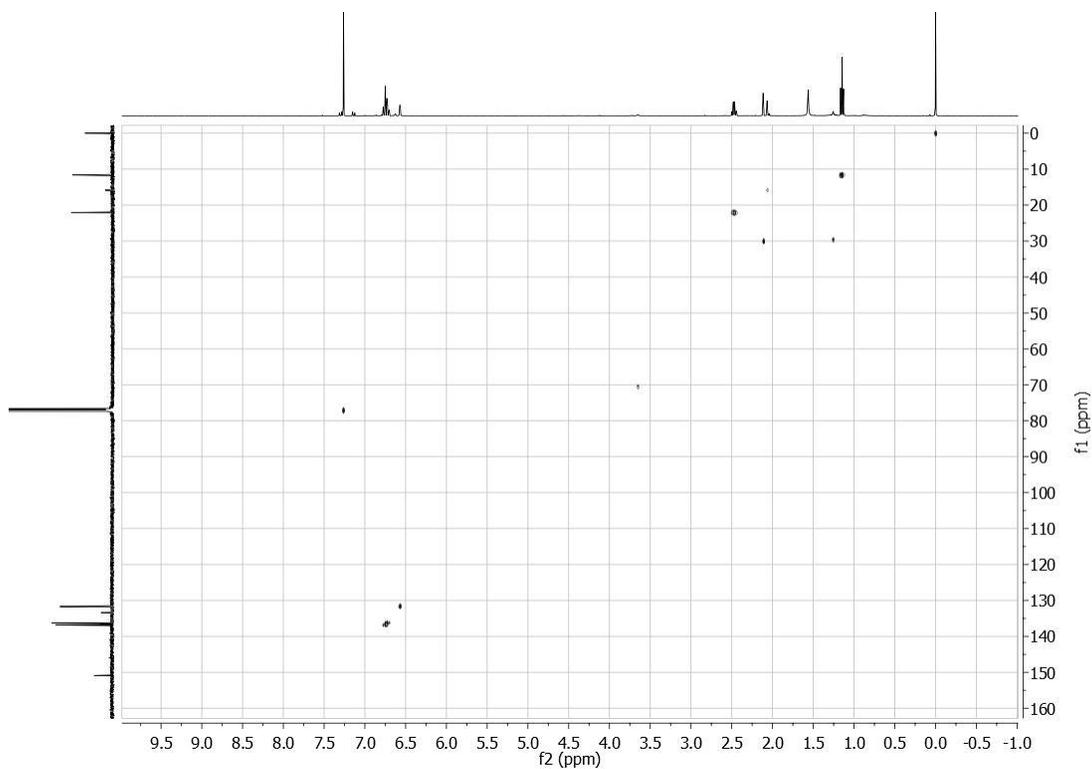
Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H (400,13 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *M. neptunus*



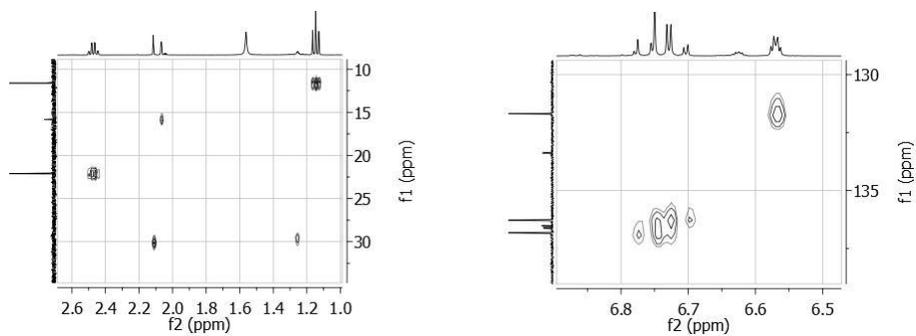
Anexo 26. Espectro de RMN de ^{13}C (100,61 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *M. neptunus*



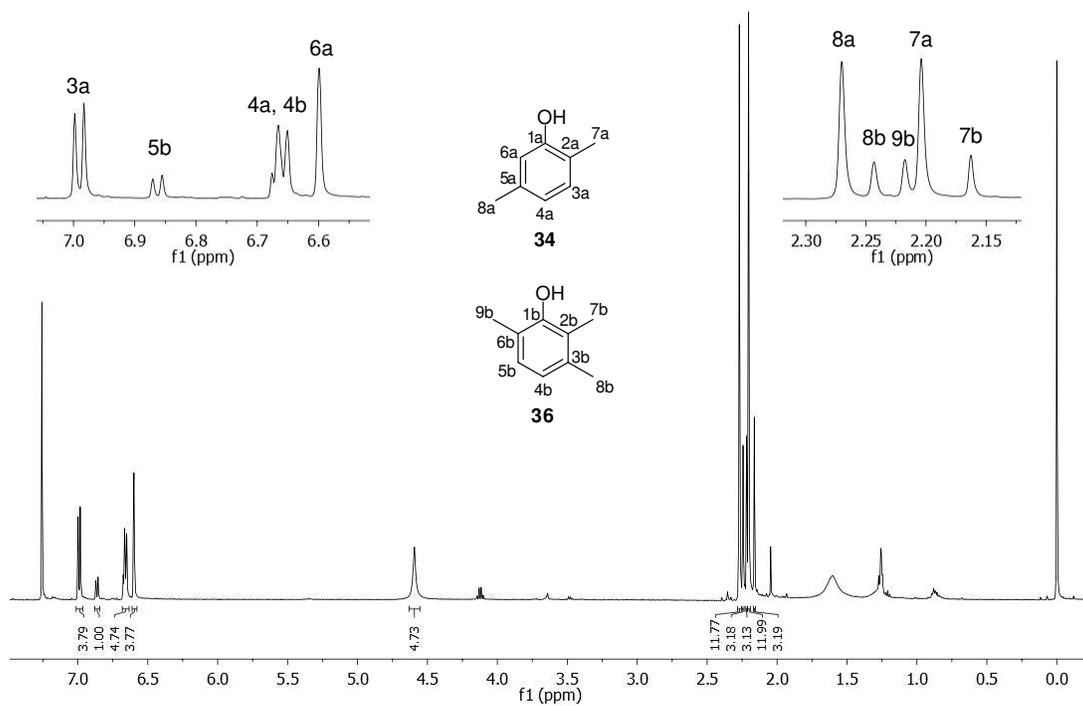
Anexo 27. Mapa de contornos de RMN 2D de correlações ^1H , ^1H (COSY) (400,13 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *M. neptunus*



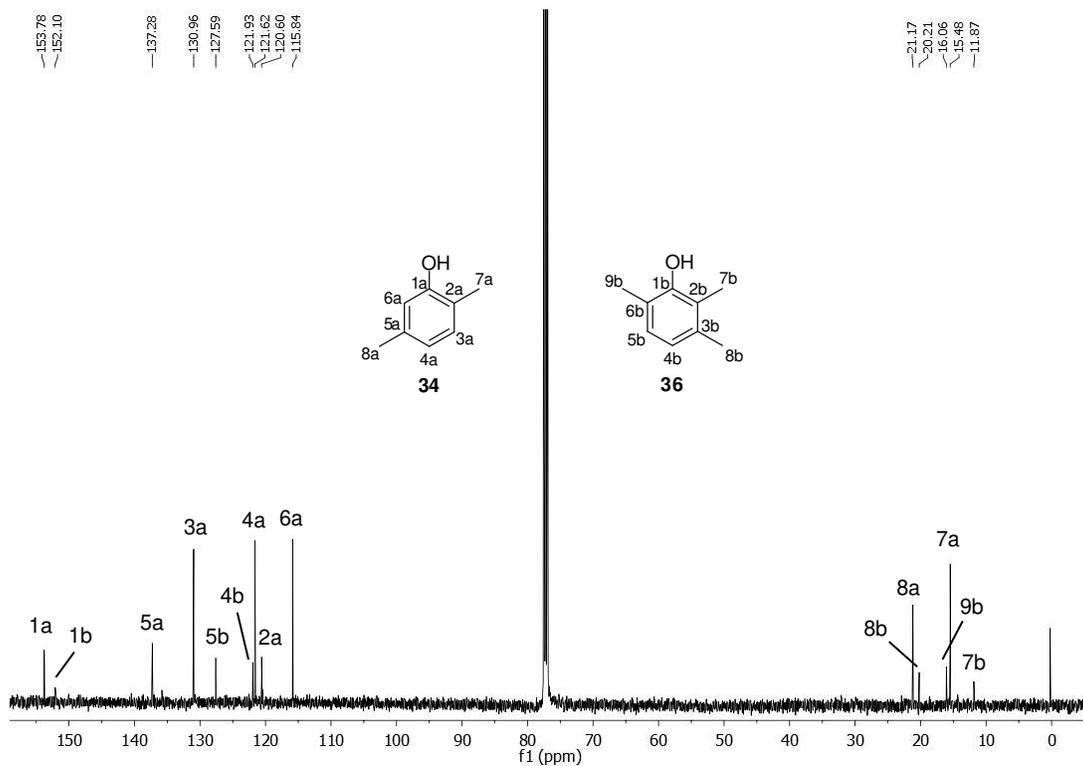
Anexo 28. Mapa de contornos de RMN 2D (CDCl_3 , TMS) de correlações ^1H (400,13 MHz), ^{13}C (100,61 MHz) ^1J HSQC da secreção de *M. neptunus*



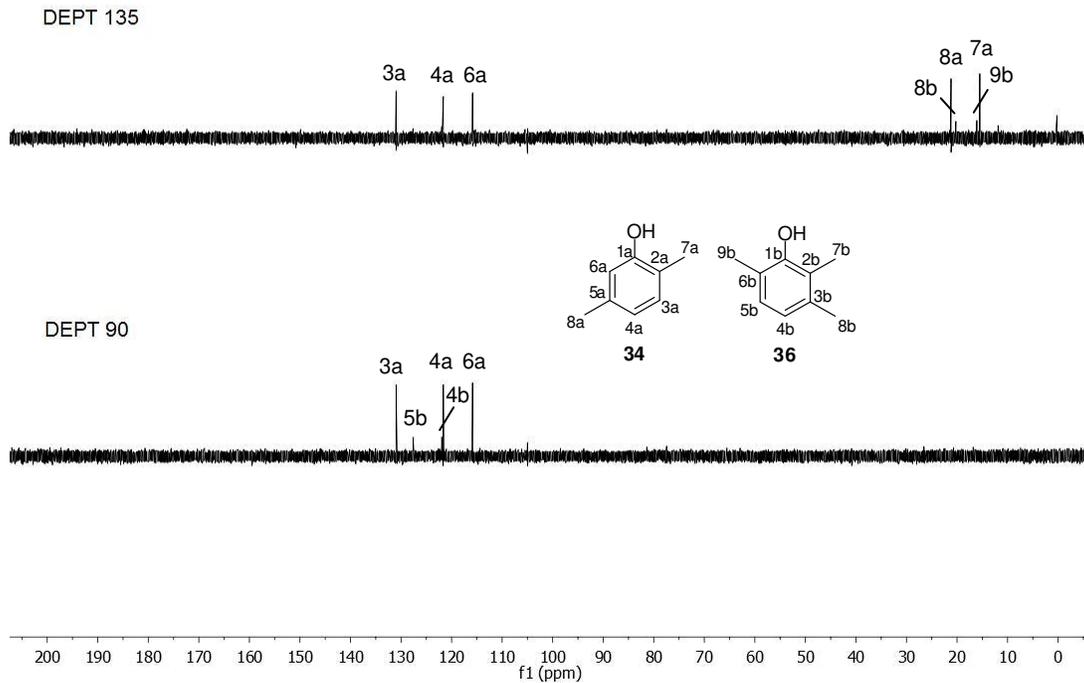
Anexo 29. Ampliações do mapa de contornos de RMN 2D (CDCl_3 , TMS) de correlações ^1H (400,13 MHz), ^{13}C (100,61 MHz) 1J HSQC da secreção de *M. neptunus*



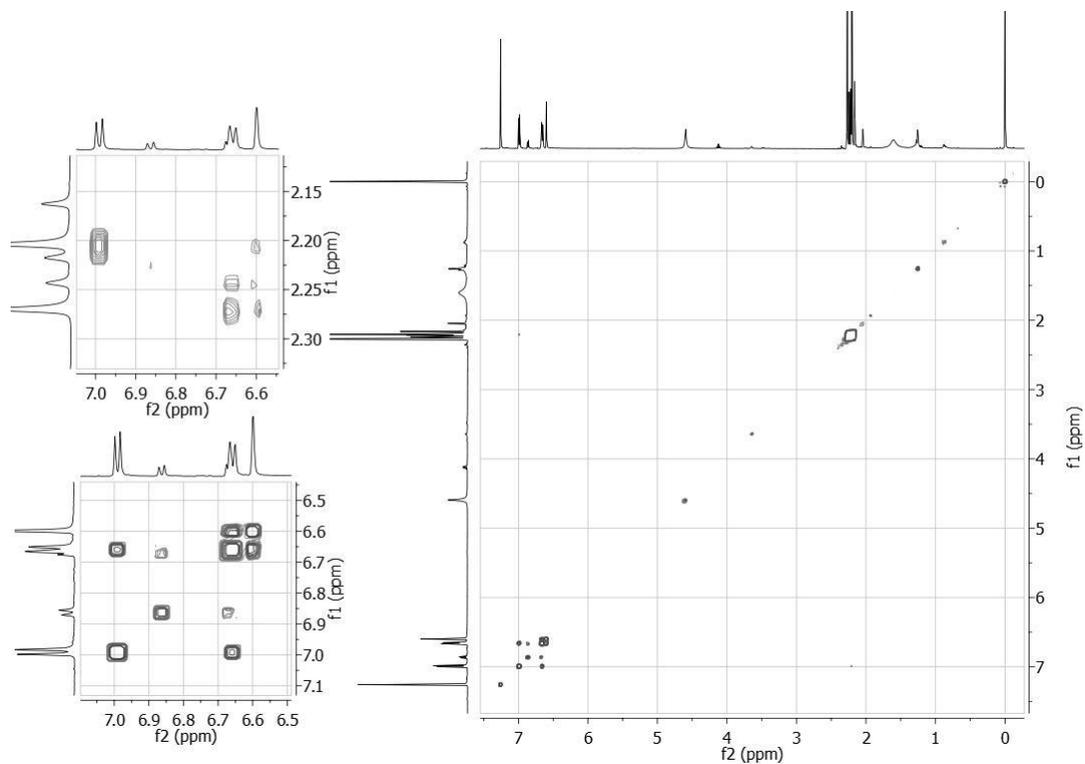
Anexo 30. Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *P. striatus*



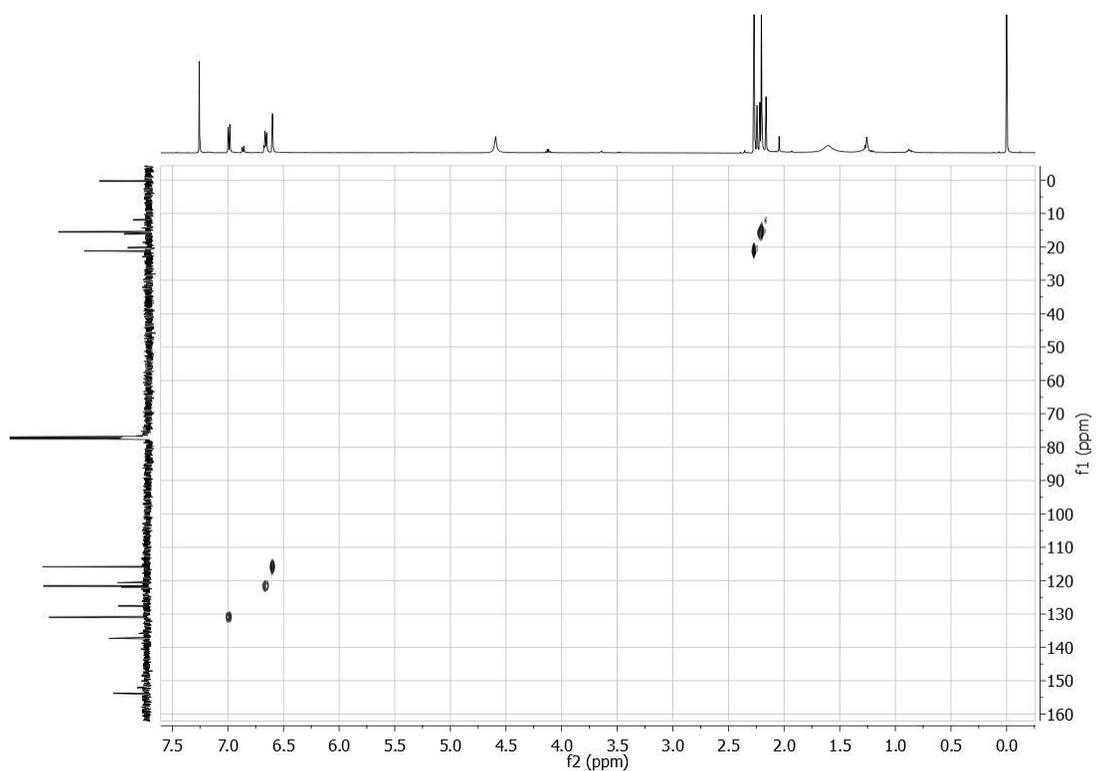
Anexo 31. Espectro de RMN de ^{13}C (125,71 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *P. striatus*



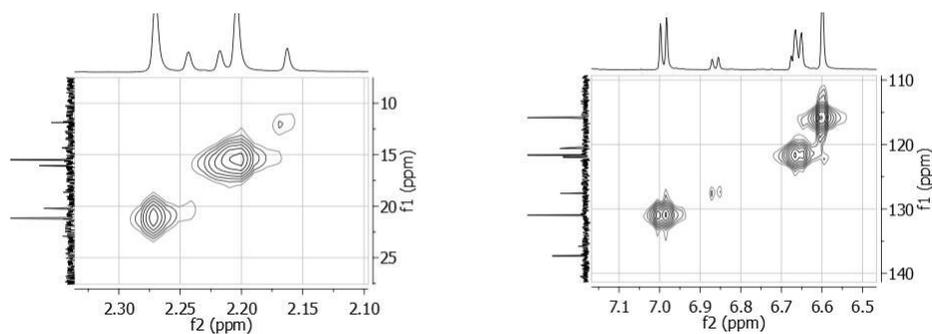
Anexo 32. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,71 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *P. striatus*



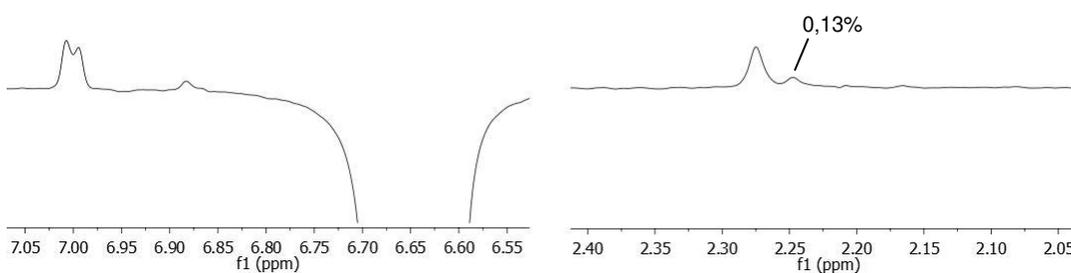
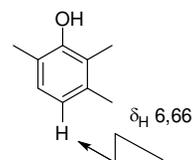
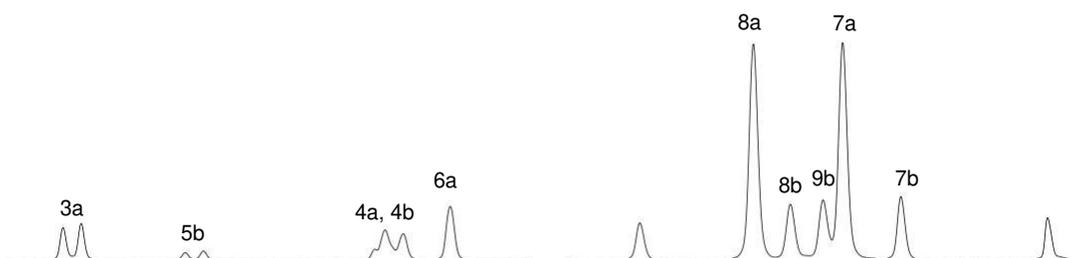
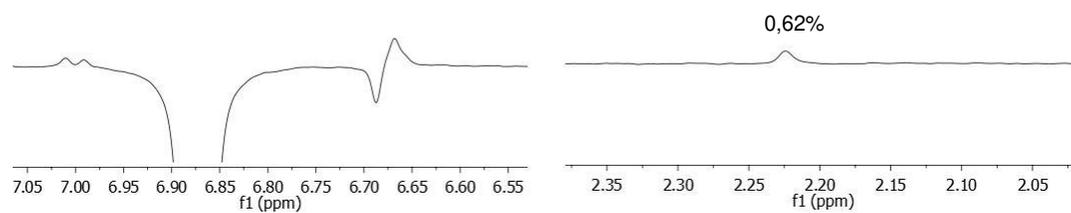
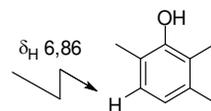
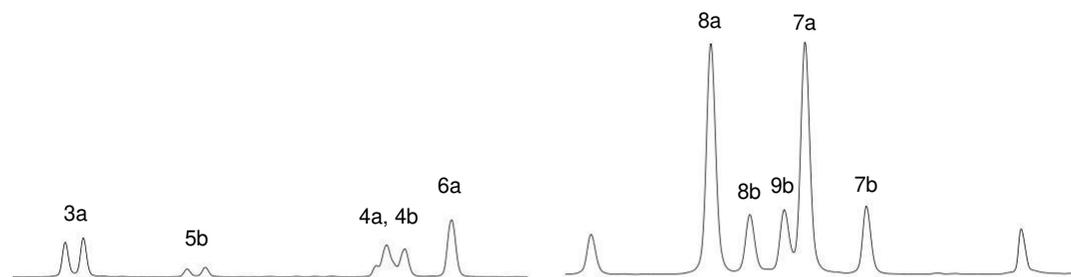
Anexo 33. Mapa de contornos de RMN 2D de correlações ^1H , ^1H (COSY) (499,89 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *P. striatus*



Anexo 34. Mapa de contornos de RMN 2D (CDCl₃, TMS) de correlações ¹H (499,89 MHz), ¹³C (125,71 MHz) ¹J HSQC da secreção de *P. striatus*

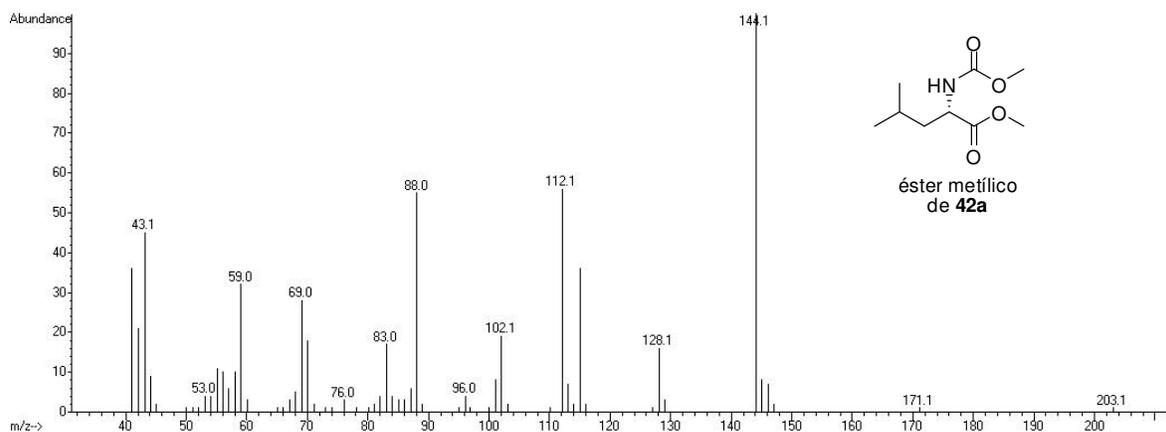


Anexo 35. Ampliações do mapa de contornos de RMN 2D (CDCl₃, TMS) de correlações ¹H (499,89 MHz), ¹³C (125,71 MHz) ¹J HSQC da secreção de *P. striatus*

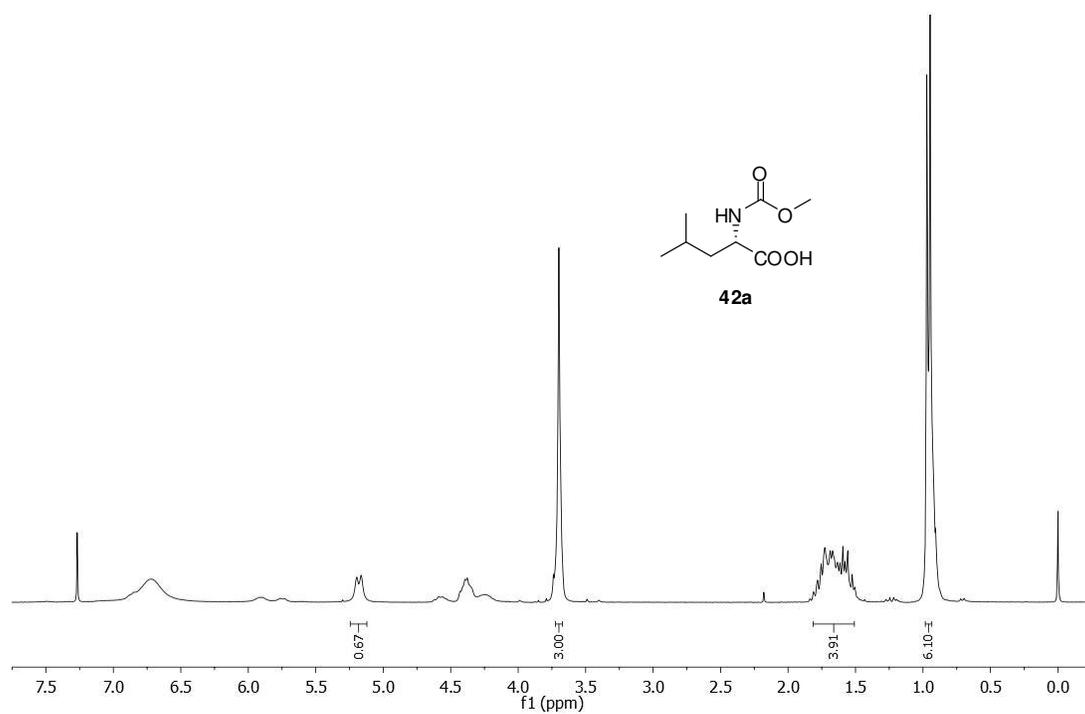


Anexo 36. Espectros de RMN de ^1H (NOESY 1D) (499,89 MHz, CDCl_3 , TMS) da secreção de *P. striatus*

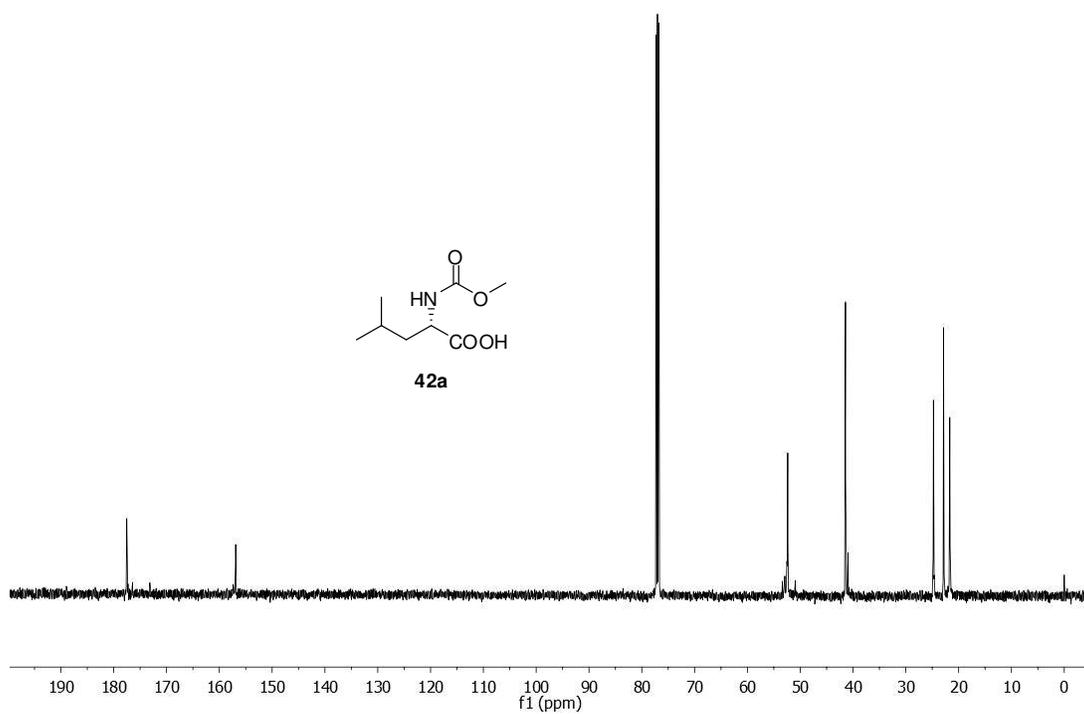
6.3. Espectros de massas e RMN dos compostos sintetizados



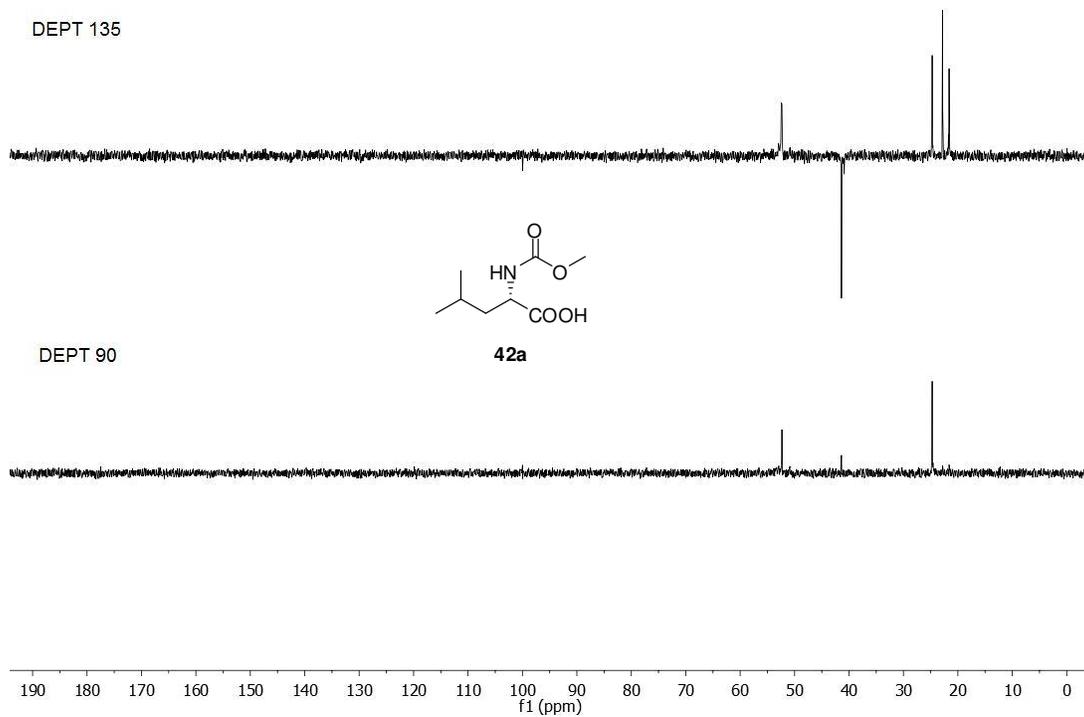
Anexo 37. Espectro de massas do composto **42a**



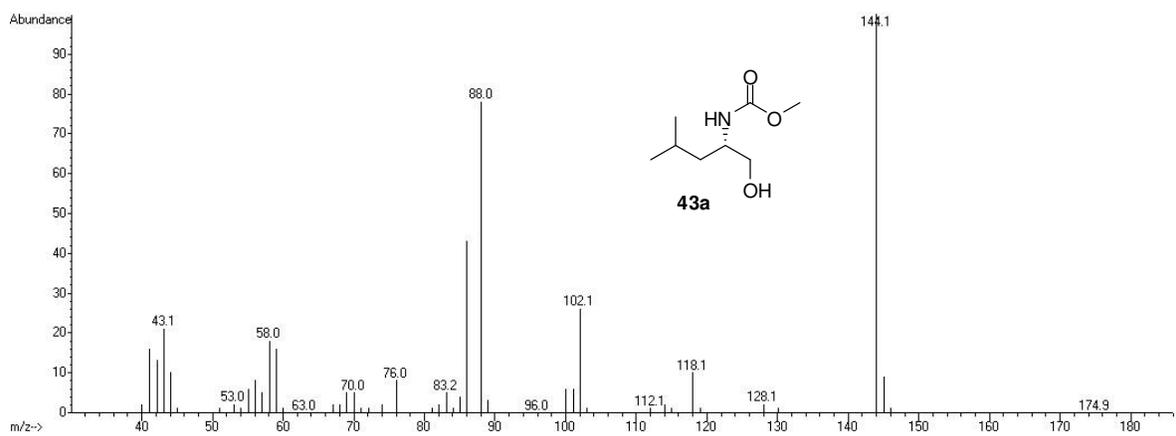
Anexo 38. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **42a**



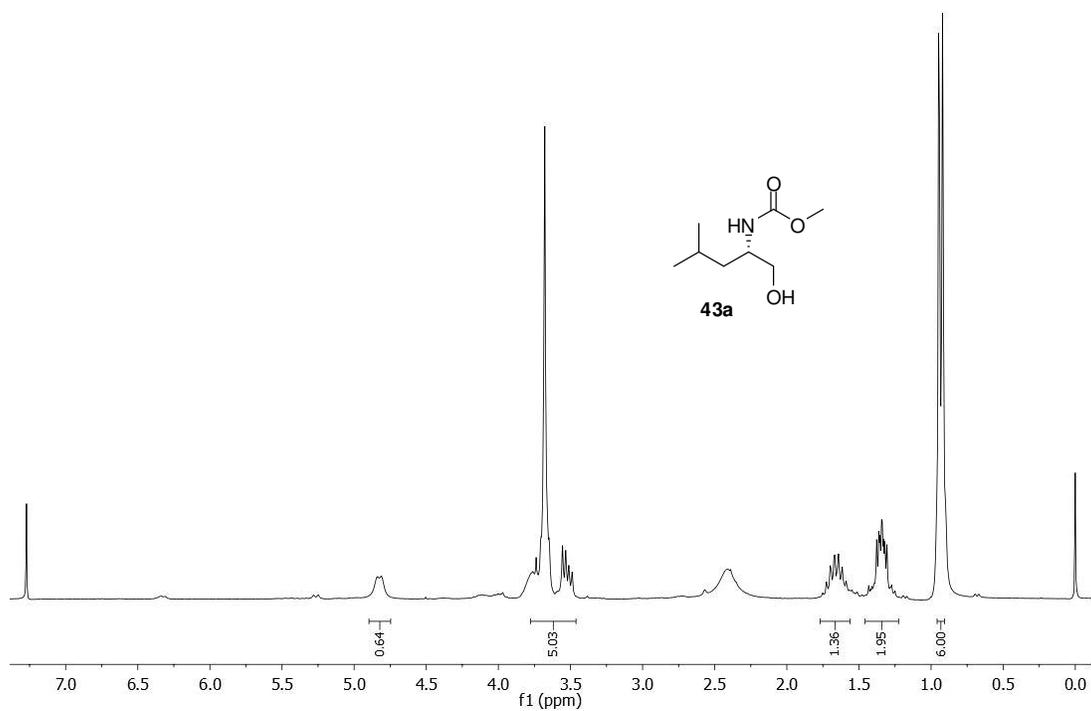
Anexo 39. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **42a**



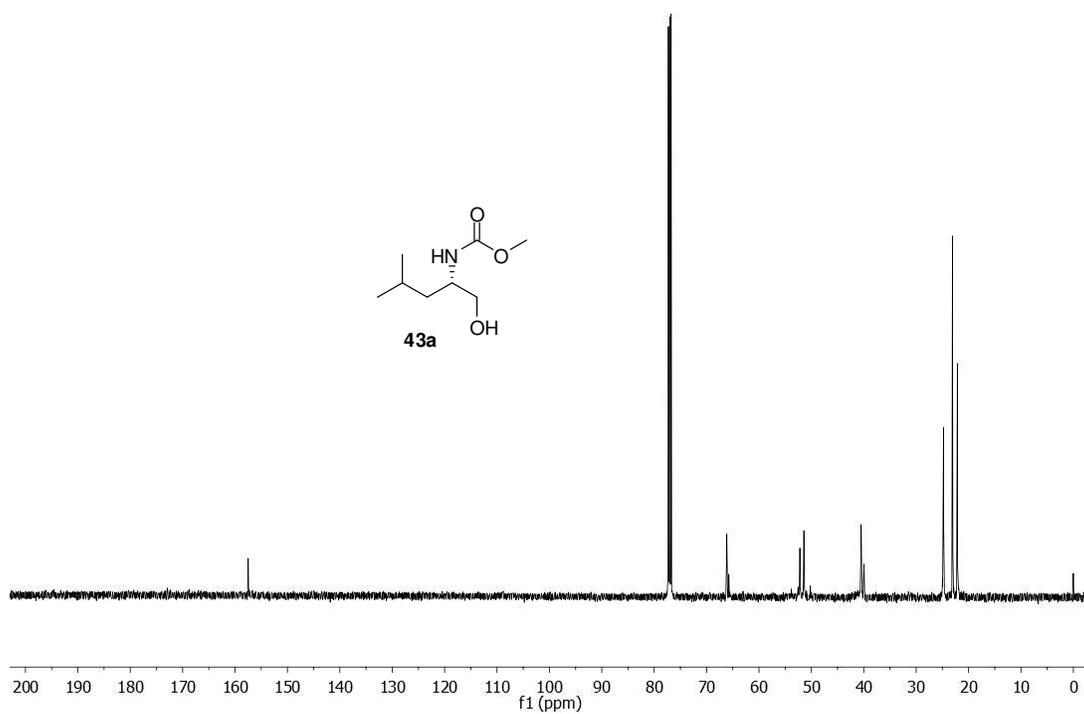
Anexo 40. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (62,90 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **42a**



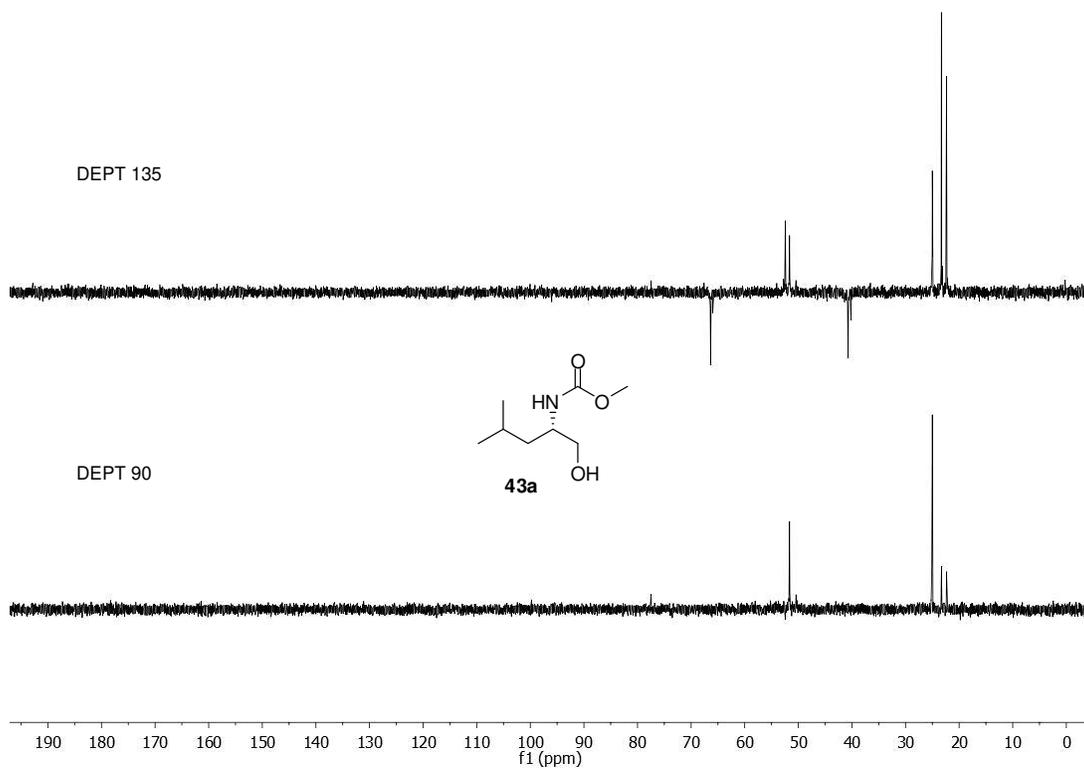
Anexo 41. Espectro de massas do composto **43a**



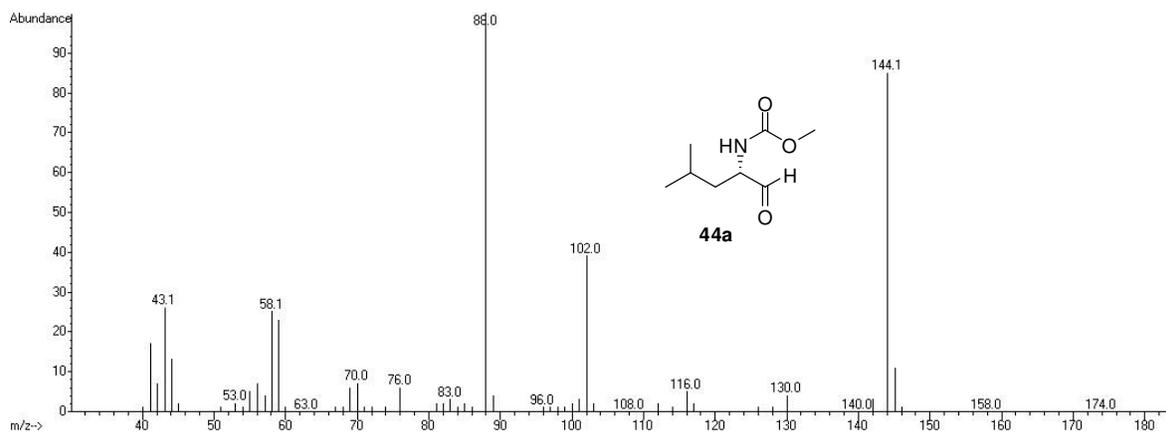
Anexo 42. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **43a**



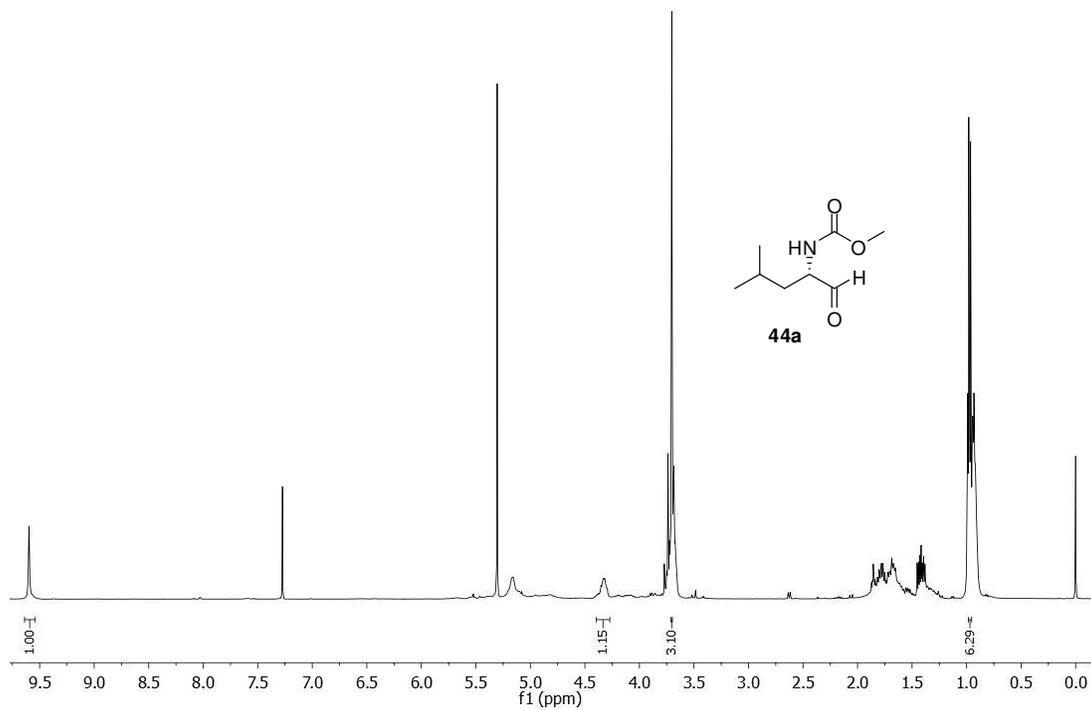
Anexo 43. Espectro de RMN de ¹³C (62,90 MHz, CDCl₃, TMS) do composto **43a**



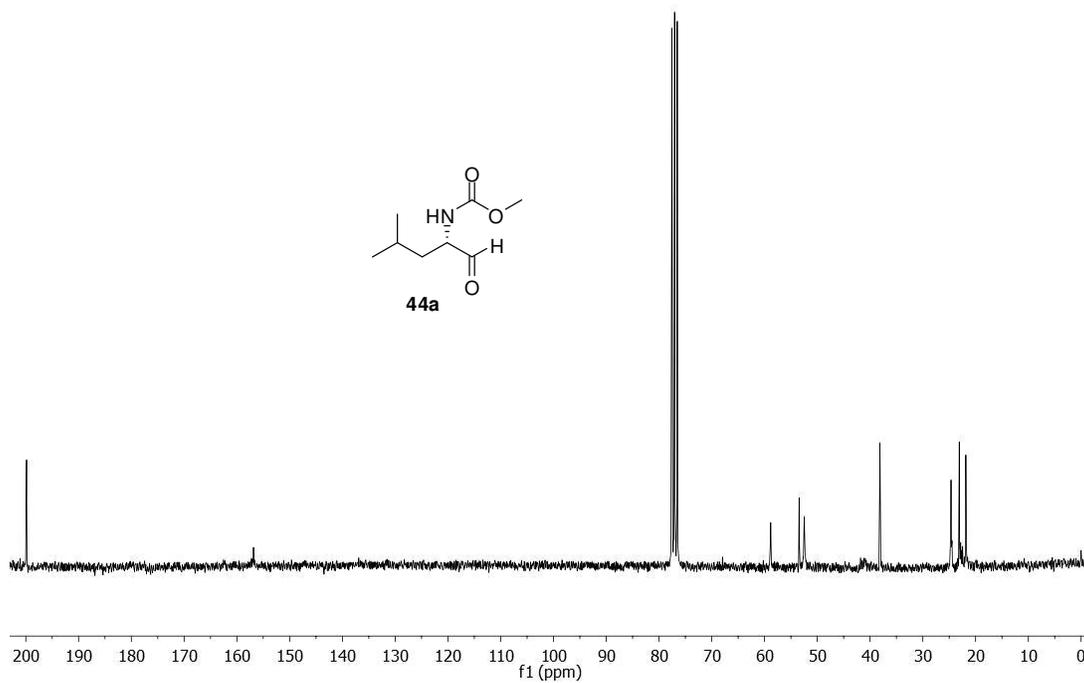
Anexo 44. Espectro de RMN de ¹³C DEPT 135° e DEPT 90° (62,90 MHz, CDCl₃, TMS) do composto **43a**



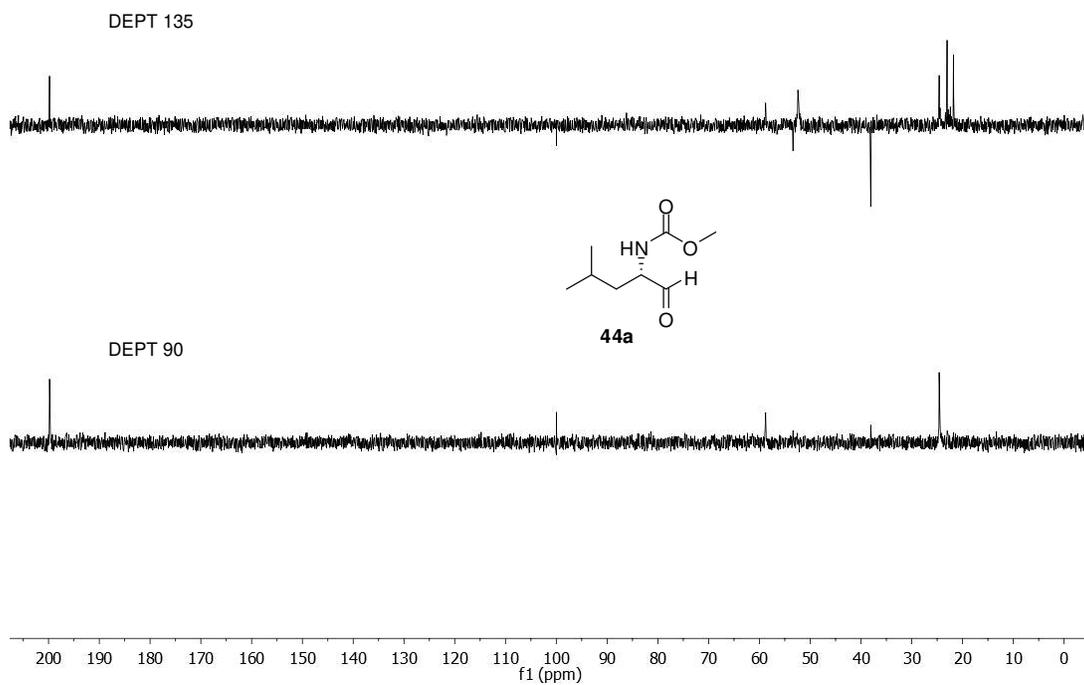
Anexo 45. Espectro de massas do composto **44a**



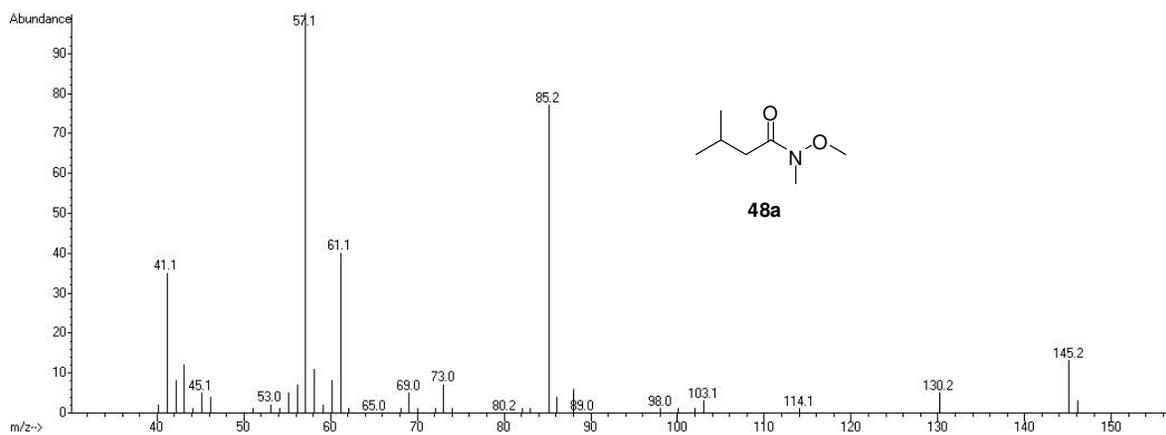
Anexo 46. Espectro de RMN de ^1H (400,13 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **44a**



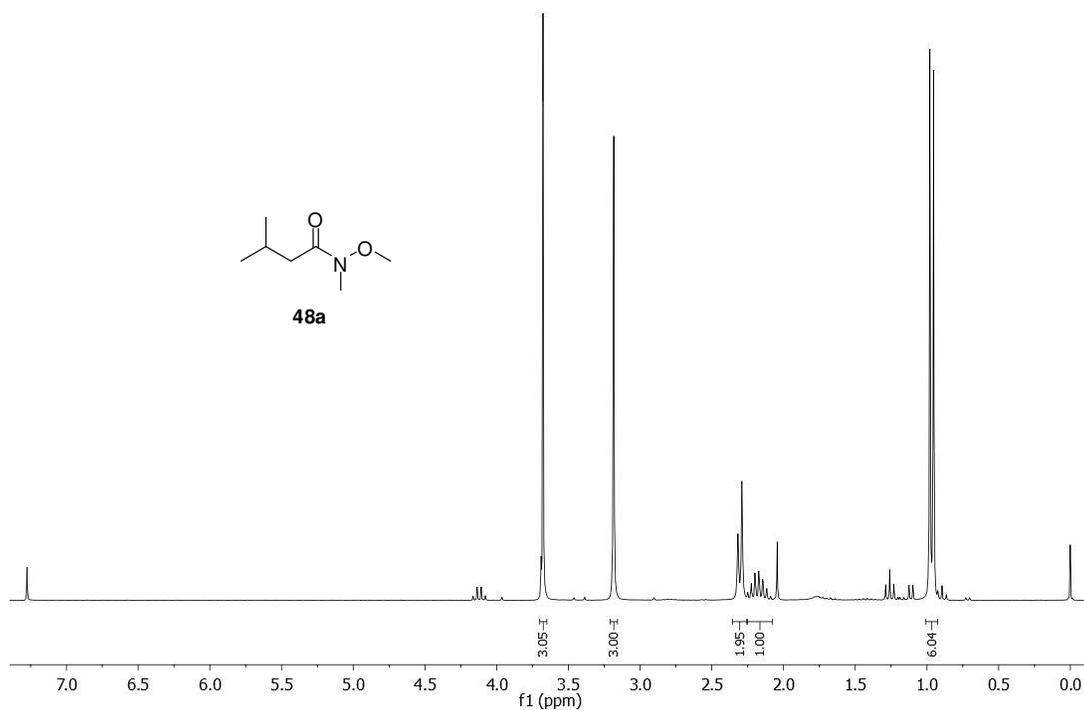
Anexo 47. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 44a



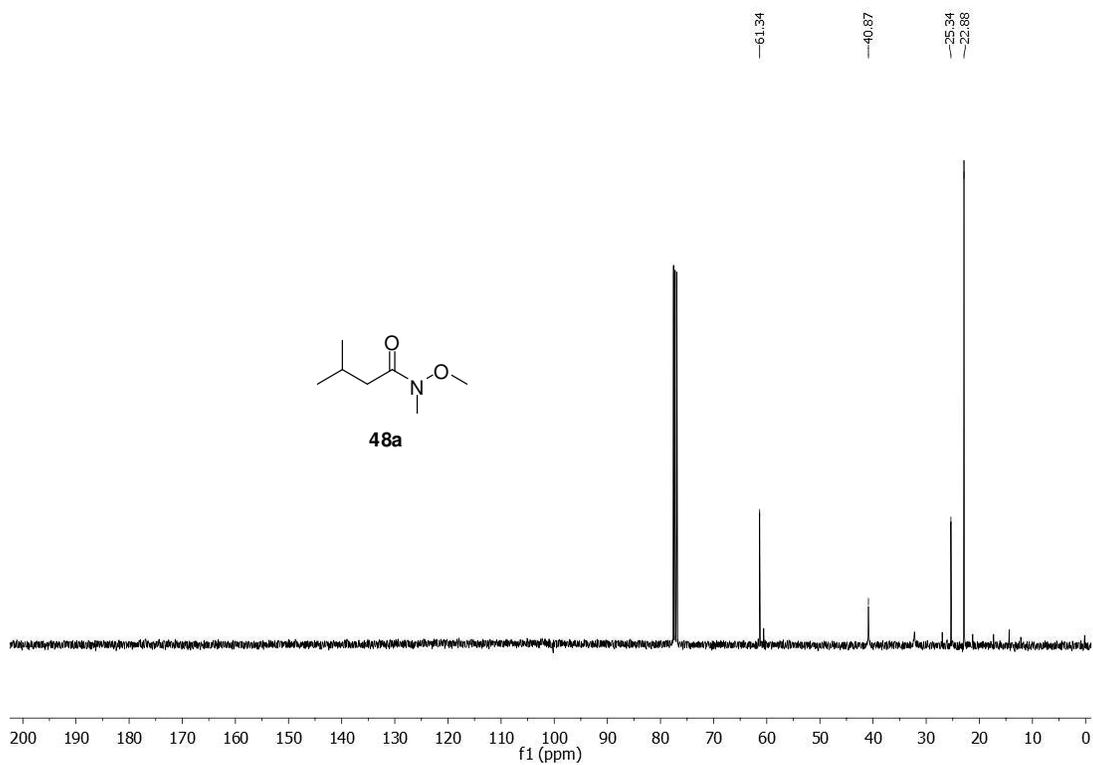
Anexo 48. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (62,90 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 44a



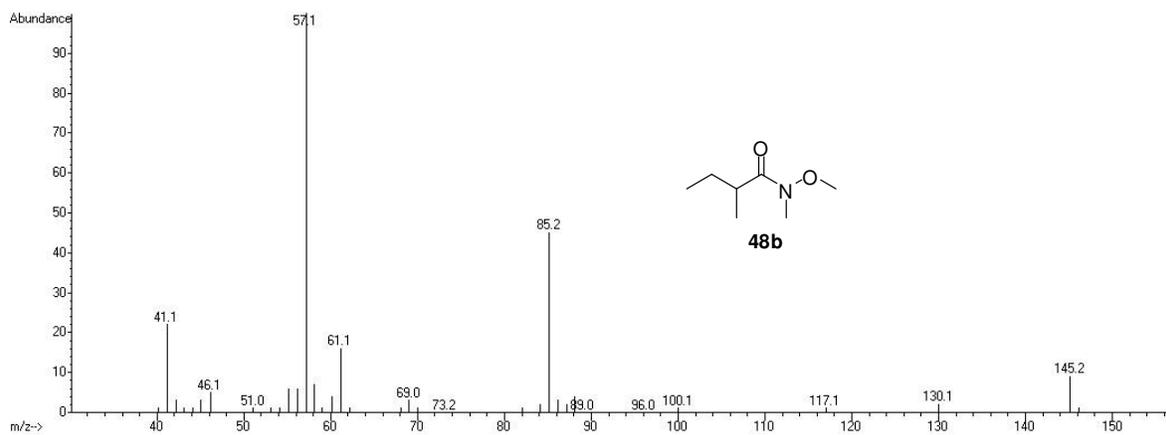
Anexo 49. Espectro de massas do composto **48a**



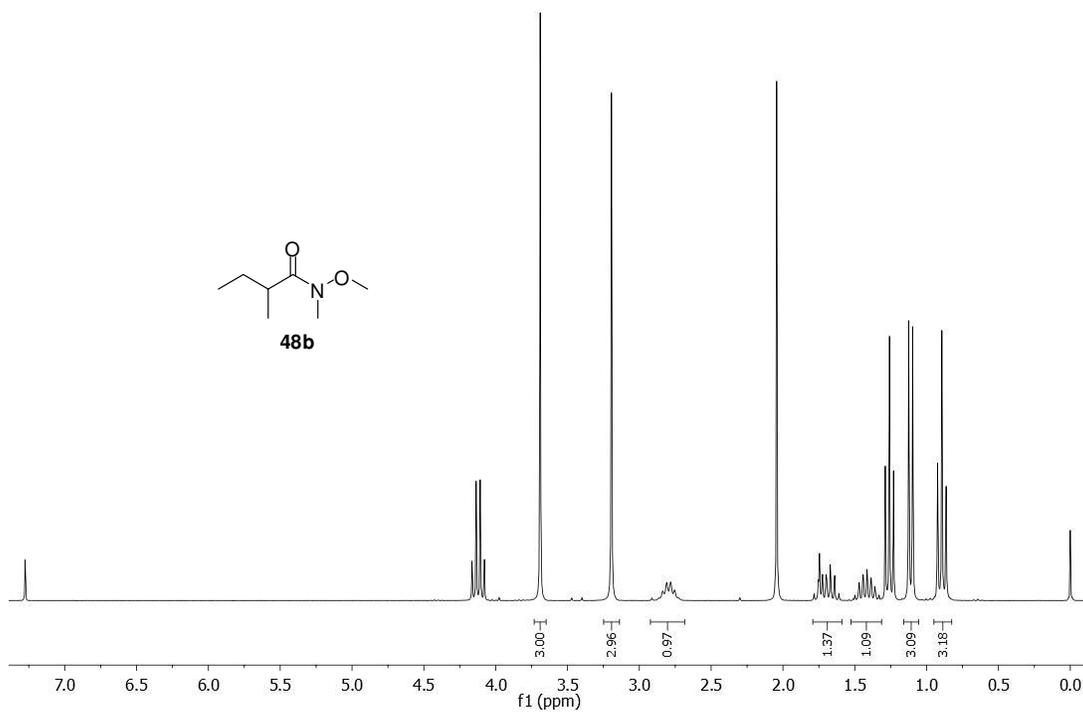
Anexo 50. Espectro de RMN de ¹H (250,13 MHz, CDCl₃, TMS) do composto **48a**



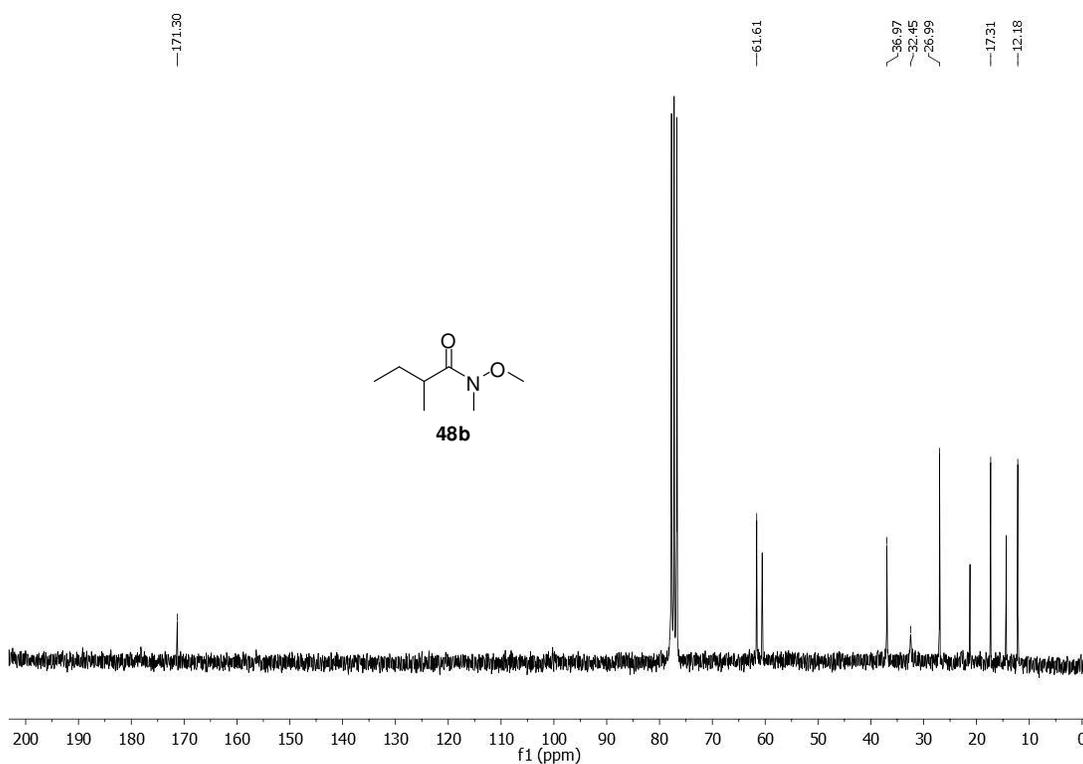
Anexo 51. Espectro de RMN de ^{13}C (100,61 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **48a**



Anexo 52. Espectro de massas do composto **48b**



Anexo 53. Espectro de RMN de ^1H (250,13 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **48b**

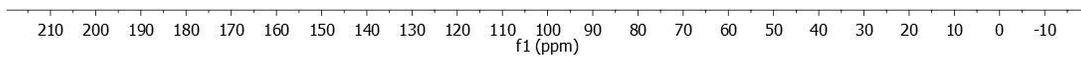
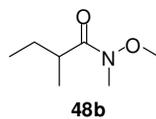


Anexo 54. Espectro de RMN de ^{13}C (62,90 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **48b**

DEPT 135



DEPT 90



Anexo 55. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 $^{\circ}$ e DEPT 90 $^{\circ}$ (62,90 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **48b**