

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Química

Departamento de Química Orgânica

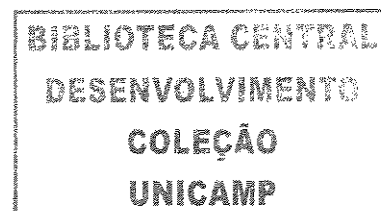
Tese de Doutorado

Caracteres Químicos em Estudos de Filogenia e Biologia de Polinização de
Espécies de *Oncidiinae* (*Orchidaceae*)

Mariza Gomes Reis

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Junho/2005



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE

QUÍMICA DA UNICAMP

UNIDADE	RC
Nº CHAMADA	R277c
V _____ EX _____	
TOMBO BC/	66035
PROC.	16.86.05
C ☐	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	26-20/05
Nº CPD	

R277c

Reis, Mariza Gomes.

Caracteres químicos em estudos de filogenia e biologia de polinização de espécies de *Oncidiinae* (*Orchidaceae*) / Mariza Gomes Reis. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. *Orchidaceae*. 2. *Oncidiinae*. 3. Diacigliceróis.
4. Interação planta-inseto. I. Marsaioli, Anita Jocelyne.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

BIB ID: 366774

Título em inglês: Chemical characters for studies on phylogeny and pollination biology for species of *Oncidiinae* (*Orchidaceae*).

Palavras-chave em inglês: *Orchidaceae*, *Oncidiinae*, Diacylglycerols, Plant-insect interaction.

Área de concentração: Química Orgânica.

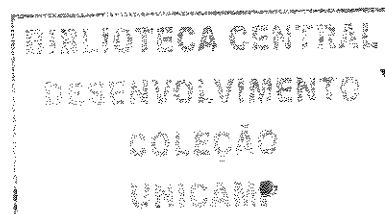
Titulação: Doutor em Ciências.

Banca examinadora: Eva Gonçalves Magalhães, Raquel Marques Braga, Maria Fátima das Graças Fernandes Silva, Massuo Jorge Kato, Paulo Mitsuo Imamura.

Data de defesa: 17/06/2005.

À minha mãe, Vera, aos meus queridos irmãos Roberto e Rodrigo, à minha cunhada Rita e ao meu sobrinho Kevin por todo carinho.

Ao meu adorável maridinho, Marlon, pela eterna paciência e carinho, e por tornar esta jornada muito mais agradável.



AGRADECIMENTOS

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

À Professor Dra Maria do Carmo E. do Amaral e ao Dr. Volker Bittrich obrigada por toda atenção.

À Dra. Aparecida Donisete de Faria pelas identificações das plantas de Oncidiinae, as fotografias e a atenção no decorrer do desenvolvimento desta tese.

Ao Serginho pela a amizade e companhia ao longo destes anos.

À Adriana Flach e ao Rodrigo Singer pelas as discussões sobre biologia de polinização.

Aos amigos de laboratório André, Bira, Samísia, Regina, Gelson, Laverde, Paulinho, Val, Mi, Lu Chen, Suzan, Eduardo, Luiz Antônio, Lucimar, Isis, Adriana e Armando obrigada pela troca de experiências e amizade.

À professora Dra. Eva Gonçalves Magalhães, professora Dra. Raquel M. Braga e ao professor Paulo M. Imamura pelas críticas e sugestões no exame de qualificação.

À Sônia, Soninha, Serginho e Paula pelas aquisições dos espectros de RMN e por sempre estarem dispostos a ajudar.

À todos funcionários do IQ por toda ajuda, atenção e educação

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro em forma de bolsa (processo nº 01/02794-7).

CURRICULUM VITAE

I. Dados Pessoais

Nome: Mariza Gomes Reis
Naturalidade: Americana – SP
Data de Nascimento: 23 – 06 – 1975
Estado Civil: Casada

II. Artigos Publicados em Periódicos

1. Reis, M. G., Pansarim, E. R., Silva, U. F., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J., Pollination attraction devices (floral fragrances) of some Brazilian orchids, *Arkivoc*, **2004**, VI, 103-111.
2. Abreu, I. N., Reis, M.G., Marsaioli, A. J., Mazzaferra, P., Essential oil composition of *Hypericum brasiliense*, *Flavor and Fragrance Journal*, **2004**, *19*, 80-82.
3. Reis, M.G., Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. Onicidinol – a novel diacylglycerol from *Ornithophora radicans* Barb. Rodr. (Orchidaceae) floral oil. *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 8519-8523.
4. Reis, M.G., Faria, A. D., Bittrich, V., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. The chemistry of flower – *Oncidium* (Orchidaceae). *Journal f the Brazilian Chemical Society*, **2000**, *11*, 600

III. Participação em Congressos Nacionais

1. Reis, M. G., Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. *Oncidinol um novo diacilglicerol isolado do óleo flaral de Ornithophora radicans.* 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Salvador-Bahia, 30 de maio a 02 de junho de 2004. Painel - PN-117
2. Reis, M. G., Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. *Síntese de um diacilglicerol inédito encontrado em óleos florais de orquídeas.* 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG 26 a 29 de maio de 2003. Painel - QO-81
3. Faria, A. D., Amaral M. C. E., Reis, M. G., Marsaioli, A. J., Williams, N. H. Whitten, W. M. *Sistemática filogenética e delimitação dos gêneros da subtribo Oncidiinae*

(*Orchidaceae*) *Endêmicos do Brasil* 54^a Congresso nacional de Botânica, Belém – Pa 13 a 13 de Julho de 2003. Painel

4. Reis, M. G., Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. *Um diacilglicerol é a principal recompensa de *Oncidium cornigerum* para *Tetrapedia diversipais**. Congresso de Ecologia Química, Campinas – SP 03 a 06 de Dezembro de 2002. Apresentação Oral - AO19.

5. Reis, M. G., Pansarin, E. R., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. *O papel das fragrâncias florais na interação de orquídeas e seus polinizadores*. Congresso de Ecologia Química, Campinas – SP 03 a 06 de Dezembro de 2002. Painel.

6. Reis, M. G., Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. *Caracteres químicos das secreções florais de *Oncidiinae* (*Orchidaceae*) e sua importância para a filogenia*. PN-188. 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 20 a 23 de maio de 2002. Painel 188

7. Faria, A. D., Castro, M. M., Santos, M. G., Marsaioli, A. J., Amaral, M. C. E., *Comparação da Estrutura anatômica e determinação das substâncias secretadas pelas glândulas de *Oncidium flexuosum* e *O. pubes**, XIII Congresso da Sociedade de Botânica de São Paulo, São Paulo – SP, 04 a 06 de Setembro de 2000. Painel

8. Santos, M. G., Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. *Composição química dos óleos florais das glândulas epiteliais (elaióforos) em espécies do gênero *Oncidium**. 22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 25 a 28 de maio de 1999. Painel 033

9. Santos, M. G.; Paiva, J. A., Barata, L. E. S., Paulo, M. Q. *Estudo químico-ecológico das ceras foliares de *Cassia occidentalis**. PN-129. 21^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG 25 a 28 de maio de 1998. Painel

IV. Participação em Congressos Internacionais

1. Santos, M. G., Pansarin, E. R., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. *The ecological role of the *Stanhopea* (*Orchidaceae*) flowers volatiles*. Painel (PPA-010) 22nd IUPAC – International Symposium on the Chemistry of Natural Products, 3 a 8 de Setembro de 2000, São Carlos- SP.

2. Santos, M. G., Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. *Identification of *Oncidium* (*Orchidaceae*) rewards*. Painel (PPA- 011) 22nd IUPAC – International Symposium on the Chemistry of Natural Products, 3 a 8 de Setembro de 2000, São Carlos- SP.

3. Santos, M. G., Faria, A. D., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J. *The role of *Oncidium* (*Orchidaceae*) oil in pollination*. Painel (P- 131) 2nd IUPAC – International Conference on Biodiversity, 11 a 15 de Julho de 1999, Belo Horizonte - MG.

Resumo

A composição química dos calos florais de 39 espécies, distribuídas em 10 gêneros, da subtribo Oncidiinae foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os resultados obtidos revelam que os componentes majoritários dos óleos florais de 13 espécies são diacilgliceróis substituídos assimetricamente, os demais calos apresentam como metabólitos secundários terpenóides, derivados de ácidos graxos, ésteres benzílicos e diacilgliceróis. Três novas estruturas de 1,2-diacilgliceróis, (2*S*, 3'*R*, 7'*R*)-1-acetil-2-(3', 7'-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol chamado de oncidinol, (3'*R*, 7'*R*)-1-acetil-2-(3'-acetoxi, 7'-hidroxioctadecanoil)-glicerol e 1-acetil-2-(3'-acetoxioctadecanoil)-glicerol, foram isoladas e identificadas por métodos espectroscópicos sendo suas configurações absolutas determinadas por aplicação da metodologia de Mosher. A similaridade química entre os calos florais foi avaliada através de métodos estatísticos. O dendrograma obtido desta análise estatística foi comparado a árvore filogenética obtida através de dados morfológicos, anatômicos e de DNA (introns ribossomal), sendo observado que algumas espécies do gênero *Oncidium* apresentam a composição do calo floral mais similar a outros gêneros (ex. *Ornithophora* e *Baptistonia*) do que a outras espécies do seu próprio gênero sendo o mesmo observado na análise filogenética.

Os resultados do estudo dos calos florais de espécies da subtribo Oncidiinae levou a investigação do fenômeno de mimetismo floral entre Oncidiinae e a família Malpighiaceae, através do estudo da composição química do óleo floral da espécie *Byrsonima intermedia*, cujo principal constituinte é um novo derivado de ácido graxo, ácido (3*R*, 7*R*)-3,7-diacetoxi-

docosanóico, que foi denominado de ácido birsónico. A similaridade entre a porção do ácido graxo do ácido birsónico e o oncidinol foi intrigante e sugere a presença de um mimetismo químico entre estes dois grupos de plantas que oferecem derivados de ácidos graxos como recompensa para abelhas polinizadoras. Outra evidência deste mimetismo foi investigada através da composição química da provisão larval do ninho da abelha *Tetrapedia diversipes* descrita como polinizadora de ambas famílias. Como resultado, foram detectadas as presenças dos ácidos 3,7-diidroxi-eicosanóico e 3,7-diidroxi-docosanóico denominados respectivamente de ácido tetrapédico A e B ambos estruturalmente relacionados aos compostos presentes em espécies de *Oncidiinae* e *Byrsonima intermedia* (Malpighiaceae). Isto demonstra que as abelhas coletam e usam os óleos florais para o provisionamento do ninho..

Investigações adicionais revelaram que o óleo floral de uma terceira família de plantas representada por *Calceolaria x herbeohybrida* (Scrophulariaceae), também apresenta similares derivados de diacilgliceróis, 1-acetil-2-(3'-acetoxi-hexadecanoil)-glicerol. Esta observação indica que famílias filogeneticamente distantes estão ligadas por recompensas florais análogas para atrair abelhas coletoras de óleos florais. Neste trabalho, foi mapeada a rota química das recompensas florais de vários gêneros não relacionados e como sua presença é importante para a sobrevivência de abelhas coletoras de óleos florais. Também foram realizados estudos sintéticos visando a obtenção de diacilgliceróis naturais.

Abstract

The chemistry of the of 39 floral calluses of specimen belonging to the subtribe Oncidiinae is described revealing that diacyl-glycerols asymmetrically substituted are the major floral oil components in 13 species, in other calluses the terpenoids, fatty acid derivatives, flavonoids, benzyl esters and diacylglycerols are the secondary metabolites. Unknown constituents were isolated from cultivated species allowing the total structural determination of three new 1,2-diacylglycerols: (2*S*, 3'*R*, 7'*R*)-1-acetyl-2-(3', 7'-diacetoxo-eicosanoyl)-glycerol named oncidinol, (3'*R*, 7'*R*)-1-acetyl-2-(3'-acetoxo, 7'-hydroxy-octadecanoyl)-glycerol and 1-acetyl-2-(3'-acetoxo-octadecanoyl)-glycerol. The results were analyzed by statistical methods. The distribution patterns of the calluses chemical constituents in Oncidiinae were compared with the phylogenetic tree derived from the introns of the ribosomal DNA, morphological and anatomical data.

This unusual glycerol and fatty acid derivatives prompted us to further investigate the Oncidiinae and Malpighiaceae floral mimicry by studying chemical composition of *Byrsonima intermedia* floral oil. This research revealed that the main constituent of this oil was a new fatty acid derivative, the (3*R*, 7*R*)-3,7-diacetoxi-docosanoic acid named byrsonic acid. The similarity between byrsonic acid and oncidinol fatty acid moiety was intriguing suggesting chemical mimicry among species offering fatty acid derivatives as floral rewards to pollinating bees. Other evidence of this mimicry was investigated by analyzing *Tetrapedia diversipes* (oil collecting bee) nest provision. As result, it was detected the presence of 3,7-dihydroxy-eicosanoic and 3,7-dihydroxy-docosanoic acid named tetrapedic acid A and B, respectively, both structurally related to compounds present in Oncidiinae

species and *Byrsonima intermedia* (Malpighiaceae). This shows that oil collecting bees use the floral rewards.

Further investigation shown that floral oil a third family of plants, represented by *Calceolaria x herbeohybrida* (Scrophulariaceae), also revealed the presence of a similar glycerol derivative, 1-acetyl-2- (3-acetoxy-hexadecanoyl)-glycerol which indicates that species from different families are linked by analogous floral reward in order to attract pollinating bees. Finally, we have mapped the chemical route of floral reward of several unrelated genera and how their offer is important to oil collecting bees survival. It was also done studies to synthesize natural diacylglycerols.

ABREVIATURAS

Cq	Carbono quaternário
CO	Carbonila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas
COSY	Correlation Spectroscopy (Espectro bidimensional de correlação H,H)
<i>d</i>	dubleto
DCC	1,3-diciclohexicarbodiimida
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DEPT	Distortioneless Enhancement by Polarization Transfer (Incremento sem distorção por transferência de polarização)
DMPA	4-dimetilamino-piridina
EM	Espectro de massas
EMAR	Espectro de massas de alta resolução
EM-ESI	Espectro de massas – Fonte de ionização - Elettron Ionization Spray
eV	Elétron Volt
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Espectro de RMN bidimensional de correlação C, H a uma ligação)
HMBC	Espectro de RMN bidimensional de correlação C, H a mais de uma ligação
IR	Índice de Retenção
IV	Infra-Vermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
M^+	Íon Molecular
MTPA	Ácido α -metoxi- α -(trifluormetil)fenil-acético
MHz	Mega Hertz
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	singleto
<i>t</i>	triplete
TR	Tempo de retenção
UEC	Herbário da Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Espécies da subtribo Oncidiinae estudadas neste trabalho.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 2. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (CDCl_3, 500 MHz, δ-TMS), ^{13}C (CDCl_3, 125 MHz, δ - CDCl_3), COSY, HSQC e HMBC para o Oncidinol.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 3. Atribuição dos dados parciais de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3, δ-TMS) dos ésteres 6a e 6b</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 4. Atribuição dos dados parciais de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3, δ-TMS) dos ésteres dos compostos 9a e 9b.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 5. Atribuição dos dados parciais de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3, δ-TMS) para os ésteres dos compostos 10a e 10b derivado do (S)- e (R)-Mosher.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 6. Tabela com a composição química do óleo floral de Oncidium pubes referente ao cromatograma da Figura 38</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 7. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3, δ-TMS), ^{13}C (125 MHz, δ-CDCl_3), COSY, HSQC e HMBC para o composto 11 do óleo floral de Oncidium pubes</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 8. Tabela com a composição química do óleo floral de Zigostates lunata referente ao cromatograma da Figura 47</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 9. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3, δ-TMS), ^{13}C (125 MHz, δ-CDCl_3) para o composto 18 do óleo floral de Zigostates lunata.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 10. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$, δ-TMS), ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$, δ-CDCl_3), COSY, HSQC e HMBC para o composto 50.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabela 11. Compostos identificados nos calos florais de 39 espécies da subtribo Oncidiinae. Os números na tabela representam a abundância relativa (%) dos compostos identificados em cada calo floral</i>	<i>96</i>
<i>Tabela 12. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3, TMS), ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), COSY, HSQC e HMBC para o Ácido Birsónico.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabela 13. Atribuição parcial dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3, TMS^a) para os ésteres de Mosher do ácido birsónico diagnósticos para determinação da congfiguração absoluta.....</i>	<i>124</i>

<i>Tabela 14. Compostos identificados na massa alimentar do ninho da abelha <i>Tetrapedia diversipes</i></i>	<i>132</i>
<i>Tabela 15. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3, δ-TMS), e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3, δ-CDCl_3), para os compostos 57 e 59</i>	<i>135</i>
<i>Tabela 16. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3), ^{13}C (125 MHz) para o composto 60, e RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para o composto acetilado 61.....</i>	<i>144</i>
<i>Tabela 17. Condições reacionais para a reação aldólica.....</i>	<i>158</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da flor de <i>Oncidium longipes</i>	2
Figura 2. A- Elaióforo epidermal, B – Elaióforo tricomáceo,	6
Figura 3. Abelha Rediviva coletando óleo de flores de <i>Diascia</i> ¹² ,	8
Figura 4. Biossíntese de ácidos graxos e policetídeos.	12
Figura 5. β -oxidação dos ácidos graxos	13
Figura 6. Biossíntese de diacilgliceróis e triacilgliceróis	15
Figura 7. A- Calo floral de <i>Oncidium truncatum</i> , B- Calo floral de <i>O. praetextum</i> . Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.	18
Figura 8. A – Fotografia de microscopia eletrônica dos elaióforos epidermais de <i>Oncidium pubes</i> com o óleo sendo exsudado. B – Fotografia de microscopia eletrônica dos elaióforos tricomáceo de <i>O. flexuosum</i> com secreção interna. Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.	19
Figura 9. Cromatograma total de íons do óleo floral de <i>Ornithophora radicans</i> . Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 μ m), forno 50-290 °C, velocidade de aquecimento 4 °C. Min ⁻¹ . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 °C.	21
Figura 10. Espectro de massas (70 eV) característico da série homologa A	22
Figura 11. Espectro de massas (70 eV) característico da série homologa B	22
Figura 12. Espectro de massas (70 eV) característico da série homologa C	22
Figura 13. Mecanismo de isomerização de 1,2- para 1,3-diacilglicerol.	24
Figura 14. Atribuição total dos hidrogênios e carbonos do Oncidinol, 1, obtidos através de RMN de 1D e 2D (homonuclear de ¹ H, ¹ H e heteronuclear de ¹ H, ¹³ C HSQC e HMBC). Flechas indicam as correlações heteronucleares à longa distância que foram diagnósticas para a determinação estrutural.	25
Figura 15. Espectro de RMN de 2D de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H – COSY (500 MHz, CDCl ₃) do composto 1.	26
Figura 16. Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C a uma ligação– HSQC (¹ H-500 MHz, ¹³ C-125 MHz, CDCl ₃) do composto 1.	27

Figura 17. Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a mais de uma ligação- HMBC (^1H -500 MHz, ^{13}C -125 MHz, CDCl_3) do composto 1.	28
Figura 18. Expansão do espectro de 2D INADEQUATE do composto 2 (75-12 ppm) (11 tesla Varian INOVA, 125.69 MHz, nanotubo) CDCl_3 , 40 mg of 2 em 40 μL de CDCl_3 e 4 mg of aceto acetato de crômio.	31
Figura 19. Espectros de massas (70 eV) dos compostos 1, 4 e 5.	34
Figura 20. Proposta de mecanismo de fragmentação para formação dos principais fragmentos observados no espectro de massas dos compostos 1, 4 e 5	35
Figura 21. Modelos conformacionais para ésteres do MTPA e a influência nas magnitudes no espectro de RMN de ^1H e das medidas de $\Delta\delta^{\text{SR}}$. As setas indicam o efeito de proteção e desproteção causado pelo sistema aromático.	37
Figura 22. Reações de obtenção dos derivados de Mosher	39
Figura 23. Modelos conformacionais para ésteres 6a e 6b e os deslocamentos encontrados no espectro de RMN de ^1H para os hidrogênios que sofrem o efeito anisotrópico do sistema aromático e as magnitudes das medidas de $\Delta\delta^{\text{SR}}$	42
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto 6a	43
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto 6b	43
Figura 26. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração do éster de Mosher 9a	46
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto 9a	46
Figura 28. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração do éster de Mosher 9b	47
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto 9b.	47
Figura 30. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração do éster de Mosher 10a	49
Figura 31. Espectro de de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto 10a.	49
Figura 32. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração do éster de Mosher 10b	50
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto 10b	50
Figura 34. Cromatograma total de ions de <i>Oncidium pubes</i> – (código -Mz11). Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 μm), forno 50-290 $^{\circ}\text{C}$, velocidade	

de aquecimento 4 °C. Min ⁻¹ . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 °C	52
Figura 35. Cromatograma total de íons de <i>Oncidium pubes</i> – Espécie coletada em Atibaia-SP (código -Mz16) Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 µm), forno 50-290 °C, velocidade de aquecimento 4 °C. Min ⁻¹ . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 °C	53
Figura 36. Cromatograma total de íons de <i>Oncidium pubes</i> – Espécie coletada na Serra do Japi-SP (código -Mz17) Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 µm), forno 50-290 °C, velocidade de aquecimento 4 °C. Min ⁻¹ . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 °C	53
Figura 37. Cromatograma total de íons de <i>Oncidium pubes</i> –(código -Mz29) Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 µm), forno 50-290 °C, velocidade de aquecimento 4 °C. Min ⁻¹ . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 °C	53
Figura 38. Cromatograma total de íons de <i>Oncidium pubes</i> – Espécie coletada em Campinas – SP (código -Mz23) e expansão da região do cromatograma que contém os compostos mais abundantes. Os compostos identificados neste óleo floral são mostrados na (	54
Figura 39. Atribuição total dos hidrogênios e carbonos de 11 obtidos através de RMN 1D e 2D (homonuclear de ¹ H, ¹ H e heteronuclear de ¹ H, ¹³ C HSQC e HMBC). Flechas indicam as correlações heteronucleares à longa distância que foram diagnósticas para a determinação estrutural.	56
Figura 40. Espectro de RMN de 2D de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H – COSY (500 MHz, CDCl ₃) do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i>	57
Figura 41. Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C a uma ligação – HSQC (¹ H-500 MHz, ¹³ C-125 MHz, CDCl ₃) do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i>	57
Figura 42. Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear a mais de uma ligação ¹ H, ¹³ C – HMBC (¹ H-500 MHz, ¹³ C-125 MHz, CDCl ₃) do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i>	58
Figura 43. Expansão do espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da região das metilas da porção do glicerol. Os números representam as respectivas metilas.	61
Figura 44. Espectros de massas (70 eV) dos compostos 11, 12 e 13.	62

<i>Figura 45. Espectros parciais de RMN de ^1H correspondentes aos sinais de H-1 e H-3 dos derivados dos diacilgliceróis 1 e 11. a) S-Mosher 6a, b) R-Mosher 6b e c) derivado R-Mosher do diacilglicerol de <i>Oncidium pubes</i> 15</i>	64
<i>Figura 46. R=R-Mosher. Expansão do espectro de RMN de ^1H da região correspondente aos hidrogênios (H-2') em evidência do derivado 10b de <i>Ornithophora radicans</i> e 16 de <i>Oncidium pubes</i></i>	65
<i>Figura 47. Cromatograma total de íons do óleo floral de <i>Zigostates lunata</i> e expansão da região do cromatograma que contém os compostos mais abundantes. Os compostos identificados neste óleo floral são mostrados na Tabela 8. Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 μm), forno 50-290 $^{\circ}\text{C}$, velocidade de aquecimento 4 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{Min}^{-1}$. Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 $^{\circ}\text{C}$</i>	66
<i>Figura 48. Atribuição dos hidrogênios e carbonos do composto 18 derivado 3-O-acetil do produto natural 17 majritário do óleo floral de <i>Zigostates lunata</i></i>	68
<i>Figura 49. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 18</i>	68
<i>Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 18</i>	69
<i>Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C: a-DEPT 135 $^{\circ}$ e b-DEPT 90 $^{\circ}$ (125 MHz, CDCl_3) do composto 18</i>	69
<i>Figura 52. Espectros de massas (70 eV) dos compostos 17, 18 e 19.</i>	71
<i>Figura 53. Coinjeção do exudado do calo floral de <i>Oncidium praetextum</i> com padrão do sitosterol 36. O cromatograma acima é do exudado floral sem padrão e o cromatograma abaixo é do exudado com reforço do padrão do sitosterol 36. Onde o composto com tempo de retenção em 63,037 min corresponde ao sitosterol 36 e o composto com tempo de retenção de 63,361min corresponde ao diacilglicerol que apresenta a mesma estrutura plana do Oncidinol. Condições do equipamento de CG/EM- Coluna HP5, 30m x 0,25mm x 0,25 μm, programação de temperatura 50-290 $^{\circ}\text{C}$, velocidade de aquecimento 4 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, injetor-240 $^{\circ}\text{C}$. tempo inicial -0 min, tempo final a 290 $^{\circ}\text{C}$ - 15 min.</i>	77
<i>Figura 54. Espectro de massas do sitosterol 36.</i>	78
<i>Figura 55. Espectros de massas: a- tetracosanoato de benzila 43 (óleo floral de <i>O. puvinatum</i>); b- oleoato de benzila 47; e c- octadecanoato de benzila 48.</i>	83
<i>Figura 56. Proposta de fragmentação para o tetracosanoato de benzila 43.</i>	84

Figura 57. Dados de correlações homonuclear de ^1H , ^1H (COSY) e heteronuclear de ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) obtidos por RMN 2D, para o composto 50	88
Figura 58. Acima – Cromatograma total de ions do extrato da flor de <i>O. puvinatum</i> sem o calo floral. Abaixo- Cromatograma total de ions do extrato do calo floral de <i>O. puvinatum</i> .	91
Figura 59. Acima – Cromatograma total de ions do extrato da flor de <i>O. praetextum</i> sem o calo floral. Abaixo - Cromatograma total de ions do extrato do calo floral de <i>O. praetextum</i>	92
Figura 60 . Acima – Cromatograma total de ions do extrato da flor de <i>O. flexuosum</i> sem o calo floral. Abaixo - Cromatograma total de ions do extrato do calo floral de <i>O. flexuosum</i>	93
Figura 61. Acima – Cromatograma total de ions do extrato sililado da flor de <i>O. flexuosum</i> sem o calo floral. Abaixo - Cromatograma total de ions do extrato sililado do calo floral de <i>O. flexuosum</i>	94
Figura 62. Flores do Grupo I.1 – A - Calo floral de <i>Oncidium pubes</i> , B- <i>Ornithophora radicans</i> e C- <i>Oncidium cornigerum</i> Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.	112
Figura 63. Flores do Grupo I.2 – A - Calo floral de <i>Oncidium welteri</i> , B- Calo floral de <i>Oncidium hookeri</i> , C – Calo floral de <i>Baptistonia echinata</i> , D- <i>Oncidium welteri</i> , E- <i>Oncidium hookeri</i> , F- <i>Baptistonia echimanta</i> . Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.	113
Figura 64. Espécies do grupo II. A- <i>Oncidium longipes</i> , B- <i>Oncidium hydrophyllum</i> , C- <i>Oncidium harrissonianum</i> , D- <i>Oncidium Macropetalum</i> , E- <i>Oncidium forbesi</i> , F- <i>Gomesa recurva</i> , G- <i>Oncidium phymatochylum</i> , H- Calo floral de <i>Oncidium widgrenii</i> , I- Calo floral de <i>Oncidium puvinatum</i> e J- <i>Oncidium praetextum</i> . Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.	114
Figura 65. Similaridade entre as espécies com relação à composição química de seus calos florais utilizando método de agrupamento completo com distância euclidiana. O número ao lado dos nomes das espécies representam o grupo a que elas pertencem na análise filogenética baseada em dados macromoleculares, anatômicos e morfológicos (Figura 67).	115

Figura 66. Método de agrupamento completo com distância euclidiana	116
Figura 67. Árvore filogenética de consenso estrito gerada com utilização de dados morfo-anatômicos, químicos e moleculares. Gentilmente cedida pela Dra. Aparecida D. de Faria ⁷¹	117
Figura 68. Flores de <i>B. intermedia</i> (Malpighiaceae)	119
Figura 69. Atribuição total dos hidrogênios e carbonos de 52 obtidos através de RMN 1D e 2D (homonuclear de ^1H , ^1H e heteronuclear de ^1H , ^{13}C HSQC e HMBC).	121
Figura 70. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração dos ésteres de Mosher 54a e 54b.	124
Figura 71. Espectro e expansões de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 54a.	125
Figura 72. Espectro e expansões de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 54b.	125
Figura 73. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração dos ésteres de Mosher 55a e 55b.	126
Figura 74. Espectro e expansões de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 55a.	126
Figura 75. Espectro e expansões de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 55b.	127
Figura 76. À esquerda- Abelha <i>Tetrapedia</i> sp com o polinário de <i>Oncidium cornigerum</i> . À direita – A perna da abelha <i>T. diversipis</i> com o óleo floral de <i>O. cornigerum</i>	130
Figura 77. Ninho de <i>Tetrapedia diversipes</i> . Na parte central do ninho (parte mais clara) está a massa alimentar e envolto pela massa alimentar está a larva da abelha.	131
Figura 78. Cromatograma total de íons da fração lipídica da massa alimentar de <i>T. diversipis</i> . Condições da análise por CG/EM: coluna HP5 (30m x 0,25mm x 0,25 μm) temperaturas – forno - 50-290 $^{\circ}\text{C}$, velocidade de aquecimento 4 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$; injetor – 240 $^{\circ}\text{C}$, tempo final (290 $^{\circ}\text{C}$) – 15 min.	132
Figura 79. Espectro de massas (70eV) dos compostos 57 (3,7- diidroxi -eicosanoato de metila-Ninho), 8 ((3R,7R)-3,7- diidroxi -eicosanoato de metila - Óleo floral de <i>Ornithophora radicans</i>), 59 (3,7- diidroxi -docosanoato de metila-Ninho) e 53((3R,7R)-3,7-	

diidroxí -docosanoato de metila - Óleo floral de *Byrsonima intermedia*), respectivamente.

133

Figura 80. Coinjeção da fração lipídica da massa alimentar do ninho de *T. diversipes* com o ácido birsónico hidrolisado e metilado 53. O cromatograma acima é da massa alimentar do ninho sem padrão e o cromatograma abaixo é do ninho com reforço do padrão 53.

Onde o composto com tempo de retenção em 11.2 min corresponde ao composto 57 (3,7-diidroxí-eicosanoato de metila) e o composto com tempo de retenção de 12.6 min corresponde ao 59 (3,7-diidroxí-docosanoato de metila). Condições da análise por CG/EM: coluna HP5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) temperaturas – forno - 100-290 °C, velocidade de aquecimento 10 °C.min⁻¹; injetor – 240 °C,

134

Figura 81. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) dos compostos 3,7-diidroxí-eicosanoato de metila 57 e 3,7-diidroxí-docosanoato de metila 59.

137

Figura 82. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto (3R, 7R)-3,7-diidroxí-docosanoato de metila 53.

137

Figura 83. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) dos compostos 3,7-diidroxí-eicosanoato de metila 57 e 3,7-diidroxí-docosanoato de metila 59.

138

Figura 84. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto (3R, 7R)-3,7-diidroxí-docosanoato de metila 53.

138

Figura 85. A- Planta de *Calceolaria herbeohybrida*. O retângulo representa a área expandida mostrada no quadro B. B- Flor de *Calceolaria x herbeohybrida*. O retângulo representa a área expandida mostrada no quadro C. C- Região onde se encontram os elaióforos tricomáticos de *C. x herbeohybrida*. O retângulo representa a região onde se encontram os elaióforos. D – Elaióforos tricomáticos de *Calceolaria tripartita*. As fotografias de *Calceolaria x herbeohybrida* foram gentilmente feitas e cedidas pelo Dr. Volker Brittrich e pela Dra. Maria do Carmo E. do Amaral.

141

Figura 86. Acima. Cromatograma de total de ions do óleo floral de *C. xherbeohybrida* (programação de temperatura do forno – 50-290 °C com velocidade de 15 °C.min⁻¹)

Abaixo. Espectro de massas do diacilglicerol 60 do óleo floral de *Calceolaria x herbeohybrida*

142

Figura 87. Expansão da região do espectro de RMN de ¹H onde é observada as metilas dos grupos acetílicos da porção do glicerol dos compostos 18 e 61, de *Zigostates lunata*

(observado em um equipamento de 500 MHz) e <i>Calceolaria x herbeohybrida</i> (observado em um equipamento de 300 MHz), respectivamente. _____	146
Figura 88. Filogenia de plantas produtoras de óleos florais baseados em caracteres de DNA (modificada do trabalho Filogenia das Angiospermas por Claus ⁷⁸). Grupos em destaque foram estudadas no presente trabalho. _____	147
Figura 89. Análise retrossintética de um diacilglicerol da série homóloga C encontrado no óleo floral de <i>Zigostates lunata</i> e <i>Calceolaria híbrida</i> _____	149
Figura 90. Espectro de RMN de ¹ H (499, 885 MHz, CDCl ₃ ; d _{TMS} 0,00) do sistema ternário calix[6]/agente quiral/(±)-3a (1:1:1, 15 mmol L ⁻¹ , 25 °C). _____	152
Figura 91. Modelo estado de transição cíclico de Zimmerman e Traxler. ⁸⁶ _____	155
Figura 92. Modelo não-quelado de adição do aldeído ao enolato _____	156
Figura 93. Síntese do composto 66a e 66b _____	157
Figura 94. Sinais de H-2 no espectro de RMN de ¹ H que determina a proporção dos diastereoisômeros 66a/66b como 5:1. _____	159
Figura 95. Conformações para os isômeros syn e anti _____	160
Figura 96. Rota sintética para obtenção de 1,2-diacilglicerol _____	162
Figura 97. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do oncidinol 1. _____	216
Figura 98. Espectro de RMN de ¹³ C desacoplado (125 MHz, CDCl ₃) do oncidinol 1. _____	216
Figura 99. Espectro de RMN de ¹³ C: a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl ₃) do oncidinol 1. _____	217
Figura 100. Mapa de contornos de RMN de 2D de ¹ H- ¹ H-COSY (500 MHz, CDCl ₃) do oncidinol 1. _____	218
Figura 101. Mapa de Contornos de RMN de 2D de ¹ H- ¹³ C – HSQC (500 MHz, CDCl ₃) do oncidinol 1. _____	219
Figura 102. Mapa de Contornos de RMN de 2D de ¹ H- ¹³ C – HMBC (500 MHz, CDCl ₃) do oncidinol 1. _____	219
Figura 103. Espectro no Infra Vermelho (filme) do oncidinol 1. _____	220
Figura 104. Espectro de massas (ESI-MS) do oncidinol 1. _____	221
Figura 105. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 2. _____	222
Figura 106. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) do composto 2. _____	222
Figura 107. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 3. _____	223

Figura 108. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 3. _____	223
Figura 109. Espectro de RMN de ^{13}C a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75 MHz, CDCl_3) do composto 3. _____	224
Figura 110. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 5. _____	224
Figura 111. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 6a. _____	225
Figura 112. Espectro de RMN de ^1H (125 MHz, CDCl_3) do composto 6a. _____	225
Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 6a _____	226
Figura 114. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto 6a _____	227
Figura 115. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C – HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto 6a _____	228
Figura 116. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C – HMBC do composto 6a _____	229
Figura 117. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 6b. _____	230
Figura 118. Espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 6b. _____	230
Figura 119. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto 6b. _____	231
Figura 120. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C – HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto 6b. _____	232
Figura 121. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}H – HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto 6b. _____	233
Figura 122. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 8. _____	234
Figura 123. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 9a _____	234
Figura 124. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 9b. _____	235
Figura 125. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 10a _____	235
Figura 126. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 10b. _____	236
Figura 127. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i> . _____	236
Figura 128. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i> . _____	237
Figura 129. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i> . _____	237

Figura 130. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i> .	238
Figura 131. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HSQC (500 MHz) do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i> .	239
Figura 132. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HMBC (500 MHz) do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i> .	240
Figura 133. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 11.	241
Figura 134. Espectro de massas (ESI-MS) do composto 11.	241
Figura 135. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 12.	242
Figura 136. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) do composto 15.	242
Figura 137. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HMBC (500 MHz) do composto 15.	243
Figura 138. Espectro de massas (ESI-MS) do composto 17.	244
Figura 139. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) do composto 18.	244
Figura 140. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) do composto 18.	245
Figura 141. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do composto 18.	245
Figura 142. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 47.	246
Figura 143. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 47.	246
Figura 144. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 48.	247
Figura 145. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 48.	247
Figura 146. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 48.	248
Figura 147. Espectro no Infra Vermelho (KBr) do composto 48.	248
Figura 148. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto 50.	249
Figura 149. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto 50.	249
Figura 150. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do composto 50.	250
Figura 151. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HSQC (500 MHz) do composto 50.	251

Figura 152. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HMBC (500 MHz) do composto 50.	252
Figura 153. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) do óleo floral de <i>Oncidium longicornu</i> .	253
Figura 154. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium amictum</i> .	253
Figura 155. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium cornigerum</i> .	254
Figura 156. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium cornigerum</i> .	254
Figura 157. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium cornigerum</i> .	255
Figura 158. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium cornigerum</i> .	256
Figura 159. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium hookeri</i> .	256
Figura 160. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium hookeri</i> .	257
Figura 161. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium hookeri</i> .	257
Figura 162. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium hookeri</i> .	258
Figura 163. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do óleo floral de <i>Oncidium hookeri</i> acetilado (isomerizado de 1,2- para 1,3-diacilglicerol).	258
Figura 164. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 52.	259
Figura 165. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 52.	259
Figura 166. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do composto 52.	260
Figura 167. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto 52.	261
Figura 168. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto 52.	262

Figura 169. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto 52.	263
Figura 170. TOCSY – 1D – hidrogênio em δ 4,84 (tempo de mistura 100 ms).	263
Figura 171. TOCSY – 1D - hidrogênio em δ 5,20 (tempo de mistura 100 ms).	264
Figura 172. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 52.	264
Figura 173. Espectro de massas de alta resolução (70 eV) do composto 52.	265
Figura 174. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 53.	265
Figura 175. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 53.	266
Figura 176. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do composto 53.	266
Figura 177. Espectro no Infra Vermelho (KBr) do composto 53.	267
Figura 178. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 54a	267
Figura 179. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 54b.	268
Figura 180. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 55a	268
Figura 181. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 55b.	269
Figura 182. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 57 e 59.	269
Figura 183. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) dos compostos 57 e 59.	270
Figura 184. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) dos compostos 57 e 59.	270
Figura 185. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 60.	271
Figura 186. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 60.	271
Figura 187. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do composto 60.	272
Figura 188. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 61.	272
Figura 189. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 62.	273
Figura 190. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 62.	273
Figura 191. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 62.	274
Figura 192. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 62.	274
Figura 193. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 63.	275
Figura 194. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 63.	275

Figura 195. Espectro no Infra Vermelho (KBr) do composto 63.	276
Figura 196. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 64.	276
Figura 197. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 64.	277
Figura 198. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 64.	277
Figura 199. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 64.	278
Figura 200. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 66a/66b.	278
Figura 201. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) dos compostos 66a/66b.	279
Figura 202. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 66.	279
Figura 203. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^1H –COSY(300 MHz, , CDCl_3) do composto 66a/66b.	280
Figura 204. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – COLOQ (300 MHz, , CDCl_3) do composto 66a/66b.	281
Figura 205. Espectro no Infra Vermelho (filme) dos compostos dos 66a/66b.	281
Figura 206. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 67.	282
Figura 207. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) dos compostos 68.	282
Figura 208. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) dos compostos 68.	283
Figura 209. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 68.	283
Figura 210. Espectro no Infra Vermelho (KBr) do composto 68.	284
Figura 211. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) dos compostos 69.	284
Figura 212. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) dos compostos 69.	285
Figura 213. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 69.	285
Figura 214. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 69.	286
Figura 215. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 70.	286
Figura 216. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 71.	287
Figura 217. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 71.	287
Figura 218. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 71.	288

<i>Figura 219. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 71.</i>	288
<i>Figura 220. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 72.</i>	289
<i>Figura 221. Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 72.</i>	289
<i>Figura 222. Espectro de RMN de ^{13}C: a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 72.</i>	290
<i>Figura 223. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 72.</i>	290
<i>Figura 224. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 73.</i>	291
<i>Figura 225. Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 73.</i>	291
<i>Figura 226. Espectro de RMN de ^{13}C: a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 73.</i>	292

ÍNDICE

1	Introdução e Objetivos	1
2	Considerações Gerais	5
2.1	Considerações sobre elaióforos	5
2.2	Considerações sobre abelhas coletoras de óleos florais	7
2.2.1	Melitidae	7
2.2.2	Ctenoplectridae	8
2.2.3	Anthophoridae	9
2.3	Considerações sobre composição química dos óleos florais	10
2.4	Considerações sobre a biossíntese de ácidos graxos	11
2.5	Considerações sobre a biossíntese de diacilgliceróis	15
2.6	Considerações sobre os gêneros de Oncidiinae investigados neste trabalho	16
3	Resultados e discussões	18
3.1	Identificação da composição química dos calos florais	18
3.1.1	Análise dos calos de Oncidiinae que exsudam óleos em sua superfície	21
3.1.1.1	Identificação e determinação da configuração absoluta do composto majoritário do óleo floral de <i>Ornithophora radicans</i> - Padrão para a série homóloga A	23
3.1.1.2	Identificação dos compostos majoritários do óleo floral de <i>Oncidium pubes</i> - Padrão para a série homóloga B	52
3.1.1.3	Identificação do composto majoritário do óleo floral de <i>Zygostates lunata</i> - Padrão para a série homóloga C	65
3.1.2	Análise dos calos florais que não secretam óleos em sua superfície	73
3.1.2.1	Terpenóides	73
3.1.2.2	Derivados de ácidos graxos	80
3.1.2.3	Acilgliceróis	85
3.1.2.4	Fenilpropanóides	85
3.1.2.5	Flavonóides	86

3.2	Análise do calo e das demais partes das flores das espécies <i>Oncidium puvinatum</i> , <i>O. flexuosum</i> e <i>O. praetextum</i>	90
3.3	Análise de similaridade química dos compostos produzidos nos calos de 39 espécies de Oncidiinae em comparação a árvore filogenética	109
3.4	<i>Byrsonima intermedia</i> (Malpighiaceae) – Ácido Birsónico	119
3.4.1	Determinação da configuração absoluta do ácido birsónico	123
3.5	Análise do ninho da abelha <i>Tetrapedia diversipes</i> Klung.	129
3.6	Óleo floral de <i>Calceolaria x herbeohybrida</i> Voss	140
3.7	Estudos sintéticos visando a obtenção de diacilgliceróis	149
3.7.1	Estudos visando a obtenção de ácido 3-acetoxi-racêmico	150
3.7.1.1	Método para a determinação de excessos enantioméricos de ácidos 3-hidróxi carboxílicos.	151
3.7.2	Estudos visando a obtenção enantiosseletiva de ácidos 3-hidróxi carboxílicos não substituídos na posição α .	153
3.7.3	Estudos visando a obtenção de (S) -1,2-diacilgliceróis	162
4	Conclusões	165
5	Parte Experimental	169
5.1	Materiais e Métodos:	169
5.2	Obtenção dos óleos e exsudados florais – Estruturas Elaióforas	175
5.3	Obtenção dos extratos dos calos e das demais partes das flores	176
5.4	Procedimento geral para reação de sililação	176
5.5	Procedimento geral para reação de acetilação	176
5.6	Isolamento e identificação dos produtos naturais	177
5.6.1	Isolamento do (2R, 3'R, 7'R)-1-acetil-2-(3',7'-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol – oncidinol 1 - <i>Ornithophora radicans</i>	177
5.6.1.1	Obtenção do composto (2R, 3'R, 7'R)-1-acetil-2-(3',7'-diacetoxi-eicosanoil)-3-t-butildimetilsilil - glicerol 3	179

5.6.1.2	Obtenção dos ésteres de <i>R</i> e <i>S</i> - Mosher 6a e 6b	181
5.6.1.3	Obtenção do (3 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-3,7- diidróxi-eicosanoato de metila 8	183
5.6.1.4	Obtenção do mono-éster do (<i>S</i>)- e (<i>R</i>)-MTPA 9a e 9b - Derivados do Oncidinol 184	
5.6.1.5	Obtenção do di-éster (<i>S</i>)- e (<i>R</i>)-MTPA 10a e 10b – Derivados do Oncidinol 185	
5.6.1.6	(3' <i>R</i> , 7' <i>R</i>)-1,3-diacetil-2-(3',7'-diacetoxi-octadecanoil)-glicerol 12 – Óleo floral de <i>Oncidium pubes</i>	188
5.6.2	Isolamento do 1,3-diacetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)-glicerol 18 derivado do óleo floral de <i>Zigostates lunata</i>	189
5.6.3	Isolamento do 3,4',6-trimetoxi caempferol (santin) 50 das flores de <i>Ornithophora radicans</i>	190
5.6.4	<i>Byrsonima intermedia</i> - Isolamento do (3 <i>R</i> ,7 <i>R</i>) – 3,7-diacetoxi-eicosanoato de metila 52 – Derivado do Ácido Birsónico	192
5.6.4.1	Obtenção do ácido (3 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-3,7-diidróxi-docosanoato de metilas – Composto 53	193
5.6.4.2	Procedimento para a obtenção dos ésteres de <i>R</i> e <i>S</i> - Mosher 54a, 54b, 55a e 55b derivados do ácido birsónico	194
5.6.5	Ninho de <i>Tetrapedia diversipes</i> – Ácido 3,7-diidróxi-eicosanóico 56 e ácido 3,7 – diidróxi-docosanóico 58	195
5.6.6	<i>Calceolaria x herbeohybrida</i> – 1-acetil-2- (3'-acetoxi-hexadecanoil)-glicerol 60	197
5.7	Síntese de padrões	198
5.7.1	Obtenção do oleato de benzila 47	198
5.7.2	Obtenção do octadecanoato de benzila 48	199
5.7.3	Obtenção do 3-hidróxi-eicosanoato de etila 62	200
5.7.4	Obtenção do ácido 3-hidróxi-eicosanóico 63	202
5.7.5	Obtenção do ácido 3-acetoxi-eicosanóico 64	203
5.7.6	Obtenção do (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)-(2-bromo, 3-hidroxi-octadecanoil)-4-benzil-2-oxazolidinona 66	204
5.7.7	Obtenção do 3 <i>R</i> -hidróxi-eicosanoato de metila 67	205

5.7.8	Estudos sintéticos visando a síntese de (2 <i>S</i>)-1,2-diacilgliceróis	207
5.7.8.1	1,2:5,6 – Diisopropilideno-D-manitol 68	207
5.7.8.2	1,2-(<i>S</i>)-O-Isopropilideno-D-glicerol 69	208
5.7.8.3	Obtenção do (2 <i>S</i>)-1,2-isopropilideno-3-benzil-glicerol 70	210
5.7.8.4	Obtenção do (2 <i>R</i>)-3-benzil-glicerol 71	211
5.7.8.5	Obtenção do (2 <i>S</i>)-1-acetil-3-benzil-glicerol 72	211
5.7.8.6	Obtenção do (2 <i>S</i>)-1-acetil-2-hexadecanoil -3-benzil-glicerol 73	212
5.7.8.7	Obtenção do (2 <i>S</i>)-1-acetil-2-hexadecanoil -glicerol 74	214
6	<i>Espectros</i>	215

1 Introdução e Objetivos

Orchidaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, compreendendo cerca de 20.000 espécies distribuídas em aproximadamente 850 gêneros.¹ A família apresenta ampla distribuição, mas possui sua maior diversidade nos trópicos, especialmente, em regiões montanhosas. Suas flores apresentam simetria bilateral, são uniformes quanto ao número e arranjo de suas peças florais, mas exibem uma grande diversidade de tamanhos, formas e cores.¹

Oncidiinae é uma subtribo da família Orchidaceae composta por mais de 1000 espécies, distribuídas em 70 gêneros. Suas espécies ocorrem nas regiões tropicais da América.¹

Segundo Williams e col.² a taxonomia de Oncidiinae está baseada, principalmente, em traços florais. No entanto, apenas poucas espécies foram estudadas segundo a sua biologia de polinização e em muitos casos é sugerido que elas atraíam polinizadores por mimetizarem flores que oferecem recompensas florais, sendo portanto flores de engano. Entende-se por recompensas florais substâncias produzidas pelas flores e coletadas por polinizadores para as mais diversas finalidades, tais como: alimento, material para construção de ninhos entre outros.

Sistemas baseados em engano são facilmente modificados, isto é, flores filogeneticamente relacionadas apresentam traços florais diferentes, enquanto espécies não tão proximamente relacionadas podem convergir na aparência

¹ Dressler, R. L. *The phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge University Press, Cambridge, 1993.

² Williams, N. H., Chase, M. W., Fucher, T., Whitten, W. M. *Lindleyana*, 2001, 16, 113.

devido ao mimetismo de uma mesma espécie que ofereça recompensa floral (ex. espécies da família Malpighiaceae).²

Um estudo recente, baseado em fragmentos de restrição de DNA de cloroplasto, revelou que espécies brasileiras de *Oncidium* (Oncidiinae) são mais proximamente relacionadas a espécies de outros gêneros como *Baptistonia*, *Gomesa* e *Ornithophora* do que a outras espécies presentes em seu próprio gênero. Estes resultados sugerem que a atual classificação que delimita estes gêneros não está correta.²

As flores de Oncidiinae apresentam na superfície do seu labelo uma protuberância chamada de calo (Figura 1) que, aparentemente, está associada à atração de insetos polinizadores.

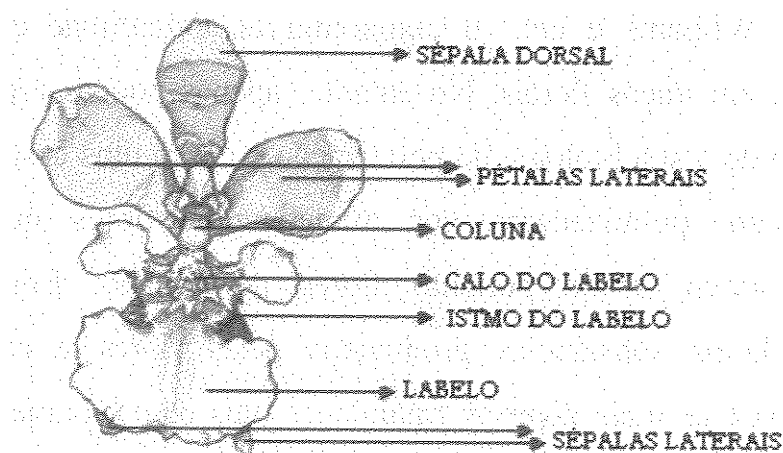


Figura 1. Esquema da flor de *Oncidium longipes*³

Nierenberg,⁴ em 1972, descreveu que a polinização de *Oncidium lucayanum* por abelhas coletoras de óleos florais ocorria devido a sua semelhança, na coloração e forma, a flores de Malpighiaceae, família de

³ Faria, A. D. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

⁴ Nierenberg, L. *American Orchid Society Bulletin*. 1972, 41, 873.

plantas com espécies que oferecem óleos como recompensa floral, sendo portanto a polinização deste *Oncidium* baseada em engano. Em 2003, foi apresentado em congresso⁵ um estudo sobre o fenômeno de mimetismo entre espécies de *Oncidium* e *Byrsonima classifolia* (Malpighiaceae), o qual foi atribuído também ao mimetismo físico. No entanto, Fritz Muller, citado por Darwin em 1862, (descrito por Faria³) observou que “*Oncidium flexuosum* presente em matas do Sul do Brasil possui pequenas protuberâncias nutritivas nas flores que são raspados por insetos”. Vogel,⁶ em 1974, observou que algumas espécies de Oncidiinae, dentre estas *Oncidium*, possuem calos florais que secretam óleos em sua superfície. Neste caso, elas poderiam recompensar os polinizadores e, portanto, não seriam flores de engano. No entanto, segundo Vogel, as espécies que não secretam óleos poderiam ser de engano.⁶ Entretanto, *O. flexuosum*, descrito por Fritz Muller, não secreta óleo, mas seu calo é raspado por insetos. Corroborando com o trabalho de Vogel e Fritz, Singer,⁷ em 1999, revela a coleta de óleo no calo floral de *Oncidium paranaense* por abelhas coletoras de óleos florais. Estas observações são conflitantes.

Aparentemente os calos e as substâncias neles produzidas parecem ter um papel importante, neste conjunto de teorias, e a elucidação de sua composição química pode contribuir para compreensão do papel desta estrutura floral na polinização de espécies Oncidiinae. Assim, o tema desta tese visou primeiramente a investigação química dos calos florais de 39 espécies brasileiras da subtribo Oncidiinae com o intuito de avaliar se os compostos produzidos nestes calos podem ou não servir de recompensas

⁵ Powell, M. P., Pupulin, F. Warner, J. Chittka, L., Chase, M. W. 2003. *Floral mimicry in oncidoid orchids*. 5 th Young Systematics Forum, December, Royal Botanic Garden Kew, UK

⁶ Vogel, S. *Öblumen und ölsammelnde Bienen*. Akad. Wissenschaften Mainz. Wiesbaden: Franz Steiner, 1974

⁷ Singer, R., B. Coccuci, A. A. 1999. *Lindleyana*. 14, 47.

florais e desta forma, verificar a existência de flores de engano e mimetismo neste grupo.

A partir destes resultados foi avaliada uma espécie de Malpighiaceae da região para estabelecer um paralelismo químico entre as espécies destas duas famílias.

Para uma compreensão mais ampla da relação entre as abelhas coletoras de óleos, Antophorideae (*Tetrapedia diversipes*), e estas duas famílias de plantas (Orchidaceae e Malpighiaceae), foi estudada a composição química do ninho da abelha *Tetrapedia diversipes* descrita como polinizadora de ambas famílias.

Um outro objetivo do presente estudo foi avaliar os perfis químicos dos calos florais através de método estatístico e compará-los a árvore filogenética destas espécies, feita a partir de estudos morfológicos, anatômicos e de sequência de introns do DNA ribossomal.³ Desta forma avaliar como ocorreu a evolução dos compostos presentes nestes calos

Adicionalmente, foi estudado o óleo floral de *Calceolaria x herbeohíbrida* (Scrophulariaceae) para avaliar a composição química de óleos florais de espécies pertencentes a famílias pouco correlacionadas filogeneticamente a Orchidaceae e Malpighiaceae.

Foram realizados também estudos sintéticos visando a síntese de diacilgliceróis naturais encontrados em óleos florais de espécies de Oncidiinae (Orchidaceae) e *Calceolaria x herbeohíbrida* (Scrophulariaceae).

2 Considerações Gerais

2.1 Considerações sobre elaióforos

Há mais de dois séculos, sabia-se que várias espécies das famílias Malpighiaceae e Krameriaceae possuíam estruturas glandulares em suas flores. Até 1969, eram sugeridos que estas glândulas eram nectários ou remanescentes destes. Vogel^{8,9} foi o primeiro a sugerir que estas estruturas florais produziam lipídios ao invés de carboidratos. Este órgão secretor de lipídios foi denominado de elaióforo.

Segundo sua morfologia os elaióforos são classificados como **epidermais** ou **tricomáceos** (Figura 2). Os **elaióforos epidermais** (Figura 2) são pequenas áreas de células epidermais que secretam óleos sob uma fina camada de cutícula.¹⁰ Os elaióforos tricomáceos (Figura 2) consistem de centenas de tricomas (do grego *trichos* – pêlo)¹¹ glandulares. Neste caso não existe uma camada protetora como a cutícula descrita para elaióforos epidermais, mas apenas um filme de óleo que pode, eventualmente, proteger os elaióforos tricomáceos.

⁸ Vogel, S. Flowers offering fatty oil instead of nectar. XI Proc. Intl. Bot. Congress. Seattle, p. 229. Abstr. 1969

⁹ Simpson, B. B., Neff, J. L. *Annual Missouri Botanic Garden*, 1981, 68, 301-322

¹⁰ Buchmann, S. L. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1987, 18: 33-369.

¹¹ Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. *Biologia vegetal*, 5 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

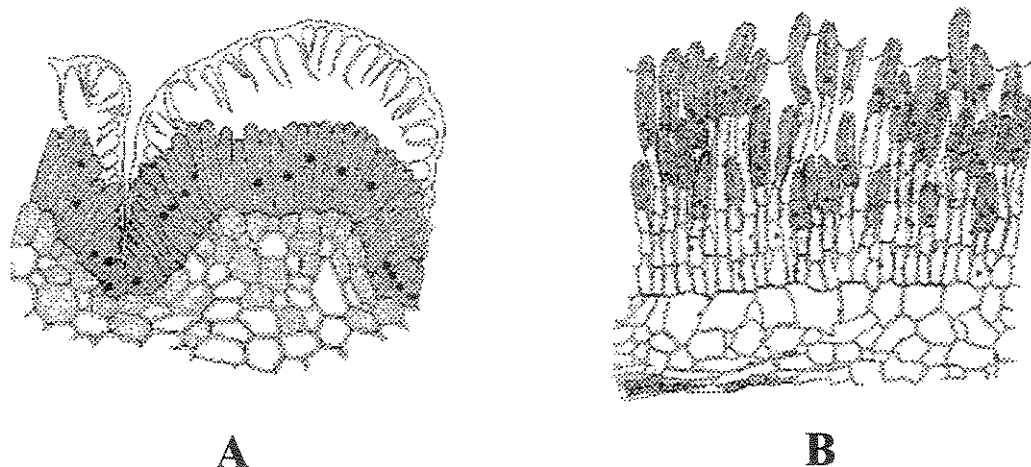


Figura 2. A- Elaióforo epidermal, B – Elaióforo tricomáceo^{12, 13}

Nove famílias de plantas presentes no Novo Mundo (Orchidaceae, Iridaceae, Krameriaceae, Malpighiaceae, Primulaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Caesalpinaceae e Generiaceae) e três no Velho Mundo (Primulaceae, Curcubitaceae e Scrophulariaceae) possuem espécies secretoras de óleos graxos sendo estes a principal recompensa para seus insetos polinizadores.^{14,15}

Todos os membros de uma dada família possuem elaióforos tricomáceos ou epidermais, com exceção de Orchidaceae que possui ambos

¹² Rasmussen, C. (1999), Coevolution of the oil bee-*Calceolaria* system in the Andes of Peru. *Master of Science Thesis*, University of Aarhus, Denmark, iv + 87 pp. [www-u.life.uicuc.edu/~Claus/MSc%20thesis%20(1999).pdf] data de acesso 20.02.2005.

¹³ Vogel, S *Ölblumen und ölsammelnde Bienen*. Akademie der Wissenschaften und der Literatur Mathematische-Naturwissenschaftliche Klasse. 1974.

¹⁴ Simpson, B. B., Neff, J. L., Dieringer, G. *Plant Systematic and Evolution*, 1990, 173: 209-222.

¹⁵ Steiner, K. E. The evolution of beetle pollination in South African orchid. *Amer. J. Bot.* 1998, 85: 1180-1193.

tipos de elaióforos. Já a localização dos elaióforos nas flores varia entre e dentro das famílias.

A falta de coerência filogenética entre estas famílias, e a esporádica ocorrência desta síndrome de polinização (ou mecanismo de polinização) mesmo dentro das famílias onde eles são encontrados sugere que os óleos se desenvolveram muitas vezes e independentemente.

2.2 Considerações sobre abelhas coletoras de óleos florais

Abelhas que coletam e usam óleos florais ocorrem tanto no Velho quanto no Novo Mundo, porém são mais diversas nas áreas tropicais e subtropicais da América do Sul e do Norte. Elas são encontradas principalmente em três famílias: Melittidae, Ctenoplectridae, Anthophoridae. A família Anthophoridae contém a maioria dos gêneros e espécies conhecidas como coletoras de óleos florais. As secreções florais são usadas como alimento para as larvas, a construção do ninho, e possivelmente também na nutrição de adultos.¹⁰

2.2.1 Melitidae

Melitidae é uma família, relativamente, pequena (16 gêneros), porém considerada muito importante para o estudo de evolução de abelhas, pois exibem características primitivas. As melitides são encontradas principalmente em regiões africanas e holárticas. Somente o gênero *Macropis* (com 18

espécies) e *Rediviva* (com 9 espécies) são conhecidas como coletoras de óleos florais. *Macropis* é especialista floral de *Lysimachia* (Primulaceae).

O gênero *Rediviva* (Figura 3) é endêmico da África do Sul e representa um exemplo de coadaptação entre abelhas coletoras de óleos florais e flores do gênero *Diascia* (Scrophulariaceae). Estas abelhas são equipadas com patas extraordinariamente longas, cobertas por pêlos, que serve para alcançar o fundo do tubo que contém os elaióforos de flores de *Diascia*.¹⁰

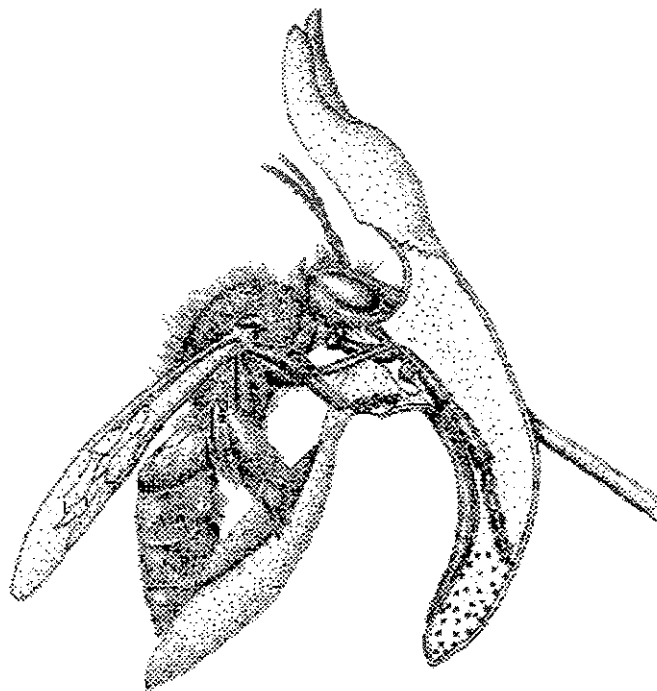


Figura 3. Abelha *Rediviva* coletando óleo de flores de *Diascia* ^{12, 16}

2.2.2 Ctenoplectridae

Ctenoplectridae é uma família de abelhas asiáticas e africanas que possui apenas um gênero, *Ctenoplectra*, com 26 espécies identificadas.

¹⁶ Steiner, K. E. and Whitehead, V. B. *Evolution* . 1990. 44: 1701-1707.

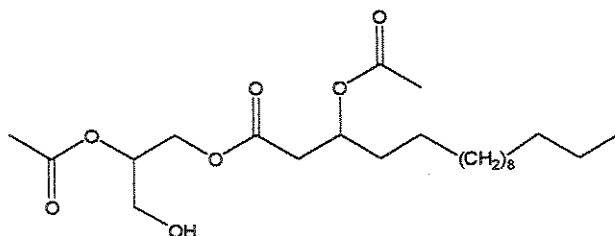
Ctenoplectra coleta óleos florais de elaióforos tricomáceos de espécies de curcubita dos gêneros *Momordica* e *Thladiantha*. Diferente das demais espécies de abelhas coletoras de óleos florais (que usam as patas para coletar os óleos) estas abelhas coletam os óleos com o abdômen, que é recoberto por uma densa franja de pêlos em forma de escova.¹⁰

2.2.3 Anthophoridae

Anthophoriadae é uma grande família de abelhas e apresenta gêneros coletores de óleos em três tribos: Centridini, Exomalopsini e Tetrapediini. Somente as espécies do Novo Mundo se desenvolveram para coletar óleos. Estas são encontradas em nove gêneros *Centris*, *Ptilotopus*, *Epicharis*, *Chalepogenus*, *Lanthanomellissa*, *Moneca*, *Paratetrapedia*, *Tapinotaspos* e *Tetrapedia*. O maior grupo de abelhas coletoras de óleos pertence à tribo Centridrini, representada por três gêneros: *Centris*, *Ptilotopus* e *Epicharis*. Cendridines são conhecidas como coletoras de óleos florais de Malpighiaceae, *Krameria* e *Calceolaria*. Elas utilizam estes óleos ao invés, ou em adição ao néctar, em suas células de provisões. A tribo Exomalopsini contém 5 gêneros, *Chalepogenus*, *Lanthanomelissa*, *Monoeca*, *Paratetrapedia* e *Tapinotaspis*, que coletam rotineiramente óleos de muitas plantas.¹⁰

2.3 Considerações sobre composição química dos óleos florais

Apesar dos elaióforos serem conhecidos há mais de 30 anos pouco é conhecido sobre a composição química deles em diferentes famílias. Vogel¹⁷ sugeriu a presença do diacilglicerol 1-(β -acetoxi-hexadecanoil)-2-acetilglicerol (A) no óleo floral de *Calceolaria pavonii* baseado em espectroscopia de RMN de ¹H. Seigler e col.¹⁸ identificaram vários ácidos β -acetoxi-graxos (B, C e D) em óleos florais de espécies de *Krameria*. Vinson¹⁹ sugeriu a presença de diacilgliceróis derivados de ácidos graxos de cadeia longa como o ácido palmítico e oléico no óleo floral de *Byrsonima crassifolia*. Recentemente foi descrito um estudo detalhado da composição química de *Malpighia coccigera* onde foram identificados ácidos graxos 3,7- e 3,9-diOH parcialmente acetilados.²⁰



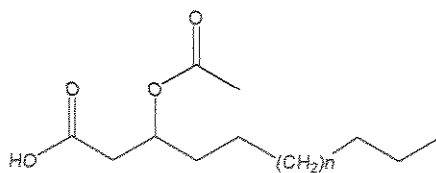
A

¹⁷ Vogel, S. *Öblumen und ölsammelnde Bienen*. Akad. Wissenschaften Mainz. Wiesbaden: Franz Steiner, 1974

¹⁸ Seigler, D., Simpson, B. B., Martin, C., Neff, J. L. *Phytochemistry*, **1978**, 17, 995.

¹⁹ Vinson, S. B., Williams, H. J., Frankie, G. W., Shrum, G. **1997**, 29, 76.

²⁰ Seigold, L., Gerlach, G., Wessjohann, L. *Chemistry and Biodiversity*, **2004**, 1, 1519-1528



B n=8; C n=10; D n=12

2.4 Considerações sobre a biossíntese de ácidos graxos

Ácidos graxos são policetídeos e ocorrem quase universalmente como componentes essenciais de células. Ácidos graxos específicos (ex. poli-hidroxilados) também podem se acumular como metabólitos secundários com uma distribuição mais seletiva em famílias específicas de plantas e microrganismos.²¹

²¹ Staunton, J., Wilkinson, B.1998. The biosynthesis of aliphatic polyketides. Topics curr. Chem. 195:42-92

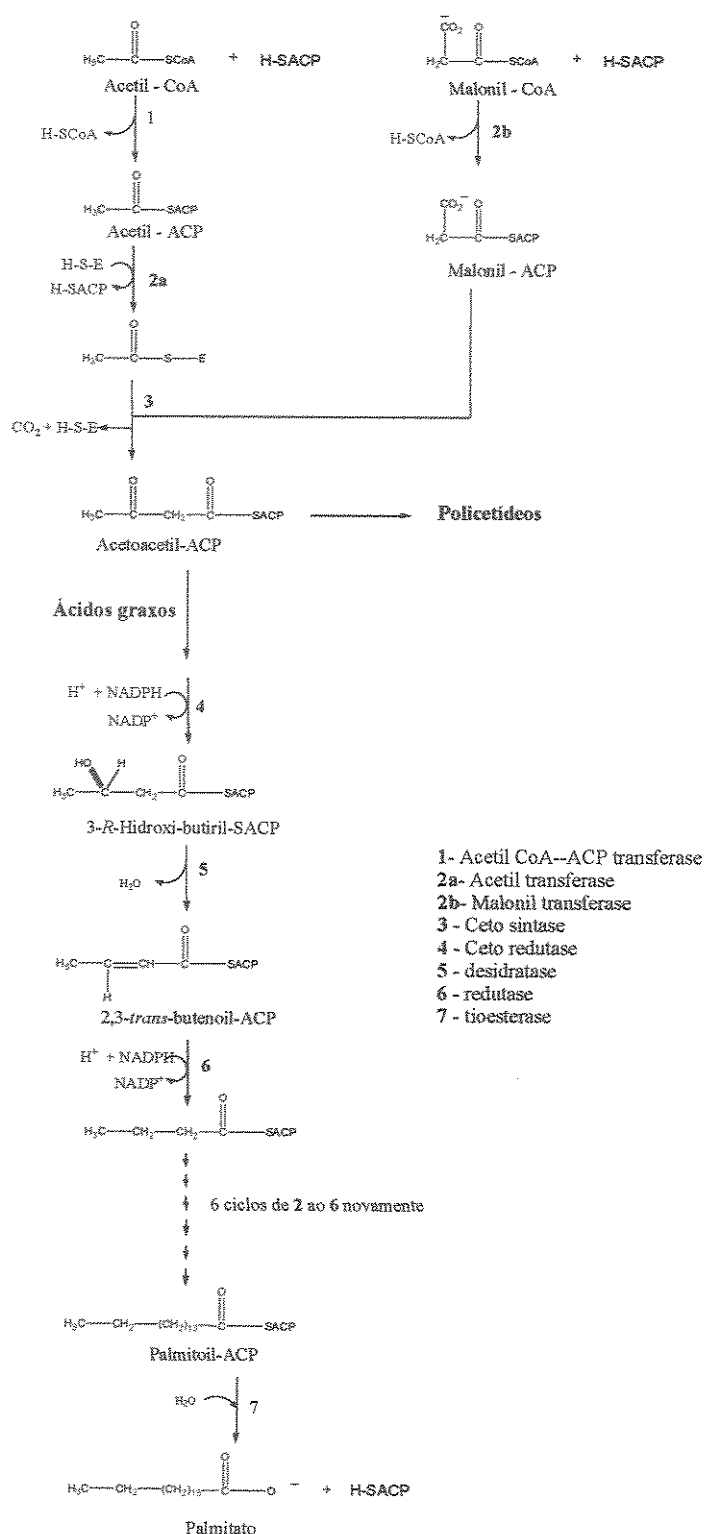


Figura 4. Biossíntese de ácidos graxos e policetídeos.

A biossíntese dos policetídeos é iniciada com a carboxilação da acetil Coenzima A (CoA) para a malonil CoA. A malonil CoA condensa-se com a acetil CoA formando o 1,3-dicetídio-SACP, este intermediário pode prosseguir ao longo das várias unidades do complexo multienzimático da policetídio sintase. Cada uma destas unidades promoverá transformações específicas fornecendo outros intermediários (Figura 4). Estas transformações foram investigadas pela primeira vez em extratos de celulares de *Escherichia coli*. Entretanto, tais complexos multienzimáticos também ocorrem em plastídeos de plantas.^{21,22,23,24,25}

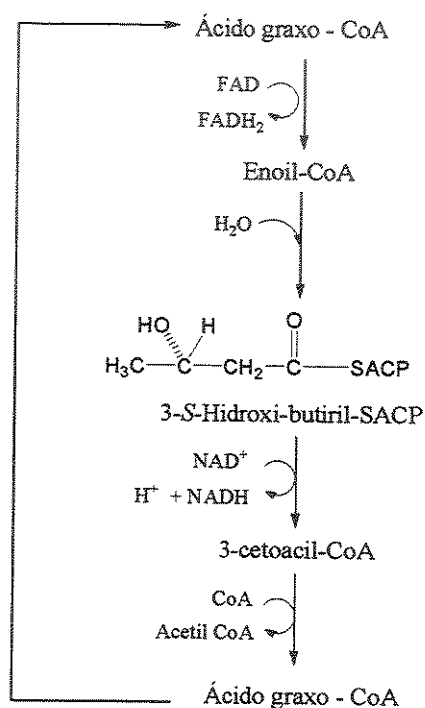


Figura 5. β-oxidação dos ácidos graxos

²² Harwood, J. L. *Biochimica et Biophysica Acta* **1996**, 1301:7-56

²³ Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. *Bioquímica*, 5 ed. **2004**. Rio de Janeiro.

²⁴ Voet, D. Voet, J. G. *Biochemistry*, 2 ed. **1995**. Canadá

²⁵ Rawlings, B. J. *Journal Natural Product* **1998**, 275-308.

O palmitato (produto comum da biossíntese dos ácidos graxos) é usado como precursor para formação de ácidos com cadeias maiores saturadas e insaturadas pela ação de enzimas elongases e dessaturases. As elongases são encontradas na mitocôndria e no retículo endoplasmático, entretanto os mecanismos de síntese que ocorrem nos dois sítios são diferentes. O alongamento da cadeia na mitocôndria ocorre por sucessiva adição de unidades de acetil. Este processo é exatamente o inverso da oxidação dos ácidos graxos (Figura 5). Neste caso, diferente da síntese *de novo* de ácidos graxos (Figura 4), a configuração do álcool formado é *S* (Figura 5). Já o alongamento no retículo endoplasmático envolve sucessivas condensações da malonil CoA com a Acila CoA. Estas reações são acompanhadas pela redução associada ao NADPH similarmente aquelas catalizadas pela ácido graxo sintase (Figura 4). Neste caso, o ácido graxo é alongado a partir do seu derivado da CoA, enquanto a sintase utiliza o derivado da ACP. Ácidos graxos insaturados são produzidos por dessaturases terminais. Nas plantas os ácidos graxos com cadeias maiores que 18 carbonos são sintetizadas extraplastídeo. Uma família de enzimas é responsável pela síntese de ácidos graxos contendo grupos funcionais hidróxi, epóxi e acetilênicos. Estas enzimas são estruturalmente similares as dessaturases- Δ^{12} do contorno da membrana extraplastidial. Somente 4 aminoácidos precisam ser alterados para converter uma 18:1 dessaturase em uma 18:1 hidrolase.^{24,22}

Muitos ácidos graxos incomuns são encontrados em diversas famílias de plantas pouco correlacionadas taxonomicamente implicando que a ativação destas enzimas para a síntese destes ácidos graxos pouco comuns pode ter ocorrido várias vezes durante a evolução das Angiospermas.²²

2.5 Considerações sobre a biossíntese de diacilgliceróis

A biossíntese dos triacilgliceróis é iniciada pela ativação de um ácido graxo pela acil CoA. Este ácido é esterificado com o glicerol 3-fosfato levando ao sn-1-acil-3-fosfato-glicerol, este por sua vez é esterificado novamente levando ao sn-1,2-diacil-3-fosfato-glicerol sendo posteriormente hidrolizado levando ao sn-1,2-diacil-glicerol que pode ser esterificado novamente para levar ao triacilglicerol. Os diacilgliceróis gerados pelo caminho da glicerol 3-fosfato geram somente sn-1,2-diacil-glicerol que possui configuração *S* no átomo de carbono na posição 2.

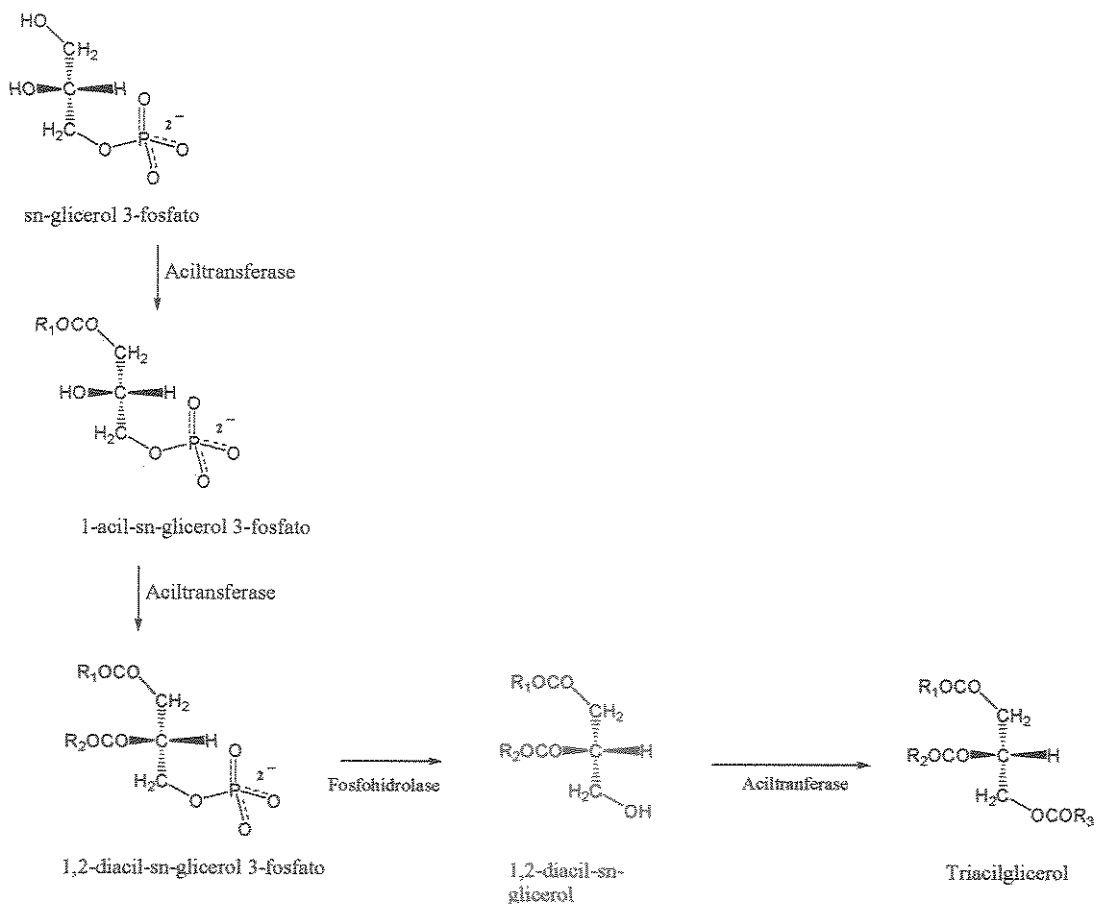


Figura 6. Biossíntese de diacilgliceróis e triacilgliceróis

2.6 Considerações sobre os gêneros de Oncidiinae investigados neste trabalho

Baptistonia inclui uma espécie epífita, *B. echinata*. Frequentemente listada sob o gênero *Oncidium*, mas, difere deste, principalmente, pela forma da coluna que é direcionada para frente e para baixo, enquanto que em *Oncidium*, a coluna é ereta. A espécie é endêmica do Sudeste do Brasil.²⁶

Gomesa é um gênero com cerca de 13 espécies epífitas presentes em florestas da região central e do Sudeste do Brasil. São caracterizadas pela presença de um pseudobulbo oblongo, achatado, com duas folhas apicais flexíveis e por uma inflorescência em forma de racemo com flores pequenas, com 1 cm de diâmetro, amareladas ou esverdeadas.

Rodrigueziella é um gênero composto por sete espécies epífitas morfológicamente muito semelhantes a *Gomesa*. Ocorrem na Mata Atlântica.²⁷ As espécies deste gênero apresentam pseudobulbos pequenos, delgados e lisos com duas folhas apicais também flexíveis.

Ornithophora é um gênero com uma única espécie, *O. radicans*. Vários pesquisadores têm considerado *Ornithophora* como sinônimo de *Stigmastostalix* por serem bastante semelhantes morfológicamente, mas estes diferem principalmente por *Ornithophora* apresentar pseudobulbo com duas folhas enquanto *Stigmastostalix* possui apenas uma folha por pseudobulbo.

²⁶ Pridgeon, A., Morrison, A. *The illustrated encyclopedia of orchids*. Portland. Timber Press. 1997.

²⁷ Miller, D. Warrer, R. *Orchids of the high mountain atlantic rain forest in southeastern Brazil*. Rio de Janeiro. Consultoria Editorial, 1994.

Zigostates com aproximadamente 12 espécies identificadas. São caracterizadas pela presença de um pseudobulbo pequeno e por uma inflorescência em forma de racemo com flores pequenas.

Phymatidium é um gênero com aproximadamente dez espécies endêmicas da Mata Atlântica, do Sudeste do Brasil e extremo Nordeste da Argentina.²⁸ As espécies são epífitas, apresentam pseudobulbos pequenos e possuem flores brancas com aproximadamente 4 mm de comprimento, apresentam calo de cor verde.

Oncidium é um gênero com aproximadamente 600 espécies descritas ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais da América. A maioria das espécies é epífita, mas algumas são facultativamente ou exclusivamente terrestres.²⁶ No Brasil, ocorrem cerca de 100 espécies distribuídas por todo território mas, principalmente, nas regiões Sul e Sudeste. As espécies do gênero são caracterizadas pela presença de pseudobulbos uni ou bifoliados, folhas flexíveis ou rígidas, flores, geralmente com três sépalas semelhantes em tamanho, forma e cor. Como as flores dos demais gêneros citados anteriormente o labelo de *Oncidium* apresenta uma região diferenciada, mais espessa denominada de calo. O calo localiza-se na base do labelo podendo alcançar até seu ápice. Frequentemente, as flores são amarelas muitas vezes com marcas castanhas, mas também existem espécies com flores castanhas com marcas amarelas ou ainda, totalmente brancas ou rosas.

²⁸ Johnson A. Las Orquídeas del Parque Iguazú. L.O.L.A. 2001

3 Resultados e discussões

3.1 Identificação da composição química dos calos florais

As espécies de Oncidiinae cujas secreções de calos florais foram estudadas estão listadas na Tabela 1. Os resultados e discussões da composição química dos calos florais foram divididos em duas partes. Na primeira parte foi discutido a elucidação da composição dos calos que exsudam óleos em sua superfície (por ex. *Oncidium truncatum* – Figura 7 e *O. pubes* - Figura 8). Na segunda, discutimos a elucidação química dos calos das espécies que não secretam óleos em sua superfície sendo neste último caso as secreções coletadas após a perfuração do calo (por ex. *Oncidium praetextum* – Figura 7 e *O. flexuosum* - Figura 8). Após a discussão dos resultados da elucidação química é apresentada, no final deste Capítulo, a comparação entre a composição química dos calos em relação às demais partes florais.

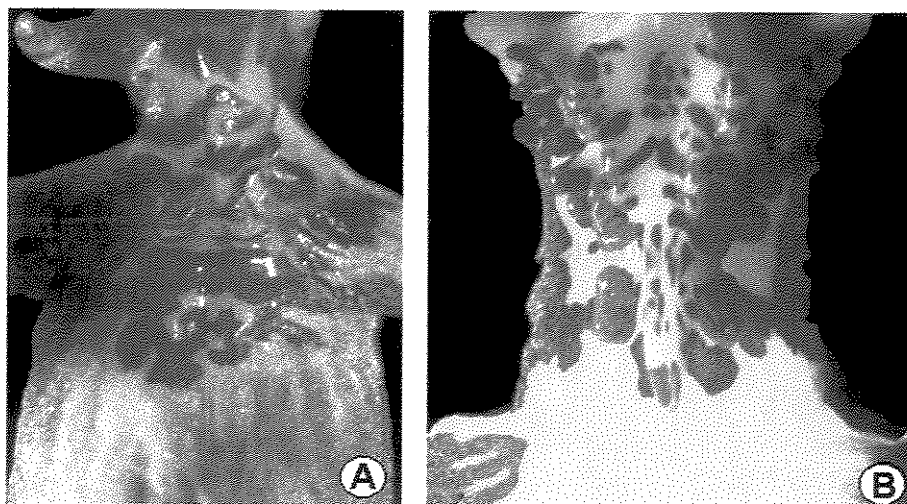


Figura 7. A- Calo floral de *Oncidium truncatum*, B- Calo floral de *O. praetextum*. Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.

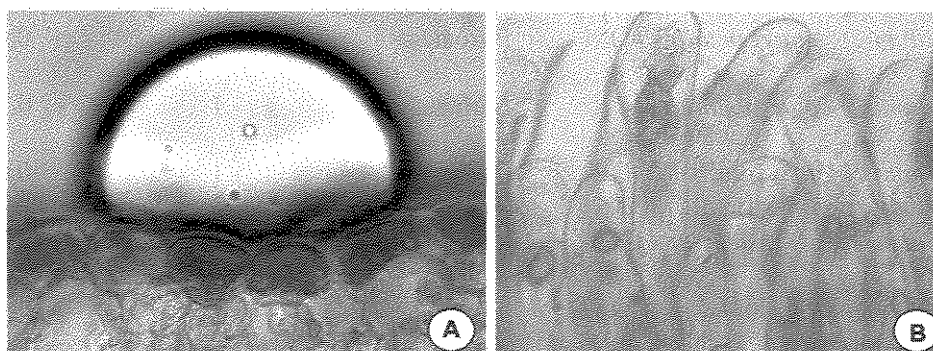


Figura 8. A – Fotografia de microscopia eletrônica dos elaióforos epidermais de *Oncidium pubes* com o óleo sendo exsudado. B – Fotografia de microscopia eletrônica dos elaióforos tricomáceo de *O. flexuosum* com secreção interna. Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.

Tabela 1. Espécies da subtribo Onciidinae estudadas neste trabalho

	Espécies	Siglas	Seção ou Gênero	Número de espécimes analisadas	mg de óleo/ou exsudado por flor
	Calos que secretam óleo				
1	<i>Oncidium pubes</i> Lindl.	OP	Walueva	6	0,3
2	<i>Oncidium cornigerum</i> Lindl.	OC	Walueva	2	0,14
3	<i>Oncidium amictum</i> Lindl.	OA	Walueva	1	0,9
8	<i>Oncidium kautskyi</i> Pabst	KA	Walueva	1	0,3
4	<i>Oncidium truncatum</i> Pabst	OT	Walueva	1	0,2
5	<i>Oncidium hookeri</i> Rolfe	HK	Paucituberculata	4	0,1
6	<i>Oncidium longicornu</i> Mutel	OL	Rhinocerontes	2	0,2
7	<i>Oncidium welterii</i> Pabst.	WE	Synsepala	1	0,03
9	<i>Oncidium trulliferum</i> Lindl.	TR	Rostrata	1	1,0
10	<i>Zygostates lunata</i> Lindl.	ZL	Gênero <i>Zygostates</i>	2	0,3
11	<i>Phymatidium</i> tillandiosioides Barb. Rodr	PD	Gênero <i>Phymatidium</i>	1	0,1
12	<i>Ornithophora radicans</i> (Rchb.f.) Garay & Pabst	RA	Gênero <i>Ornithophora</i>	3	0,3
13	<i>Baptistonia echinata</i> Barb. Rodr.	BE	Gênero <i>Baptistonia</i>	1	1,1
	Calos que não secretam óleo				
14	<i>Oncidium widgrenii</i> Lindl.	OW	Walueva	2	0,02

15	<i>Oncidium longipes</i> Lindl.& Paxt.	LP	Barbata	1	0,05
16	<i>Oncidium macropetalum</i> Lindl.	OM	Barbata	1	0,04
17	<i>Oncidium cogniauxianum</i> Schl.	CX	Barbata	1	0,1
18	<i>Oncidium ciliatum</i> Lindl.	OB	Barbata	1	0,04
19	<i>Oncidium sarcodes</i> Lindl.	AS	Synsepala	1	0,4
20	<i>Oncidium praetextum</i> Rchb.f.	PX	Crispum	3	0,07
21	<i>Oncidium forbesi</i> Hook.	OF	Crispum	2	0,02
22	<i>Oncidium warmingii</i> Rchb.f.	WA	Synsepala	2	0,01
23	<i>Oncidium varicosum</i> Lindl.	VA	Synsepala	1	0,05
24	<i>Oncidium flexuosum</i> Sims	FL	Synsepala	2	0,01
25	<i>Oncidium onustum</i> Lindl.	OO	Onustum	1	0,03
26	<i>Oncidium divaricatum</i> Lindl.	DI	Puvinata	1	0,02
27	<i>Oncidium phymatochilum</i> Lindl.	PH	Planilabria	2	0,02
28	<i>Oncidium pulvinatum</i> Lindl.	PV	Puvinata	1	0,04
29	<i>Oncidium harrisonianum</i> Lindl.	HR	Puvinata	2	0,02
30	<i>Oncidium hydrophyllum</i> Barb. Rodr.	HY	Synsepala	1	0,06
31	<i>Rodrigueziella gomesoide</i>	RG	Gênero <i>Rodrigueziella</i>	1	0,05
32	<i>Gomesa laxifolia</i> Klotzsch ex Rchb.f.	GL	Gênero <i>Gomesa</i>	1	0,06
33	<i>Gomesa crispa</i> . Klotzsch ex Rchb.f.	GC	Gênero <i>Gomesa</i>	2	0,08
34	<i>Gomesa recurva</i> R. Br	GR	Gênero <i>Gomesa</i>	1	0,04
35	<i>Gomesa sessilis</i> Barb. Rodr.	GS	Gênero <i>Gomesa</i>	1	0,06
36	<i>Gomesa</i> sp	SP	Gênero <i>Gomesa</i>	1	0,07
37	<i>Lockhartia lunifera</i> Rchb.f.	LL	Gênero <i>Lockhartia</i>	2	0,01
38	<i>Miltonia spectabilis</i> Lindl.	MI	Gênero <i>Miltonia</i>	1	0,01
39	<i>Rodriguesia venusta</i> Rchb.f.	RD	Gênero <i>Rodriguesia</i>	2	0,02

3.1.1 Análise dos calos de Oncidiínea que exsudam óleos em sua superfície

Foram analisados por CG/EM a composição química dos óleos florais exsudados de 13 espécies. Eles apresentam como substâncias majoritárias, compostos com alto tempo de retenção que eluem a uma temperatura superior a 270 °C em uma coluna cromatográfica HP-5 (Figura 9). Foi observado que se tratavam, principalmente, de diacilgliceróis dos quais foi possível observar a presença de 3 séries homólogas (A, B e C) de compostos com padrão distinto de substituintes como componentes majoritários (Figura 10, Figura 11 e Figura 12). A substituição do glicerol foi determinada como 1,2-diacilglicerol utilizando RMN de ^1H para o óleo de 7 espécies (*Oncidium pubes*, *O. amictum*, *O. cornigerum*, *O. longicornium*, *O. hookeri*, *Ornithophora radicans* e *Zigostates lunata*) e revelaram também que o glicerol apresenta um grupo acetil e um derivado de ácido graxo mono ou dissustituído (grupos OH e/ou OAc). Estes compostos são inéditos necessitando, portanto, uma análise espectroscópica mais detalhada para determinar sua estrutura.

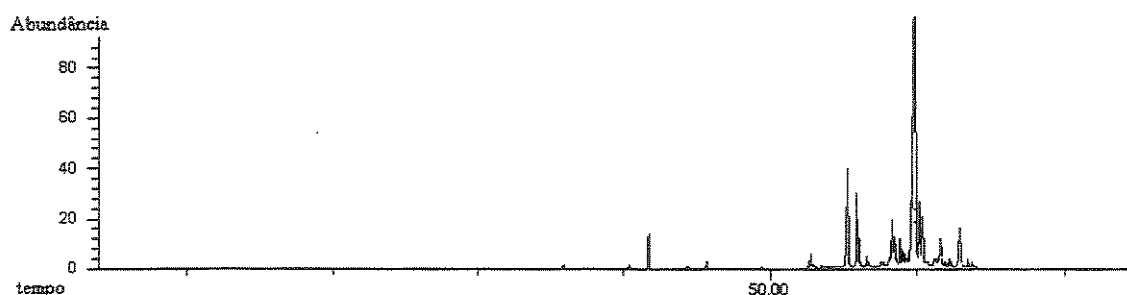


Figura 9. Cromatograma total de íons do óleo floral de *Ornithophora radicans*. Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 μm), forno 50-290 °C, velocidade de aquecimento 4 °C. Min^{-1} . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 °C.

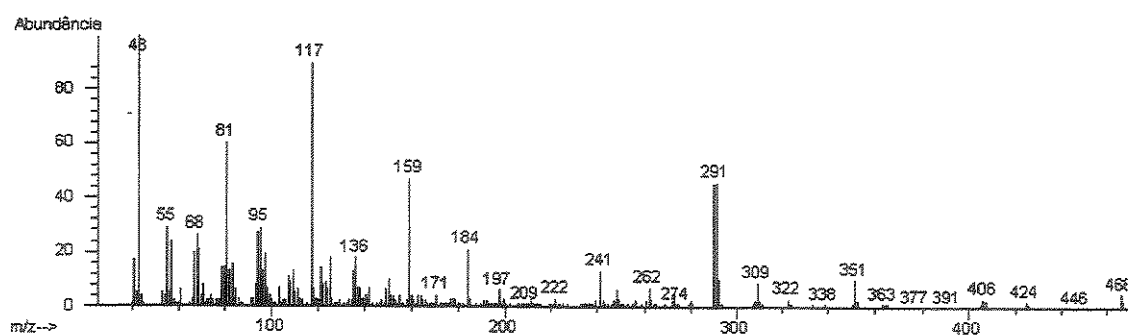


Figura 10. Espectro de massas (70 eV) característico da série homologa A

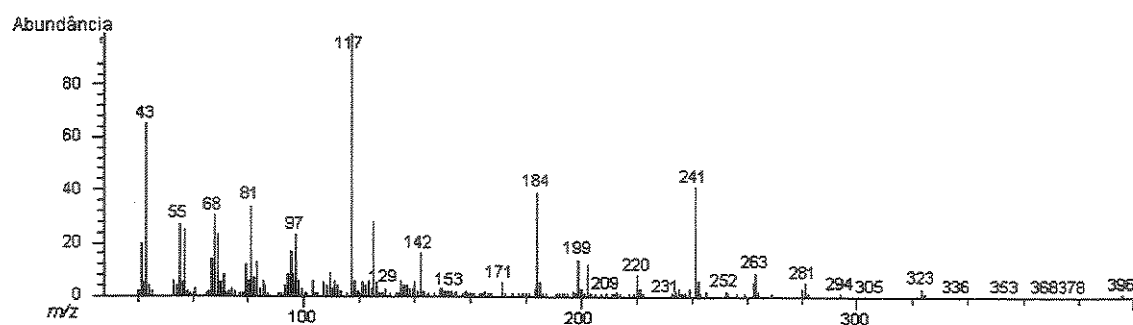


Figura 11. Espectro de massas (70 eV) característico da série homologa B

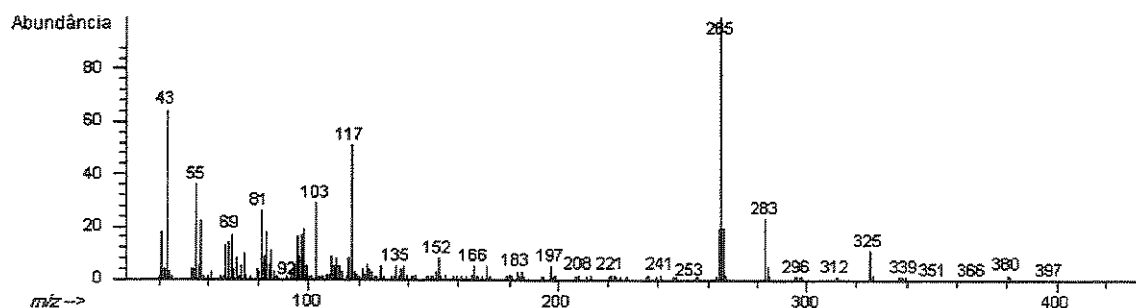


Figura 12. Espectro de massas (70 eV) característico da série homologa C

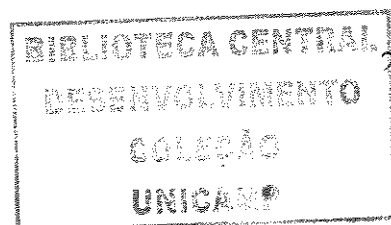
Os óleos florais de *Ornithophora radicans*, *Oncidium pubes* e *Zigostates lunata* apresentaram componentes majoritários pertencentes às séries homólogas A, B e C respectivamente, e por este motivo estas espécies foram selecionadas para caracterização destes padrões.

3.1.1.1 Identificação e determinação da configuração absoluta do composto majoritário do óleo floral de *Ornithophora radicans* - Padrão para a série homologa A

Das 39 espécies de Oncidiinae investigadas nesta tese, *Ornithophora radicans*, foi a única espécie da qual foi obtida uma grande quantidade de flores, aproximadamente 1000 (21,3 g). Suas flores foram coletadas no orquidário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Piracicaba-SP) em fevereiro de 2003. A grande quantidade de flores obtidas permitiu a purificação do produto natural majoritário.

Para purificação do composto majoritário deste óleo floral foi utilizado o extrato floral obtido através da maceração das flores frescas com acetato de etila, sendo este solvente previamente tratado com bicarbonato de sódio para remover o resíduo de ácido acético. O extrato obtido foi rapidamente purificado em coluna de sílica gel impregnada com trietilamina, eluída com hexano/acetato de etila/trietilamina (1:1:0,01). A trietilamina foi adicionada para diminuir a acidez da sílica e evitar uma isomerização significativa do 1,2-diacilglicerol natural para o 1,3-diacilglicerol.²⁹ O mecanismo pelo qual ocorre esta isomerização envolve o ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio da hidroxila à carbonila do éster, que está na posição 2 do glicerol levando ao isômero mais estável 1,3-diacilglicerol (Figura 13), sendo este mecanismo acelerado na presença de meio ácido ou básico.²⁹

²⁹ Lock, C. M., Ward, J. P. Chem. Phys. Lipids, 1986, 39:19.



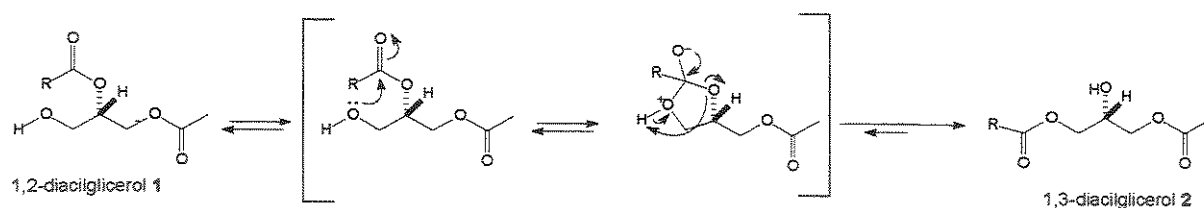
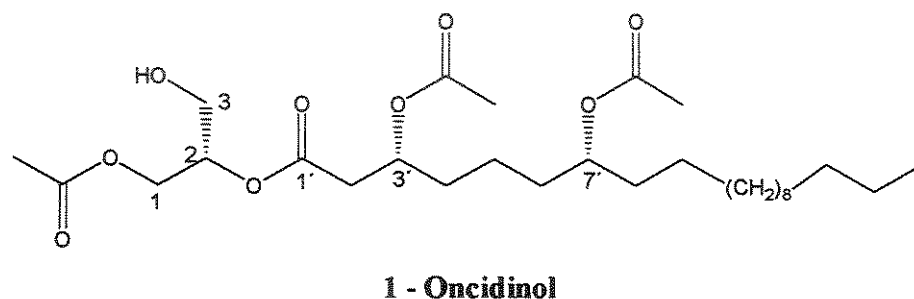


Figura 13. Mecanismo de isomerização de 1,2- para 1,3-diacylglicerol.

Desta coluna foram obtidos 210 mg de uma mistura de compostos cujos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C (ver seção de anexo) e de cromatografia gasosa revelaram a presença de um único diacylglicerol 1 com aproximadamente 90% de pureza.



Por causa da isomerização foram obtidos os dados espectrais da amostra com 90% de pureza. O íon molecular MH^+ é 545 (ESI-EM) somado aos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C foram consistentes com a formula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O}_9$. O espectro de RMN de ^{13}C (Carbono desacoplado e DEPT 135° e 90°) revelou a presença de 4 metilas; 2 metilenos conectados a heteroátomos, vários metilenos sobrepostos, em δ 29,7, característico de cadeia alifática, 3 metinos conectados a heteroátomos e 4 carbonilas. Os espectros de RMN de 1D e 2D (^1H , ^1H COSY, ^1H , ^{13}C HSQC, ^1H , ^{13}C HMBC) permitiram a determinação da

estrutura desta molécula e suas correlações são mostradas na Figura 14 e descritas na Tabela 2.

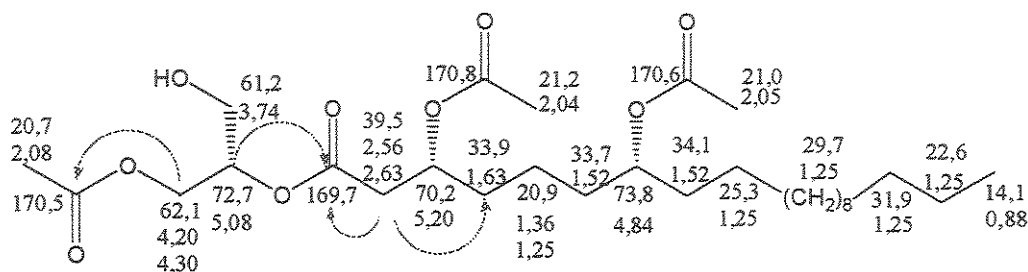


Figura 14. Atribuição total dos hidrogênios e carbonos do Oncidinol, 1, obtidos através de RMN de 1D e 2D (homonuclear de ¹H, ¹H e heteronuclear de ¹H, ¹³C HSQC e HMBC). Flechas indicam as correlações heteronucleares à longa distância que foram diagnósticas para a determinação estrutural.

No espectro de RMN de ¹H (espectro em anexo no final da tese) foi observado a presença de sinais em δ 5,08 (m, 1H, H-2), δ 4,20 (dd, 2H, J=12,1, 4,38 Hz, H-1), 4,30 (dd, 2H, J=12,1, 5,9 Hz, H-1) e δ 3,74 (m, 2H, H-3) que são característicos de derivados do 1,2-diacilglicerol.³⁰

Os sinais em δ_H 5,20 e δ_H 4,84 foram atribuídos aos metinos carbinólicos da porção do ácido graxo. O metino em δ_H 5,21 foi atribuído a posição C-3' devido a sua correlação homonuclear com metilenos H-4' (δ 1,63) e H-2' (δ 2,56 e 2,63). O metileno em δ 2,56 e 2,63 60 (H-2') com um sistema spin do tipo ABX é característico de hidrogênio α uma carbonila com um grupo acetoxi na posição 3'.

³⁰ Krug, P. J.; Boyd, K. G.; Falkner, D. J. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 11063.

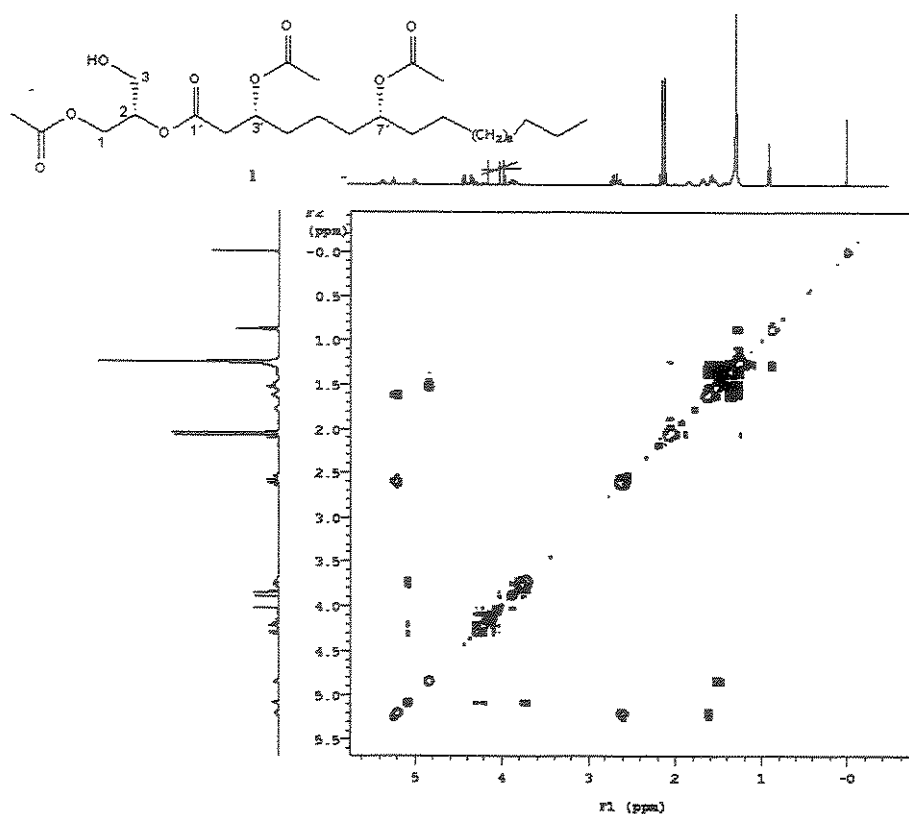


Figura 15. Espectro de RMN de 2D de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto 1.

O sinal em δ 4,84 foi atribuído ao segundo metino $\text{H}-7'$ da cadeia derivada do ácido graxo. A principal evidência da atribuição deste metino na posição $\text{C}-7'$ foi devido ao espectro de RMN de ^{13}C apresentar um metileno em δ_c 20,9 que sugere a presença de um duplo efeito γ -gauche neste carbono.³¹ Assim os metinos carbinólicos ($\text{C}-3'$ -70,2 e $\text{C}-7'$ -73,8) estaria distanciados entre si por três carbonos. Desta forma, o carbono do meio ($\text{C}-5'$, δ 20,9) sofreria o efeito γ -gauche dos grupos em $\text{C}-3'$ e $\text{C}-7'$. Esta observação foi confirmada posteriormente por experimento de INADEQUATE 2D.

³¹ Duddeck, H. 1986. *Topics in Stereochem.* 16: 219-234

O espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (2D-HMBC) permitiu atribuir cada grupo acil na porção do glicerol desta molécula. Dos 4 grupos carbonilas apenas 3 (δ_{C} 170,5, δ_{C} 170,6 e δ_{C} 170,8) mostram correlação com grupos metílicos e portanto são atribuídos aos grupos acetoxílicos. A correlação heteronuclear (2J , ^{13}C , ^1H) entre o H-2' (δ_{H} 2,56 e 2,63) e a carbonila δ_{C} 169,67 e as correlações heteronucleares 3J entre esta carbonila (δ_{C} 169,7) e os hidrogênios H-3' (δ_{H} 5,20) e H-2 (δ_{H} 5,08) evidenciam que o grupo derivado do ácido graxo está localizado na posição 2 do glicerol. A presença da correlação heteronuclear 3J de uma carbonila de um grupo acetoxi com o sinais de deslocamento δ_{H} 4,20 e 4,30, atribuído ao hidrogênio H-1, indica que a cadeia derivada do ácido acético está na posição 1 do glicerol.

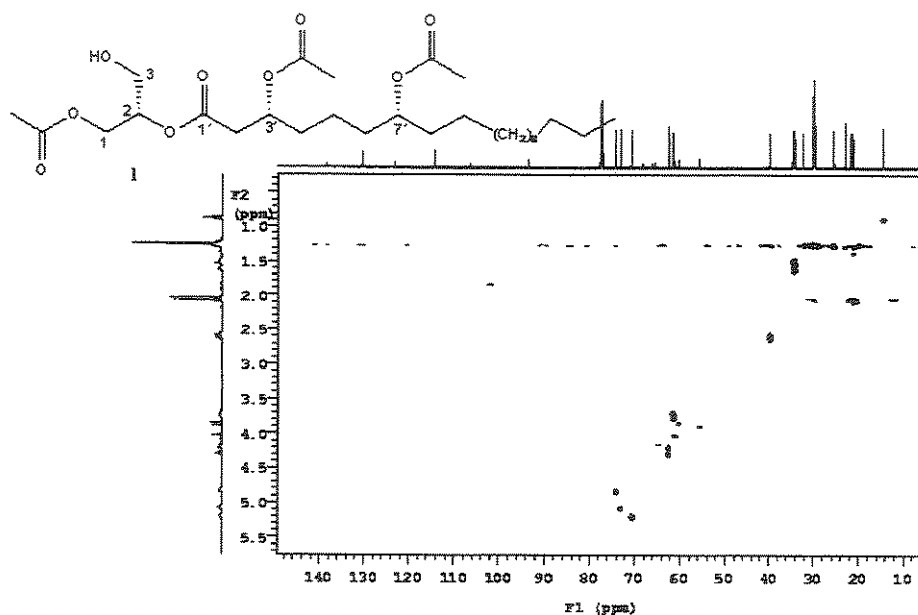


Figura 16. Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação- HSQC (^1H -500 MHz, ^{13}C -125 MHz, CDCl_3) do composto 1.

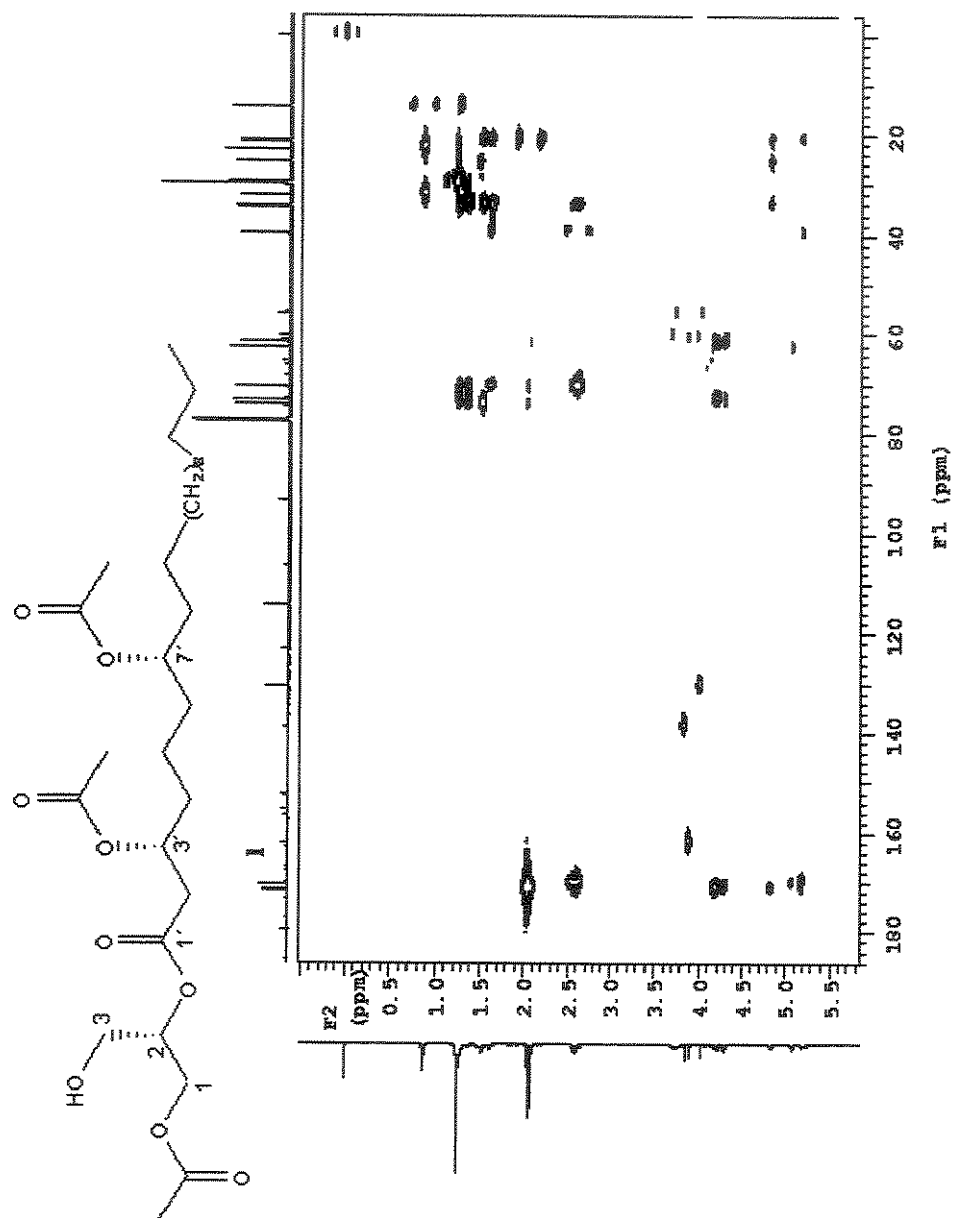


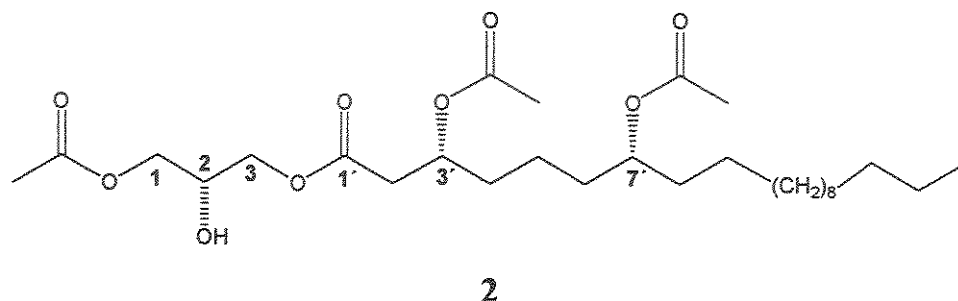
Figura 17. Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a mais de uma ligação- HMBC (^1H -500 MHz, ^{13}C -125 MHz, CDCl_3) do composto 1.

Tabela 2. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, δ -TMS), ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz, δ - CDCl_3), COSY, HSQC e HMBC para o Oncidinol

C#	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)	HMBC
1'	169,7	-	
2'	39,5	2,56 (dd, J = 4.76, 15,3 Hz, 1H) 2,63 (dd, J=7,69, 15,3 Hz, 1H)	C-1', C-3' e C-4'
3'	70,2	5,20 (m, 1H)	C-2'
4'	33,9	1,63 (m, 2H)	C-5', C-3'
5'	20,9	1,36 (m, 1H) 1,25 (m, 1H)	C-4', C-6'
6'	33,7	1,52 (m, 2H)	C-7'
7'	73,8	4,84 (m, 1H)	C-5', C-6', C-8' e C-9'
8'	34,1	1,52 (m, 2H)	C-7'
9'	25,3	1,25 (m, 2H)	C-8'
10'-17	29,7	1,25 (m, 36H)	C-8', C-9', C-18', C-19' e C-20'
18'	31,9	1,25 (m, 2H, H-18')	
19'	22,6	1,25 (m, 2H)	
20'	14,1	0,88 (t, J=6,59, 3H)	
1	62,1	4,20 (dd, J=4.38, 12.08 Hz, 1H) 4,30 (dd, J=5.86, 12.08 Hz, 1H)	C-2, C-3
2	72,7	5,08 (m, 1H)	C-1
3	61,2	3,74 (m, 2H)	
$\text{CH}_3\text{CO-1}$	20,7	2,08 (s, 3H)	
$\text{CH}_3\text{CO-3'}$	21,2	2,04 (s, 3H)	
$\text{CH}_3\text{CO-7'}$	21,0	2,05 (s, 3H)	
$\text{CH}_3\text{CO-1}$	170,5	-	
$\text{CH}_3\text{CO-3'}$	170,8	-	
$\text{CH}_3\text{CO-7'}$	170,6	-	

As tentativas de purificação deste composto em placas preparativas impregnadas com hidróxido de amônio levaram à isomerização do 1,2-diacilglicerol **1** para 1,3-diacilglicerol **2**.²⁹

O composto **2** é facilmente identificado por RMN de ¹H devido a presença dos sinais em forma de multiplete em δ_H 4,11 atribuídos aos hidrogênios H-1, H-2 e H-3. Para confirmar a substituição, 3' e 7' da cadeia lateral do Oncidinol **1** foi realizado o experimento de INADEQUATE 2D com o isômero 1,3-diacilglicerol purificado **2**.



A conectividade entre os carbonos com deslocamentos químicos 73,8 à 14,1 ppm revela as seguintes correlações: δ_C 34,1 e 73,8; 33,7 e 25,3; 25,3 e 29,5; 29,5 e 31,9; 31,9 e 22,60; Ambos 33,7 e 33,9 com 20,9. Devido a adição do acetoacetonato de crômio ocorreu um alargamento das linhas dos carbonos impedindo que os carbonos 33,9 (C-4') e 33,7 (C-6') fossem discriminados, no entanto ambos se correlacionam com o carbono δ_C 20,9, e este fato sugere que a substituição na cadeia lateral seja realmente 3',7' – diacetoxi. Conseqüentemente a estrutura do oncidinol é 1-acetil-2-(3,7-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol.

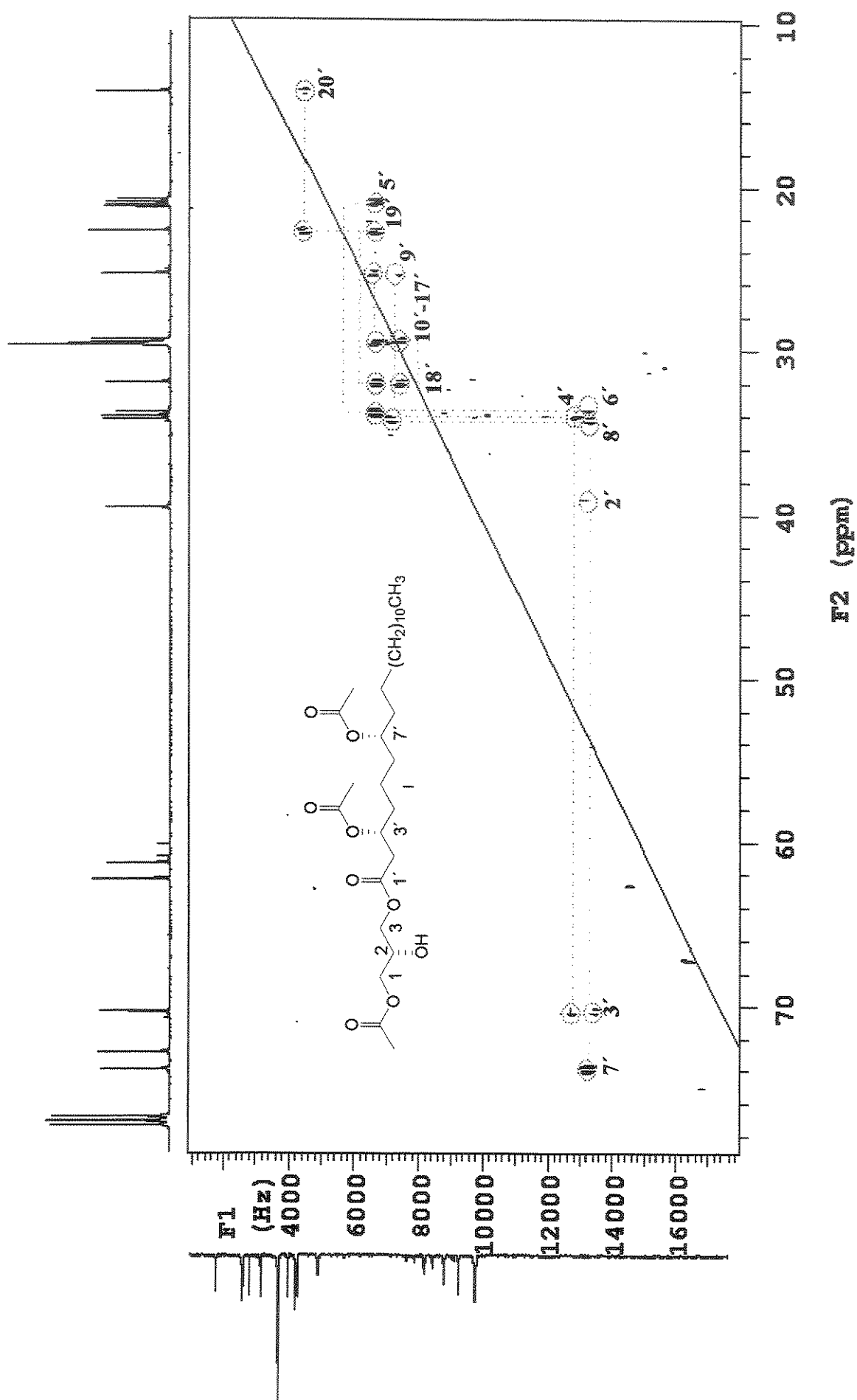
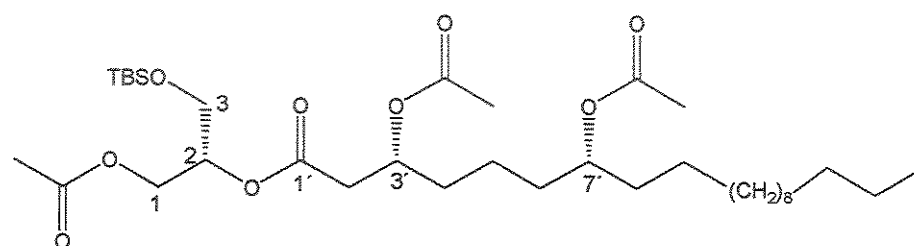


Figura 18. Expansão do espectro de 2D INADEQUATE do composto **2** (75-12 ppm) (11 tesla Varian INOVA, 125.69 MHz, nanotubo) CDCl_3 , 40 mg of **2** em 40 μL de CDCl_3 e 4 mg of aceto acetato de cromo.

Para o purificar o oncidinol 1, sem que ocorresse a isomerização do 1,2- para 1,3-diacilglicerol, foi realizada a proteção da hidroxila 3 com o grupo *t*-butil-dimetil silil. O composto purificado, 1-acetil- 2-(3',7'-diacetoxi-eicosanoil)- 3-*t*-butildimetilsilano 3, apresentou no espectro de RMN de ^1H dois duplos dubletos em δ 4,27 e δ 4,08 atribuídos aos hidrogênios H-1, um dubleto em δ 3,65 atribuído aos hidrogênios H-3. O sinal em δ 0,82 foi atribuído a metila terminal e as metilas do grupo *t*-butildimetilsilano. Deste composto foi obtido o valor de $[\alpha]_D^{20} + 16,5$ ($c=2$, CHCl_3).



3

Para a identificação do oncidinol 1 e sua série homóloga nos demais óleos florais, foram obtidos os dados de CG/EM (espectro de massas e tempo de retenção) do Oncidinol 1 e de seus derivados sililado 4 e acetilado 5. O primeiro íon observado no espectro de massas obtido por CG/EM (70 eV) do composto natural Oncidinol 1 foi o de m/z 466 (8 %) que ocorre devido à perda de uma molécula de água e uma molécula de ácido acético. O íon de m/z 351 (14 %) foi atribuído ao grupo 3,7-diacetoxi-eicosanoila seguido da perda de ácido acético. O íon de m/z 291 (60 %) foi atribuído ao fragmento derivado da cadeia diacetoxi-eicosanoila devido a perda de 2 moléculas de ácido acético. O íon de m/z 117 (100 %) foi atribuído ao fragmento $[\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_3]^+$ da porção do glicerol formado pela perda do radical $[\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{O}_6]^\cdot$ (Figura 20).

O primeiro íon observado no espectro de massas do composto sililado com trimetilsilil (TMS) **4** foi o de m/z 601 (3 %) que foi atribuído a perda de uma molécula de ácido acético seguida da perda de um radical metila do íon molecular. Os íons de m/z 351 (2 %) e m/z 291 (40 %) foram atribuídos aos mesmos fragmentos observados para o Oncidinol **1**. O íon de m/z 189 (100 %) foi atribuído ao caminho de fragmentação I (m/z 117) da porção do glicerol com adição de 72u.

O composto **5** (Figura 19) foi obtido a partir da reação de acetilação do composto **1** e apresentou no espectro de massas o fragmento de m/z 466 (3 %) que foi atribuído à perda de uma molécula de ácido acético do íon molecular. Os íons de m/z 351 (1 %) e o de m/z 291 (40 %) foram atribuídos aos fragmentos derivados da cadeia diacetoxi-eicosanoila da mesma forma que o observado para os compostos **1** e **4**. O íon de m/z 159 (100 %) é atribuído ao mesmo fragmento da porção do glicerol que antes era 117 pela adição de 59 u do acetil.

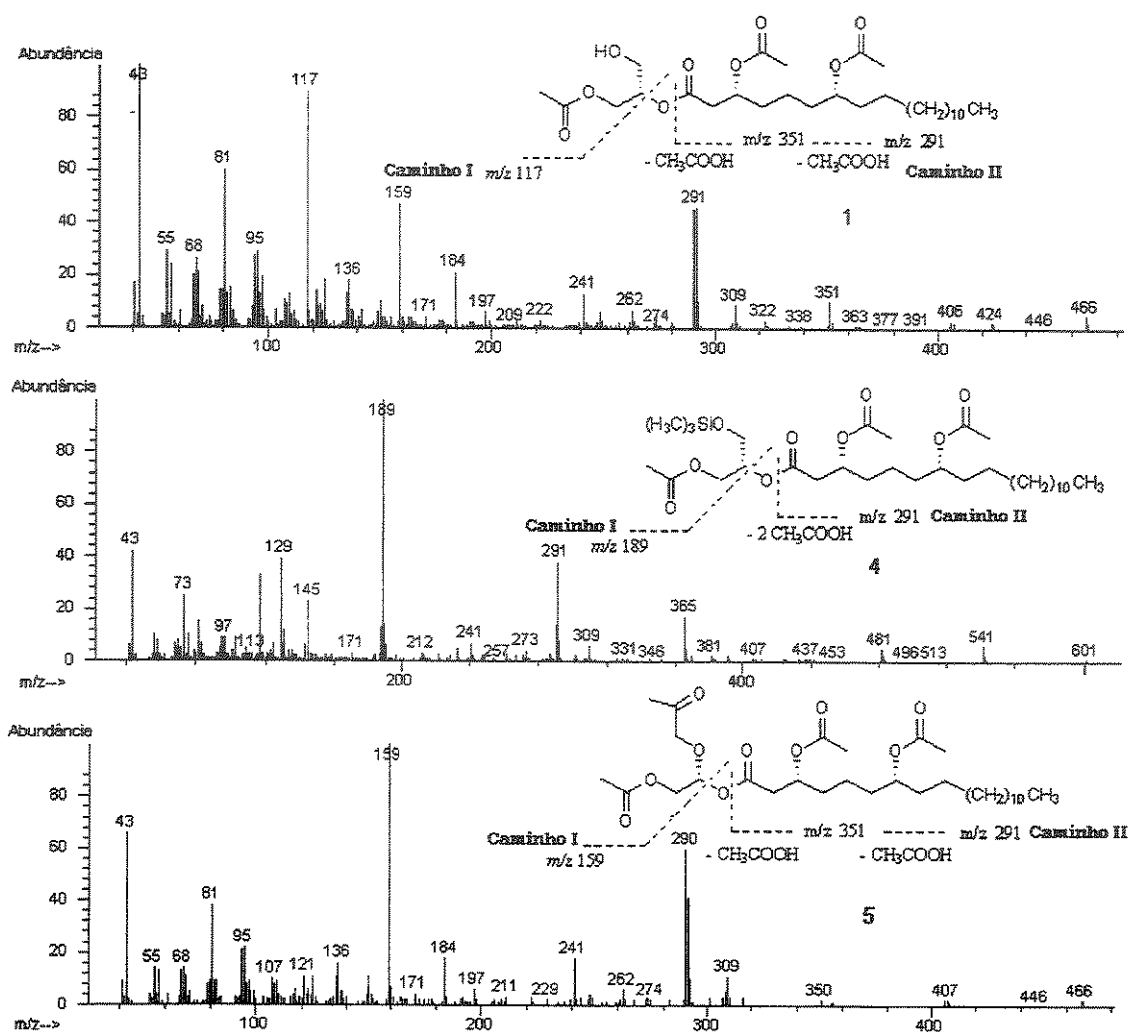


Figura 19. Espectros de massas (70 eV) dos compostos 1, 4 e 5.

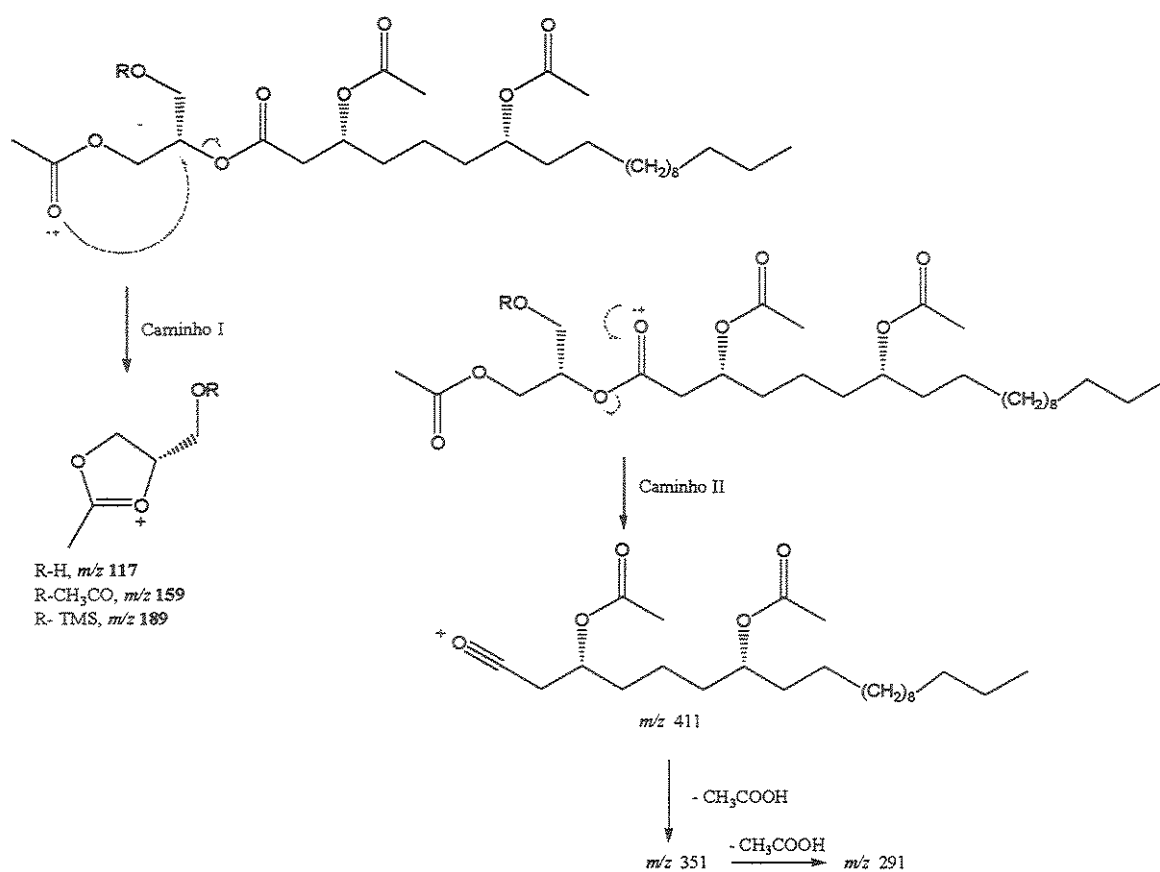


Figura 20. Proposta de mecanismo de fragmentação para formação dos principais fragmentos observados no espectro de massas dos compostos 1, 4 e 5

A partir destes dados foram identificadas a presença do Oncidinol 1 e sua série homóloga nos óleos florais de *Oncidium kautiksy*, *O. hookeri*, *O. longicornu*, *O. amictum*, *O. praetextum*, *O. welterii* e *Phymatidium delicatulum* e *Phymatidium tillandiosioides* (Tabela 11).

3.1.1.1.1 Determinação da configuração absoluta do Oncidinol 1

Diacilgliceróis assimetricamente substituídos são mensageiros secundários que ativam a proteína cinase C. A ativação da proteína cinase regula o crescimento e diferenciação celular, e desregula a atividade mitogênica.³² Diante destas informações, aliadas a importância destes óleos na vida das abelhas, é essencial para compreender a real função destes compostos a determinação da sua configuração absoluta.

Como a isomerização do 1,2- para 1,3-diacilglicerol (

Figura 13) ocorre com retenção de configuração o composto 2 pode ser utilizado para determinação da configuração absoluta do carbono 2 através do método de Mosher.³³

Este é o método mais utilizado para determinar a configuração absoluta de álcoois secundários e utiliza as diferenças de deslocamentos de hidrogênio em análises de RMN de ¹⁹F e de ¹H dos derivados de α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacetatos (MTPA). A aplicação deste método foi ampliada consideravelmente por Kakisawa e colaboradores³⁴ através da aplicação de diferenças de deslocamento de outros sinais e não somente os dos vizinhos aos centros assimétricos como descrito no método original, já que os instrumentos de RMN utilizados por Mosher³³ eram de 60-100 MHz e a completa atribuição dos hidrogênios de moléculas orgânicas complexas era praticamente impossível

³² Topham, M. K.; Bunting, M.; Zimmerman, G. A.; McIntyre, T. M.; Blackshear, P. J.; Prescott, S. M. *Nature* 1998, 394, 697-700.

³³ Dale, J. A.; Mosher, H. S.; *Journal American Chemical Society*, 1973, 95, 512, Sullivan, G. R.; Dale, J. A.; Mosher, H. S.; *Journal Organic chemistry*. 1973, 38, 2143

³⁴ Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. 1991. *J. Amer. Chem. Soc.* 113, 4092-4096.

Este método baseia-se no efeito anisotrópico da fenila do auxiliar quiral (MTPA) sobre os substituítes (L_1 e L_2) do álcool esterificado. Nos ésteres do MTPA foi evidenciado que o confôrmero predominante é o que o grupos trifluorometil, carbonila e hidrogênio carbinólico estão no mesmo plano (Figura 21). Sendo assim, a fenila protege os hidrogênios de L_1 enquanto os hidrogênios de L_2 não são alterados e com a mudança da configuração do MTPA o inverso é observado, ou seja, a fenila protege os hidrogênios de L_2 enquanto os hidrogênios de L_1 permanecem inalterados (Figura 21).

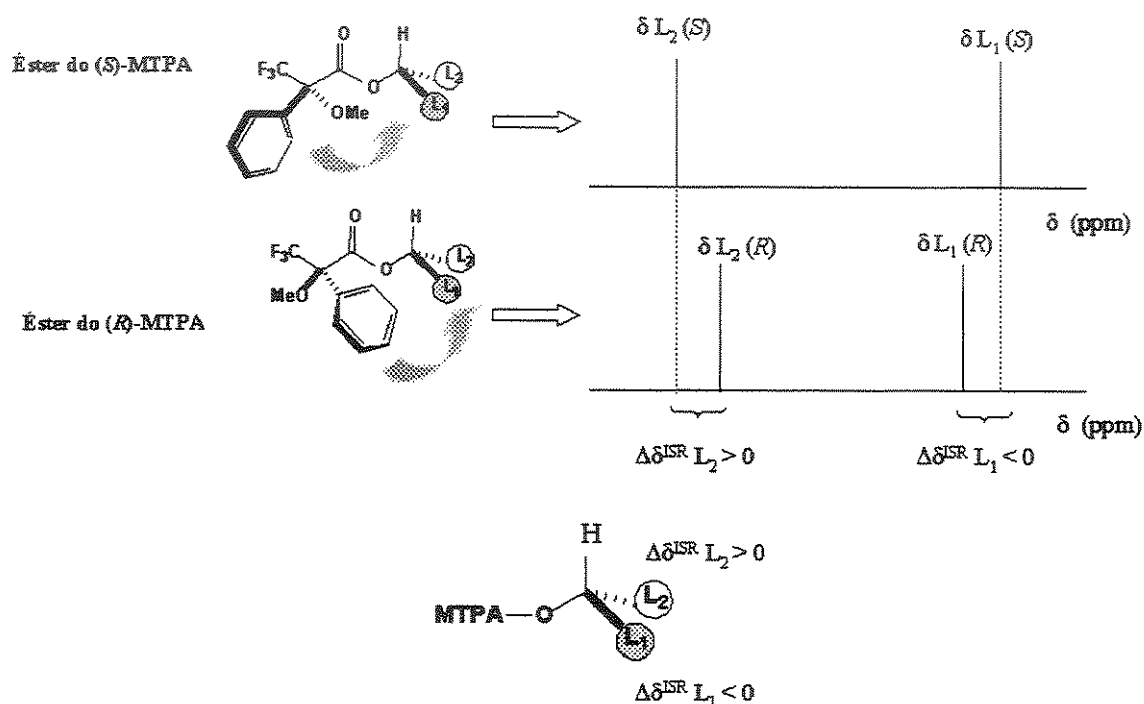


Figura 21. Modelos conformacionais para ésteres do MTPA e a influência nas magnitudes no espectro de RMN de 1H e das medidas de $\Delta\delta^{SR}$. As setas indicam o efeito de proteção e desproteção causado pelo sistema aromático.

Desta forma, foi utilizado este procedimento para determinação da configuração absoluta do Oncidinol **1** e as etapas reacionais realizadas são descritas no Figura 22.

O 1,3-diacilglicerol **2** foi esterificado com o *R*-(+) ácido de Mosher (*R*-MTPA) e com o *S*-(-)- ácido de Mosher (*S*-MTPA) separadamente na presença de 4-dimetilaminopiridina e dicitcloexilcarbodiimida sob refluxo (Figura 22).

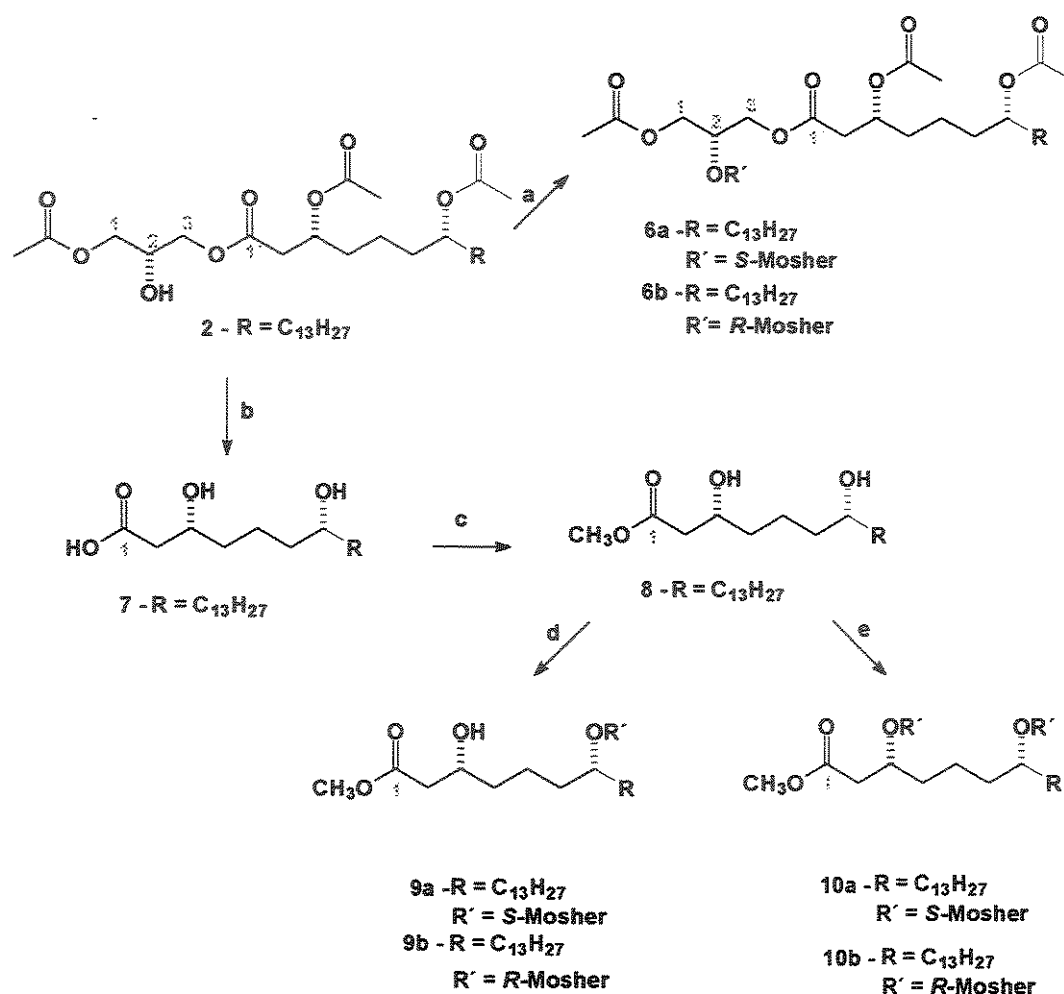


Figura 22. Reações de obtenção dos derivados de Mosher

Legenda: a-DCC/DMAP/CH₂Cl₂/ácido *S*-α-metoxi-α-(trifluorometil)-fenilacético(MTPA), 5 min. 0 °C e 5 horas, refluxo, (71.6%); DCC/DMAP/CH₂Cl₂/R-MTPA, 5 min. 0 °C e 5 horas, refluxo (67%). b- LiOH.H₂O/THF/MeOH/H₂O. 30 min. 0 °C, 24h, ta, CH₃COOH, 70% v/v, pH=7, c- diazometano, 0 °C (36%). d- DCC/DMAP/CH₂Cl₂/*S*-MTPA, 15 min. 0 °C e 15 horas a ta, (13,6%), DCC/DMAP/CH₂Cl₂/R-MTPA, 15 min. 0 °C e 15 horas a ta (13,6 %). e- DCC/DMAP/CH₂Cl₂/*S*-MTPA, 5 min. 0 °C e refluxo 24h (22 %), DCC/DMAP/CH₂Cl₂/R-MTPA, 5 min. 0 °C e refluxo 24h (22 %)

Os dados de RMN de ^1H resumidos dos derivados *S*, *R* de Mosher **6a** e **6b**, respectivamente, (Esquema 1, Tabela 3 , Figura 23 a Figura 25) revelam a proteção dos hidrogênios H-1 e H-2' e desproteção dos hidrogênios H-3 e da metila do grupo acetoxílico no carbono C-1 do composto **6a**. Já o composto **6b** apresentou os hidrogênios H-1 e H-2' desprotegidos e os hidrogênios H-3 e da metila do grupo acetoxílico sobre o carbono 1 protegidos. Utilizando o modelo de Mosher e verificando os efeitos de anisotropia dos grupos MTPAs nos compostos **6a** e **6b** sugerimos a configuração *2R* para **2** e por consequência *2S* no produto natural **1** por mudança de prioridades segundo a regra de Cram, Ingold e Prelog.

Tabela 3. Atribuição dos dados parciais de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) dos ésteres 6a e 6b

Hidrogênio	δ_{H}		$\Delta\delta_{S-R}$
	6a	6b	
2'	2,48	2,54	- 0.06
3	4,33*	4,41*	- 0.08
	4,14*	4,20*	- 0.06
1	4,41*	4,32*	+ 0.09
	4,18*	4,11*	+ 0.07
CH ₃ do grupo acetoxi-1	2,06	1,98	+ 0.07

*Atribuições baseadas em correlações de HMBC

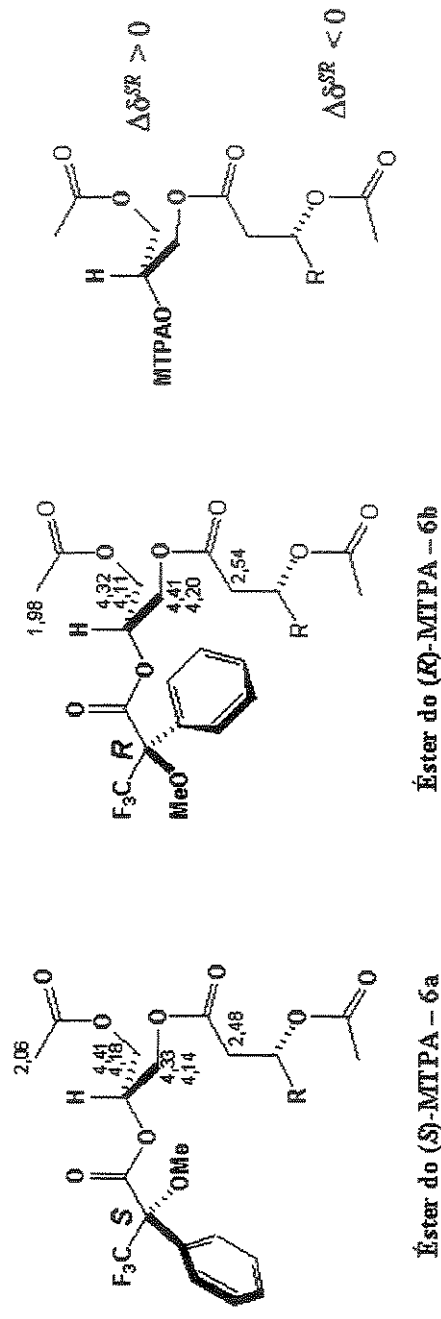


Figura 23. Modelos conformacionais para ésteres **6a** e **6b** e os deslocamentos encontrados no espectro de RMN de ¹H para os hidrogénios que sofrem o efeito anisotrópico do sistema aromático e as magnitudes das medidas de $\Delta\delta^{SR}$

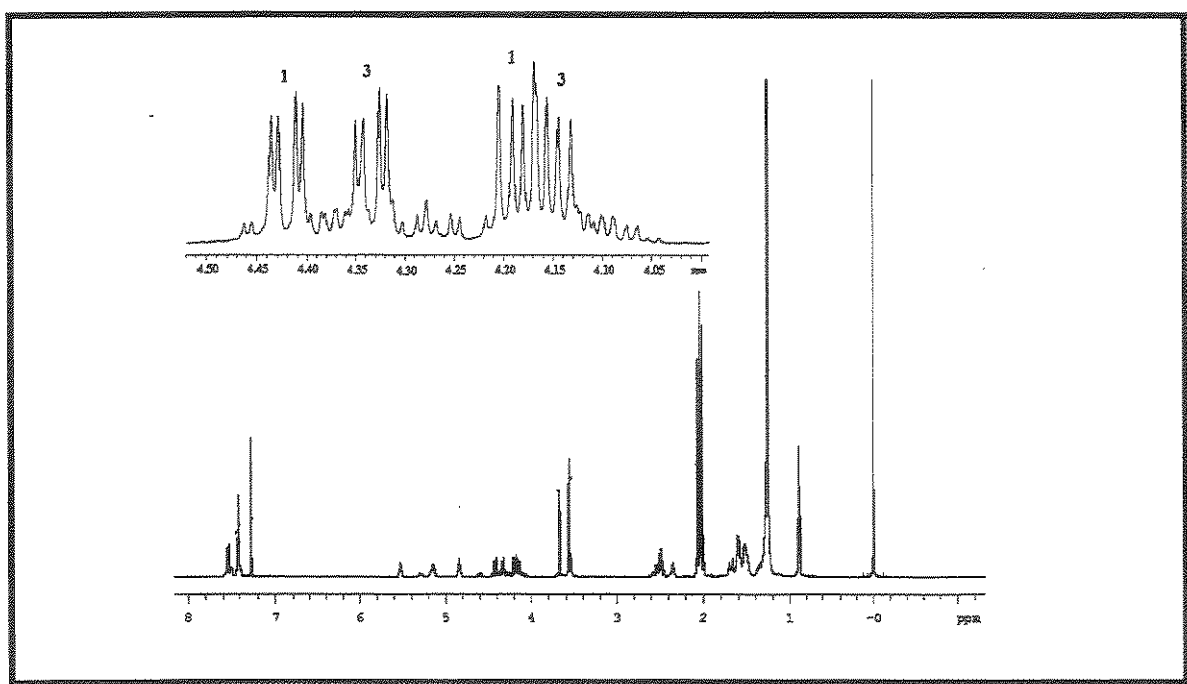


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto 6a

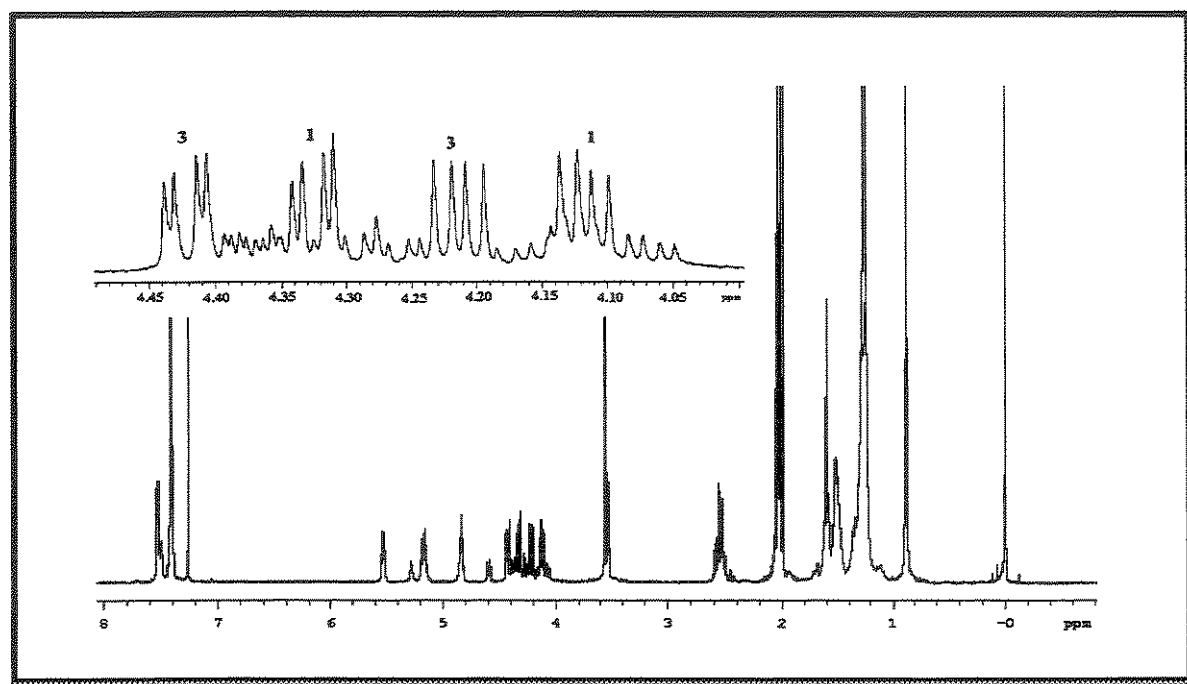
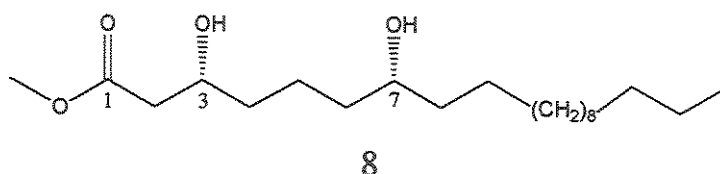


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto 6b

3.1.1.1.1 Determinação da configuração absoluta dos carbonos 3' e 7'

Hidrólise do diacilglicerol



Para obter a configuração dos carbonos 3' e 7' foi utilizada como estratégia a desproteção das hidroxilas. Inicialmente foi testada a hidrólise, de um padrão de triacilglicerol, utilizando uma solução de hidróxido de sódio sob condições brandas.³⁵ Foi observado através de uma CCD que a hidrólise ocorreu. Em seguida foi realizada a mesma reação com o óleo floral. Sendo observado a formação de produtos de hidrólise os quais após elaboração da reação foram metilados com diazometano e analisada por CG/EM. O espectro de massas do produto obtido revelou que ocorreu a desidratação do álcool.

Na segunda metodologia, o diacilglicerol 2 foi hidrolisado em meio básico (hidróxido de lítio) e uma mistura tetraidrofurano, metanol e água na proporção de 3:1:1. Neste caso a reação levou ao ácido 3,7-diidróxi-eicosanóico. O ácido foi metilado com diazometano e purificado em coluna de sílica gel eluída com hexano/acetato (1:1) obtendo-se o composto 8 com

³⁵ Trimurtulu, G.; Ohtami, I.; Patterson, M. L.; Moore, R. E.; Corbett, T. H.; Valeriote, F. A.; Demchik, L. 1994, *Jornal American Chemical Sociate* 116, 4729

rendimento de 36%.³⁶ O espectro de RMN de ^1H do composto **8** apresentou sinais intensos e largos em δ 1,25 característico dos vários grupos metilênicos existentes na cadeia, na região δ 2,42 e δ 2,53 foram observados dois duplos dubletos atribuídos aos hidrogênios H-2, um multipeto em δ 3,60 e δ 4,02 que foram atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-3, respectivamente.

Determinação da configuração do carbono 7 – Esterificação seletiva da hidroxila 7 com ácido *R*-(+)-Mosher e *S*-(-)-Mosher

A determinação da configuração de um centro em poliálcoois aplicando a metodologia de Mosher merece cuidado especial, pois o efeito da anisotropia, sobre o qual repousa o método, é um fenômeno que ocorre através do espaço e assim os deslocamentos químicos (e $\Delta\delta^{SR}$) observados para certos hidrogênios é resultado da aditividade de efeitos de proteção e desproteção de todos MTPAs presentes no peréster e não somente devido à influência de um MTPA. Cada reagente contribui para deslocamentos químico em diferentes caminhos (proteção e desproteção) e a intensidade referente ao deslocamento depende da estrutura do poliol, portanto o resultado $\Delta\delta^{SR}$ leva a deslocamentos e valores diferentes daqueles previstos se apenas o efeito de um auxiliar fosse considerado.³⁷ Por este motivo foi realizada a esterificação seletiva da hidroxila 7 do 3,7-diidroxi-eicosanoato de metila. A esterificação seletiva da hidróxila na posição 7 do composto **8** pode ser realizada devido à menor reatividade do OH-C3 devido a sua ligação de hidrogênio com a carbonila.

³⁶ Nicolau, K. C.; Webber, S. E. *Journal European Organic Chemistry*, **1983**, 453.

³⁷ Seco, J. M.; Martino, M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Organic Letters*, **2000**, 2, 3261

O composto **8** foi esterificado com o *S*-(-) e com o *R*-(+) ácido de Mosher separadamente a temperatura ambiente levando aos compostos **9a** e **9b** (Figura 22). As análises dos espectros de RMN de ^1H dos compostos **9a** e **9b** (Figura 27 e Figura 29) revelou a presença de apenas um sinal, na região de metinos carbinólicos esterificados, em 5,09 ppm indicando que apenas a hidroxila **7** foi esterificada com o MTPA.

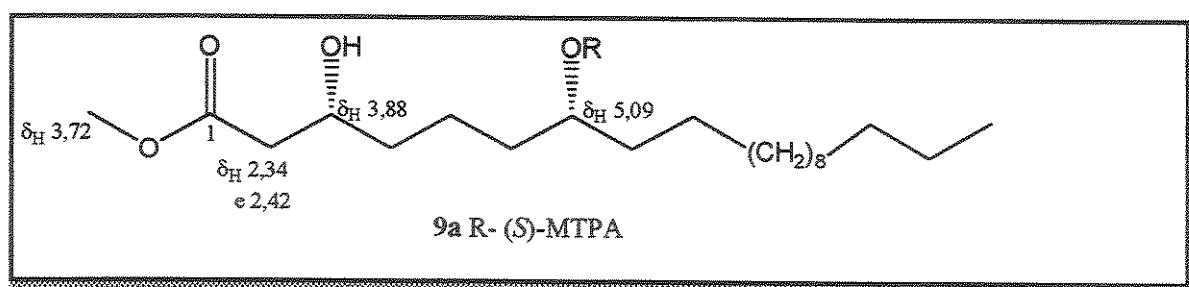


Figura 26. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração do éster de Mosher **9a**

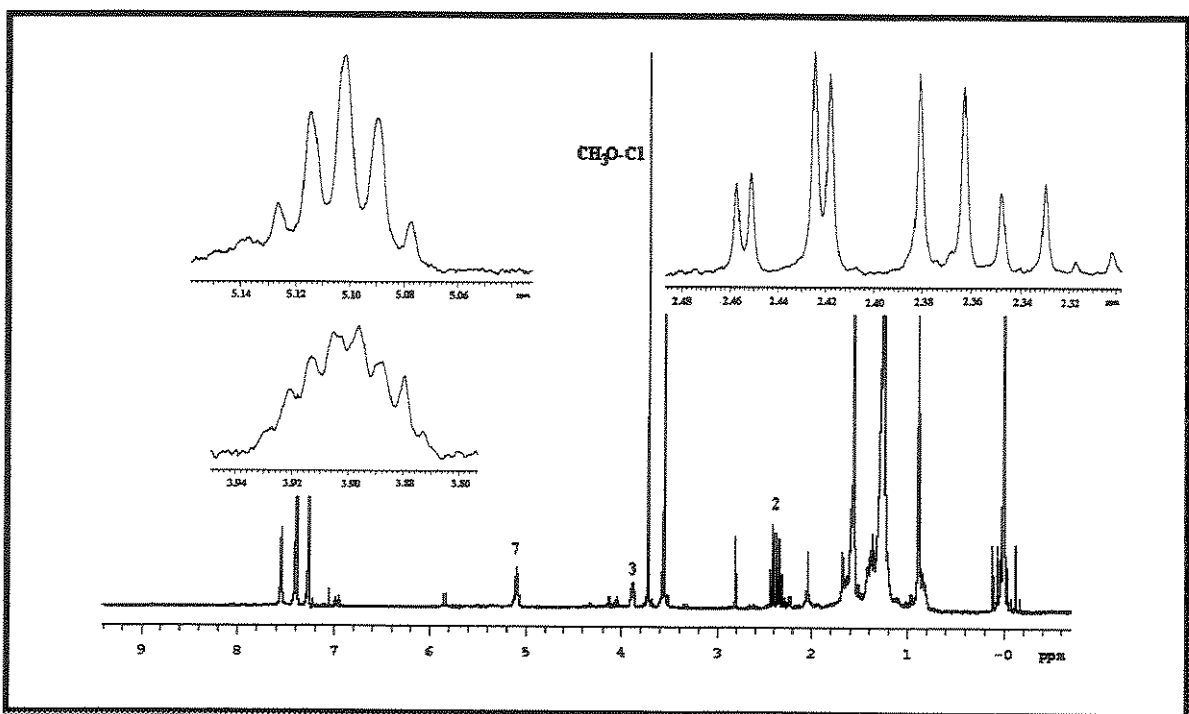


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto **9a**

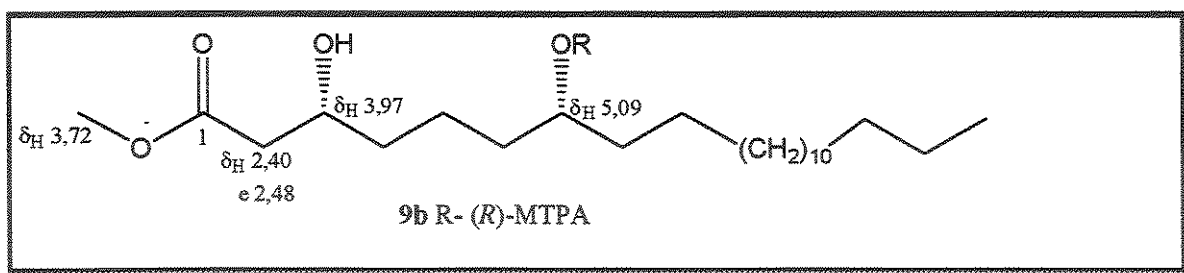


Figura 28. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração do éster de Mosher **9b**

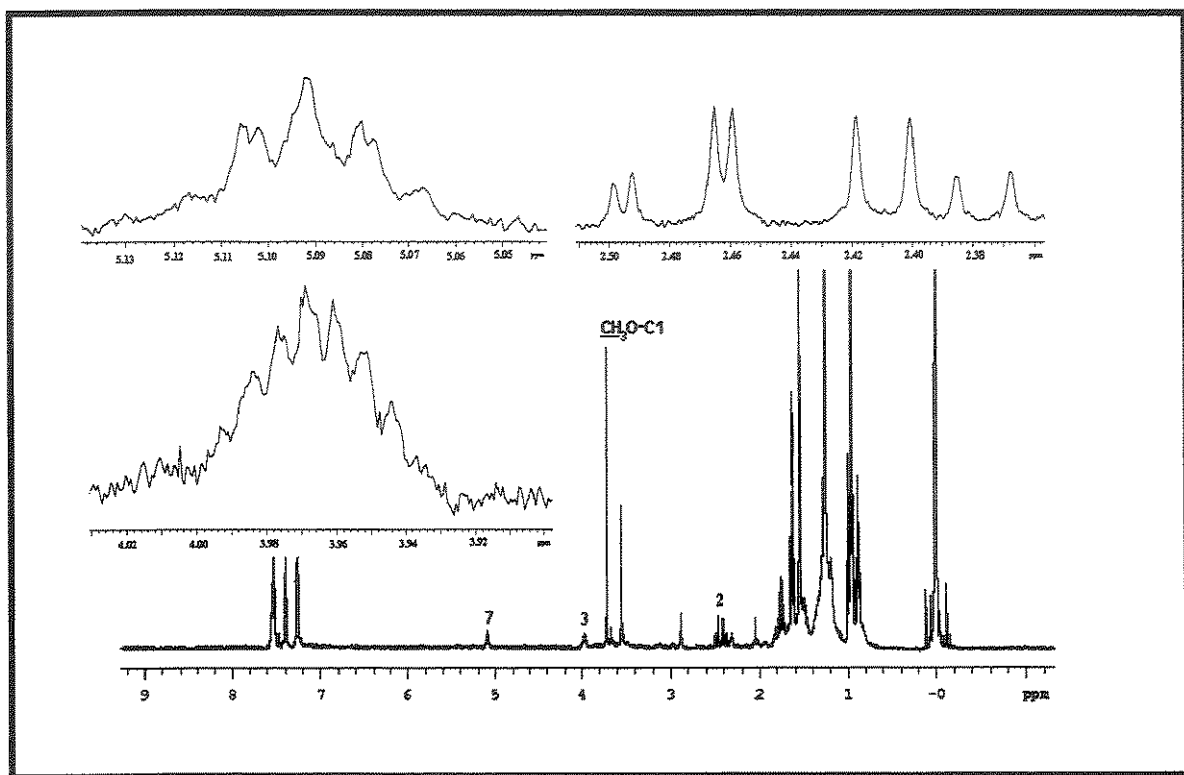


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto **9b**.

Os deslocamentos e valores de $\Delta\delta^{SR}$ apresentados (Tabela 4) revelam a proteção dos hidrogênios H-2 e H-3 de **9a** em relação a **9b** pela presença dos grupos *S*-MTPA e *R*-MTPA respectivamente. Como esperado, não foi observado uma variação no deslocamento do hidrogênio H-7 na presença de ambos MTPAs (Figura 26, Figura 27, Figura 28 e Figura 29). Devido a

sobreposição dos sinais na região de deslocamentos de H-8 e H-9 (δ 1,5 - 1,6) não foi possível observar a variação nos deslocamentos destes hidrogênios. Utilizando o modelo de Mosher foi possível sugerir a configuração 7-*R* para o composto **8** e conseqüentemente 7'-*R* para o oncidinol **1**.

Tabela 4. Atribuição dos dados parciais de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) dos ésteres dos compostos **9a** e **9b**

Hidrogênio	δ_{H}		$\Delta\delta_{S-R}$
	9a	9b	
CH_3O	3,72	3,72	0,00
2	2,34	2,40	- 0,06
	2,42	2,48	- 0,04
3	3,88	3,97	- 0,08
7	5,09	5,09	0,00

Determinação da configuração do carbono 3 – Esterificação das hidroxilas 3 e 7 com ácido *R*-(+)-Mosher e *S*-(-)-Mosher

Para determinar o último centro assimétrico do Oncidinol **1** foram esterificadas as duas hidroxilas do 3,7-diidroxi-eicosanoato de metila **8** levando aos compostos **10a** e **10b** (Figura 22). A reação neste caso ocorreu sob refluxo devido à baixa reatividade da hidroxila 3 (Figura 22).

As análises dos espectros de RMN de ^1H dos compostos **10a** e **10b** revelam a presença de dois sinais, na região dos metinos carbinólicos esterificados indicando que as hidroxilas 3 e 7 foram esterificadas com os

MTPAs (Figura 31 e Figura 33). Os deslocamentos e valores de $\Delta\delta^{SR}$ apresentados (Tabela 5) revelaram a proteção dos hidrogênios H-1', H-2 e H-3 e a desproteção do hidrogênio metínico H-7 no composto 10a.

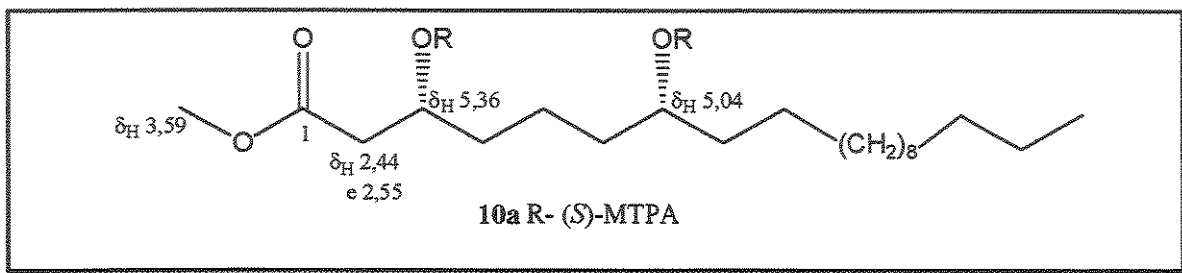


Figura 30. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração do éster de Mosher 10a

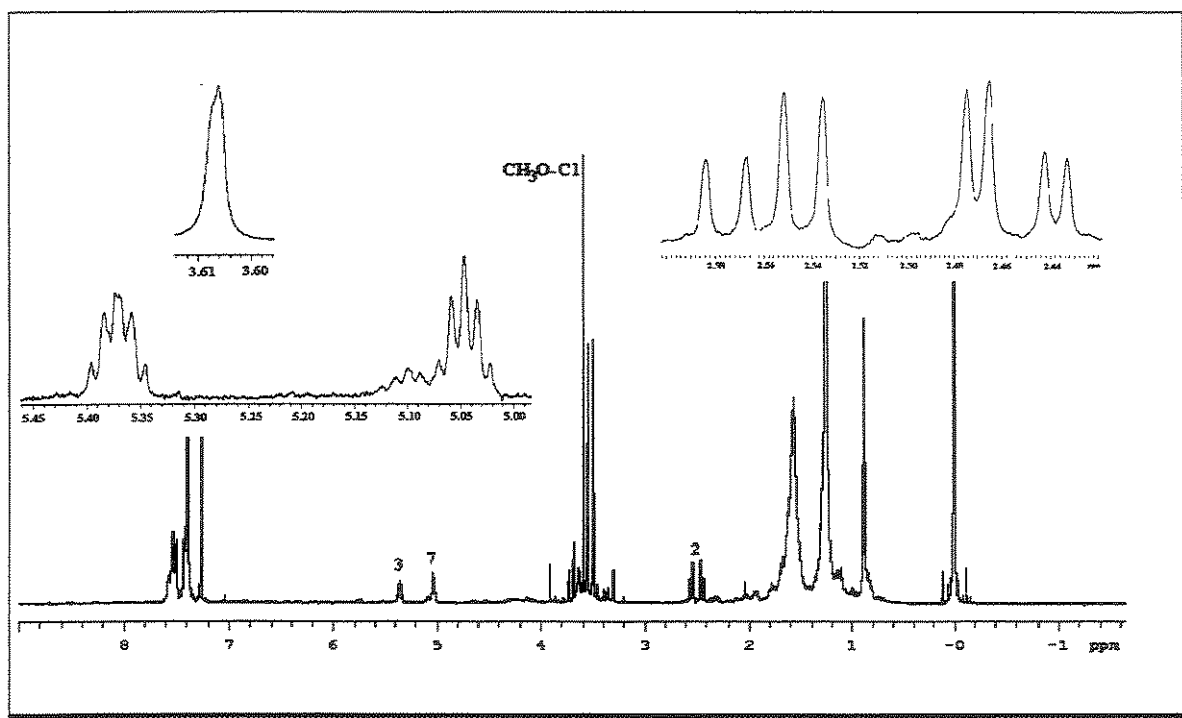


Figura 31. Espectro de de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto 10a.

Já para o composto **10b** foram observados as desproteções dos hidrogênios H-1', H-2 e H-3 e a proteção do hidrogênio metínico H-7. O hidrogênio metínico H-7 sofre influência de apenas do MTPAs na posição 3, pois não foi observada nenhuma influência dos MTPAs da posição 7 nos compostos **9a** e **9b**. Utilizando o modelo de Mosher foi sugerida configuração 3-*R* para **8** e 3'-*R* para **1**.

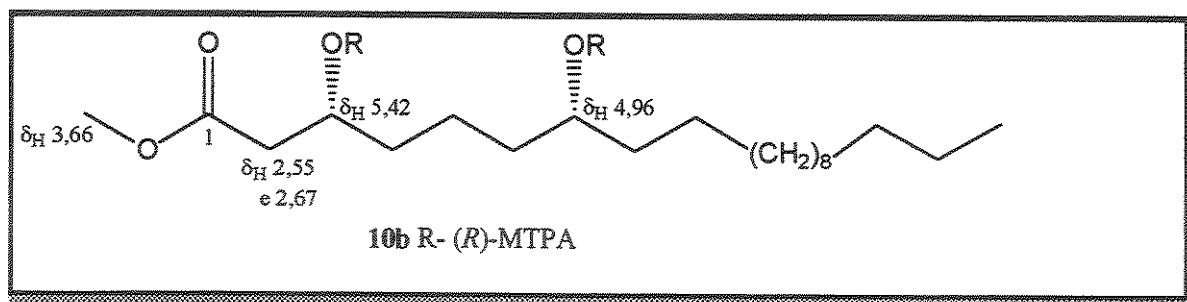


Figura 32. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração do éster de Mosher **10b**

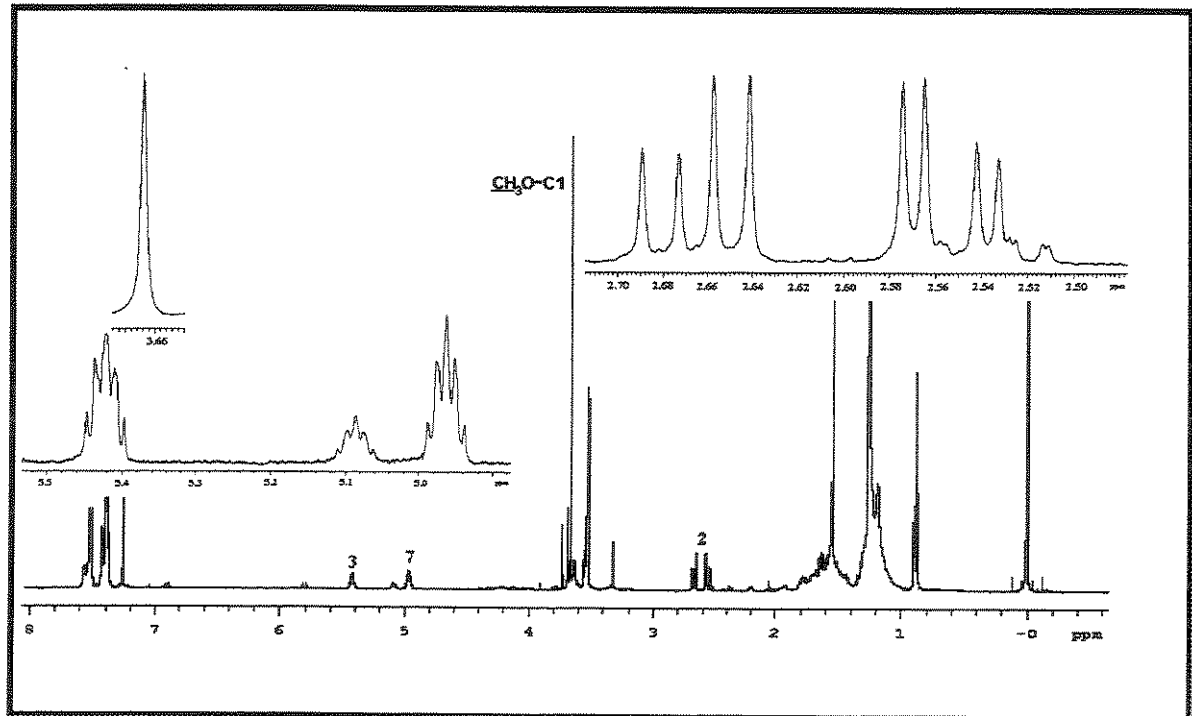


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS) do composto **10b**

Tabela 5. Atribuição dos dados parciais de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3 , δ -TMS) para os ésteres dos compostos **10a** e **10b** derivado do (*S*)- e (*R*)-Mosher.

Hidrogênio	δ_{H}		$\Delta\delta_{S-R}$
	10a	10b	
1'	3,59	3,66	- 0,07
2	2,44	2,55	- 0,11
	2,55	2,67	- 0,12
3	5,36	5,42	- 0,06
7	5,04	4,96	+ 0,08

Com base nestes resultados foi sugerido que o Oncidinol **1** seja o (2*S*,3'*R*,7'*R*)-1-acetil-2-(3',7'-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol.

3.1.1.2 Identificação dos compostos majoritários do óleo floral de *Oncidium pubes*- Padrão para a série homologa B

A espécie *O. pubes* foi a que apresentou maior número de indivíduos cultivados em casa de vegetação. Foi realizada a análise do óleo floral de quatro espécimes trazidos de três diferentes habitats e mantidos em cultivo na casa de vegetação e com uma espécime coletada em seu habitat natural. Os resultados obtidos revelam pouca variação entre a composição química de seus óleos, como pode ser observado nos Cromatogramas abaixo. Esta pequena variação também foi observada para amostras de outras espécies. Esta conformidade na composição revela a importância destes compostos na vida destas orquídeas independente do habitat onde elas se encontram. Estes resultados permitem que esta composição possa ser avaliada em estudos de quimiotaixonomia.

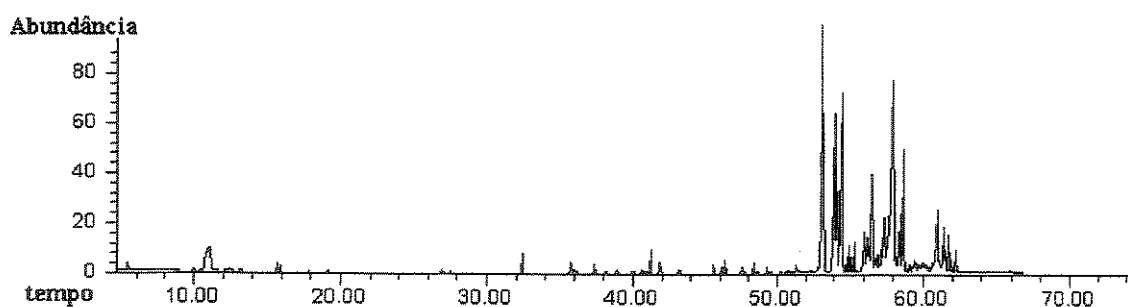


Figura 34. Cromatograma total de íons de *Oncidium pubes* – (código -Mz11). Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 μ m), forno 50-290 $^{\circ}$ C, velocidade de aquecimento 4 $^{\circ}$ C. Min^{-1} . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 $^{\circ}$ C

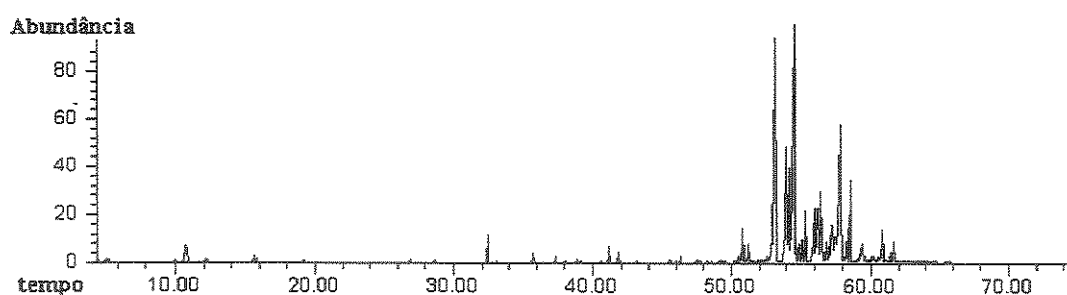


Figura 35. Cromatograma total de íons de *Oncidium pubes* – Espécie coletada em Atibaia-SP (código -Mz16) Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 μ m), forno 50-290 $^{\circ}$ C, velocidade de aquecimento 4 $^{\circ}$ C. Min^{-1} . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 $^{\circ}$ C

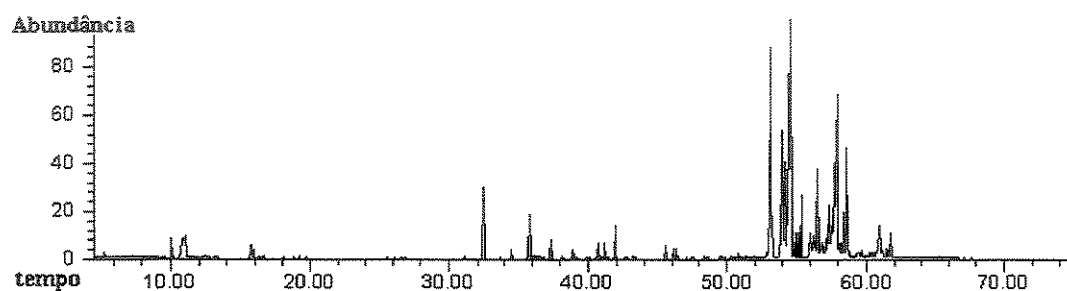


Figura 36. Cromatograma total de íons de *Oncidium pubes* – Espécie coletada na Serra do Japi-SP (código -Mz17) Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 μ m), forno 50-290 $^{\circ}$ C, velocidade de aquecimento 4 $^{\circ}$ C. Min^{-1} . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 $^{\circ}$ C

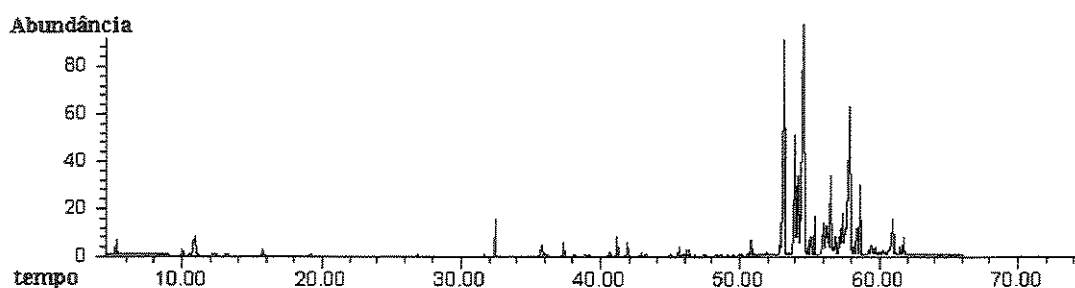


Figura 37. Cromatograma total de íons de *Oncidium pubes* –(código -Mz29) Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 μ m), forno 50-290 $^{\circ}$ C, velocidade de aquecimento 4 $^{\circ}$ C. Min^{-1} . Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 $^{\circ}$ C

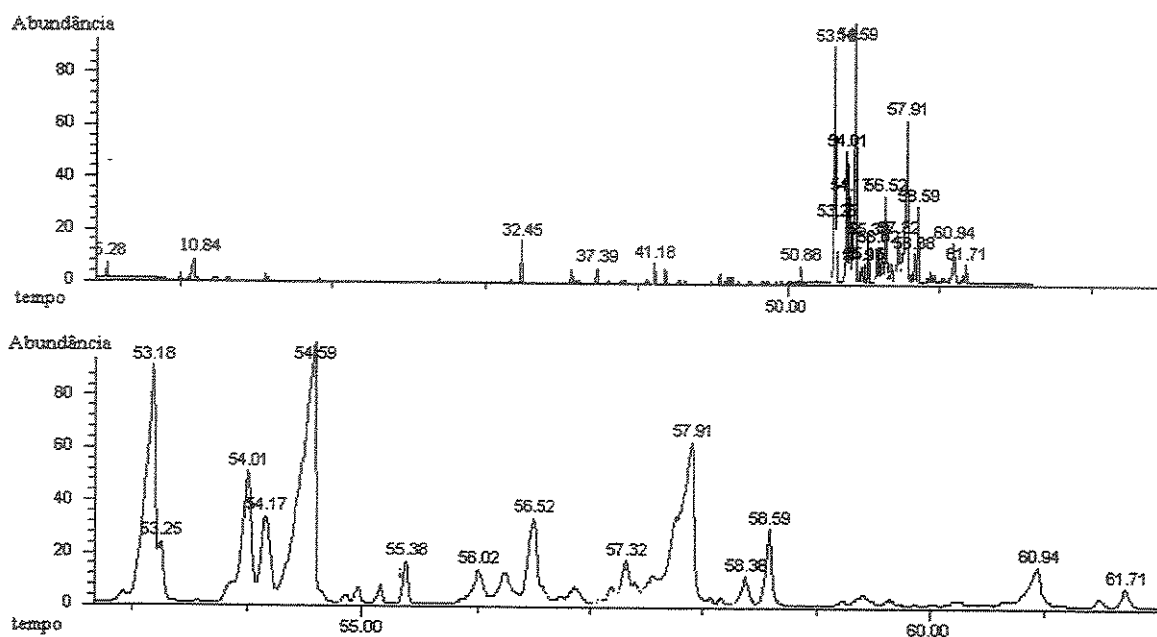


Figura 38. Cromatograma total de ions de *Oncidium pubes* – Espécie coletada em Campinas – SP (código – Mz23) e expansão da região do cromatograma que contém os compostos mais abundantes. Os compostos identificados neste óleo floral são mostrados na (Tabela 6). Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 µm), forno 50-290 °C, velocidade de aquecimento 4 °C. Min⁻¹. Tempo na temperatura inicial: 0 min, tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 °C

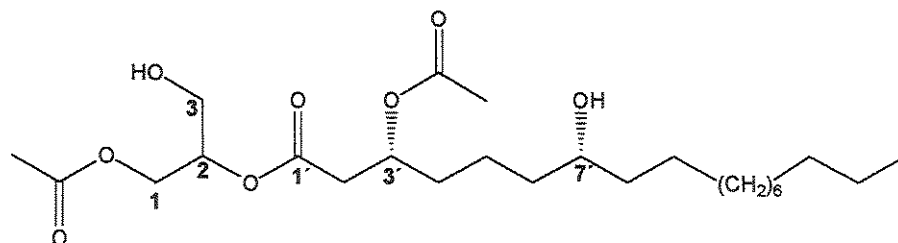
Tabela 6. Tabela com a composição química do óleo floral de *Oncidium pubes* referente ao cromatograma da Figura 38

Compostos	TR	IR	Abundância relativa (%)
1-acetil-glicerol	10.84	1123	2,4
Ácido palmítico	32.45	1974	1,3
Não identificado	37.39	2010	0,5
Não identificado	41.18	2176	0,6
Não identificado	50.88	2663	0,9
1-acetil-2-(3-acetoxi, 7-hidroxi-hexadecanoil)-glicerol	53.18	2797	17,4
Não identificado	54.01	2846	7,8
Não identificado	54.17	2857	5,2
1-acetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)-glicerol	54.59	2881	23,2
Não identificado	55.38	2940	1,3

Não identificado	56.02	2972	2,4
Não identificado			
1,3-diacetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)- glicerol	56.52	3004	5,2
Não identificado	57.32	3057	2,0
1-acetil-2-(3-acetoxi-7-hidroxi- octadecanoil)-glicerol 11	57.91	3095	16,1
Não identificado	58.38	3127	1,2
1,3-diacetil-2-(3-acetoxi-7-hidroxi- octadecanoil)-glicerol	58.59	3141	3,1
1-acetil-2-(3-acetoxi-7-hidroxi-eicosanoil)- glicerol e o 1-acetil-2-(3-acetoxi-9-hidroxi- eicosanoil)-glicerol	60.94		3,4
1-acetil-2-(3,7-diacetoxi-eicosanoil)- glicerol	61.71		0,9

TR – Tempo de retenção; IR- Índice de retenção; Abundância relativa obtida por CG/EM.

No óleo floral de *O. pubes* foi identificado o segundo padrão de diacilglicerol. O óleo foi coletado a partir de 40 flores frescas com papel de filtro (19 mg de óleo) e imediatamente analisado por CG/EM e RMN de ^1H e ^{13}C .



11

O espectro de RMN de ^{13}C (Carbono desacoplado e DEPT 135 e 90) revela a presença de 3 metilas; vários metilenos, sendo 2 conectados a heteroátomos, 3 metinos conectados a heteroátomos e 3 carbonilas. O espectro de RMN de ^1H contém sinais em δ 5,08 (m, 1H, H-2), 4,25, (dd, 2H, $J=11,9$, 5,2 Hz, H-1), 4,37 (dd, 2H, $J=11,9$, 4,3 Hz, H-1), 3,72 (dd, 2H, $J=11,9$, 5,5 Hz, H-3) e 3,75 (dd, 2H, $J=11,9$, 5,2 Hz, H-3), que são característicos de

derivados do 1,2-diaciglicerol da mesma forma que já tinha sido observado para o Oncidinol 1. Os espectros de RMN de 1D e 2D (^1H , ^1H COSY, ^1H , ^{13}C HSQC, ^1H , ^{13}C HMBC) foram importantes para determinação da estrutura plana da molécula **11** como mostrado na Figura 39 e descritos na Tabela 7. A seguir, para evitar repetições, serão discutidos apenas os sinais que diferenciam este composto do Oncidinol 1.

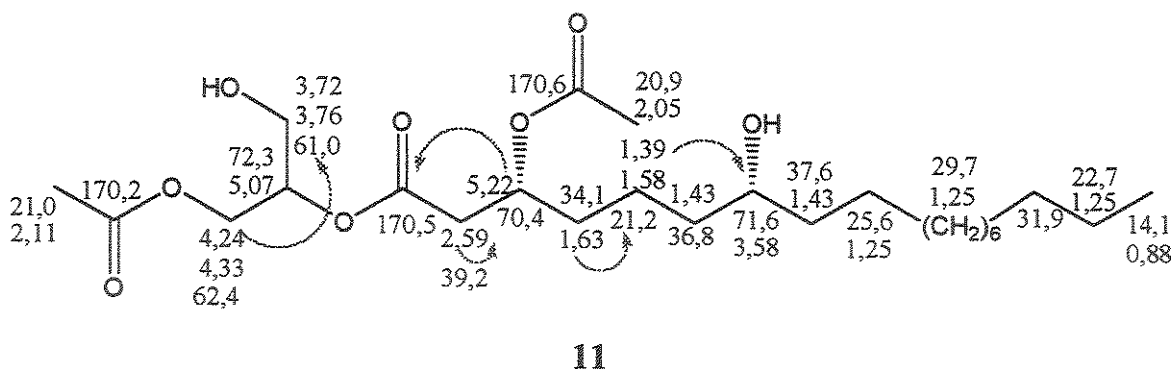


Figura 39. Atribuição total dos hidrogênios e carbonos de **11** obtidos através de RMN 1D e 2D (homonuclear de ^1H , ^1H e heteronuclear de ^1H , ^{13}C HSQC e HMBC). Flechas indicam as correlações heteronucleares à longa distância que foram diagnósticas para a determinação estrutural.

Marisa O.pubes 20/cdcl3 deallhagq0007

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
File: deallhagq0007
INOVA-500 "nucsun"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.186 sec
Width 5631.5 Hz
2D Width 5631.5 Hz
32 repetitions
128 LOCKPOINTS
CROSSPULP RL, 499.8027564 MHz
DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.093 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.067 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 22 min, 35 sec

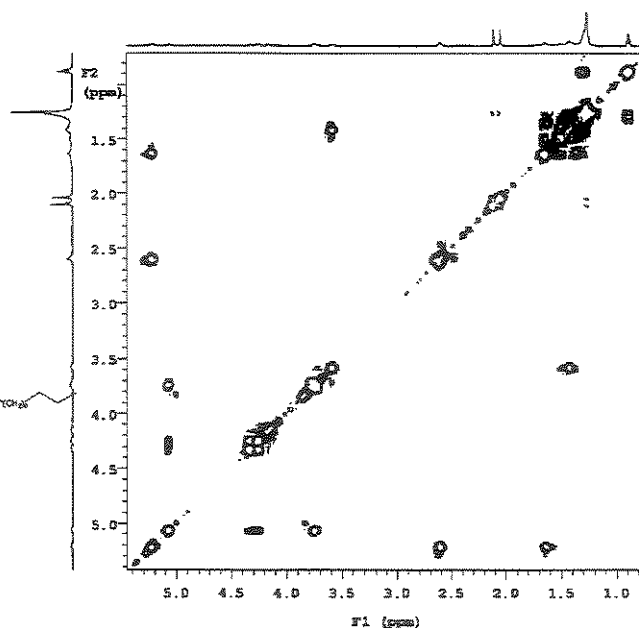
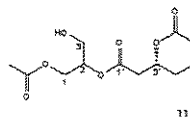


Figura 40. Espectro de RMN de 2D de correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ – COSY (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium pubes*

Marisa O.pubes 20/cdcl3 deallhagq0007

Pulse Sequence: HMQC
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Date: 1-14-97
File: deallhagq0007
INOVA-500 "nucsun"

Relax. delay 1.500 sec
Acq. time 0.180 sec
Width 3396.5 Hz
2D Width 24972.4 Hz
64 repetitions
2 x 256 increments
CROSSPULP RL, 499.8027734 MHz
DECOUPLE CL3, 125.7073390 MHz
Power 50 dB
on during acquisition
off during delay
GMP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss specification 0.080 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss specification 0.019 sec
FT size 2048 x 4096
Total time 11 hr, 55 min, 4 sec

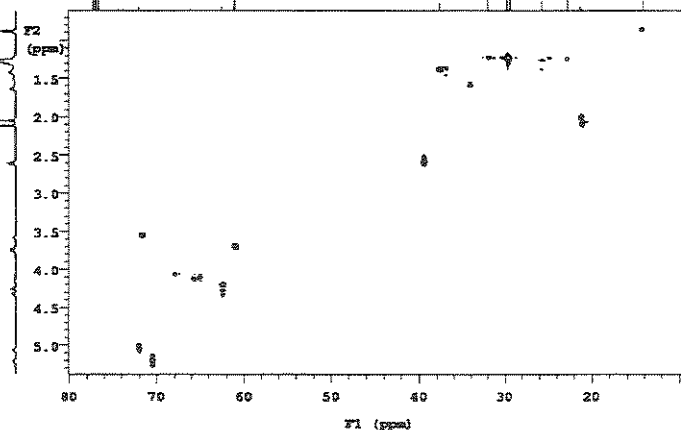
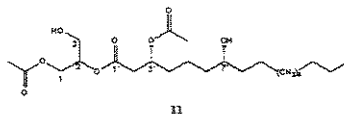


Figura 41. Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ a uma ligação – HSQC (^1H -500 MHz, ^{13}C -125 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium pubes*

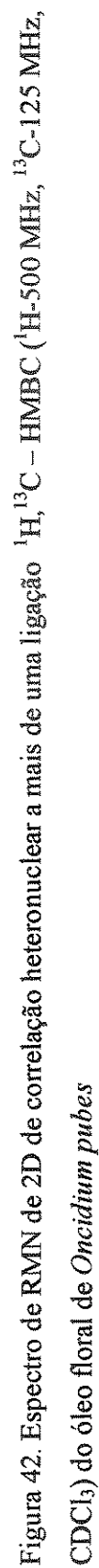


Tabela 7. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS), ^{13}C (125 MHz, δ - CDCl_3), COSY, HSQC e HMBC para o composto 11 do óleo floral de *Oncidium pubes*

C#	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)	HMBC
1'	170,5		
2'	39,2	2,59 (m, 2H)	C3'
3'	70,4	5,22 (m, 1H)	C1'
4'	34,1	1,63 (m, 2H)	C3', C5', C6'
5'	21,2	1,39 (m, 1H) 1,58 (m, 1H)	C7'
6'	36,8	1,43 (m, 1H), 1,49 (m, 1H)	C7'
7'	71,6	3,58 (m, 1H)	C7'
8'	37,6	1,43 (m, 2H)	
9'	25,6	1,25 (m)	
10' e 11'	29,6	1,25 (m)	
12'-15'	29,7	1,25 (m)	
16'	31,9	1,25 (m)	
17'	22,7	1,25 (m)	
18'	14,1	0,88 (t, $J=6,7$ Hz, 3H)	
1	62,4	4,24 (dd, $J=5,2, 11,9$ Hz, 1H) 4,33 (dd, $J=4,3, 11,9$ Hz, 1H)	C2, C3
2	72,31	5,07 (m, 1H)	C1, C1'
3	61,04	3,72 (dd, $J=5,5, 11,9$ Hz, 1H) 3,76 (dd, $J=5,2, 11,9$ Hz, 1H)	C2, C3
CH ₃ CO-C1	170,2		
CH ₃ CO-C3'	170,6		
CH ₃ CO-C1	20,9	2,11 (s, 3H)	
CH ₃ CO-C3'	21,0	2,05 (s, 3H)	

O sinal em δ 3,59, característico de hidrogênio carbinólico, foi atribuído ao segundo metino H-7' da cadeia derivada do ácido graxo. Neste caso, diferente do Oncidinol 1, o carbono C-7' tem ligado a si um grupo hidroxílico ao invés de um acetoxílico. O metileno em δ_c 21,2 (C-5'), no espectro de RMN de ^{13}C , confirma a atribuição do segundo metino na posição 7' devido ao duplo efeito γ -gauche, de forma semelhante ao observado para o Oncidinol 1. Neste caso não foi possível observar por HMBC as correlações entre os hidrogênios da porção do glicerol e as carbonilas do ácido graxo e do acetil pois as três carbonilas presentes na molécula apresentam deslocamentos químicos muito próximos (δ 170.3, δ 170.5 e δ 170.7).

Uma alternativa encontrada para a determinação dos substituintes na posição 1 e 2 do glicerol foi a acetilação do composto 11 que levou ao 12 cujo o espectro de RMN de ^1H apresentou um sinal em δ 2,08 integrando para seis hidrogênios atribuído às metilas dos grupos acetílicos do glicerol que no composto 12 apresenta a parte do glicerol com quase perfeita simetria C_2 . A presença do produto isomerizado foi observada devido a presença do sinal em δ 2,09 (Figura 43). Os resultados obtidos evidenciaram que o grupo derivado do ácido graxo está localizado na posição 2 e a cadeia derivada do ácido acético esta na posição 1 do glicerol, como em Oncidinol 1.

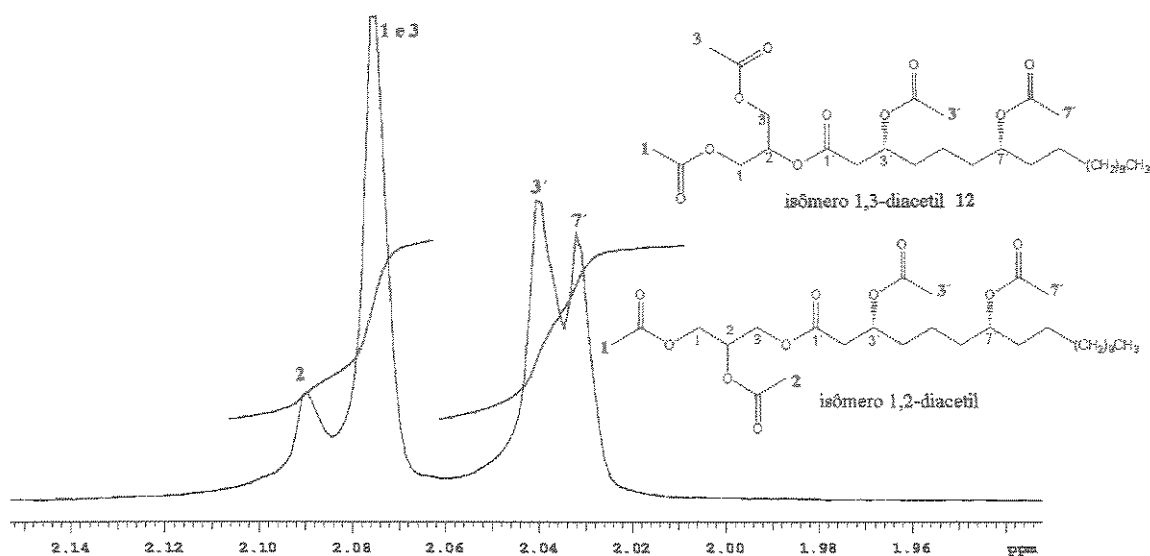


Figura 43. Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da região das metilas da porção do glicerol. Os números representam as respectivas metilas.

O composto **11** apresentou o íon de m/z 498 no espectro de massas obtido através de ESI-MS³⁸ o qual corresponde a $(\text{M}+\text{H}+\text{Na})^{2+}$ que foi consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_8$. Este dado fortaleceu a atribuição da estrutura, 1-acetil-2-(3'-acetoxi,7'-hidroxi-octadecanoil)-glicerol, para o composto **11**.

O espectro de massas do composto **11** apresentou o íon de m/z 323 (2%) e 263 (17) derivados da cadeia lateral. O fragmento de m/z 117 foi atribuído a porção do glicerol da mesma forma do que o observado anteriormente para o Oncidinol **1**. O composto **12** apresentou um perfil de fragmentação muito semelhante ao observado para o Oncidinol acetilado **4**, sendo esta mais uma evidência da mesma substituição em ambos compostos. O espectro de massas do composto **13** que é o derivado sililado do composto natural **11** apresenta uma fragmentação bastante atípica, devido ao fragmento de m/z 271 ser o pico

³⁸ Emmert, J. Pfluger, M. Wahl, F. LC-GC Europe, 17(12), 646-649, 2004.

base do espectro. A princípio foi sugerido que o grupo hidroxílico estaria na posição 6 e clivagem α a este grupo levaria ao fragmento de m/z 271. No entanto, a presença do sinal em δ 21,2, atribuído ao metileno C-5', no espectro de RMN de ^{13}C indica que a substituição seja 3,7.

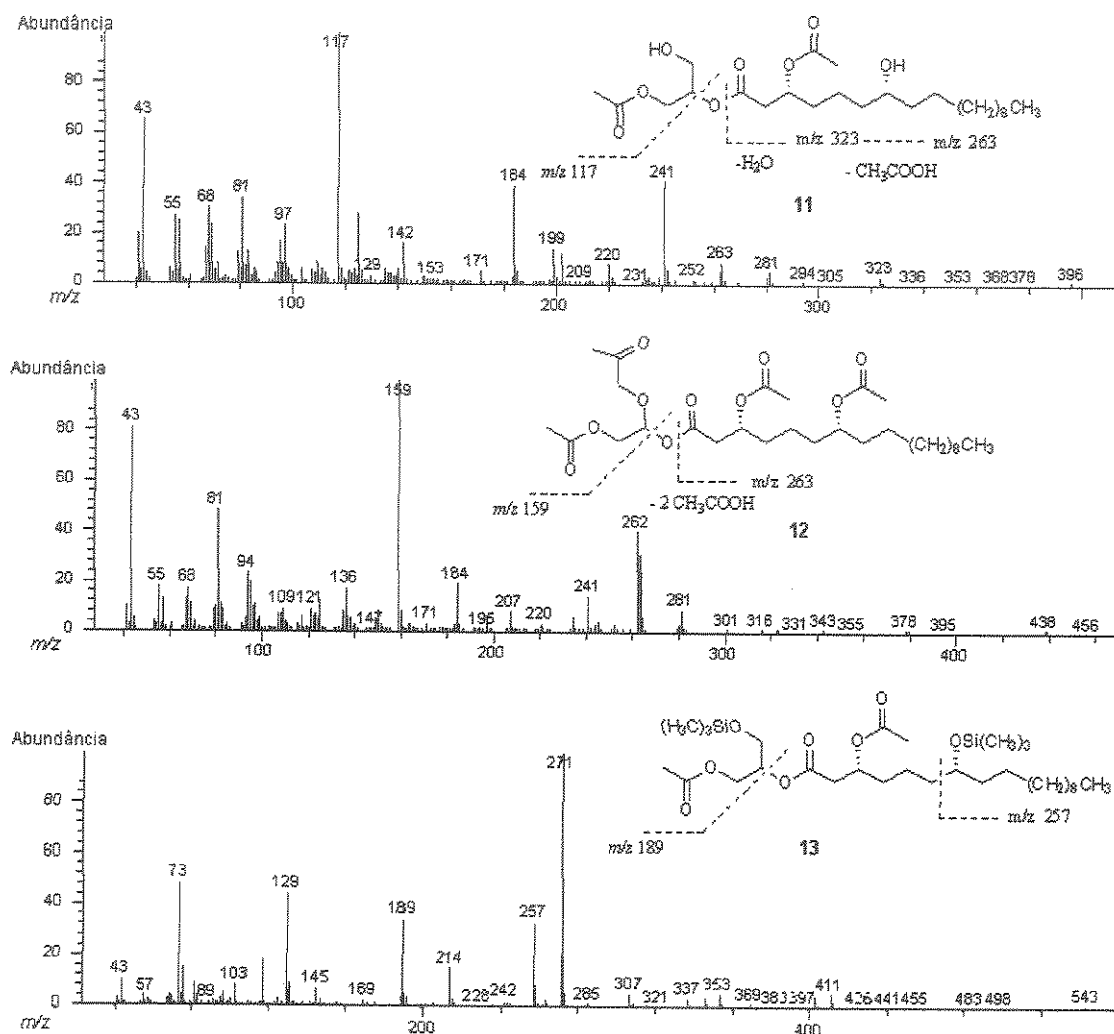
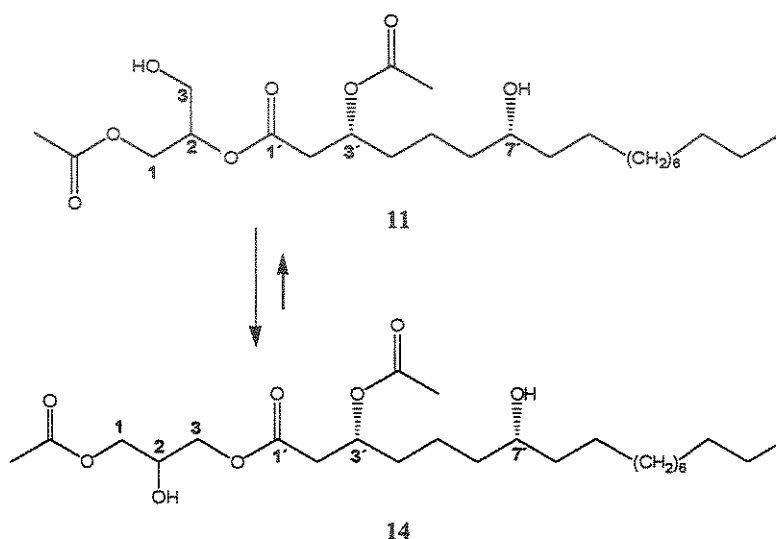


Figura 44. Espectros de massas (70 eV) dos compostos 11, 12 e 13.

Compostos desta série foram encontrados nos óleos florais de *Oncidium kautskyi*, *O. trulliferum*, *O. cornigerum*, *O. truncatum* e *Baptistonia echinata* (Tabela 11).

3.1.1.2.1 Tentativa de determinação da configuração do carbono C-2 e determinação da configuração dos carbonos C-3' e C-7' do diacilglicerol de *Oncidium pubes*

O isômero 1,3-diacilglicerol **14** do composto **11** foi esterificado com o *R*-(+) ácido de Mosher produzindo **15** contendo MTPA em C-2 e C-7'.



Era esperado que o MTPA na posição 7' não influenciasse os hidrogênios metilênicos H-1 e H-3 da porção do glicerol. Desta forma, estes hidrogênios, dependendo de sua configuração, apresentariam os mesmos sinais e deslocamentos observados para **6a** ou **6b**. No entanto, os hidrogênios H-1 e H-3 do composto **15** apresentaram deslocamentos diferentes dos observados anteriormente (Figura 45). Logo concluimos que o MTPA da posição 7' no composto **15** influencia os deslocamentos destes hidrogênios tornando imprópria esta metodologia para a determinação da configuração de C-2 para o composto **11**.

Para determinar a configuração dos demais centros da molécula 11 foi realizada a hidrólise e metilação deste composto, seguida pela esterificação com o *R*-Mosher levando ao composto 16, empregando assim, a mesma metodologia descrita anteriormente para o Oncidinol 1 (Figura 22). O espectro de RMN de ^1H do composto diesterificado 16 apresentou os mesmos deslocamentos químicos observados para o composto diesterificado 10b de *Ornithophora radicans* o que sugere que ambos tenham a mesma configuração (Figura 46). Assim, é sugerido que o composto natural 11 de *Oncidium pubes* é o (3'*R*,7'*R*)-1-acetil-2-(3'-acetoxi-7'-hidroxi-octadecanoil)-glicerol.

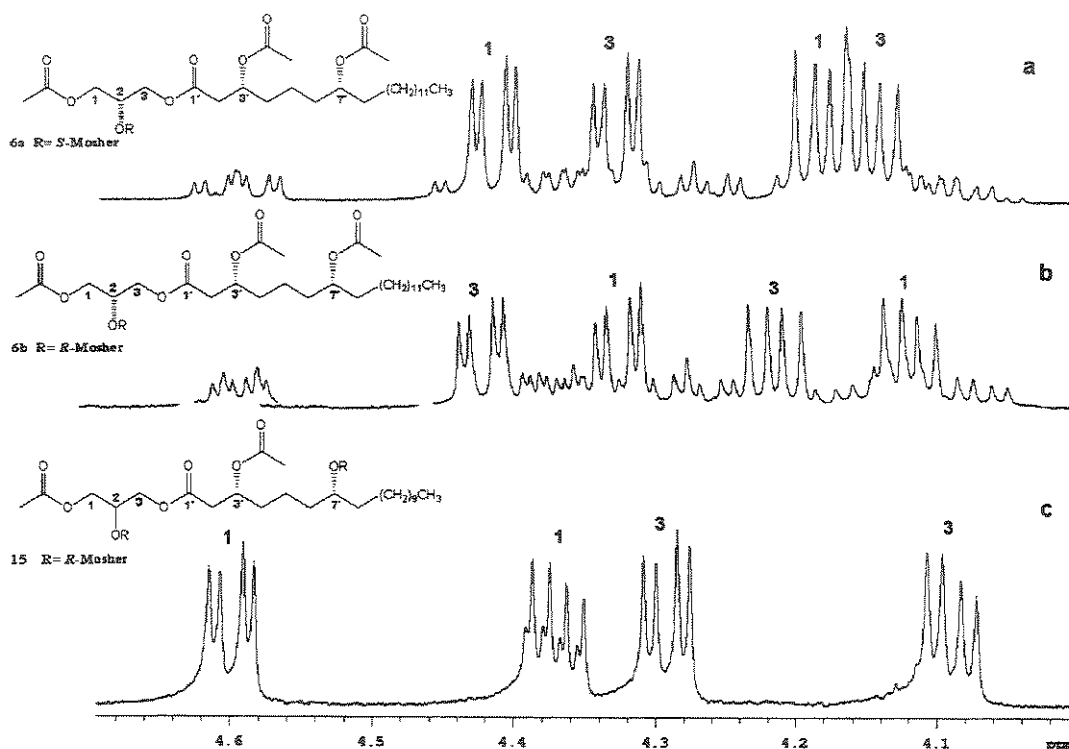


Figura 45. Espectros parciais de RMN de ^1H correspondentes aos sinais de H-1 e H-3 dos derivados dos diacilgliceróis 1 e 11. a) S-Mosher 6a, b) R-Mosher 6b e c) derivado R-Mosher do diacilglicerol de *Oncidium pubes* 15

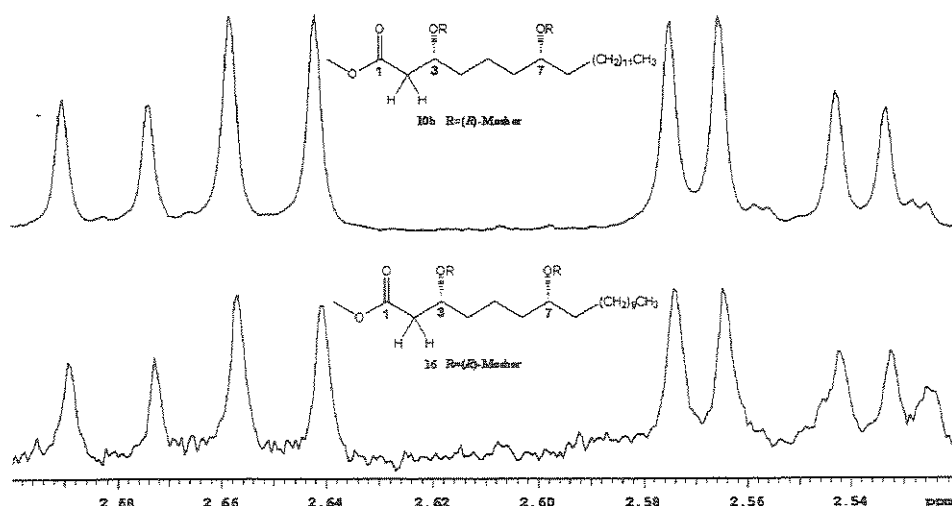


Figura 46. R=R-Mosher. Expansão do espectro de RMN de ^1H da região correspondente aos hidrogênios (H-2') em evidência do derivado **10b** de *Ornithophora radicans* e **16** de *Oncidium pubes*

Como conclusão desta etapa foi observado que ambos diacilgliceróis de *Ornithophora radicans* e *Oncidium pubes* apresentam a mesma configuração (3'R,7'R) na cadeia derivada do ácido graxo.

3.1.1.3 Identificação do composto majoritário do óleo floral de *Zygostates lunata*-Padrão para a série homóloga C

O terceiro padrão de diacilglicerol foi identificado no óleo floral de *Zygostates lunata*. O gênero *Zygostates* era formalmente incluído na subtribo Ornithocephalinae, no entanto, recentemente foi incluído na Oncidiinae.³⁹ *Z. lunata* apresenta elaióforo tricômático sendo diferente de *Ornithophora radicans* e *Oncidium pubes* que apresentam elaióforos epidermais. As flores

³⁹ Whitten W. M.; Williams, N. H.; Chase, M. W. *Amer. J. Bot.* **2000**, 87: 1842-1856.

deste gênero produzem óleos, porém são visualmente diferentes, em termos de coloração e morfologia, das flores de *Oncidium* s.l. O óleo desta espécie que foi coletado com papel de filtro de 50 flores obtendo-se 12 mg de óleo. A análise por CG/EM deste óleo floral revelou a presença majoritária do diacilglicerol 17, com fragmento de m/z 117 característico de diacilgliceróis (Figura 52). O composto 17 apresenta o íon de m/z 481 ($M+Na$)⁺ no espectro de massas (ESI-EM) o qual corresponde a formula molecular $C_{25}H_{46}O_7$.

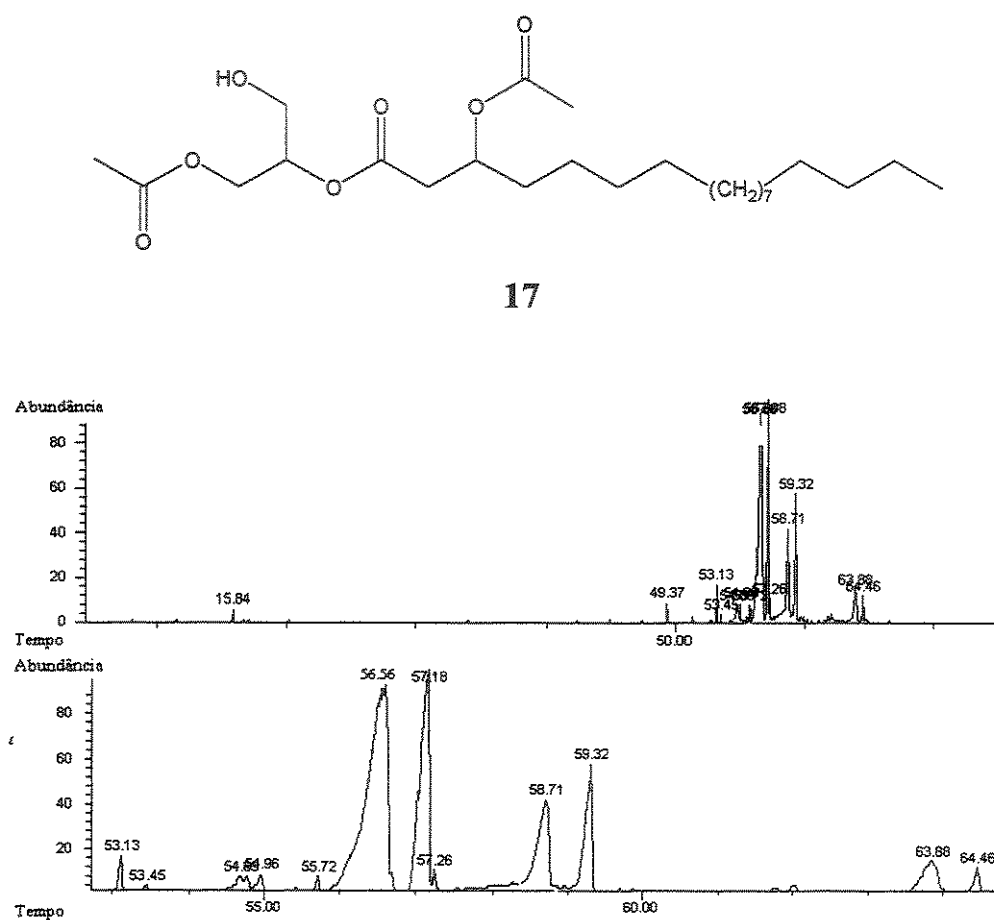


Figura 47. Cromatograma total de íons do óleo floral de *Zigostates lunata* e expansão da região do cromatograma que contém os compostos mais abundantes. Os compostos identificados neste óleo floral são mostrados na **Tabela 8**. Condição da análise por CG/EM: Coluna HP5 (30m x 0,25mm, x 0,25 μ m), forno 50-

290 °C, velocidade de aquecimento 4 °C. Min⁻¹. Tempo na temperatura inicial: 0 min; tempo na temperatura final: 15 min. Injetor: 240 °C

Tabela 8. Tabela com a composição química do óleo floral de *Zigostates lunata* referente ao cromatograma da Figura 47

Composto	TR	IR	Abundância relativa %
Não identificado	15,84	1203	1,8
Pentacosano	49,37	2500	3,8
Heptacosano	53,13	2700	6,1
1,3-diacetil-3-acetoxi-palmitoil-glicerol	53,45	2723	1,2
1-acetil-2-octadecenoil-glicerol	54,71	2798	6,8
1,3-diacetil-2-octadecenoil-glicerol	55,72	2858	2,8
1-acetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)-glicerol 17	56,56	2909	40,0
1,3-diacetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)-glicerol 18	57,18	2949	21,1
1-acetil-2-(3,7-diacetoxi-octadecanoil)-glicerol	58,71	3049	13,7
1-acetil-2-(3,7-diacetoxi-octadecanoil)-glicerol	59,32	3089	10,0
1-acetil-2-(3,7-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol	63,88		5,5
1,3-diacetil-2-(3,7-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol	64,46		1,5

Para a atribuição dos substituintes da porção do glicerol, 7 mg deste óleo foram acetilados e purificados em coluna de sílica gel utilizando como eluente hexano:acetato de etila (8:2) obtendo-se desta coluna 1 mg do composto acetilado 18.

O espectro de RMN de ¹H de 18 revelou um sinal em δ 2,08 integrando para seis hidrogênios atribuído às metilas dos grupos acetílicos. Evidenciando assim, que neste caso o grupo derivado do ácido graxo também estava localizado na posição 2 e a cadeia derivada do ácido acético estava na posição 1 do glicerol de forma semelhante à observada anteriormente para o composto 12. O deslocamento químico em δ 2,60 é característico de hidrogênio α a

carbonila com um grupo acetoxi na posição 3'. Os sinais em δ 5,20 e δ 5,25 foram atribuídos aos hidrogênios metínicos H-3' e H-2. Enquanto, os sinais em δ 4,14 e 4,29 correspondem aos hidrogênios metilênicos H-1 e H-3. O sinal em δ 1,25 foi atribuído aos vários hidrogênios metilênicos da cadeia lateral derivada do ácido graxo e o sinal em δ 2,04 aos hidrogênios metilícos do grupo acetila em C-3'.

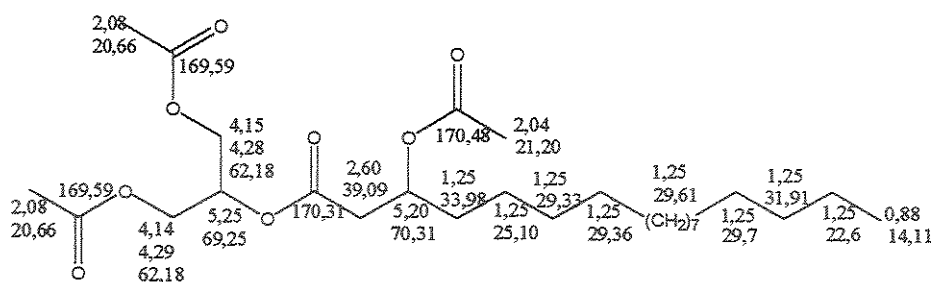


Figura 48. Atribuição dos hidrogênios e carbonos do composto **18** derivado 3-O-acetil do produto natural **17** majritário do óleo floral de *Zigostates lunata*

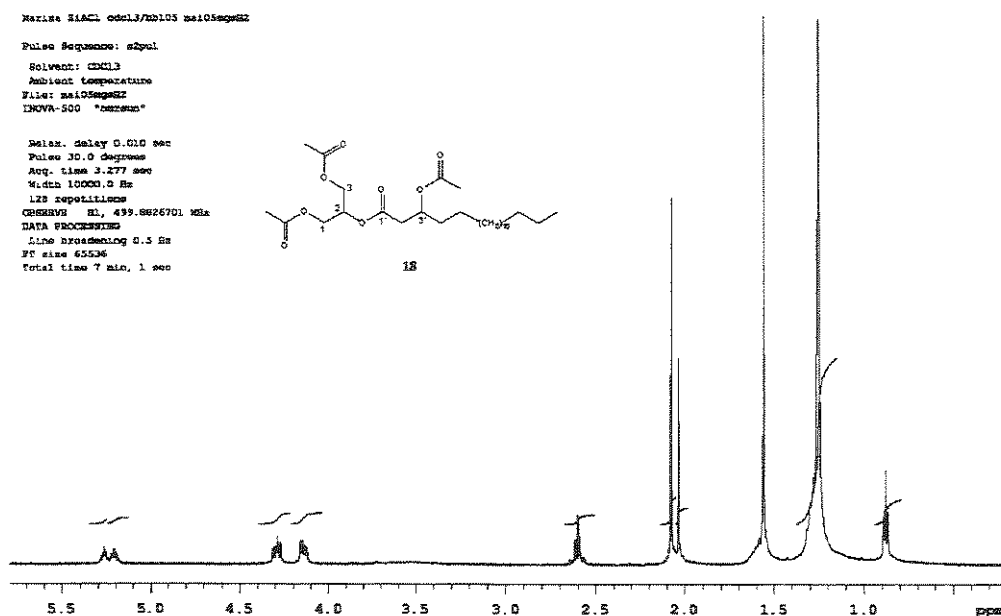


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **18**

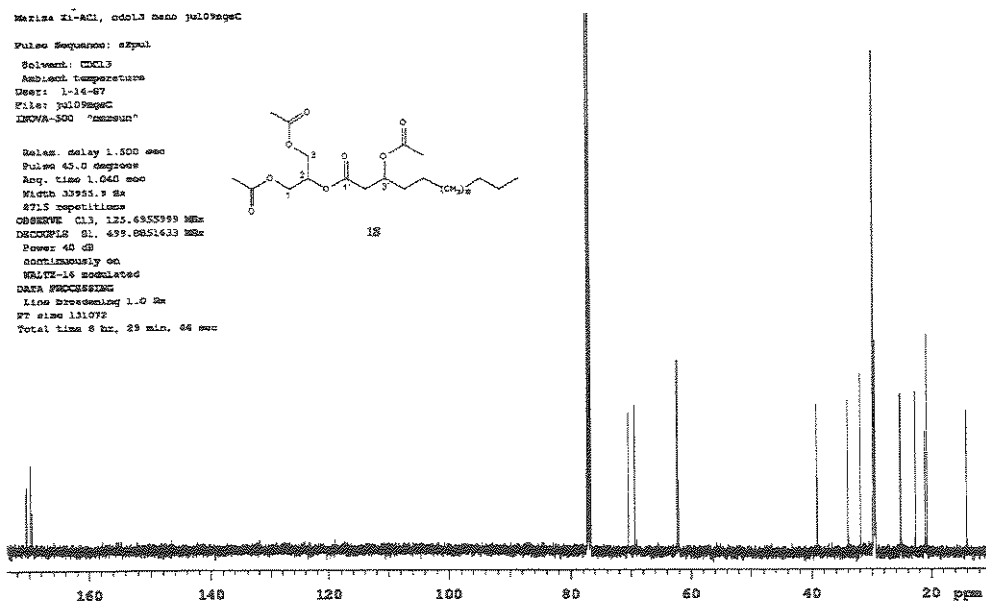


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 18

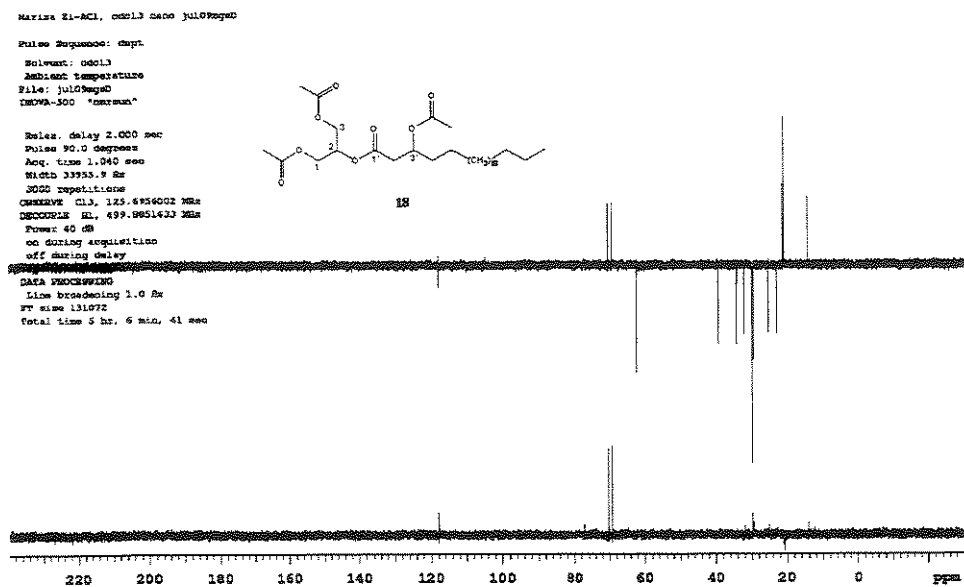


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C : a-DEPT 135 ° e b-DEPT 90 ° (125 MHz, CDCl_3) do composto 18

Tabela 9. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS), ^{13}C (125 MHz, δ - CDCl_3) para o composto **18** do óleo floral de *Zigostates lunata*

C#	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)
1'	170,31	-
2'	39,09	2,60 (m, 2H)
3'	70,31	5,20 (m, 1H)
4'	33,98	1,25 (m)
5'	25,10	1,25 (m)
6'	29,33	1,25 (m)
7'	29,36	1,25 (m)
8'	29,52	1,25 (m)
9'	29,61	1,25 (m)
10'-11'	29,63	1,25 (m)
12'-15'	29,67	1,25 (m)
16'	31,91	1,25 (m)
17'	22,68	1,25 (m)
18'	14,11	0,88 (t, $J=6,6$ Hz, 3H)
1	62,18	4,14 (dd, $J=12,0, 5,8$ Hz, 1H) 4,29 (dd, $J=12,0, 9,2$ Hz, 1H)
2	69,25	5,25 (m, 1H)
3	62,18	4,15 (dd, $J=12,0, 5,8$ Hz, 1H) 4,28 (dd, $J=12,0, 9,16$ Hz, 1H)
$\underline{\text{CH}_3}\text{CO-C-1}$	20,66	2,08 (s, 3H)
$\underline{\text{CH}_3}\text{CO-C-3}$	20,66	2,08 (s, 3H)
$\underline{\text{CH}_3}\text{CO-C-3'}$	21,04	2,04 (s, 3H)
$\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{O-C-1}$	169,59	-
$\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{O-C-3}$	169,59	-
$\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{O-C-3'}$	170,48	-

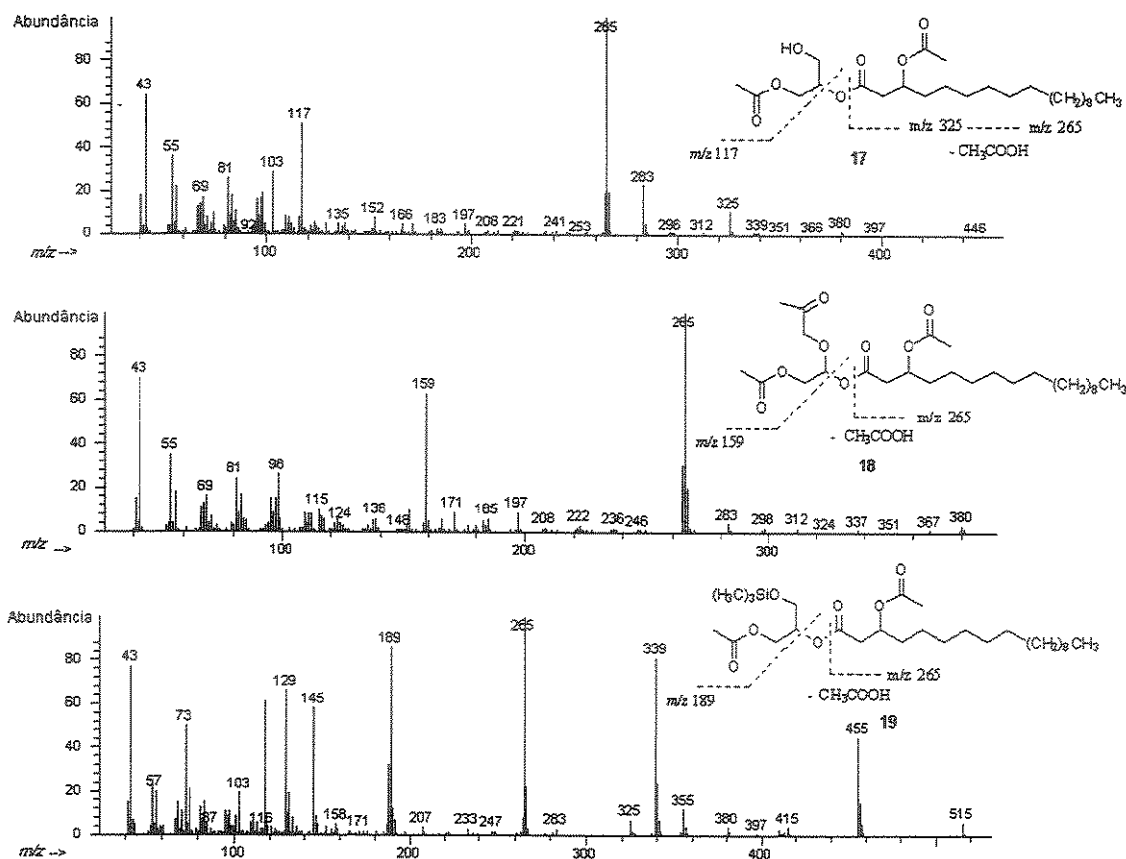


Figura 52. Espectros de massas (70 eV) dos compostos 17, 18 e 19.

Os espectros de massas de 17 e seus derivados são similares aos dos compostos 1 e 11. A principal diferença no espectro de 17 é a presença do íon de m/z 325 (15 %) ao invés do íon de m/z 323 do composto 11. O íon de m/z 325 foi atribuído à cadeia lateral 3-acetoxi-octadecanoil e o fragmento de m/z 265 (100 %) foi atribuído ao fragmento derivado da cadeia lateral com perda de uma molécula de ácido acético. Os compostos 18 e 19 apresentam um mesmo padrão de fragmentação observado para os derivados dos compostos 1 e 11. Desta forma, determinamos o terceiro padrão de diacilglicerol que foi encontrado também nos óleos florais de *Oncidium kaustskyi*, *Phymatidium*

tillandiosioides, *O. pubes*, *O. longicorniu*, *Ornithophora radicans* *O. truncatum* e *Baptistonia echinata*. (Tabela 11)

Em razão da pequena quantidade obtida do composto 17 não foi possível determinar a sua configuração absoluta.

Estes dados mostram que os espectros de massas dos compostos 1, 11 e 17 e seus derivados apresentam fragmentos característicos de diacilgliceróis, como o m/z 117, o diacilglicerol sililado apresenta a adição de 72 u a este fragmento levando ao íon de m/z 189. Já os triacilgliceróis 4, 12 e 18 apresentaram o íon de m/z 159 sendo este um fragmento característico da porção do glicerol destes triacilgliceróis. Os diacil- e triacilgliceróis apresentam fragmentos que caracterizam o comprimento e a substituição da cadeia derivada do ácido graxo. A partir destas informações, foi possível identificar estes compostos e suas séries homólogas nos demais calos florais investigados (Tabela 11).

3.1.2 Análise dos calos florais que não secretam óleos em sua superfície

Dentre as 39 espécies de Oncidiinae investigadas, 26 não apresentam secreção exposta na superfície de seu calo floral. Nestes casos, os exsudados foram coletados após a perfuração do calo. Esta forma de coleta tentou imitar o que pode ser realizado pelas abelhas como descrito por Fritz Müller (descrito por Faria⁴⁰) “*Oncidium flexuosum* (espécie que não apresenta secreção exposta) presente em matas do Sul do Brasil possuem pequenas protuberâncias nutritivas nas flores que são raspados por insetos”. No presente estudo, foi observado que os calos florais destas espécies produzem uma larga variedade de compostos que incluem acilgliceróis, derivados de terpenos, ácidos graxos e flavonóides. Os resultados e discussões da elucidação química destes compostos, e onde eles foram identificados, serão apresentados segundo suas classes (Tabela 11).

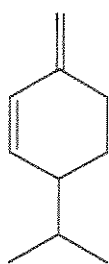
3.1.2.1 Terpenóides

3.1.2.1.1 Monoterpenóides

Os monoterpenóides β -felandreno **20** e terpineol **22** foram identificados no calo floral de *Oncidium forbesi*. Enquanto, o óxido de linalol **21** foi encontrado em *Rodrigueziella gomesoide*. A identificação destes compostos

⁴⁰ Faria, A. D. Tese de Doutorado. Sisteática filogenática e delimitação dos gêneros da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae) endêmicos do Brasil: *Baptistonia*, *Gomesa*, *Ornithophora*, *Rodrigueziella*, *Rodrigueziopsis* e *Oncidium pro parte*. 2004

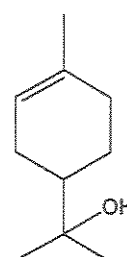
foi realizada por comparação do seu espectro de massas e índice de retenção com padrões da literatura (Tabela 11).⁴⁶



20



21

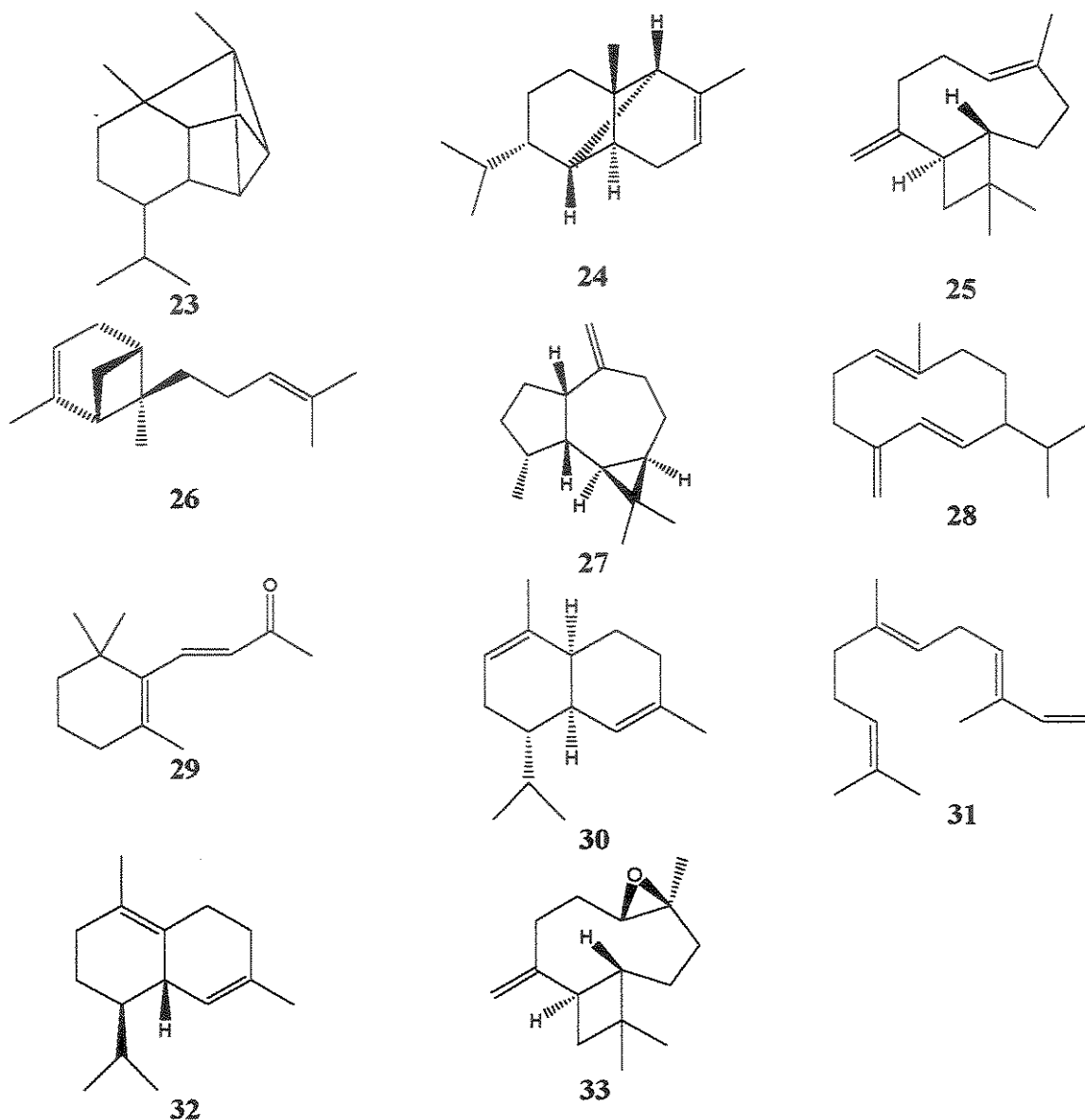


22

3.1.2.1.2 Sesquiterpenóides

Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos estão presentes nos calos florais de *G. crispa*, *G. recurva*, *Oncidium forbesi* e *Gomesa laxifolia*. O ciclosativeno **23** e o α -copaeno **24** foram identificados no calo de *G. recurva* sendo o α -copaeno **24** o componente majoritário do calo floral desta espécie. O β -cariofileno **25** foi encontrado nos calos florais de *Gomesa crispa* e *G. recurva*. O germacreno-d **28**, a β -ionona **29** e o α -muruleno **30** foram identificados no calo floral de *Gomesa crispa*. O farneseno **31** foi encontrado nos calos de *G. crispa* e *G. laxifolia*. O δ -cadineno **32** foi encontrado nos calos florais de *G. crispa* e *Oncidium forbesi*. O sesquiterpeno oxigenado, óxido de cariofileno **33**, foi observado no calo floral de *G. crispa*. A identificação destes compostos foi realizada por comparação do seu espectro de massas e índice de retenção com padrões da literatura (Tabela 11).⁴¹

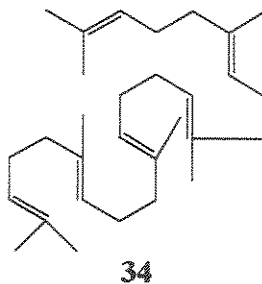
⁴¹ Adams, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co., Illinois. 1995.



3.1.2.1.3 Triterpenóides

O hidrocarboneto triterpênico, esqualeno **34**, foi identificado na secreção do calo floral de *Gomesa sessilis*, *Gomesa laxifolia*, *Oncidium barbatum*, *Oncidium warmingi*, *Rodrigueziella gomesoide* e *Oncidium*

harrissonianum. A identificação deste composto foi realizada por comparação do seu espectro de massas com padrão da literatura (Tabela 11).



3.1.2.1.4 Esteróides

O estigmasterol **35** e o sitosterol **36** estão presentes nos calos florais de *Gomesa sessilis*, *Lokarsia lunifera*, *Oncidium forbesi*, *O. widgreni*, *O. varicosum*, *O. praetextum*, *O. longipes*, *O. barbatum*, *O. welteri*, *O. warmingi*, *Ornithophora radicans*, *Baptistonia echinata*, *Gomesa laxifolia*, *O. flexuosum* e *Rodrigueziella gomesoi* (Tabela 11). A identificação do sitosterol foi realizada a partir da co-injeção com padrão comercial. A Figura 53 apresenta o resultado da co-injeção do exudado floral do calo de *Oncidium praetextum*. O composto com tempo de retenção de 63.037 min corresponde ao β -sitosterol **36** e o composto com tempo de retenção de 63.361 min corresponde ao diacilglicerol com estrutura plana idêntica ao Oncidinol 1. As abundâncias relativas destes dois compostos, antes e depois da coinjeção respectivamente, revelam a adição do padrão devido ao aumento da área do seu pico em relação ao diacilglicerol.

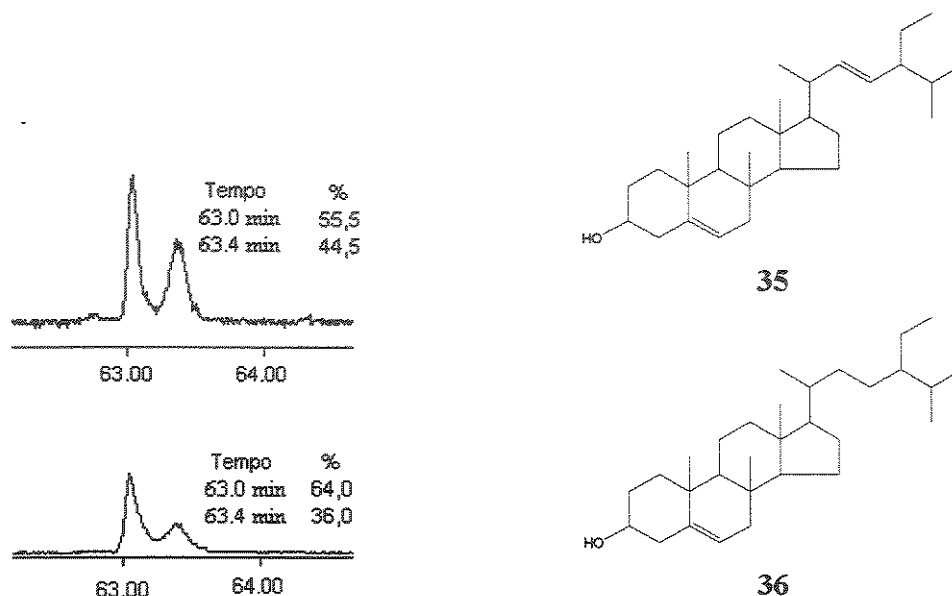


Figura 53. Coinjeção do exudado do calo floral de *Oncidium praetextum* com padrão do sitosterol **36**. O cromatograma acima é do exudado floral sem padrão e o cromatograma abaixo é do exudado com reforço do padrão do sitosterol **36**. Onde o composto com tempo de retenção em 63,037 min corresponde ao sitosterol **36** e o composto com tempo de retenção de 63,361 min corresponde ao diacilglicerol que apresenta a mesma estrutura plana do Oncidinol. Condições do equipamento de CG/EM- Coluna HP5, 30m x 0,25mm x 0,25 μ m, programação de temperatura 50-290 $^{\circ}$ C, velocidade de aquecimento 4 $^{\circ}$ C.min $^{-1}$, injetor-240 $^{\circ}$ C. tempo inicial - 0 min, tempo final a 290 $^{\circ}$ C - 15 min.

Os espectros de massas dos esteróis são caracterizados pela perda de 18u atribuída à eliminação de uma molécula de água. A presença de vários fragmentos com abundâncias relativas similares indicam a ausência de outros grupos funcionais que levariam a uma fragmentação preferencial. (Figura 54).

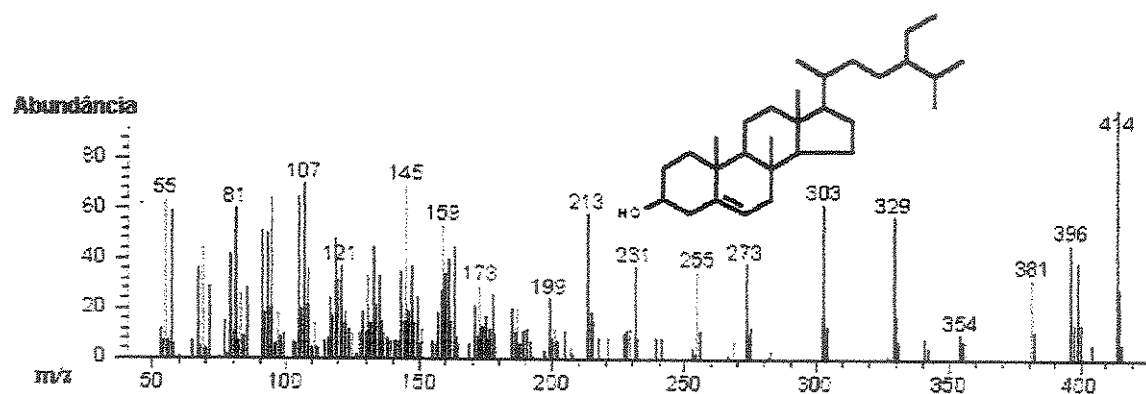


Figura 54. Espectro de massas do sitosterol 36.

Os fitoesteróis (esteróis de plantas) são importantes componentes de membranas de plantas, servindo para estabilizar os fosfolipídios em membranas celulares, da mesma forma que o colesterol em animais. Duzentos diferentes tipos de fitoesteróis são relatados em plantas. Sua biossíntese começa a partir da condensação de duas moléculas de difosfato de farnesila que produz o esqualeno (triterpeno). As etapas ciclizações enzimáticas do esqualeno levam ao cicloartenol que por sua vez, através de reações enzimáticas, levam aos fitoesteróis.⁴²

Para os insetos os fitoesteróis, obtidos através de sua alimentação, apresentam uma considerável importância já que é a partir destes compostos que eles metabolizam os esteróides vitais para sua sobrevivência.⁴³

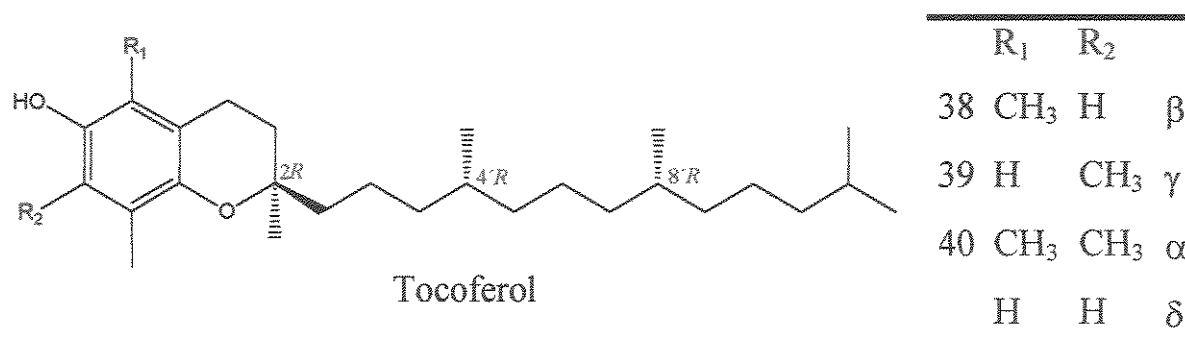
⁴² Moreau, R. A., Whitaker, B. D., Hicks, K. B., Phytosterols, phytosteranols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses, *Progress in Lipid Research* 41, 457–500, 2002

⁴³ Downer, R. G. H. Functional role of lipids in insects. In Rockstein, M. *Biochemistry of insects*. London, Academic Press, 1978

3.1.2.1.5 Tocoferóis

O β -tocoferol **38** está presente nos calos florais de *Gomesa sessilis* e *O. warmingi*. O δ -tocoferol **39** está presente nos calos florais de *Gomesa sessilis*, *O. varicosum*, *O. harrissonianum*, *O. puvinatum*, *O. warmingi*, *O. widgreni* e *R. gomesoide* (Tabela 11). Já o α -tocoferol **40** está presente nos calos florais de *O. ciliatum* e *O. macropetalum*. A identificação desta classe de compostos foi realizada a partir da comparação dos seus espectros de massas com os do banco de dados Wiley os quais apresentaram espectros idênticos, com 95% de confiabilidade.

Os tocoferóis são antioxidantes que protegem os tecidos e têm importantes papéis em processos vitais. Os tocoferóis são derivados do 6-cromanol e apresentam como cadeia lateral um isoprenóide C-16 saturado. Dependendo do tipo dos grupos R_1 e R_2 os tocoferóis são denominados de α -, β -, γ -, δ -tocoferol.⁴⁴



O α -Tocoferol também é essencial para a alimentação de insetos, que precisam obtê-lo de plantas.⁴³

⁴⁴ Azzi, A. Stocker, A. 2000. *Vitamin E: non-antioxidant roles*, Progress in Lipid Research 39, 231-255.

De um modo geral, os terpenos constituem um grande grupo de produtos naturais compreendendo muitos compostos que apresentam um importante papel em processos fisiológicos. Eles são alvos de inúmeros estudos de ecologia química devido ao seu papel como fitoalexinas, substâncias impalátaveis, repelentes para insetos, agentes de defesa contra herbívoros, ferômonios, aleloquímicos e hormônios de plantas.⁴⁵ Sua biossíntese é um tópico investigado há mais de meio século. Muito cedo, trabalhos com células de animais estabeleceram que a biossíntese universal dos terpenos tinha como precursores o difosfato de isopentenila e o difosfato de dimetilalila, a partir da acetil-CoA via mevalonato. Há aproximadamente uma década atrás, um segundo caminho para formação destes intermediários (difosfato de isopentenila e o difosfato de dimetilalila) via o carboidrato, 5-fosfato 1-deoxi-D-xilose, foi descoberto em certas bactérias e também em *Ginkgo biloba*.⁴⁶

3.1.2.2 Derivados de ácidos graxos

3.1.2.2.1 Ácidos graxos livres

Ácidos graxos livres foram encontrados em várias secreções de calos florais analisadas (Tabela 11). Há relatos da identificação de ácidos livres em óleos florais de *Byrsonima crassifolia*, Malpighiaceae.⁴⁷ Ácidos alcanóicos livres com substituintes acetoxi na posição 3 foram identificados e reportados

⁴⁵ Robbers, J. E., Speedie, M. K., Tyler, V. E., *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Ed. Williams & Wilkins. 1996

⁴⁶ Adam, P., Hecht, S., Eisenreich, W., Kaiser, J., Grawert, T., Arigoni, D., Bacher, A., Rohdich, F., *PNAS*, vol. 99, no. 19, 12108-12113

⁴⁷ Vison, S.B., Williams, H.J., Frankie, G.W., Shrum, G. *Biotropica*, 1997, 29, 76.

nos óleos florais de várias espécies de *Krameria* (Krameriaceae),^{48,49} no entanto, não foram detectados em nenhum dos calos analisados neste estudo.

3.1.2.2.2 *n*-Alcanos

Todas as secreções de calos florais analisadas, com exceção de *Miltonia spectabilis* mostraram a presença de *n*-alcanos entre C₁₉ e C₃₀, com as abundâncias relativas variando entre as espécies. A análise do exudado do calo da espécie *Oncidium hyphaematicum* revelou a presença apenas de *n*-alcanos.

3.1.2.2.3 Ésteres

Ésteres metílicos e etílicos foram identificados nos calos florais de *O. onustum*, *O. harrissonianum*, *G. laxifolia*, *O. warmingii* e *Lokartia lunifera* (Tabela 11). A identificação destes compostos foi realizada por comparação de seus espectros de massas e seus índices de retenção com padrões da literatura.⁴¹

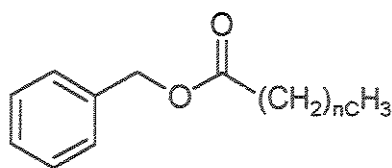
3.1.2.2.4 Ésteres benzílicos

Uma série homóloga de ésteres benzílicos (dodecanoato de benzila **41**, tricosanoato de benzila **42**, tetracosanoato de benzila **43**, pentacosanoato de benzila **44**, hexacosanoato de benzila **45** e heptacosanoato de benzila **46**) foi observada nos calos florais de *Oncidium puvinatum*, *O. divaricatum* e *O.*

⁴⁸ Simpson, B. B.; Seigler, D. S.; Neff, J. L. *Biochemical Systematics and Ecology*, **1979**, 7, 193.

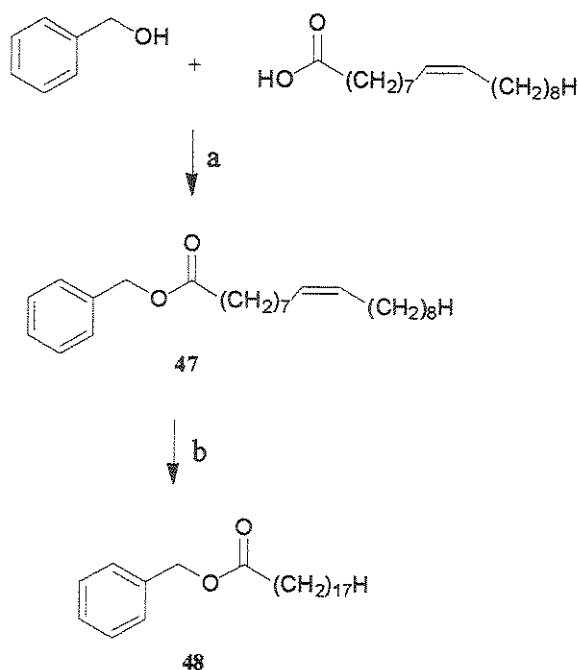
⁴⁹ Seigler, D., Simpson, B. B., Martin, C., Neff, J. L. *Phytochemistry*, **1978**, 17, 995.

harrisonianum, todos pertencentes à seção Puvinata do gênero *Oncidium* (Tabela 11).



41 n=20
42 n=21
43 n=22
44 n=23
45 n=24
46 n=25

A presença de íons de m/z compatíveis com fragmento $[C_nH_{2n-1}O - 2H]$ que é originada da clivagem α a carbonila de ésteres derivados de ácidos graxos com uma insaturação em sua cadeia, sugeriam que estes ésteres benzílico poderiam ser derivados de ácidos graxos insaturados. Para confirmar a presença desta classe de compostos foi sintetizado o oleato de benzila segundo descrito no Esquema 1.



Esquema 1. Preparação dos padrões oleato de benzila **47** e octadecanoato de benzila **48**.

Legenda: a-DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , 24 h, ta, 72%, b- Pt/C, metanol/acetato de etila, H_2 , 24 h, 92 %.

O espectro do oleato de benzila apresenta um padrão de fragmentação diferente dos compostos naturais devido à baixa abundância do íon de m/z 108 (Figura 55b). Suspeitou-se que a insaturação da cadeia lateral desfavorecesse a formação deste íon. Assim o oleato de benzila foi hydrogenado levando ao octadecanoato de benzila (Esquema 1). Este composto apresentou o mesmo padrão de fragmentação dos compostos naturais como pode ser observado na Figura 55. Desta forma, com base nestes dados foi sugerido que os ésteres benzílicos presentes nos calos florais de espécies da seção Puvinata são uma série homóloga de ésteres benzílicos derivados de ácidos graxos saturados.

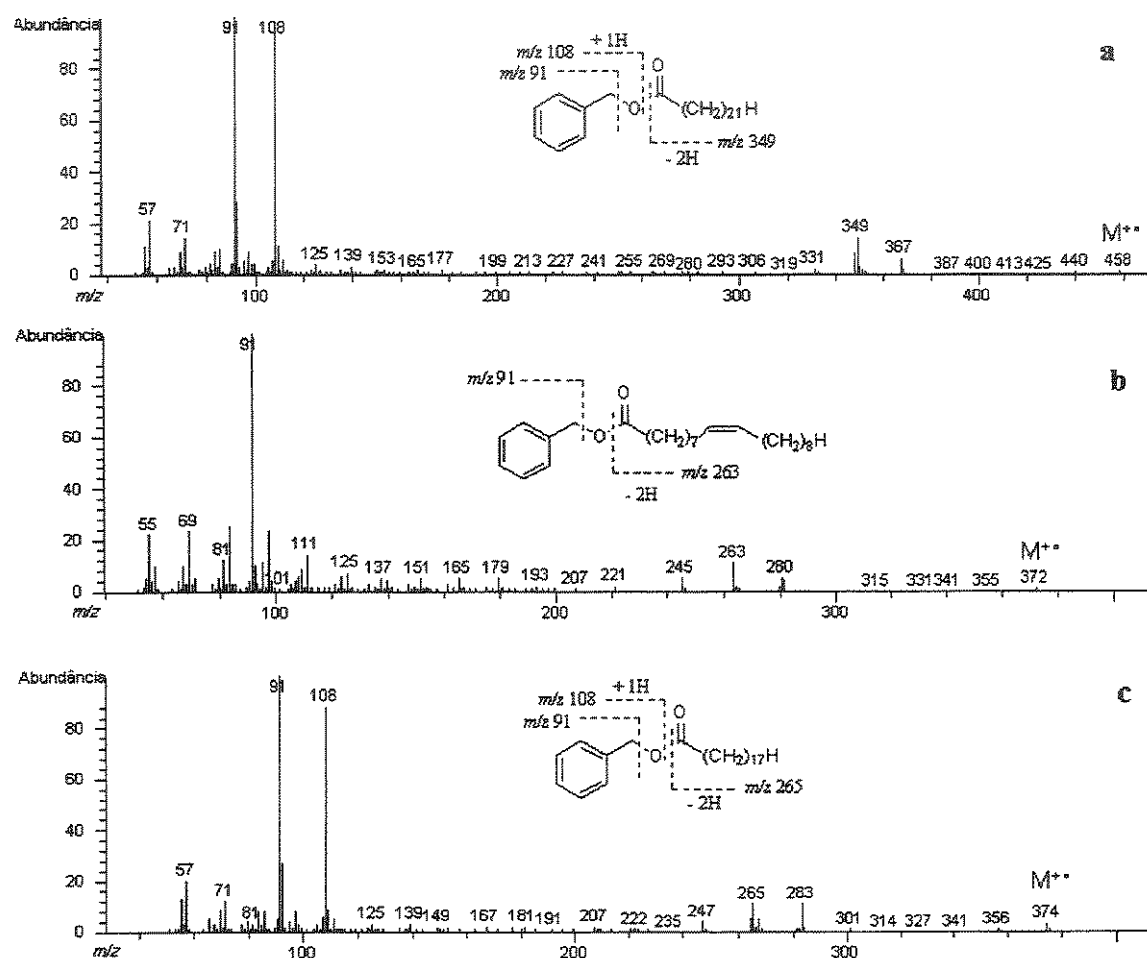


Figura 55. Espectros de massas: **a**- tetracosanoato de benzila 43 (óleo floral de *O. puvinatum*); **b**- oleato de benzila 47; e **c**- octadecanoato de benzila 48.

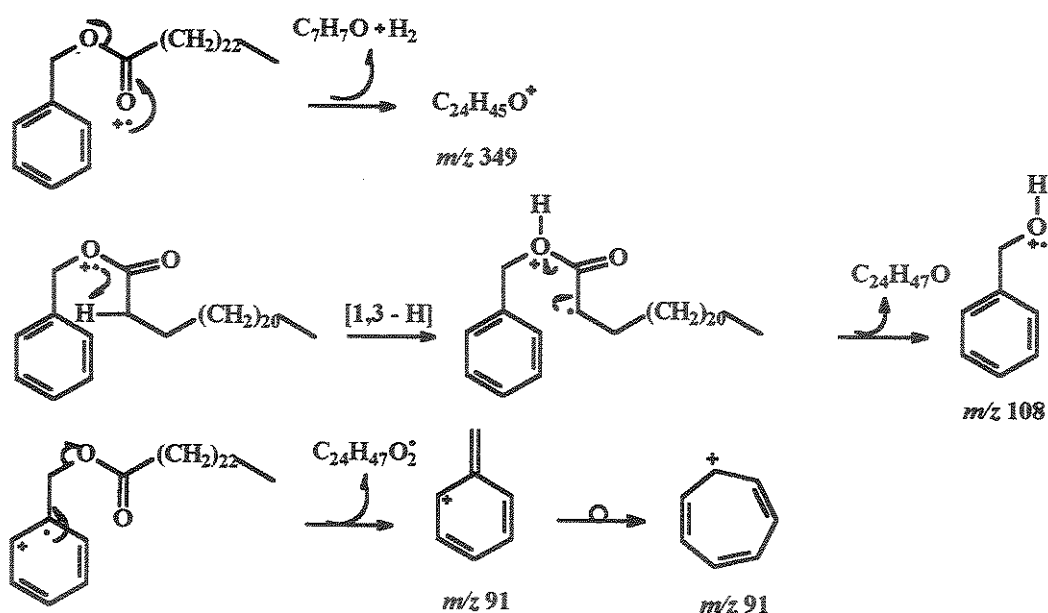


Figura 56. Proposta de fragmentação para o tetracosanoato de benzila 43.

Ésteres benzílicos foram identificados em ceras epicuticulares de folhas de *Eucalyptus regnans*. Estas folhas são utilizadas por *Chrysophtharta bimaculata* para oviposição.⁵⁰ Segundo Howlett e Clarke⁵⁰ o comportamento dos insetos nesta interação sugere que eles podem receber informações químicas da superfície foliar através de receptores localizados na antena, palpos (apêndice segmentado das maxilas dos insetos) ou ovipositor, por causa destas partes do corpo sempre entrarem em contato com a superfície foliar.

De um modo geral, um grande número de feromônios de insetos são derivados de ácidos graxos. Ayasse⁵¹ descreveu o papel de hidrocarbonetos

⁵⁰ Howlett, B. G., Clarke, A. R. 2003. Australian Journal of Entomology, 42, 144-148.

presente na cera epicuticular de flores de *Orphys* (Orchidaceae) na atração de insetos polinizadores.⁵¹

Os precursores enzimáticos da biossíntese dos ácidos graxos são derivados da acetil-CoA. Aldeídos, álcoois primários e secundários, hidrocarbonetos, cetonas e ésteres são produzidos por reações de descarboxilação ou redução dos ácidos graxos.⁵²

3.1.2.3 Acilgliceróis

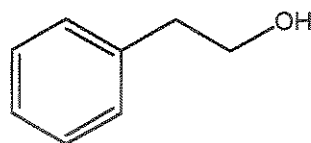
O diacilglicerol, 1-acetil-2-(3,7-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol (mesma estrutura plana do Oncidinol 1) foi identificado nos calos florais de *Oncidium praetextum*, *Oncidium varicosum*. O 1-acetil-2-(3-acetoxi-eicosanoil)-glicerol foi encontrado no calo de *Oncidium widgrenii*. Nestes casos, diferente do observado para as espécies que secretam óleos na superfície de seus calos, os acilgliceróis são componentes minoritários.

3.1.2.4 Fenilpropanóides

Foram identificados vários fenilpropanóides em diferentes calos florais (Tabela 11). Dentre estes se destaca o álcool 2-feniletanol **49** que é o constituinte majoritário do calo floral de *Miltonia spectabilis*. A identificação destes compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com espectros de massas da biblioteca Wiley e por comparação com índices de retenção da literatura.⁴¹

⁵¹ Schiestl, F. P.; Ayasse, M.; Paulus, H. F.; Löstedt, C.; Hansson, B. S.; Ibarra, F.; Francke, W. 1999.. *Nature* 399: 421-422.

⁵² Mariani, C., Wolters-Arts, M. Complex Waxes, *Plant Cell* 2000, 12, 1795-1798.



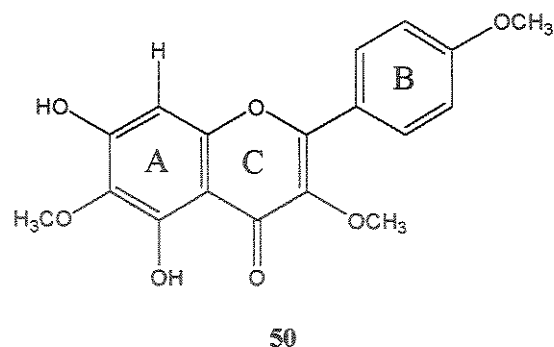
49

Os fenilpropanóides se originam da rota biossintética do ácido chiquímico que origina os amino-ácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina. A fenilalanina amônia-liase remove a amônia da fenilalanina, produzindo o ácido *trans*-cinâmico. Esta enzima marca a transição do metabolismo primário da planta para o secundário (é similar a ação da liase, na tirosina levando ao ácido p-cumárico). O ácido cinâmico é um precursor importante de muitos metabólitos aromáticos.⁵³

3.1.2.5 Flavonóides

Foi observado na secreção do calo de *Oncidium warmingii* e *O. phymatochilum* a presença de compostos que possuem espectro de massas compatíveis com espectros de flavonóides (Tabela 11). Um destes compostos, majoritário na secreção de *O. warmingii*, foi encontrado também no extrato das flores de *Ornithophora radicans*.

⁵³ Croteau, R., Karp, F. In Müller, P. M., Lamparsky, D. *Perfumes: Art science technology*. 101-126, 1994.



O composto **50**, isolado do extrato das flores de *Ornithophora radicans*, apresenta o íon molecular de m/z 344 que somado aos dados de RMN ^1H e ^{13}C sugere a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$. O espectro de ^{13}C (Carbono desacoplado e DEPT 135° e 90°) revela a presença de 3 metilas conectadas a heteroátomos; 3 metinos conectados a sistemas aromáticos e 10 carbonos quaternários sendo um destes uma carbonila. A soma dos sinais no espectro de carbono revela 16 linhas o que indica a presença de dois carbonos isocronos. O espectro de RMN de ^1H contém um conjunto de sinais com deslocamentos químicos em δ 7,02 e 7,04 e outro conjunto em δ 8,06 e 8,08 ambos na forma de um duplo falso tripleto de um sistema $\text{AA}'\text{BB}'$ do anel B atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5', H-2' e H-6' com constantes de acoplamento de $J_{5',6'} = 9,0$, $J_{5',3'} = 3,1$ e $J_{5',2'} = 2,1$. Os sinais em δ 3,94, 3,91 e 3,81 foram atribuídos as três metoxilas do composto. O sinal em δ 12,72 foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila ligado ao carbono C-5. O último sinal observado no espectro de RMN de ^1H do composto **50** é o singlete com deslocamento em δ 6,52 atribuído ao hidrogênio metínico H-8. Os espectros de RMN de 1D e 2D (H,H COSY , H,C HSQC , H,C HMBC) associados a dados encontrados na literatura para compostos semelhantes^{54,55,56,57} foram importantes na determinação de

⁵⁴ Agrawal, P.K. "Carbon-13 NMR of flavonoids" Elsevier, 1989

conectividade dos carbonos na molécula estando suas correlações mostradas Figura 57. Os dados obtidos sugerem que o composto pertença à classe dos flavonóis e seja o 3, 4', 6- trimetoxi-campferol também conhecido como santin.^{58,59}

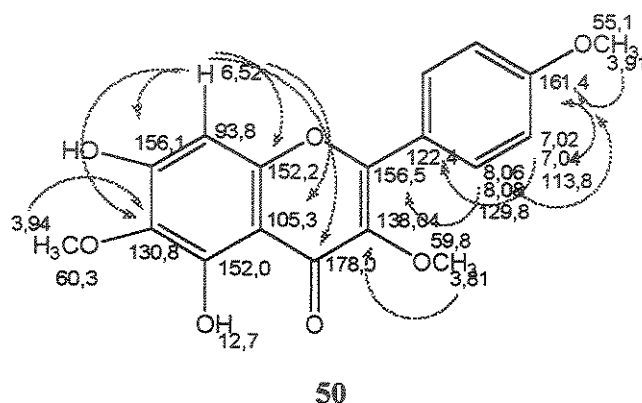


Figura 57. Dados de correlações homonuclear de ^1H , ^1H (COSY) e heteronuclear de ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) obtidos por RMN 2D, para o composto **50**

Tabela 10. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$, δ -TMS), ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$, δ - CDCl_3), COSY, HSQC e HMBC para o composto **50**

C #	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
2	156,5	-	
3	138,0	-	
4	178,0	-	
5	152,2	-	
6	130,8	-	

⁵⁵ Long, C., Sauleau, P., David, B. Lavaud, C., Cassabois, V., Ausseil, F. Massiot, G. *Phytochemistry*, **2003**, 64: 567-569.

⁵⁶ Houssein, S. A. M., Hashem, A. N. M., Seliem, M. A., Lindequist, U., Nawwar, M. A. M., *Phytochemistry*, **2003**, 64:883-889.

⁵⁷ Houssein, S. A. M., Barakat, H. H., Nawar, M. A. M., Willuhn, G., *Phytochemistry*, **1997**, 45:1529-1532.

⁵⁸ Harborne, J. B. *Phytochemistry*, **1969**, 8, 177.

⁵⁹ Martinez, J. Silván, A. M., Abad, J. M., Bermejo, P., Villar, A. *J. Natural Products*, **1997**, 60:142-144

7	156,1	-	
8	93,8	6,52 (s, 1H)	C-4, C-5, C-7, C-8, C-10
9	152,0	-	
10	105,3	-	
1'	122,4	-	
3' e 5'	113,8	8,06 e 8,08 (<i>dft</i> , $^3J_{5',6'} = 9,0$, $^4J_{5',3'} =$ C-2, C-4', 3,1 e $^5J_{5',2'} = 2,1$, 2H)	
2' e 6'	129,8	7,02 e 7,04 (<i>dft</i> , $^3J_{5',6'} = 9,0$, $^4J_{6',2'} =$ C-1', C-4', 3,1 e $^5J_{6',3'} = 2,1$, 2H)	
4'	161,5	-	
CH ₃ -C3	59,8	3,81 (s, 3H)	C-3
CH ₃ -C6	60,3	3,94 (s, 3H)	C-8
CH ₃ -C4'	55,1	3,91 (s, 3H)	C-4'
HO-C5	-	12,70 (s, 1H)	

Flavonóides representam um importante grupo de pigmentos de plantas. Os flavonóides amarelos são geralmente flavonóis que apresentam grupos hidroxílicos adicionais na posição 6 e/ou 8 do anel aromático A em adição a estrutura básica 5,7-diidroxilada.^{60,61} Estudos realizados com extrato microsomal de *Tagetes patula* revelaram que o grupo hidroxílicos na posição 6 do anel A do flavonol quercetin é introduzido por uma monoxigenase dependente de P450.⁶⁰

⁶⁰ Halbworth, H. Forkmann, G., Stich, K., *Plant Science*, **2004**, 167:129-135.

⁶¹ Proctor, M., Yeo, P., Lack, *The Natural History of Pollination*, Harper Collins Publishers, **1996**.

3.2 Análise do calo e das demais partes das flores das espécies *Oncidium puvinatum*, *O. flexuosum* e *O. praetextum*

Uma vez observada a composição química dos calos florais de 39 espécies de Oncidiinae, nosso passo seguinte foi avaliar se os compostos produzidos nestes calos estão também presentes em outras partes florais.

Levando em consideração que as flores disponibilizam as recompensas de forma estratégica para que durante a coleta deste material ocorra a transferência do pólen ou polínia para o polinizador, observa-se que as mesmas não se encontram distribuídas uniformemente por todas partes da flor.⁶⁰ Assim outra forma de confirmar que os exsudados florais de Oncidiinae produzidos nos calos atuam como recompensas ou são compostos com funções especiais⁶² seria observando as diferenças nas composições químicas dos calos e das demais partes florais. Portanto foram selecionadas três espécies distintas de Oncidiinae contendo diferentes classes de compostos e pertencendo ao gênero *Oncidium*: *Oncidium puvinatum* que apresenta uma alta abundância relativa de ésteres benzílicos, *O. flexuosum* com esteróides e hidrocarbonetos e *O. praetextum* com diacilgliceróis na secreção do seu calo floral.

Os resultados obtidos revalam que os ésteres benzílicos (Figura 58) de *Oncidium puvinatum* estão presentes predominantemente nos calos e nas outras partes da flor se encontram apenas em traços. O diacilglicerol que está presente no calo de *O. praetextum* não está nas demais partes da flor (Figura

⁶² Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective, *Phytochemistry*, 64, 3-19.

59). Enquanto o calo e as outras partes da flor de *O. flexuosum* apresentam uma composição química bastante semelhante (Figura 60).

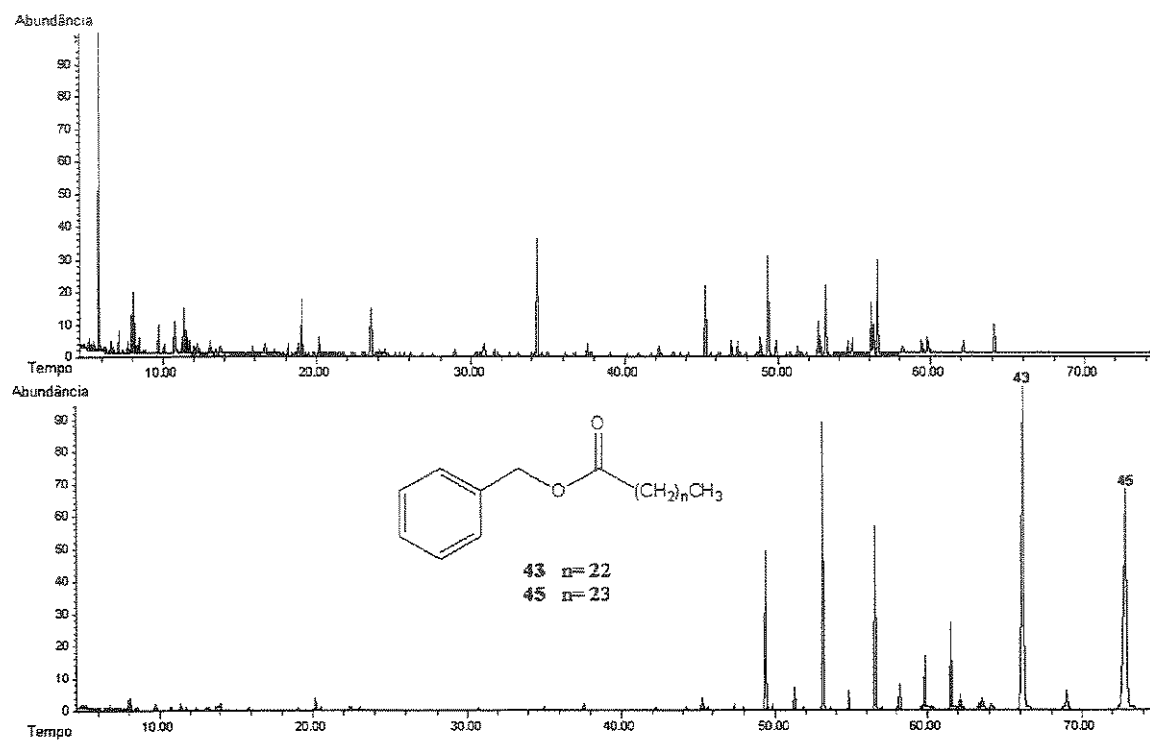


Figura 58. Acima – Cromatograma total de íons do extrato da flor de *O. puvinum* sem o calo floral.

Abaixo- Cromatograma total de íons do extrato do calo floral de *O. puvinum*.

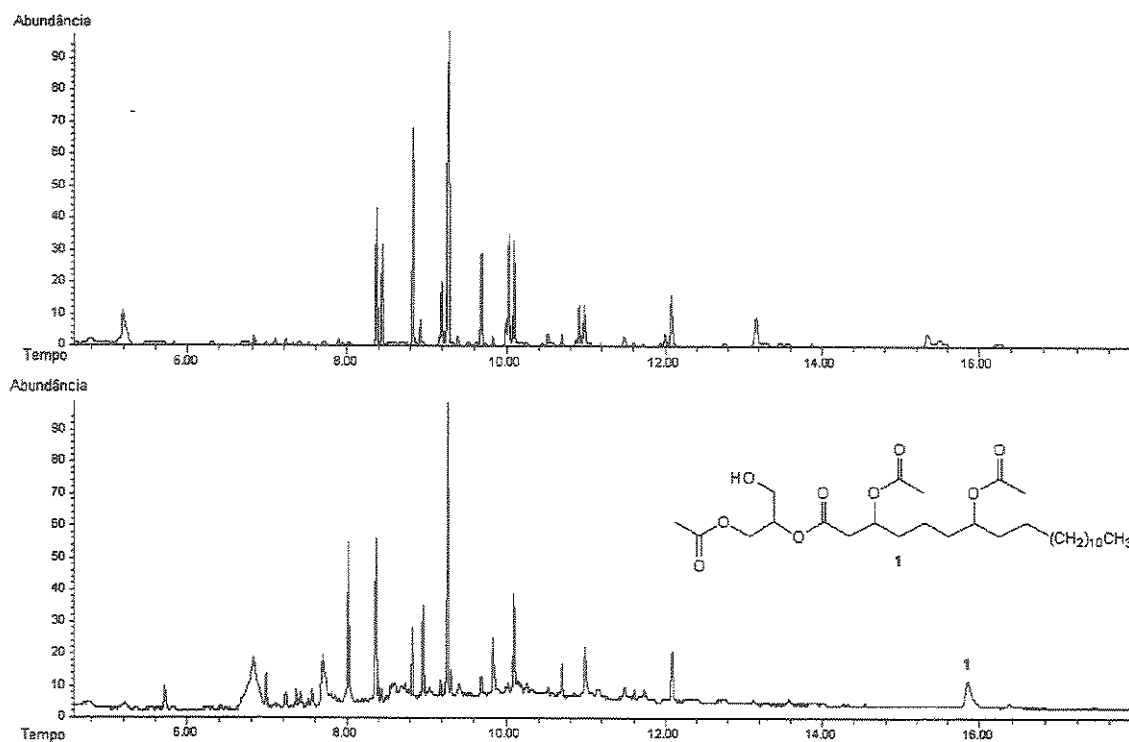


Figura 59. Acima – Cromatograma total de íons do extrato da flor de *O. praetextum* sem o calo floral. Abaixo - Cromatograma total de íons do extrato do calo floral de *O. praetextum*

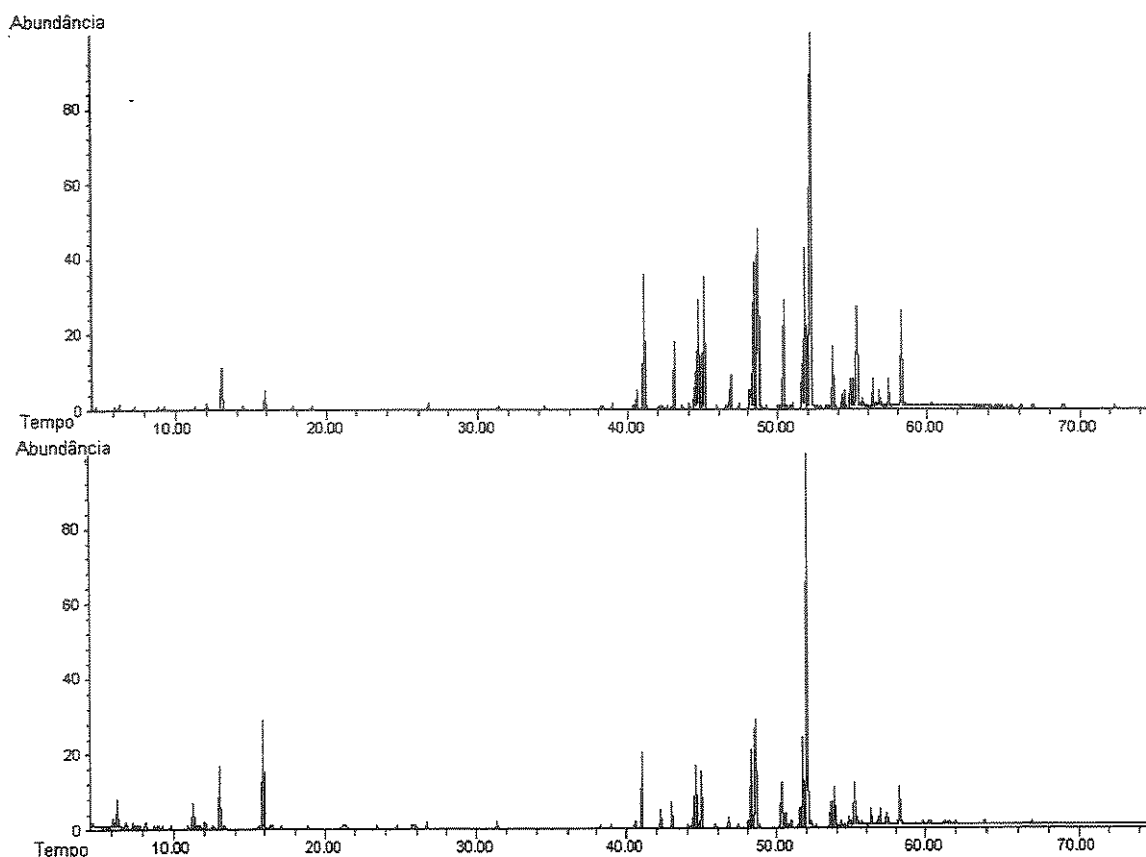


Figura 60 . Acima – Cromatograma total de íons do extrato da flor de *O. flexuosum* sem o calo floral. Abaixo - Cromatograma total de íons do extrato do calo floral de *O. flexuosum*

Como Fritz Muller observou a presença de insetos raspando o calo floral de *O. flexuosum*. Para avaliar se este calo poderia ser um nectário foi realizada a sililação do extrato floral obtido através da maceração de flores sem os calos e os calos separadamente com uma mistura de acetato de etila e metanol (1:1). O extrato sililado foi analisado por CG/EM. No entanto, os resultados obtidos revelaram a mesma composição de açúcar no calo e nas demais regiões florais. Estes resultados sugerem que o calo floral de *Oncidium flexuosum* seja uma modificação floral que não apresenta uma composição química que o diferencie das demais regiões florais. O curioso é que seu

elaióforo apresenta todas as características morfológicas descritas para elaióforos tricomáceos.

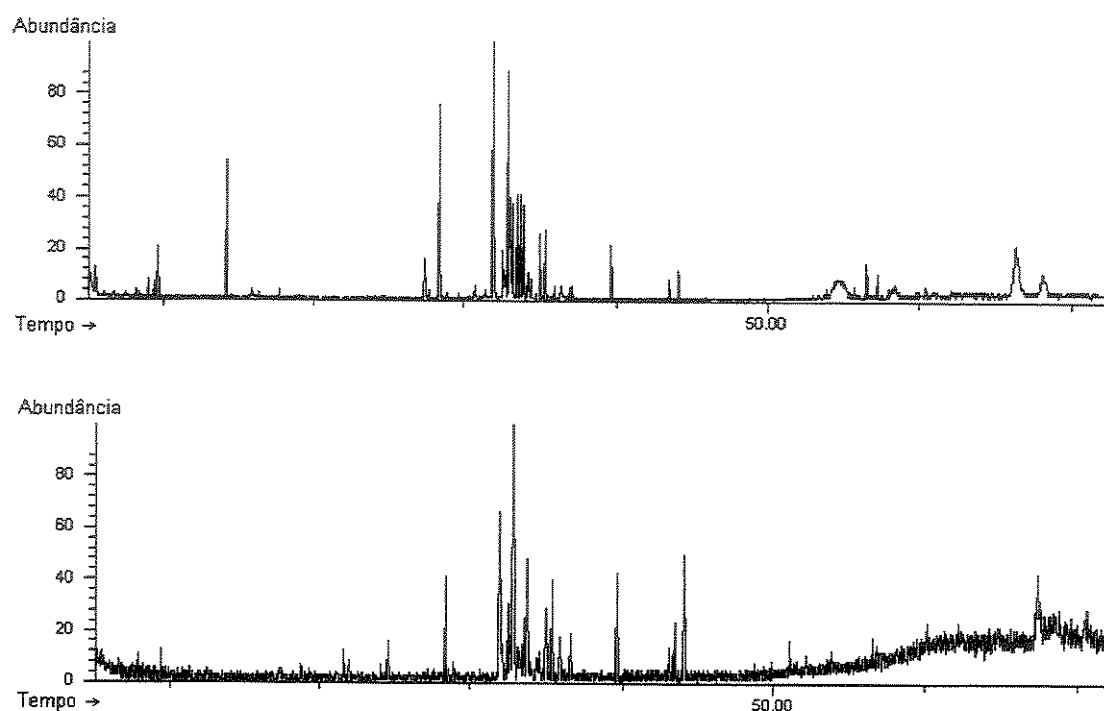


Figura 61. Acima – Cromatograma total de íons do extrato sililado da flor de *O. flexuosum* sem o calo floral.
Abaixo - Cromatograma total de íons do extrato sililado do calo floral de *O. flexuosum*

Como conclusão desta etapa foi verificado que *O. puvinatum* produz ésteres benzílicos e *O. praetextum* produz diacilglicerol apenas nos calos florais enquanto *O. flexuosum* produz os mesmos compostos tanto no calo quanto nas demais partes da flor, indicando que o calo não produz compostos que diferenciem o calo das demais regiões sendo aparentemente apenas uma modificação morfológica da flor, e podendo portanto, ser uma flor de engano. Assim os ésteres benzílicos e os diacilglicerois seriam recompensas em

potencial. Entretanto, são necessários estudos de biologia de polinização para confirmar esta hipótese.

Tabela 11. Compostos identificados nos calos florais de 39 espécies da subtribo Oncidinae. Os números na tabela representam a abundância relativa (%) dos compostos identificados em cada calo floral.

		FL	ZI	OK	TR	PD	OP	OC	OA	OT	OW	OL	RA	BE	GL	LP	OM	CX	OB	SA	PX
	IR ou TR ^{1,2,3}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Derivados de glicerol																					
1-acetil-glicerol	1123			1,2	1,6	1,4	1,1	2,0	11,8			3,3		2,0							
Diacetil glicerol	1244													0,5							
Hexadecanoil-glicerol	2504													0,3							
1,3-diacetil-2-hexadecanoil-glicerol			1,2																		
1-acetil-2-(3-acetoxi-hexadecanoil)-glicerol	2692						0,5														
1-acetil-2-(3-acetoxi-7-hidroxi-hexadecanoil)-glicerol	2797						17,4														
1-acetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)-glicerol	2914		40,0	8,0			23,2			18,0		3,5	45,9	2,3							
1,3-diacetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)-glicerol	2964		21,1			10,8	5,2			2,4			17,5								
1-acetil-2-(3-acetoxi-eicosanoil)-glicerol	3095			32		11,5					1,0	5,8	7,8	8,7							
1,3-diacetil-2-(3-acetoxi-cicosanoil)-glicerol	3105			2,0									3,4								
1-acetil-2-(3-acetoxi-7-hidroxi-octadecanoil)-glicerol	3095			10,1			22,6	59,1		34,8				14,4							
1,3-diacetil-2-(3-acetoxi-7-hidroxi-octadecanoil)-glicerol	3174			3,1			5,9	4,8													

¹ Os composto que eluíram a uma temperatura superior a 290 °C (isotérmica) não tiveram seus índices de retenção calculados

² Tempo de retenção (min) do 1-acetil-2-(3,7-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol = 59,83; 1,3-diacetil-2-(3,7-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol = 60,27;

1-acetil-2-(3-acetoxi-6-hidroxi-docosanoil)-glicerol = 62,33 quando os seguintes hidrocarbonetos apresentam o tempo de retenção: pentadecano = 22,42;

hexadecano = 25,30; pentacosano = 46,00; hexacosano = 47,85

³ Tempo de retenção (min) do tricosanoato de benzila = 60,68; tetracosanoato de benzila = 62,69; hexacosanoato de benzila = 64,60; heptacosanoato de benzila = 67,25; octacosanoato de benzila = 70,21

quando os seguintes hidrocarbonetos apresentam o tempo de retenção: pentadecano = 23,53; hexadecano = 26,45; pentacosano = 47,38; hexacosano = 49,26

Oncidium pubes -OP; *Oncidium cornigerum* -OC; *Oncidium amictum* -AO; *Oncidium kautskii* -KA; *Oncidium truncatum* -OT; *Oncidium hookeri* -OH; *Oncidium longicornul* -OL; *Oncidium welletii* -WE; *Oncidium trulliferum* -TR; *Zygostates lunata* -ZL; *Phymatidium tillandsioides* -PD; *Ornithophora radicans* -RA; *Baptistonia echinata* -BE; *Oncidium widgrenii* -OW; *Oncidium longipes* -LP; *Oncidium macropetalum* -OM; *Oncidium cogniauxianum* -CX; *Oncidium ciliatum* -OB; *Oncidium sarcodes* -AS; *Oncidium praetextum* -PX; *Oncidium forbesi* -OF; *Oncidium warningii* -WA; *Oncidium varicosum* -VA; *Oncidium flexuosum* -FL; *Oncidium onustum* -OO; *Oncidium divaricatum* -DI; *Oncidium phymatochilum* -PH; *Oncidium pulvinatum* -PV; *Oncidium harrisionianum* -HR; *Oncidium hydrophylum* -HY; *Rodriguezella gomesoides* -RG; *Gomesa laxifolia* -GL; *Gomesa crispa* -GC; *Gomesa recurvar* -GR; *Gomesa sessilis* -GS; *Gomesa* sp-SP; *Lockhartia lunifera* -LL; *Miltonia spectabilis* -MI; *Rodriguesia venusta* -RD

Continuação: Tabela 11. Compostos identificados nos calos florais de 39 espécies da subtribo Oncidiinae

		WE	WA	VA	HK	RG	OO	PV	HR	PH	GC	GS	GR	SP	LL	OF	HY	DI	MI
	IR ou	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
	TR*																		
Derivados de glicerol																			
1-acetil-glicerol	1123	11																	
Diacetil glicerol	1244																		
Hexadecanoil-glicerol	2504																		
1,3-hexadecanoil-glicerol	2504																		
1,3-diacetil-2-hexadecanoil-glicerol																			

[illegible]

β -Sitosterol	3315	7,9	4,0	11,3	2,2	1,4	1,9	5,8	1,0	3,8	16,9		
Flavonóides													
Flavonóide 1	2981							20,0					
Santín	3021		26,7										
Flavonóide 2	3250		2,0										

¹ Os composto que eluíram a uma temperatura superior a 290 °C (isotérmica) não tiveram seus índices de retenção calculados

² Tempo de retenção (min) do 1-acetil-2-(3,7-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol = 59,83; 1,3-diacetil-2-(3,7-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol = 60,27;

1-acetil-2-(3-acetoxi-6-hidroxi-docosanoil)-glicerol = 62,33 quando os seguintes hidrocarbonetos apresentam o tempo de retenção: pentadecano = 22,42; hexadecano = 25,30; pentacosano = 46,00; hexacosano = 47,85

³ Tempo de retenção (min) do tricosanoato de benzila = 60,68; tetracosanoato de benzila = 62,69; hexacosanoato de benzila = 64,60; heptacosanoato de benzila = 67,25; octacosanoato de benzila = 70,21

quando os seguintes hidrocarbonetos apresentam o tempo de retenção: pentadecano = 23,53; hexadecano = 26,45; pentacosano = 47,38; hexacosano = 49,26

3.3 Análise de similaridade química dos compostos produzidos nos calos de 39 espécies de Oncidiinae em comparação a árvore filogenética

A composição química dos calos florais de 39 espécies de Oncidiinae foi caracterizada e avaliada segundo sua filogenia segundo a sua filogenia, e desta forma, foi observado como estes caracteres evoluíram neste grupo de orquídeas.

A diversidade das espécies resulta de processos de evolução e coadaptação representando um mecanismo laborioso, especialmente no que diz respeito à polinização, cujo sucesso representa a perpetuação de uma espécie. O arranjo floral das orquídeas, “maravilhosamente adaptadas para controlar sua polinização por insetos”, fascinou Darwin em seus estudos sobre a evolução das espécies. Um dos inúmeros exemplos que marcaram seu trabalho foi à orquídea *Angraecum sesquipedale*, de Madagascar, cujo receptáculo para néctar media 28 centímetros. Ele previu que em algum ponto de Madagascar deveria haver um inseto com um proboscídeo de 28 centímetros, adequado para extrair o néctar da orquídea. Lá, 40 anos depois, dois entomólogos descobriram a mariposa *Xanthopan morgani praedicta* com um proboscídeo de 28 centímetros responsável pela polinização desta orquídea. Atualmente, os pesquisadores estão impressionados com a diversidade química das orquídeas que leva a atração de diferentes polinizadores.^{63,64,65,66,67}

⁶³ Reis, M. G., Pansarim, E. R., Silva, U. F., Amaral, M. C. E., Marsaioli, A. J., *Arkivoc*, 2004, VI:103-111

Em trabalhos para avaliar filogenia de um grupo é importante utilizar caracteres que não mudem frente a mudanças ambientais. Desta forma, foi avaliado se os compostos produzidos nos calos florais sofrem modificações frente a diferentes ambientes ou em diferentes anos, para isto foram feitos várias análises com espécimes de diferentes populações.

Não foram observadas variações significativas na composição dos calos florais entre diferentes populações e nem do mesmo indivíduo em diferentes anos. Várias espécies avaliadas foram coletadas em seu habitat e as mesmas também foram avaliadas no ano seguinte após serem mantidas em cultivo em casa de vegetação. Estes resultados revelam um forte componente genético pouco influenciado por mudanças ambientais.

Diferente do que poderia ser esperado para um grupo monofilético, foi observado que os calos florais apresentam uma grande variedade de compostos e classes de compostos e isto, provavelmente, reflete os diferentes mecanismos de polinização envolvidos neste grupo. Por outro lado, é esperado que compostos associados à polinização possam ser diferentes para atrair diferentes polinizadores e desta forma manter a integridade das espécies.

Grandes variações da composição química entre as espécies foram rapidamente percebidas, como a presença de diacilgliceróis em todas as espécies que exsudam óleos. No entanto, diferenças sutis só puderam ser avaliadas com o auxílio de análise estatística. Este tratamento estatístico para avaliar a similaridade química entre as espécies foi realizado através do

⁶⁴ Flach A, Dondon RC, Singer RB, Koehler S, Amaral MDE, Marsaioli AJ. *Journal Of Chemical Ecology* 2004,30:1045-1056.

⁶⁵ Schiestl FP, Ayasse M. *Plant Systematics and Evolution*, 2002 234:111-119.

⁶⁶ Schiestl FP, Ayasse M, *Oecologia* 2001, 126: 531-534

⁶⁷ Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Lofstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W, *Nature* 1999 399: 421-422

agrupamento hierárquico pelo Dr. Marlon Martins dos Reis. Para tal, três abordagens foram testadas: A primeira através dos dados originais; a segunda através do número de compostos em classes de compostos; e na terceira a abundância relativa de compostos em cada classe de compostos. Os dados originais correspondem a uma matriz de dados onde cada linha corresponde a uma flor e cada coluna a um composto identificado, ou seja sua abundância relativa. As outras matrizes de dados usadas foram construídas através do agrupamento dos compostos identificados em classes, sendo uma formada pelo número de compostos em cada classe e a outra pela soma das abundâncias relativas dos compostos de cada classe. O agrupamento hierárquico foi implementado através do emprego de distâncias euclidianas e através do agrupamento completo^{68,69} (foi empregado o programa R⁷⁰). A partir do emprego destes métodos foi verificado que a matriz de dados em melhor concordância com a classificação filogenética obtida no trabalho de Faria⁷¹ foi aquela formada com a soma das abundâncias relativas dos compostos em classes de compostos. O resultado desta análise é apresentado nas Figura 65 e Figura 66 onde o gráfico de dendrograma e uma tabela de cores (representando a tabela de dados) que permite identificar as classes de compostos significativas para similaridade dentro de cada grupo de flores.

Nesta análise foi observada a formação de dois grandes grupos marcados principalmente pela abundância relativa dos diacilgliceróis. O primeiro, **grupo I**, é formado pelas espécies que apresentam óleos exsudados e o segundo, **grupo II**, pelas espécies que não os exsudam. Dentro destes

⁶⁸ Brian S. Everitt. "A handbook of statistical analyses using S-PLUS", London : Chapman and Hall, c1994.

⁶⁹ N. Bratchell, "Cluster analysis" Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, Volume 6, Issue 2 , July 1987, Pages 105-

⁷⁰ www.r-project.org

⁷¹ Faria, A. D. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

grupos também foram separados grupos menores que apresentam as mesmas classes de compostos, com abundâncias relativas diferentes.

O **grupo I** (Figura 65 e Figura 66) é quimicamente homogêneo, porque todos produzem majoritariamente diacilgliceróis esterificados por uma unidade de ácido acético e a outra de ácidos graxos hidroxilado ou acetilado. Neste grupo estão incluídas todas as espécies do grupo *Walueva* com exceção de *O. widgreni* (que não exsuda óleo) uma espécie do grupo *Rhinocerontes*, uma do grupo *Pacituberculata* e espécies pertencentes a quatro outros gêneros *Baptistonia*, *Ornithophora*, *Zigostates* e *Phymatidium*. Uma curiosidade deste grupo é a maior similaridade entre espécies do gênero *Oncidium* com espécies de outros gêneros (Ex. *Baptistonia* e *Ornithophora*) ao invés de espécies do seu próprio gênero (Ex. todas as espécies de *Oncidium* que não exsudam óleos). Sendo estas observações químicas suportadas por evidências macromoleculares como pode ser observado na árvore filogenética⁷¹ (Figura 67).

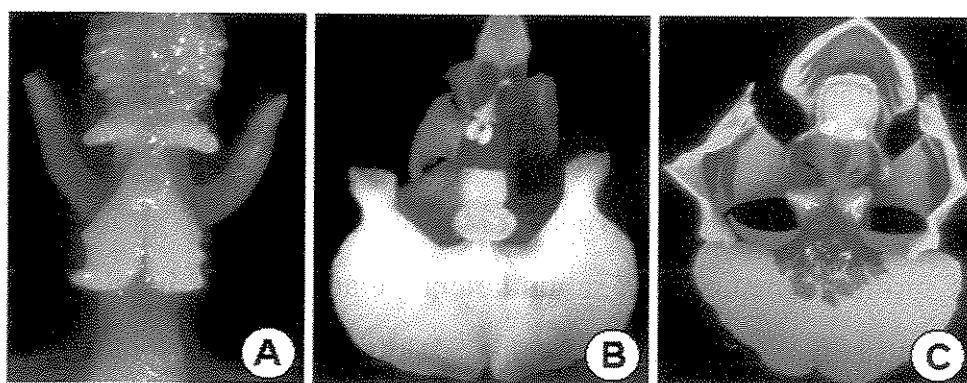


Figura 62. Flores do Grupo I.1 – A - Calo floral de *Oncidium pubes*, B- *Ornithophora radicans* e C- *Oncidium cornigerum* Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.

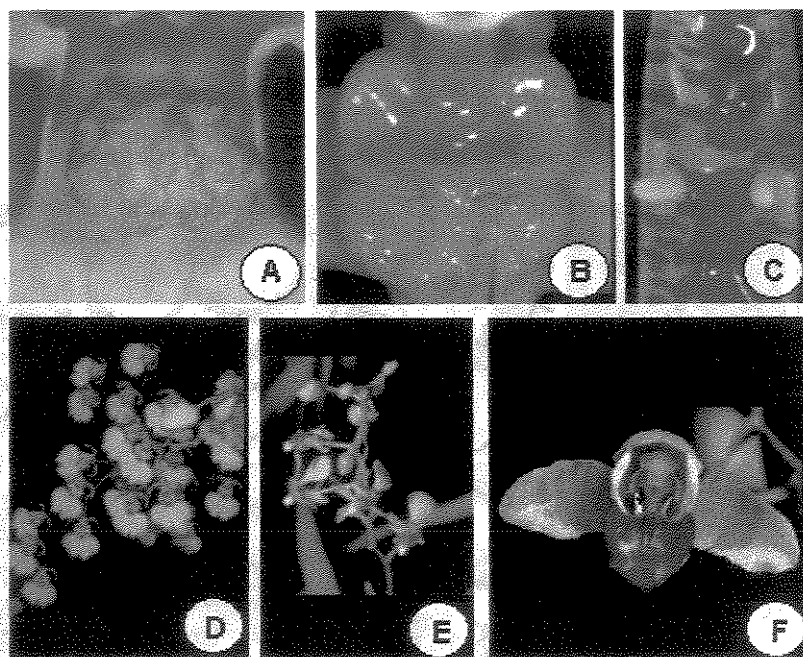


Figura 63. Flores do Grupo L2 – A - Calo floral de *Oncidium welteri*, B- Calo floral de *Oncidium hookeri*, C – Calo floral de *Baptistonia echinata*, D-*Oncidium welteri*, E- *Oncidium hookeri*, F-*Baptistonia echinata*. Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.

O grupo I é subdividido em dois grupos: No grupo I.1 se destaca as espécies *Oncidium pubes*, *Oncidium cornigerum* e *Oncidium amictum* todos proximamente relacionados também na análise filogenética. Outra característica botânica importante entre as espécies é que elas pertencem à mesma seção, *Walpura*, do gênero *Oncidium*. O grupo I.2. apresenta as espécies *Oncidium welteri*, *Oncidium hookeri* e *Oncidium longicornium* também são proximamente relacionadas na análise filogenética⁷¹ no entanto, elas eram classificadas em diferentes seções do gênero.

O grupo II, formado pelas espécies que não exudam óleos, e subdividido em seis grupos. O grupo II.1 é formado por uma única espécie, *Miltonia spectabilis*, que apresenta como componente majoritário do seu calo

o álcool 2-fenil-etanol. Esta espécie não foi avaliada através de dados moleculares.⁷¹

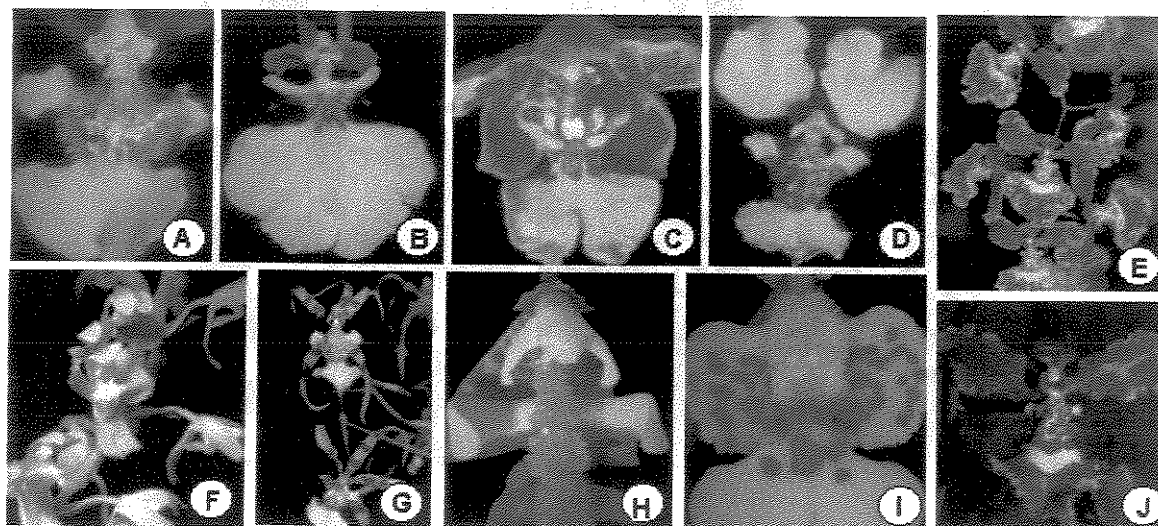


Figura 64. Espécies do grupo II. A- *Oncidium longipes*, B- *Oncidium hydrophyllum*, C-*Oncidium harrissonianum*, D-*Oncidium Macropetalum*, E- *Oncidium forbesi*, F- *Gomesa recurva*, G- *Oncidium phymatochylum*, H- Calo floral de *Oncidium widgrenii*, I- Calo floral de *Oncidium puvinatum* e J- *Oncidium praetextum*. Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Aparecida D. de Faria.

O grupo II.2 é constituído de duas espécies, *Oncidium cogniauxianum* e *O. longipes*, das três espécies da seção Barbata investigadas. Estas espécies apresentam como componente majoritário dos seus calos florais (cerca de 90%) um composto cuja estrutura não foi identificada, em razão da pequena quantidade de flores obtidas, mas, que foi encontrado apenas nestas duas espécies das 39 investigadas. Este composto foi relatado anteriormente por Kaiser que analisou a fragrância floral de *O. longipes*.⁷² A espécie *O. longipes*

⁷² Kaiser, R., 1993. The scents of orchids, olfactory and chemical investigations. Elsevier, editions Roche, Basel. Amsterdam

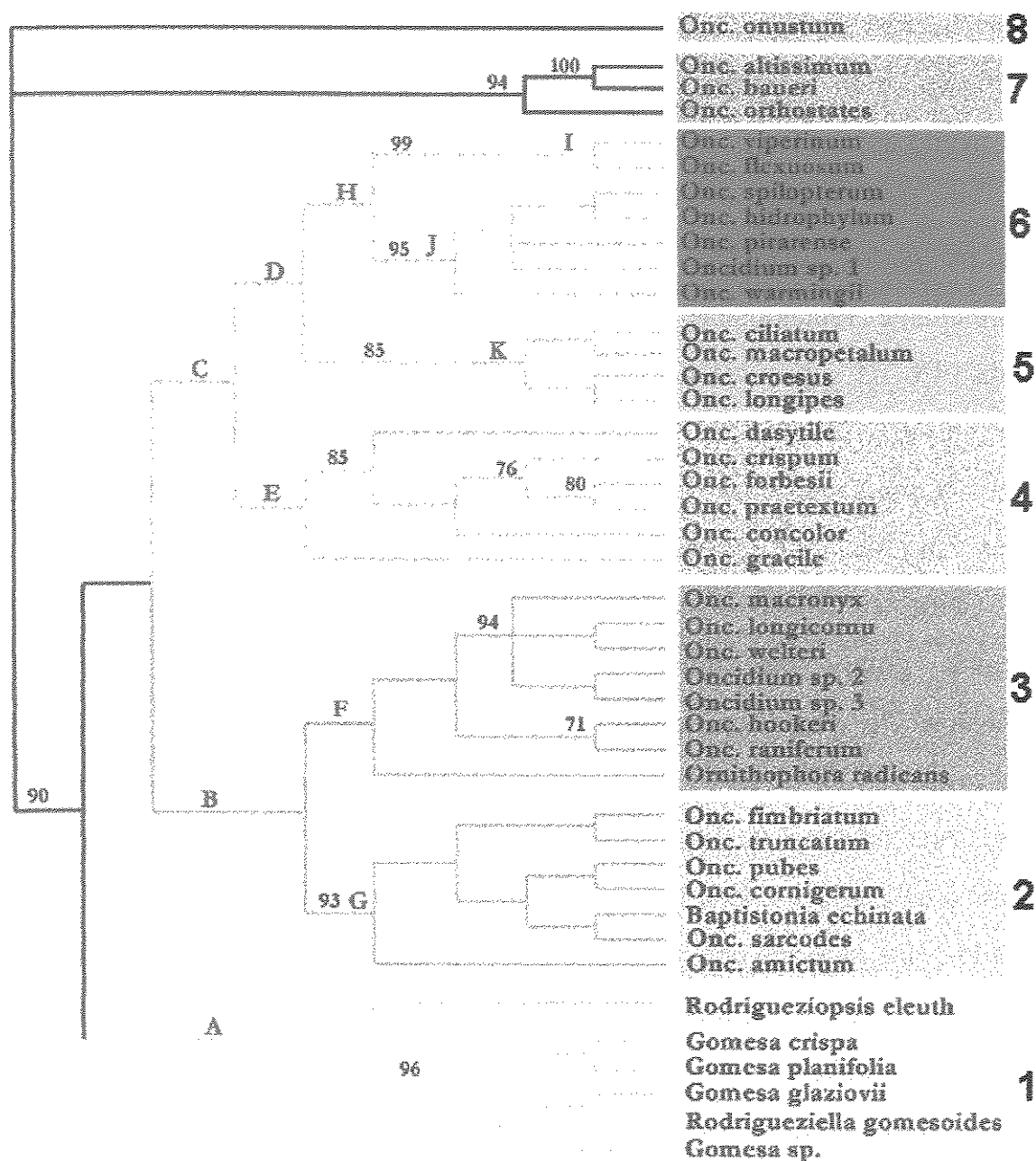


Figura 67. Árvore filogenética de consenso estrito gerada com utilização de dados morfo-anatômicos, químicos e moleculares. Gentilmente cedida pela Dra. Aparecida D. de Faria⁷¹

Observando a tabela de classes de compostos responsável pela formação dos grupos (Figura 66) é possível identificar que os ésteres benzílicos são

marcadores químicos da seção Puvinata. Pois, eles foram observados apenas em três espécies da seção Puvinata das quatro investigadas. Os ésteres benzílicos foram encontrados predominantemente nos calos florais, sendo identificado apenas traços destes compostos nas demais partes florais.

Um fato interessante deste estudo é as espécies *Oncidium praetextum* e *Oncidium forbesi* que na árvore filogenética (Figura 67, grupo 4) estão proximamente relacionadas, no entanto *O. praetextum* (espécie que não exsuda óleo na superfície do seu labelo) apresenta na secreção de seu calo floral um diacilglicerol enquanto *O. forbesi* não apresenta esta classe de composto, sendo portanto os diacilgliceróis um dos caracteres evolutivos que diferenciam estas duas espécies.

Como conclusão desta etapa, foi verificado que os calos florais de diferentes grupos da subtribo Oncidiinae produzem diversos tipos de compostos. De uma forma geral, é possível separar dois grandes grupos de flores presentes na esta subtribo, um com diacilgliceróis como componentes majoritários de seus óleos florais estando as espécies deste grupo também proximamente relacionadas na análise filogenéticas de DNA e o outro grupo formado pelas espécies que apresentam uma variedade compostos destacando-se os n-alcanos e os fitoesteróis. Observamos neste trabalho que algumas espécies do gênero *Oncidium* apresentam a composição do calo floral mais similar a outros gêneros (ex. *Ornithophora* e *Baptistonia*) do que com espécies do mesmo gênero sendo estes também observados pela análise filogenética.⁷¹

se apresenta em um grupo diferente também na análise filogenética⁷¹ (Figura 66).

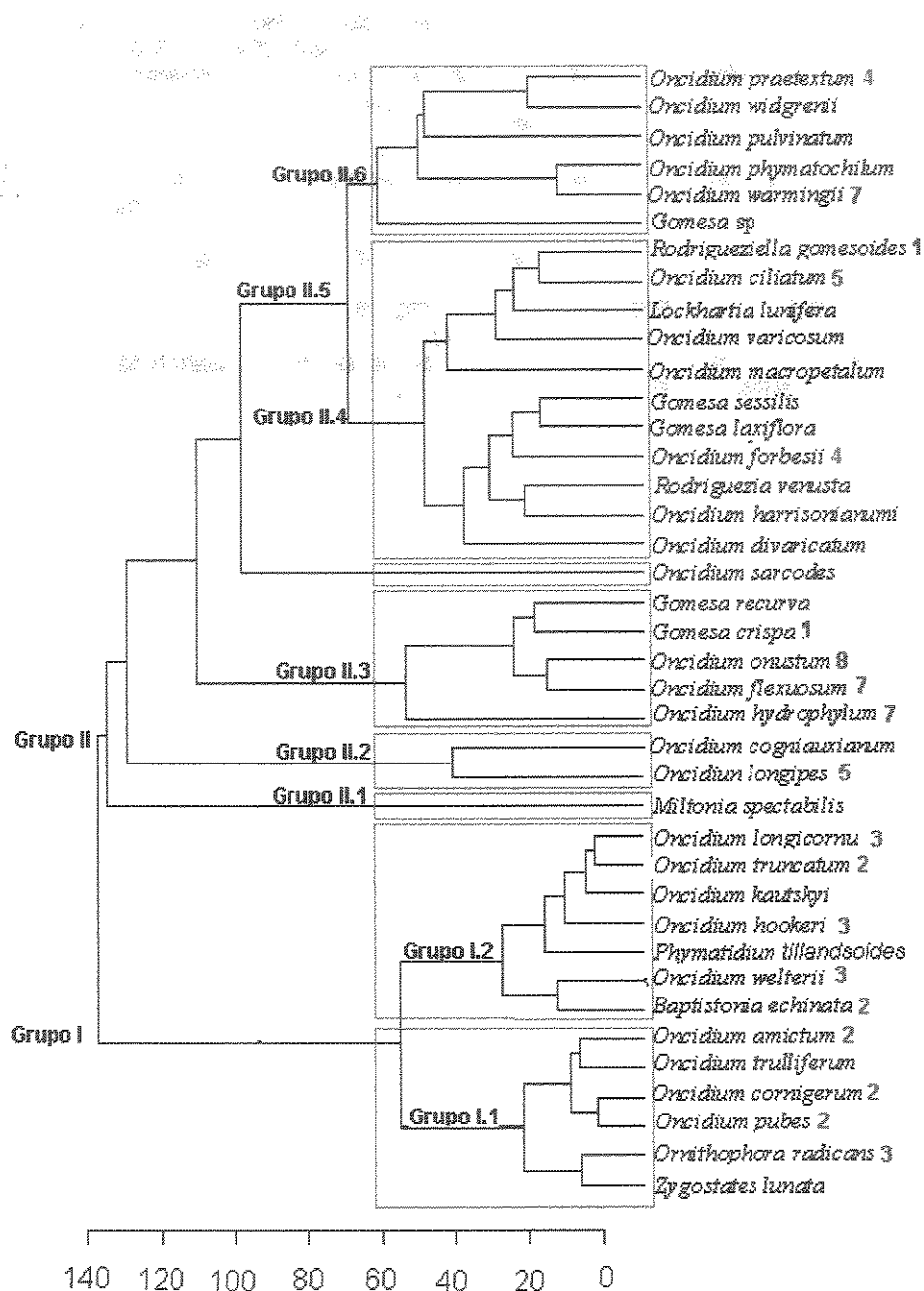


Figura 65. Similaridade entre as espécies com relação à composição química de seus calos florais utilizando método de agrupamento completo com distância euclidiana. O número ao lado dos nomes das espécies representam o grupo a que elas pertencem na análise filogenética baseada em dados macromoleculares, anatômicos e morfológicos (Figura 67).

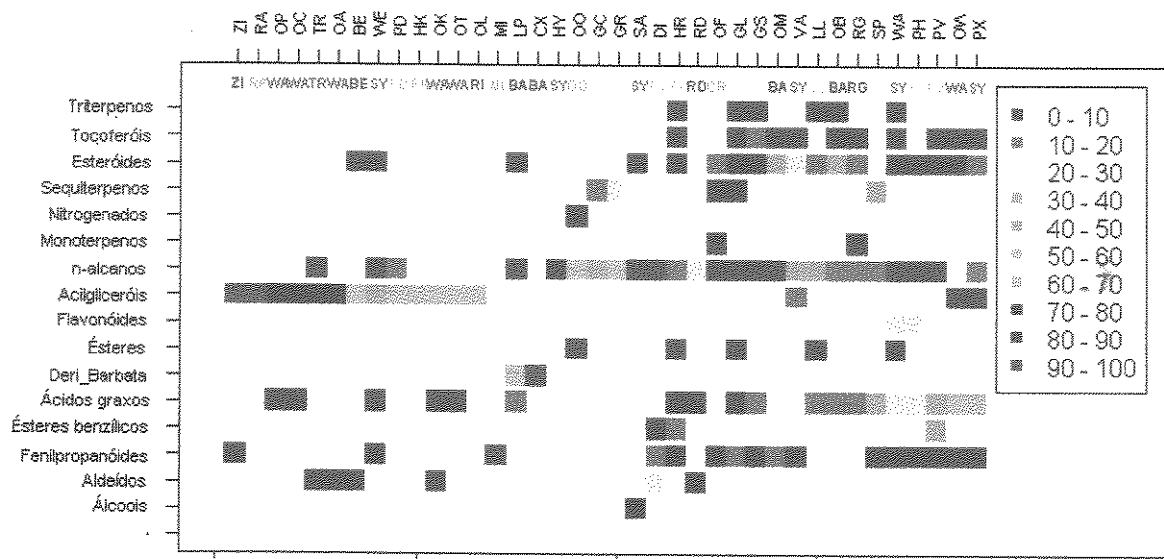


Figura 66. Método de agrupamento completo com distância euclidiana. As cores indicam a abundância relativa das classes de compostos.

Já os outros grupos, **grupo II.3**, **grupo II.4**, **grupo II.5** e **grupo II.6** revelam a presença de uma mistura de compostos constituídos principalmente de hidrocarbonetos, esteróides e tocoferóis. Outras classes de compostos também são observadas mas parece ter pouca influência na formação dos grupos, e assim os grupos foram agrupados principalmente pela variação de hidrocarbonetos, esteróides e tocoferóis em cada espécie. Estes compostos apresentam ampla distribuição entre as angiospermas e por isso não são bons indicadores taxômicos.

3.4 *Byrsonima intermedia* (Malpighiaceae) – Ácido Birsónico

Buscando investigar o fenômeno de mimetismo descrito para flores de Malpighiaceae e *Oncidium* foi escolhida a espécie *Byrsonima intermedia*, comum no Estado de São Paulo, para estudar seu óleo floral.

A família Malpighiaceae possui várias espécies que exsudam óleos florais que são coletados por abelhas. Flores de Malpighiaceae e *Oncidium* (Oncidiinae) são bastante semelhantes fisicamente. Nierenberg⁷³ descreveu que a polinização de *Oncidium lucayanum* por abelhas coletoras de óleos florais ocorria devido a sua semelhança, na coloração e forma, a flores de Malpighiaceae.

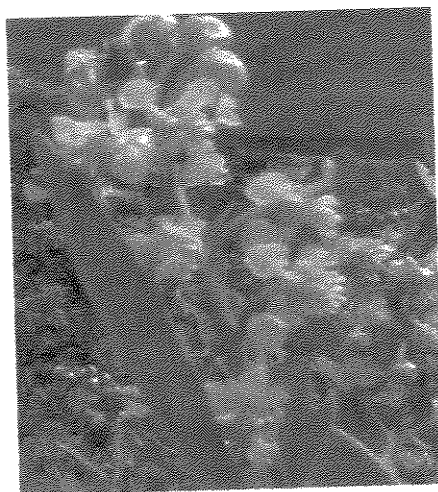
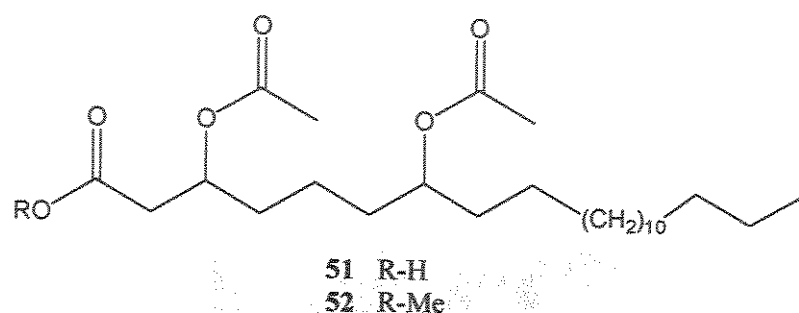


Figura 68. Flores de *B. intermedia* (Malpighiaceae)

⁷³ Nierenberg, L. 1972. *American Orchid Society Bulletin*. 41, 873.

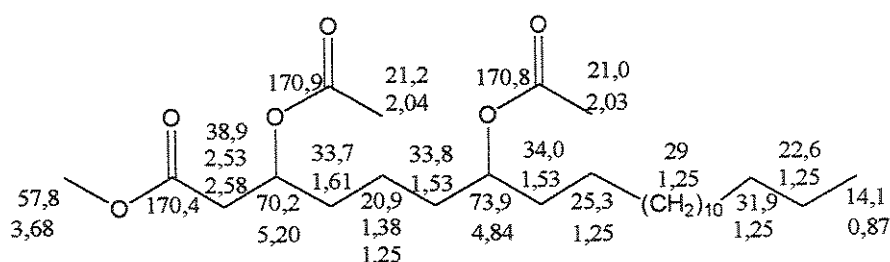
As flores de *Byrsonima intermedia* foram coletadas no campus da Universidade de São Paulo – SP em dezembro de 2003. As flores frescas (10 flores) foram lavadas com acetato de etila obtendo-se um extrato de 2 mg. A análise por cromatografia em camada delgada (Hexano/Acetato de etila 1:1) revelou que o óleo é constituído de compostos mais polares que os diacilgliceróis encontrados nas espécies de Oncidiinae. Este extrato bruto e posteriormente o extrato bruto metilado foram analisados por RMN de ^1H . O espectro revelou que o extrato bruto é composto por ácidos graxos semelhantes aos que esterificam o Oncidinol 1.



O composto majoritário foi isolado do extrato obtido através da maceração de 50 g de flores frescas, obtendo-se 600 mg de extrato que foi metilado com diazometano e em seguida submetido a uma coluna cromatográfica levando a 35 mg do composto **52**. A análise do espectro de **52** (RMN de ^1H e ^{13}C , 1D e 2D, HMBC, Tabela 12) revelou a presença de dois grupos metílicos característicos de grupos acetoxílicos (δ_c 21.20, δ_H 2.04; δ_c 21.16, δ_H 2.03) e dois metinos carbinólicos em δ_c 70.18 (δ_H 5.19, m) e δ_c 73.89 (δ_H 4.84, m) semelhante ao Oncidinol 1. Os demais sinais observados também foram similares aos observados para cadeia lateral do Oncidinol como descritos na Figura 69 e Tabela 12. Para certificar que este composto também

apresenta a substituição 3,7-diacetoxi, como o observado para o Oncidinol 1, foi realizado um experimento de TOCSY-1D. O hidrogênio H-3 foi excitado, por aplicação de um tempo otimizado de mistura de 100 ms, assim, os hidrogênios δ_H 4,84 (H-7) 2,53 (H-2), 2,58 (H-2), 1,61 (H-4), 1,53 (H-6), 1,38 (H-5) e 1,25 (H-5) do sistema spin de H-2 a H-7 foram visualizados. O segundo experimento de TOCSY-1D excitou o hidrogênio H-7 sendo observados os sinais em δ_H 5,20 (H-3), 2,53 (H-2), 2,58(H-2), 1,61(H-4), 1,53 (H-6), 1,38 (H-5), 1,25 (H-5, H-8, H-9, H-10).

O espectro de massas de alta resolução de **52** forneceu íon molecular M^+ 470,360 que é condizente com a fórmula molecular $C_{27}H_{50}O_6$ (calculado 470,360). Desta forma foi sugerido que o composto majoritário do óleo floral de *Byrsonima intermedia* é o ácido 3,7-diacetoxi-docosanóico **51**, sendo este um novo derivado de ácido graxo nomeado de ácido birsônico.



52

Figura 69. Atribuição total dos hidrogênios e carbonos de **52** obtidos através de RMN 1D e 2D (homonuclear de 1H , 1H e heteronuclear de 1H , ^{13}C HSQC e HMBC).

Tabela 12. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS), ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), COSY, HSQC e HMBC para o Ácido Birsônico

C#	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)	HMBC
1'	51,75	3,68 (s, 3H)	
1	170,36		
2	38,89	2,53 (dd, $J=5,5$ and 15,6 Hz, 1H) 2,58 (dd, $J=7,6$ and 15,6 Hz, 1H)	C1, C3, C4
3	70,18	5,20 (m, 1H)	C1, C5
4	33,70	1,61 (m)	C3, C5, C2
5	20,92	1,38 (m, 1H) 1,25 (m, 1H)	C4, C6
6	33,75	1,53 (m, 2H)	C7
7	73,89	4,84 (m, 1H)	$\text{COCH}_3\text{-C7}$
8	34,04	1,53 (m, 2H)	C7
9	25,25	1,25 (m)	
10	29,32	1,25 (m)	
11	29,42	1,25 (m)	
12 e 13	29,64	1,25 (m)	
14 e 15	29,62	1,25 (m)	
16 e 17	29,61	1,25 (m)	
18	29,53	1,25 (m)	
19	29,48	1,25 (m)	
20	31,87	1,25 (m)	
21	22,64	1,25 (m)	
22	14,07	0,87 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H)	
$\text{COCH}_3\text{-C3}$	170,76		
$\text{COCH}_3\text{-C3}$	21,16	2,04 (s, 3H)	
$\text{COCH}_3\text{-C7}$	170,89		
$\text{COCH}_3\text{-C7}$	21,02	2,03 (s, 3H)	

3.4.1 Determinação da configuração absoluta do ácido birsónico

Foi observado que a estrutura plana do ácido birsónico é igual à de ácidos graxos que esterificam diacilgliceróis de várias espécies de Oncidiinae. Suspeitamos a princípio que as configurações destes dois ácidos (originados de Malpighiaceae e Oncidiinae) pudessem ser diferentes e isto poderia levar as abelhas preferirem flores de Malpighiaceae.

Para investigar esta hipótese foi determinada a configuração absoluta do ácido birsónico utilizando a mesma metodologia descrita para o Oncidinol. Assim, o ácido foi hidrolizado em meio básico levando ao ácido 3,7-diidróxi-docosanóico que foi em seguida metilado com diazometano e purificado em coluna de sílica gel eluído com hexano/acetato (1:1) levando ao 3,7-diidróxi-docosanoato de metila **53**, com rendimento de 46 %. Foram preparados os quatro ésteres de Mosher e foi observado que estes ésteres apresentam os deslocamentos similares (Tabela 13, Figura 70 a Figura 75) aos encontrados para o derivado de Oncidinol **1**. Assim, o ácido birsónico apresenta a configuração (3*R*, 7*R*) igual à observada para porção do ácido graxo dos diacilgliceróis **1** e **11**. Logo o derivado de ácido graxo de *B. intermedia* é o ácido (3*R*, 7*R*)-3,7-diacetoxi-docosanóico.

Tabela 13. Atribuição parcial dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS^a) para os ésteres de Mosher do ácido birsônico diagnósticos para determinação da configuração absoluta.

Hidrogênio	δ_{H}		$\Delta\delta_{S-R}$	δ_{H}		$\Delta\delta_{S-R}$
	54a	54b		55a	55b	
CH_3O	3,72	3,72	0,00	3,59	3,66	- 0,07
2	2,34	2,39	- 0,05	2,44	2,55	- 0,11
	2,42	2,48	- 0,04	2,54	2,67	- 0,13
3	3,89	3,97	- 0,08	5,34	5,42	- 0,08
7	5,09	5,09	0,00	5,03	4,96	+ 0,07

^aDeslocamentos químicos referenciados para o TMS (δ 0,00)

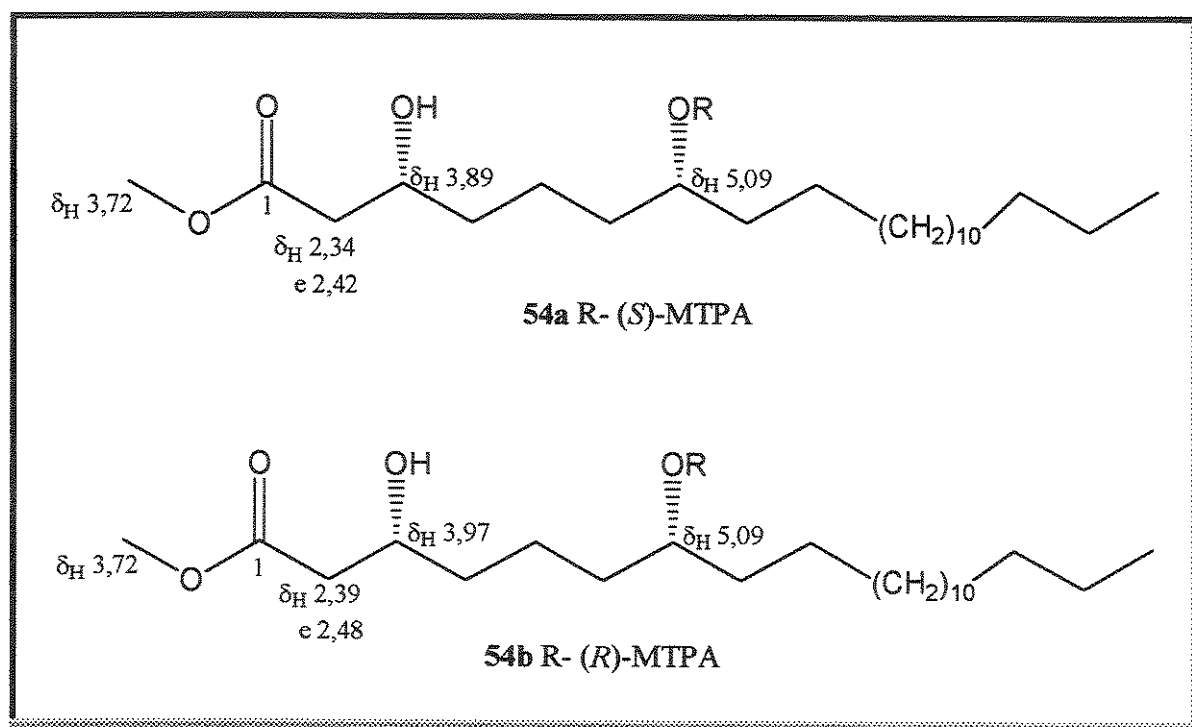


Figura 70. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração dos ésteres de Mosher **54a** e **54b**.

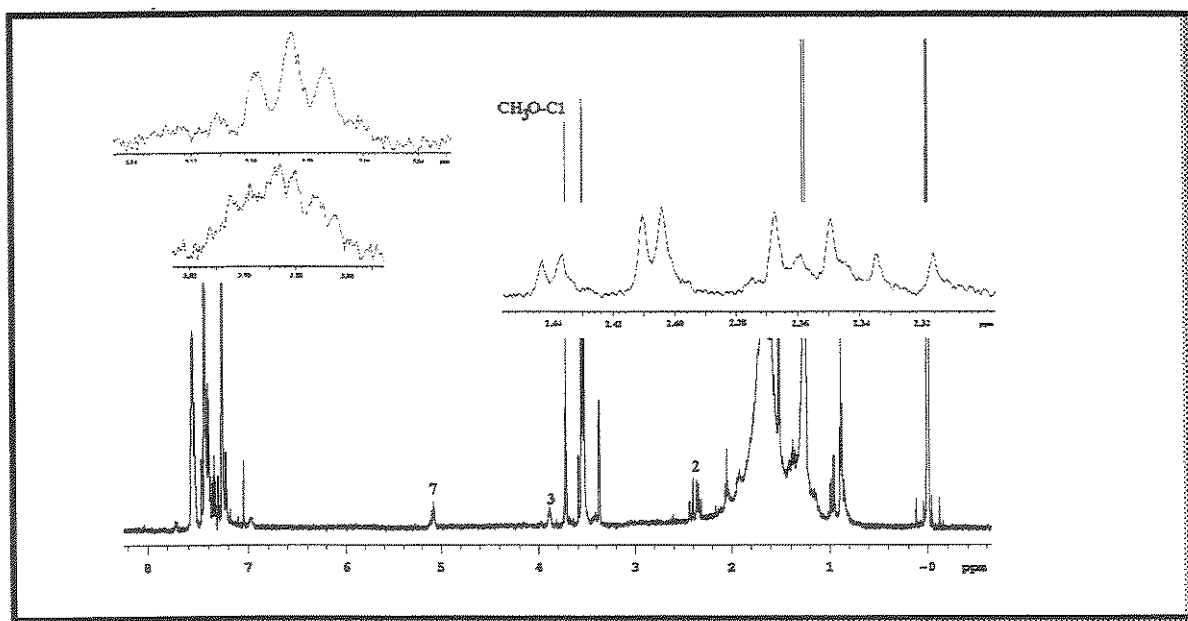


Figura 71. Espectro e expansões de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 54a.

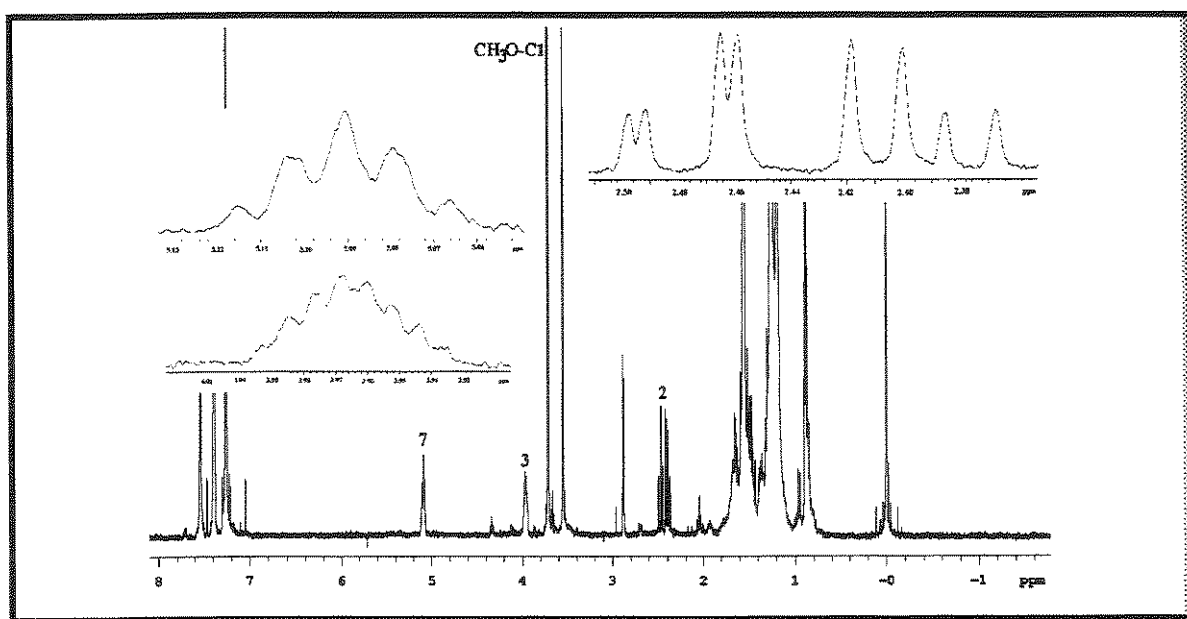


Figura 72. Espectro e expansões de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 54b.

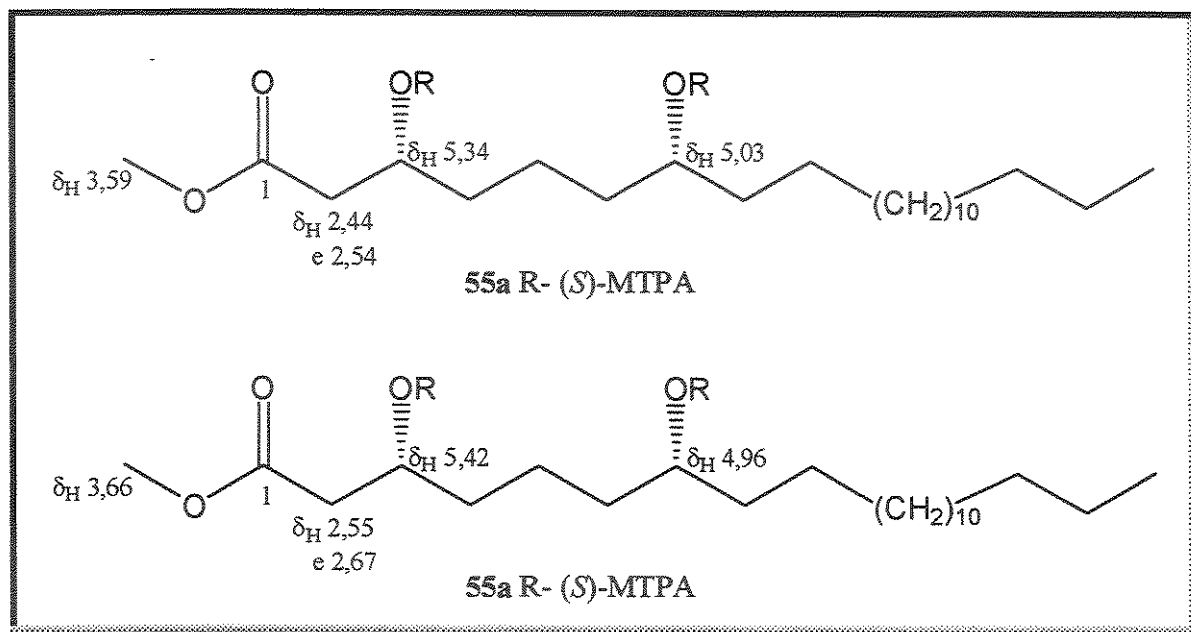


Figura 73. Deslocamentos dos sinais de RMN de ^1H diagnósticos para a determinação da configuração dos ésteres de Mosher **55a** e **55b**.

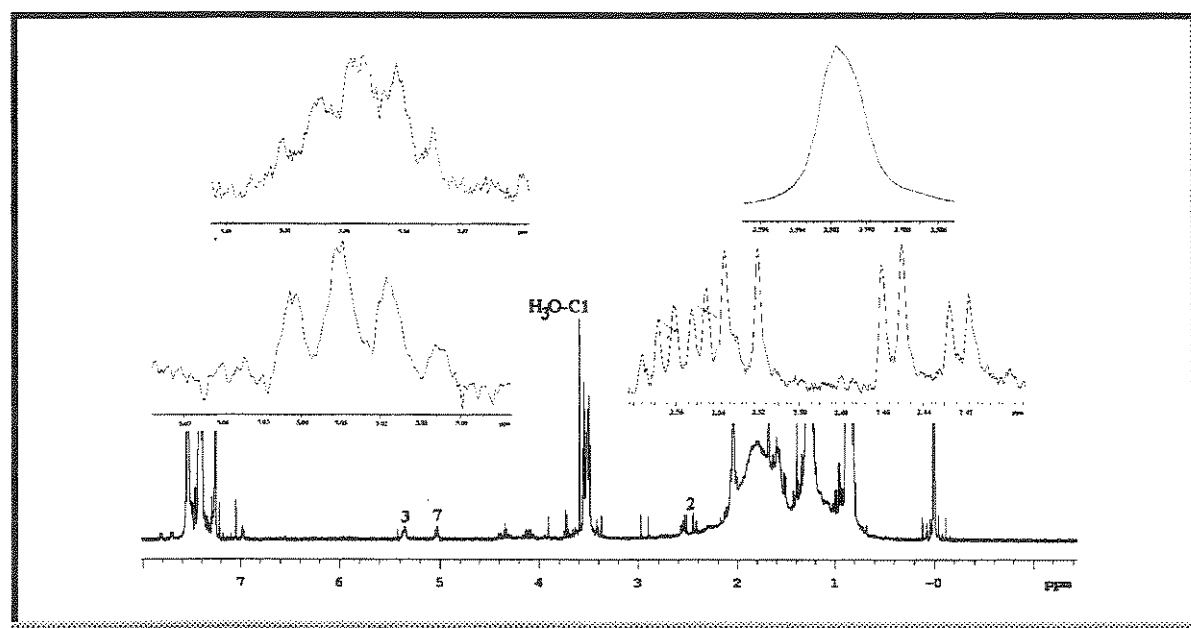


Figura 74. Espectro e expansões de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto **55a**.

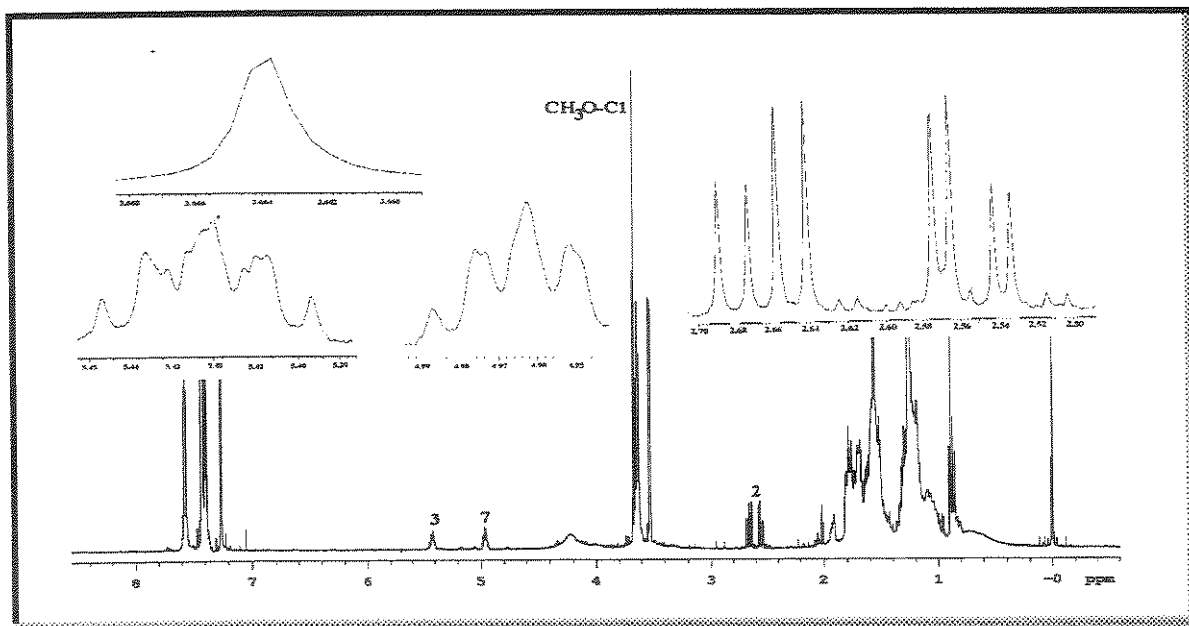


Figura 75. Espectro e expansões de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 55b.

A interação entre Oncidiinae e Malpighiaceae atrai a atenção de pesquisadores desde 1974. No presente trabalho, foi observado que o óleo floral de *B. intermedia* (Malpighiaceae) é composto por ácidos graxos livres com a mesma substituição e configuração dos ácidos graxos que esterificam os diacilgliceróis de Oncidiinae e isto sugere que o mimetismo entre estas espécies não é apenas na forma física, mas também químico. Devido à família Orchidaceae ser considerada uma das famílias de plantas mais evoluída sugere-se que ela mimetize a família Malpighiaceae, no entanto, ainda não existem estudos que comprovem esta teoria de evolução.

A composição química identificada para o de *B. intermedia* é diferente daquela descrita para o óleo floral de *Byrsonima classifolia*⁷⁴, estudada na Costa Rica, e analisado por cromatografia gasosa. Os autores sugerem que os

⁷⁴ Vinson, S. B., Williams, H. J., Frankie, G. W., Shrum, G. 1997, 29, 76.

óleos florais de onze plantas desta espécie, das quatorze investigadas, são constituídos, principalmente, por monoacilgliceróis derivados de ácido graxos saturados e insaturados, sendo os derivados saturados mais abundantes. As demais plantas investigadas, em um total de três, apresentaram como compostos majoritários, substâncias não identificadas, com polaridade superior aos dos monoacilgliceróis. Entretanto, em uma colaboração realizada pelo nosso grupo de pesquisa para a análise do óleo floral de *B. classifolia* do Panamá foi observado que este óleo é composto, principalmente, pelo ácido birsônico da mesma forma que *B. intermedia*. Assim, acreditamos que este possa ser o composto polar do óleo floral das três espécies de *B. classifolia* da Costa Rica não identificado por Vinson. Um fato que nos chamou atenção no estudo de Vinson, além da diferença entre a composição em diferentes plantas, foi que os monoacilgliceróis são derivados de ácidos graxos saturados e insaturados ao invés de ácidos graxos substituídos como o ácido birsônico. Em nossos estudos com diacilgliceróis de *Oncidiinae* observamos que a hidrólise do diacilglicerol, 1-acetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)-glicerol, utilizando hidróxido de sódio levava a desidratação do álcool. A identificação dos ácidos que esterificam os monoacilgliceróis de *B. crassifolia* realizada por Vinson foi feita após a hidrólise utilizando KOH:MeOH a 60 °C o que provavelmente levaram também a produtos de desidratação e por sua vez a uma identificação equivocada da composição do seu óleo floral, no que diz respeito aos compostos insaturados.

3.5 Análise do ninho da abelha *Tetrapedia diversipes* Klung.

Avaliada a composição química dos óleos florais de diversas espécies de Oncidiinae e da espécie *Byrsonima intemedia* (Malpighiaceae) e continuando nossa investigação sobre interação entre Oncidiinae e Malpighiaceae foi realizado o estudo da composição química do ninho da abelha *Tetrapedia diversipes*.

A abelha *Tetrapedia diversipes* Klung, pertencente à família Anthophoridae e é classificada como abelha solitária. Nas espécies solitárias, cada fêmea, individualmente, constrói e cuida de seu próprio ninho. A abelha *T. diversipes* constrói seu ninho utilizando areia, pólen e óleos florais. Foi observada na casa de vegetação do Instituto de Biologia da Unicamp a coleta do óleo floral de *Oncidium cornigerum* por uma abelha *Tetrapedia* sp. (Figura 76) onde durante o processo de coleta houve a retirada dos polinários de suas flores, mostrando assim, que estas abelhas podem ser responsáveis pela polinização desta espécie (A. D. de Faria & R. Singer, com. pes.). Sigrist, observou a coleta de óleo floral por espécies do gênero *Tetrapedia* em flores da família Malpighiaceae. Segundo esta autora a coleta de óleo em Malpighiceae pode ser feita no botão ou na flor. Ao coletar óleo estas abelhas pousam diretamente sobre uma sépala, pétala ou órgãos sexuais dirigem-se aos elaióforos. Em seguida, iniciam a coleta dos óleos florais com os pentes basitarsais do primeiro par de pernas, coletando e transferindo o óleo para as escopas das pernas posteriores sem sair da flor ou do botão. Durante a coleta do óleo estas abelhas tocam os órgãos sexuais da flor recebendo o pólen no ventre e pernas, enquanto coletam o óleo podem tocar anteras ou estigmas

com o ventre abdominal e pernas posteriores ocorrendo desta forma o mecanismo de polinização.⁷⁵

O ninho desta abelha foi coletado, no campus da USP - São Paulo, próximo à árvore de *Byrsonima intermedia*, analisada neste trabalho, portanto esta planta pode ter sido uma fonte de óleo floral para a abelha *T. diversipes*.

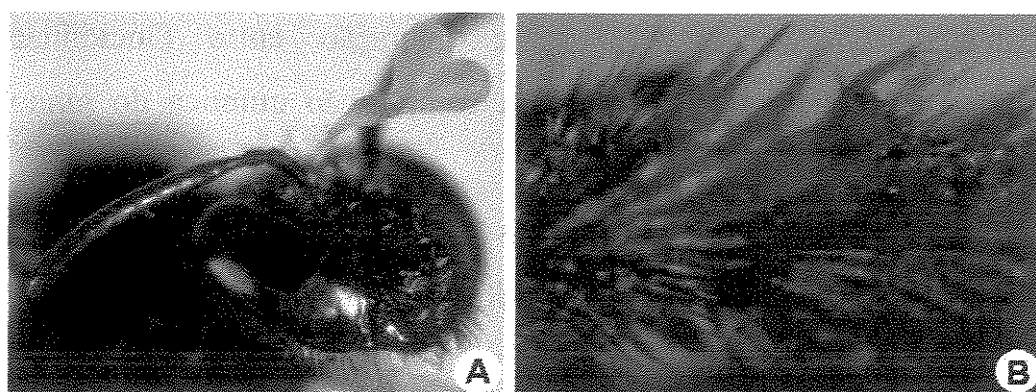


Figura 76. À esquerda- Abelha *Tetrapedia* sp com o polinário de *Oncidium cornigerum*. À direita – A perna da abelha *T. diversipes* com o óleo floral de *O. cornigerum*

O ninho da abelha *Tetrapedia diversipes* analisado neste trabalho foi coletado assim que a fêmea terminou de prepará-lo (no primeiro dia do ninho) pela Dra. Isabel Alves dos Santos. O ninho foi coletado no primeiro dia para obter toda a massa alimentar nele depositado, pois a larva se alimenta desta massa rapidamente (Santos, I. A. comunic. pessoal) (Figura 77).

⁷⁵ Sigrist, M. R. *Biologia reprodutiva de doze espécies simpátricas de Malpighiaceae* em matas semidecídua do sudeste brasileiro. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia-Universidade Estadual de Campinas, 2001.

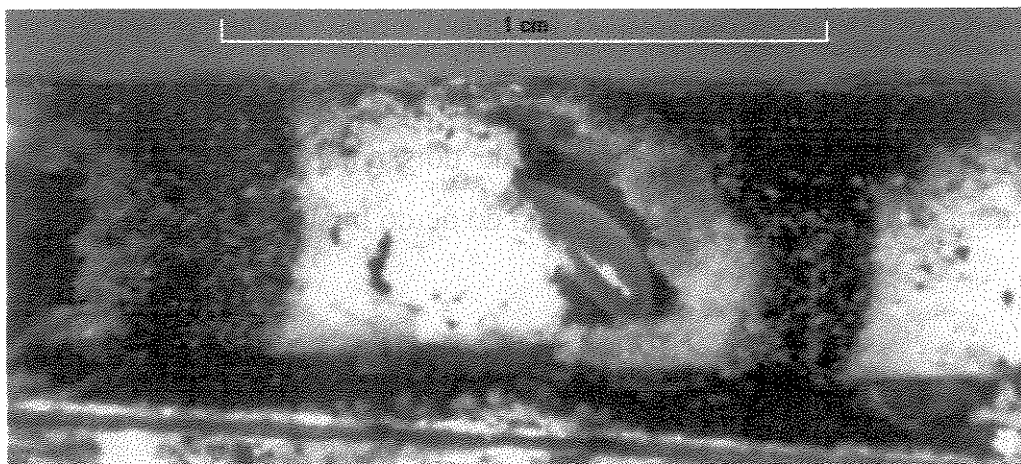
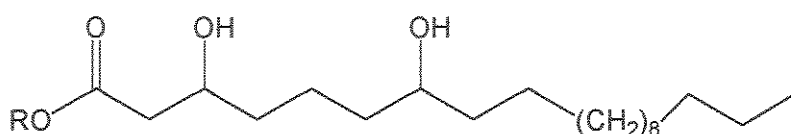
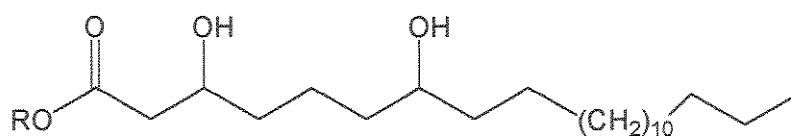


Figura 77. Ninho de *Tetrapedia diversipes*. Na parte central do ninho (parte mais clara) está a massa alimentar e envolto pela massa alimentar está a larva da abelha.⁷⁶



56 R=H

57 R=Me



58 R=H

59 R=Me

A massa alimentar foi extraída por extração a frio com metanol durante 72 horas. Em seguida, o extrato metanólico foi concentrado a vácuo em evaporador rotativo obtendo-se assim 34 mg de extrato da massa alimentar. A

⁷⁶ Alves-Dos-Santos, I., Melo, G. A. R., Rozen, J. G. 2002. *Amer. Museum Novitates*. 337:1-45.

fase metanólica foi metilada com diazometano e em seguida solubilizada em acetato de etila (3 mg) a fração solúvel em acetato foi analisada por CG/EM (Figura 76). Foi observada a presença de dois compostos majoritários que apresentam a fragmentação semelhante ao do ácido birsónico hidrolisado.

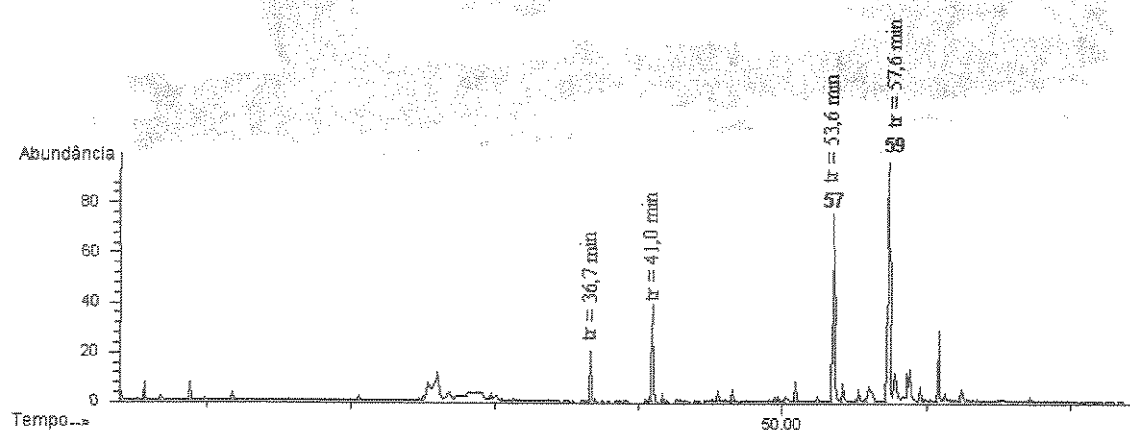


Figura 78. Cromatograma total de íons da fração lipídica da massa alimentar de *T. diversipes*. Condições da análise por CG/EM: coluna HP5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) temperaturas – forno - 50-290 $^{\circ}$ C, velocidade de aquecimento 4 $^{\circ}$ C.min $^{-1}$; injetor – 240 $^{\circ}$ C, tempo final (290 $^{\circ}$ C) – 15 min.

Tabela 14. Compostos identificados na massa alimentar do ninho da abelha *Tetrapedia diversipes*

TR (min)	Composto	Abundância relativa
36,7	Hexadecanoato de metila	7,8
41,0	Octadecatrienoato de metila	8,4
53,6	3,7-diidroxiieicosanoato de metila 57	19,9
57,6	3,7-diidroxidocosanoato de metila 58	32,7

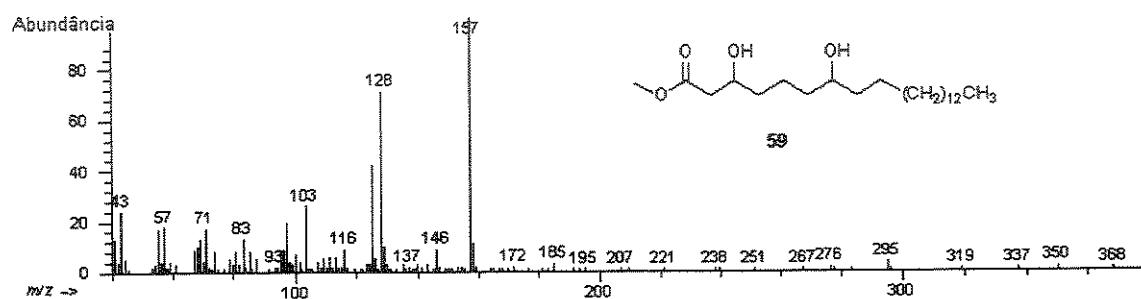
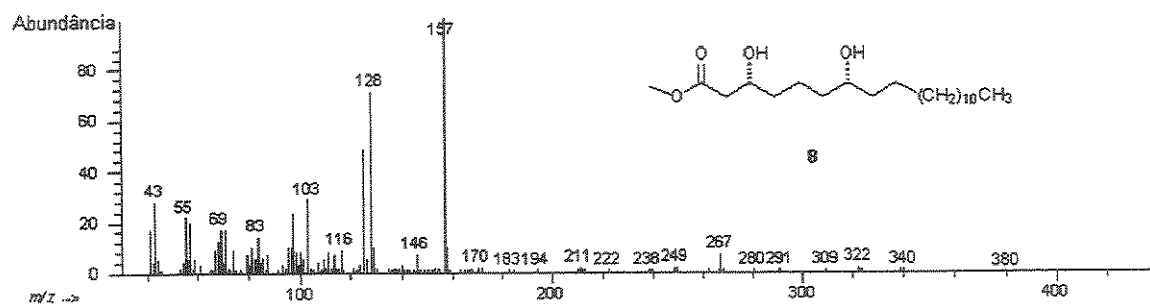
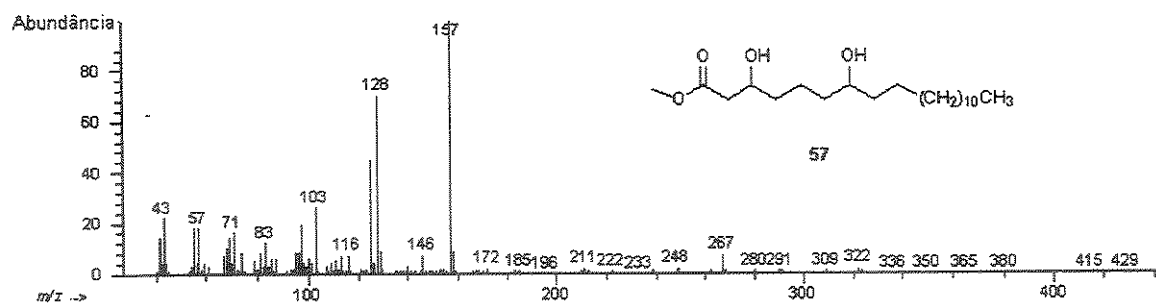


Figura 79. Espectro de massas (70eV) dos compostos **57** (3,7- dihidroxi -eicosanoato de metila-Ninho), **8** ((3R,7R)-3,7- dihidroxi -eicosanoato de metila - Óleo floral de *Ornithophora radicans*), **59** (3,7- dihidroxi -docosanoato de metila-Ninho) e **53**((3R,7R)-3,7- dihidroxi -docosanoato de metila - Óleo floral de *Byrsonima intermedia*), respectivamente.

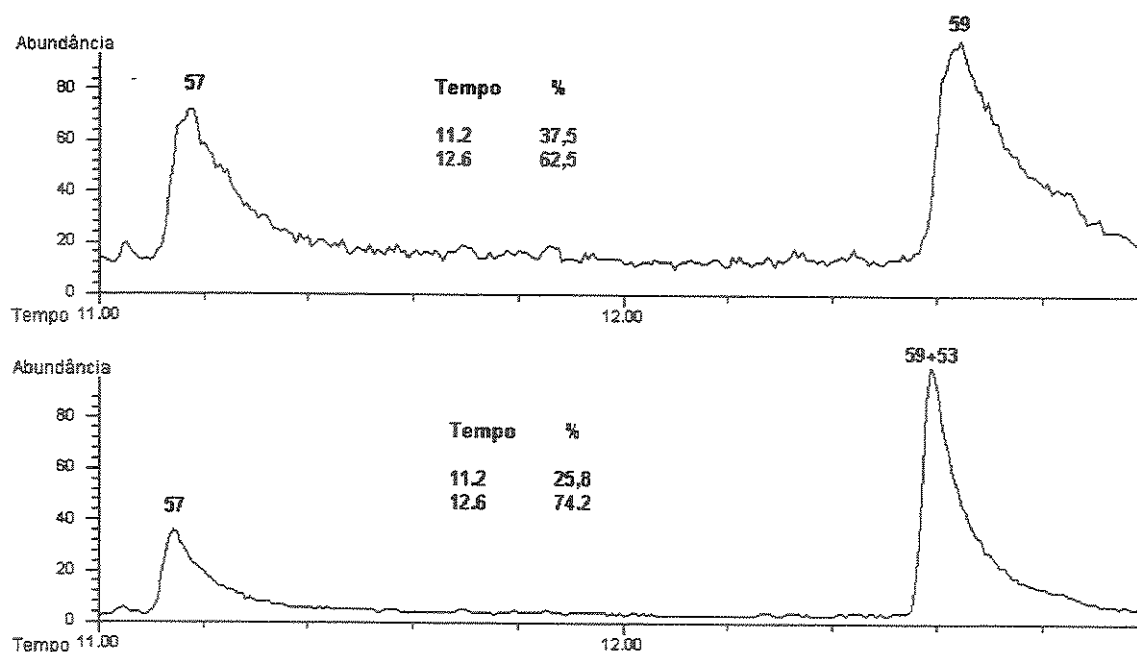


Figura 80. Coinjeção da fração lipídica da massa alimentar do ninho de *T. diversipes* com o ácido birsônico hidrolisado e metilado 53. O cromatograma acima é da massa alimentar do ninho sem padrão e o cromatograma abaixo é do ninho com reforço do padrão 53. Onde o composto com tempo de retenção em 11.2 min corresponde ao composto 57 (3,7-diidroxi-eicosanoato de metila) e o composto com tempo de retenção de 12.6 min corresponde ao 59 (3,7- diidroxi-docosanoato de metila). Condições da análise por CG/EM: coluna HP5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) temperaturas – forno - 100-290 $^{\circ}$ C, velocidade de aquecimento 10 $^{\circ}$ C.min $^{-1}$; injetor – 240 $^{\circ}$ C,

Desta forma, foi realizada a coinjeção do derivado hidrolisado e metilado do ácido birsônico 53 com a fração lipídica do ninho. O composto com tempo de retenção de 11,2 min corresponde ao 57 e o composto com tempo de retenção de 12,6 min corresponde ao 59. As abundâncias relativas destes dois compostos, antes e depois da coinjeção respectivamente, revelam a adição do padrão 53 devido ao aumento da área do seu pico correspondente ao composto 59 em relação ao 57 (Figura 80).

Para confirmar que estrutura encontrada no ninho se tratava do ácido birsônico hidrolisado o extrato lipídico metilado (3,0 mg) foi purificado em

coluna cromatográfica de sílica gel levando a 1 mg de uma mistura de composto contendo os compostos **57** e **59** que foram analisados por RMN de ^1H e de ^{13}C (Figura 81, Figura 82, Figura 83 e Figura 84). Foi observado que estes compostos apresentam os mesmos deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C encontrado para o ácido birsônico hidrolisado **53**.

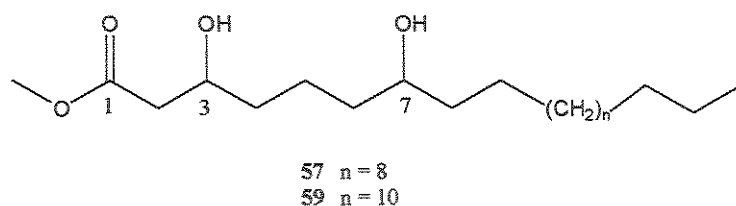


Tabela 15. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ -TMS), e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ - CDCl_3), para os compostos **57** e **59**

C#	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)
CH_3O	51,82	3,78 (s, 3H)
1	173,23	
2	41,13	2,53 (dd, J=3,30 and 16,48, 1H) 2,42 (dd, J=8,79 and 16,48, 1H)
3	67,86	4,02 (m, 1H)
4	36,22	1,47 (m)
5	21,46	1,47 (m)
6	37,52	1,47 (m)
7	71,80	3,59 (m)
8	37,09	1,47 (m)
9	25,65	1,25 (m)
10	29,35	1,25 (m)
11-17 ^a	29,68	1,25 (m)

18 ^a	31,91	1,25 (m)
19 ^a	22,68	1,25 (m)
20 ^a	14,12	0,87 (t, $J=7,0$ Hz, 3H)
<u>HOC-3</u>		2,97 (bs, 1H)
<u>HOC-7</u>		2,04 (bs, 1H)

^a Para 57 são 11-18, 19, 20, 21 e 22 respectivamente.

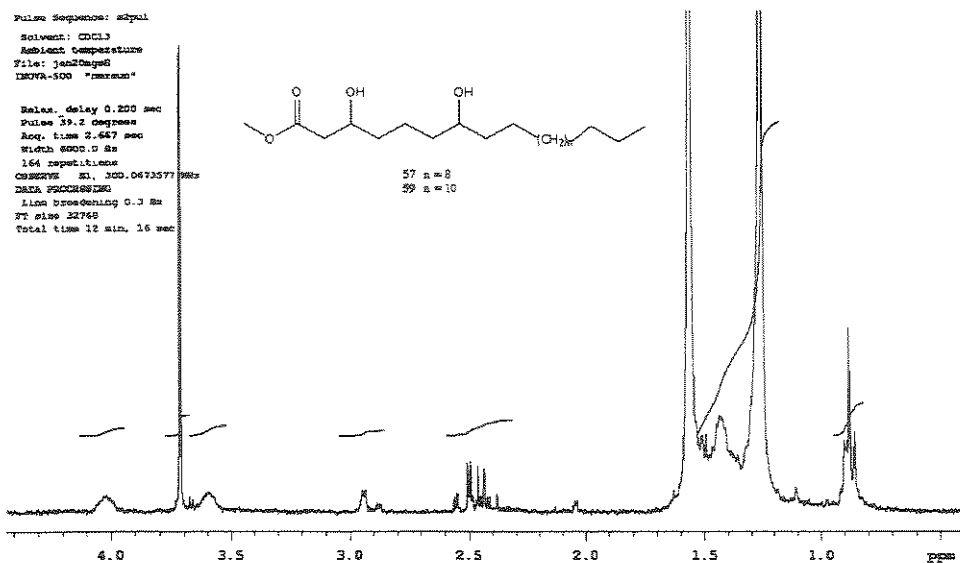


Figura 81. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) dos compostos 3,7-diidroxi-eicosanoato de metila 57 e 3,7-diidroxi-docosanoato de metila 59.

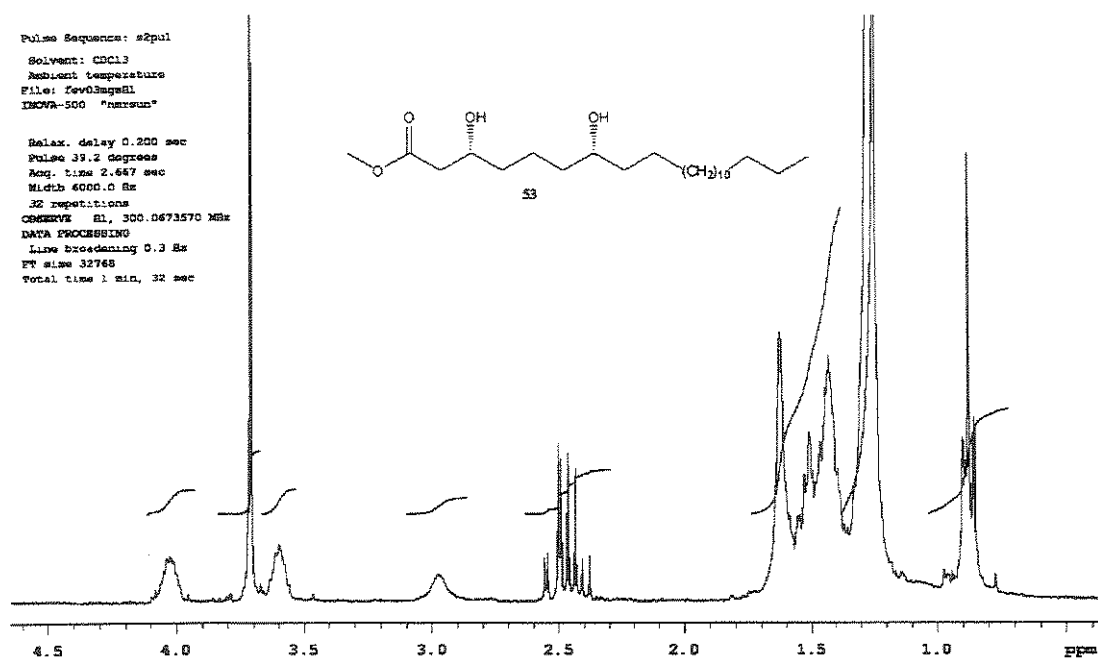


Figura 82. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto (3*R*, 7*R*)-3,7-diidroxi-docosanoato de metila 53.

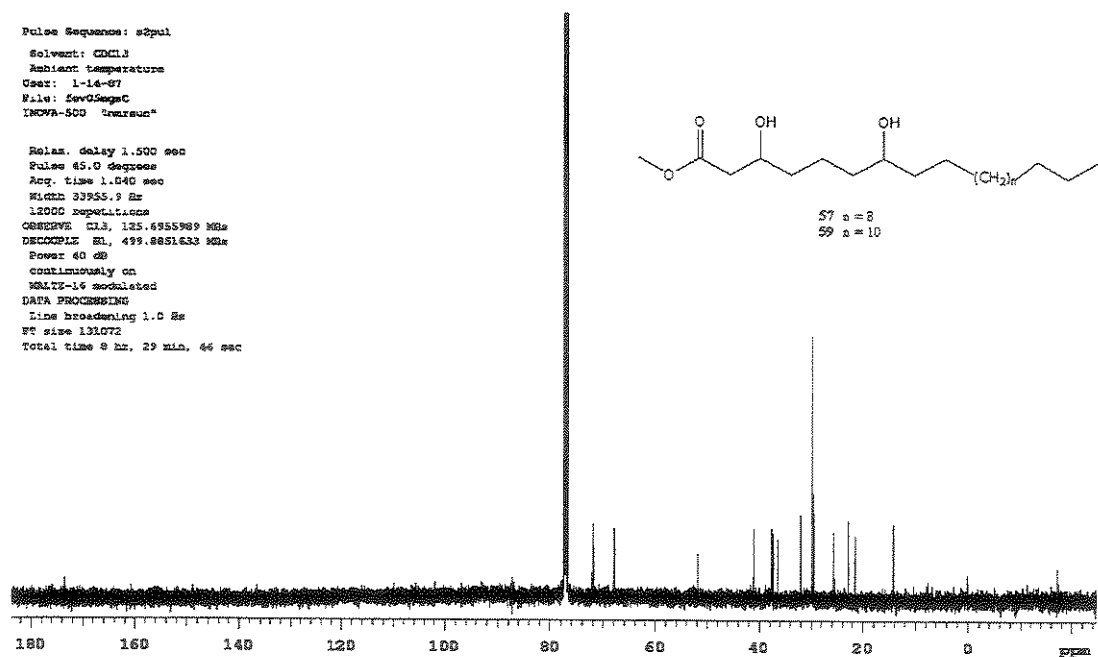


Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) dos compostos 3,7-diidroxi-eicosanoato de metila **57** e 3,7-diidroxi-docosanoato de metila **59**.

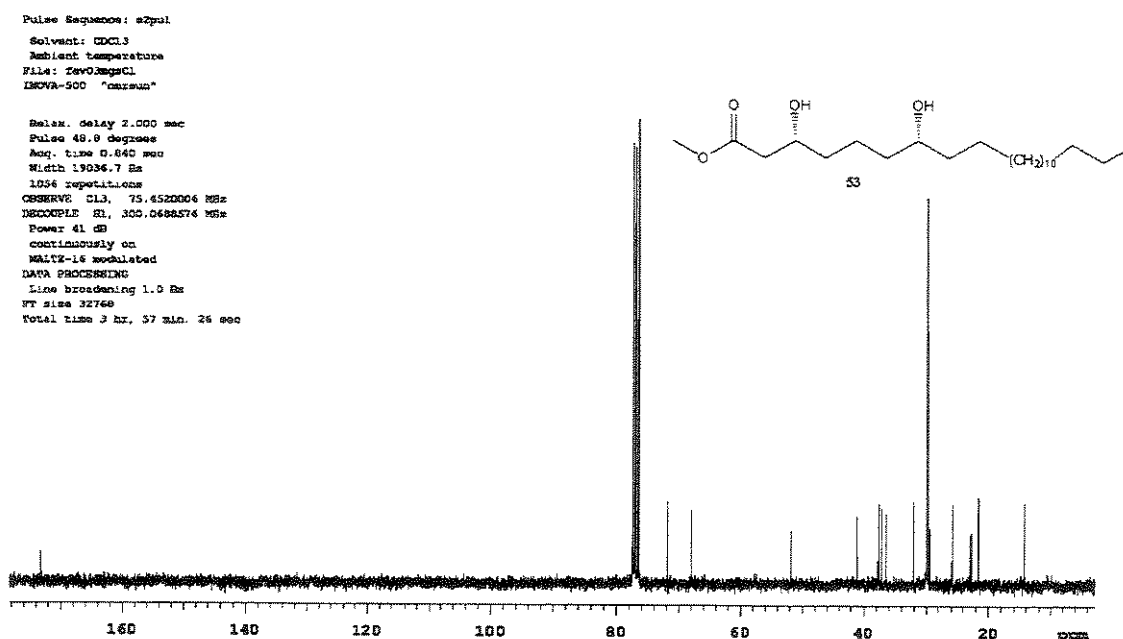


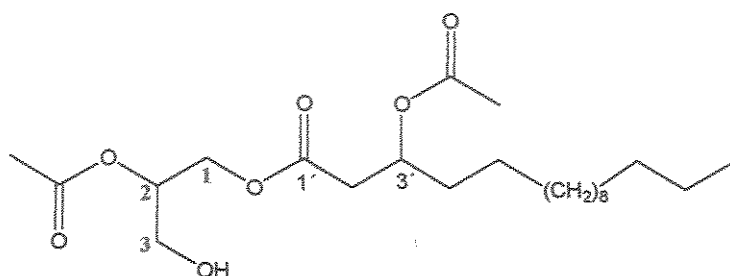
Figura 84. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto (3*R*, 7*R*)-3,7-diidroxi-docosanoato de metila **53**.

A pesquisa realizada até este ponto é bastante encorajadora pois é a primeira vez que se observa um paralelismo, no nível molecular, entre os óleos florais de Oncidiinae e Malpighiaceae e mais ainda, um paralelismo entre estes óleos e o ninho de uma abelha Anthophoridae. Parece pois que as abelhas descobriram após milhões de anos de evolução que os ácidos graxos dos diacilgliceróis de Oncidiinae e os ácidos graxos de Malpighiaceae apresentam o mesmo padrão de substituição 3,7 e que o uso de hidrolases, mandibulares permitiriam a produção dos ácidos 56 e 58, cuja função para nós é uma incógnita mas para elas parece vital.

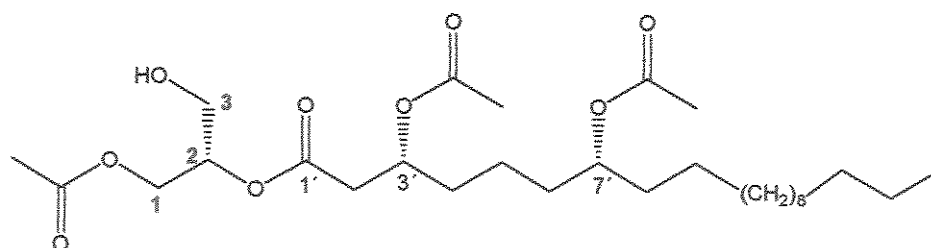
3.6 Óleo floral de *Calceolaria x herbeohybrida* Voss

Foi observado que óleos florais de Malpighiaceae e Oncidiinae são constituídos dos mesmos derivados de ácidos graxos, e que estes podem ser modificados por abelhas coletoras de óleos florais.

Buscando a literatura, observamos que os diacilgliceróis descritos para *Calceolaria pavonii* apresentam uma das cadeias laterais derivada de um ácido de cadeia longa substituído na posição 3 por uma acetoxila.⁷⁷



A



Oncidinol

Entretanto, o diacilglicerol A, isolado por Vogel do óleo floral de *C. pavonii*, apresenta a cadeia derivada do ácido graxo localizado na posição 1 do glicerol sendo diferente dos diacilgliceróis encontrados nos óleos florais de

⁷⁷ Vogel, S. *Öblumen und ölsammelnde Bienen* Akad. Wissenschaften Mainz. Wiesbaden: Franz Steiner, 1974

Oncidiinae onde a cadeia derivada do ácido graxo está na posição 2 do glicerol, Oncidinol.

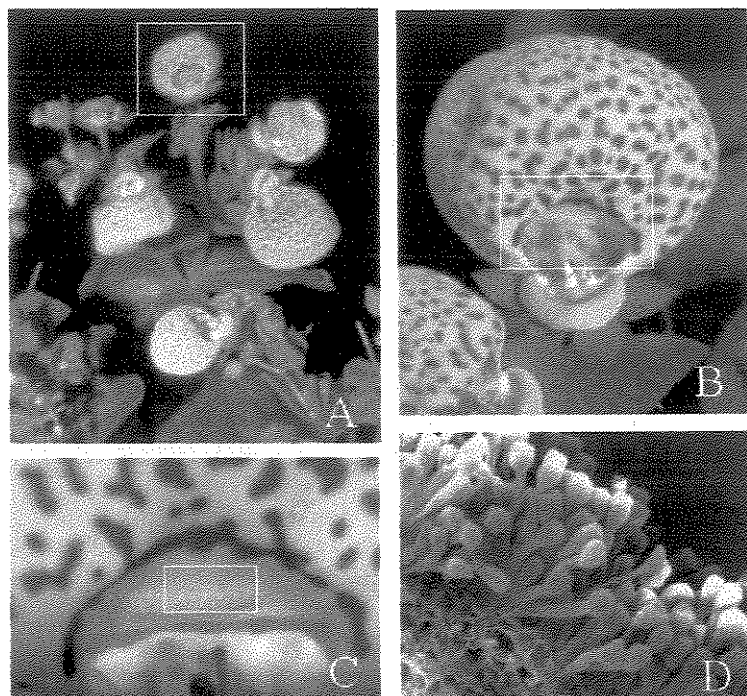


Figura 85. A- Planta de *Calceolaria herbeohybrida*. O retângulo representa a área expandida mostrada no quadro B. B- Flor de *Calceolaria x herbeohybrida*. O retângulo representa a área expandida mostrada no quadro C. C- Região onde se encontram os elaióforos tricômáticos de *C. x herbeohybrida*. O retângulo representa a região onde se encontram os elaióforos. D – Elaióforos tricômáticos de *Calceolaria tripartita*^{78,79}
As fotografias de *Calceolaria x herbeohybrida* foram gentilmente feitas e cedidas pelo Dr. Volker Brittrich e pela Dra. Maria do Carmo E. do Amaral.

Buscando investigar se este tipo de substituição, no diacilglicerol, é uma característica do gênero *Calceolaria*, e conseqüentemente da família Scrophulariaceae, que as diferenciam de Orchidaceae foi realizado um estudo

⁷⁸ Rasmussen, C. Olesen, J. M. *Oil flowers and oil-collecting bees*. Scandinavian Association for Pollination Ecology honours Knut Faegri. p. 23.

⁷⁹ Rasmussen, C. (1999). Coevolution of the oil bee-*Calceolaria* system in the Andes of Peru. *Master of Science Thesis, University of Århus, Denmark*, iv + 87 pp.
[www-u.life.uiuc.edu/~clausr/MSc%20thesis%20(1999).pdf]

da composição do óleo floral de *Calceolaria x herbeohybrida* (Figura 85) que é uma planta ornamental comumente vendida em floriculturas na cidade de Campinas.

Primeiro, o óleo floral foi coletado de 30 flores obtendo-se 0,2 mg de óleo que foi analisado por CG/EM (Figura 86).

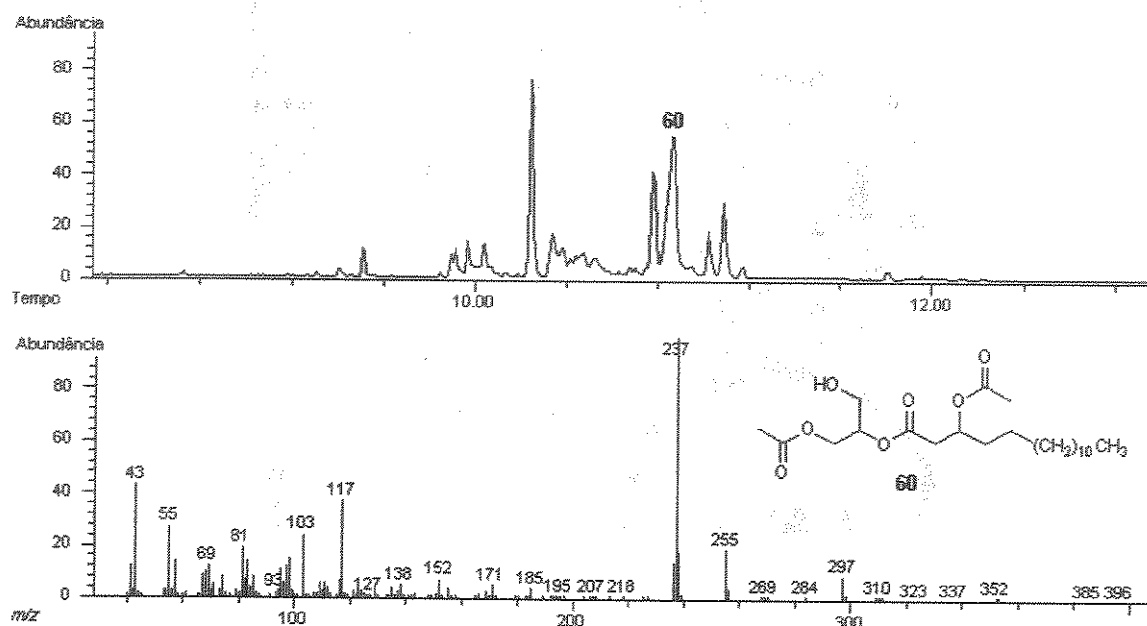
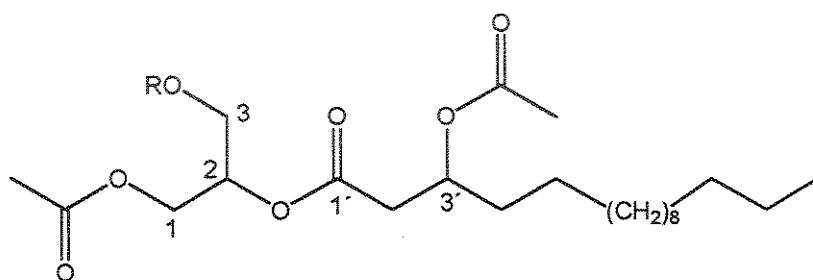


Figura 86. Acima. Cromatograma de total de íons do óleo floral de *C. xherbeohybrida* (programação de temperatura do forno – 50-290 °C com velocidade de 15 °C.min⁻¹) Abaixo. Espectro de massas do diacilglicerol **60** do óleo floral de *Calceolaria x herbeohybrida*

Esta análise revelou que o óleo floral de *Calceolaria x herbeohybrida* apresenta como componente majoritário de seu óleo floral um diacilglicerol cujo padrão de fragmentação é semelhante ao encontrado para o composto majoritário do óleo floral de *Zigostates lunata* (Oncidiinae). Sendo a principal diferença entre estes dois compostos a presença de menos 28 u nos fragmentos derivados da cadeia lateral do diacilglicerol de *Calceolaria x herbeohybrida* em relação ao de *Z. lunata*. Desta forma esta estrutura poderia ser a mesma

descrita anteriormente por Vogel, já que o espectro de massas não permite diferenciar a substituição no glicerol.

Para obter uma quantidade maior de óleos florais, para o isolamento e caracterização deste diacilglicerol por espectroscopia de RMN, foram compradas dez plantas desta espécie em uma floricultura no Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP em janeiro de 2004. O extrato floral (143 mg) foi obtido a partir de 87 g de flores recém coletadas. Deste extrato, 98 mg foram purificadas em coluna de sílica obtendo-se 6,1 mg de **60** e o restante do extrato bruto (45 mg) foi acetilado e após purificação foi obtido 1,1 mg do produto acetilado **61**.



60 R-H

61 R- COCH₃

Tabela 16. Atribuição dos dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3), ^{13}C (125 MHz) para o composto **60**, e RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para o composto acetilado **61**

	Composto 60		Composto 61
#	^{13}C	^1H	^1H
1'	170,9	-	-
2'	39,6	2,36 (m, 2H)	2,59 (m, 2H)
3'	70,7	5,21 (m, 1H)	5,20 (m, 1H)
4'	34,3	1,59 (m, 2H)	1,57 (sobreposto pelo sinal de H_2O)
5'	25,1	1,25 (m)	1,25 (m)
6'-7'	29,3	1,25 (m)	1,25 (m)
8' - 9'	29,4	1,25 (m)	1,25 (m)
10'-11'	29,6	1,25 (m)	1,25 (m)
12'-13'	29,5	1,25 (m)	1,25 (m)
14'	31,9	1,25 (m)	1,25 (m)
15'	22,7	1,25 (m)	1,25 (m)
16'	14,1	0,87 (t, J=6,22, 3H)	0,88 (t, J=5,9, 3H)
1	62,2	4,21 (dd, J=5,49, 12,0, 1H)	4,14 (m, 1H)
		4,29 (dd, J=4,39, 12,0, 1H)	4,28 (m, 1H)
2	72,8	5,07 (m, 1H)	5,26 (m, 1H)
3	61,3	3,73 (m, 2H)	4,14 (m, 1H)
			4,28 (m, 1H)
$\text{COCH}_3\text{-C1}$	170,9	-	-
$\text{COCH}_3\text{-C1}$	20,7	2,07 (s, 3H)	2,07 (s, 6 H, $\text{COCH}_3\text{-C1}$ e C-2)
$\text{COCH}_3\text{-C3'}$	170,1	-	-
$\text{COCH}_3\text{-C3'}$	21,1	2,05 (s, 3H)	2,03 (s, 3H)

O espectro de RMN de ^1H do composto natural **60** revelou a presença dos sinais em: δ 3,73 (m, 2H, H-3), 4,21 (dd, J=5,5, 12,0, 1H, H-1a), 4,29 (dd, J=4,4, 12,0, 1H, H-1b) e 5,07 (m, 1H, H-2), característicos de 1,2-

diacilgliceróis. O sinal em δ 5,21 integrando para um hidrogênio foi atribuído ao metino H-3. O sinal em 2,36 foi atribuído ao metileno H-2 que está entre a carbonila C-1 e o grupo metino em C-3. Os singletos em δ 2,05 e 2,07 foram atribuídos aos dois grupos acetatos que estão ligados ao metinos da cadeia lateral e da porção do glicerol, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C e DEPT (90 e 120) revelou a presença de 18 linhas sendo 5 linhas correspondentes cada uma a dois carbonos isócronos. Assim, o espectro de carbono sugere a presença de 23 carbonos nesta molécula, sendo 3 metilas, 15 metilenos, destes 2 estão ligados a heteroátomos, dois metinos ligados a heteroátomos e três carbonilas sendo duas isócronas. Este espectro de RMN de ^{13}C é condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{47}\text{O}_7$ sugerida a partir do espectro de massas deste composto. Os sinais em δ 62,2, 72,8 e 61,3 foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-1, C-2 e C-3 da porção do glicerol. O segundo metino em δ 70,7 foi atribuído ao carbono C-3'. O metileno em 39,6 foi atribuído ao C-2'. O sinal em δ 14,1 foi atribuído a metila terminal da cadeia derivada do ácido graxo. Os sinais em 20,7 e 21,1 foram atribuídos as metilas dos grupos acetílicos.

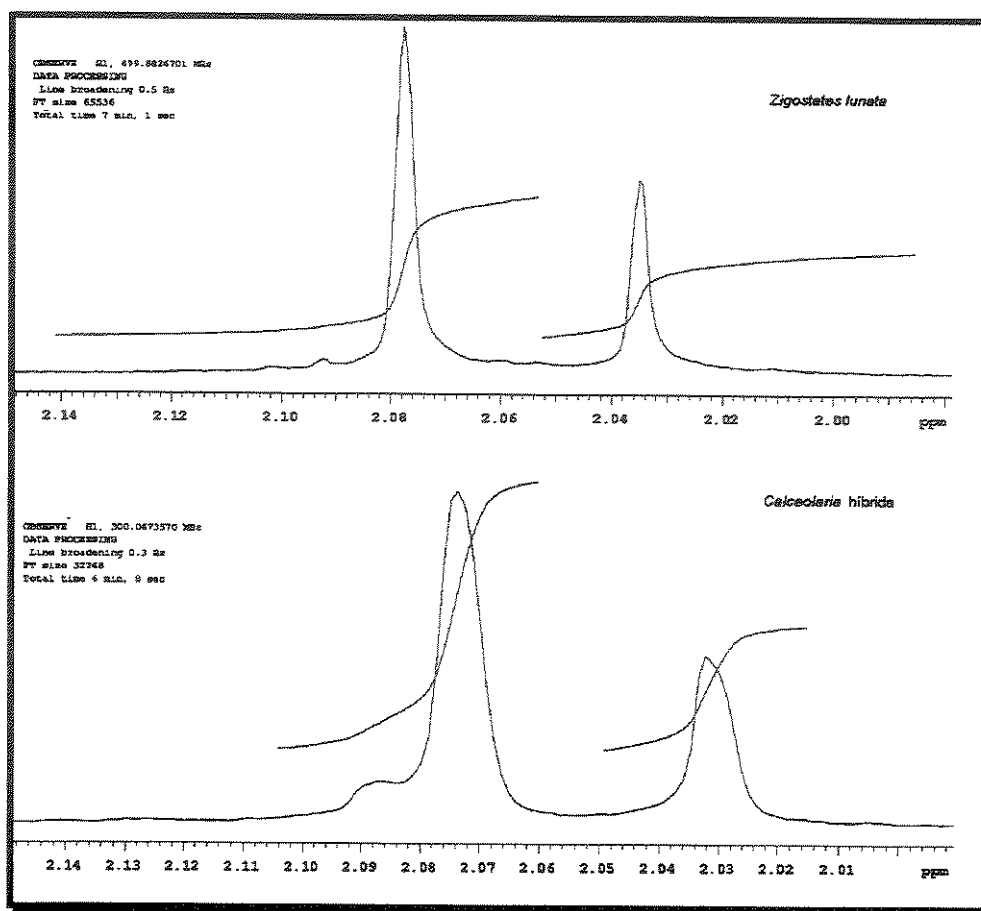


Figura 87. Expansão da região do espectro de RMN de ^1H onde é observada as metilas dos grupos acetílicos da porção do glicerol dos compostos **18** e **61**, de *Zigostates lunata* (observado em um equipamento de 500 MHz) e *Calceolaria x herbeohybrida* (observado em um equipamento de 300 MHz), respectivamente.

O derivado acetilado **61** foi utilizado para determinar a substituição na porção do glicerol, da mesma forma que já foi discutido para o composto **11** do óleo floral de *Oncidium pubes*. O espectro de RMN de ^1H apresentou um singlete em δ 2,07 integrando para seis hidrogênios característico de metilas de grupos acetílicos da porção do glicerol de 1,3-diacetil-2-acil-gliceróis. Sendo este espectro idêntico ao do composto **18** do óleo floral de *Zigostates lunata* (Figura 87).

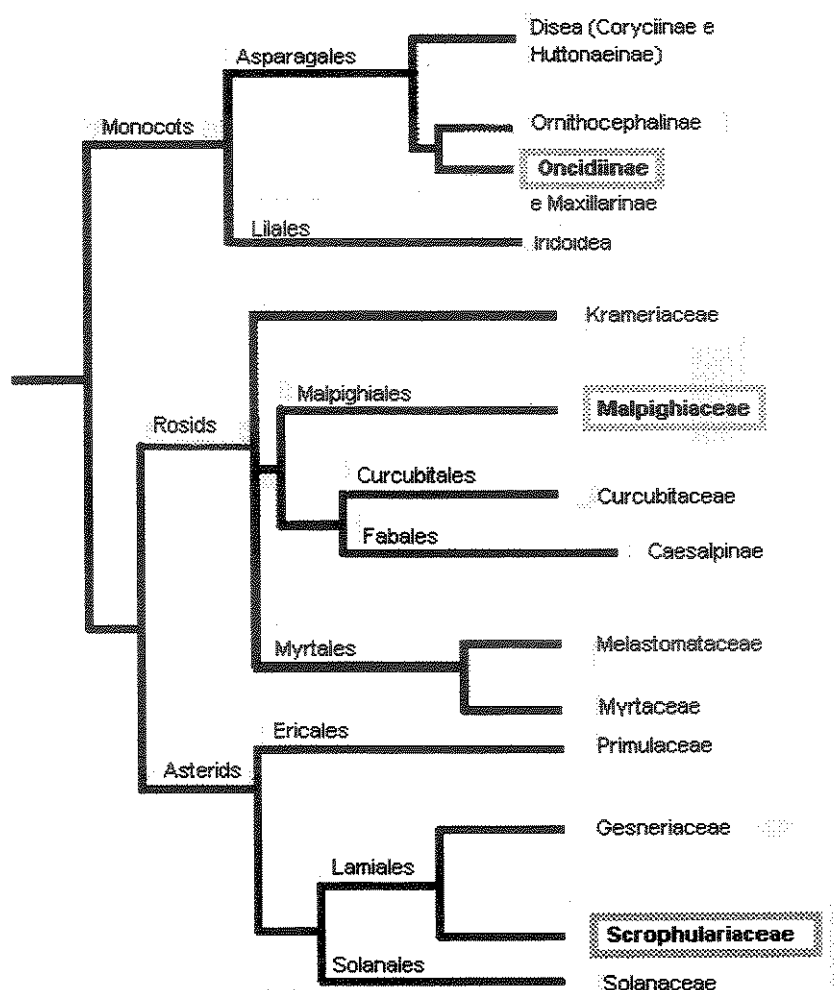


Figura 88. Filogenia de plantas produtoras de óleos florais baseados em caracteres de DNA (modificada do trabalho Filogenia das Angiospermas⁸⁰ por Claus⁷⁸). Grupos em destaque foram estudadas no presente trabalho.

Conseqüentemente, o diacilglicerol de *Calceolaria x herbeohybrida* apresenta a mesma substituição característica de espécies de *Oncidiinae*. Desta forma, esta especificidade estrutural ocorre simultaneamente em famílias (*Orchidaceae* e *Scrophulariaceae*) pouco correlacionadas

⁸⁰ Grupo Filogenia das Angiospermas. 1998, A ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 531-553.

filogeneticamente (Figura 88). Portanto, além dos elaióforos, os diacilgliceróis se desenvolveram paralelamente em diferentes famílias e isto sugere a importância destas estruturas na vida destas plantas e de suas abelhas polinizadoras.

É possível que a estrutura A descrita por Vogel esteja equivocada, já que não é possível determinar a substituição do glicerol do composto A por RMN de ^1H . No entanto, isto só poderá ser confirmado, ou não, através de uma nova análise do óleo floral de *Calceolaria pavonii*.

3.7 Estudos sintéticos visando a obtenção de diacilgliceróis

Consideramos um desafio sintetizar os diacilgliceróis florais. Estes padrões sintéticos são de grande interesse para nosso grupo de pesquisa em futuros estudos biológicos que avaliem, por exemplo, reações de hidrólise pelo sistema enzimático das abelhas coletoras de óleos florais.

É importante ressaltar que em ensaios biológicos os compostos quirais devem ter seus excessos enantioméricos estabelecidos e relacionados com as respostas biológicas. Para tanto é necessário ter em mãos não somente uma metodologia sintética flexível para obtenção enantiosseletiva destes compostos mas também estabelecer os métodos e condições para observar os enantiômeros separadamente ou seja discriminá-los para obter os excessos enantioméricos dos produtos naturais e sintéticos.

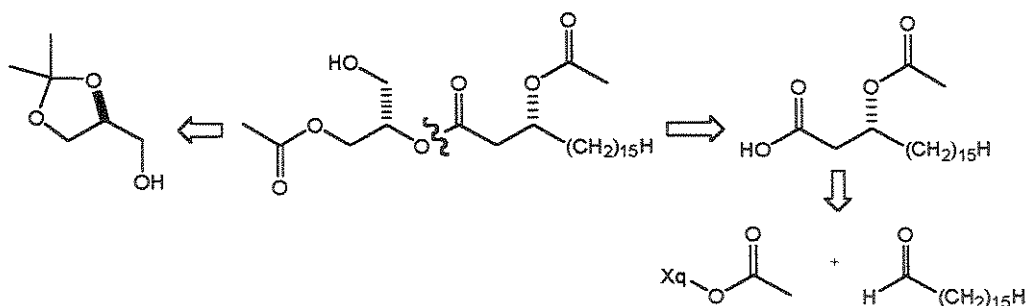
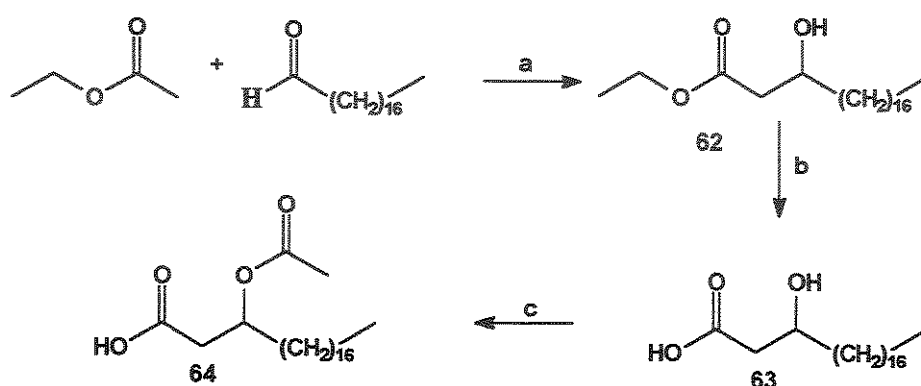


Figura 89. Análise retrossintética de um diacilglicerol da série homóloga C encontrado no óleo floral de *Zigostates lunata* e *Calceolaria* híbrida

3.7.1 Estudos visando a obtenção de ácido 3-acetoxi-racêmico

Com o intuito de avaliar metodologias para discriminação enantiomérica de ácidos 3-hidroxi-alcanóicos, foi realizada a síntese racêmica do ácido 3-hidroxi-eicosanóico.



Esquema 2. Síntese do ácido 3-acetoxi-eicosanóico

Legenda: a. LDA/THF, -78°C, 2h, 0°C (73%) b. LiOH.H₂O/THF/MeOH/H₂O. 0°C, 1h, HCl, 0,1 M, pH=7 (95%). c Anidrido acético/ piridina 30min, ta (96%)

A reação aldólica é um método clássico para sintetizar moléculas 1,3-oxigenadas. Neste trabalho foi utilizado o diisopropilamido de lítio que é uma base forte, não nucleofílica que diminui a formação de produtos de eliminação. O produto 62 foi obtido com rendimento de 73 %.

O método de hidrólise básica descrito por Nicolau⁸¹ que utiliza hidróxido de lítio e uma mistura de solventes (THF/MeOH/H₂O) revelou ser

⁸¹ Nicolau, K. C.; Webber, S. E. *Journal European Organic Chemistry*. 1983, 453.

muito eficiente para a obtenção do ácido 3-hidróxi-eicosanóico **63** com rendimento de 95 %.

O espectro de RMN de ^1H do composto **63** apresentou sinais intensos e largos em δ 1,25 característicos dos vários grupos metilênicos existentes na cadeia, na região δ 2,38 e δ 2,49 foi observado dois duplos dubletos atribuídos aos hidrogênios H-2 e um multipletos em δ 4,00 atribuído ao hidrogênio H-3.

A acetilação da hidroxila do ácido 3-hidróxi-eicosanóico utilizando anidrido acético e piridina foi eficiente obtendo-se o ácido 3-acetoxi-eicosanóico com rendimento de 96 % ⁶⁴.

O espectro de RMN de ^1H do composto **64** apresentou sinal intenso e largo em δ 1,25 característicos dos vários grupos metilênicos existentes na cadeia, um singlete em δ 2,04 atribuído à metila do grupo acetoxilíco. Nas regiões de δ 2,61 e 5,20 foram observados dois multipletos atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-3 respectivamente.

3.7.1.1 Método para a determinação de excessos enantioméricos de ácidos 3-hidróxi carboxílicos.

Metodologias como as cromatografias gasosas e líquidas equipadas com colunas quirais podem ser utilizadas para separação de enantiômeros. Neste caso, foi avaliada a separação destes enantiômeros por cromatografia gasosa utilizando a coluna Chrompack[®]. No entanto, não foi observada a separação dos enantiômeros. A segunda metodologia avaliada, é uma nova metodologia de separação de enantiômeros utilizando complexos de calix[6]areno que foi desenvolvida pelo doutorando Ms. Sergio Antonio Fernandes integrante de nosso grupo de pesquisa. Neste trabalho foram utilizados o calix[6]areno e um

composto quiral como seletor quiral e os compostos: 3-hidróxi-eicosanoato de etila **62**, ácido 3-hidróxi-eicosanóico **63**, e do ácido 3-acetoxi-eicosanóico **64**.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 90) do complexo calix/agente quiral/**64** foi observado a diferenciação dos enantiômeros pela duplicação dos sinais δ 1,989 e 1,995 dos hidrogênios diastereotópicos da metila do grupo acetílico do ácido 3-acetoxi-eicosanóico **64** não sendo observado nenhuma modificação na forma dos sinais do seletor quiral (calix[6]/agente quiral). No entanto, devido à sobreposição dos sinais das duas metilas este método precisa ser otimizado para obter melhores separações, e assim ser utilizado para determinar os excessos enantioméricos destes compostos. A mesma metodologia foi aplicada para os compostos **62** e **63** mas, nenhuma diferenciação nos sinais foi observada⁸². Os detalhes desta metodologia fazem parte da tese de doutorado do Ms. Sérgio Antônio Fernandes.

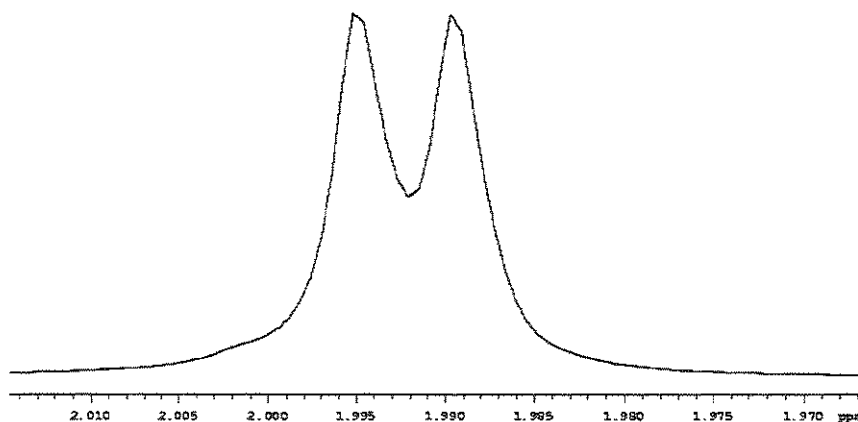
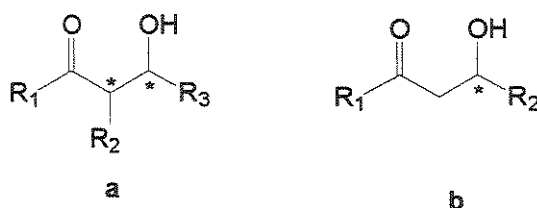


Figura 90. Espectro de RMN de ^1H (499, 885 MHz, CDCl_3 ; d_{TMS} 0,00) do sistema ternário calix[6]/agente quiral/($\pm$)-**3a** (1:1:1, 15 mmol L^{-1} , 25 °C).

⁸² Fernandes, S. A. 2005. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas

3.7.2 Estudos visando a obtenção enantiosseletiva de ácidos 3-hidróxi carboxílicos não substituídos na posição α .

Produtos de reação aldólica não substituídos na posição α são utilizados como bloco de construção para síntese de diversos compostos naturais. A adição aldólica assimétrica mediada por auxiliares quirais é uma das metodologias importantes e gerais para formação da ligação carbono-carbono. Esta metodologia tem se mostrado bastante eficiente para reações aldólicas do tipo propionato (a), no entanto baixas diasterosseletividades foram observadas em reações aldólicas do tipo acetato (b).⁸³ A baixa seletividade para acetatos é atribuída à falta de substituintes no carbono da posição α do enolato.



Para contornar este problema tem sido inserido grupos como metiltiol⁸⁴ e bromo⁸⁵ na posição α carbonila (R₂), grupos estes que podem ser removidos após a reação aldólica.

A reação entre um enolato metálico de um composto carbonílico com um aldeído pode fornecer 4 possíveis diastereoisômeros (Figura 91). Assumindo que a reação passe pelo estado de transição cíclico de 6 membros,

⁸³ Braun, M. *Angew. Chem. Int. Engl.* 1987, 26, 24.

⁸⁴ Evans, D. A., Bartroli, J., Shih, T. L. *Journal American Chemical Society*, 1981, 103, 2127.

⁸⁵ Evans, D. A., *Journal American Chemical Society*, 1987, 109, 7151

proposto por Zimmerman e Traxler,⁸⁶ a geometria do enolato é responsável pelo controle da diastereodiferenciação. Enolatos de geometria *E* fornecem preferencialmente aldóis *anti*, devido ao estado de transição que levaria ao aldol *syn* ser desestabilizado por interações desfavoráveis do tipo 1,3-axial (R, R₁ e L). Da mesma forma, enolatos de geometria *Z* favorece a formação de produtos aldol *syn*. Considerando que o estado de transição formado preferencialmente é aquele que envolve o menor número de interações, a enantiodiferenciação pode ser controlada pela face do enolato que sofrerá a adição do aldeído.

⁸⁶ Hsiau, C. N.; Liu, L.; Miller, M. J. *Journal Organic Chemistry*, **1987**, 52, 2201

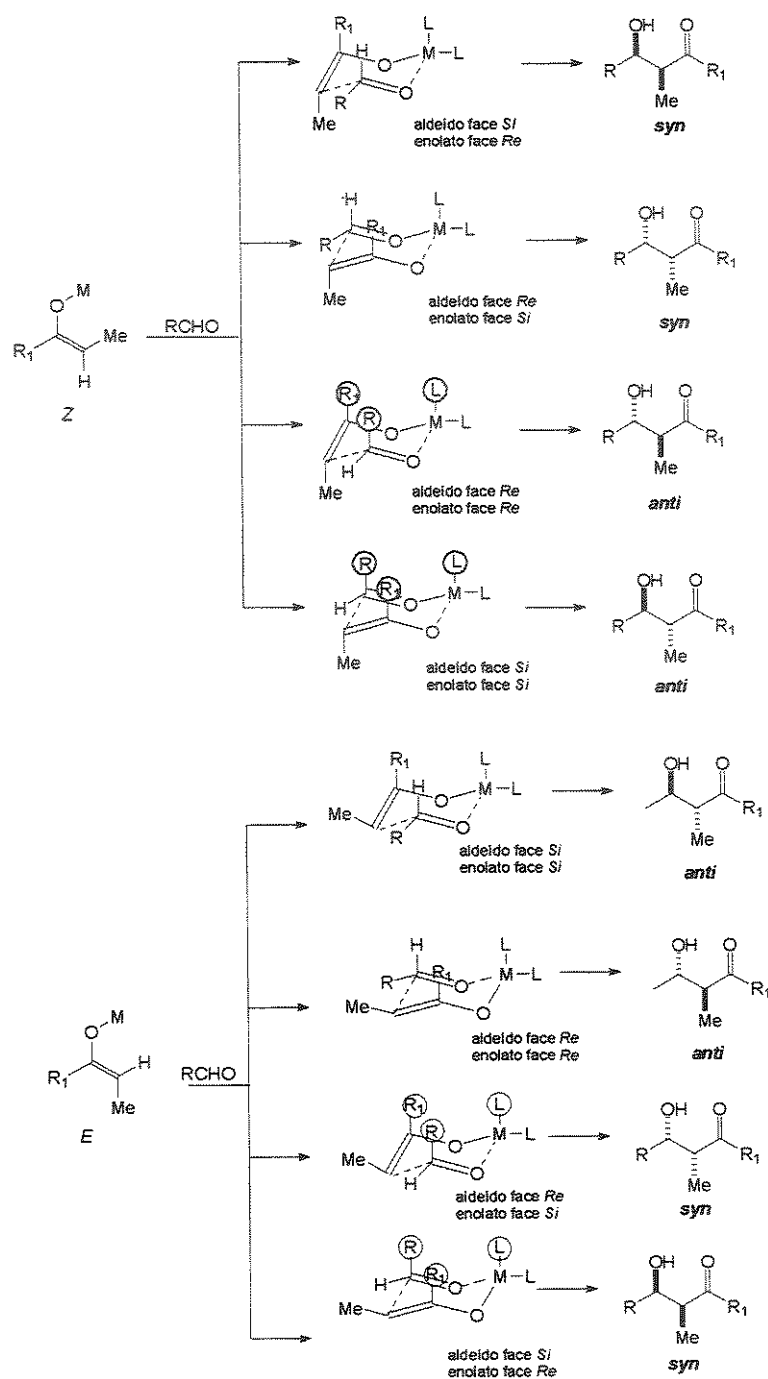


Figura 91. Modelo estado de transição cíclico de Zimmerman e Traxler.⁸⁶

Desta forma os reagentes metálicos que geram o enolato desempenham um papel muito importante para formação do produto desejado. Dependendo reagente metálico escolhido pode ser obtido enolatos de geometria *Z* ou *E*.

No presente estudo foi utilizado o enolato do (4*S*)-3-(1-bromoacetil)-4-benzil-2-oxazolidinona **65**. O composto **65** pode ser obtido a partir do acoplamento dos compostos comerciais (4*S*)-4-benzil-2-oxazolidinona e do brometo de bromoacetato na presença de *n*-butil-lítio. No entanto, este composto foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ronaldo A. Pilli do Instituto de Química desta Universidade. O reagente metálico escolhido para geração do enolato foi o cloreto de titânio (IV). Este reagente gera enolatos de geometria *Z*.⁸⁷

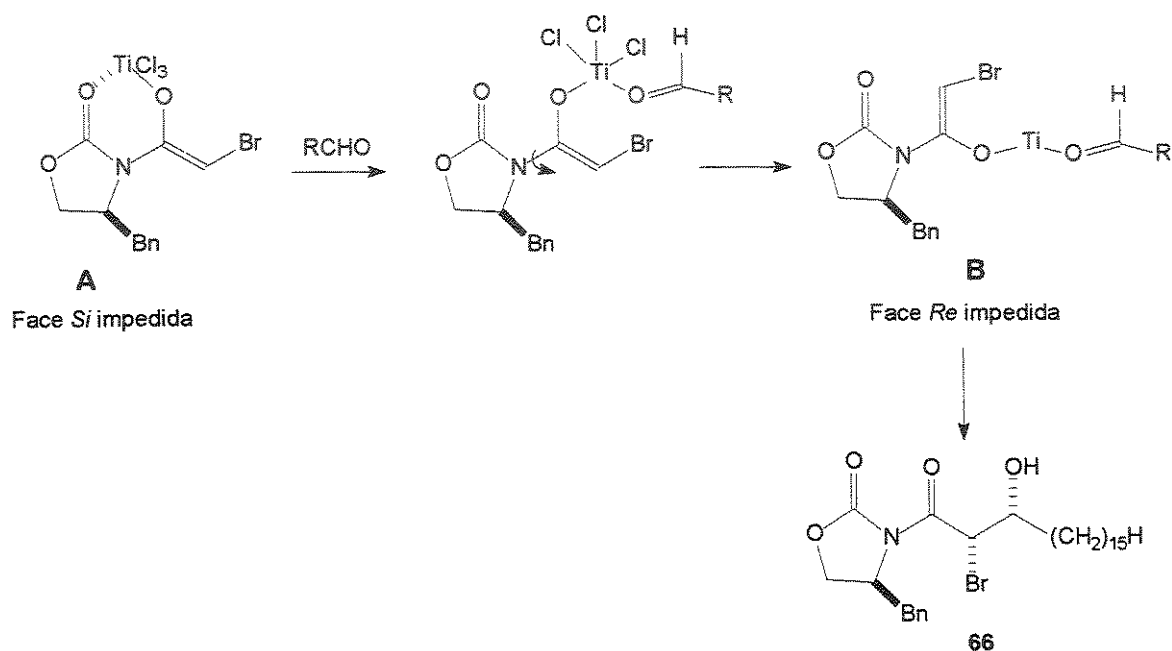


Figura 92. Modelo não-quelado de adição do aldeído ao enolato

A adição do aldeído ao enolato de cloreto de titânio segue o modelo não-quelado (Figura 92) o aldeído se adiciona pela face *Si* do enolato já que a

⁸⁷ Evans, D. A.; Rieger, D.; Bilodeau, M. T.; Urpi, F. *Journal of American Chemical Society*, **1990**, *112*, 8215.

face *Re* está impedida, desta forma o produto esperado para a reação do composto **65** com o eicosanal levará, preferencialmente, ao produto **66** com configuração *2S*, *3R*.

Nas tentativas de obtenção do composto **66** utilizando as temperaturas de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ constantes durante todo procedimento reacional, foi observada a formação do enolato devido a formação da coloração vermelho escuro característico de enolatos de titânio. No entanto produtos de adição do aldeído ao enolato não foram observados. A otimização das condições reacionais revelou que a elevação da temperatura de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ após a formação do enolato e após a adição do aldeído melhorou a eficiência do acoplamento aldólico levando a rendimentos de 45 %.

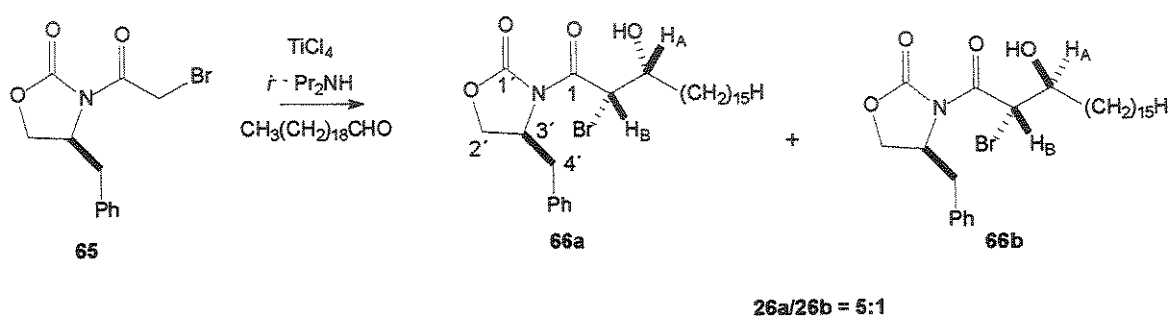


Figura 93. Síntese do composto **66a** e **66b**

Tabela 17. Condições reacionais para a reação aldólica

Condições reacionais	Temperatura	Equivalente de aldeído	Rendimento
1	- 78 °C	1 eq.	Nenhum produto foi observado
2	- 45 °C	1 eq.	Nenhum produto foi observado
3	- 45 °C	2 eq.	Nenhum produto foi observado
4	- 78 °C - 0 °C	1 eq.	45 %

Os compostos **66a/66b** apresentam sinais no espectro de RMN de ^1H em δ 4,30 atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-3'. Dois duplo dubletos em δ 2,8 e 3,3 foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-5a e H-5b. O sinal largo em δ 3,94 foi atribuído ao hidrogênio ligado a hidroxila e o multiplete em δ 4,17 ao hidrogênio H-3. O sinal intenso em 1,25 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral. O dubleto em δ 5,69 foi atribuído ao hidrogênio H-2 do composto **66a** (Figura 94).

A diastereosseletividade da reação foi 5:1 em relação **66a/66b** determinada através do espectro de RMN de ^1H .⁸⁸ A constante de acoplamento vicinal $J_{2,3}$ é menor para o isômero *syn* (3,3 Hz) que para o isômero *anti* (8,4 Hz) já que o grupo ligado ao carbono α é bromo e apresenta um pequeno volume (Figura 95).

⁸⁸ Heathcock, C. H., In: Morrison, J. D. *Asymmetric Synthesis*, v. 3, part B, 111, 1984.

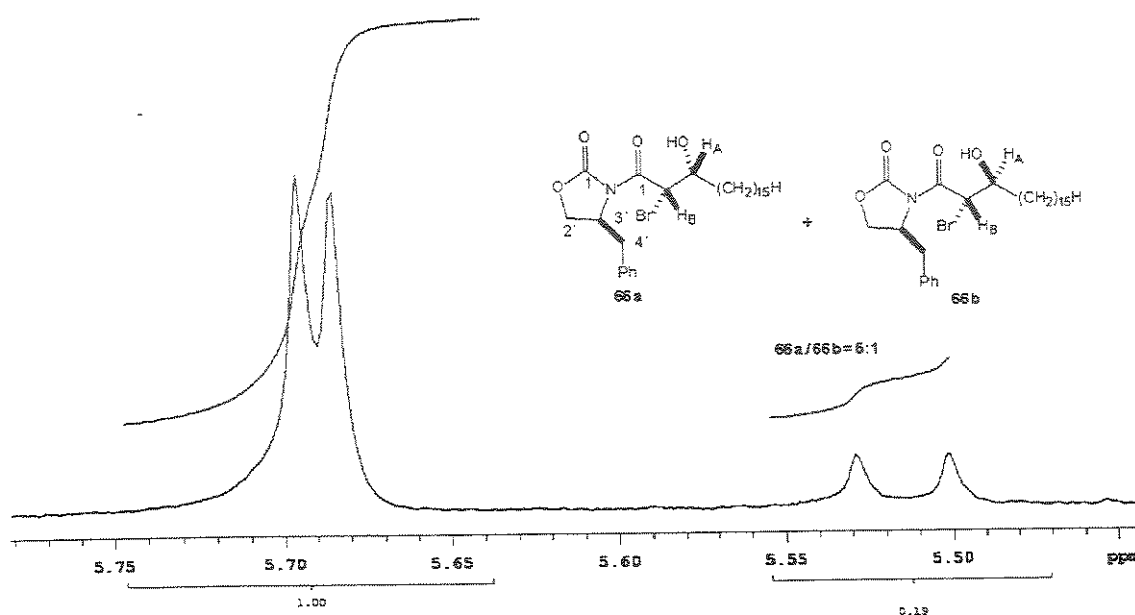


Figura 94. Sinais de H-2 no espectro de RMN de ^1H que determina a proporção dos diastereoisômeros **66a/66b** como 5:1.

A razão destes valores de constantes de acoplamento podem ser observado na Figura 95, que revela os três rotâmeros do *syn* e *anti* β -hidroxi-cetonas **66a** e **66b**. Em ambas as conformações (**A**, **B**) do isômero *syn* que apresentam ligação de hidrogênio intramolecular os hidrogênios H_A e H_B apresentam uma relação gauche, logo $J_{\text{A,B}}$ esperado é pequeno. Já o isômero *anti* apresenta um confôrmero (**B'**) em que H_A e H_B tem uma relação gauche, porém o outro (**A'**) apresenta uma relação *anti*. Portanto, o $J_{\text{A,B}}$ esperado é a média da constante de acoplamento pequena e grande. Quando R_2 e R_3 são grupos volumosos, que não é o caso dos isômeros **66a** e **66b**, a conformação **C** torna-se mais importante para o isômero *syn* e a conformação **B'** mais importante para o isômero *anti*.⁸⁸

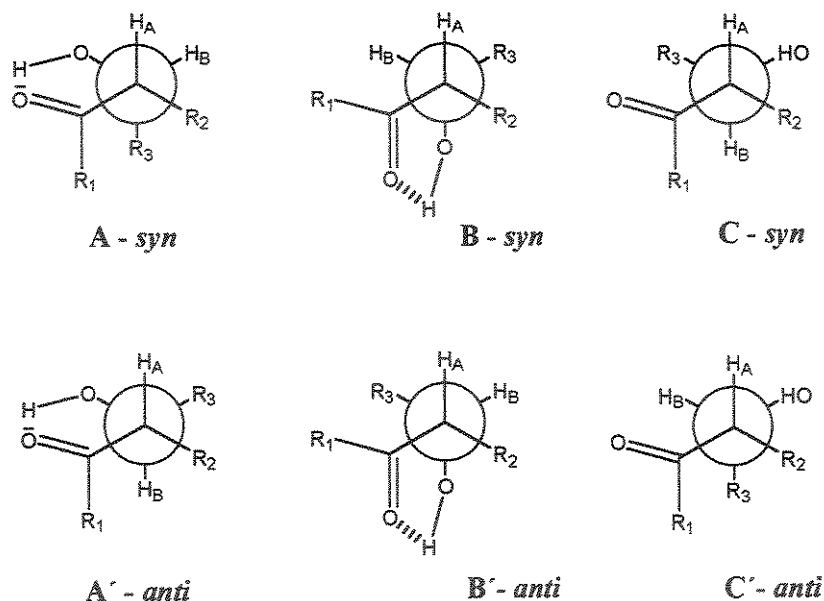
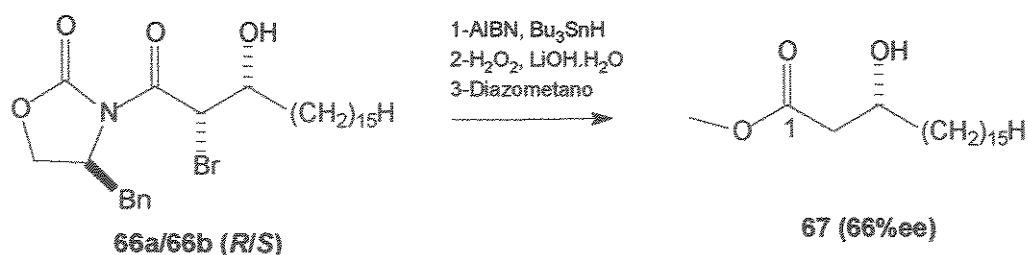


Figura 95. Conformações para os isômeros *syn* e *anti*

A mistura diastereoisomérica pode ser separada por cromatografia em coluna de sílica no entanto, foi utilizada a mistura **66a/66b** para otimização das condições reacionais para remoção do bromo. Portanto, a mistura **66a/66b** foi submetida a redução com hidreto de n-tributil-estanho (Bu_3SnH) na presença de 2,2'-azo-*bis*-izobutironitrila (AIBN) para a remoção do bromo e seguido o auxiliar quiral foi removido na presença de peróxido de hidrogênio e hidróxido de lítio. Devido, às tentativas anteriores levarem a um baixo rendimento do ácido 3-hidróxi-octadecanóico que pode ter ocorrido durante a purificação em coluna cromatográfica de sílica gel. Para purificação em coluna cromatográfica a mistura reacional foi metilada com diazometano obtendo-se nestas três etapas o enantiomero *R* **67** com excesso enantiomérico de 66 % e com rendimento de 34 %.



O composto **67** apresenta dois duplos dubletos em δ 2,52 ($J=16,4, 3,2$ Hz) e δ 2,41 ($J=16,4, 8,8$ Hz), característico do sistema ABX dos hidrogênios H-2 e um sinal intenso em δ 1,25 atribuído aos vários metilenos da cadeia alquílica.

Sendo assim, várias etapas da síntese enantiosseletiva de ácidos 3-hidroxi-alcanóicos foram realizadas e os resultados obtidos revelam uma moderada diastereosseletividade de 5:1.

3.7.3 Estudos visando a obtenção de (*S*)-1,2-diacilgliceróis

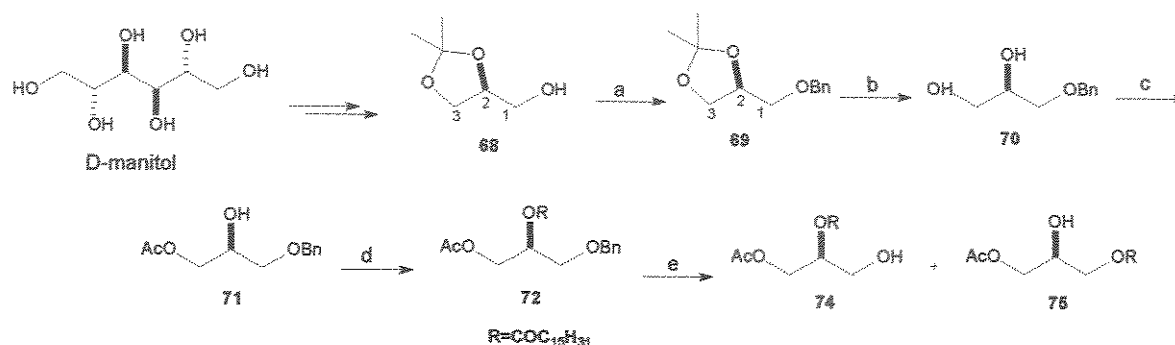


Figura 96. Rota sintética para obtenção de 1,2-diacilglicerol

Legenda: a. NaH/THF, cloreto de benzila, refluxo (68%) b. ácido acético_{aq.} 70% (92%), c. Anidrido acético/ piridina 30min, ta (38%), d-DCC/DMAP, ácido palmitico, ta. (50 %). e. Pt/carvão, metanol/acetato de etila.

Para obtenção de diacilgliceróis com configuração *S* foi utilizado o (2*S*)-1,2-isopropilideno-glicerol **69** que foi obtido a partir do D-manitol.

Existem várias alternativas para proteção de alcóois utilizando brometo de benzila.⁸⁹ Neste trabalho utilizou-se o hidreto de sódio para a promover a formação do alcoóxido. O (2*S*)-1,2-isopropilideno-glicerol **69** foi protegido utilizando o brometo de benzila na presença de hidreto de sódio. Obtendo-se o composto (2*S*)-1-benzil-1,2-isopropilideno-glicerol **70** com rendimento de 68%.

⁸⁹ Greene, T. W. *Protective groups in organic synthesis*, John Wiley & Sons, USA, 2 ed. 1991.

O espectro de RMN de ^1H para o composto **70** apresentou dois singletos em δ 1,36 e δ 1,42 correspondente aos hidrogênios dos grupos metílicos e três multipletos em δ 3,51, 3,75 e 4,08 correspondentes aos hidrogênios H-3, H-2 e H-1. Um multipletto em δ 7,32 atribuído aos hidrogênios aromáticos.

Para remover o grupo cetal do composto (2*S*)-3-benzil-1,2-isopropilideno-glicerol **70**, utilizou-se uma solução de ácido acético obtendo-se o (2*R*)-3-benzil-glicerol **71**.

O (2*R*)-1-benzil-glicerol **71** foi acetilado seletivamente utilizando anidrido acético e piridina, obtendo-se o produto acetilado (2*S*)-3-benzil-1-acetil-glicerol **72** com rendimento de 38%.

O espectro de RMN de ^1H para o composto **72** apresentou singlete em δ 2,07 correspondente aos hidrogênios do grupo metílico e dois multipletos em δ 3,52, e δ 4,15 correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-1 e um singlete largo em δ 4,05 atribuído ao H-2.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou os sinais δ 65,5, δ 68,82, δ 70,08 e δ 73,48 que foram atribuídos aos carbonos C-3, C-2, C-1 e CH_2 do grupo benzílico respectivamente

Para avaliar metodologias de desproteção do grupo benzílico sem que ocorra a isomerização do produto 1,2- para 1,3-diacil, o composto **72** foi esterificado com ácido palmítico na presença de N, N-diciclohexilcarbodiimida e 4-dimetilaminopiridina, obtendo-se o (2*S*)-1-benzil-2-palmitoil-3-acetil-glicerol **73** com rendimento de 50%.

O espectro de RMN de ^1H do composto **73** apresentou um tripleto em δ 0.89, característico de hidrogênios metílicos. Foi observado entre δ 1-1,5 sinais intensos e largos indicando a existência de vários grupos metilênicos na cadeia derivada do ácido graxo. Na região entre δ 3,58 e δ 4,25 foram

observados dois duplos dubletos atribuídos aos hidrogênios H-3, e dois multipletos em δ 4,53 e δ 5,23 atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-1.

No espectro de RMN de ^{13}C os sinais em δ 62,8, δ 69,94, e δ 70,36 foram atribuídos aos carbonos C-1, C-3 e C-2, respectivamente e os sinais em δ 170,5, 172,96 aos carbonos carbonílicos do acetato e C-1', respectivamente.

A metodologia avaliada para a desproteção do grupo benzílico foi a hidrogenólise. O composto 73 foi reduzido na presença de platina sob carvão na presença de hidrogênio. O produto da reação foi analisado por CG/EM e verificado a formação da mistura de isômeros numa proporção aproximada de 1:1. Sendo esta a única etapa até o momento que não foi obtido êxito para a obtenção de diacilgliceróis florais.

Como conclusões gerais desta parte de estudos sintéticos foram obtidos êxitos em várias etapas para a obtenção enantiosseletiva de diacilgliceróis naturais. Sendo os rendimentos obtidos variando de bons a moderados. Apenas na última etapa de síntese destes diacilgliceróis, a desproteção do grupo OH na porção do glicerol, não foram obtidos resultados satisfatórios devido à formação do isômero 1,3-diacilglicerol.

4 Conclusões

Este trabalho investigou a química dos calos florais de 39 espécies da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae) revelando que os compostos produzidos nestes calos representam traços evolutivos que se diversificaram durante a evolução. A análise estatística destes dados revelou um grupo consistente de 13 espécies (*Oncidium pubes*, *O. cornigerum*, *O. truncatum*, *O. longicornium*, *O. hookeri*, *O. kautskyi*, *O. welterii*, *Ornithophora radicans*, *Baptistonia echinata*, *Zigostates lunata* e *Phymatidium tillandsoides*) segregadas pela presença majoritária de diacilgliceróis. Este grupo destacou-se também na análise de filogenia baseada em caracteres morfológicos, anatômicos e de DNA. As demais 26 espécies (*O. widgrenii*, *O. longipes*, *O. macropetalum*, *O. cogniauxianum*, *O. ciliatum*, *O. sarcodes*, *O. praetextum*, *O. forbesi*, *O. warmingii*, *O. varicosum*, *O. flexuosum*, *O. onustum*, *O. divaricatum*, *O. phymatochilum*, *O. pulvinatum*, *O. harrisonianum*, *O. hydrophyllum* Barb. Rodr., *Rodrigueziella gomesoides*, *Gomesa laxifolia*, *Gomesa crispa*, *Gomesa recurva*, *Gomesa sessilis*, *Gomesa* sp., *Lockhartia lunifera*, *Miltonia spectabilis* e *Rodriguesia venusta*) apresentaram uma larga diversidade de compostos pertencentes as classes dos terpenos, acilglicérolis e derivados de ácidos graxos, destacando derivados do álcool benzílico. É importante ressaltar que durante estas análises foram isolados e identificados 3 novos diacilglicérolis: (2*S*, 3'*R*, 7'*R*)-1-acetil-2-(3', 7'-diacetoxi-eicosanoil)-glicérol nomeado de oncidinol, (3'*R*, 7'*R*)-1-acetil-2-(3'-acetoxi, 7'-hidroxioctadecanoil)-glicérol e 1-acetil-2-(3'-acetoxioctadecanoil)-glicérol.

Impulsionados pela falta de argumentos consistentes sobre o fato de espécies de Oncidiinae serem ou não flores de engano que mimetizam flores de Malpighiaceae para atrair abelhas coletoras de óleos. E o fato dos

diacilgliceróis e estéres benzílicos identificados em Oncidiinae estarem presentes apenas nos calos florais, não sendo identificado nas demais partes florais o que sugere que estes compostos podem apresentar uma função especial. Foi proposta a investigação da química do óleo floral de uma Malpighiaceae (*Byrsonima intermedia*). Este estudo levou ao isolamento de um novo derivado de ácido graxo (3*R*, 7*R* - 3,7-diacetoxi-docosanóico) idêntico à porção de ácido graxo que esterifica os diacilgliceróis de espécies de Oncidiinae. Desta forma, a hidrólise do diacilgliceróis de Oncidiinae pode levar a compostos idênticos aos das flores de Malpighiaceae. Assim este dado desmistifica o conceito de flores de engano de forma geral para a subtribo Oncidiinae. Entretanto, as espécies que apresentam a mesma composição no calo e nas demais partes florais podem ser realmente de engano como por exemplo *Oncidium flexuosum*.

Para estabelecer a importância destes compostos na vida das abelhas coletoras de óleos florais (Anthophoridae) foi feita a análise de um ninho de *Tetrapedia diversipes* isolando os 3,7-diidroxi-eicosanóico e 3,7-diidroxi-docosanóico. Estes compostos estão quimicamente relacionados aos óleos florais de Oncidiinae e Malpighiaceae através de uma hidrólise que pode ser efetuada pela abelha ao manipular os óleos com sua secreção mandibular. Assim, foi conectado de forma bastante contundente os óleos florais da família Malpighiceae e da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae) as abelhas coletoras de óleos florais.

Intrigados pela presença de óleos florais em gêneros e famílias diferentes foi proposto a análise de uma outra espécie pertencente a uma família de plantas filogeneticamente distante das, até então, investigadas para verificar se o fenômeno se repetia. Para isto, foi selecionado o óleo floral de *Calceolaria x herbeoabyrida* (Scrophulariaceae) onde foi identificado o 1-

acetil-2-(3'-acetoxi-hexadecanoil)-glicerol. Portanto, além dos elaióforos, os diacilgliceróis se desenvolveram paralelamente em diferentes famílias e isto sugere a importância destas estruturas na vida destas plantas e de suas abelhas polinizadoras.

Foram obtidos resultados satisfatórios em várias etapas sintéticas para a obtenção enantioseletiva de diacilgliceróis naturais. Apenas a última etapa de síntese destes diacilgliceróis, a remoção do grupo protetor na porção do glicerol, não foi bem sucedida devido à formação do isômero 1,3-diacilglicerol. Este estudo sintético permitiu a observação dos mecanismos de fragmentação destes composto por espectrometria de massas auxiliando na elucidação estrutural dos compostos naturais, além de permitir também a otimização das condições reacionais de obtenção dos ésteres de Mosher.

De uma forma geral, neste trabalho foram obtidos vários resultados inéditos que contribuíram para o entendimento da química dos calos florais de *Oncidiinae* brasileiras.

5 Parte Experimental

5.1 Materiais e Métodos:

- ◆ Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analiticamente puros e/ou indicados pelos fabricantes, para uso em síntese orgânica. Sempre que houve necessidade de reagentes e solventes com um grau maior de pureza, foram utilizados os métodos gerais de purificação descritos na literatura.⁹⁰
- ◆ Os procedimentos experimentais aqui descritos referem-se aos melhores resultados obtidos em laboratório.
- ◆ As reações sensíveis à umidade foram realizadas em atmosfera de argônio seco ou nitrogênio seco, utilizando vidrarias previamente secas em estufa a 180°C e resfriados em dessecador ou sob fluxo de nitrogênio seco. A secagem do nitrogênio foi realizada, passando o gás através de três frascos de adsorção, conectados entre si e contendo, respectivamente: sílica gel ativada, cloreto de cálcio anidro e peneira molecular de 4 Å (4-8 mesh) respectivamente.
- ◆ As cromatografias de adsorção em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas da marca Merck
- ◆ A determinação da posição de um composto sobre as placas de CCD foram obtidas pulverizando a superfície do adsorvente com uma mistura de *p*-anisaldeído (0,5 mL), ácido acético glacial (50 mL) e ácido sulfúrico

⁹⁰ *Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel*. E. Merck, Darmstadt, 1980

concentrado (1 mL). Após a pulverização, as placas eram aquecidas até o aparecimento de manchas coloridas.⁹¹

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

♦ Os compostos sintetizados foram purificados pelos métodos usuais (*i.e.*, cromatografia, cristalização, destilação etc.). Foram considerados puros, quando apresentavam, um único pico por cromatografia em fase gasosa.

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

⁹¹ Perrin, D. D., Armarego, W. L. F. E. Perrin, D. R. *Purification of laboratory chemical*, 2^a ed. Pergamon Press, New York, 1980.

◆ Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de 300 MHz e 500 MHz, foram obtidos à temperatura ambiente, nos espectrômetros das firmas: Varian (modelo Gemini-300) e Varian (modelo Inova-500). Os deslocamentos químicos foram fornecidos em ppm, utilizando como referências interna o tetrametilsilano ($\delta = 0$ ppm). As constantes de acoplamento foram fornecidas em Hertz (Hz).

◆ Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 desacoplados a 75.46 MHz e 125.69 MHz, foram obtidos à temperatura ambiente, nos espectrômetros das firmas: Varian (modelo Gemini-300) e Varian (modelo Inova-500). Os deslocamentos químicos foram fornecidos em ppm, utilizando o CDCl_3 como referência interna ($\delta = 77.00$ ppm). A interpretação dos dados foi realizada com o auxílio dos espectros de RMN de ^{13}C obtidos pela técnica DEPT a 135° onde: CH_3/CH = sinais positivos, CH_2 = sinal negativo e C_o (quaternário) = sinal de intensidade zero e RMN de ^{13}C DEPT a 90° onde só aparecem os sinais de CH.

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

da ordem de 1 μ L de uma solução de 20 ppm do óleo floral em acetato de etila.

◆ CG/EM – (2) cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa O cromatógrafo a gás da firma Agilent (série GC-6870) acoplado a um detetor de massas do mesmo fabricante (série MS-5973), operado a 70 eV. O cromatógrafo é equipado com colunas capilares de sílica fundida do tipo HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Como gás de arraste, foi empregado o hélio. As injeções das amostras foram da ordem de 1 μ L de uma solução de 10 ppm do óleo floral em acetato de etila.

O programa de temperatura empregado para a análise dos exsudados florais foi: $T_i = 50^\circ\text{C}$ (1 min.) $\Rightarrow 4^\circ\text{C}/\text{min.} \Rightarrow T_f = 290^\circ\text{C}$ (15 min.), com as temperaturas do injetor e do detetor em 240°C e 290°C , respectivamente.

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

$$IR = [(T_S - T_{Cn-1}) / (T_{Cn} - T_{Cn-1})] \times 100 + 100 \times N \quad (\text{Equação de Dool e Krats}^{92})$$

Onde: -

T_S - Tempo de retenção da substância analisada

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

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

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

♦ Os compostos que eluíram a uma temperatura superior a 290 °C (programação isotérmica) não tiveram os seus índices de retenção calculados, pois esta condição não satisfaz a equação de Van den Dool e Krats.⁹²

Material Botânico (Voucher):

Byrsonima intermedia – (UEC 95.102)

Calceolaria xhebeohybrida – Material cultivado M.C.E. Amaral e V. Bittrich 2004/51. Instituto de Biologia - Unicamp

Oncidiinae:

Oncidium pubes Lindl - (UEC 95.102), (UEC 100.966), (UEC 109.103), (UEC 110.433), (UEC 100.306).

Oncidium cornigerum Lindl - (UEC 129.087), (UEC 109.104).

Oncidium amictum Lindl. - (UEC 100.828).

Oncidium kautskyi Pabst - (UEC 103.080).

⁹² Van den Dool, H., Kratz, P. D., J., 1963, *Journal of Chromatography*, 11, 463.

Oncidium truncatum Pabst - (UEC 109.102).
Oncidium hookeri Rolfe - (UEC 94.340), (UEC 95.262), (UEC 100.560), (UEC 100.910).
Oncidium longicornu Mutel - (UEC 100.124), (UEC 100.765).
Oncidium welterii Pabst - (UEC 100.127).
Oncidium trulliferum Lindl. - (UEC 98.278).
Zygostates lunata Lindl - (UEC 103.092).
Phymatidium tillandsioides Barb. Rodr. - (UEC).
Ornithophora radicans (Rchb.f.) Garay & Pabst - (UEC 100.863), (UEC 100.496).
Baptistonia echinata Barb. Rodr. - (UEC 99.183).
Oncidium widgrenii Lindl. - (UEC 103.625), (UEC 94.139).
Oncidium longipes Lindl. & Paxt. - (UEC 95.093).
Oncidium macropetalum Lindl. - (UEC 98.005).
Oncidium cogniauxianum Schl. - (UEC 103.073).
Oncidium ciliatum Lindl. - (UEC 98.276).
Oncidium sarcodes Lindl. - (UEC 93.953).
Oncidium praetextum Rchb.f - (UEC 100.916), (UEC 100.118), (UEC 95.097).
Oncidium forbesii Hook. - (UEC 100.016), (UEC 100.351).
Oncidium warmingii Rchb.f. - (UEC 100.911), (UEC 100.452).
Oncidium varicosum Lindl. - (UEC 125.832).
Oncidium flexuosum Sims - (UEC 93.537), (UEC 94.620).
Oncidium onustum Lindl. - (UEC 103.075).
Oncidium divaricatum Lindl. - (UEC 103.308).
Oncidium phymatochilum Lindl. - (UEC 93.147), (UEC 103.607).
Oncidium pulvinatum Lindl. - (UEC 103.087).

Oncidium harrisonianum Lindl - (UEC 103.091), (UEC 94.319).
Oncidium hydrophyllum Barb. Rodr. - (UEC 100.126)
Rodrigueziella gomesoides - (UEC 94.554).
Gomesa laxiflora Klotzsch ex Rchb.f. - (UEC 103.076).
Gomesa crispa Klotzsch ex Rchb.f. - (UEC 99.191), (UEC 98.007).
Gomesa recurva R. Br. - (UEC 109.105).
Gomesa sessilis Barb. Rodr - (UEC 103.083).
Lockhartia lunifera Rchb.f. - (UEC 103.093), (UEC 79.933).
Miltonia spectabilis Lindl. - (UEC 103.077).
Rodriguezia venusta Rchb.f. - (UEC 103.074).

5.2 Obtenção dos óleos e exsudados florais – Estruturas Elaióforas

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

5.3 Obtenção dos extratos dos calos e das demais partes das flores

Os calos das flores foram separados das demais partes das florais e ambos foram extraídos com acetato de etila (2 min) e em seguida foram analisados por CG/EM.

Para observar o perfil de açúcar do calo floral e das demais partes florais de *Oncidium flexuosum* foi utilizado uma mistura de acetato de etila:metanol (1:1). O solvente foi evaporado sob fluxo de N₂. Os extratos obtidos foram sililados seguindo o procedimento descrito abaixo.

5.4 Procedimento geral para reação de sililação

Em um frasco contendo 0,1 mg de óleo floral foram adicionados 10 µL de BSTFA [N, O-Bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida] e 20 µL de piridina seca. Em seguida o frasco foi lacrada e mantida a temperatura ambiente por 1 hora. Após este período esta mistura foi analisada por CG/EM.

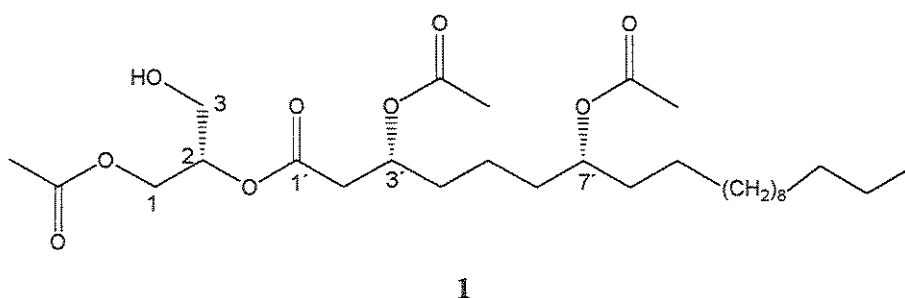
5.5 Procedimento geral para reação de acetilação

Em um frasco contendo 1 mg de óleo floral foram adicionados 200 µL de piridina seca e 50 µL de anidrido acético. A mistura reacional permaneceu em um frasco lacrado a temperatura ambiente por 24 horas. A reação foi

acidicionado acetato de etila e esta mistura foi lavada com solução aquosa de sulfato cúprico para remoção da piridina. O extrato obtido foi secado com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido em rotaevaporador.

5.6 Isolamento e identificação dos produtos naturais

5.6.1 Isolamento do (2R, 3'R, 7'R)-1-acetil-2-(3',7'-diacetoxi-eicosanoil)-glicerol – oncidinol 1 - *Ornithophora radicans*



As flores de *Ornithophora radicans* foram coletadas no orquidário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Piracicaba-SP) em fevereiro de 2003. 21,3g de flores frescas foram maceradas com acetato de etila e logo em seguida o extrato de acetato de etila obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo produzindo 1,8 g de extrato. O extrato foi purificado em coluna de sílica gel eluída com hexano/acetato de etila/trietilamina (1:1:0.01). A trietilamina foi adicionada ao sistema eluente para diminuir a acidez da

sílica e evitar assim a isomerização de 1,2-diacilgliceróis para 1,3-diacilgliceróis. Desta coluna foram obtidas 210 mg de uma mistura de compostos cujos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C e de cromatografia gasosa revelaram que a mistura era composta majoritariamente (aproximadamente 90%) de um único diacilglicerol. Esta mistura foi caracterizada por dados espectroscópicos.

Propriedades físicas: óleo incolor

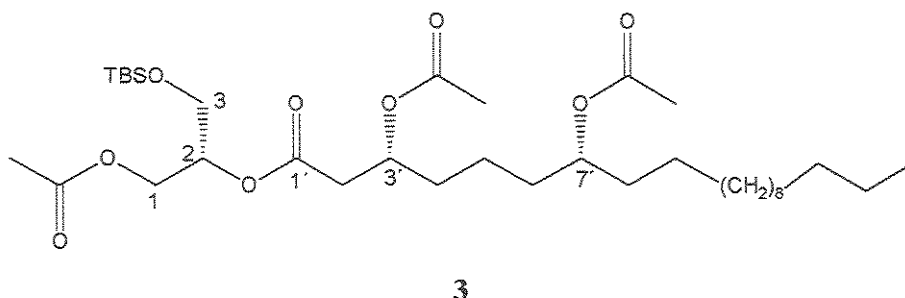
ESMS- MH^+ 545 (massa molecular – 544)

IV (filme) $\nu_{\text{max. cm}^{-1}}$: 3462, 2925, 2854, 1740, 1242 cm^{-1}

RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J=6,59$, H-20'), 1,25 (m, 20H, H-9'-19'), 1,25 (m, 1H, H-5'), 1,36 (m, 1H, H-5'), 1,52 (m, 4H, H-6'-7'), 1,63 (m, 2H, H-4'), (2,04 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-C-3}'$), 2,05 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-C-7}'$), 2,08 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-C-1}$), 2,56 (dd, $J=4,76$, 15,3 Hz, 1H, H-2'), 2,63 (dd, $J=7,69$, 15,3 Hz, 1H, H-2'), 3,74 (m, 2H, H-3), 4,20 (dd, $J=4,38$, 12,08 Hz, 1H, H-1), 4,30 (dd, $J=5,86$, 12,08 Hz, 1H, H-1), 4,84 (m, 1H, H-7'), 5,08 (m, 1H, H-2), 5,20 (m, 1H, H-3').

RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) δ : 14,1 (1 CH_3 , C-20'), 20,7 (1 CH_3 , $\text{CH}_3\text{CO-C-1}$), 20,9 (1 CH_2 , C-5'), 21,0 (1 CH_3 , $\text{CH}_3\text{CO-C-7}'$), 21,2 (1 CH_3 , $\text{CH}_3\text{CO-C-3}'$), 22,6 (1 CH_2 , C-19'), 25,3 (1 CH_2 , C-9'), 29,7 (7 CH_2 , C-10'-17'), 31,9 (CH_2 , C-18'), 33,7 (1 CH_2 , C-6'), 33,9 (1 CH_2 , C-4'), 34,1, (1 CH_2 , C-8'), 61,2 (1 CH_2 , C-3), 62,1 (1 CH_2 , C-1), 70,2 (1CH, C-3'), 72,7 (1CH, C-2), 73,8 (1CH, C-7'), 169,7 (C_q , C-1'), 170,5 (C_q , CO-C-1), 170,6 (C_q , CO-C-7'), 170,8 (C_q , CO-C-3').

5.6.1.1 Obtenção do composto (2R, 3'R, 7'R)-1-acetil-2-(3',7'-diacetoxi-eicosanoil)-3-t-butildimetilsilil - glicerol 3



A uma solução da mistura de 1 e 2 (180 mg em 0.5 mL de CH₂Cl₂) foram adicionados sequencialmente 30 µL de trietilamina, 4-dimetilamino piridina (0.3 mg, 0.02 mmol) e cloreto de *t*-butildimetilsilano (34 mg, 0.25 mmol). A mistura reacional foi agitada durante 2 horas. A reação foi tratada com salmora e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio e em seguida concentrada em evaporador rotativo obtendo-se assim 160 mg de extrato bruto. Este extrato foi purificado em coluna de sílica gel eluída com hexano/acetato de etila (1:1). Obtendo-se 11 mg do composto 3 e 120 mg do composto 2

Propriedades físicas: óleo incolor

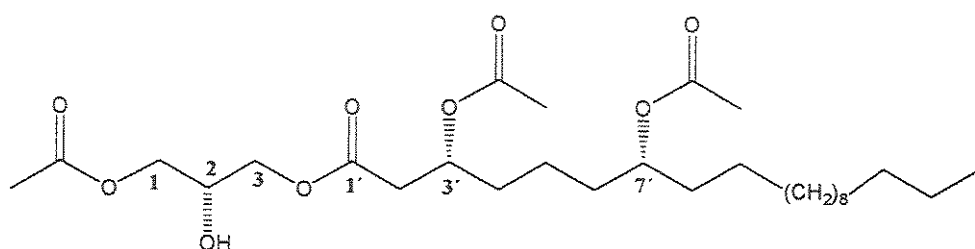
$\alpha_D^{20} = +16.5$ [c. 2,0 (mg/mL), CHCl₃]

Dicroísmo circular: Efeito Cotton positivo

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 5,14 (m, 1H, H-2), 5,00 (m, 1H, H-3'), 4,78 (m, 1H, H-7'), 4,27 (dd, J=8,4, 11,9; 1H, H-3), 4,08 (dd, J=5,9, 11,9; 1H, H-3), 3,65 (d, J=5,1, 2H, H-1), 2,52 (m, 2H, H-2), 2,01 (s, 3H, CH₃CO-C7'), 1,98 (s, 3H, CH₃CO-C3'), 1,97 (s, 3H, CH₃CO-C7'), 1,55 (m, H-4),

1,46 (m, H-5'-H-6'), 1,25 (m, H-7' - H-19'), 0,82 (m, H-20' E CH₃ do *t*-butildimetilsilano),

RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃): δ: 170,65 (CO), 170,43(CO), 170,02 (CO), 73,97 (CH, C-7'), 72,21 (CH, C-2), 70,09 (CH, C-3'), 62,63 (CH, C-1), 61,32 (CH, C-3), 39,13 (CH, C-2'), 34,22 (CH₂, C-8'), 33,91 (CH₂, C-4'), 33,84 (CH₂, C-6'), 32,01 (CH₂, C-18'), 29,75 (CH₂, C-14'-C-16'), 29,69 (CH₂, C-12-13'), 29,64 (CH₂, C-11'), 29,46 (CH₂, C-10'), 25,87 (CH₂, C-6'), 25,85 (CH₂, C-9'), 22,81 (CH₂, C-17'), 21,36 (CH₂, C-6'), 21,14 (CH₂, C-6'), 21,08 (CH₂, C-6'), 20,89 (CH₂, C-5'), 14,26 (CH₃, C-20'),



2

Propriedades físicas: óleo incolor

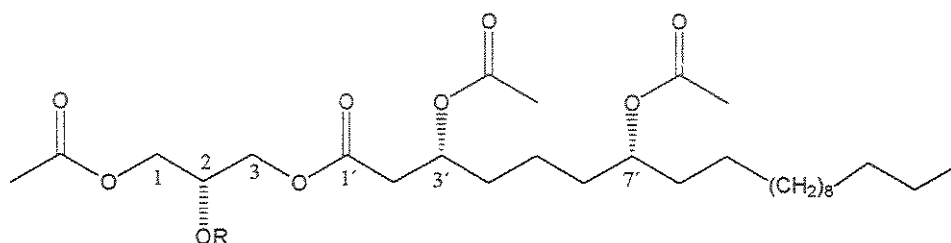
IV (filme) ν_{max} cm⁻¹ : 3462,56, 2925,09, 2854,26, 1740,57, 1242,79 cm⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ: 5,24 (m, 1H, H-3'), 4,85 (m, 1H, H-7'), 4,11 (m, 5H, H-1, H-2, H-3), 2,60 (m, 2H, H-2'), 2,10 (s, 3H, CH₃CO-C1), 2,05 (s, 3H, CH₃CO-C3'), 2,04 (s, 3H, CH₃CO-C7'), 1,62 (m, H-4'), 1,53 (m, H-5', H-6'), 1,25 (m, H-7' - H-19'), 0,88 (t, J=6.7, 3H, H-20').

RMN de ¹³C (125 MHz; CDCl₃) δ: 14,34 (C-20'), 21,02 (CH₃CO), 21,18 (CH₂, C-5'), 21,29 (CH₃CO), 21,46 (CH₃CO), 22,91 (CH₂, C-19'), 25,54 (CH₂, C-9'), 29,58 (CH₂, C-10'), 29,74(CH₂, C-11'), 29,76 (CH₂, C-

12'), 29,80 (CH₂, C-13'), 29,87 (2CH₂, C-14'-15'), 29,91 (2CH₂, C-16'-17') 32,14 (CH₂, C-18'), 33,96 (CH₂, C-6'), 34,18 (CH₂, C-4'), 34,36 (CH₂, C-8'), 39,78 (CH₂, C-2'), 65,27 (CH₂, C-1 ou C-3), 65,90 (CH₂, C-1 ou C-3), 68,01 (CH, C-2), 70,56 (CH, C-3'), 74,11 (CH, C-7'), 170,46 (C_q, CO), 171,11 (C_q, CO), 171,21 (C_q, CO), 171,31 (C_q, CO).

5.6.1.2 Obtenção dos ésteres de *R* e *S*- Mosher 6a e 6b



6a *R*-(*S*)-MTPA

6b *R*-(*R*)-MTPA

A uma solução de **2** (9 mg, 0.0165 mmols) em CH₂Cl₂ (3mL) a 0 °C, foram adicionados o ácido *S*-(-)-α-metoxi-α-(trifluormetil)fenilacético (10 mg, 0.042 mmols), 4-dimetilaminopiridina (4 mg, 0,032 mmol) e o hexadeciclocarbodimida (8,7 mg 0,042), sequencialmente. Após 5 minutos o banho de gelo foi removido e a mistura foi agitada sobre refluxo (temperatura 40 °C) e sob atmosfera de N₂ por 5 horas. A reação filtrada em uma coluna de sílica gel eluida com CH₂Cl₂. Desta forma foi obtido o éster derivado do *S*-Mosher, **6a** (9,5 mg) 71.6% de rendimento. O mesmo procediemto foi utilizado para obtenção do éster de *R*-Mosher, **6b** (9 mg), 67,8%. Ambos na forma de um óleo incolor.

Composto 6a

RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (t, $J=7,02$ Hz, 3H, H-20'), 1,25 (m, H-9'-19'), 1,52 (m, H-5'), 1,60 (m, H-6'e H-7'), 1,69 (m, H-4'), 2,01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-C3}'$), 2,04(s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-C7}'$), 2,06(s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-Cl}$), 2,48 (m, 2H, H-2'), 3,56 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$), 4,14 (dd, $J=7,3, 12,2$ Hz, 1H, H-1), 4,33 (dd, $J=6,4, 12,2$ Hz, 1H, H-1), 4,18 (dd, $J= 3,35, 12,2$, 1H, H-3), 4,41 (dd, $J=3,9, 12,2$ Hz, 1H, H-3), 4,85 (m, 1H, H-7'), 5,15 (m, 1H, H-3'), 5,53 (m, 1H, H-2), 7,41 e 7,54 (m, 5H, aromáticos - MTPA).

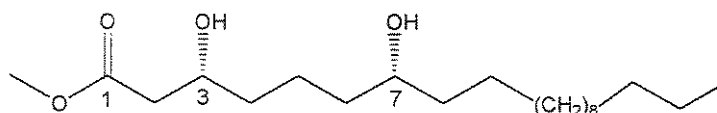
RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) δ : 14,10 ($\text{CH}_3\text{-C20}'$), 20,53 (CH_3CO), 20,91 (CH_2 , C-5'), 20,96 (CH_3CO), 21,21 (CH_3CO), 22,66 (CH_2 , C-19'), 25,28 (CH_2 , C-9'), 29,33 (1CH_2 , C-10'), 29,49 (1CH_2 , C-11'), 29,51 (1CH_2 , C-12'), 29,55 (1CH_2 , C-13'), 29,62 (2CH_2 , C-14'-15'), 29,64 (1CH_2 , C-16'), 29,66(1CH_2 , C-17'), 31,89 (1CH_2 , C-18'), 34,08 (1CH_2 , C-8'), 33,70 (1CH_2 , C-6'), 33,63 (1CH_2 , C-4'), 38,54 (1CH_2 , C-2'), 55,39, (1CH_3 , $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$), 61,97 (2CH_2 , C-1 e C-3), 69,95 (1CH , C-3'), 71,17 (1CH , C-2), 73,89 (1CH , C-7'), 80,5(CF_3), 121,97 (C_q , MTPA), 124,27 (C_q , MTPA), 127,3, 128,4, 129,7 e 131,9 (aromáticos-MTPA), 165,89 (CO , MTPA), 169,73 (1C_q , $\text{CO-Cl}'$), 170,19 (1C_q , COCH_3), 170,33 (1C_q , COCH_3), 170,90 (1C_q , CO CH_3),

Composto 6b

RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (t, $J=6.6$ Hz, 3H, H-20'), 1,25 (m, H-9'-19'), 1,50 (m, H-5'), 1,59 (m, H-6'e H-7'), 1,65 (m, H-4'), 1,99 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-Cl}$), 2,01(s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-C3}'$), 2,03(s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-C7}'$), 2,54 (m, 2H, H-2'), 3,56 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$), 4,41 (dd, $J=4,04, 12,0$ Hz, 1H, H-1), 4,20 (dd, $J=3,66, 12,0$ Hz, 1H, H-1), 4,32(dd, $J=6,9, 12,08$ Hz, 1H, H-3), 4,11 (dd, $J= 3,66, 12,07$, 1H, H-3), 4,83 (m, 1H, H-7'), 5,16 (m, 1H, H-3'), 5,55 (m, 1H, H-2), 7,40 e 7,52 (m, 5H, aromáticos - MTPA).

RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) δ : 14,11 ($\text{CH}_3\text{-C20}'$), 20,44 (CH_3CO), 20,94 (CH_2 , C-5'), 20,96 (CH_3CO), 21,21 (CH_3CO), 22,67 (CH_2 , C-19'), 25,29 (CH_2 , C-9'), 29,33 (1CH_2 , C-10'), 29,50 (1CH_2 , C-11'), 29,52 (1CH_2 , C-12'), 29,57 (1CH_2 , C-13'), 29,63 (2CH_2 , C-14'-15'), 29,65 (1CH_2 , C-16'), 29,67 (1CH_2 , C-17'), 31,90 (1CH_2 , C-18'), 34,09 (1CH_2 , C-8'), 33,74 (1CH_2 , C-6'), 33,71 (1CH_2 , C-4'), 38,69 (1CH_2 , C-2'), 55,44 (1CH_3 , $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$), 61,76 (1CH_2 , C-1), 62,25 (1CH_2 , C-3), 69,95 (1CH , C-3'), 71,17 (1CH , C-2), 73,89 (1CH , C-7'), 121,97 (C_q , MTPA), 124,27 (C_q , MTPA), 127,3, 128,5, 129,8 e 131,9 (aromáticos-MTPA), 165,89 (CO , MTPA), 169,73 (CO), 170,20 (CO), 170,34 (CO), 170,90 (CO).

5.6.1.3 Obtenção do (3*R*,7*R*)-3,7- diidróxi-eicosanoato de metila 8



8

A uma solução do composto 2 (0,050 g, 0,091mmol) em THF/ H_2O /MeOH (3:1:1, 3,2 mL) a 0 °C foi adicionado $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (51 mg, 1,22 mmol). Após a adição do hidróxido de lítio o banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 18 horas. À mistura reacional foi adicionado clorofórmio e esta foi adicionada uma solução de ácido acético 70 % até $\text{pH} = 7$. A fase orgânica foi extraída com

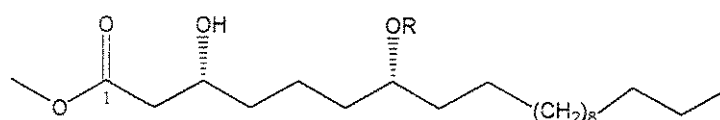
clorofórmio e concentrada em evaporador rotativo obtendo-se 27,6 mg do extrato bruto da reação. O extrato foi metilado com diazometano e em seguida purificado em coluna de sílica gel eluída com hexano/acetato (1:1) obtendo-se 11,8 mg do composto **8** com 36 % de rendimento.

Propriedades físicas: sólido branco

EM (70 eV): m/z 358 (íon molecular não observado), 340 (2 %), 322 (2 %), 267 (10 %), 157 (100 %), 128 (78 %), 103 (36 %) e 43 (34 %).

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 4,02 (m, 1H, H-3), 3,71 (s, 3H, CH_3O), 3,60 (m, 1H, H-6), 2,53 (dd, $J=3,3, 16,5$ Hz; 1H, H-2), 2,42 (dd, $J=8,4, 16,5$ Hz; 1H, H-2), 1,56 (m, H-4), 1,43 (m, H-5 e H-6), 1,25 (m, H-7 – H-19), 0,88 (t, $J=6,2$, 3H, H-20)

5.6.1.4 Obtenção do mono-éster do (*S*)- e (*R*)-MTPA **9a** e **9b** - Derivados do Oncidinol



9a R-(*S*)-MTPA

9b R-(*R*)-MTPA

A uma solução de **8** (5 mg, 0.022 mmols) em CH_2Cl_2 (2 mL) a 0 °C, foram adicionados o ácido *S*-(-)- α -metoxi- α -(trifluormetil)-fenilacético (4.5 mg, 0.022 mmols), 4-dimetilaminopiridina (1 mg, 0.0081 mmol) e o hexadeciclocarbodimida (4.5 mg, 0.022 mmol), sequencialmente. Após 10 minutos o banho de gelo foi removido e a mistura foi agitada a temperatura ambiente e sob atmosfera de N_2 por 24 horas. A reação filtrada em uma coluna de sílica gel eluída com hexano/acetato de etila (8:1). Desta forma foi obtido o

mono-éster derivado do *S*-Mosher, **9a** (1,1 mg) 13,6 de rendimento e obtendo-se 3 mg do material de partida. O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção do mono-éster de *R*-Mosher **9b**.

Composto **9a**

Propriedades físicas: óleo incolor

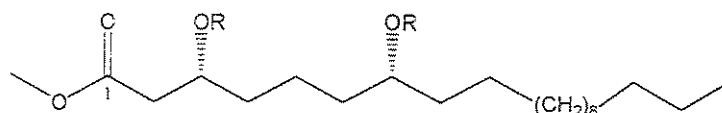
RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 0,87 (t, 3H, $J=6,41$ Hz, H-20), 1,26 (m, 20H, H-9-H-19), 1,54 (m, 8H, H-4, H-5, H-6, H-8- sinal sobreposto pelo sinal da água), 2,34 (dd, 1H, $J=8,9, 16,5$ Hz, H-2), 2,42 (dd, 1H, $J= 3,05, 16,5$ Hz, H-2), 3,72 (s, 3H, CH_3O), 3,56 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$) 3,88 (m, 1H, H-3), 5,09 (m, 1H, H-7), 7,39 (m, 3H, aromáticos - MTPA), 7,55 (m, 2H, aromáticos - MTPA).

Composto **9b**

Propriedades físicas: óleo incolor

RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J=7,02$ Hz, H-20), 1,25 (m, 20H, H-9-H-19), 1,55 (m, 8H, H-4, H-5, H-6, H-8- sinal sobreposto pelo sinal da água), 2,40 (dd, 1H, $J=8,9, 16,5$ Hz, H-2), 2,48 (dd, 1H, $J= 3,05, 16,5$ Hz, H-2), 3,72 (s, 3H, CH_3O), 3,55 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$) 3,97 (m, 1H, H-3), 5,09 (m, 1H, H-7), 7,52 (m, 3H, aromáticos - MTPA), 7,70 (m, 2H, aromáticos - MTPA).

5.6.1.5 Obtenção do di-éster (*S*)- e (*R*)-MTPA **10a** e **10b** – Derivados do Oncidinol



10a R-(*S*)-MTPA

10b R-(*R*)-MTPA

A uma solução de **8** (2 mg, 0.008 mmols) em CH_2Cl_2 (3 mL) a 0 °C sob atmosfera de N_2 , foram adicionados o ácido *S*-(-)- α -metoxi- α -(trifluormetil)-fenilacético (8 mg, 0.032 mmols), 4-dimetilaminopiridina (2 mg, 0.016 mmol) e o hexadeciclocarbodimida (7 mg 0,032), sequencialmente. Após 5 minutos o banho de gelo foi removido e a mistura foi agitada sobre refluxo (temperatura 40 °C) e sob atmosfera de N_2 por 24 horas. A reação filtrada em uma coluna de sílica gel eluída com CH_2Cl_2 . Desta forma foi obtido o di-éster derivado do *S*-Mosher, **10a** (1,0 mg) 22 % de rendimento. O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção do di-éster do *R*-Mosher, **10b** (1,0 mg).

Composto 10a

Propriedades físicas: óleo incolor

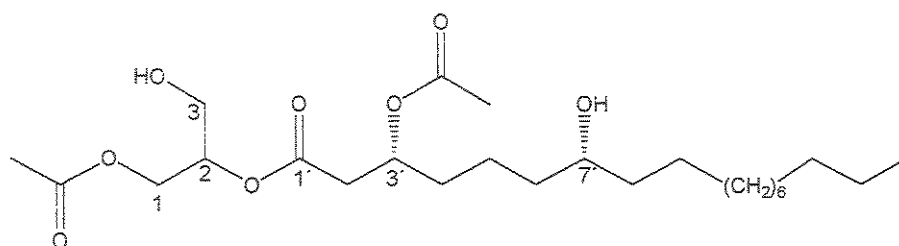
RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J=6,71$, Hz, H-20), 1,26 (m, 20H, H-9-H-19), 1,54 (m, 8H, H-4, H-5, H-6, H-8- sinal sobreposto pelo sinal da água), 2,44 (dd, 1H, $J=4,58$, 15,87 Hz, H-2), 2,55 (dd, 1H, $J=8,24$, 15,87 Hz, H-2), 3,50 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$), 3,55 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$), 3,59 (s, 3H, CH_3O), 5,36 (m, 1H, H-3), 5,04 (m, 1H, H-7), 7,40 (m, 4H, aromáticos - MTPAs) e 7,51 (m, 6H, aromáticos - MTPAs).

Composto 10b

Propriedades físicas: óleo incolor

RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J=7,02$ Hz, H-20), 1,26 (m, 20H, H-9-H-19), 1,54 (m, 8H, H-4, H-5, H-6, H-8- sinal sobreposto pelo sinal da água), 2,55 (dd, 1H, $J=4,88$, 15,87 Hz, H-2), 2,67 (dd, 1H, $J=8,24$, 15,87 Hz, H-2), 3,52 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$), 3,53 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-MTPA}$), 3,66 (s, 3H, CH_3O), 5,42 (m, 1H, H-3), 4,96 (m, 1H, H-7), 7,40 (m, 4H, aromáticos-MTPAs) 7,53, (m, 6H, aromáticos-MTPAs).

(3'R, 7'R)-1-acetil-2-(3'-acetoxi,7'-hidroxi-octadecanoil)-glicerol 11 – Óleo floral de *Oncidium pubes*



11

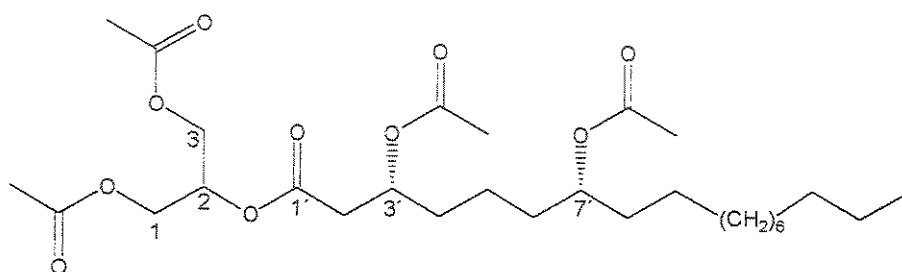
O óleo floral de *O. pubes* foi coletado de 40 flores frescas com papel de filtro. O óleo foi extraído do papel com acetato de etila (3 x 1 mL). O solvente foi evaporado obtendo-se 19 mg de óleo. Este óleo foi imediatamente analisado por RMN de ^1H , ^{13}C e CG/EM. Sendo identificado composto 11. Este óleo foi posteriormente purificado levando ao isômero 1-acetil-3-(3'-acetoxi,7'-hidroxi-octadecanoil)-glicerol 12. E este isômero foi utilizado para determinar a configuração dos seus centros assimétricos utilizando a mesma metodologia descrita para o Oncidinol 1. Para maiores detalhes veja resultados e discussões.

Propriedades físicas – óleo incolor

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δTMS) δ : 2,59 (m, 2H, H-2'), 5,22 (m, 1H, H-3'), 1,63 (m, 2H, H-4'), 1,39 (m, 1H, H-5'), 1,58 (m, 1H, H-5'), 1,43 (m, 1H, H-6'), 1,49 (m, 1H, H-6'), (m, 1H, 7'), 1,43 (m, 2H, H-8'), 1,25 (m, H-9' - H-17'), 0,88 (t, $J=6,7$ Hz, 3H, H-18'), 4,24 (dd, $J=5,2, 11,9$ Hz, 1H, H-1), 4,33 (dd, $J=4,3, 11,9$ Hz, 1H, H-1), 5,07 (m, 1H, H-2), 3,72 (dd, $J=5,5, 11,9$ Hz, 1H, H-3), 3,76 (dd, $J=5,2, 11,9$ Hz, 1H, H-3), 2,09 (s, $\text{CH}_3\text{CO-C3'}$), 2,11(s, $\text{CH}_3\text{CO-C1}$).

RMN de ^{13}C (125 MHz, δCDCl_3) δ : 170,5 (C-1'), 39,2 (C-2'), 70,4 (C-3'), 34,1 (C-4'), 21,2 (C-5'), 36,8 (C-6'), 71,6 (C-7'), 37,6 (C-8'), 25,6 (C-9'), 29,6 (C-10'-C-11'), 29,7 (12'-15'), 31,9 (C-16'), 22,7 (C-17'), 14,1 (C-18'), 62,4 (C-1), 72,31 (C-2), 61,04 (C-3), 170,2 ($\text{CH}_3\text{CO-C1}$), 170,6 ($\text{CH}_3\text{CO-C3'}$), 20,9 ($\text{CH}_3\text{CO-C1}$), 21,0 ($\text{CH}_3\text{CO-C3'}$).

5.6.1.6 (3'R, 7'R)-1,3-diacetil-2-(3',7'-diacetoxi-octadecanoil)-glicerol 12 – Óleo floral de *Oncidium pubes*

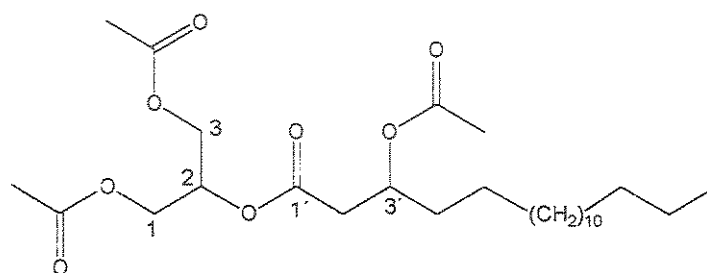


12

O óleo floral (2 mg) de *O. pubes* foi acetilado e purificado em coluna de sílica gel obtendo-se 0,5 mg do composto 12.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δTMS) δ : 2,58 (m, 2H, H-2'), 5,19 (m, 1H, H-3'), 1,25 (m, 28H, H-4' - H-17'), 0,88 (t, $J=6,6$ Hz, 3H, 18'), 4,13 (m, 2H, H-1, e H-3), 4,29 (m, 2H, H-1 e H-3), 5,25 (m, 1H, H-2), 2,08 ($2\text{CH}_3\text{CO-C-1}$ e $\text{CH}_3\text{CO-C-3}$), 2,04 ($\text{CH}_3\text{CO-C-3'}$), 2,03 ($\text{CH}_3\text{CO-C-7'}$).

5.6.2 Isolamento do 1,3-diacetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)-glicerol 18 derivado do óleo floral de *Zigostates lunata*



18

As flores de *Zigostates lunata* foram coletadas no orquidário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo (São Paulo-SP) em dezembro de 2003. O óleo floral foi coletado de 50 de flores frescas com papel de filtro. Obtendo-se 12 mg de óleo. 7 mg deste óleo foi acetilado com anidrido acético (10 µL) e piridina (0,1 mL). Após 30 minutos a reação foi tratada com solução sulfato de cobre. A mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 5 mL), as fases orgânicas foram reunidas e concentradas em rota evaporador rotativo. O resíduo (4 mg), obtido após a evaporação do solvente, foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 20 %, obteve-se o 1,3-diacetil-2-(3-acetoxi-octadecanoil)-glicerol (1 mg), na forma de um óleo incolor.

Propriedades físicas: óleo incolor

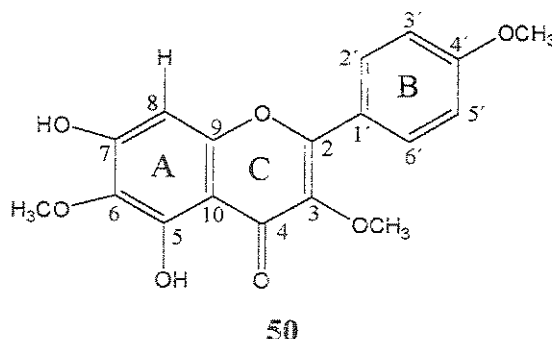
RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 2,60 (m, 2H, H-2'), 5,20 (m, 1H, H-3'), 1,25 (m, 28H, H-4' - H-17'), 0,88 (t, $J=6,6$ Hz, 3H, 18'), 4,14 (dd, $J=12,0, 5,8$ Hz, 1H, H-1), 4,29 (dd, $J=12,0, 9,2$ Hz, 1H, H-1), 5,25 (m, 1H, H-

2), 4,15 (dd, $J=12,0, 5,8$ Hz, 1H, H-3), 4,28 (dd, $J=12,0, 9,16$ Hz, 1H, H-3), 2,08(2 $\underline{\text{CH}_3\text{CO-C-1}}$ e $\underline{\text{CH}_3\text{CO-C-3}}$), 2,04 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-C-3'}}$).

RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) δ : 170,3 (1 C_q , C-1'), 2'; 39,09 (1 CH_2 , C-2'), 70,31 (CH, C-3'), 33,98 (CH_2 , C-4'), 25,10 (CH_2 , C-5'), 29,33 (CH_2 , C-6'), 29,36 (CH_2 , C-7') 29,52 (CH_2 , C-8'), 29,61 (CH_2 , C-9'), 29,63 (2 CH_2 , C-10'-11'), 29,67 (3 CH_2 , C-12'-15'), 31,91; (C-16'), 22,68 (CH_2 , C-17'), 14,11 (CH_3 , C-18') 62,18 (CH_2 , C-1), 69,25 (CH, C-2), 62,18 (CH_2 , C-3), 20,66 (CH_3 , $\underline{\text{CH}_3\text{CO-C-1}}$), 20,66 (CH_3 , $\underline{\text{CH}_3\text{CO-C-3}}$), 21,04 (CH_3 , $\underline{\text{CH}_3\text{CO-C-3'}}$), 169,59 ($\text{CH}_3\text{CO-C-1}$), 169,59 ($\text{CH}_3\text{CO-C-3}$), 170,48 ($\text{CH}_3\text{CO-C-3'}$)

5.6.3 Isolamento do 3,4',6-trimetoxi caempferol (santin)

50 das flores de *Ornithophora radicans*



As flores de *Ornithophora radicans* foram coletadas no orquidário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Piracicaba-SP) em fevereiro de 2003. 21,3g de flores frescas foram maceradas com acetato de etila e logo em seguida o extrato de acetato de etila obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo produzindo 1,8 g de extrato. O extrato foi purificado em coluna de sílica eluída com hexano/acetato de etila/trietilamina (1:1:0.01).

Desta coluna foram obtidas 30 mg do flavonóide 3,4',6-trimetoxi caempeferol, também conhecido como santin, que cristalizou em forma de agulhas.

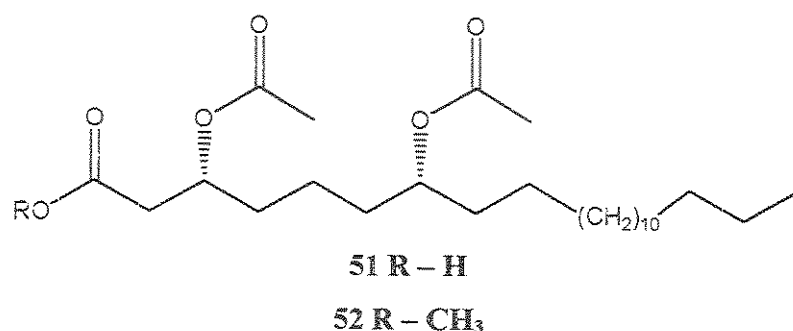
Propriedades físicas: sólido amarelo

EM (70 eV) m/z : íon molecular 344 (100%), 329 (40%), 301 (30%), 283 (28%), 258 (10%), 135 (18%), 69 (18%).

RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 3,81 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C3}$), 3,91 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C4}'$), 3,94 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C8}'$), 6,52 (s, 1H, H-8), 7,02 e 7,04 (*dft*, $^3J_{5',6'}=9,0$, $^4J_{5',3}=3,1$, $^5J_{5',2}=2,1$, 2H, H-3' e 5'), 8,06 e 8,08 (*dft*, $^3J_{5',6'}=9,0$, $^4J_{5',3}=3,1$, $^5J_{5',2}=2,1$, 2H, H-2' e 6'), 12,70 (s, 1H, HO-C5).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 55,1 (1 CH_3 , $\text{CH}_3\text{-C4}'$), 59,8 (1 CH_3 , $\text{CH}_3\text{-C3}$), 60,3 (1 CH_3 , $\text{CH}_3\text{-C6}$), 93,8 (1CH, C-8), 105,3 (1 C_q , C-10), 113,8 (2CH, C-3' e C-5'), 129,8 (2CH, C-2'-C-6'), 130,8 (1 C_q , C-6), 138,0 (1 C_q , C-3), 152,0 (1 C_q , C-9), 152,2 (1 C_q , C-5), 156,1 (1 C_q , C-7), 156,5 (1 C_q , C-2), 161,5 (1 C_q , C-4'), 178,0 (1 C_q , C-4).

5.6.4 *Byrsonima intermedia* - Isolamento do (3*R*,7*R*) –
3,7-diacetoxi-eicosanoato de metila 52 – Derivado do
Ácido Birsónico



As flores de *Byrsonima intermedia* foram coletadas no campus da Universidade de São Paulo (São Paulo-SP) em dezembro de 2003. 50,3g de flores frescas foram maceradas com acetato de etila e logo em seguida o extrato de acetato de etila obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo produzindo 0,68 g de extrato. O extrato foi metilado com diazometano e purificado em coluna de sílica eluída com hexano/acetato de etila (1,5:0,5). Desta coluna foram obtidas 35 mg de uma mistura de compostos cujos dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C e de cromatografia gasosa revelaram que a mistura era composta majoritariamente (aproximadamente 90%) de um único éster metílico. Esta mistura foi caracterizada por dados espectroscópicos.

Propriedades físicas: óleo incolor

$[\alpha]_D^{20} = +4,0^\circ$ (c. 2,0, CHCl₃)

RMN de ¹H (500 MHz; CDCl₃) δ: 3,68 (s, 3H, H-1'), 2,53 (dd, *J*=5,5 and 15,6 Hz, 1H, H-2), 2,58 (dd, *J*=7,6 and 15,6 Hz, 1H, H-2), 5,20 (m, 1H,

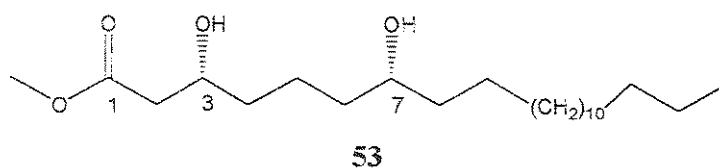
H-3), 1,61 (m, H-4), 1,38 (m, 1H, H-5), 1,25 (m, 1H, H-5), 1,53 (m, 2H, H-6), 4,84 (m, 1H, H-7), 1,53 (m, 2H, H-8) 1,25 (m, H-9 a H-21)

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 51,75 (CH_3 , C-1'), 170,36 (CH_q , C-1), 38,89 (CH_2 , C-2), 70,18 (CH , C-3), 33,70 (CH_2 , C-4), 20,92 (CH_2 , C-5), 33,75 (CH_2 , C-6), 73,89 (CH , C-7), 34,04 (CH_2 , C-8), 25,25 (CH_2 , C-9), 29,32 (CH_2 , C-10), 29,42 (CH_2 , C-11), 29,64 (2CH_2 , C-12 e C13), 29,62 (2CH_2 , C-14 e C-15), 29,61 (2CH_2 , C-16 e C-17), 29,53 (CH_2 , C-18), 29,48 (CH_2 , C-19), 31,87 (CH_2 , C-20), 22,64 (CH_2 , C-21), 14,07 (CH_3 , C-22), 170,76 (COCH_3 - C3), 21,16 (COCH_3 - C3)

IV (filme) ν_{max} cm^{-1} : 2923, 2852, 1740, 1458, 1430, 1241, 1022 cm^{-1} ;

EM-AR: Encontrada 470,360 (calculada 470,360); 378,343 (16 %), 350,313 (36 %), 157,078 (100 %) , 128,077 (43 %).

5.6.4.1 Obtenção do ácido (3*R*,7*R*)-3,7-diidroxi-docosanoato de metilas – Composto 53



A uma solução do 3,7- diacetoxi-docasanoato de metila (30 mg, 0,06 mmol) em THF/ H_2O /MeOH (1,2:0,4:0,4 mL) à 0 °C foi adicionado $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (7,56 mg, 0,18 mmol). Após a adição do hidróxido de lítio o banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 18 horas. A mistura reacional foi adicionado clorofórmio e em seguida foi adicionada solução de ácido acético a 70% até $\text{pH} = 7$. A fase orgânica foi

extraída com clorofórmio e concentrada em evaporador rotativo o extrato bruto da reação foi metilado com diazometano e em seguida purificado em coluna de sílica gel eluída com hexano/acetato (1:1) obtendo-se 10,6 mg com rendimento de 46 % na forma de um sólido branco amorfo.

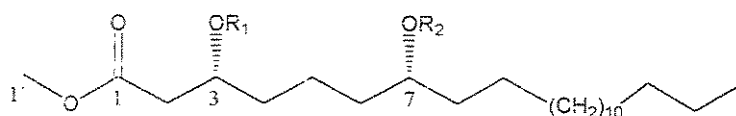
Propriedades físicas: sólido branco

EM (70 eV): m/z 386 (íon molecular não observado), 368 (2 %), 350 (2 %), 295 (10 %), 157 (100 %), 128 (78 %), 103 (36 %) e 43 (34 %).

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 4,05 (m, 1H, H-3), 3,71 (s, 3H, CH_3O), 3,60 (m, 1H, H-7), 2,97 (sl, 1H, OH-3), 2,52 (dd, $J=3,30$ and $16,48$, 1H, H-2) 2,42 (dd, $J=8,79$ e $16,48$, 1H, H-2), 1,40 (m, 6H, H-4, H-6 e H-8) 1,30 (m, 2H, H-5), 1,25 (m, 24H, H-9-H-21), 0,87 (t, $J=6.23$ Hz, 3H, H-22).

RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3) δ : 14,26 (C-22), 21,60 (C-5), 22,81 (C-21), 25,79 (C-9), 29,47 (C-10), 29,80 (C-11-C-19), 32,03 (C-20), 37,64 (C-8), 37,21 (C-6), 36,47 (C-4), 41,13 (C-2), 51,82 (CH_3O), 67,91 (C-3), 71,86 (C-7), 173,23 (C-1).

5.6.4.2 Procedimento para a obtenção dos ésteres de *R* e *S*-Mosher 54a, 54b, 55a e 55b derivados do ácido birsónico



54a, $\text{R}_1\text{-H}$, $\text{R}_2\text{-(S)}$ -MTPA

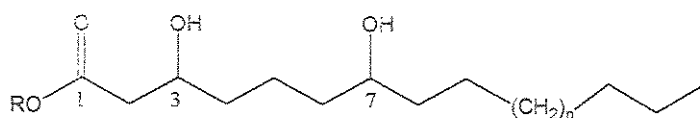
54b, $\text{R}_1\text{-H}$, $\text{R}_2\text{-(R)}$ -MTPA

55a $\text{R}_1\text{-(S)}$ -MTPA, $\text{R}_2\text{-(S)}$ -MTPA

55b $\text{R}_1\text{-(R)}$ -MTPA, $\text{R}_2\text{-(R)}$ -MTPA

Para obtenção dos derivados **54a**, **54b**, **55a** e **55b** foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente para obtenção dos derivados do Oncidinol **9a**, **9b**, **10a** e **10b**. Como eles apresentam a mesma configuração os espectros de RMN de ^1H também são idênticos.

5.6.5 Ninho de *Tetrapedia diversipes* – Ácido 3,7-diidroxi-eicosanóico **56** e ácido 3,7 – diidroxi-docosanóico **58**



56 R-H, n=8

57 R-Me, n=8

58 R-H, n=10

59 R-Me, n=10

O ninho da abelha *Tetrapedia diversipes* foi coletado assim que a fêmea terminou de prepará-lo pela Dra. Isabel Alves dos Santos no campus da Universidade de São Paulo em São Paulo em fevereiro de 2001. A massa alimentar (79 mg) de uma célula (o ninho de apenas uma larva) foi extraída por extração a frio com metanol durante 72 horas. Em seguida, o extrato metanólico foi concentrado a vácuo em evaporador rotativo obtendo-se assim 34 mg de extrato da massa alimentar. A análise deste extrato por CCD eluída com acetato de etila:hexano (8:2) revelou que ele é composto por substâncias polares. Desta forma a fase metanólica metilada com diazometano e em

seguida solubilizada em acetato de etila. Obtendo-se 3,0 mg de extrato de acetato de etila. Esta fração foi analisada por CG/EM. Em seguida a fração foi purificada em coluna de sílica gel levando a 1 mg de uma mistura de composto contendo os compostos 57 e 59.

Propriedades físicas: sólido branco

Composto 57 - EM (70 eV): m/z 358 (íon molecular não observado), 340 (2 %), 322 (2 %), 267 (10 %), 157 (100 %), 128 (78 %), 103 (36 %) e 43 (34 %).

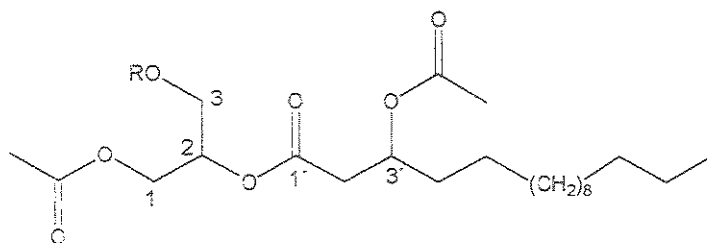
Composto 59 EM (70 eV): m/z 386 (íon molecular não observado), 368 (2 %), 350 (2 %), 295 (10 %), 157 (100 %), 128 (78 %), 103 (36 %) e 43 (34 %).

Compostos 57 e 59

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 4,02 (m, 1H, H-3), 3,78 (s, 3H, CH_3O), 3,59 (m, 1H, H-7), 2,97 (sl, 1H, OH-3), 2,04 (sl, 1H, OH-7), 2,53 (dd, $J=3,30$ and $16,48$, 1H, H-2) 2,42 (dd, $J=8,79$ e $16,48$, 1H, H-2), 1,47 (m, 6H, H-4, H-6 e H-8) 1,47 (m, 2H, H-5), 1,25 (m, 24H, H-9 a H-19 ou H-9-H-21), 0,87 (t, $J=7,0$ Hz, 3H, H-18 ou H-22).

RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3) δ : 14,12 (C-18 ou C-22), 21,46 (C-5), 22,68 (C-21), 25,65 (C-9), 29,35 (C-10), 29,68 (C-11 à C-17 ou à 19), 31,91 (C-18, ou C-20), 37,09 (C-8), 37,52 (C-6), 36,22 (C-4), 41,13 (C-2), 51,82 (CH_3O), 67,86 (C-3), 71,80 (C-7), 173,23 (C-1).

5.6.6 *Calceolaria x herbeohybrida* – 1-acetil-2- (3'-
acetoxi-hexadecanoil)-glicerol 60



60 R-H

61 R- COCH₃

As plantas de *Calceolaria x herbeohíbrida* foram compradas em uma floricultura no Distrito de Barão Geraldo – Campinas – SP. As flores (87g) foram extraídas com acetato de etila (300 mL) a frio por 1 hora. O solvente foi removido em evaporador rotativo obtendo-se 143 mg de extrato. Deste extrato, 98 mg foram purificadas em coluna de sílica gel eluída com hexano:acetato de etila (7:3) obtendo-se 6,1 mg de **60**. O restante do extrato bruto (45 mg) foi acetilado e após purificação foi obtido 1,1 mg do produto acetilado **61**.

Composto 60

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ: 2,36 (m, 2H, H-2'), 5,21 (m, 1H, H-3'), 1,59 (m, 2H, H-4'), 1,25 (m, H-5' à H-15'), 0,87 (t, J=6,22, 3H, H-16'), 4,21 (dd, J=5,49, 12,0, 1H, H-1), 4,29 (dd, J=4,39, 12,0, 1H, H-1), 5,07 (m, 1H, H-2), 3,73 (m, 2H, H-3), 2,07 (s, 3H, COCH₃-C1), 2,05 (s, 3H, COCH₃-C3').

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ: 170,9 (1'), 39,6 (2'), 70,7 (3'), 34,3 (4'), 25,1 (5'), 29,3 (6'e 7'), 29,4 (8'e 9'), 29,6 (10'-11'), 29,5 (12'-13'), 31,9

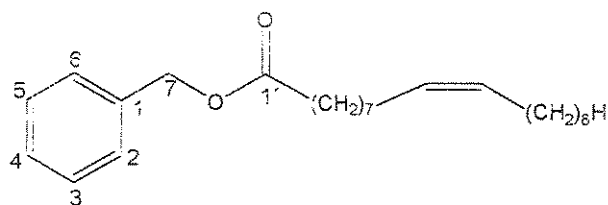
(14'), 22,7 (15'), 14,1 (16'), 62,2 (1), 72,8 (2), 61,3 (3), 170,9 ($\text{COCH}_3\text{-C1}$), 20,7 ($\text{COCH}_2\text{-C1}$), 170,1 ($\text{COCH}_3\text{-C3'}$), 21,1 ($\text{COCH}_2\text{-C3'}$).

Composto 61

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 2,59(m, 2H, H-2'), 5,20 (m, 1H, H-3'), 1,57 (m, 2H, H-4') (sobreposto pelo sinal de H_2O), 1,25 (m, H-5' à H-15'), 0,88 (t, $J=5,9$, 3H-16'), 4,14 (m, 1H, -1 e H-3), 4,28 (m, 1H, H-1 e H-3), 5,26 (m, 1H, H-2), 2,07 (s, 6H, $\text{COCH}_2\text{-C1}$ e C-2), 2,03 (s, 3H, $\text{COCH}_2\text{-C3'}$).

5.7 Síntese de padrões

5.7.1 Obtenção do oleato de benzila 47



47

A uma solução do álcool benzílico (200 mg, 1,85 mmols) em diclorometano (5 mL), a 0°C sob atmosfera de nitrogênio adicionou-se ácido oléico (574 mg, 2,03 mmols) e quantidade catalítica de 4-dimetilaminopiridina, DMAP, (2,5 mg). À solução adicionou-se 1,3-diciclohexilcarbodiimida - DCC (418 mg, 2,03 mmol) sob agitação. Imediatamente depois da adição de DCC uma suspensão branca de DCC hidratado, dicicloexiluréia, DCU, se forma. Depois de 24 horas a temperatura

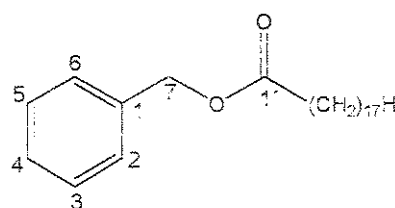
ambiente, filtrou-se a mistura reacional através de celite e o filtrado foi evaporado a vácuo em evaporador rotativo. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 20%, obteve-se o oleato de benzila (499 mg, 72 % de rendimento), na forma de um óleo incolor.

Propriedades físicas: óleo incolor

IV (filme) ν_{max} , cm^{-1} : 2925, 2854, 1704, 1456, 1164.

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (3H, t, $J=6,9$ Hz, H-18'), 1,27 (20H, m, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-12', H-13', H-14', H-15' e H-16'), 1,64 (2H, m, H-17'), 2,00 (4H, m, H-8' e H-11'), 2,34 (2H, t, $J=7,5$ Hz, H-2'), 5,10 (2H, s, H-7), 5,33 (2H, m, H-9' e H-10'), 7,34 (5H, s, H-1, H-2, H-3, H-4, H-5)

5.7.2 Obtenção do octadecanoato de benzila 48



48

Em um balão foi adicionado o éster, 47 (82 mg, 0,23mmol), metanol (90 μL) e acetato de etila (110 μL). A esta solução foi adicionado platina sob carvão (195 mg, 0,002 mmol). A este balão foi inseridos uma bexiga com hidrogênio. A reação permaneceu sob agitação por 24 horas a temperatura

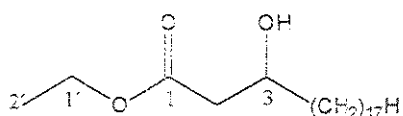
ambiente. Foi adicionado acetato de etila na reação. A mistura reacional foi filtrada sob celite. O filtrado foi evaporado e forneceu 75 mg de material na forma de cristais brancos, com rendimento de 92%.

IV (filme) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 2919,43, 2849,64, 1736,51, 1463,05, 1389,03, 1170,1, 954,206 cm^{-1}

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (3H, t, $J=6.9$ Hz, H-18'), 1,25 (28H, m, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-9', H-10', H-11', H-12', H-13', H-14', H-15', H-16 e H-17'), 2,34 (2H, t, $J=7.7$ Hz, H-2'), 5,11 (2H, s, H-7), 7,33 (5H, s, H-1, H-2, H-3, H-4, H-5).

RMN de ^{13}C (75.45 MHz, CDCl_3): δ : 14.74 (CH_3 , C-18'), 22.8 (CH_2 , C-16'), 25,1 (CH_2 , C-3'), 29,2 (CH_2 , C-3'-C-4'), 29,3 (CH_2 , C-5'-C-6'), 29,4 (CH_2 , C-7' ao C-11), 29,8 (CH_2 , C-11' ao C-15'), 32,0 (CH_2 , C-16'), 34,4 (CH_2 , C-2), 128,5 (3CH, C-3, C-4, C-5), 128,9 (2CH, C-2 e C-6), 136,5 (1C_q, C-1), 174,0 (1CO, C-1')

5.7.3 Obtenção do 3-hidróxi-eicosanoato de etila 62



62

O aldeído utilizado na síntese deste produto foi obtido a partir da oxidação do octadecanol com PFC (flúor cromato de piridinium).

Preparação do PFC – Em um balão de 250 mL foi adicionado óxido de cromo (10g 0,1mol) e adicionaram-se 18 mL de solução de ácido fluorídrico (6N). Sobre esta solução foi adicionado, durante 5 minutos e a 40°C, 8,1 mL de piridina. Resfriou-se a 10°C até formar uma precipitado

laranja (cerca de 3 horas). Aqueceu-se novamente a 40°C e adicionaram-se 83 g de alumina neutra. Deixou-se sob vácuo por 1 hora à 100°C. O equivalente de oxidação médio é de 1mmol/g.

Preparação do Octadecanal – Em um balão foi dissolvido o álcool (2,5 g, 9 mmol) em 40 mL de diclorometano e adicionado 9 g de PFC. A reação permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 5 horas. A mistura reacional foi filtrada em uma coluna de sílica gel eluída com diclorometano, obtendo-se 960 mg do aldeído puro com rendimento de 40%.

Em um balão flambado, sob atmosfera inerte (argônio) à -78 °C foi adicionado 17,6 mL de THF seco. Diisopropilamina seca foi adicionada gota-a-gota (605,6 µL, 4,2 mmol). A esta solução foi adicionado n-butilítio gota-a-gota (3,0 mL de solução em hexano a 1,35M, 4,2mmol). A mistura permaneceu sob agitação durante 20 minutos à - 78°C. Após este período foi adicionado uma solução de acetato de etila seco 0,5 M, em THF seco (368,8 µL, 3,7 mmol) gota-a-gota. Permaneceu sob agitação durante 20 minutos à - 78°C e à 0 °C por 10 minutos. Voltou-se à - 78°C e adicionou-se a mistura reacional uma solução de 0,5 M do octadecanal em THF seco (1000mg, 3,7 mmols) gota a gota. A reação permaneceu sob agitação durante 40 minutos à - 78°C e por 10 minutos a 0 °C. Por fim foram adicionadas 50 mL de solução saturada de NH₄Cl_(aq). Foi deixado chegar a temperatura ambiente e extraído com éter etílico e lavada com solução saturada de NaCl_(aq). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro filtrada e evaporada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 20%, obteve-se o 3-hidróxi-eicosanoato de etila (700 mg, 73 % de rendimento), na forma de um óleo incolor.

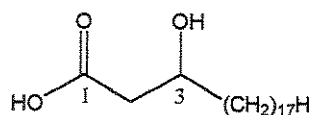
Propriedades físicas: Óleo incolor

IV (filme) $\nu_{\max}$. cm^{-1} : 3440, 2924, 2853, 1725, 1464 cm^{-1}

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (3H, t, $J=6,6$ Hz, H-20), 1,32 (28H, m, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15 e H-16), 2,39 (1H, dd, $J=16$ Hz e 8,8 Hz, H-2) 2,50 (1H, dd, $J=16$ Hz e 3,3 Hz, H-2) 2,96 (1H, s, OH), 4,00 (1H, m, H-3) 5,71 (3H, q, $J=6,9$ Hz, H-2')

RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3): δ : 14,4 (CH_3 , C-20), 14,5 (1CH_3 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 23,0 (CH_2 , C-17), 25,78 (CH_2 , C-5), 29,10 (CH_2 , C-6), 29,67, (CH_2 , C-7, C-8, C-9, C-10) 29,90 (CH_2 , C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 32,2 (1CH_3 , C-20), 36,80 (1CH_2 , C-4), 41,54 (1CH_2 , C-2), 60,89 (1CH_2 , C-2'), 68,27 (CH , C-3).

5.7.4 Obtenção do ácido 3-hidróxi-eicosanóico 63



63

A uma solução do composto **62** (100 mg, 0.28 mmol) em THF/ H_2O /MeOH (3:1:1, 7,5 mL) á 0 °C foi adicionado $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (47 mg, 1,22 mmol). A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 1 hora. À mistura reacional foi adicionado clorofórmio e em seguida foi neutralizada até pH = 7 com solução de ácido acético a 70%. A fase orgânica foi extraída com acetato de etila e concentrada em evaporador rotativo obtendo-se 87 mg do produto que não precisou ser purificado, 95 % de rendimento.

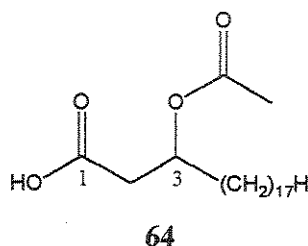
Forma física: Sólido branco

IV (filme) ν_{max} cm^{-1} : 3532, 2915, 2848, 1684, 1470.

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 0,82 (3H, t, $J=7,0$ Hz, H-20), 1,32 (13 H, m, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15 e H-16), 2,38 (1H, dd, $J=16,1$ Hz e 8,8 Hz, H-2) 2,49 (1H, dd, $J=16,1$ Hz e 3,7 Hz, H-2), 4,10 (1H, m, H-3)

RMN de ^{13}C (300 MHz; CDCl_3) δ : 13,64 (1 CH_3 , C-20), 22,36 (1 CH_2 , C-19), 25,22 (1 CH_2 , C-5), 29,04, 29,30, 29,37 (12 CH_2 , C-6 a C-17), 31,37 (1 CH_2 , C-18), 36,42 (1 CH_2 , C-4), 41,24 (1 CH_2 , C-2), 67,78 (1CH, C-3), 174,51 (1 C_q , C-1).

5.7.5 Obtenção do ácido 3-acetoxi-eicosanóico 64



A uma solução do álcool (87 mg, 0,26 mmol) em piridina (0,5 mL), adicionou-se anidrido acético (0,1 mL), sob agitação a temperatura ambiente. Após 30 minutos a reação foi tratada com solução sulfato de cobre. A mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo. Foram obtidos 92 mg do produto, que não precisou ser purificado, com rendimento de 96 %.

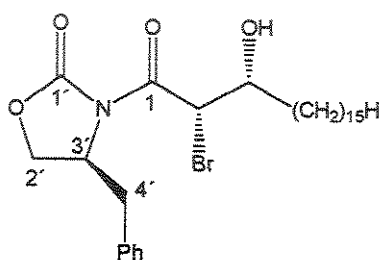
Forma física: Sólido branco

IV (filme) ν_{max} cm^{-1} : 2917 2849, 1735, 1707.

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (3H, t, $J=7,0$ Hz, H-20), 1,25 (13H, m, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15 e H-16), 2,04 (3H, s, CH_3), 2,61 (2H, m, H-2) 5,20 (1H, m, H-3).

RMN de ^{13}C (300 MHz; CDCl_3) δ : 14,22 (1 CH_3 , C-20), 21,18 (1 CH_3 , CH_3CO), 22,78 (1 CH_2 , C-19), 25,21 (1 CH_2 , C-5), 29,43, 29,54, 29,61, 29,77 (12 CH_2 , C-6 a C-17), 31,99 (2 CH_2 , C-18 e C-2), 34,04 (1 CH_2 , C-4).

5.7.6 Obtenção do (2*S*, 3*R*, 4*R*)-(2-bromo, 3-hidroxi-octadecanoil)-4-benzil-2-oxazolidinona 66



66

A uma solução de 1,0 mmol de TiCl_4 (2 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_{2(\text{seco})}$) a -78°C sob atmosfera de argônio e agitação magnética foi adicionada gota-a-gota uma solução de oxazolidinona (260 mg, 0,8 mmol) em $\text{CH}_2\text{Cl}_{2(\text{seco})}$ (1,6 mL). A mistura foi agitada por 15 min formando uma coloração laranja. O enolato de titânio é formado após a adição de 1,0 mmol de diisopropilamina em 1mL de CH_2Cl_2 formando uma coloração vermelho escuro. A mistura reacional foi agitada nesta temperatura por 1 hora, e então foi adicionado uma solução de aldeído 1 mmol (2 mL de CH_2Cl_2) a -78°C gota-a-gota. Após a total adição do aldeído a temperatura foi elevada para 0°C . A reação foi mantida nesta temperatura sob agitação magnética por 2 horas. A reação foi tratada com

solução saturada de NH_4Cl , e deixou-se a mistura chegar a temperatura ambiente. A reação foi extraída com éter etílico obtendo-se 0,7 mg de extrato bruto. O extrato foi purificado em coluna de sílica gel eluída com hexano/acetato de etila/trietilamina (7,5:2,4:0,1). Obtendo-se 0,21 mg do composto **26** (66 %).

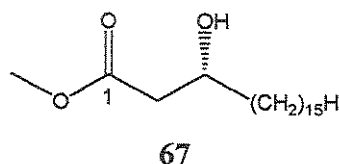
Forma física: óleo incolor

IV (filme) ν_{max} . cm^{-1} : 3464, 2917, 2850, 1788, 1698, 1697, 1393, 1212.

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (*t*, 3H, $J=6,94$ Hz, H-18), 1,52 (*m*), 2,8 (*dd*, 1H, $J=13,3, 9,5$ Hz, H-5'a), 3,3 (*dd*, 1H, $J=13,3, 9,5$, H-5'b), 4,30 (*m*, 3H, H-2' e H-3'), 3,94 (*m*, 1H, OH), 4,71 (*m*, 1H, H-3), 5,69 (*d*, $J=3,3$, 2H, H-2), 7,27 (*m*, 5H, aromáticos)

RMN de ^{13}C (300 MHz; CDCl_3) δ : 14,19 (CH_3 , C-18), 22,75 (CH_2 , C-17), 25,44 (CH_2 , C-5), 29,40 (CH_2 , C-6 e C-7), 29,70 (CH_2 , C-8 a C-15), 31,97 (CH_2 , C-16), 34,63 (CH_2 , C-4), 37,91 (CH_2 , C-4'), 50,66 (CH , C-2), 55,69 (CH , C-3'), 66,52 (CH_2 , C-2'), 70,61 (CH , C-3), 127,45 (CH , aromático), 128,92 e 129,244 (4CH, aromáticos).

5.7.7 Obtenção do 3*R*-hidroxi-eicosanoato de metila **67**



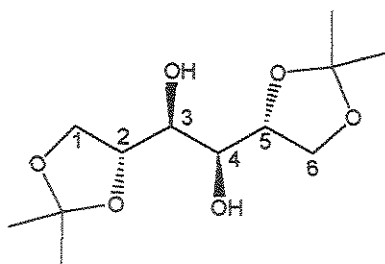
A uma solução do composto **66** (**66a/66b**) (0,008 mg, 0,015 mmol) em DME (2 mL), foi adicionado quantidade catalítica de AIBN (0,001). A reação

foi agitada à 80 °C durante 5 horas e Bu_3SnH (4,9 μL , 0,018) foram adicionados. Após 12 horas foi adicionado 0,2 mL de solução aquosa saturada de NH_4Cl e 0,2 mL de solução aquosa 10% de KF . A mistura foi agitada durante 1 h à temperatura ambiente e foram adicionados 5 mL de Et_2O . As fases foram separadas, a fase aquosa foi extraída com (3 x 3 mL) de Et_2O , a fase orgânica foi seca com NaSO_4 . O solvente foi evaporado sob pressão reduzida obtendo-se 5,1 mg. O extrato bruto foi utilizado na reação seguinte sem purificação prévia. A uma solução do extrato (5,1 mg, 0,012 mmol) em THF (0,01 mL) a 0 °C foi adicionado H_2O (0,01 mL), H_2O_2 aq 30 % e uma solução de $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1mg, 0,024) em água (0,01 mL). A mistura foi agitada por 5 horas e então foi adicionado Na_2SO_3 (6,0, 0,048) em água (0,1 mL) foi adicionado e agitado por 16 horas a ta. A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3 x 1 mL). Os extratos combinados foram secos com NaSO_4 , filtrados e o solvente foi removido sob pressão reduzida obtendo-se a (S)-4-benzil-2-oxazolidinona (1,6 mg). A fase aquosa foi acidificada até pH=4 com HCl aq. 1M e extraído com acetato de etila (3 x 3 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com NaSO_4 , filtrado e evaporado em rotaevaporador rotativo. O resíduo metilado com diazometano e purificado por cromatografia em sílica gel impregnada com trietilamina eluída com Hexano/Acetato de etila (9:1) obtendo-se 1,5 mg do composto 67 com *ee* de 66 % (33 % de rendimento em três etapas).

RMN de ^1H δ : 0,88 (*t*, 3H, $J=6,94$ Hz), 1,52 (*m*, 28H), 2,41 (*dd*, 1H, $J=16,4$, 8,79, H-2a), 2,52 (*dd*, 1H, $J=16,4$, 3,29, H-2b), 3,54 (*s*, 3H, CH_3), 4,01 (*s*, 1H, OH)

5.7.8 Estudos sintéticos visando a síntese de (2S)-1,2-diacilgliceróis

5.7.8.1 1,2:5,6 – Diisopropilideno-D-manitol 68



68

Tratamento do cloreto de zinco- Em um balão foi adicionado 19,2 g de cloreto de zinco úmido e aquecido até fundir sobre bico de Bunsen. O aquecimento foi mantido e com auxílio de uma linha de vácuo reduziu-se a pressão dentro do balão, observou-se imediatamente a formação de uma coloração amarelada, neste instante o vácuo foi interrompido inserindo-se um fluxo de gás seco inerte (N₂), e o balão foi resfriado em dessecador. O cloreto de zinco foi em seguida utilizado na reação.

A uma solução de cloreto de zinco (19g, 140 mmol) em acetona (126 mL) adicionou-se D-manitol (10.8 g, 56,3 mmol) sob atmosfera de nitrogênio, a 0 °C e deixou-se sob agitação por 30 minutos e à temperatura ambiente durante 20 horas. Em seguida adicionou-se acetato de etila (150 mL) e solução saturada de NaCl (150 mL). A fase aquosa foi extraída com acetato de

etila (3 x 150 mL), e em seguida fase orgânica foi lavada com solução de hidróxido de amônia a 5% (2 x 100 mL) e tratada com sulfato de sódio anidro. A fase orgânica foi evaporada até secar (10,9 g). Ao resíduo foi adicionado éter de petróleo. A mistura foi aquecida até ebulição durante 40 minutos. O D-manitol que não reagiu, permaneceu insolúvel no éter de petróleo e foi removido por filtração a quente. Com o resfriamento houve cristalização em forma de agulhas brancas e após filtração obteve-se o 1,2:5,6 – Diisopropilideno-D-manitol cristalino 7,6g, (51.3%).

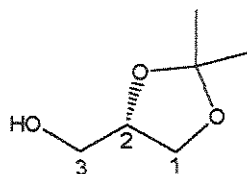
Forma física: Sólido branco

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

RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 1,39 (6H, s, 2CH_3); 1,41 (6H, s, 2CH_3); 2,68 (2H, OH); 3,74 (2H, t, $J = 6,4$ Hz, H-3 e H-4); 3,98 (2H, dd, $J = 5,6$ e $8,4$ Hz, H-1' e H-6'); 4,12 (2H, dd, $J = 5,8$ e $8,1$ Hz, H-1 e H-6); 4,18 (2H, ddd, $J_{1,2}=J_{2,3}=J_{3,4} = 6,4$ Hz, H-2 e H-5)

RMN ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) δ : 109,63 (2C, C_0); 76,45 (2C, C-3 e C-4); 71,39 (2C, C-2 e C-5); 66,98 (2C, C-1 e C-6); 25,43 (2C, C-7 e C-8); 26,96 (2C, C-7' e C-8')

5.7.8.2 1,2-(*S*)-O-Isopropilideno-D-glicerol 69



69

A uma suspensão de 1,2:5,6-diisopropilideno-D-manitol (3,0g, 11.4 mmol) em solução aquosa de bicarbonato de sódio (5%, 30 mL), sob agitação

vigorosa, a 0°C, adicionou-se 7 mL de solução de periodato de sódio (M = 2 mol em água), gota a gota. A agitação foi mantida durante uma hora a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado etanol (90 mL) para precipitar o iodato de sódio, removido do meio reacional por filtração.

O filtrado contendo o (2*R*)-1,2-O-Isopropilideno-gliceraldeído, foi resfriado a 0°C, tratado com boroidreto de sódio (0,85g, 22,88 mmol) e mantida sob agitação durante 2 horas. A mistura reacional foi filtrada e o filtrado foi concentrado a um volume de aproximadamente 20 mL. Adicionou-se clorofórmio (20 mL) e o ácido acético que foi cuidadosamente adicionado, a 0°C com agitação, até pH 8. Após 10 minutos, a mistura foi extraída com clorofórmio (6 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e evaporadas sob vácuo, fornecendo o álcool bruto (3,7g), o qual foi destilado em aparelho horizontal do tipo “Kugelrohr” a 60 °C (a pressão menor que 10 mmHg), obtendo-se um óleo incolor cujo os dados físicos e espectrais são idênticos aos já citados na literatura para o (2*S*)-1,2-O-isopropilideno-D-glicerol (2.1g, 63%).

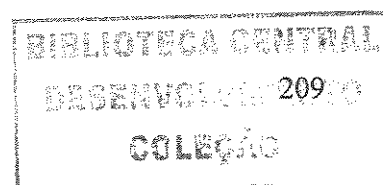
Forma física: Óleo incolor

$[\alpha]_D^{20} = +10,9^\circ$ (c. 23,4, MeOH) [Lit.¹. $[\alpha]_D^{20} = -10,9^\circ$ (c. 1, MeOH), correspondente ao enantiômero-oposto-(2*R*)-1,2-O-Isopropilideno-D-glicerol]

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

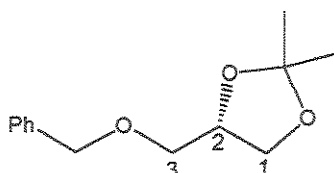
RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 1,38 (3H, s, H-4'), 1,45 (3H, s, H-4), 2,24 (1H, sl, OH), 3,60 (1H, dd, $J = 5,1$ and $11,7$ Hz, H-1'), 3,73 (1H, dd, $J = 3,7$ and $11,7$ Hz H-1), 3,81 (1H, dd, $J = 6,6$ e $8,4$ Hz H-3'), 4,04 (1H, dd, $J = 6,6$ e $8,1$ Hz H-3), 4,24 (m, 1H, H-2),

RMN ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) δ : 26,64 (1C, C-4'), 25,21 (1C, C-4), 62,95 (1C, C-1), 65,65 (1C, C-3), 76,12 (1C, C-2), 109,37 (1C, C₀),



5.7.8.3 Obtenção do (2*S*)-1,2-isopropilideno-3-benzil-glicerol

70



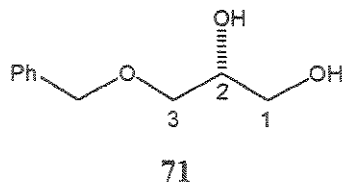
70

Uma solução do 1,2-isopropilideno-glicerol (1 g, 7,5 mmol) em THF_(seco) foi adicionado gota-a-gota a uma suspensão de NaH (0,3 g, 12,5 mmol) em 20 mL de THF_(seco). A mistura reacional foi refluxada por 30 min. O brometo de benzila (1 mL, 7,5 mmol) foi adicionado gota-a-gota. A reação permaneceu sob refluxo e foi monitorada por CCD. Aproximadamente 1 hora depois da adição todo isopropilideno havia sido consumido. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente. Foi adicionado H₂O cautelosamente para eliminar o excesso de NaH. A reação foi extraída com éter e solução saturada de NaCl. As fases orgânicas foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo. Obtendo-se 1,2 g de um óleo incolor que foi utilizado na reação seguinte sem purificação prévia.

IV (filme) $\nu_{\text{max. cm}^{-1}}$: 2987, 2935, 1454, 1380, 1071.

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 1,36 (*s*, 3H, CH₃), 1,42 (*s*, 3H, CH₃), 3,46 (*dd*, *J*=9,9, 5,49 Hz, 1H, H-1a), 3,56 (*dd*, *J*=9,9, 5,4 Hz, 1H, H-1b), 3,73 (*dd*, *J*= 8,1, 6,2 Hz, 1H, H-3a), 4,05 (*dd*, *J*=8,1, 6,2 Hz, 1H, H-3b), 4,30 (*qt*, *J*=5,86 Hz, 1H, H-2), 7,32 (*m*, 5H, Ar).

5.7.8.4 Obtenção do (2*R*)-3-benzil-glicerol 71



Ao 1,2-isopropilidenol-3-benzil-glicerol (0,5 g, 2,40 mmol) foi adicionado 2 mL de solução de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ a 70 %, a mistura reacional permaneceu sob agitação durante 2 horas. A reação foi extraída com éter. As fases orgânicas foram reunidas e concentradas em rotaevaporador rotativo. Obtendo-se 242 mg (60%) do 3-benzil-glicerol.

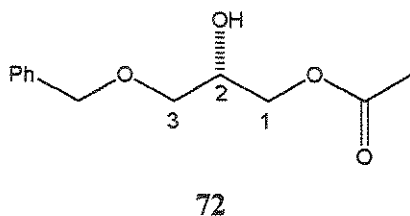
Propriedades físicas: óleo incolor

IV (filme) ν_{max} , cm^{-1} : 3384, 2869, 1454, 1066, 698.

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 3,33 (s, 2H, C-1), 3,52 (*dd*, 1H, $J=11,0, 6,0$ Hz, H-1), 3,63 (*dd*, 1H, $J=11,0, 3,9$ Hz, H-3), 3,86 (m, 1H, C-2), 7,33 (*m*, 5H, Ar)

RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) δ : 63,91 (CH_2 , C-1'), 70,73 (CH, C-1), 71,55 (CH, C-3), 127,62, 128,28 e 128,82 (CH, aromáticos), 137,46 (C-2').

5.7.8.5 Obtenção do (2*S*)-1-acetil-3-benzil-glicerol 72



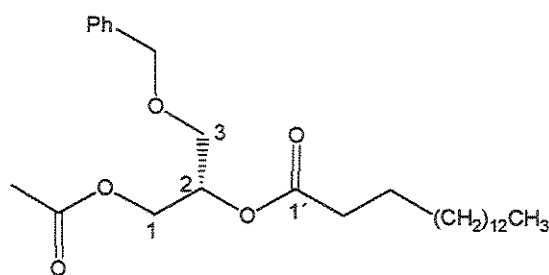
A uma solução do álcool 3-benzil-glicerol (200,00 mg, 1,09 mmol) em piridina (0.2 mL), adicionou-se anidrido acético (112 mg, 1,09 mmol), sob agitação a temperatura ambiente. Após 30 minutos a reação foi tratada com solução sulfato de cobre. A mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL), as fases orgânicas foram reunidas e concentradas em rota evaporador rotativo obtendo-se o 1-acetil,3-benzil-glicerol. O resíduo (190 mg), obtido após a evaporação do solvente, foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 20 %, obteve-se o 1-acetil-3-benzil-glicerol (93 mg, 38 % de rendimento), na forma de um óleo incolor.

Propriedades físicas: óleo incolor

IV (filme) $\nu_{\max}$, cm^{-1} : 3426, 1738, 1245, 1096, 1046, 699.

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 2,07 (s, 3H, CH_3), 2,58 (sl, OH), 3,52 (dd, 1H, $J=11,0$, 4,39 Hz, H-1), 4,05 (sl, 1H, H-2), 4,15 (dd, 1H, $J=8,1$, 4,39 Hz, H-3), 4,55 (s, 2H, CH_2), 7,33 (m, 5H, Ar).

5.7.8.6 Obtenção do (2*S*)-1-acetil-2-hexadecanoil -3-benzil-glicerol 73



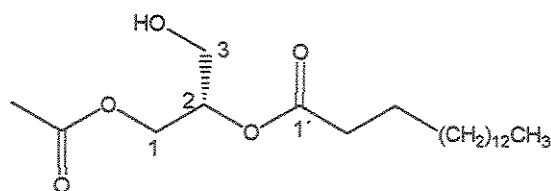
73

A uma solução do álcool 73 (30 mg, 0,14 mmols) em diclorometano (1 mL), a 0°C sob atmosfera de nitrogênio adicionou-se ácido palmítico (53 mg, 0,21 mmols) e quantidade catalítica de 4-dimetilamino-piridina, DMAP, (0,2 mg). À esta solução adicionou-se 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCC, (43 mg, 0,21 mmol) sob agitação. Imediatamente depois da adição de DCC uma suspensão branca de DCC hidratado, dicicloexiluréia, DCU, se forma. Depois de 48 horas a temperatura ambiente, filtrou-se a mistura reacional através de celite e o filtrado foi evaporado a vácuo em evaporador rotativo. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Eluindo-se a coluna cromatográfica, com uma mistura de hexano/acetato de etila a 20%, obteve-se o 1-acetil-2-palmitoil-3-benzil-glicerol (31mg, 50 % de rendimento aproximadamente), na forma de um óleo incolor.

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J=6,94$ Hz), 1,25 (m, 28H), 2,03 (s, 3H, CH_3), 3,58 (d, 2H, $J=5,13$ Hz, H-3), 4,18 (dd, $J=12,0, 6,59$ Hz, 1H, H-1), 4,33 (dd, $J=12,0, 3,66$ Hz, 1H, H-1), 4,53 (m, 2H), 5,23 (m, 1H), 7,31 (m, 5H).

RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) δ : 14,22 (C-16'), 20,83 (CH_3CO), 22,79 (C-15'), 25,06 (C-3'), 29,36 (C-4'), 29,44, 29,44, 29,57, 29,71, 29,73, 29,78 (C-3'-C-13'), 32,00 (C-14') 34,40 (C-2'), 62,96 (CH_2 -benzil), 69,95 (CH_2O), 70,32 (C-2), 73,30 (CH_2O), 127,49 (CH-aromático), 128,28 (CH-aromático), 170,37 (CO), 172,89 (CO).

5.7.8.7 Obtenção do (2*S*)-1-acetil-2-hexadecanoil -glicerol 74



74

Em um balão foi adicionado o éster, 74 (15 mg, 0,032 mmol), metanol (0,1 mL) e acetato de etila (0,3 mL). A esta solução foi adicionada platina sob carvão ativado (195 mg, 0,002 mmol). A este balão foi inserida uma bexiga com hidrogênio. A reação permaneceu sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente. Adicionou-se acetato de etila na reação e esta depois foi filtrada sob celite. A bruto da reação foi analisado por CG/EM e revelou a presença de grande parte do material de partida e o 1,2- e 1,3-diacilglicerol na proporção de 1:1 como discutido na parte de resultados e discussões.

6 Espectros

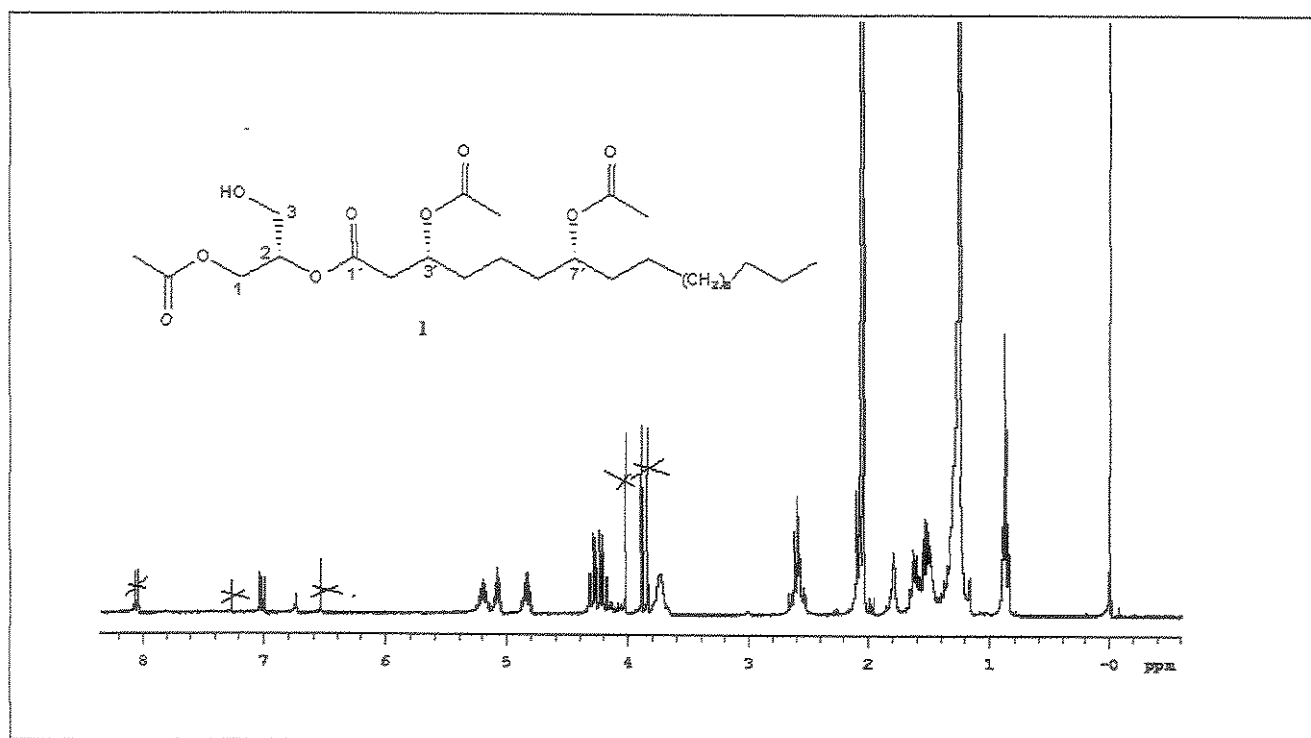


Figura 97. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do oncidinol 1.

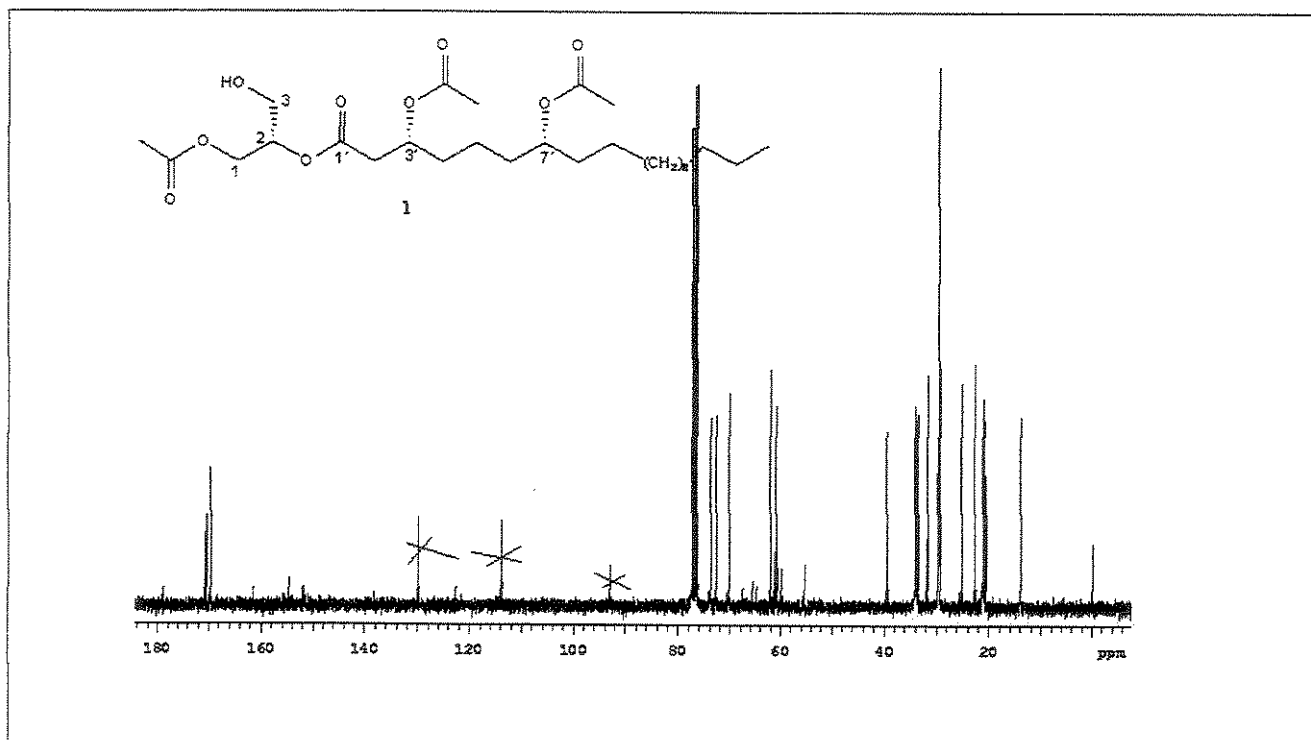


Figura 98. Espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (125 MHz, CDCl_3) do oncidinol 1.

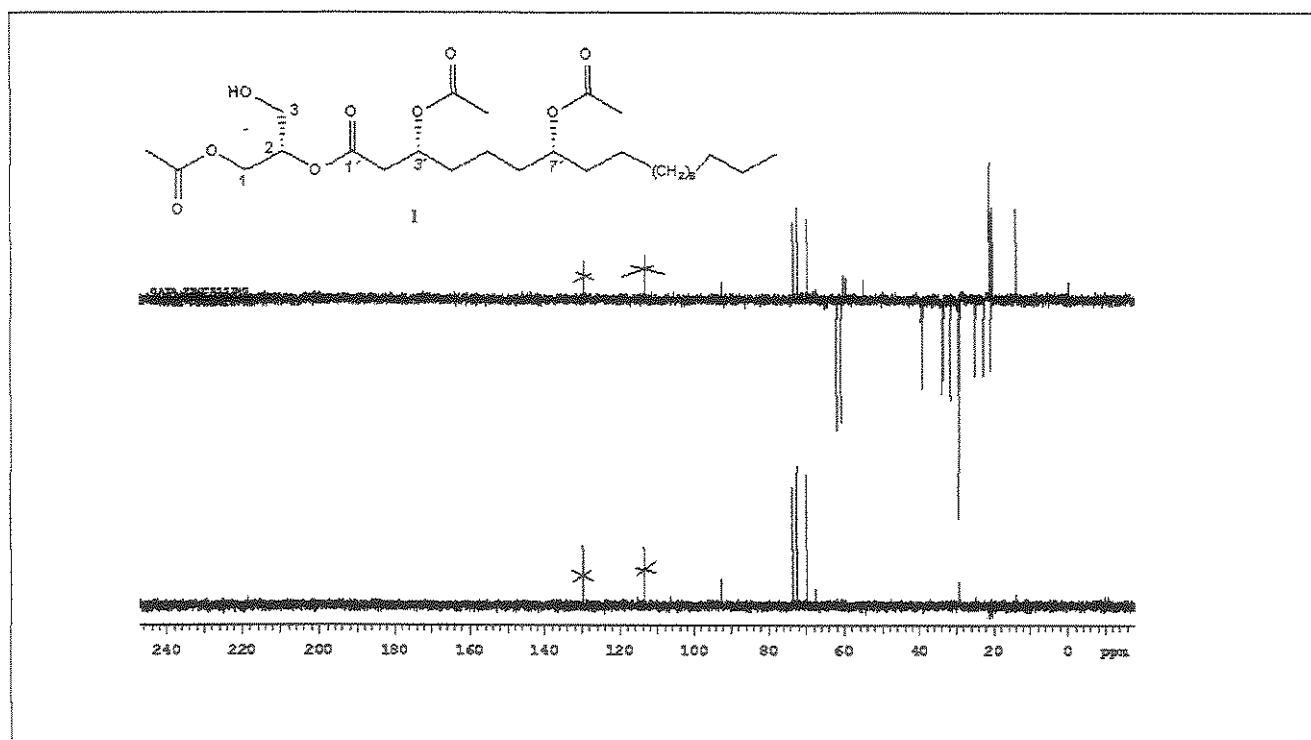


Figura 99. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do oncidinol 1.

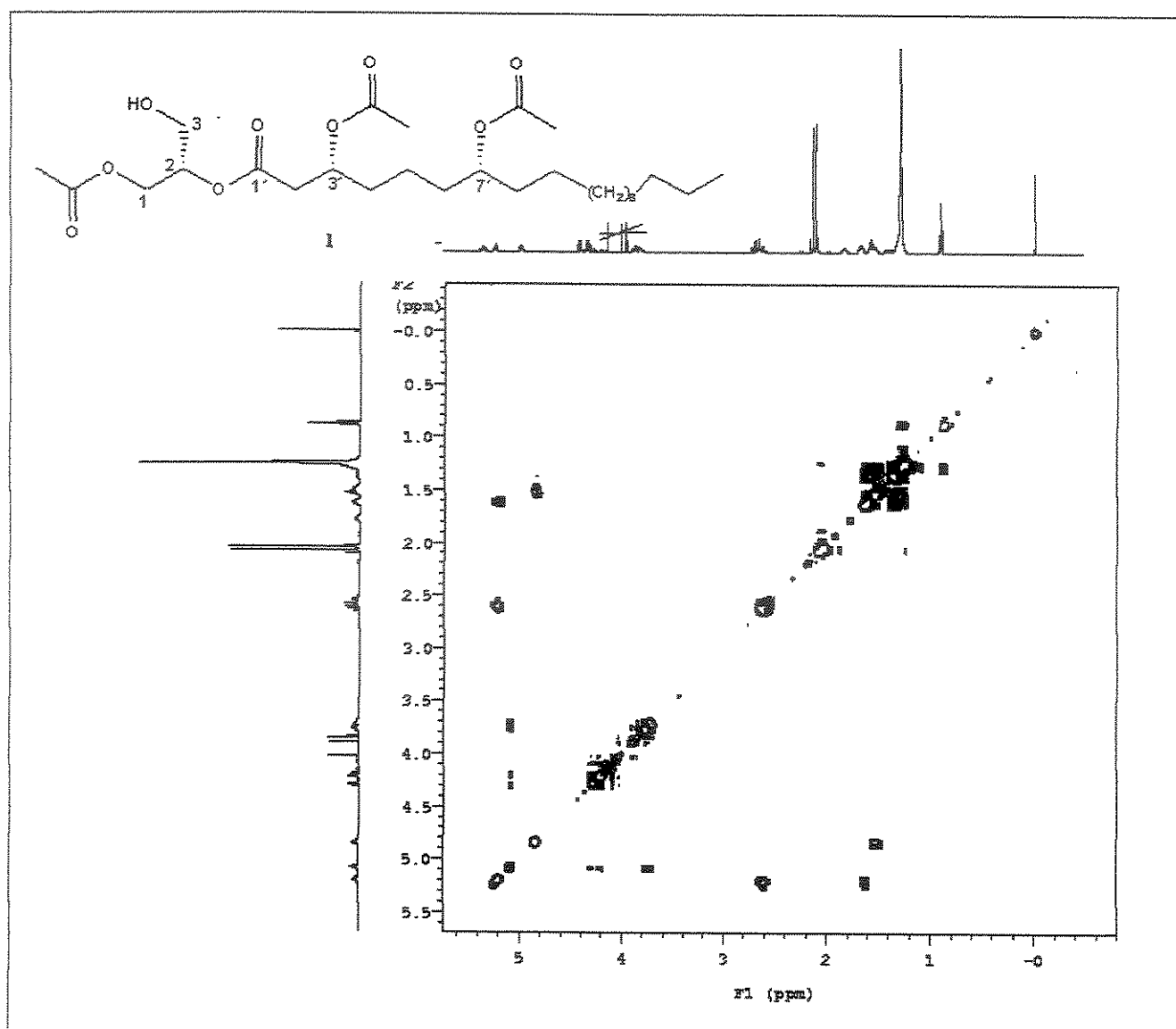


Figura 100. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) do oncidinol 1.

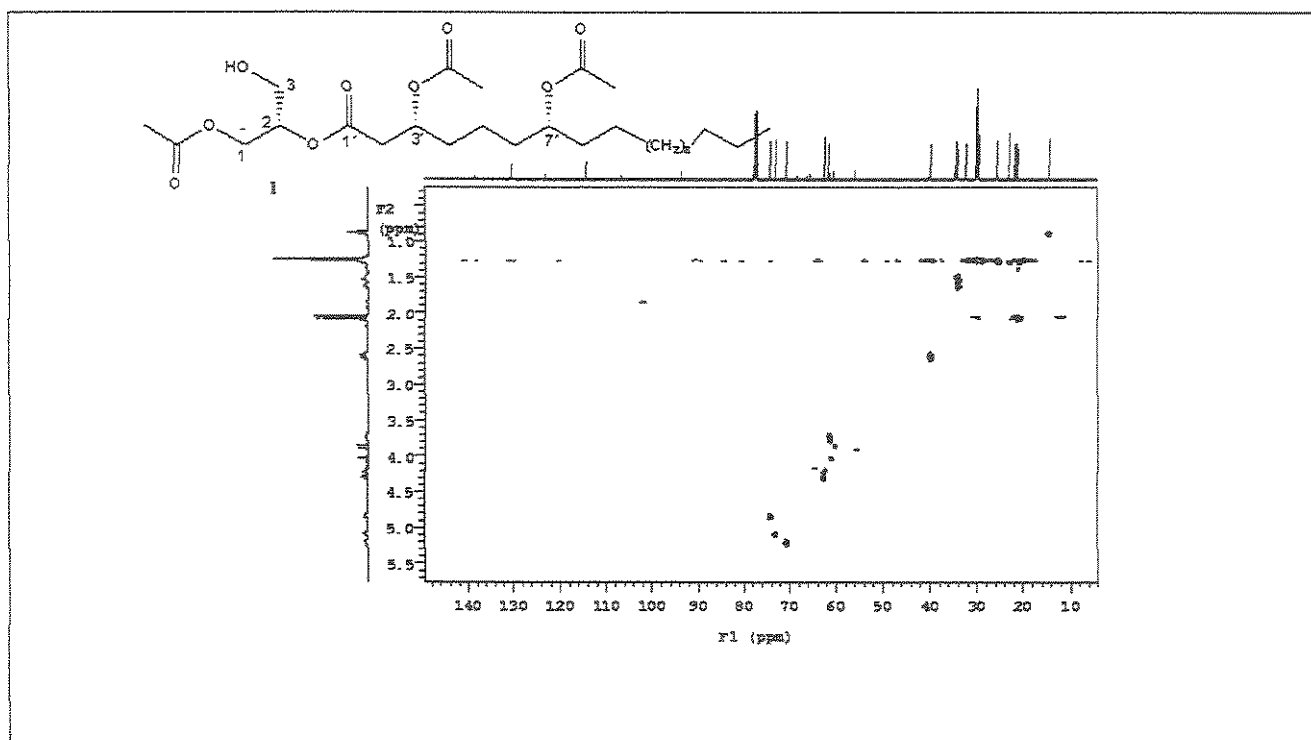


Figura 101. Mapa de Contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C – HSQC (500 MHz, CDCl_3) do oncidinol 1.

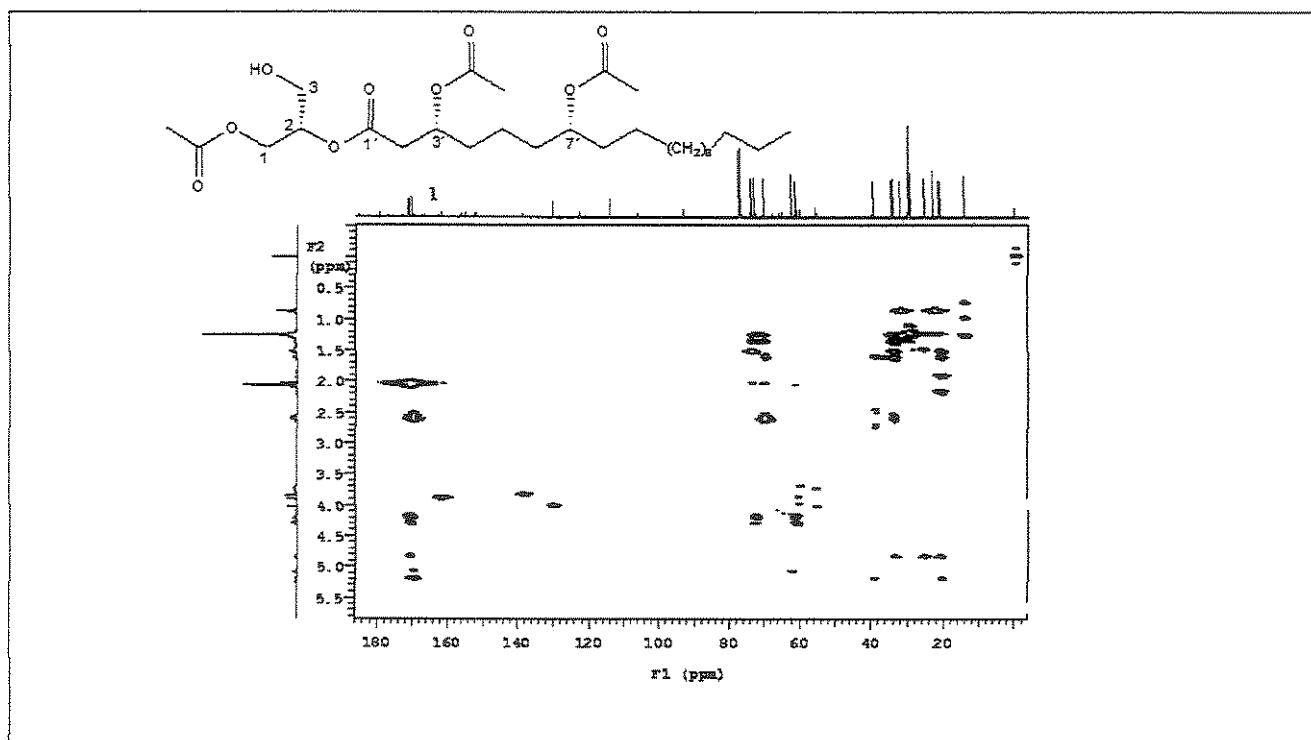


Figura 102. Mapa de Contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C – HMBC (500 MHz, CDCl_3) do oncidinol 1.

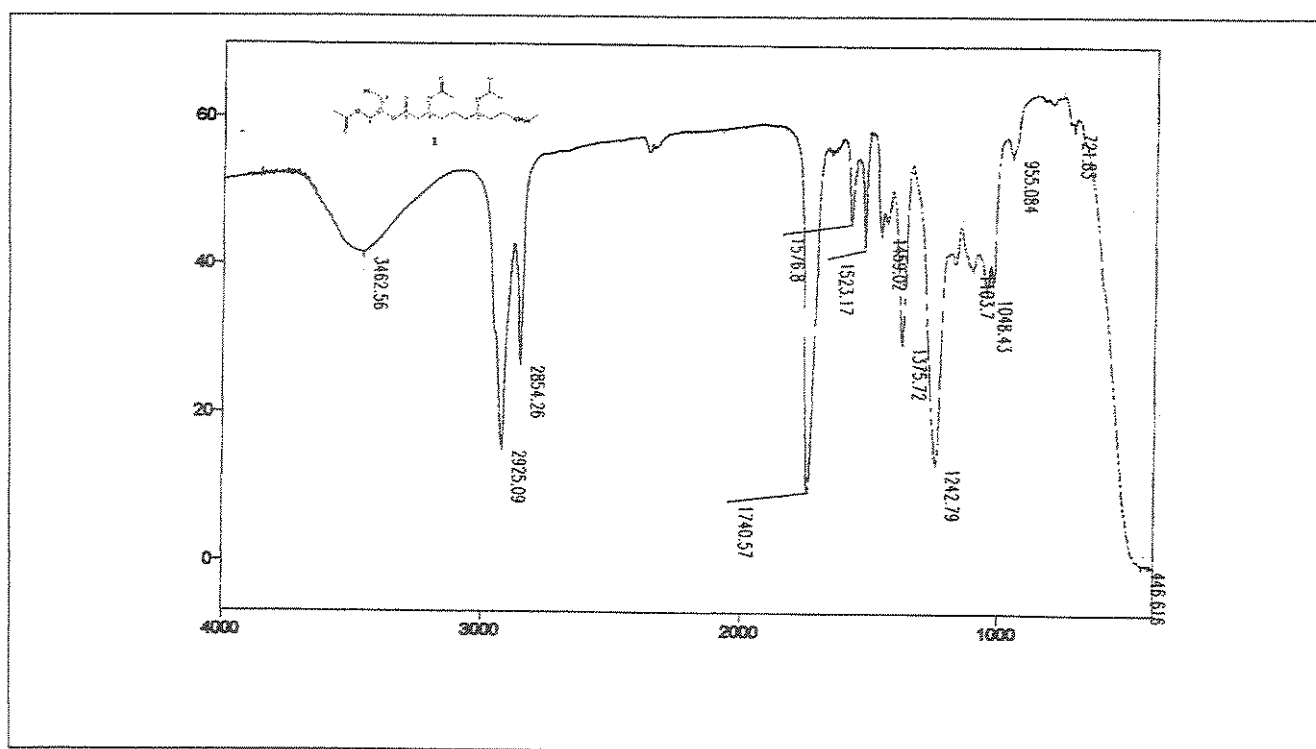


Figura 103. Espectro no Infra Vermelho (filme) do oncidinol 1.

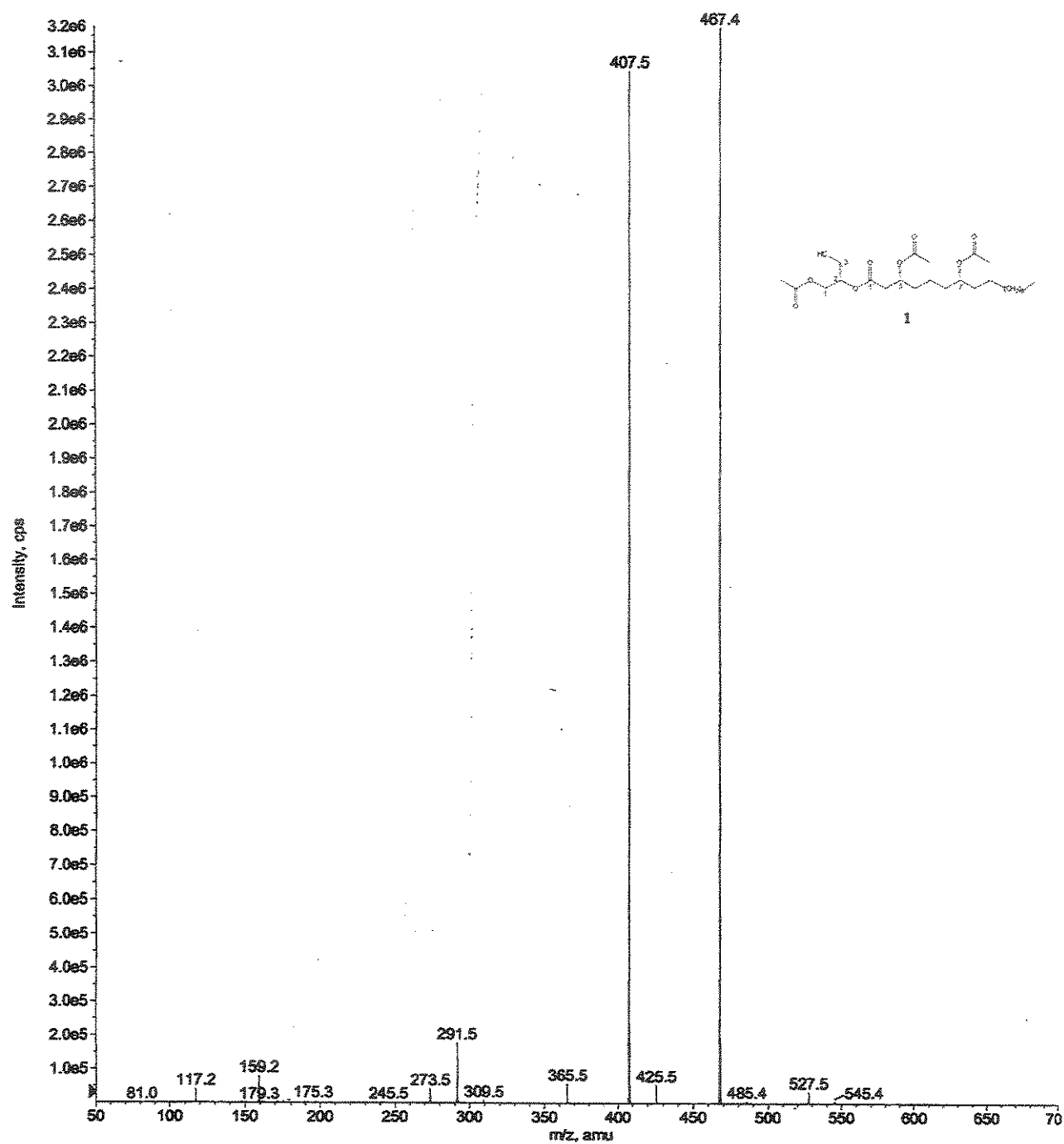


Figura 104. Espectro de massas (ESI-MS) do oncidinol 1.

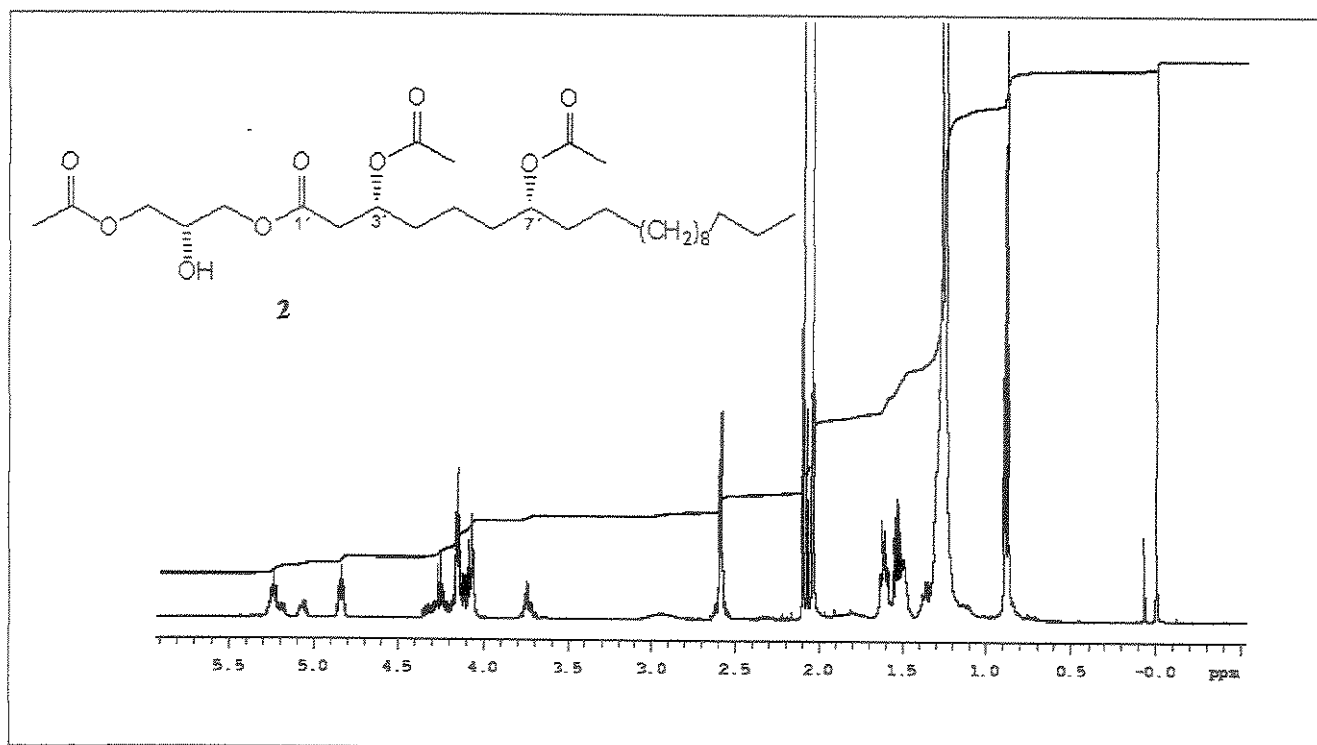


Figura 105. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto 2.

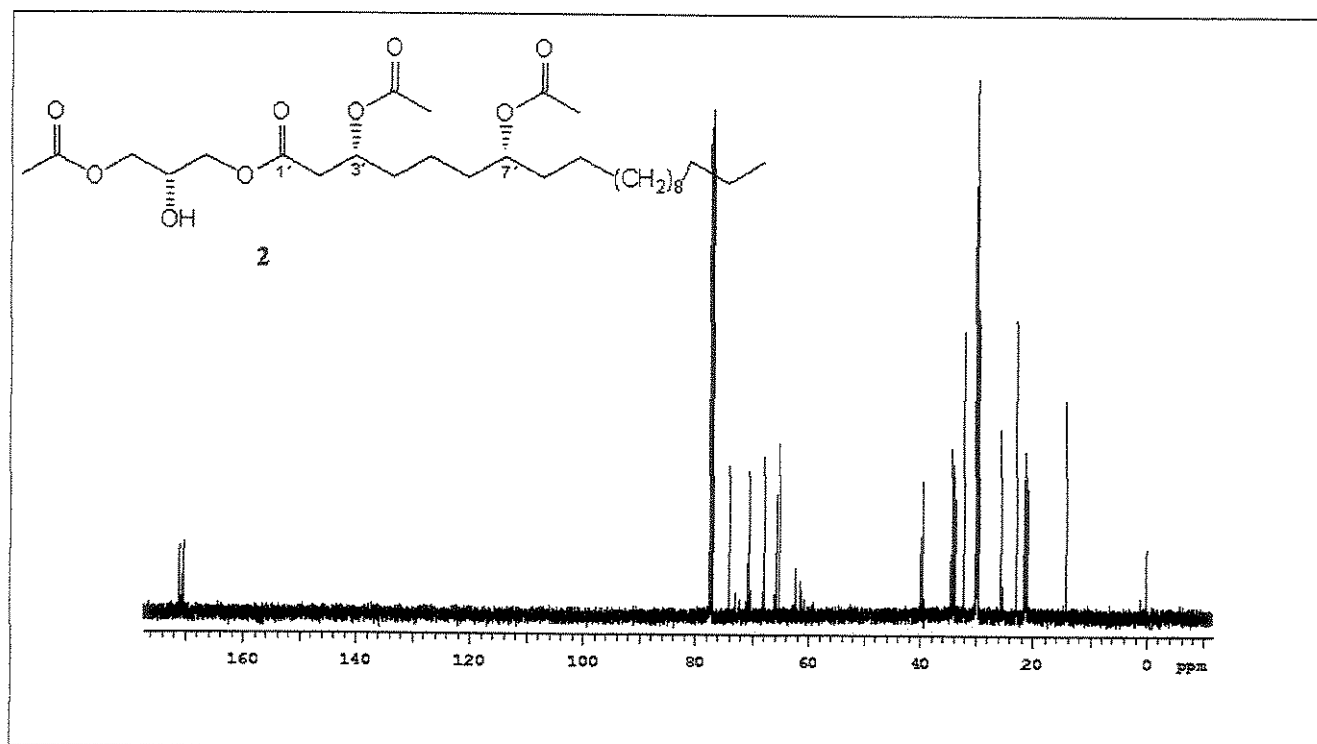


Figura 106. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 2.

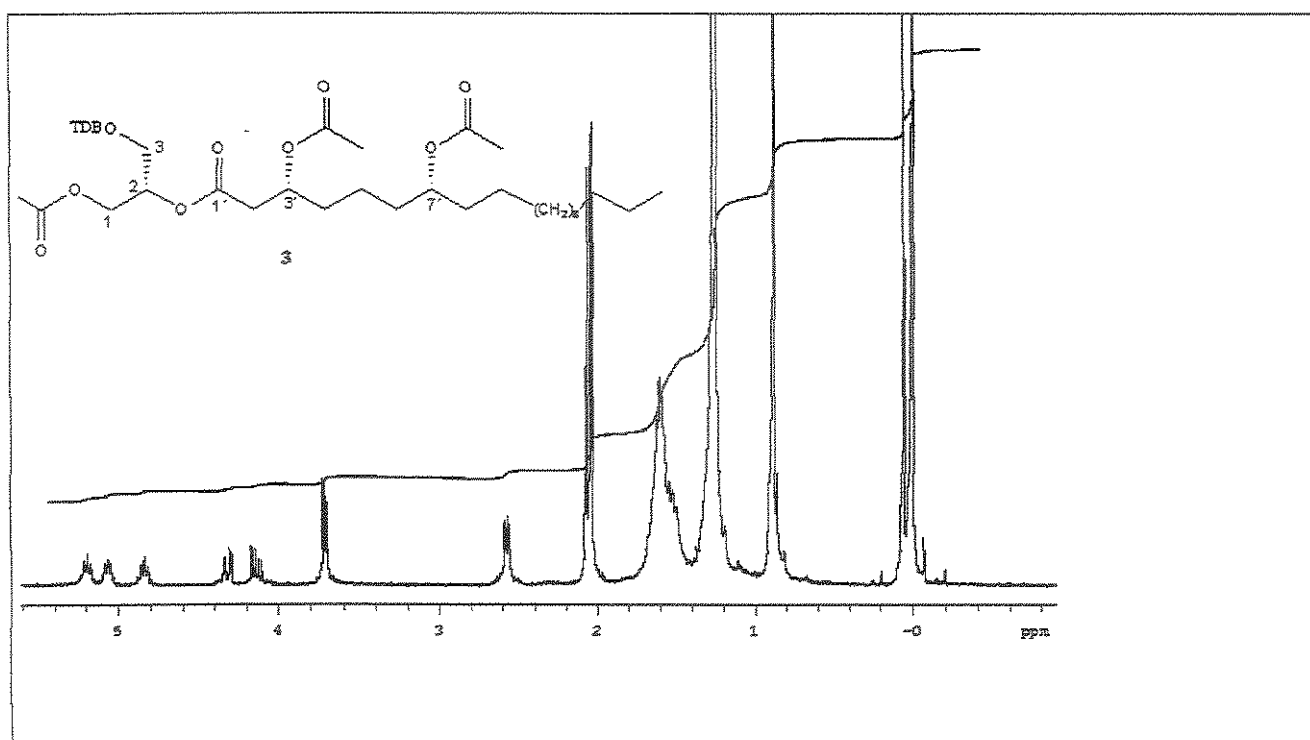


Figura 107. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 3.

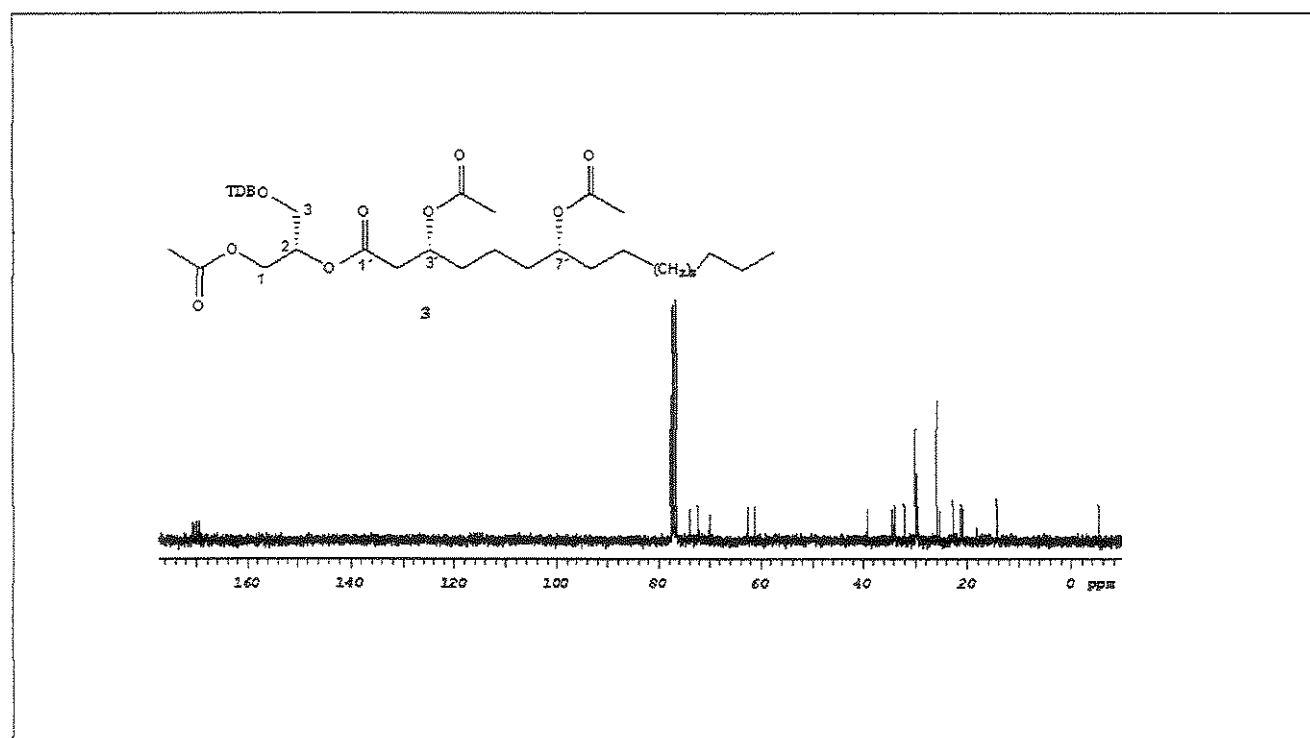


Figura 108. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 3.

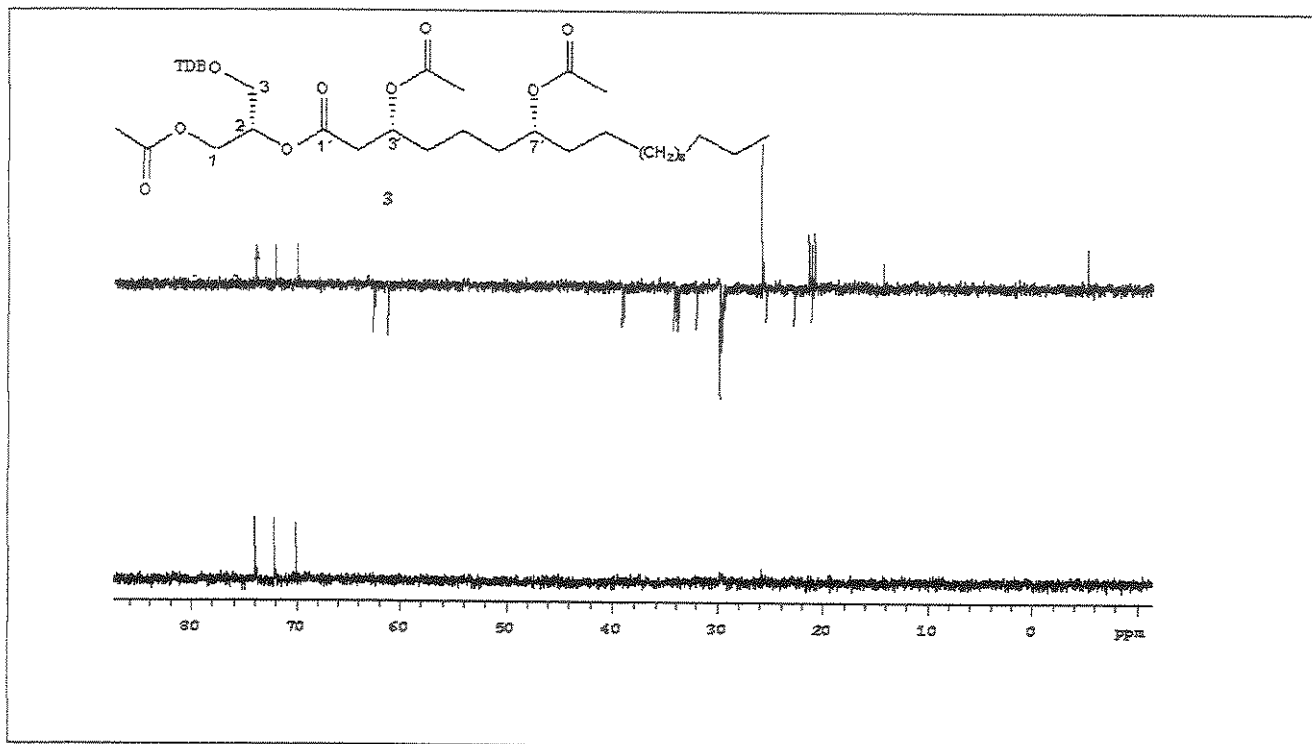


Figura 109. Espectro de RMN de ^{13}C a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75 MHz, $CDCl_3$) do composto 3.

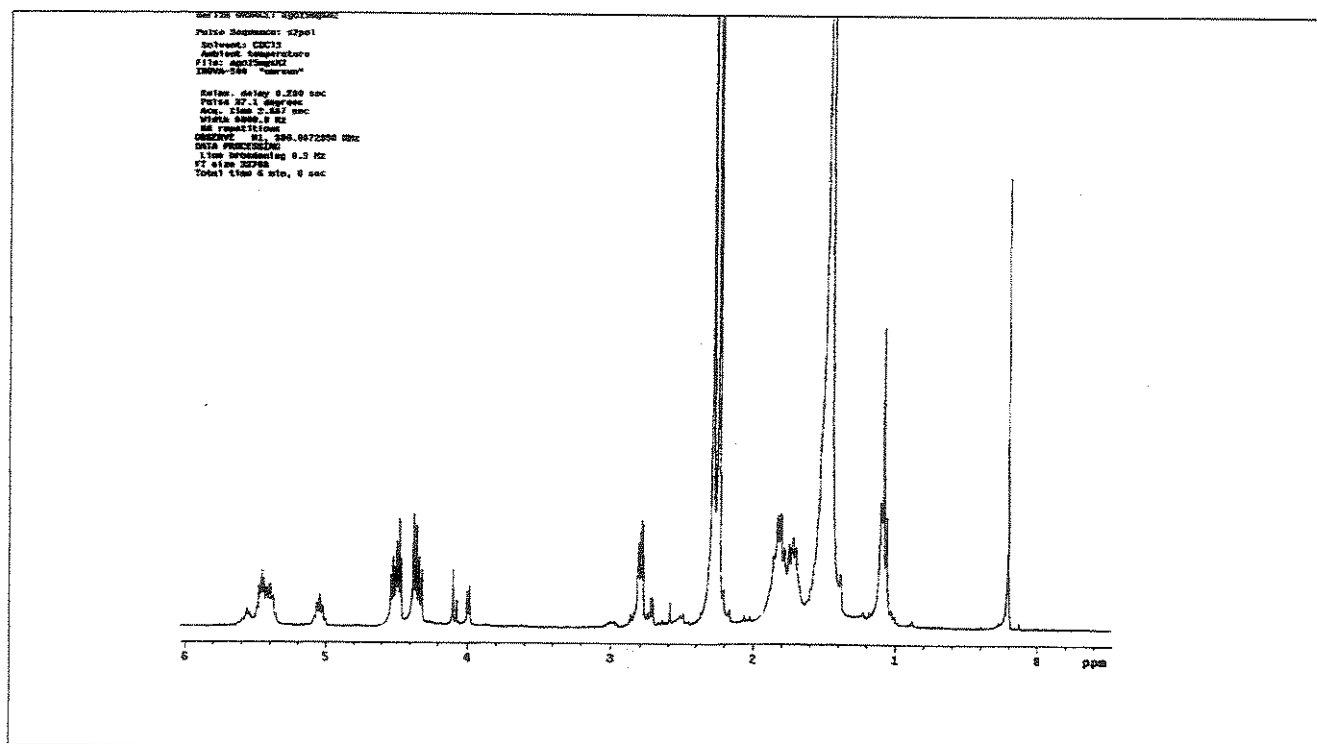


Figura 110. Espectro de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) do composto 5.

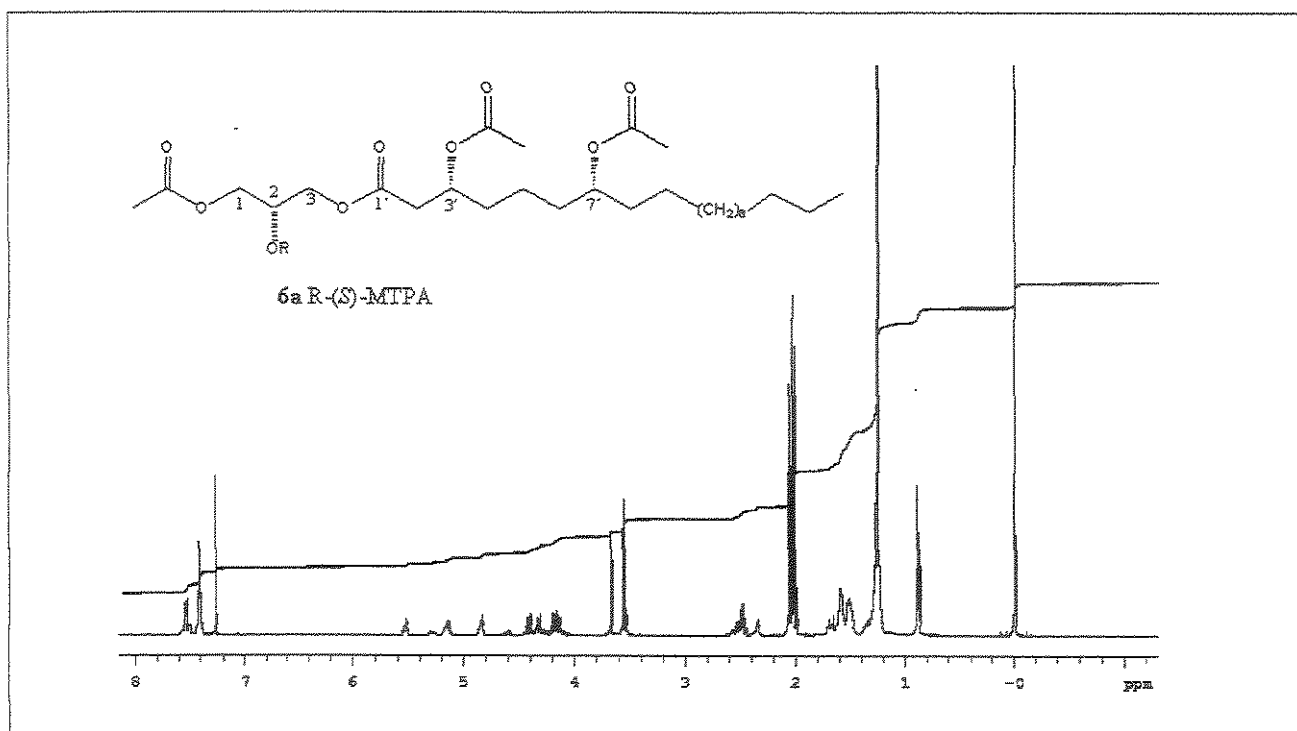


Figura 111. Espectro de RMN de ^1H (500 Mz, CDCl_3) do composto 6a.

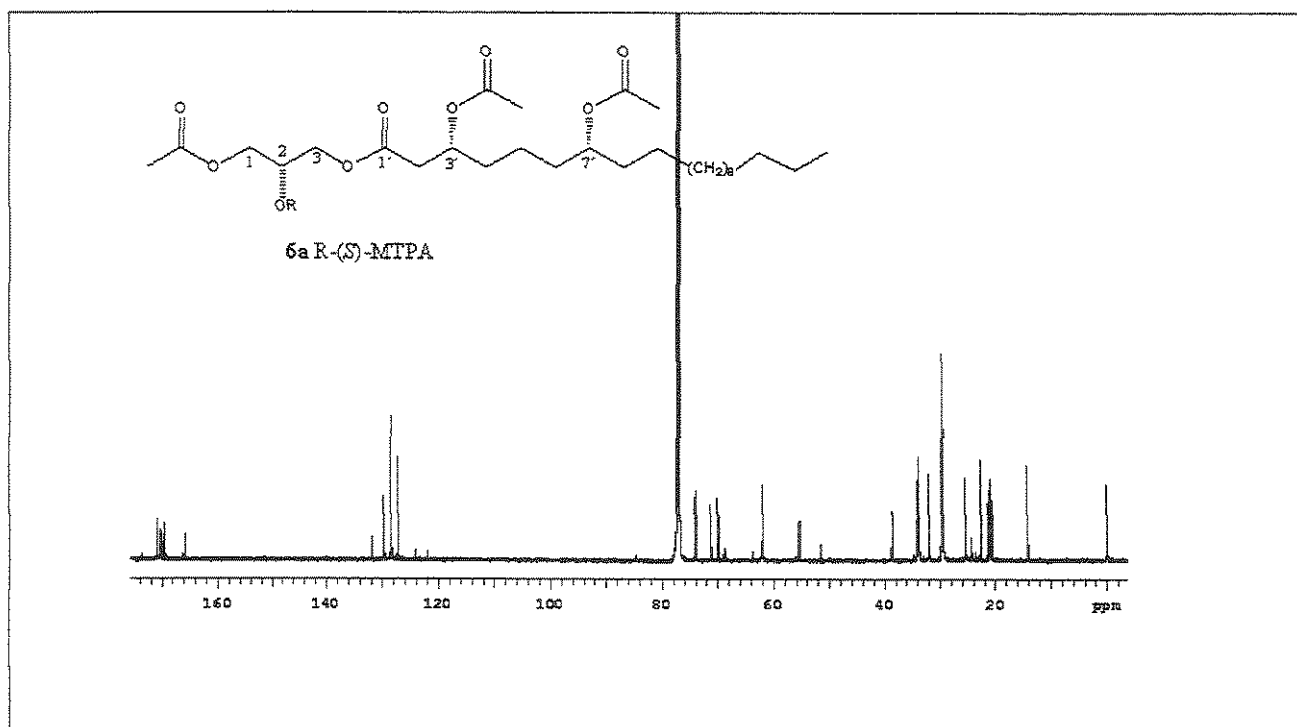


Figura 112. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 6a.

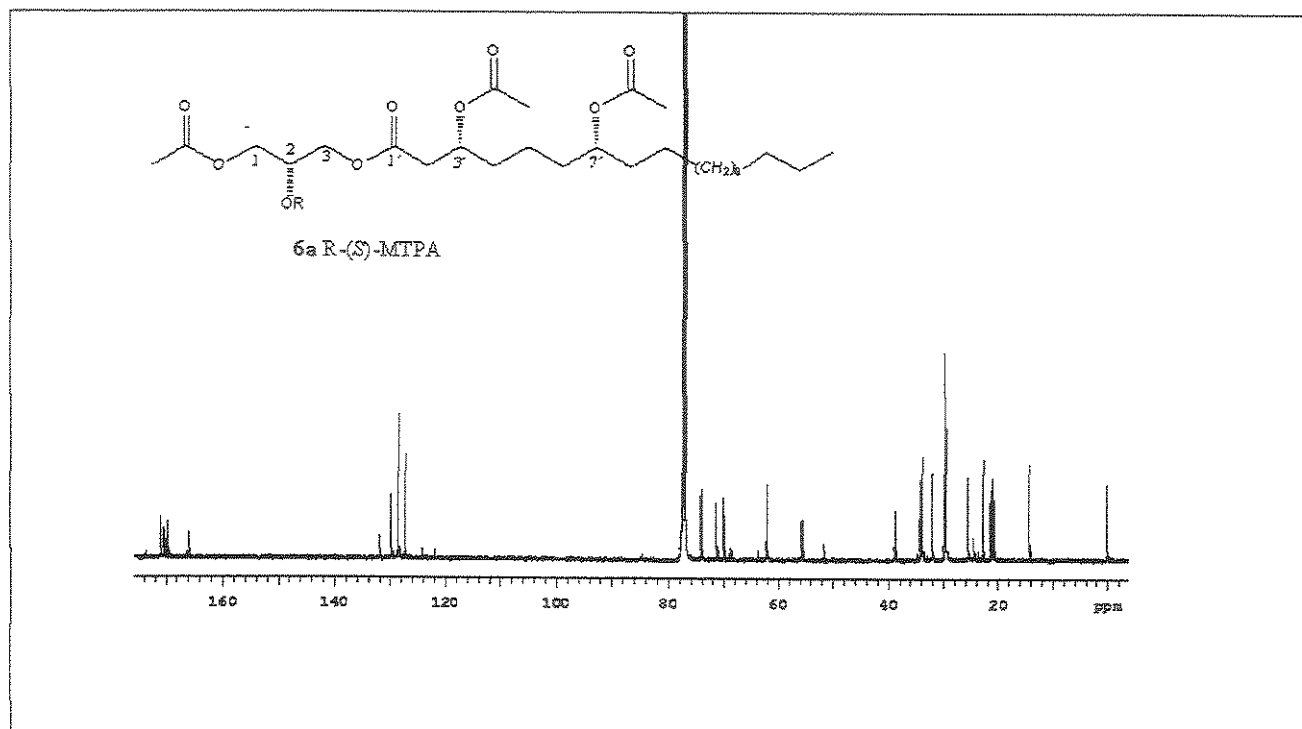


Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 6a

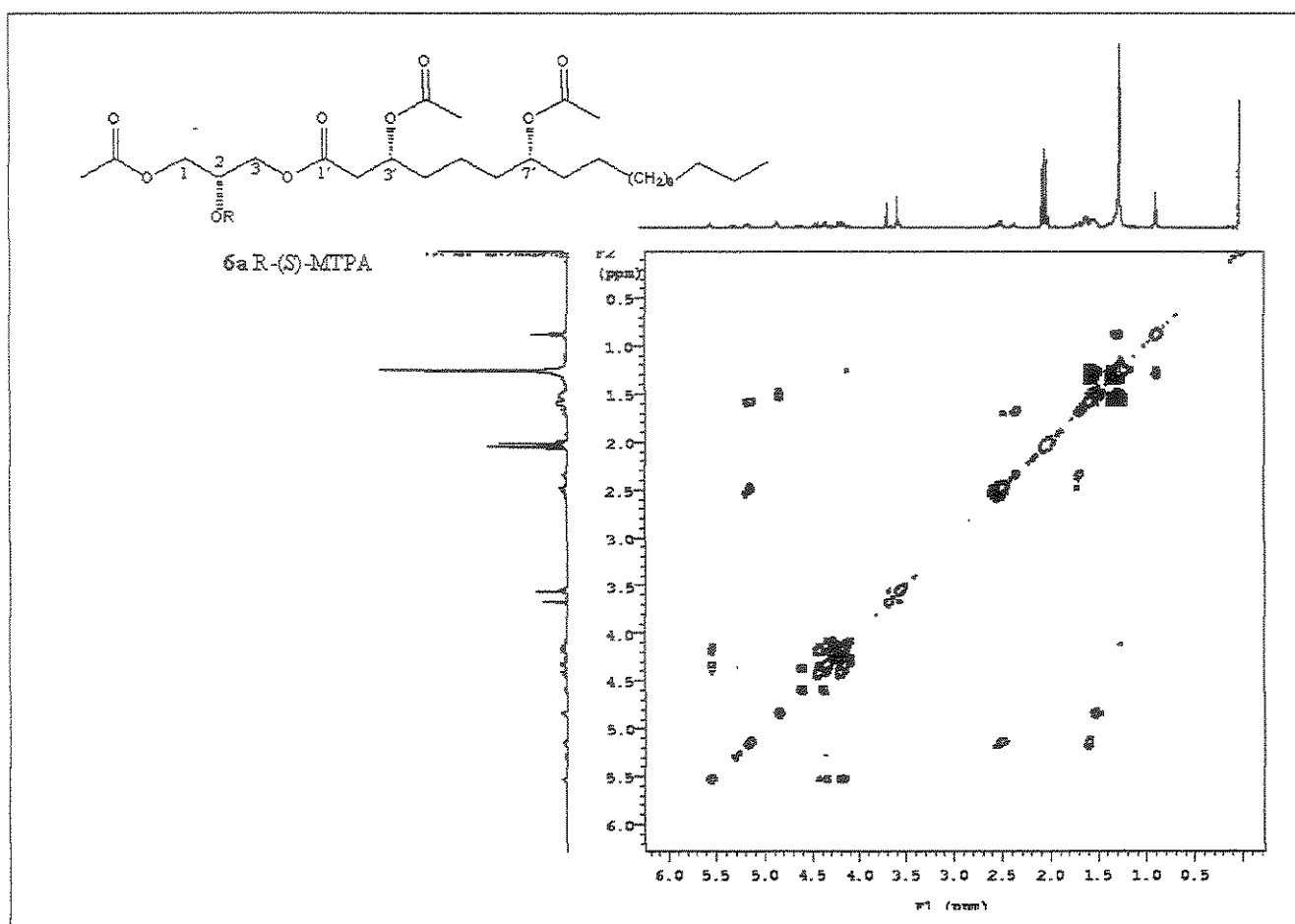


Figura 114. Mapa de contornos de RMN de 2D de ¹H-¹H – COSY (500 MHz, CDCl₃) do composto 6a

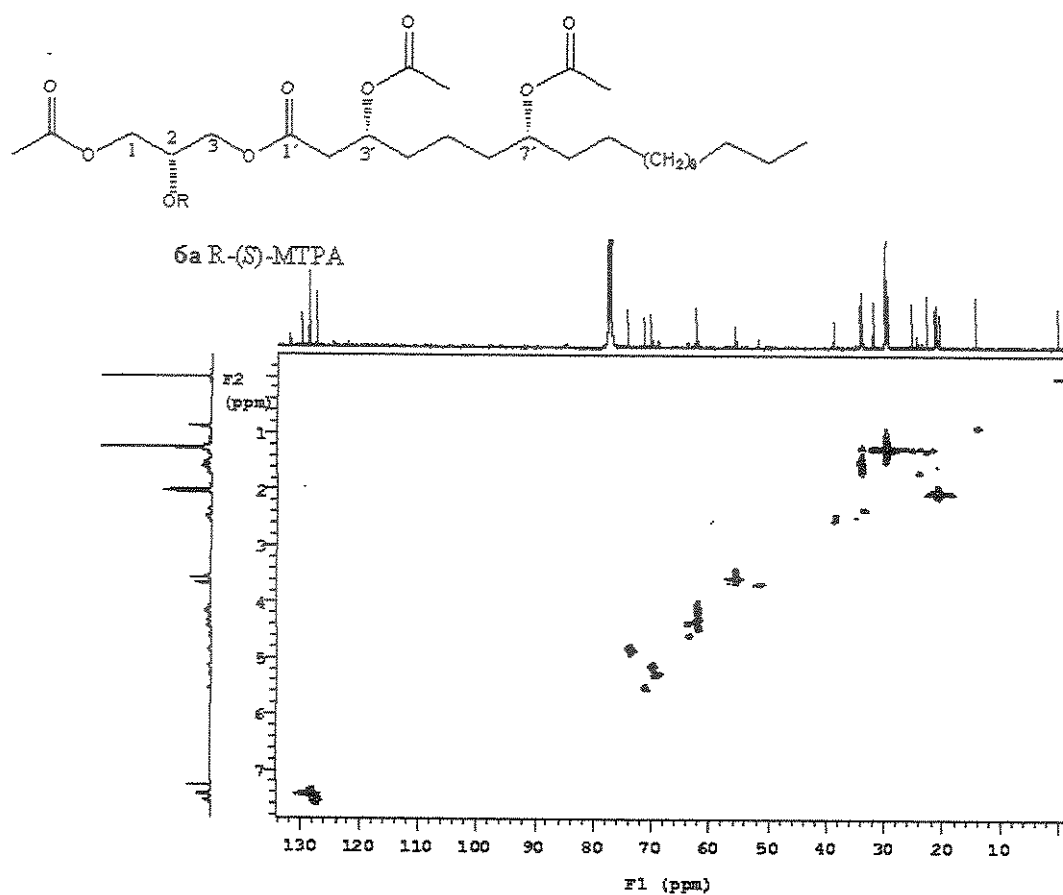


Figura 115. Mapa de contornos de RMN de 2D de ¹H-¹³C – HSQC (500 MHz, CDCl₃) do composto 6a

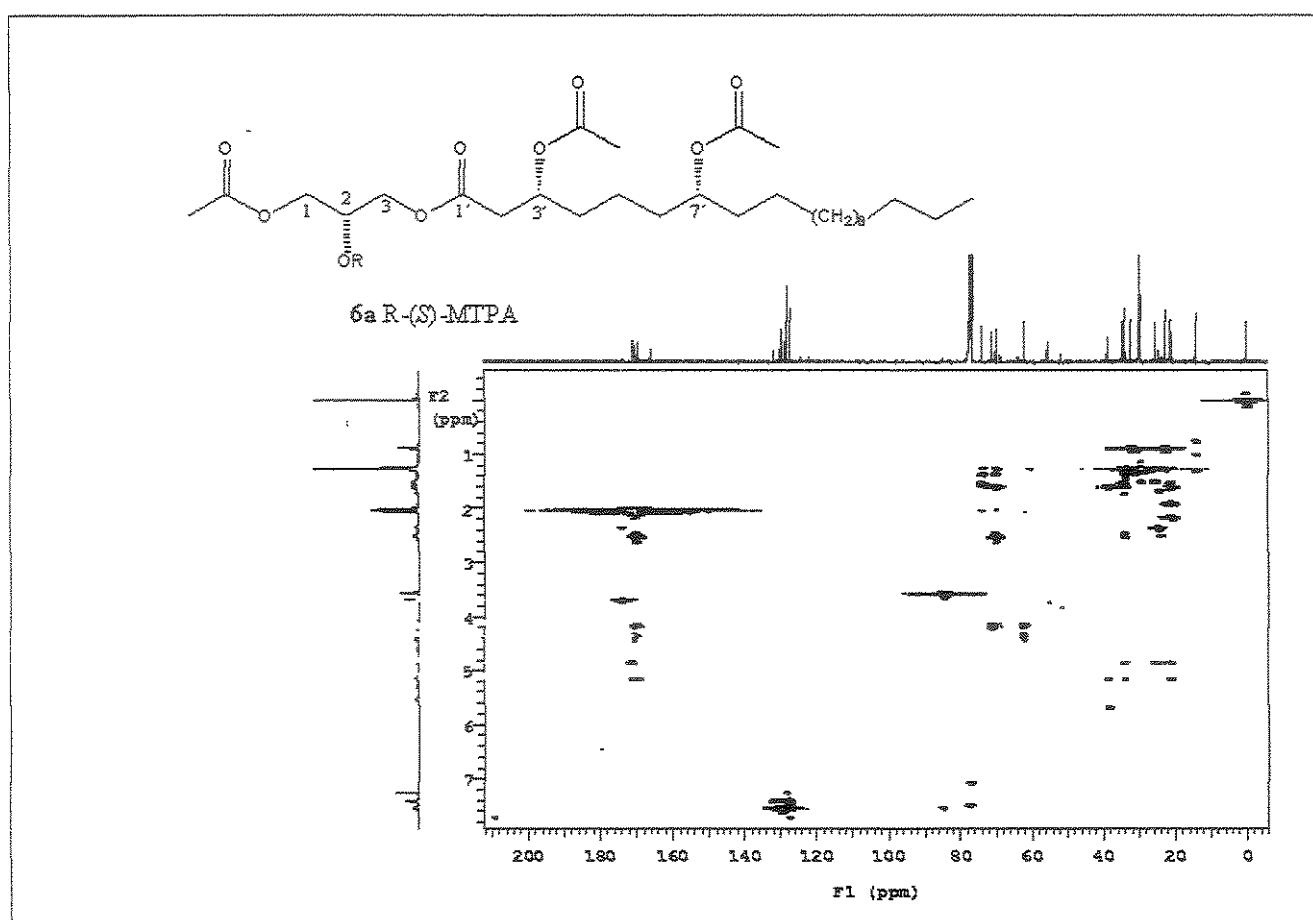


Figura 116. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C - HMBC do composto **6a**

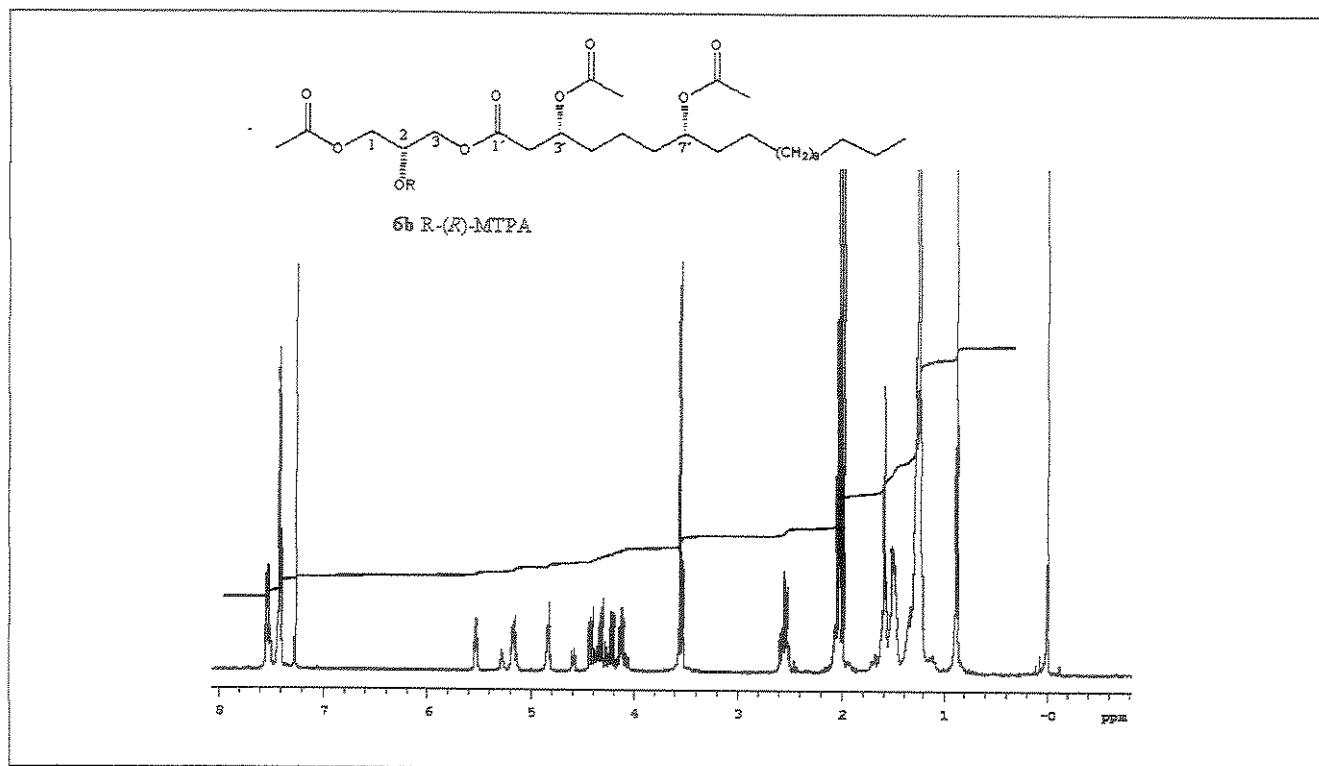


Figura 117. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 6b.

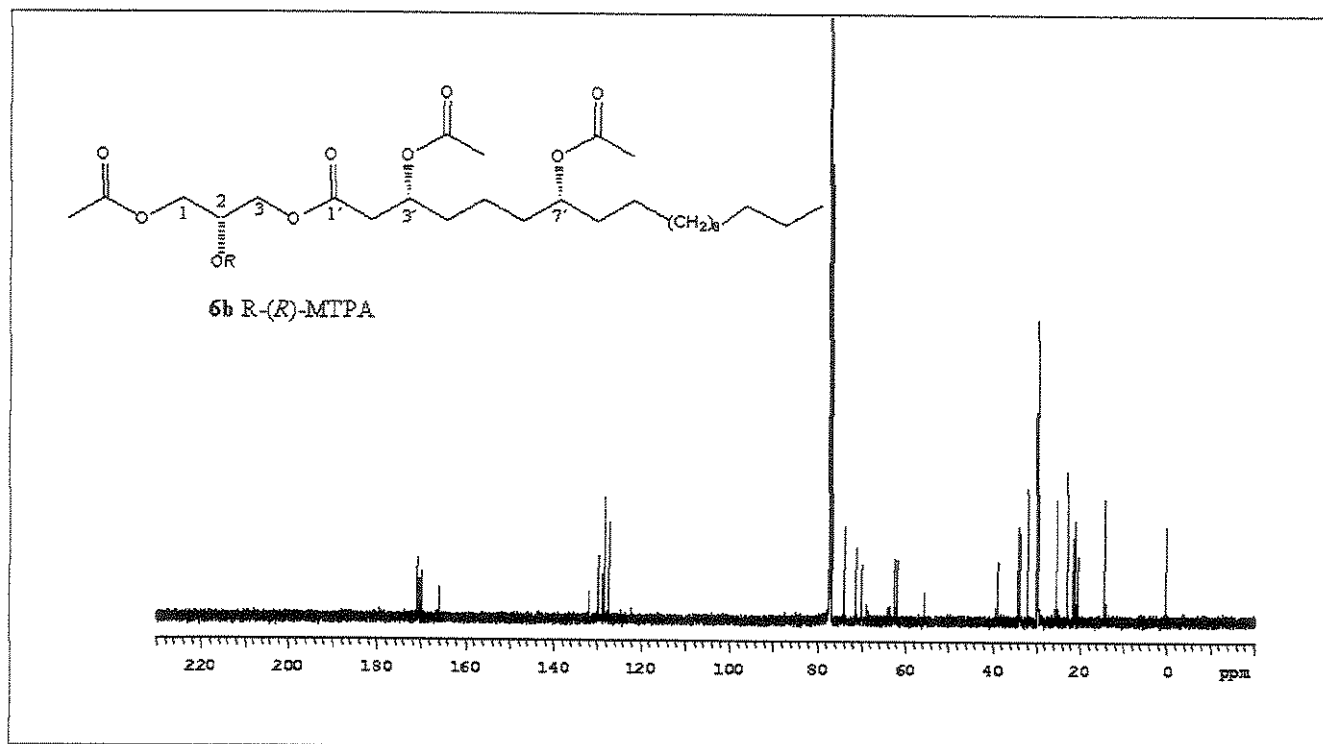


Figura 118. Espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 6b.

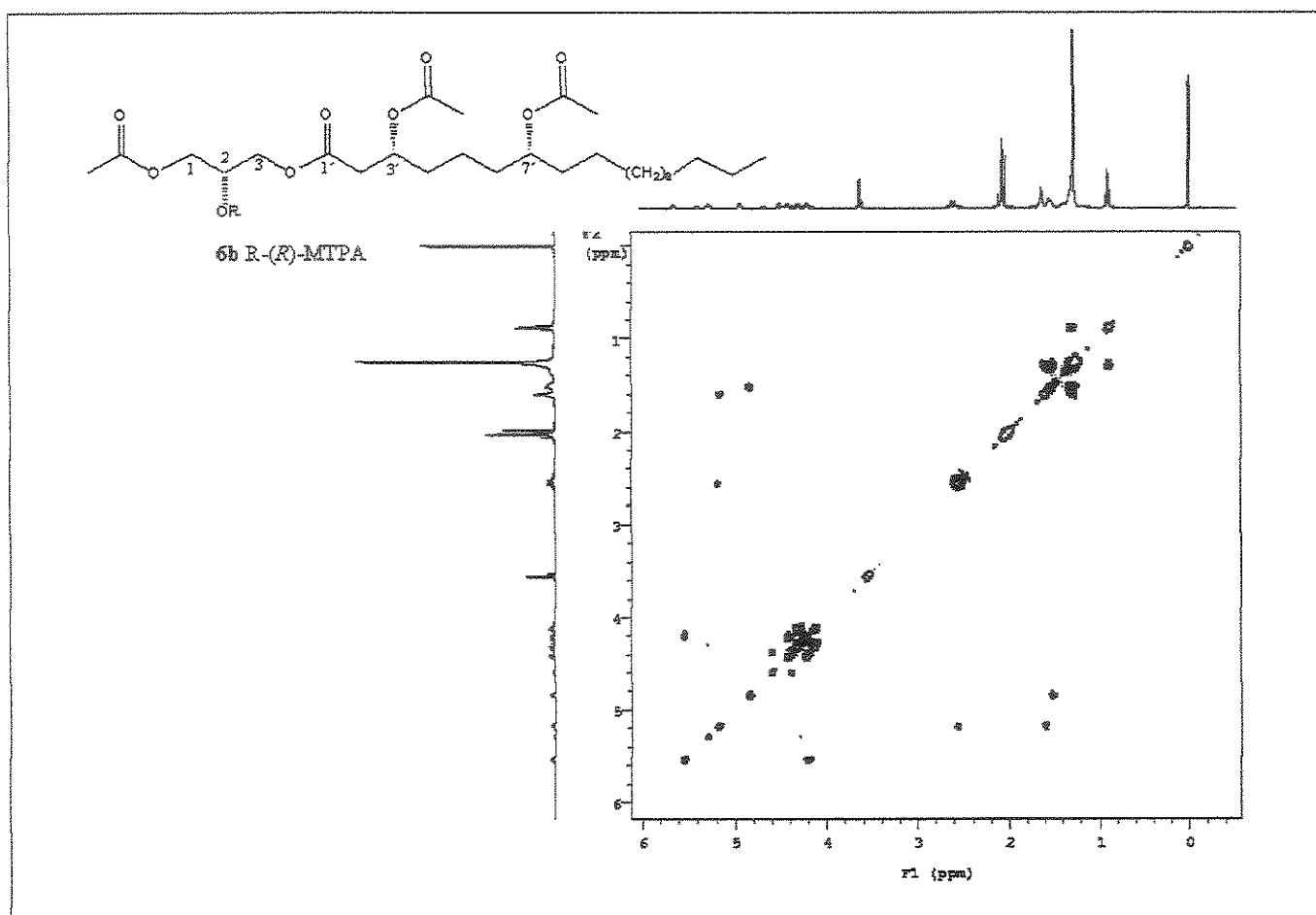


Figura 119. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto 6b.

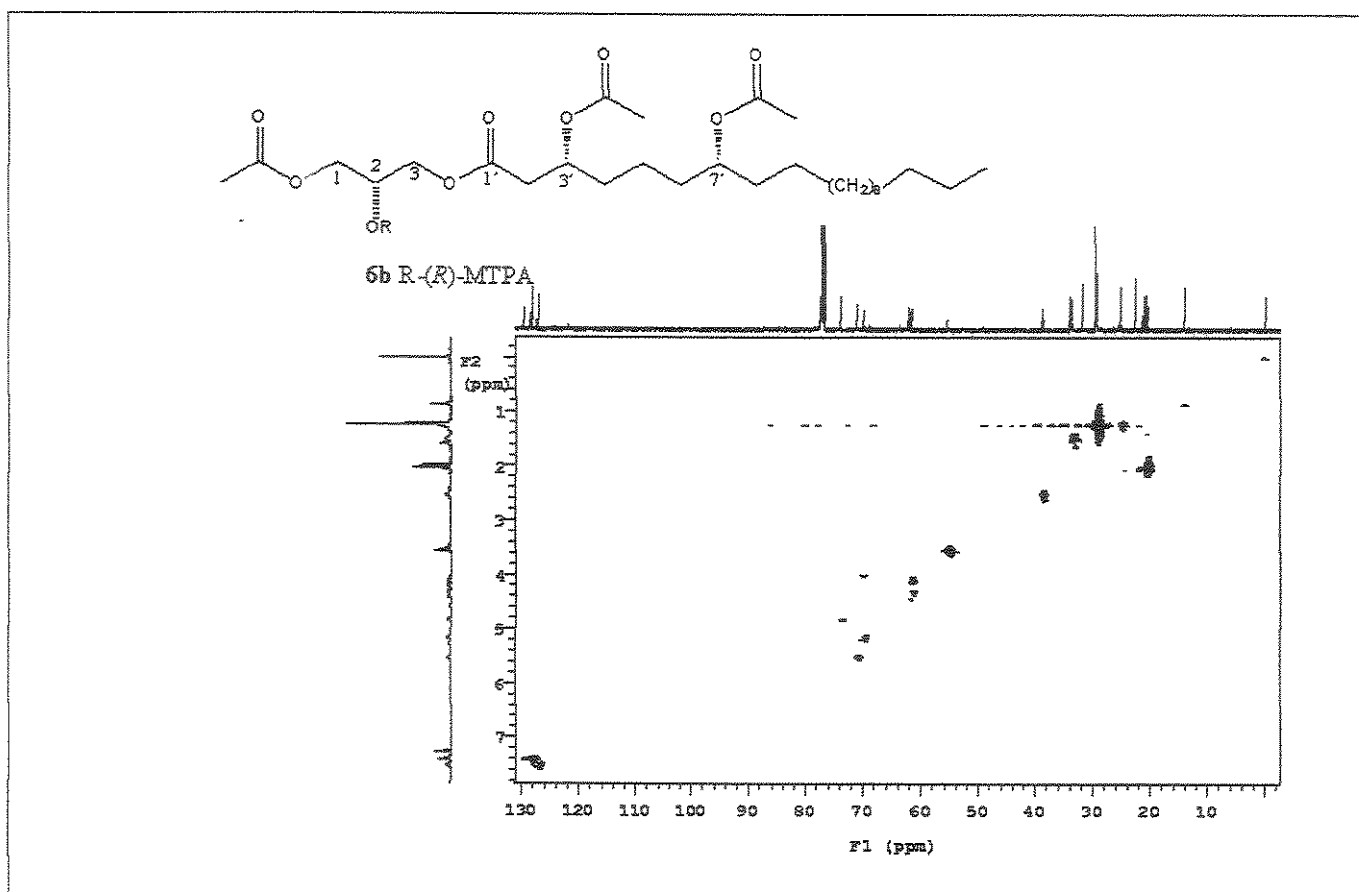


Figura 120. Mapa de contornos de RMN de 2D de ¹H-¹³C – HSQC (500 MHz, CDCl₃) do composto 6b.

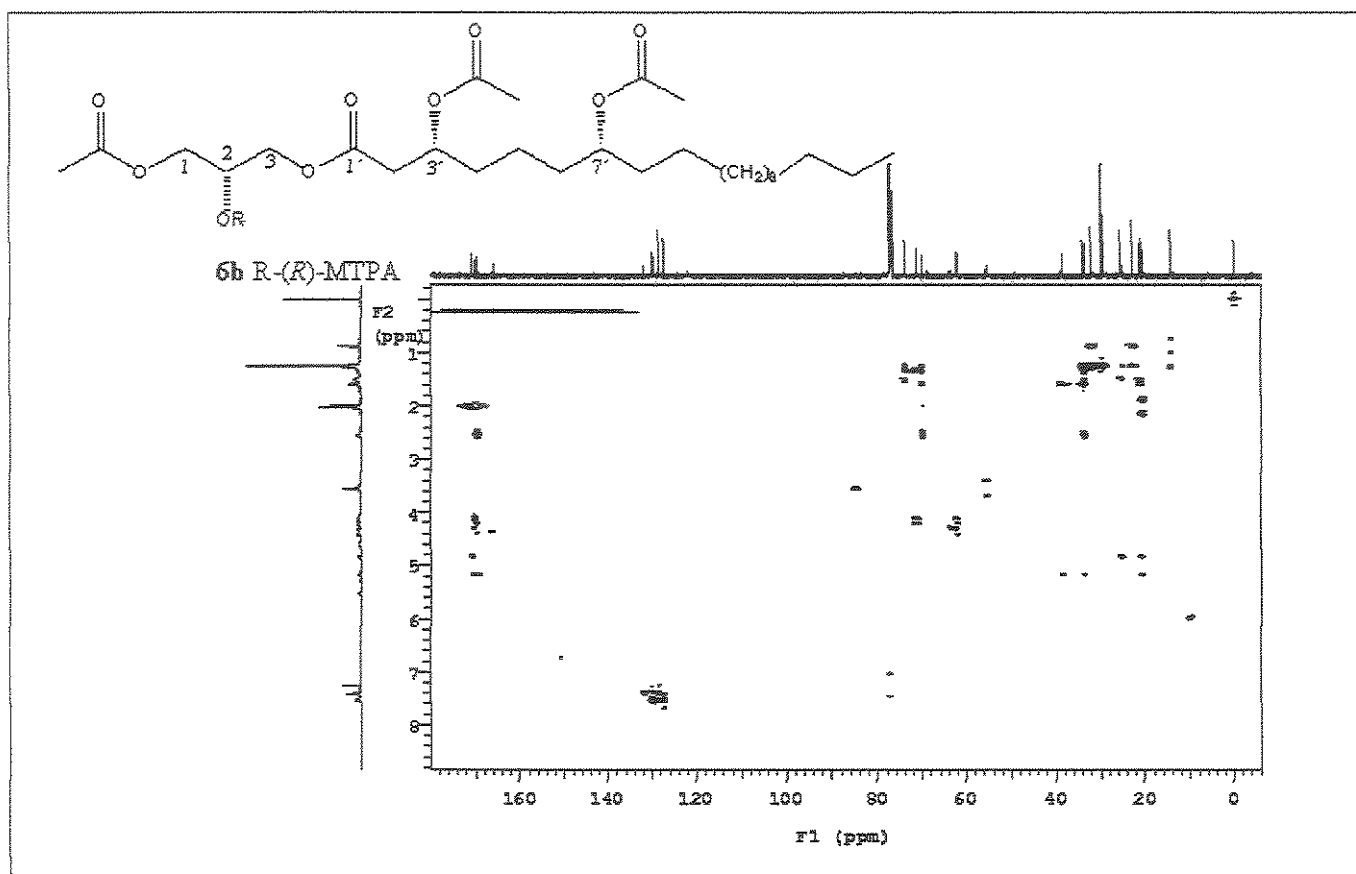


Figura 121. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **6b**.

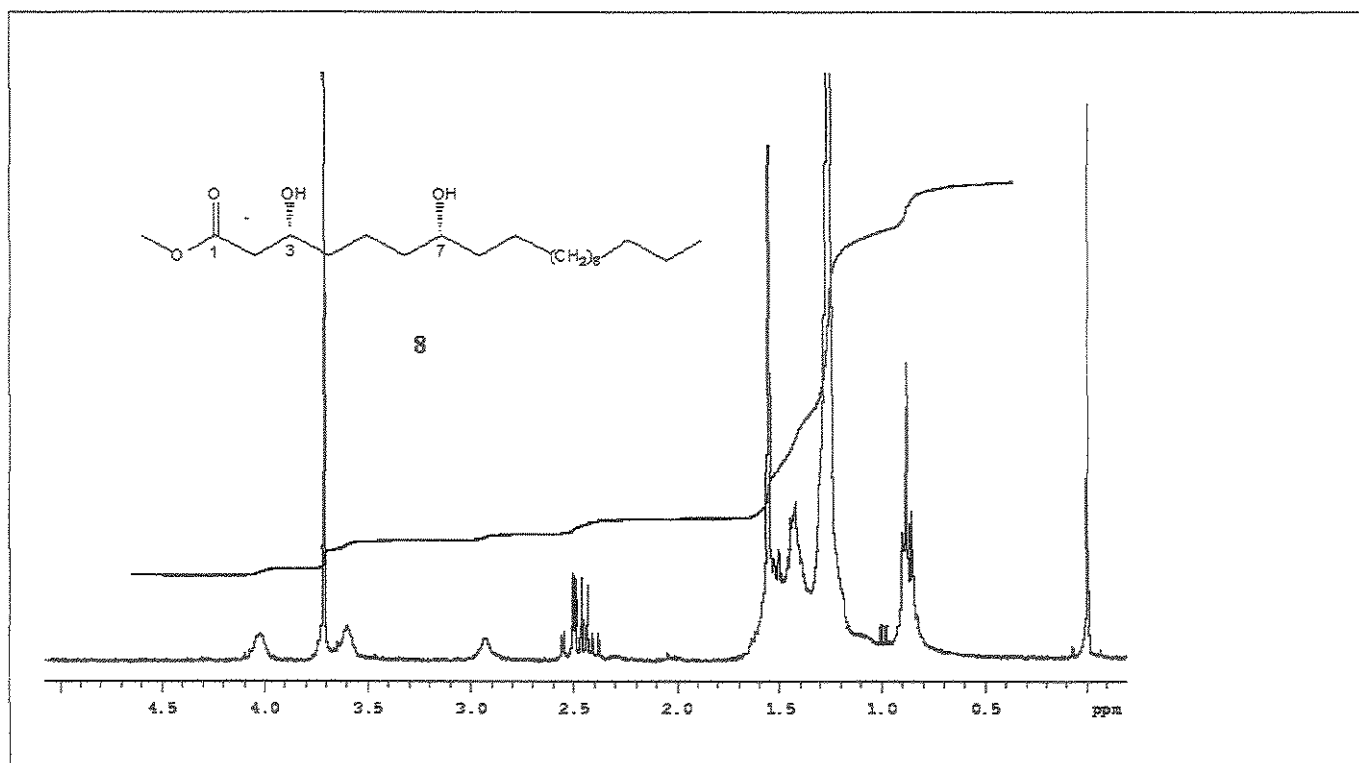


Figura 122. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 8.

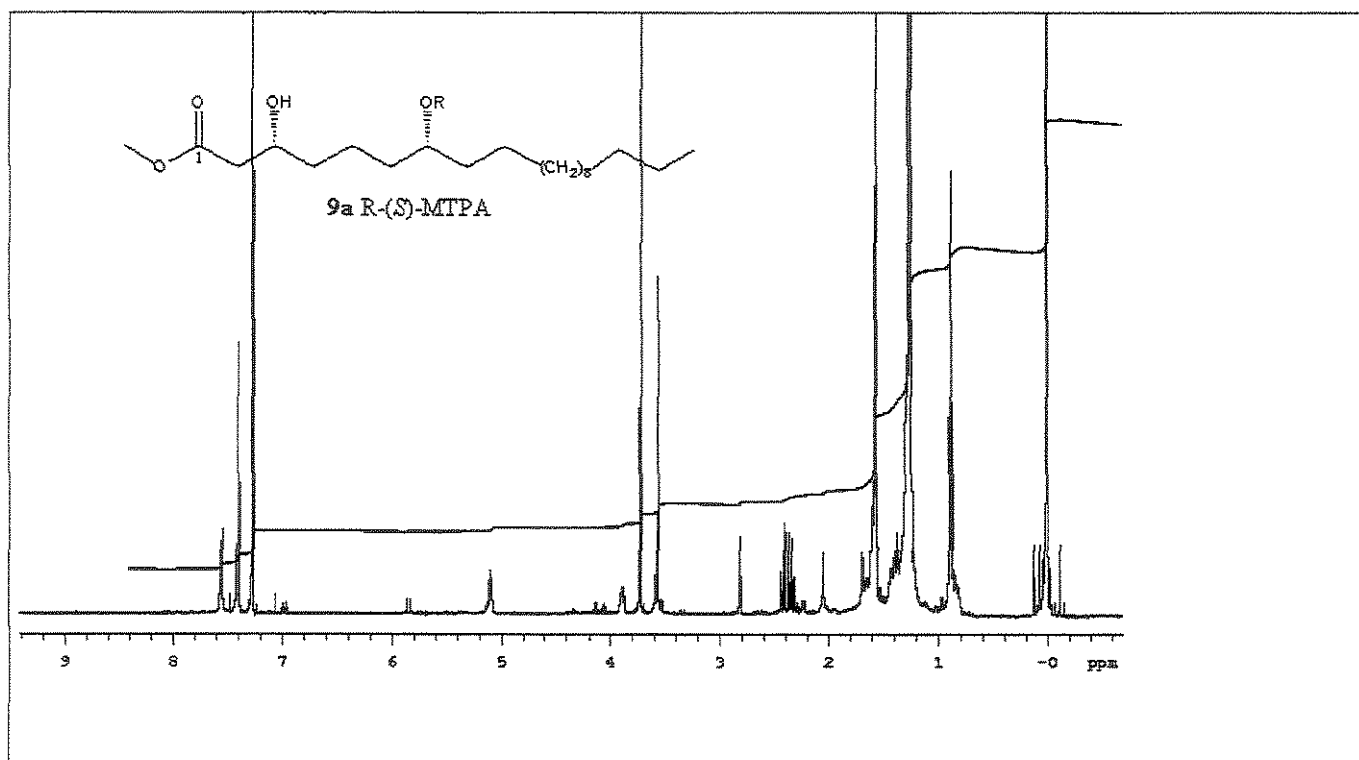


Figura 123. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 9a

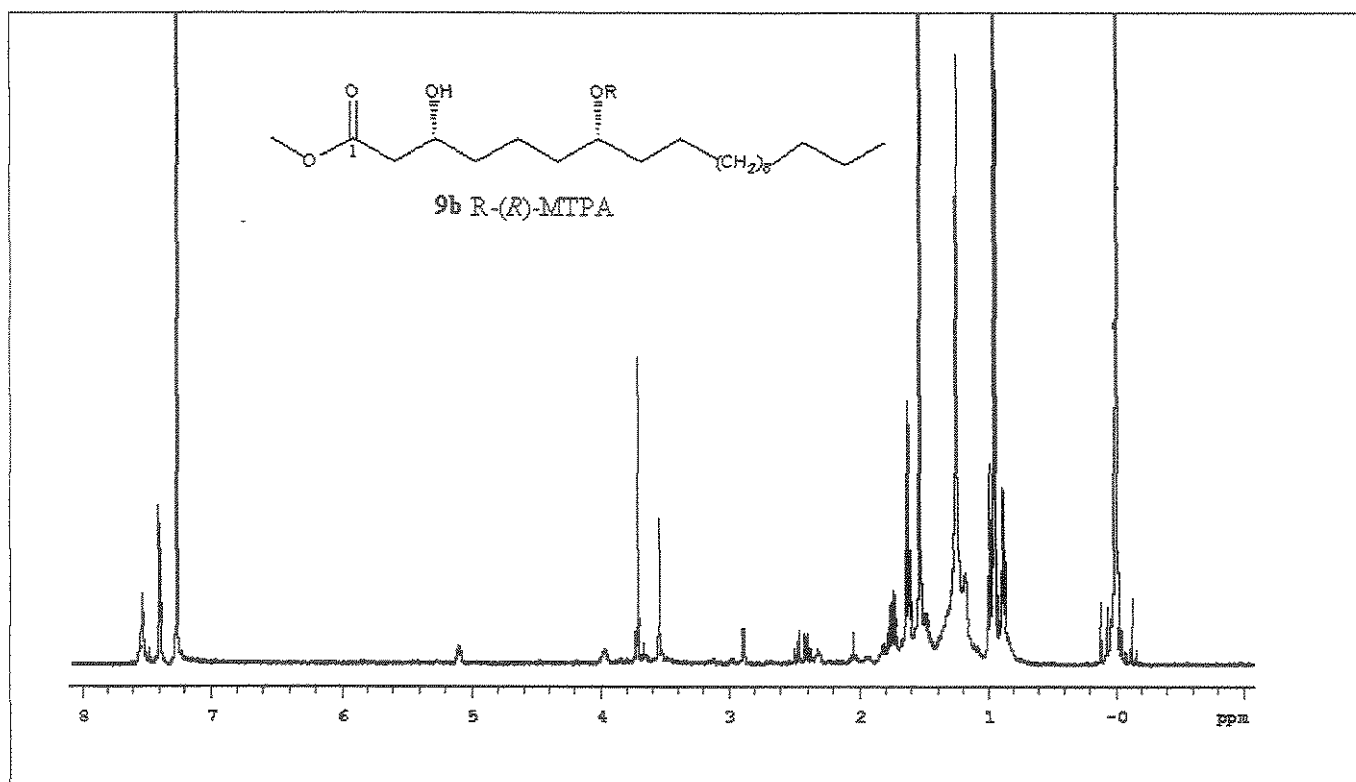


Figura 124. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 9b.

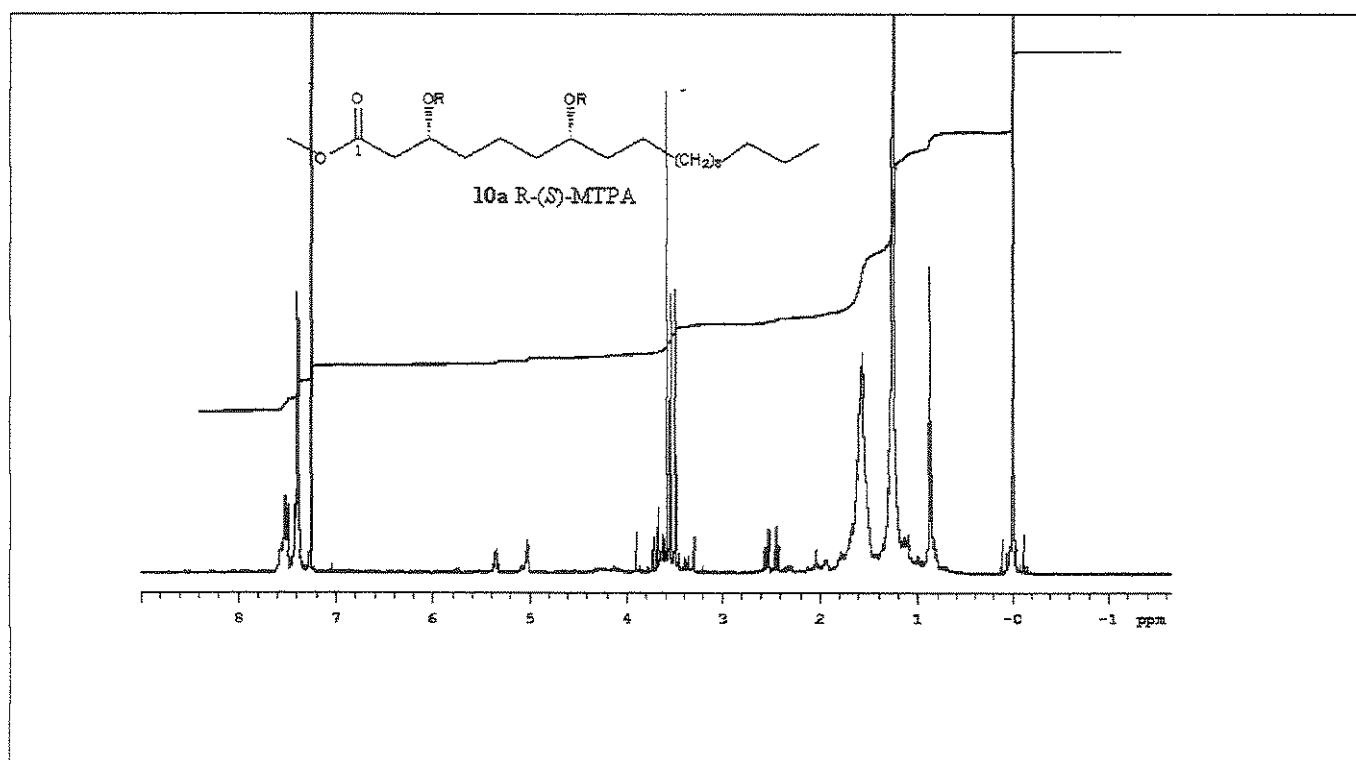


Figura 125. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 10a

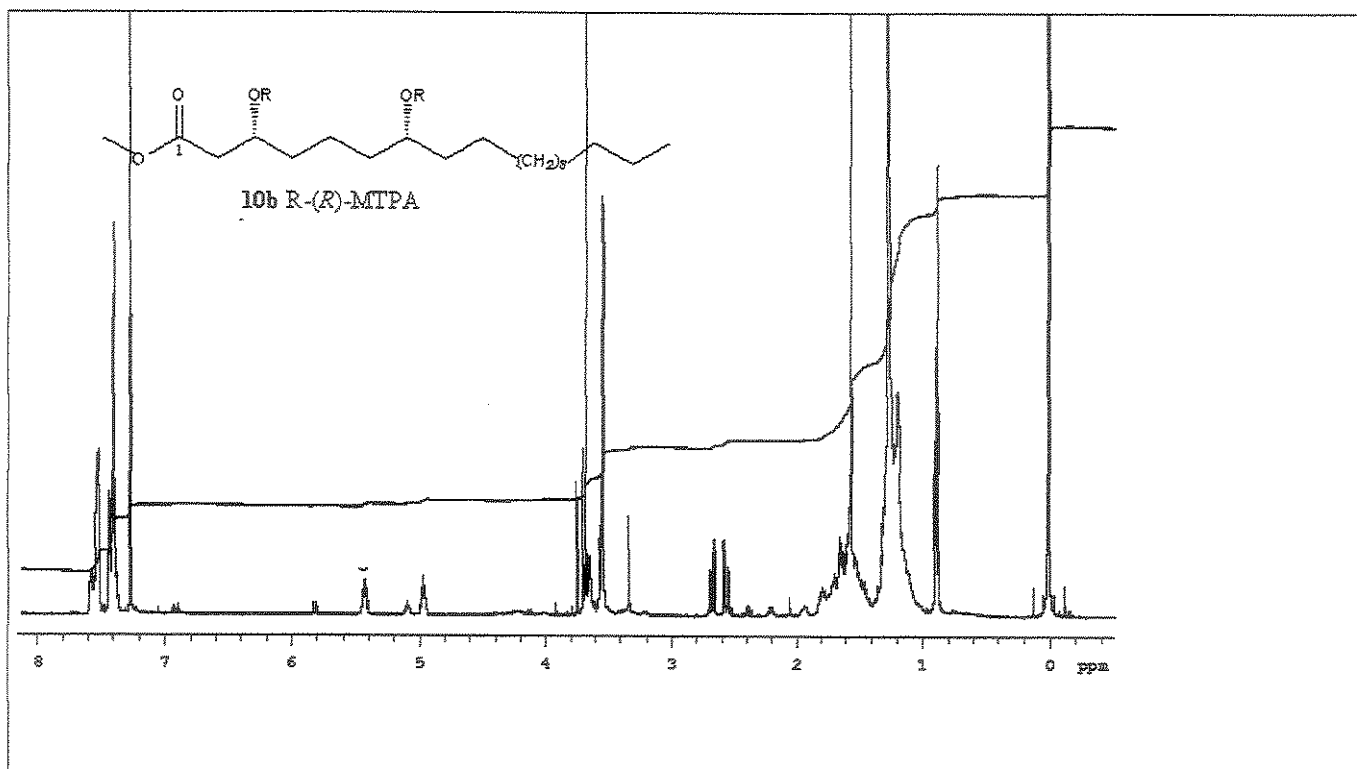


Figura 126. Espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) do composto 10b.

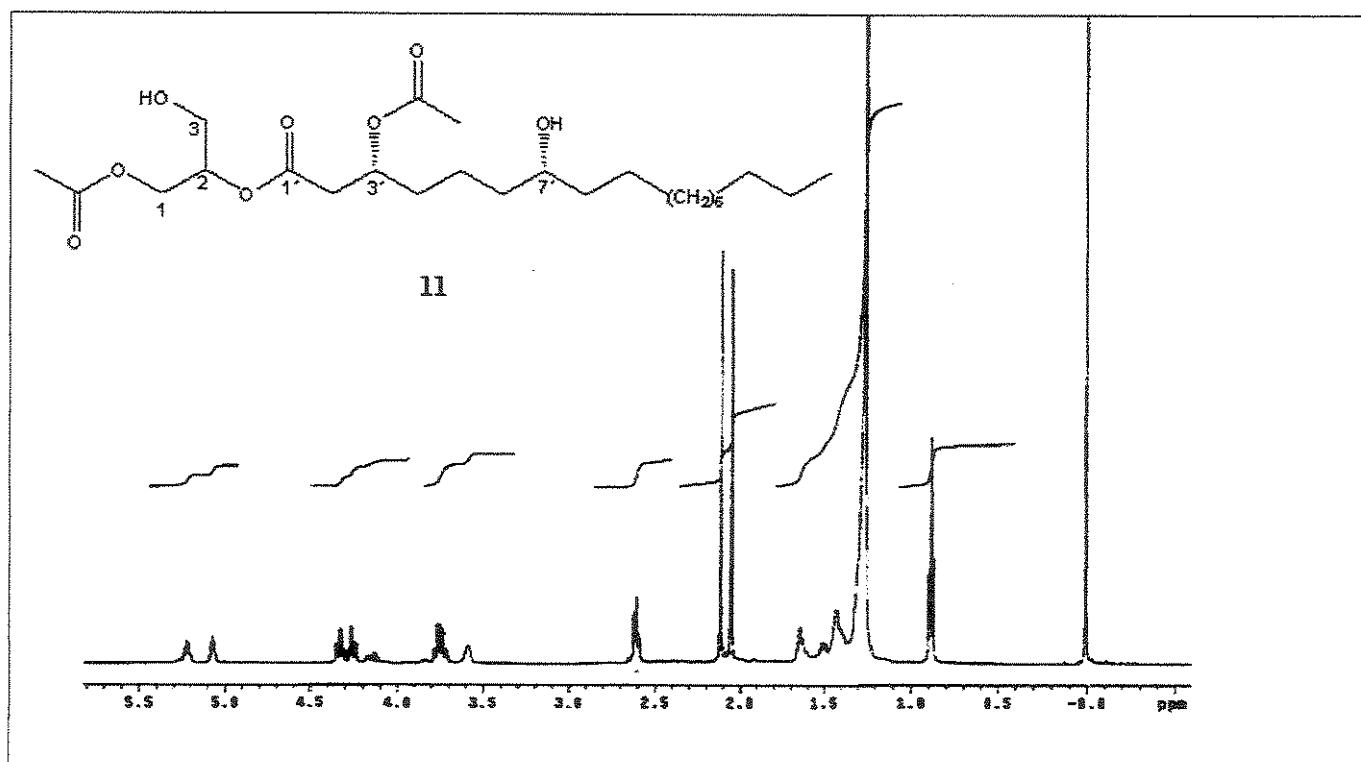


Figura 127. Espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) do óleo floral de *Oncidium pubes*.

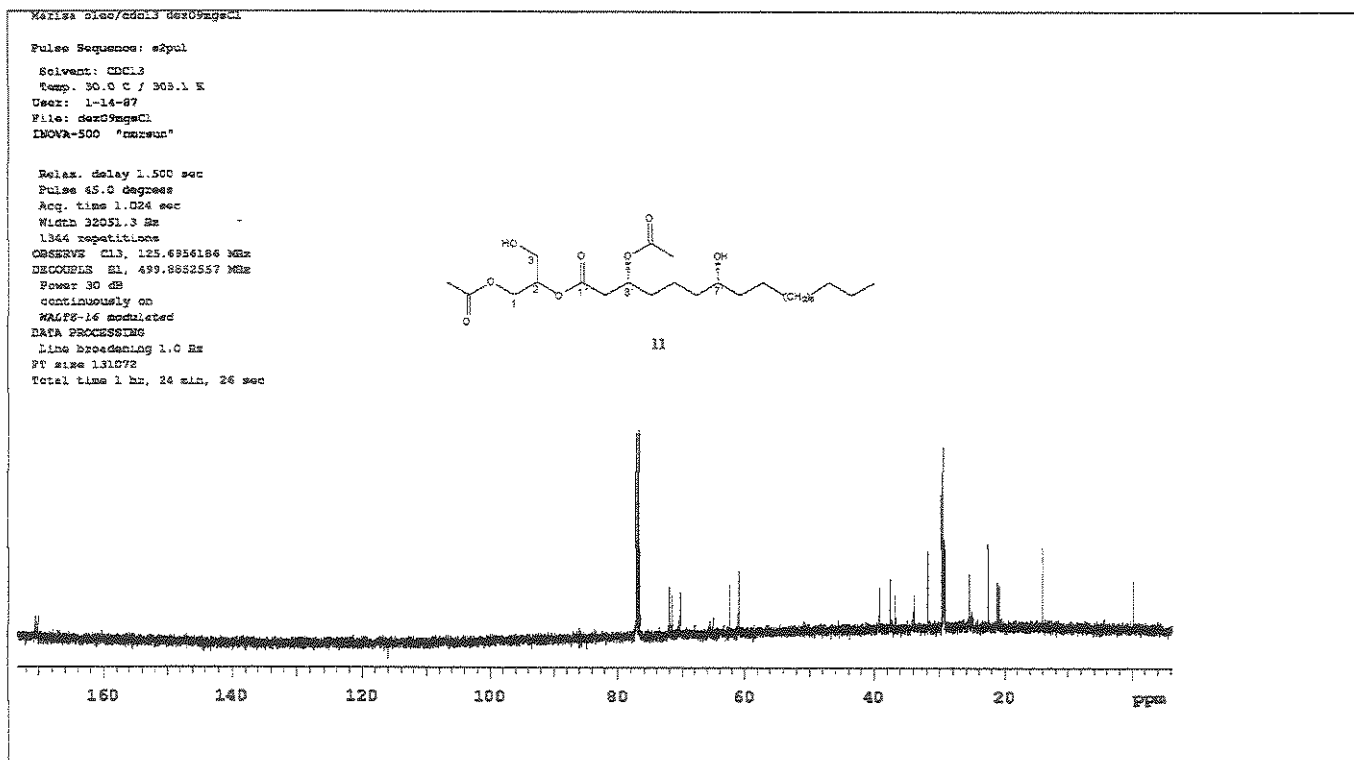


Figura 128. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) do óleo floral de *Oncidium pubes*.

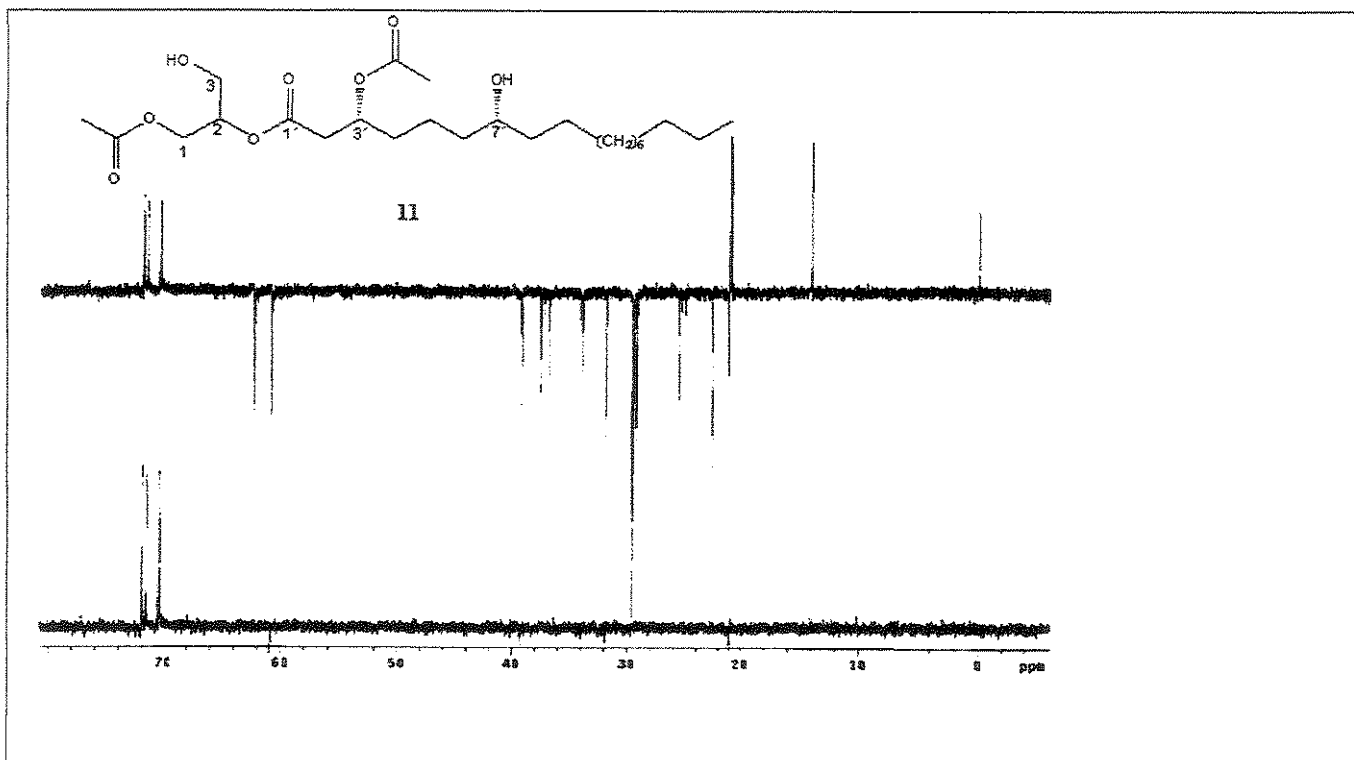


Figura 129. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium pubes*.

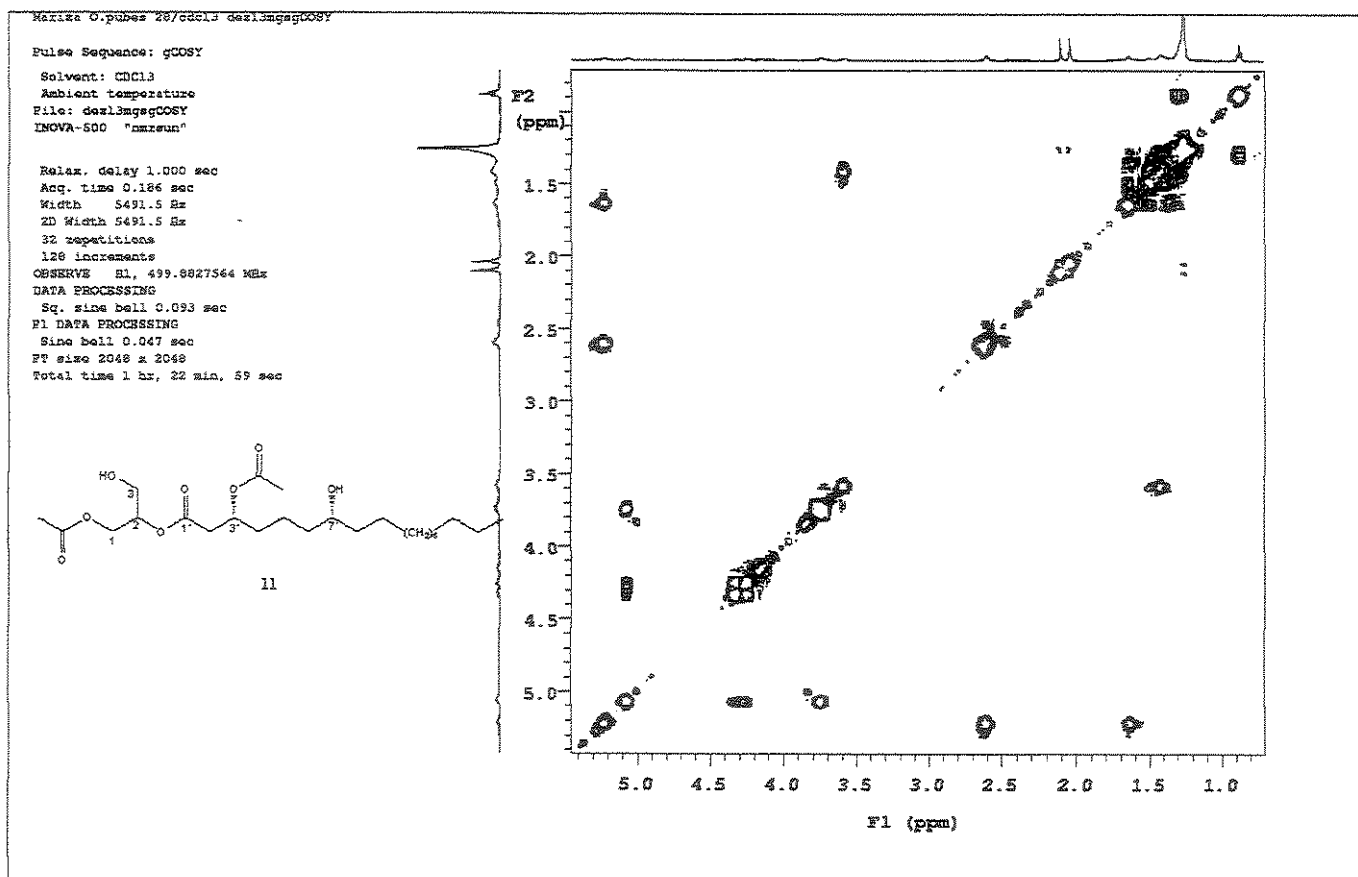


Figura 130. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium pubes*.

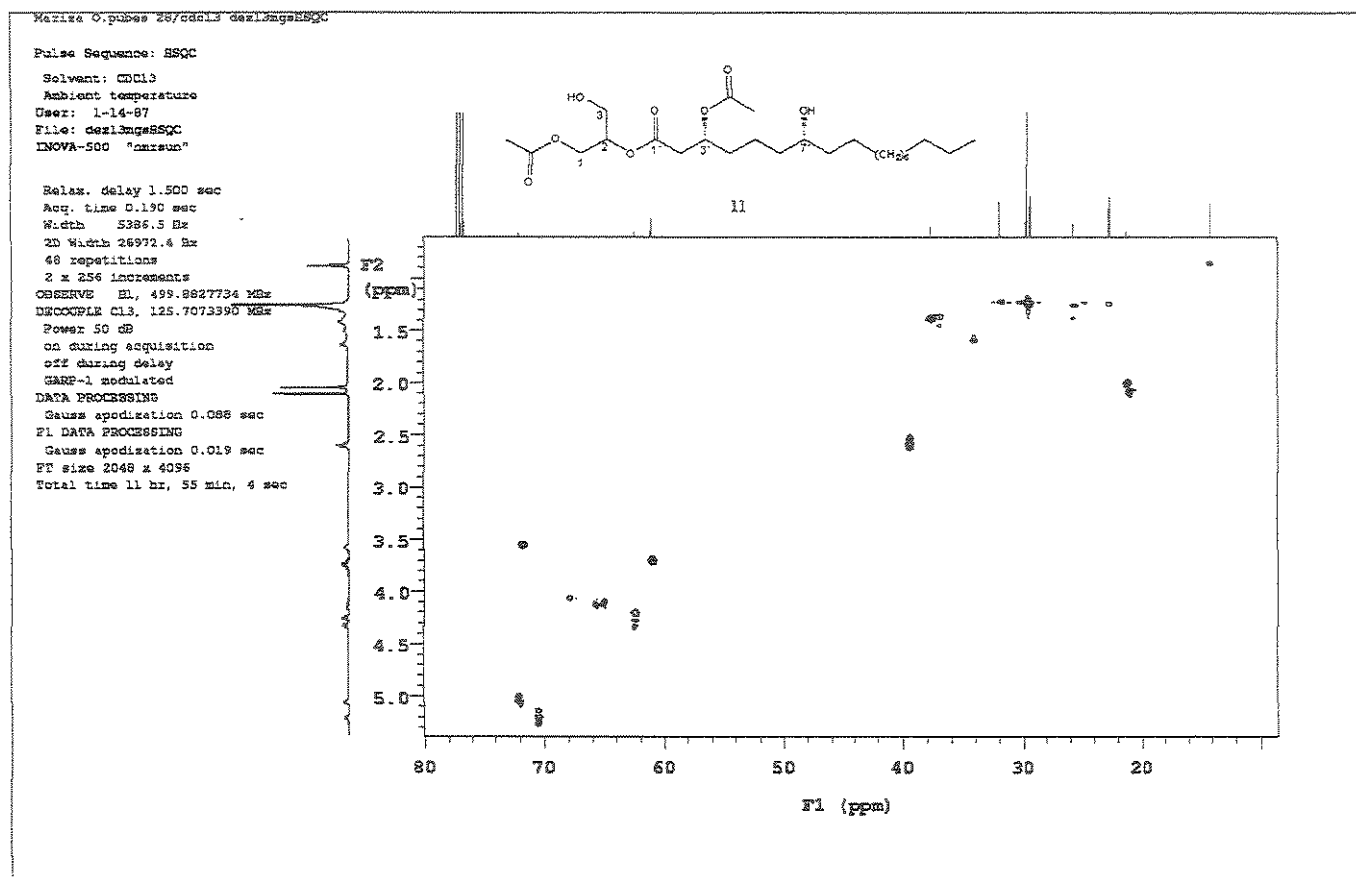


Figura 131. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HSQC (500 MHz) do óleo floral de *Oncidium pubes*.

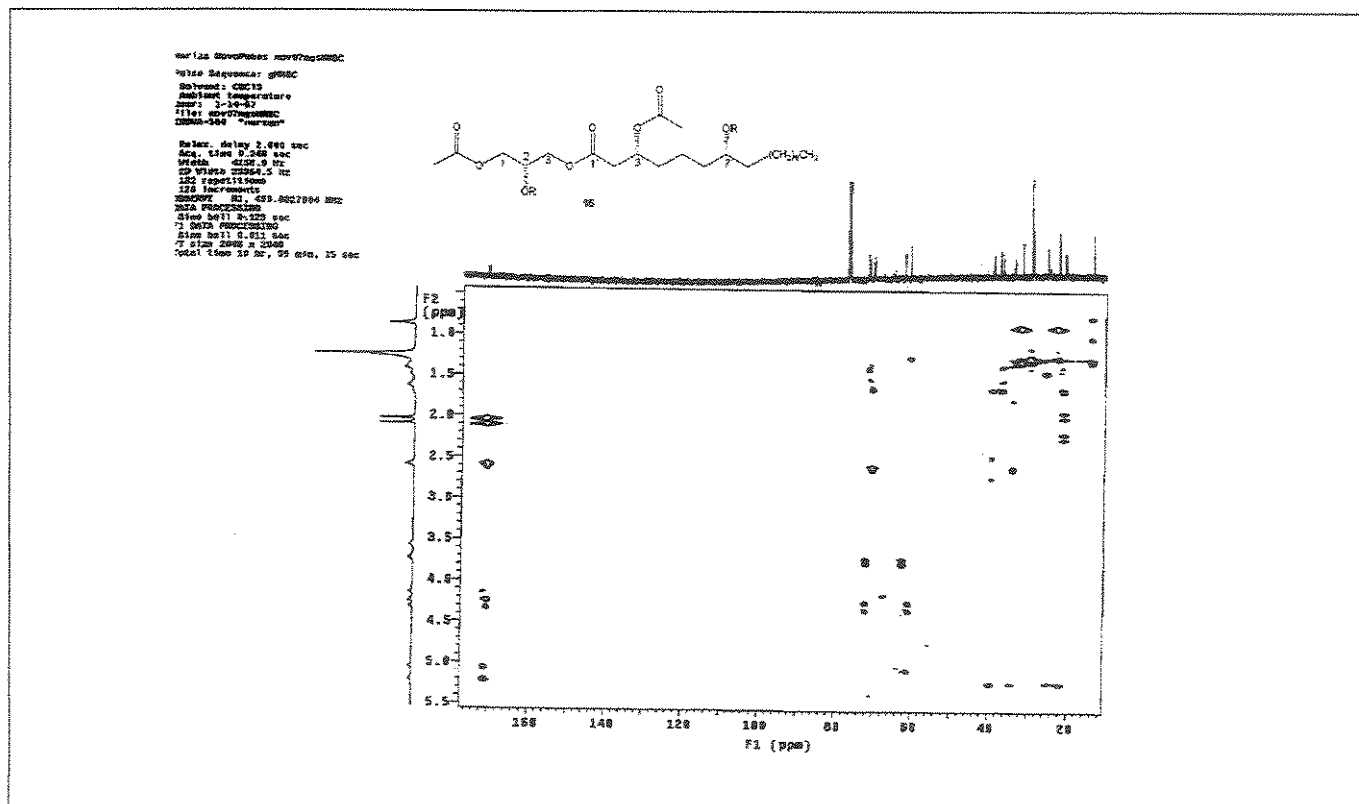


Figura 132. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HMBC (500 MHz) do óleo floral de *Oncidium pubes*.

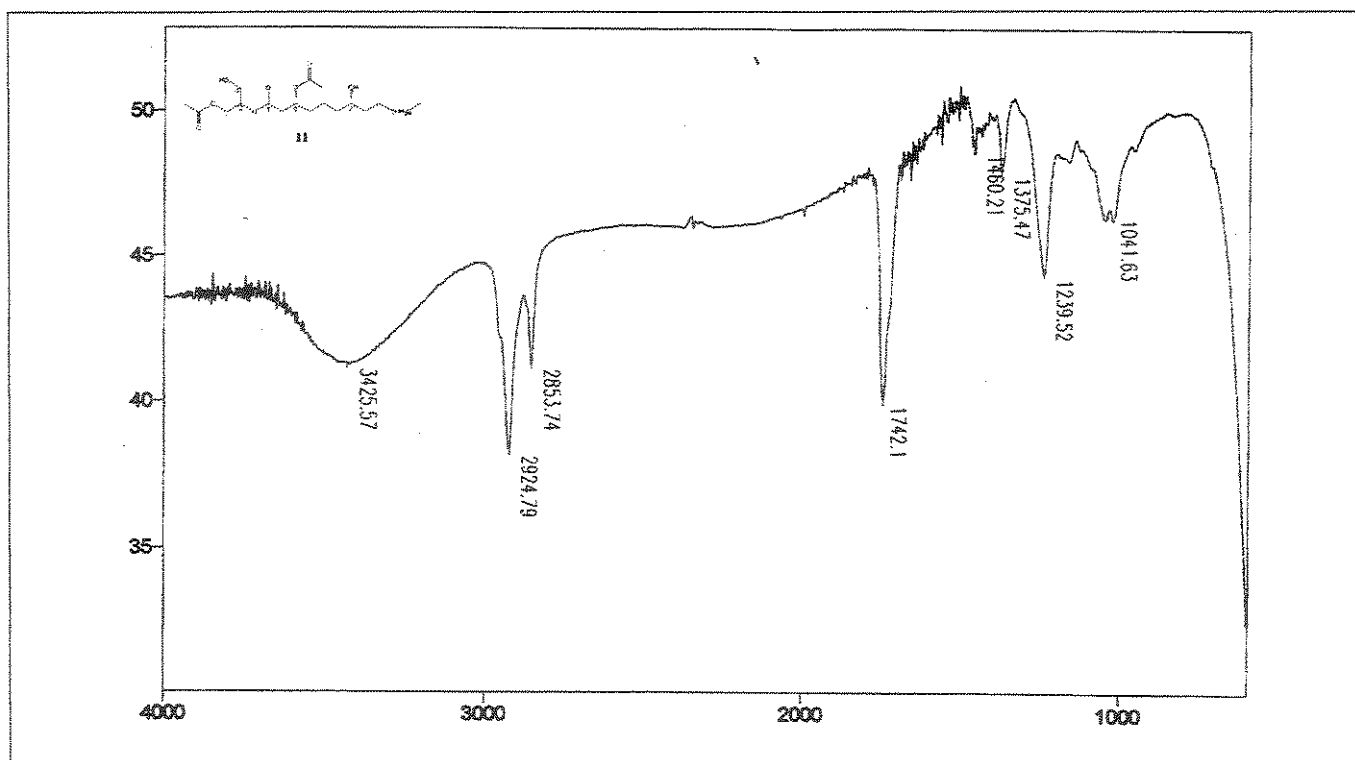


Figura 133. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 11.

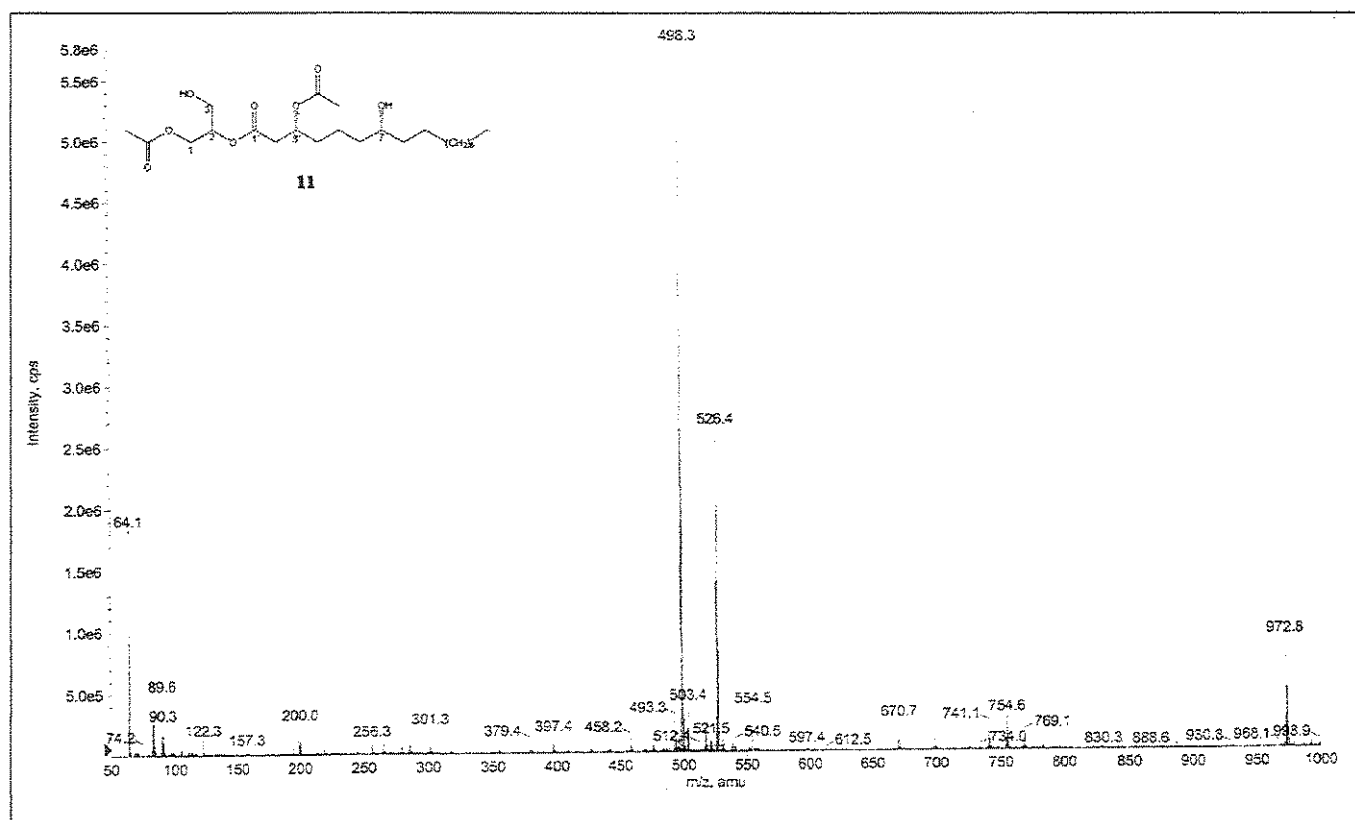
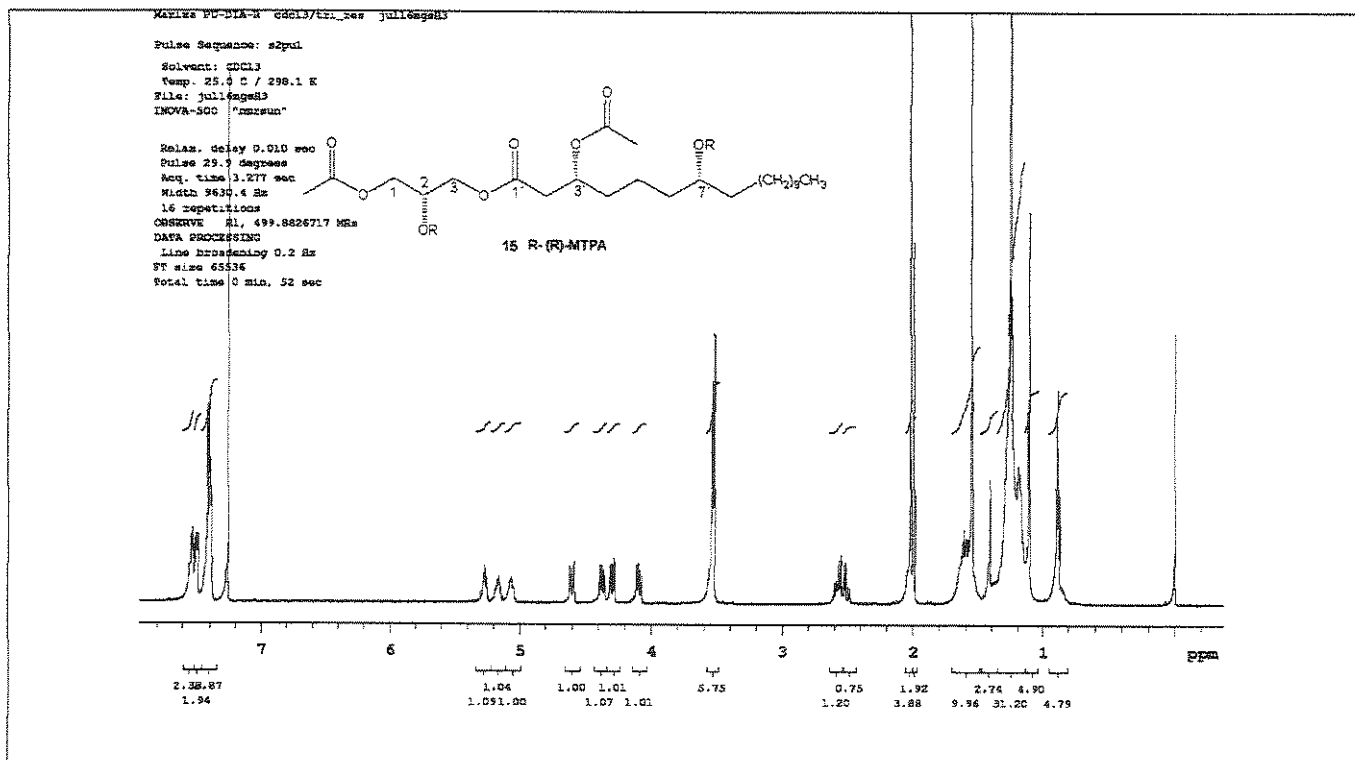
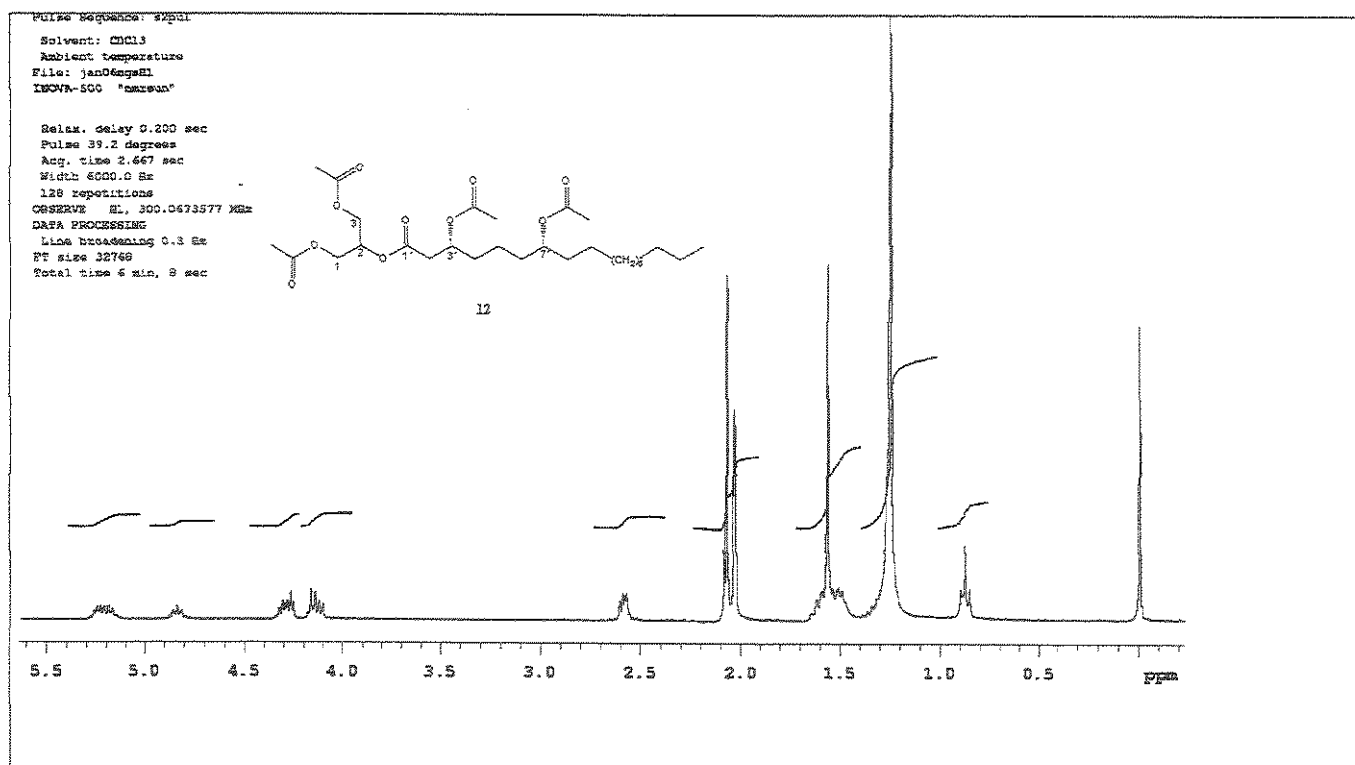


Figura 134. Espectro de massas (ESI-MS) do composto 11.



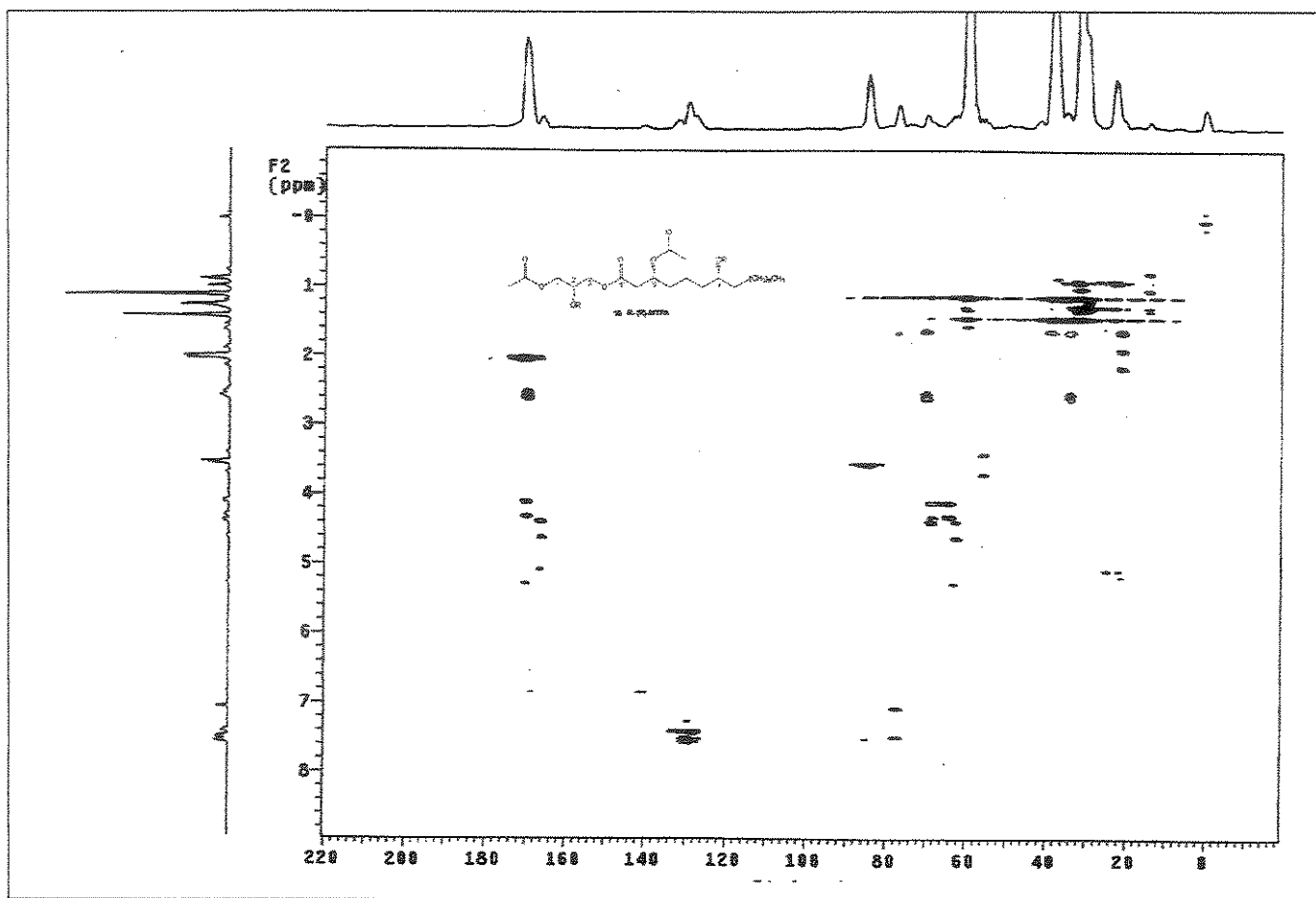


Figura 137. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HMBC (500 MHz) do composto 15.

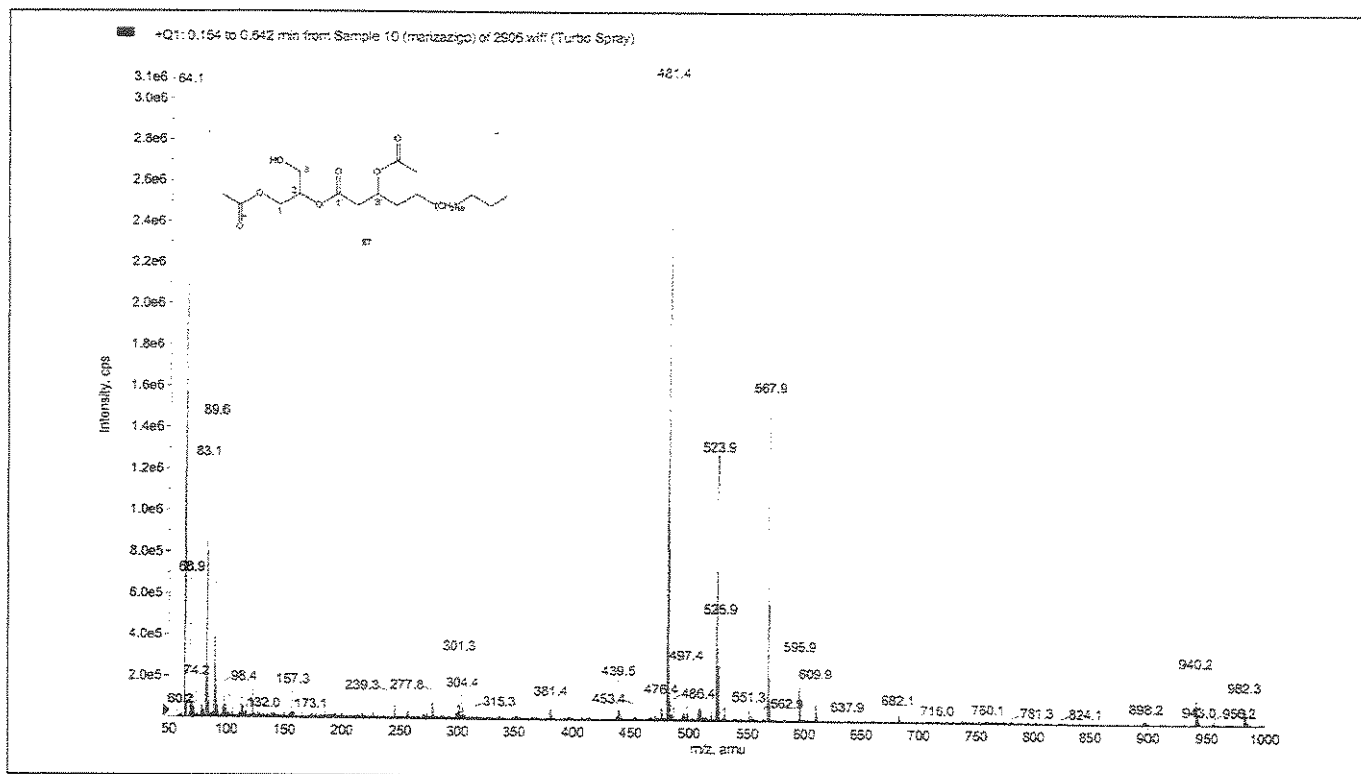


Figura 138. Espectro de massas (ESI-MS) do composto 17.

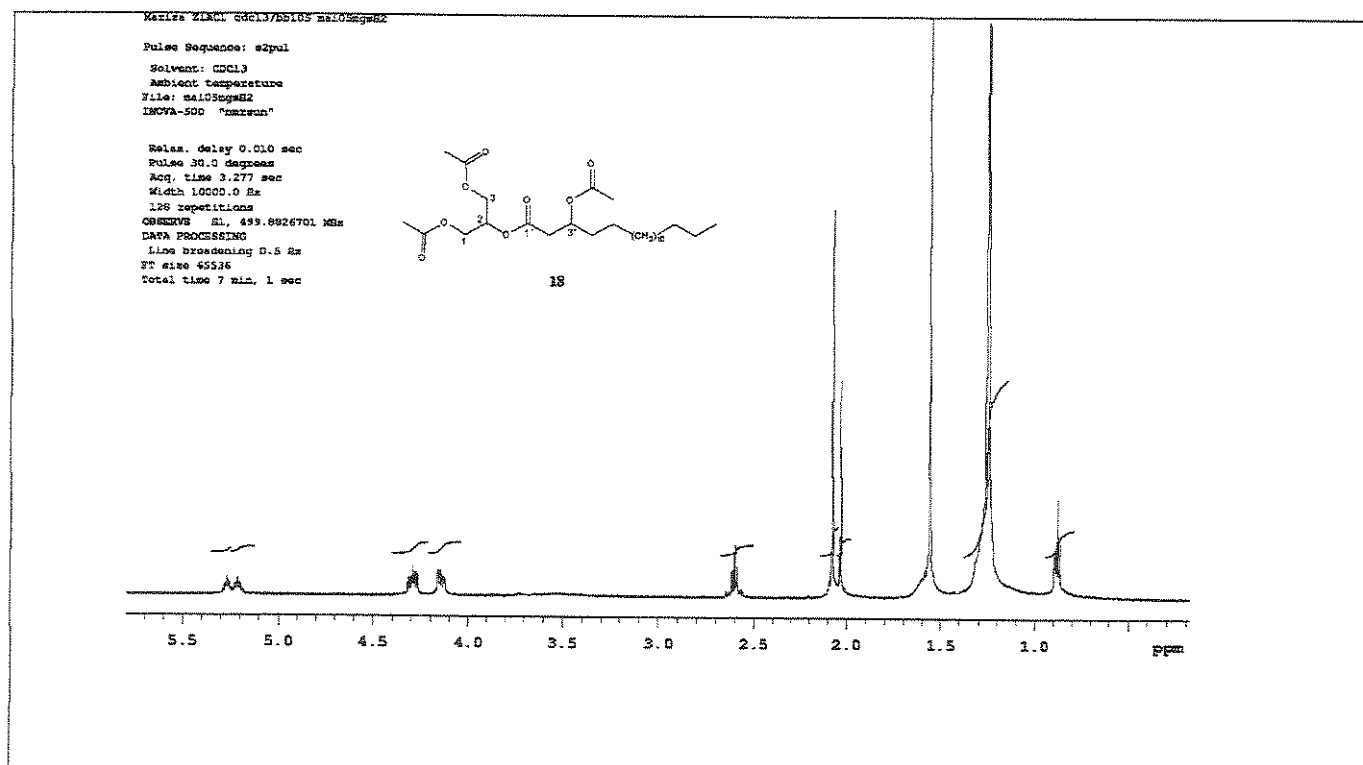


Figura 139. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz) do composto 18.

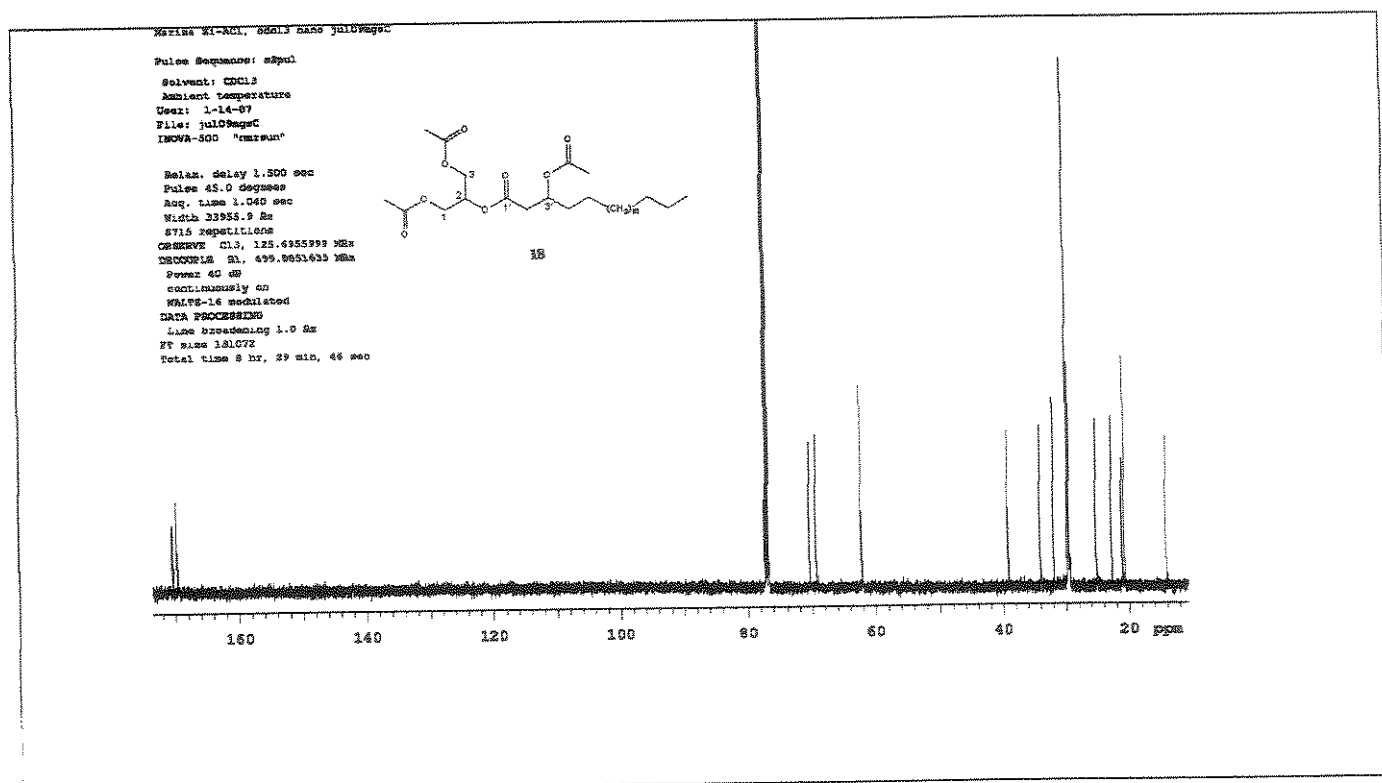


Figura 140. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) do composto 18.

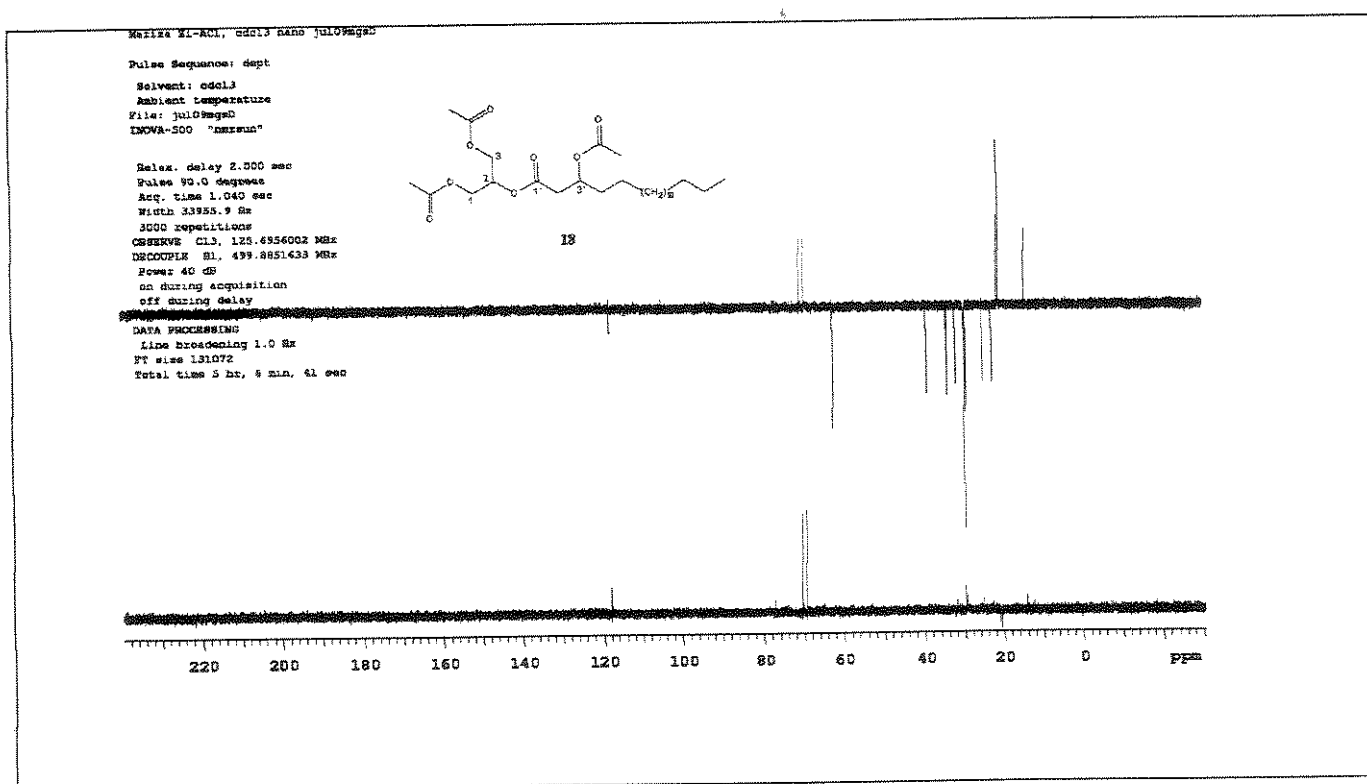


Figura 141. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do composto 18.

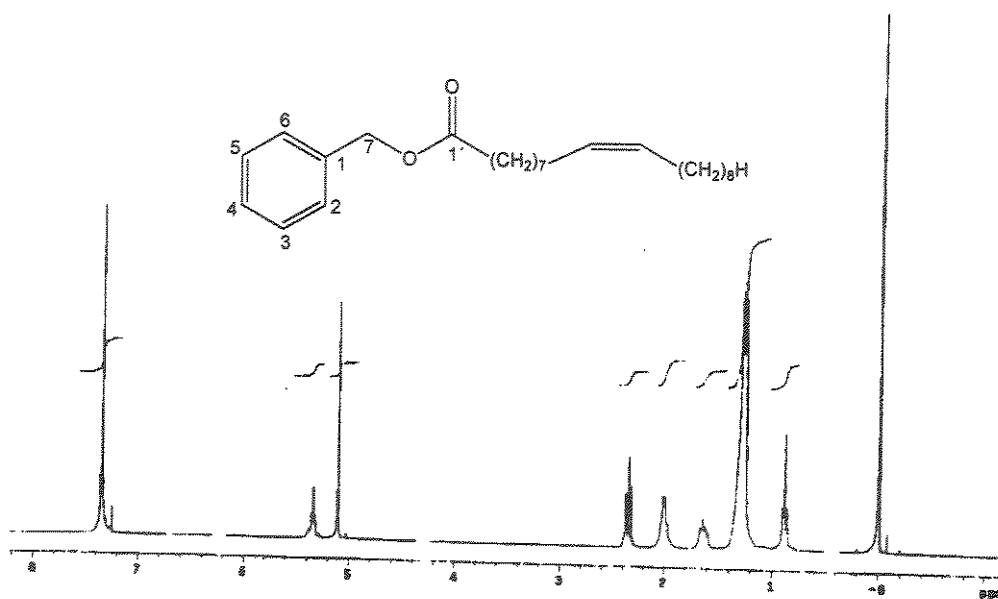


Figura 142. Espectro de H (300 MHz) do composto 47.

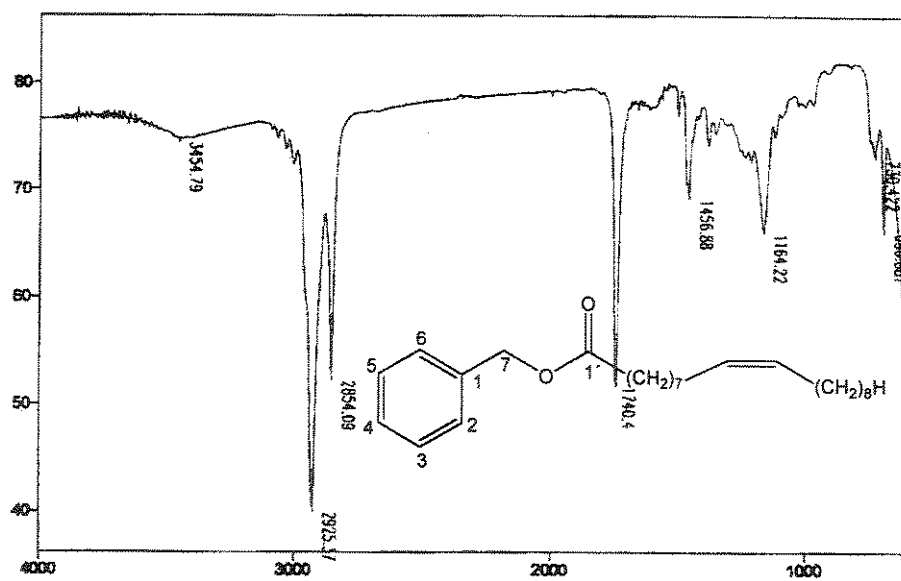


Figura 143. Espectro no Infravermelho (filme) do composto 47.

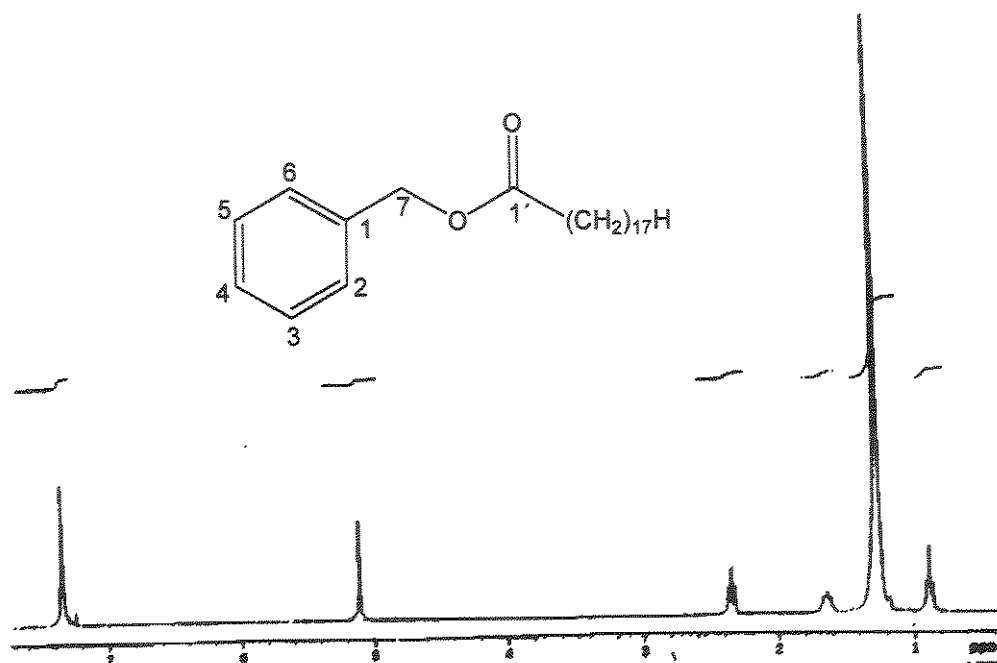


Figura 144. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 48.

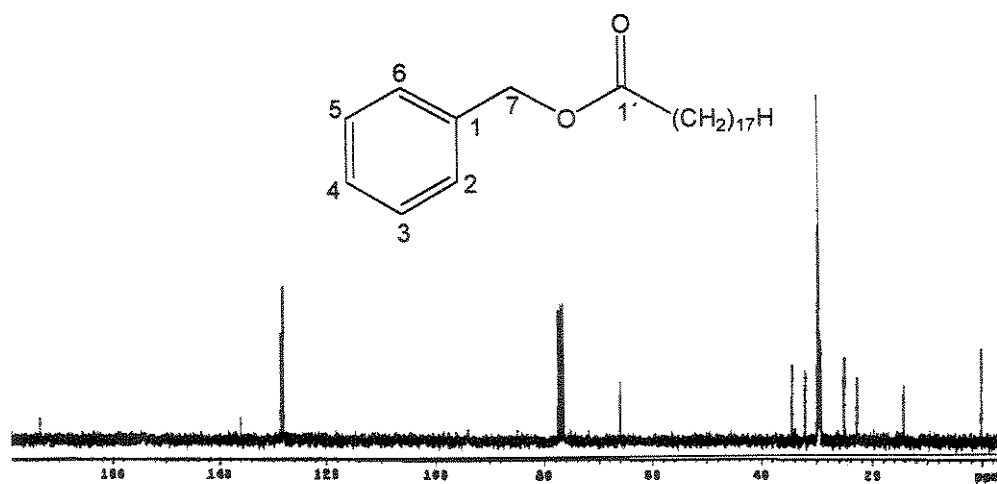


Figura 145. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do composto 48.

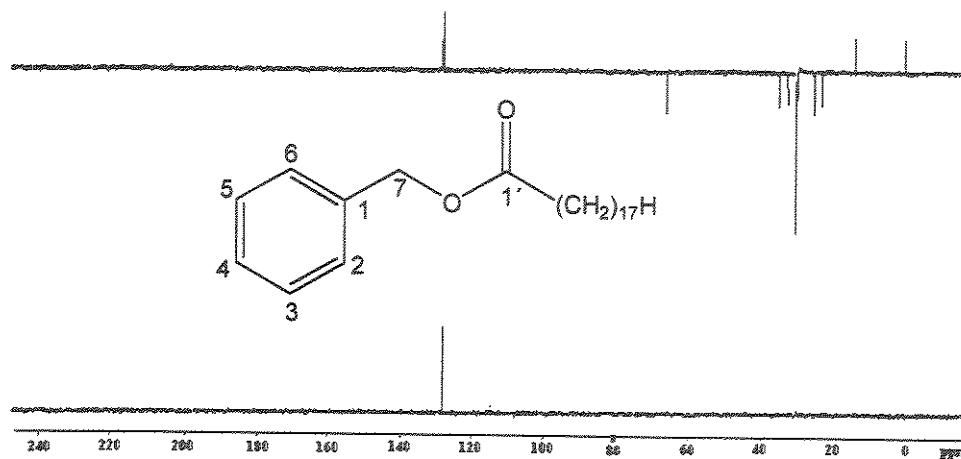


Figura 146. Espectro de RMN de ¹³C: a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75,45 MHz, CDCl₃) do composto 48.

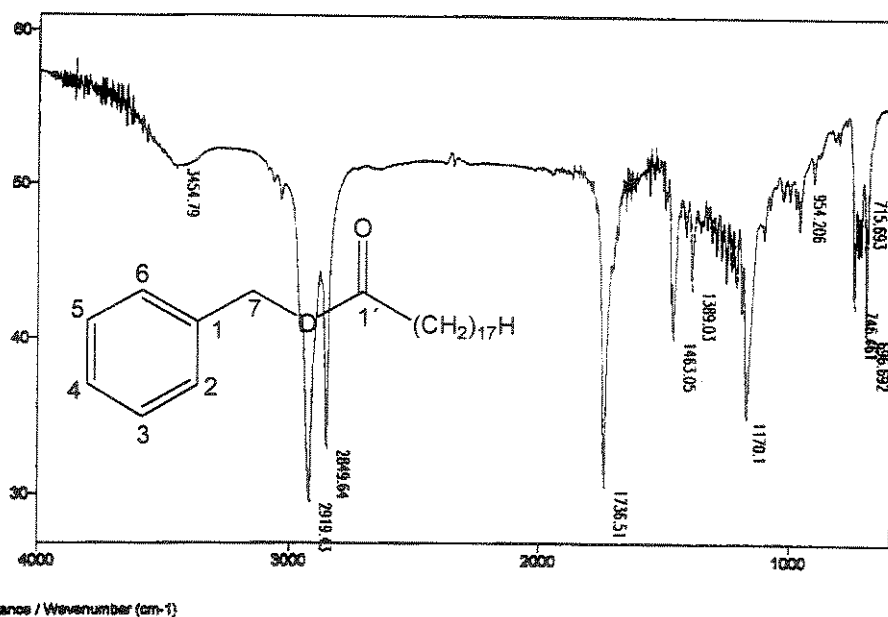


Figura 147. Espectro no infravermelho (KBr) do composto 48.

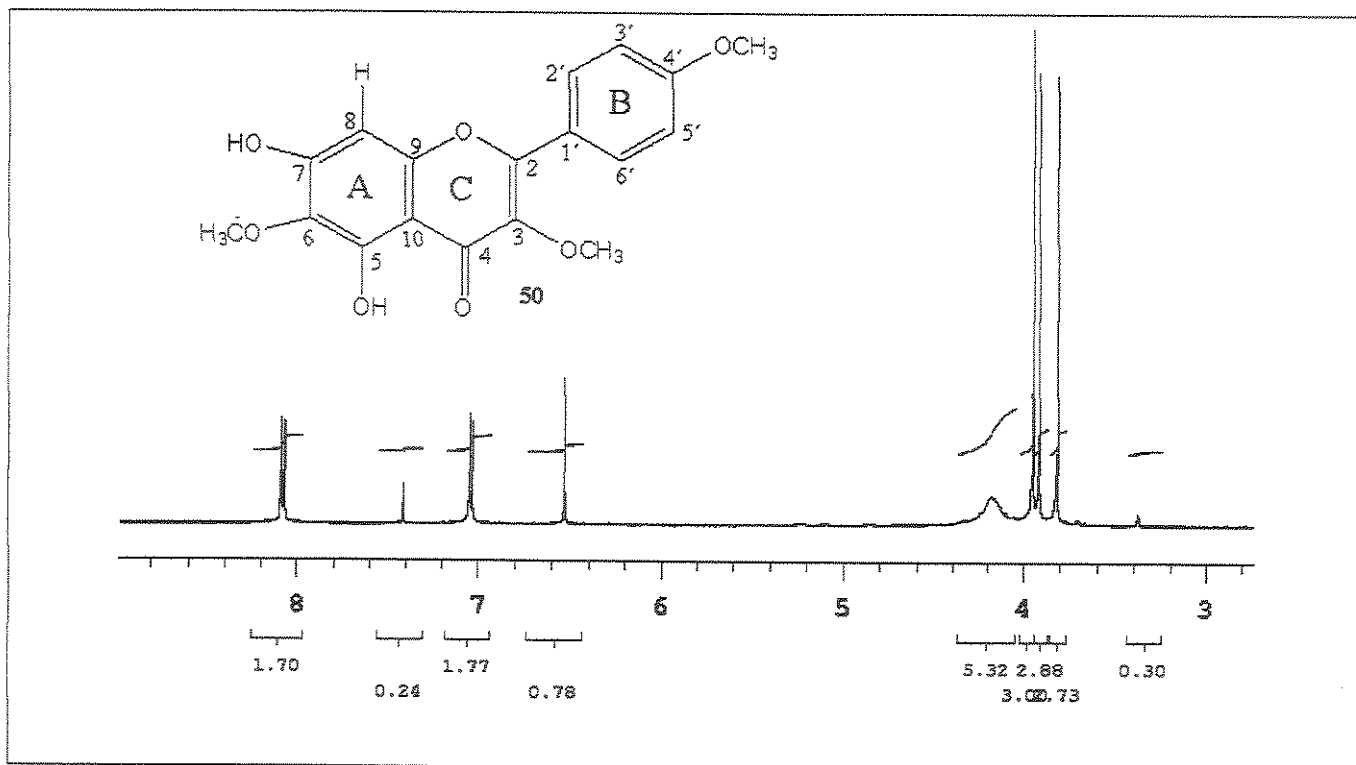


Figura 148. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto 50.

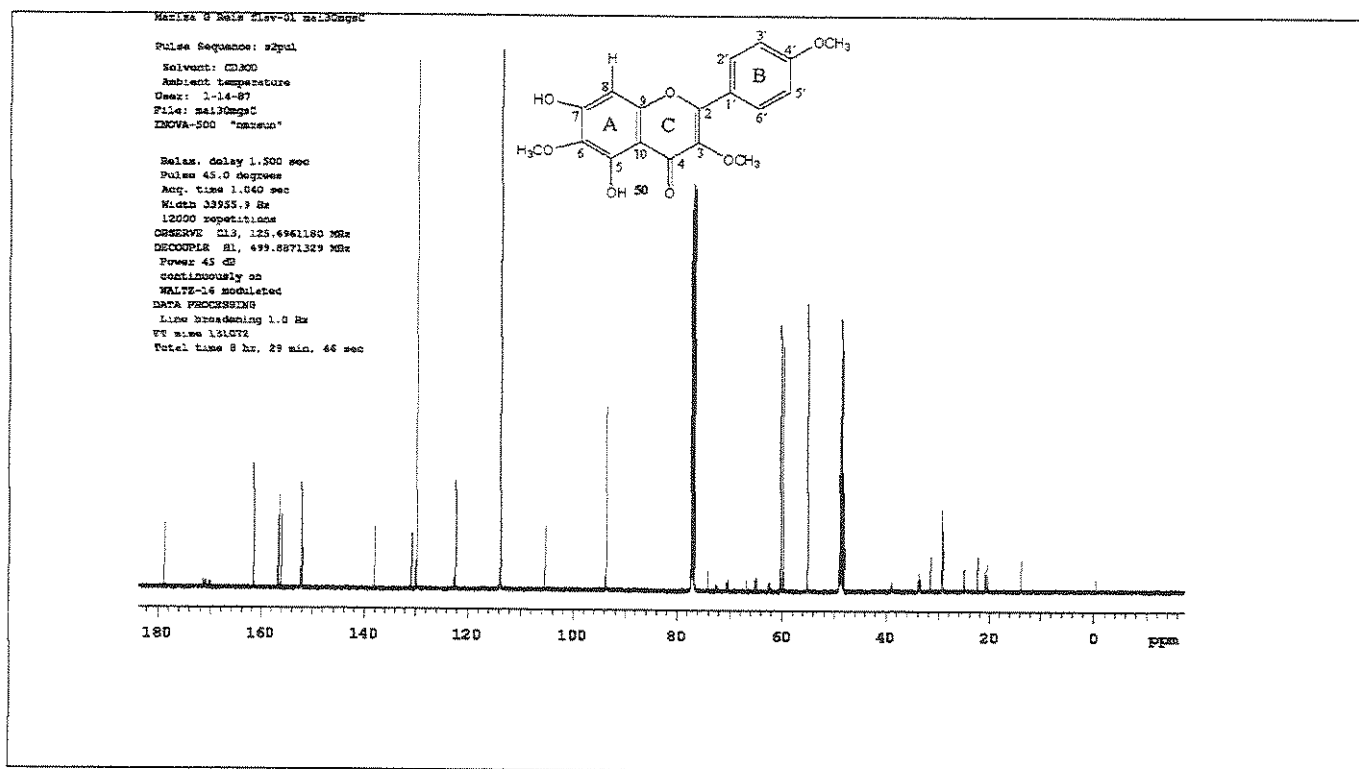


Figura 149. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto 50.

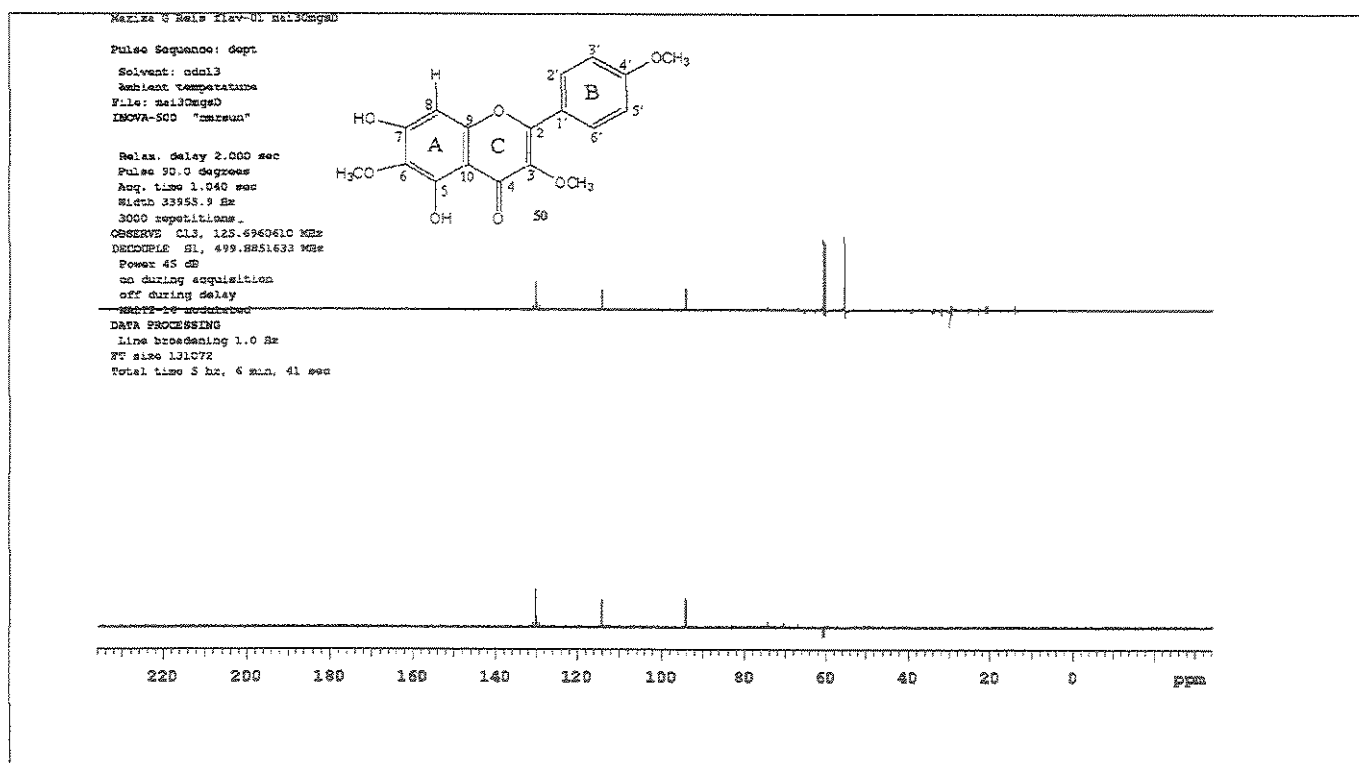


Figura 150. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do composto 50.

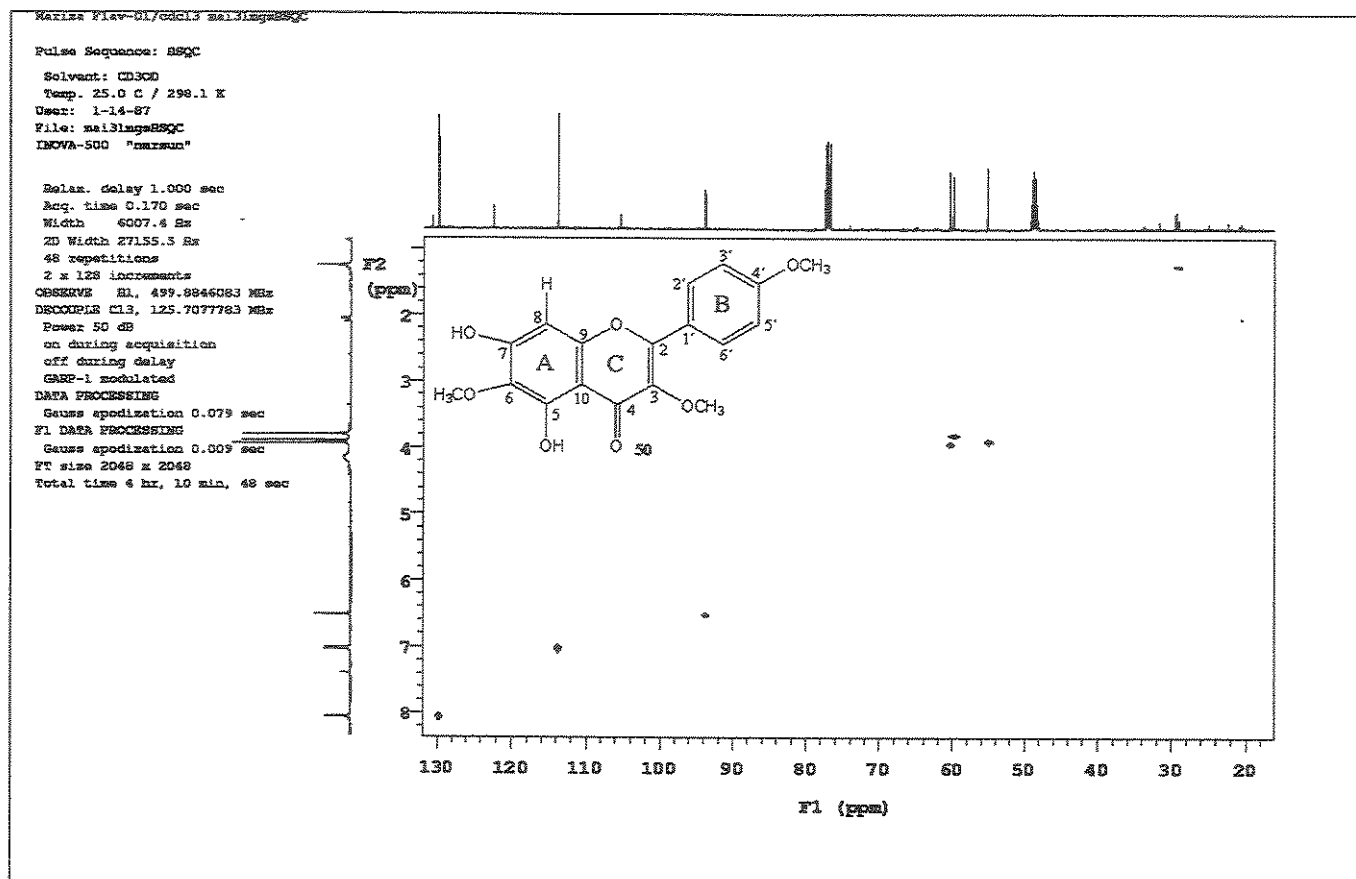


Figura 151. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HSQC (500 MHz) do composto 50.

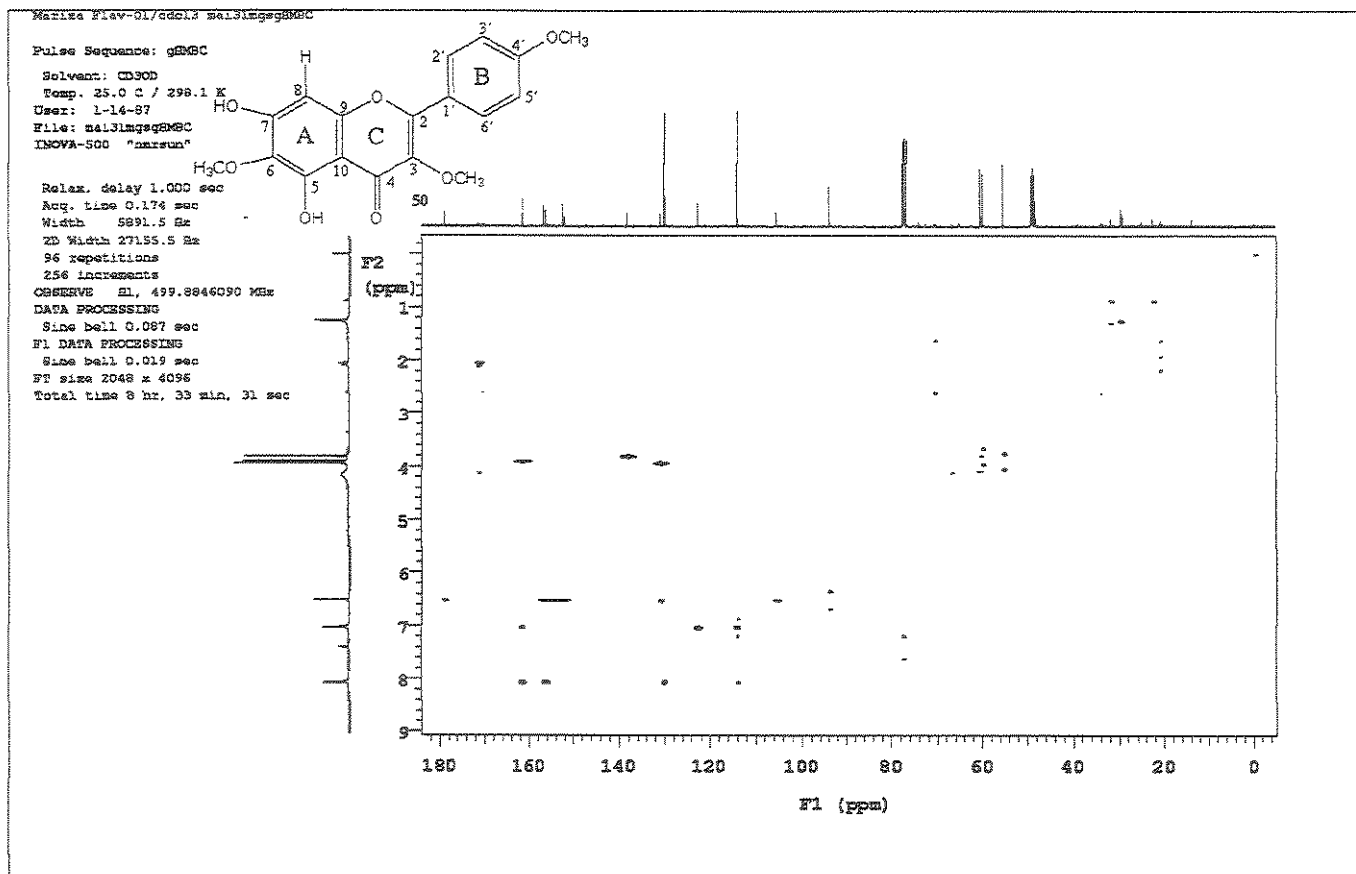


Figura 152. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C – HMBC (500 MHz) do composto 50.

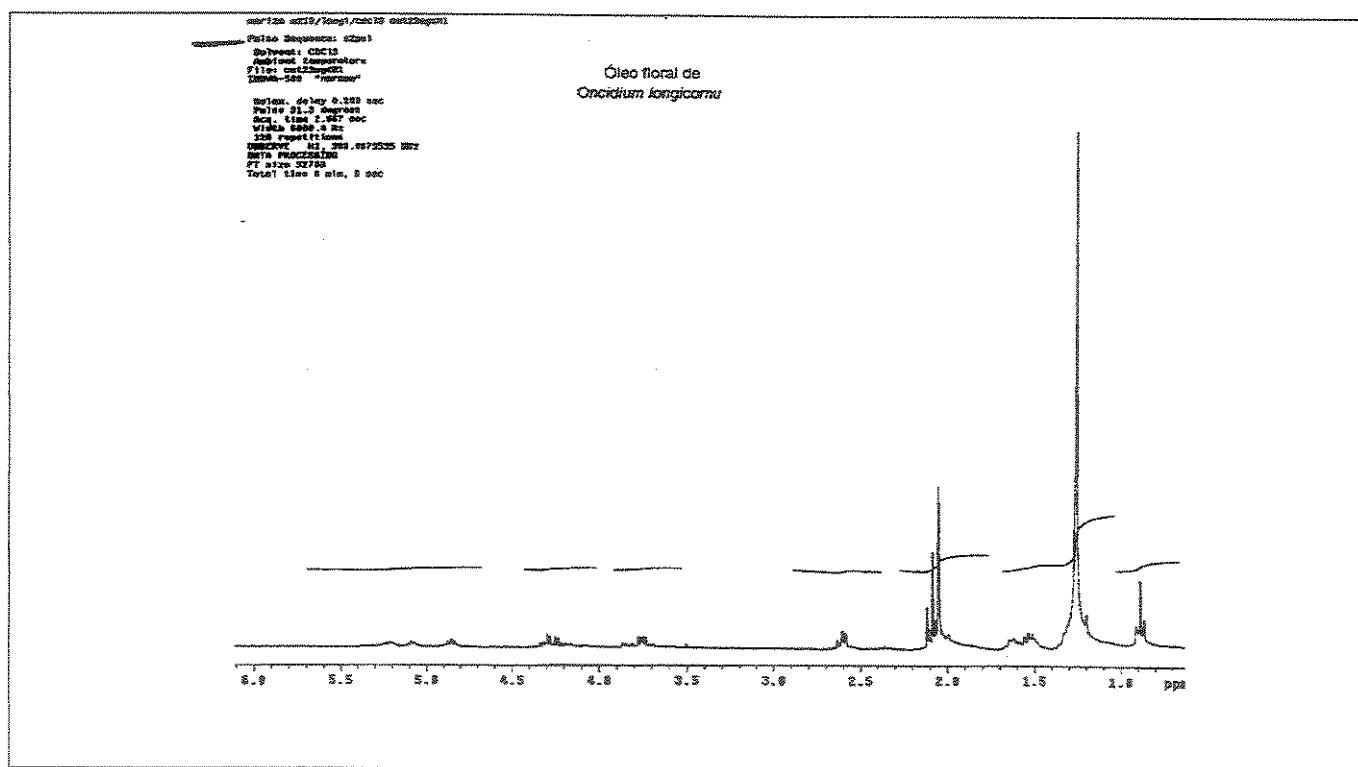


Figura 153. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) do óleo floral de *Oncidium longicornu*.

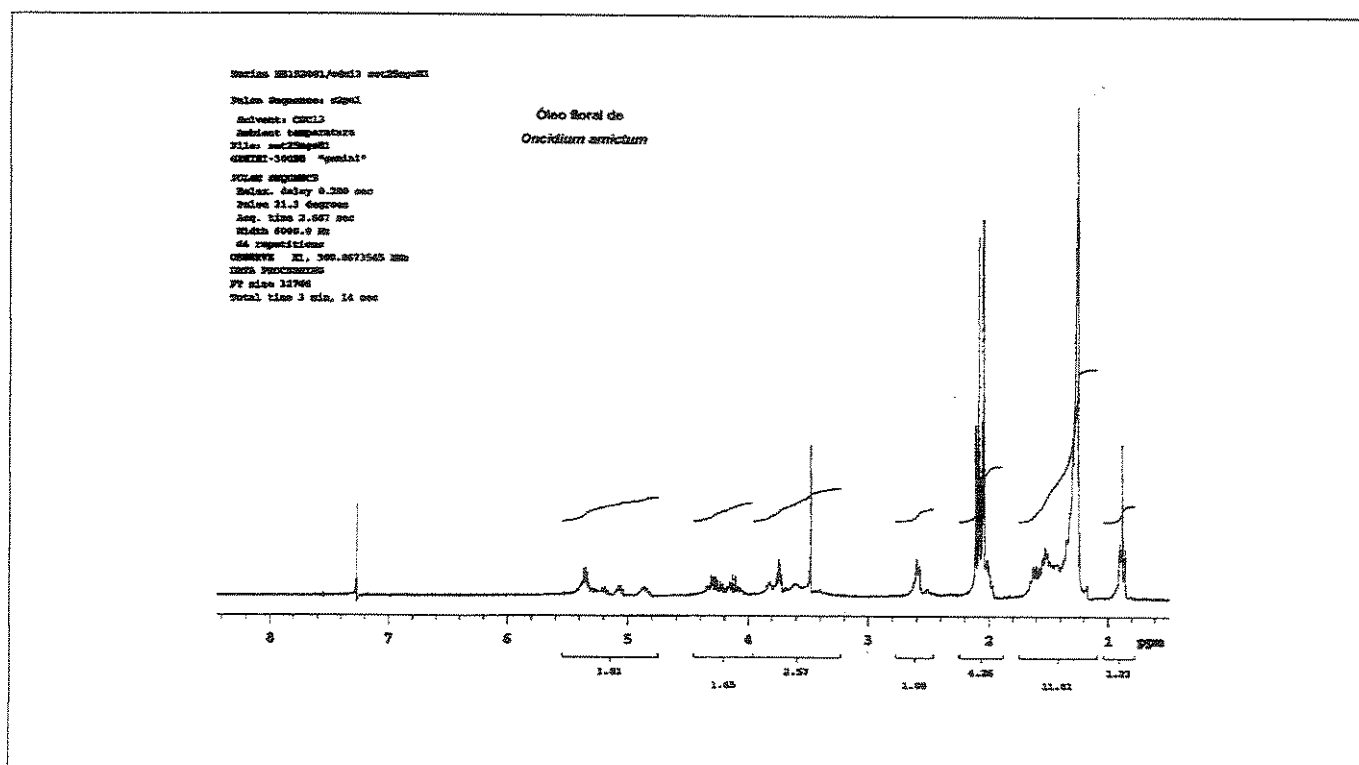


Figura 154. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium amictum*.

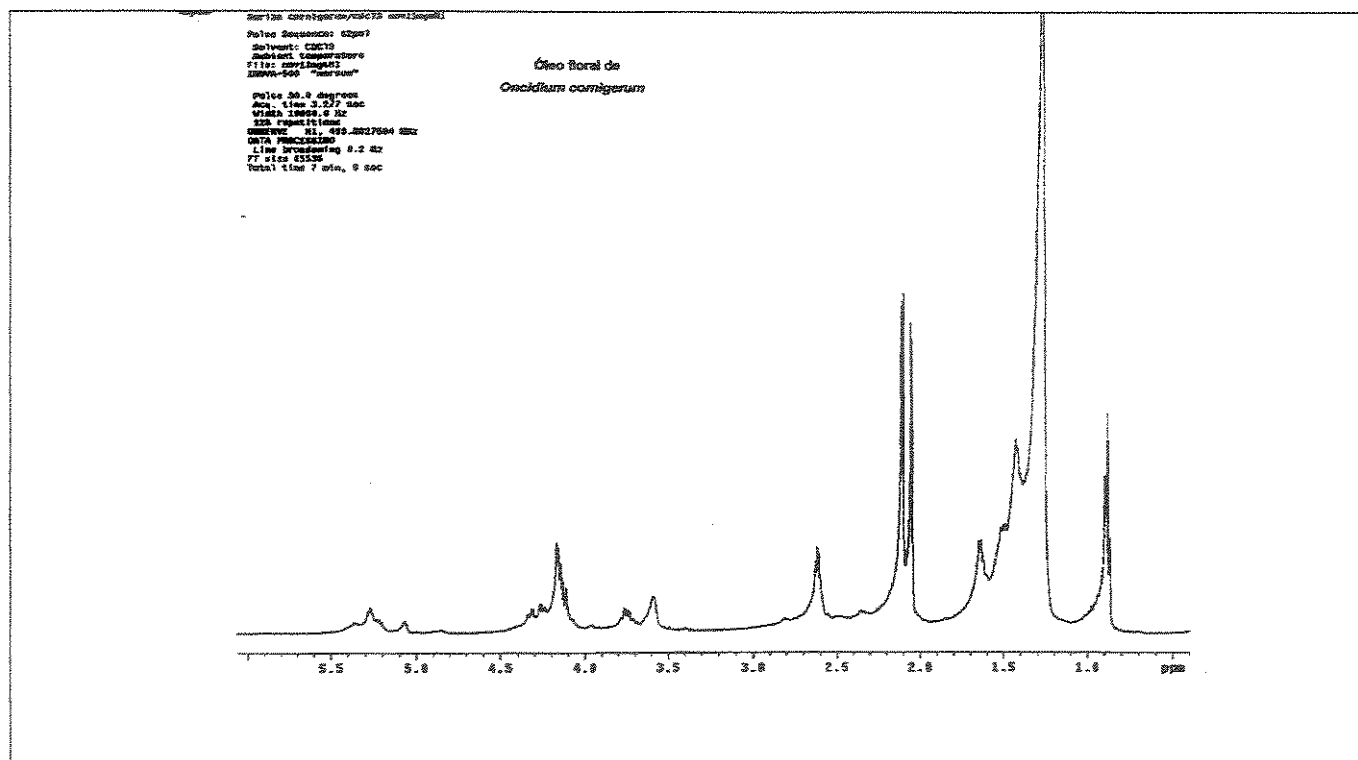


Figura 155. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium cornigerum*.

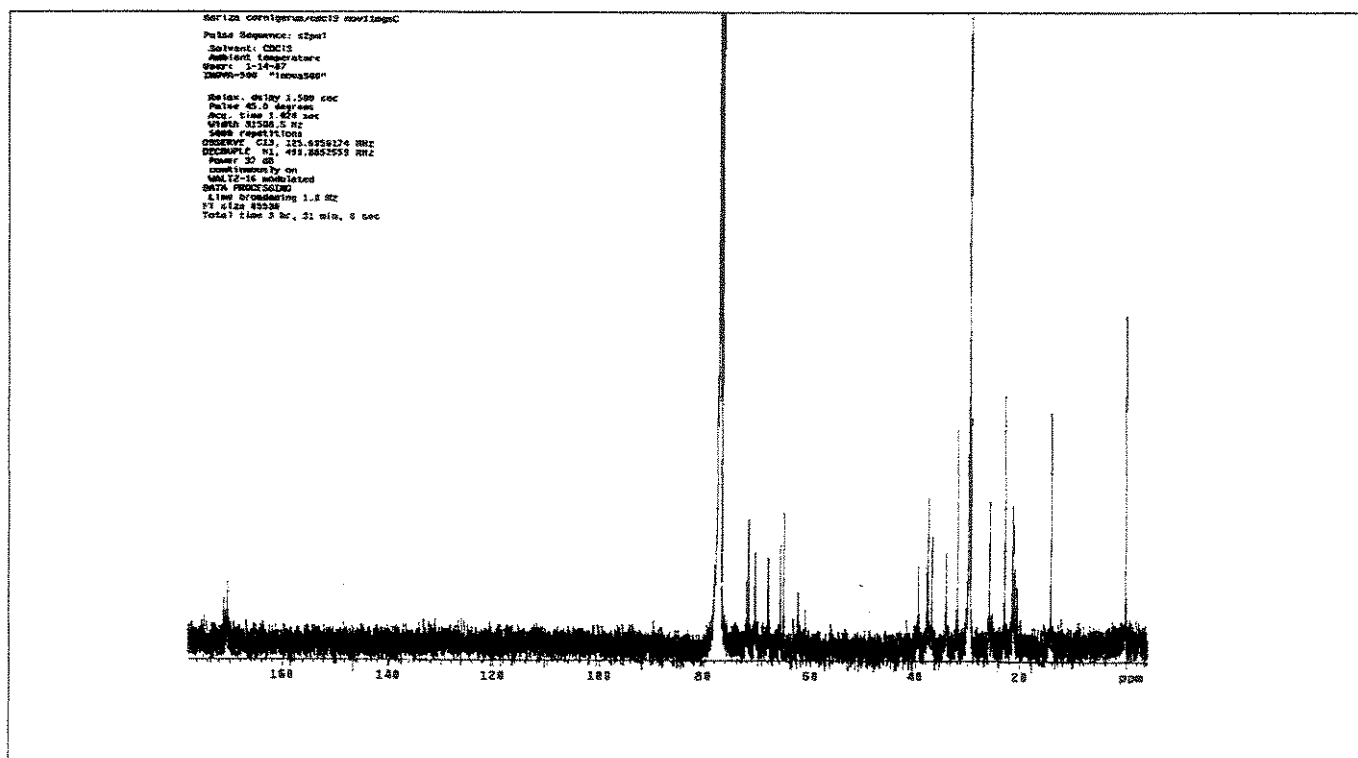


Figura 156. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium cornigerum*.

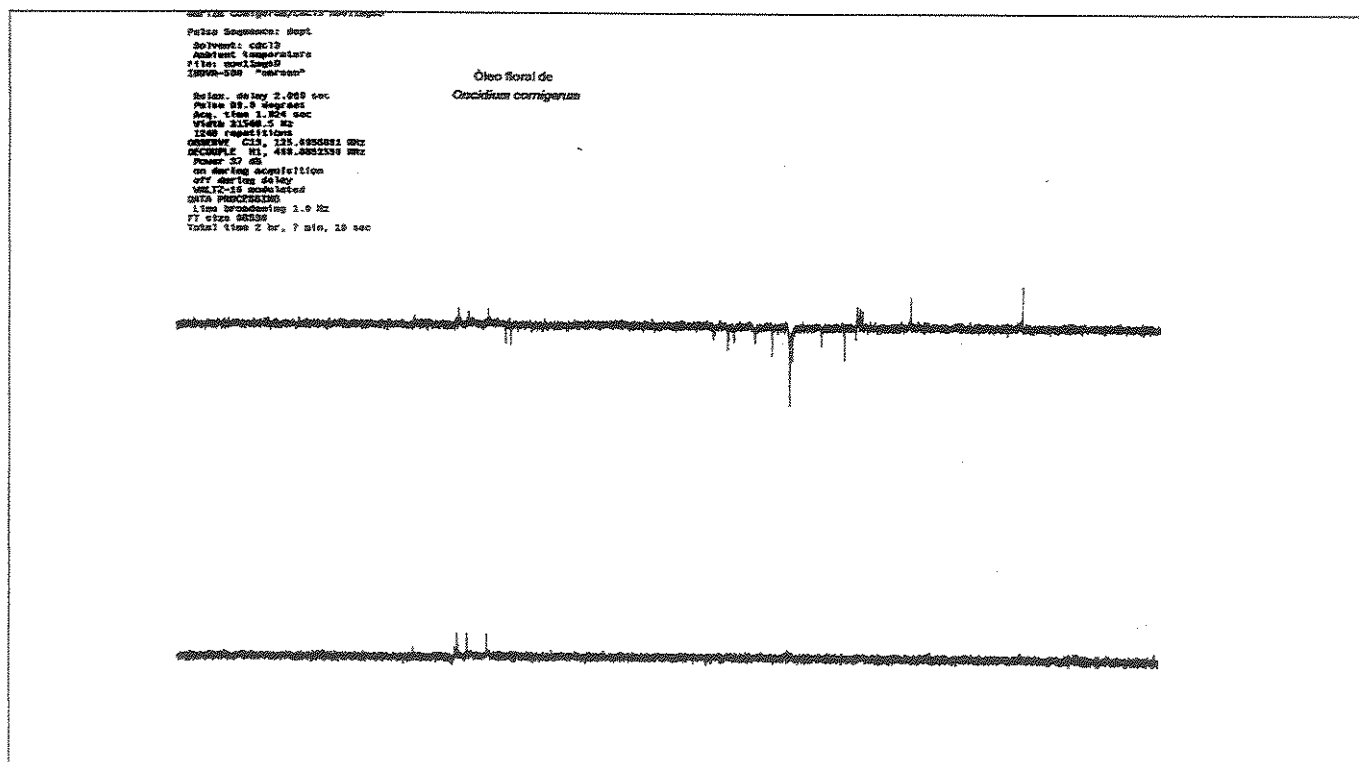


Figura 157. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium cornigerum*.

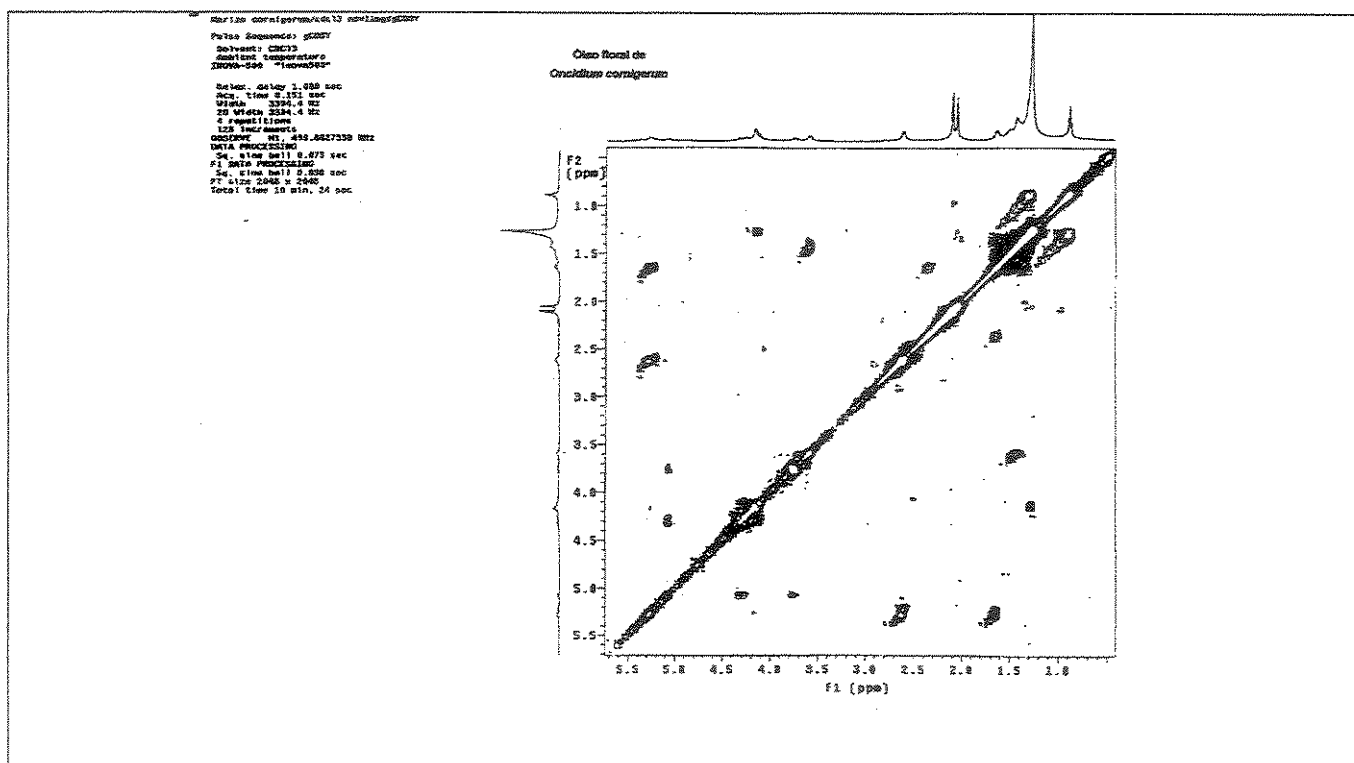


Figura 158. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium cornigerum*.

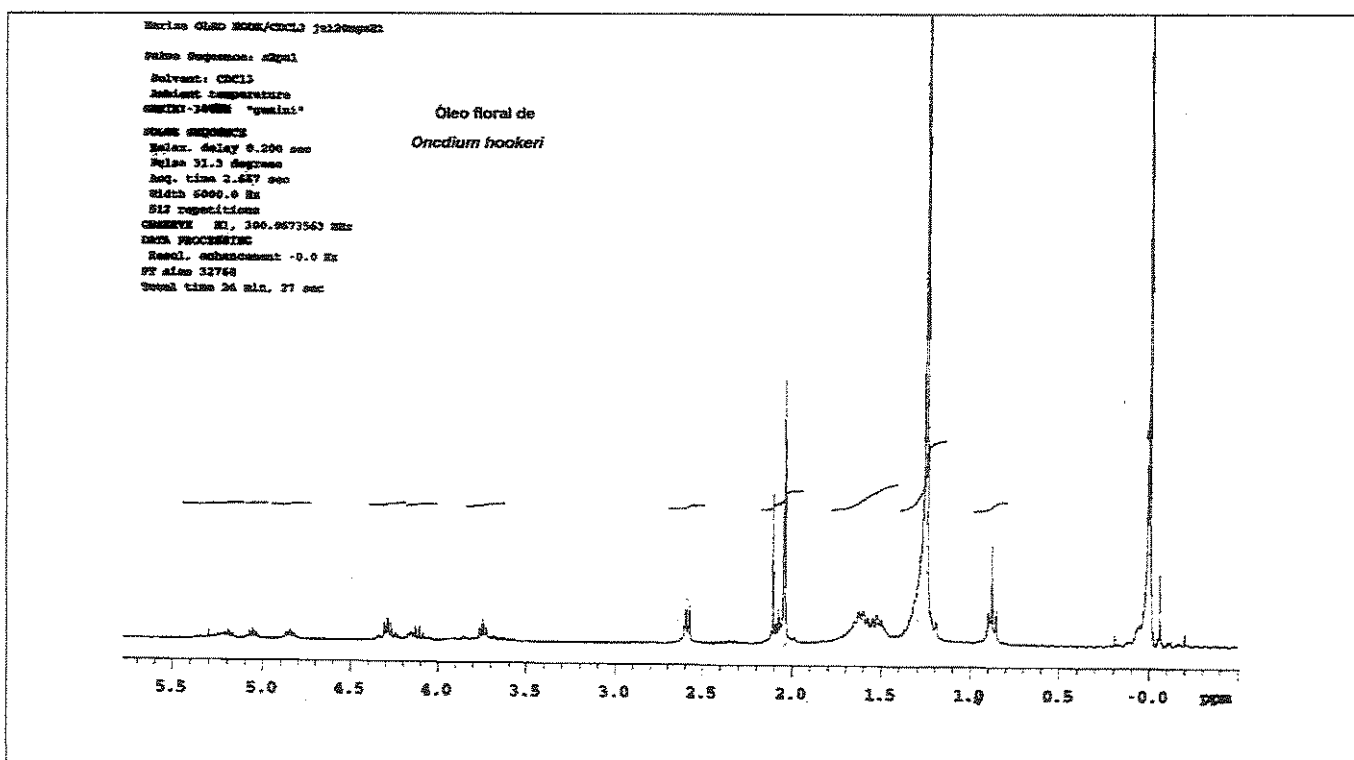


Figura 159. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium hookeri*.

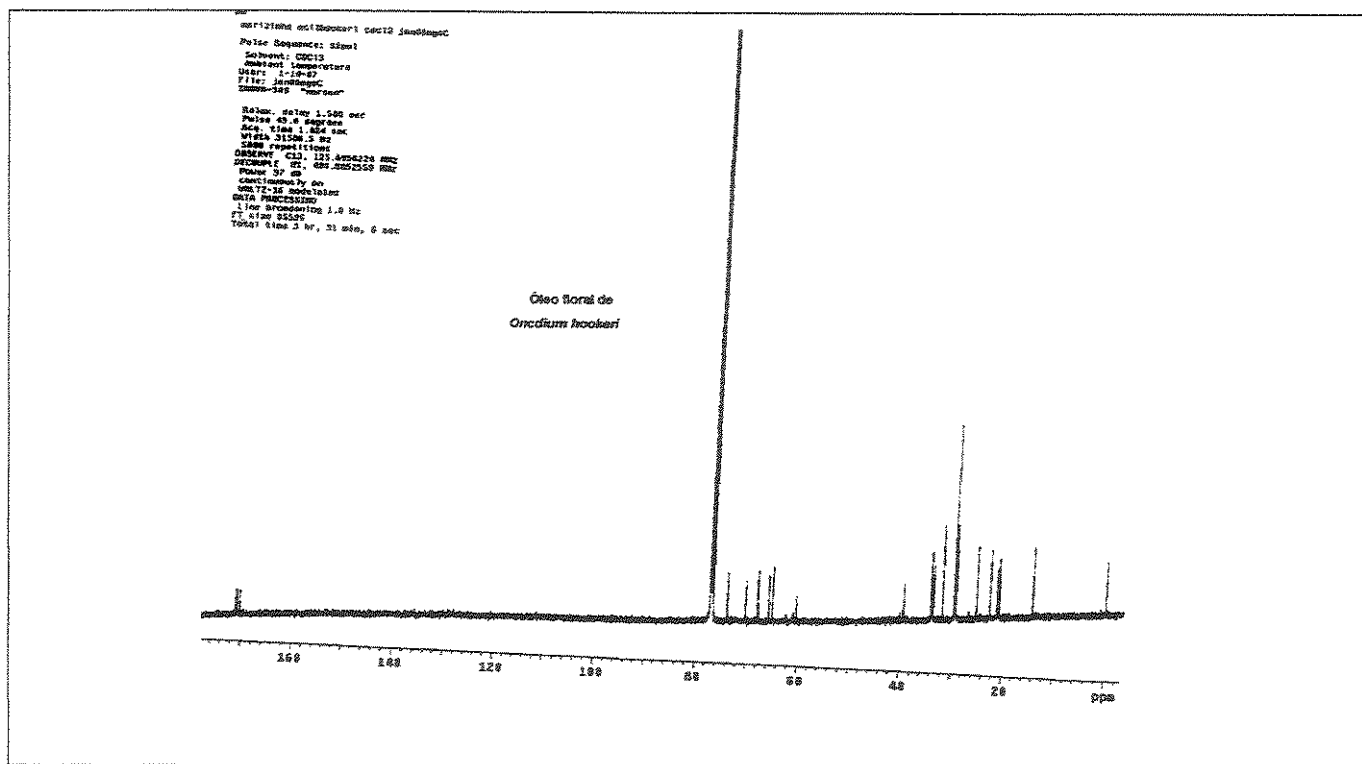


Figura 160. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium hookeri*.

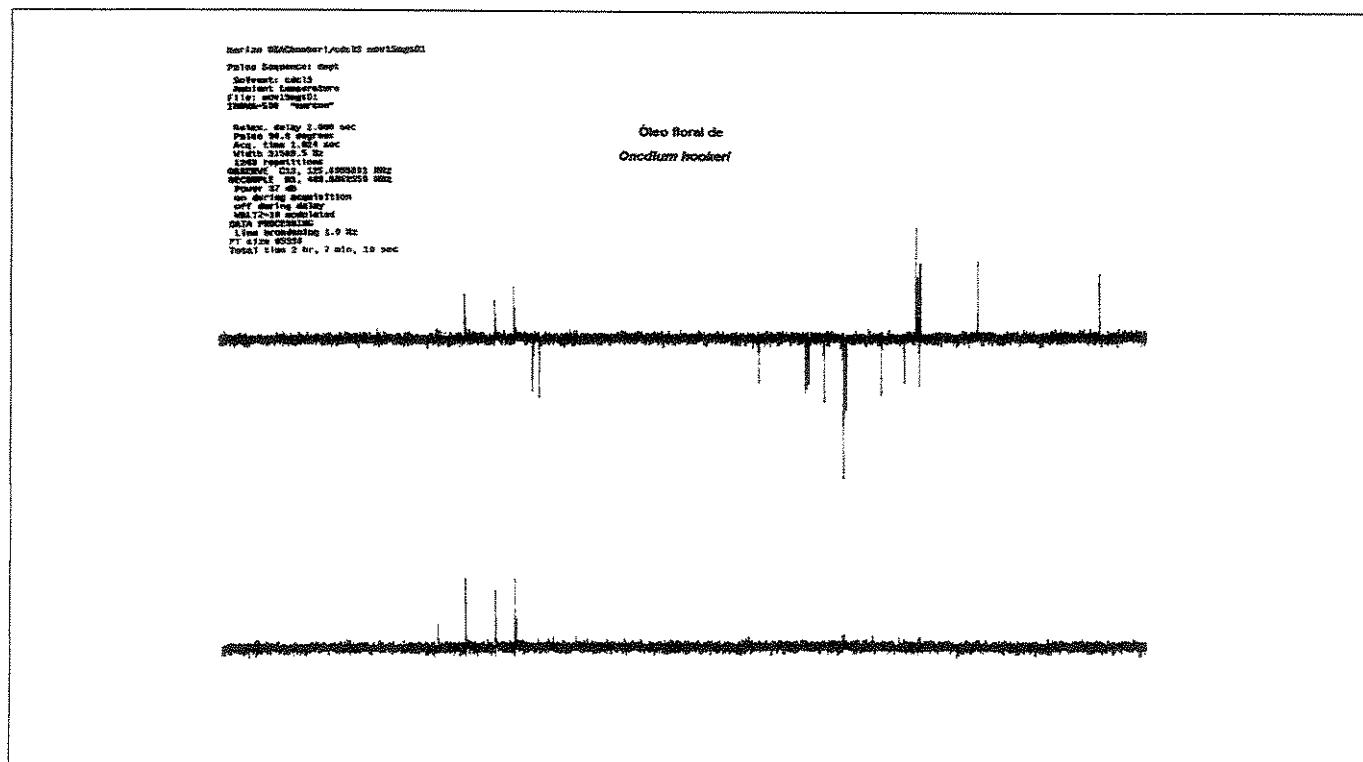


Figura 161. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium hookeri*.

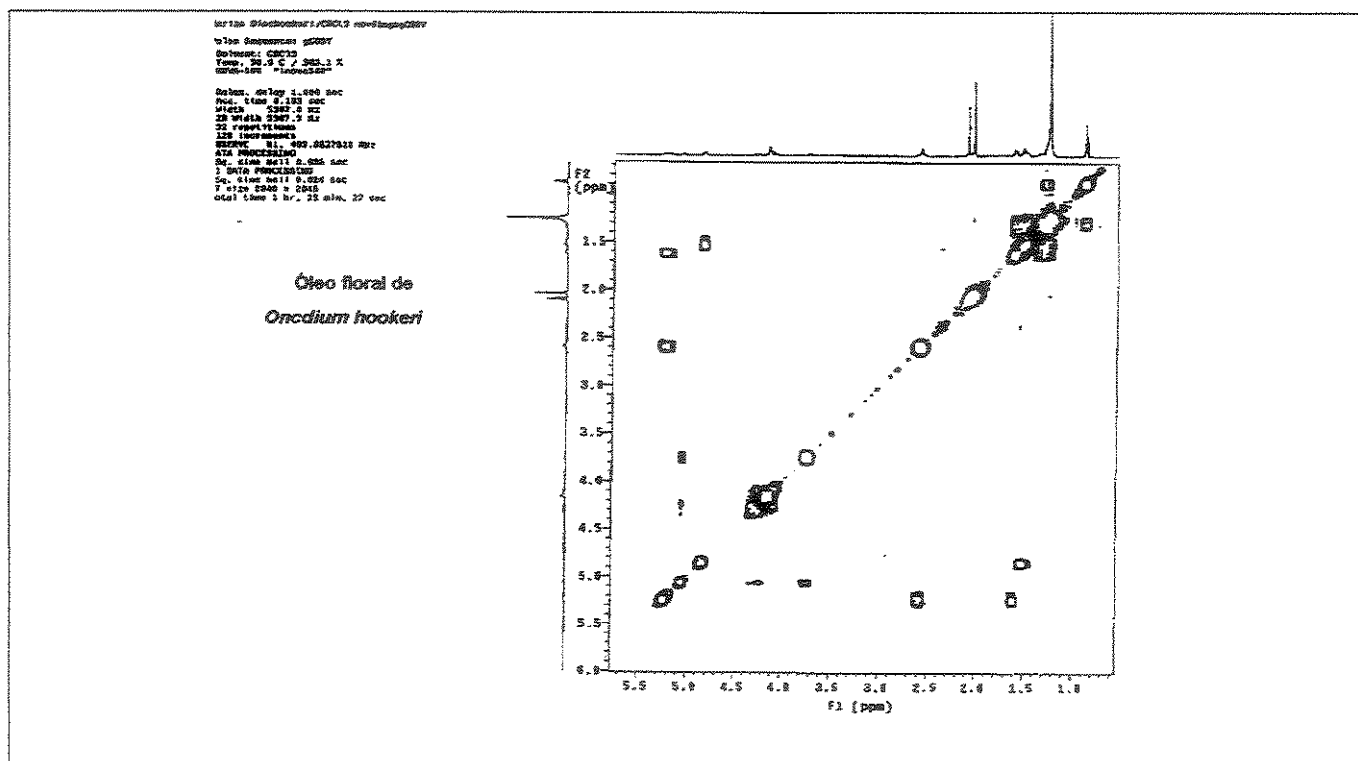


Figura 162. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium hookeri*.

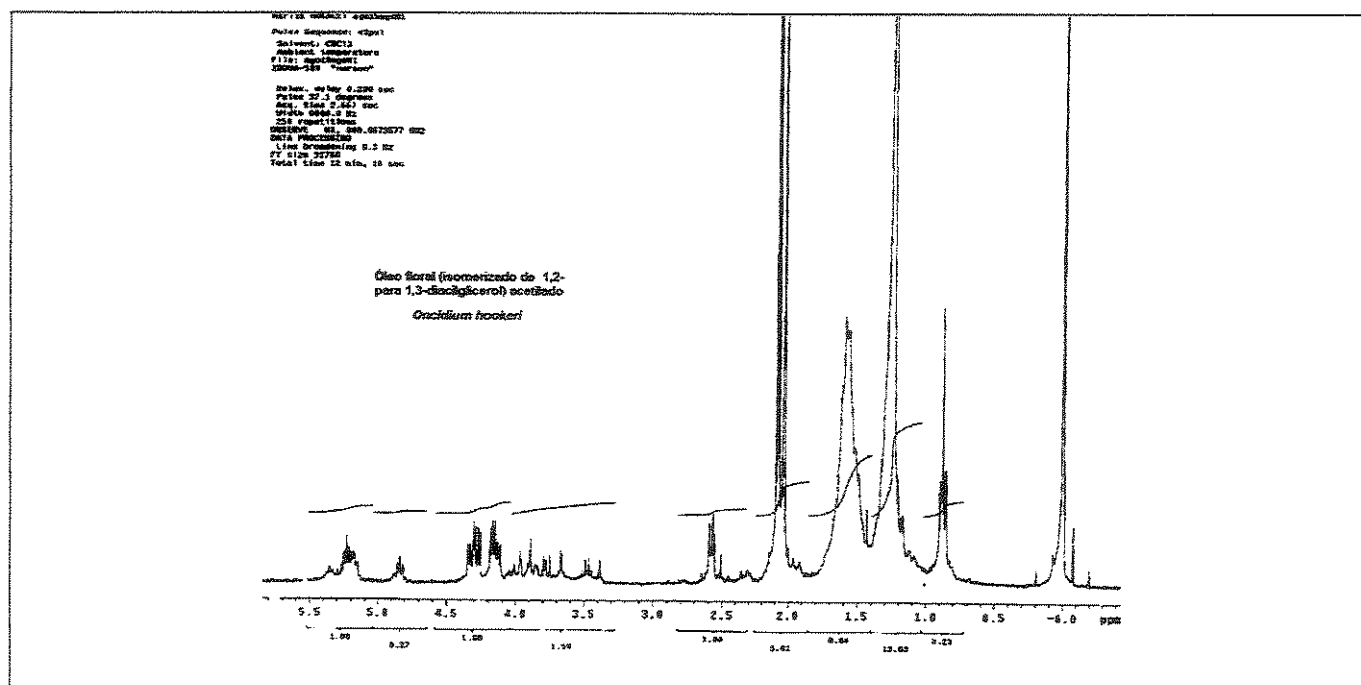


Figura 163. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do óleo floral de *Oncidium hookeri* acetilado (isomerizado de 1,2- para 1,3-diácilglicerol).

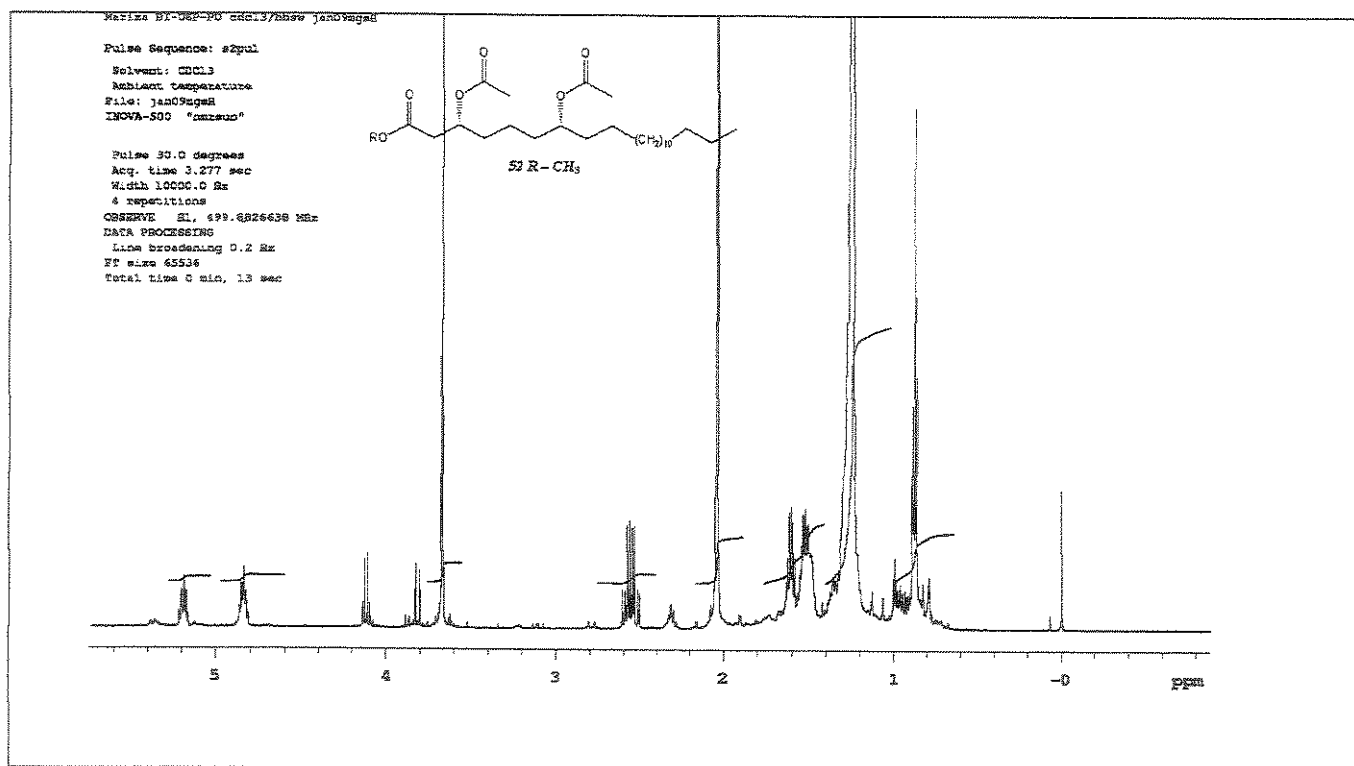


Figura 164. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 52.

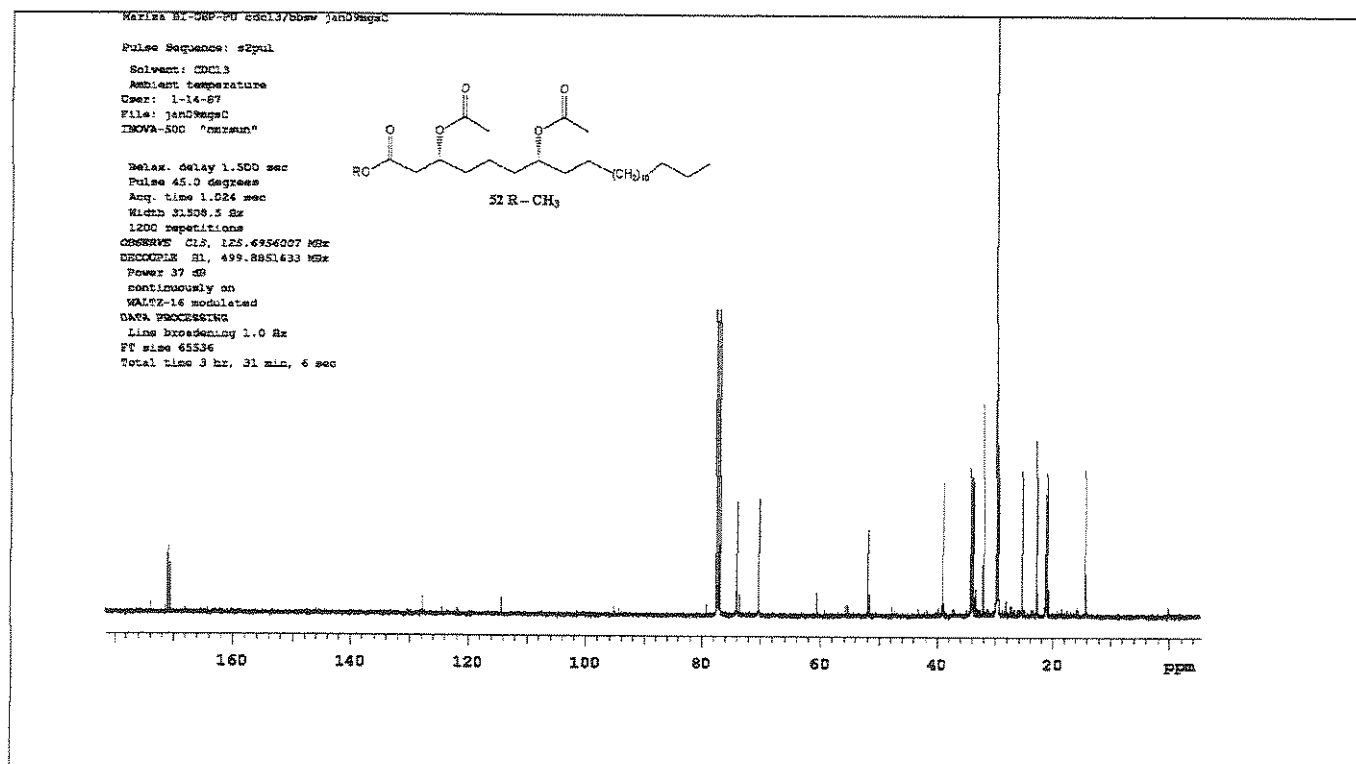


Figura 165. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do composto 52.

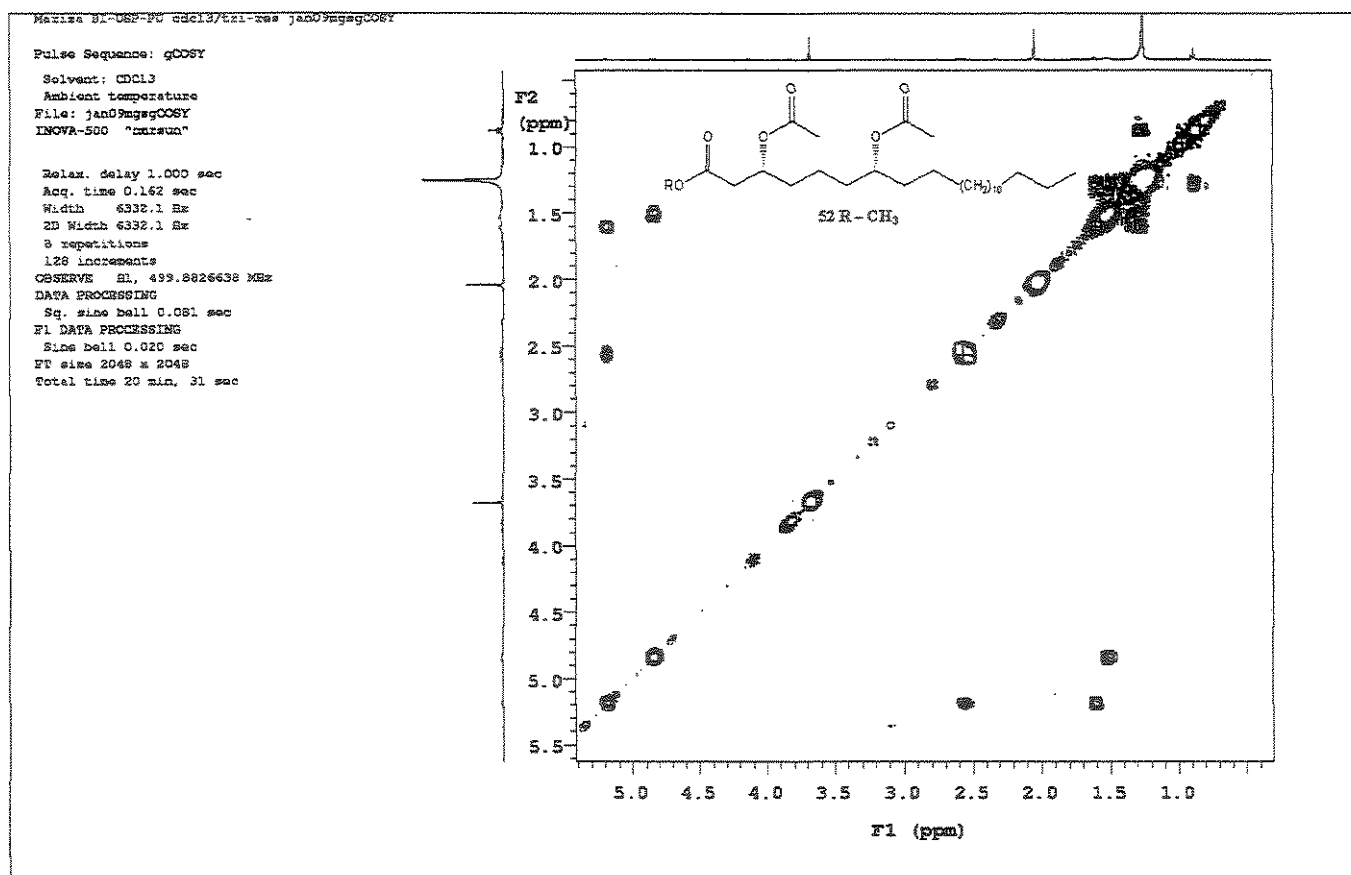


Figura 167. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C - COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto 52.

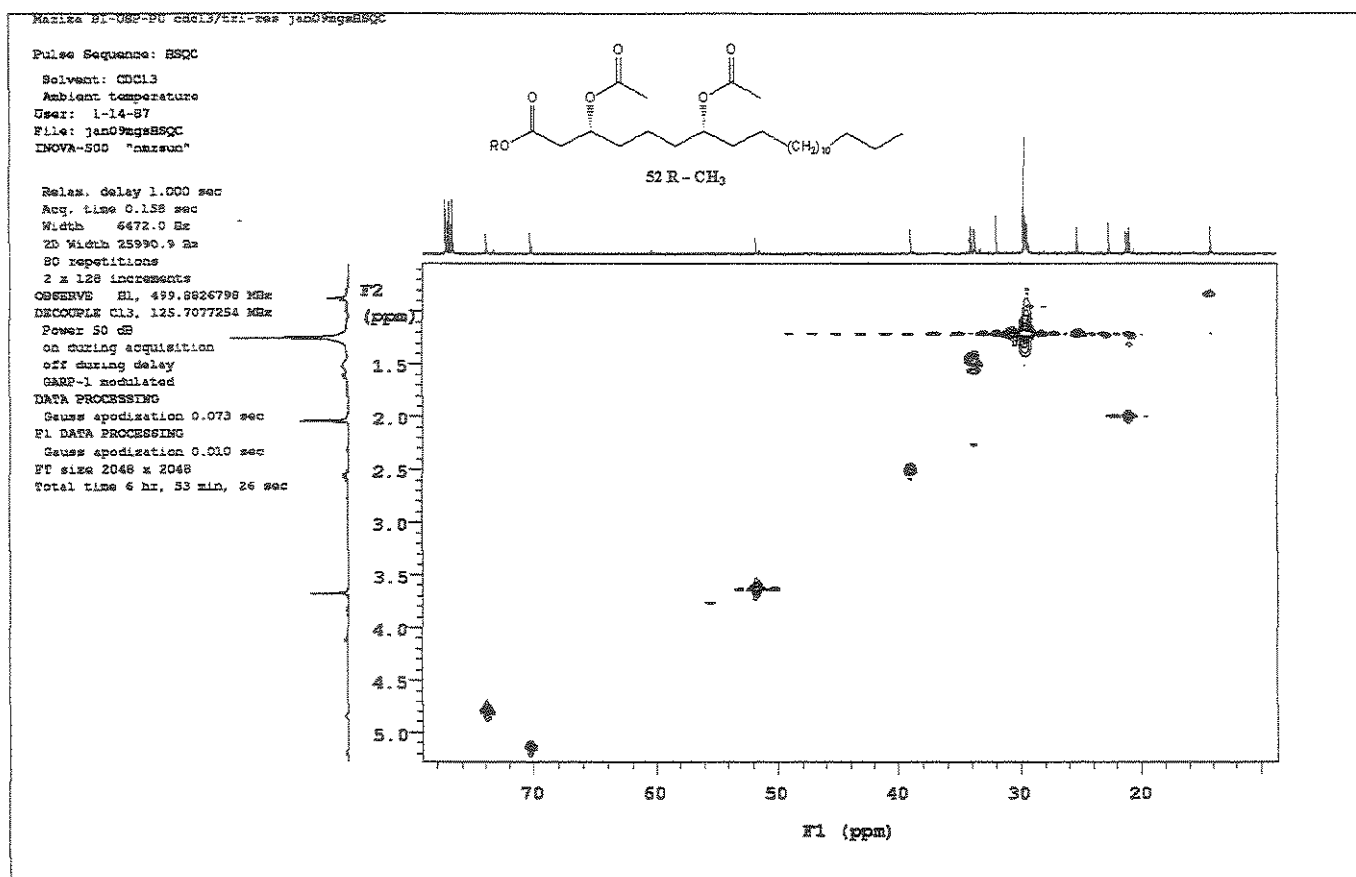
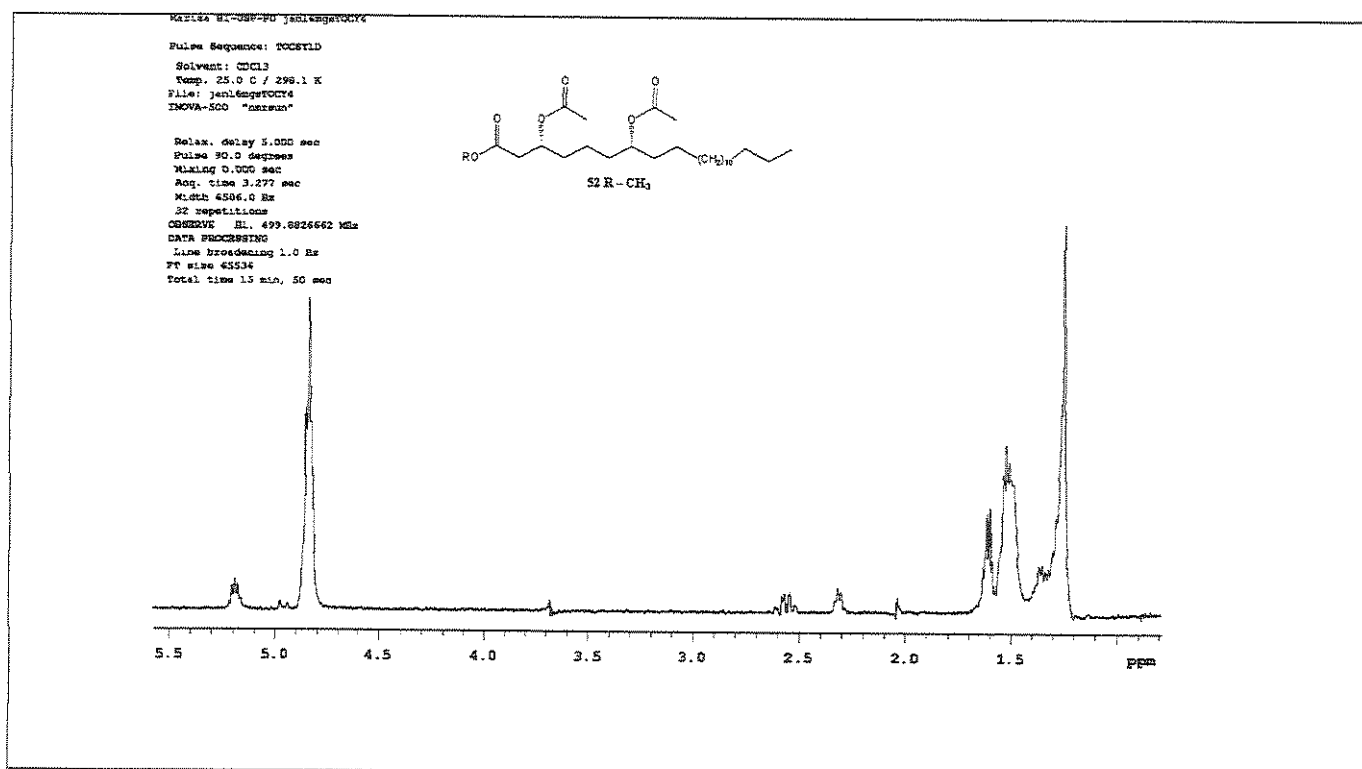
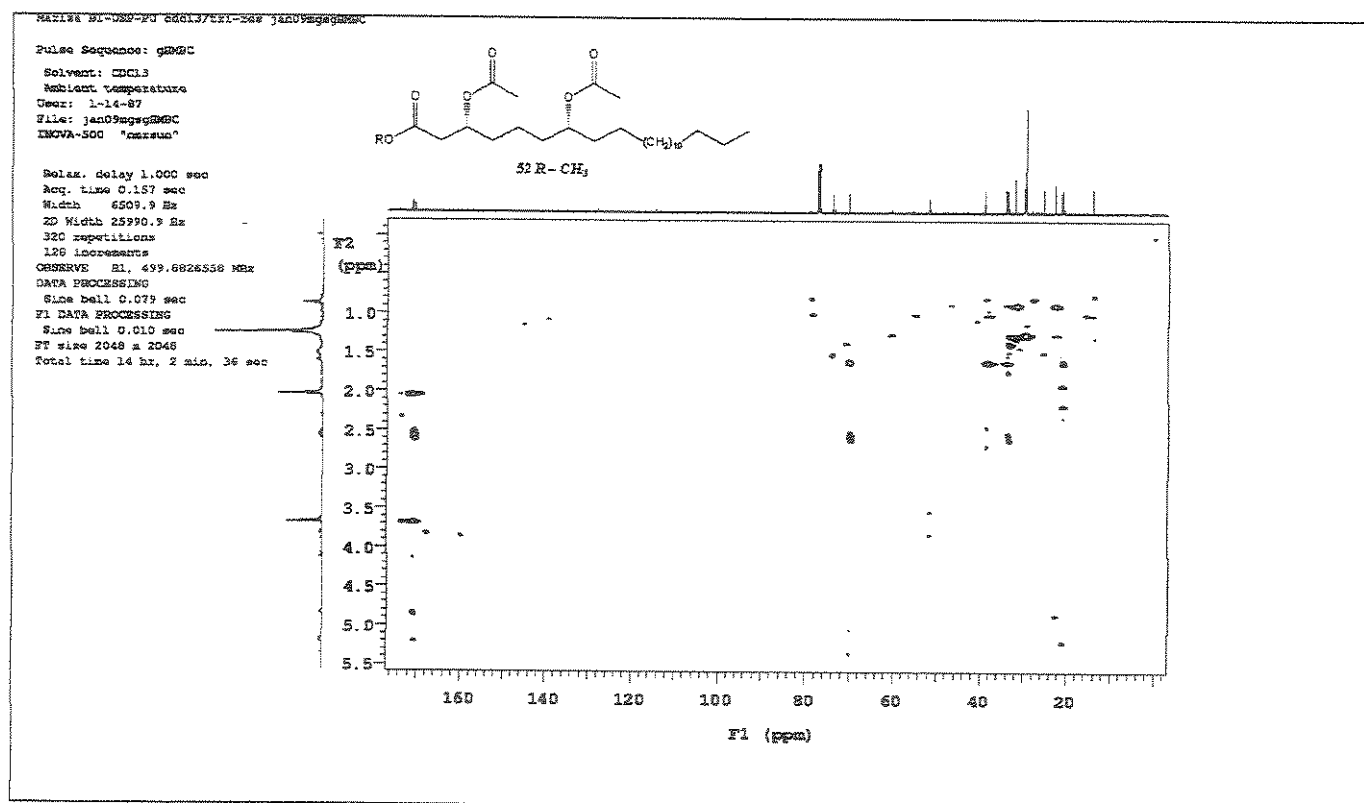


Figura 168. Mapa de contornos de RMN de 2D ¹H-¹³C – HSQC (500 MHz, CDCl₃) do composto S2.



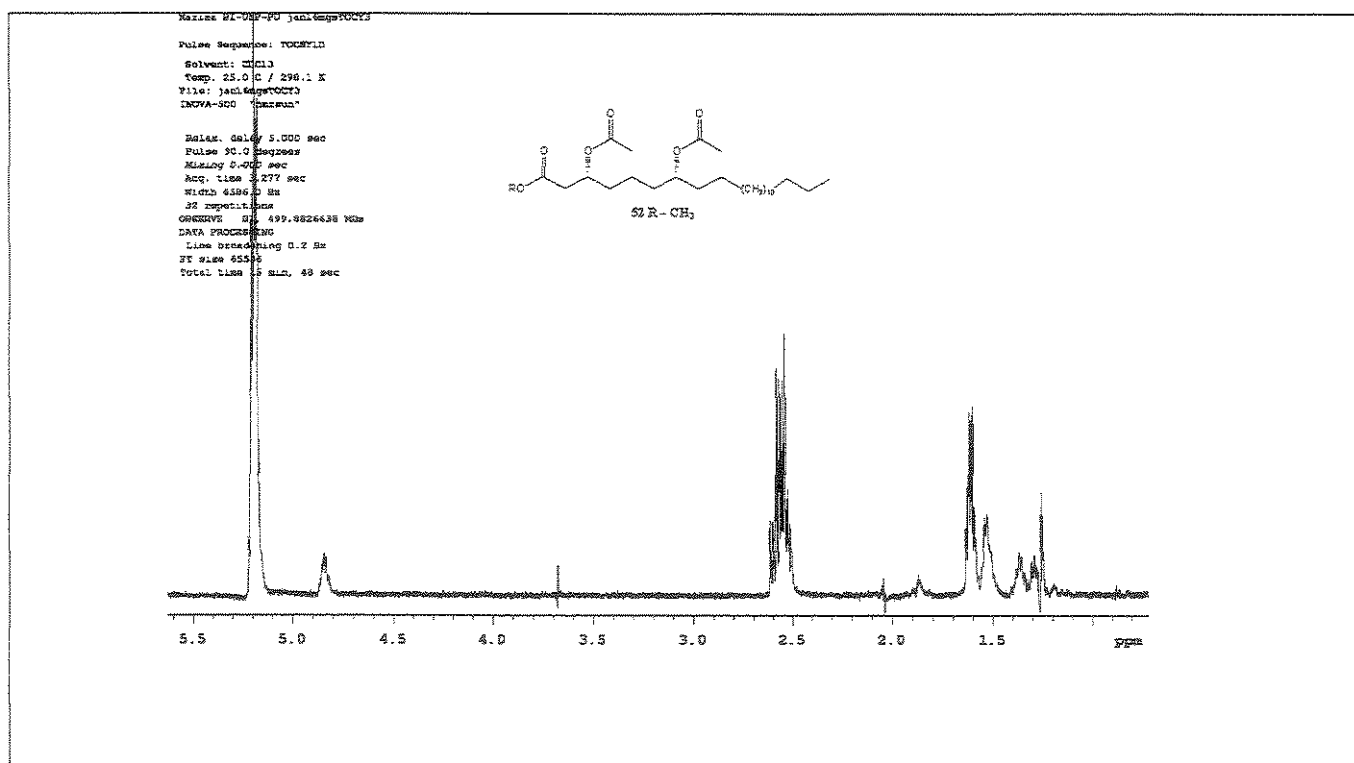


Figura 171. TOCSY – 1D - hidrogênio em δ 5,20 (tempo de mistura 100 ms).

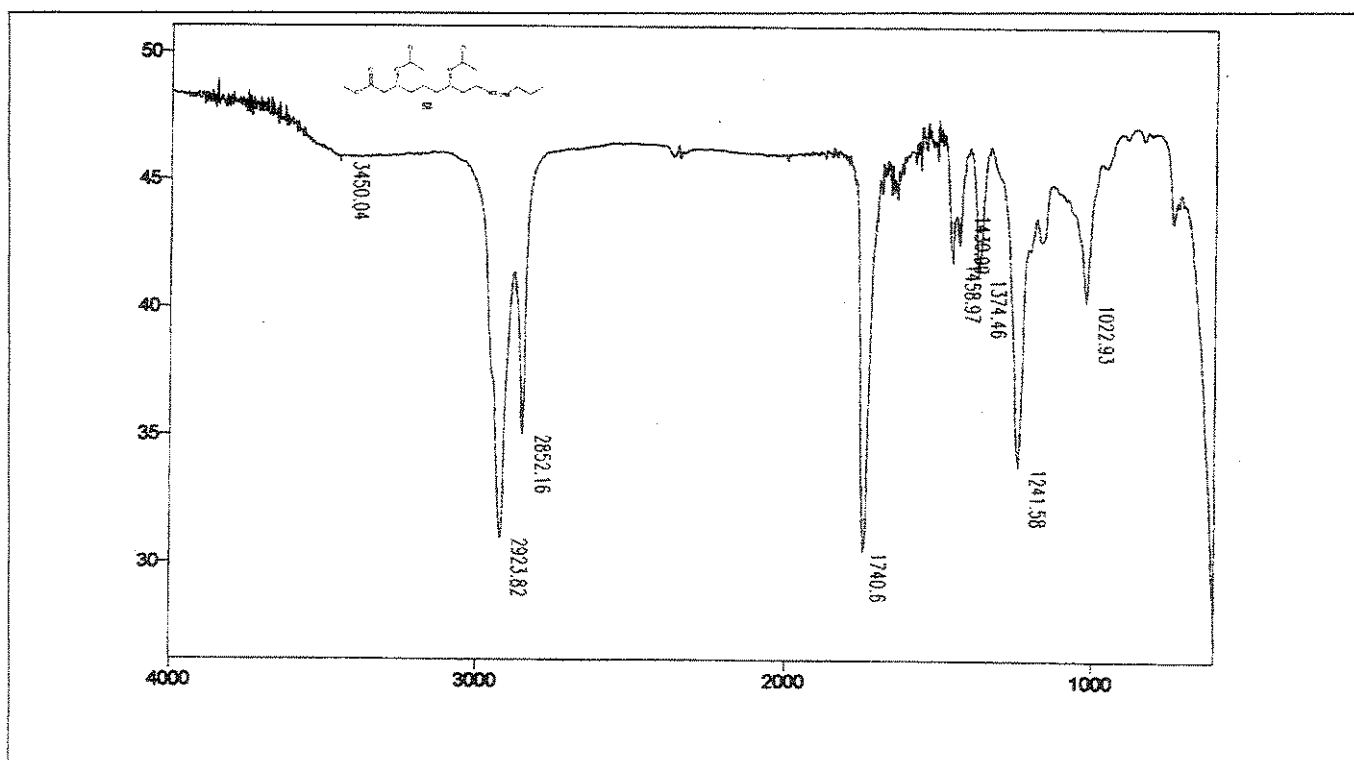
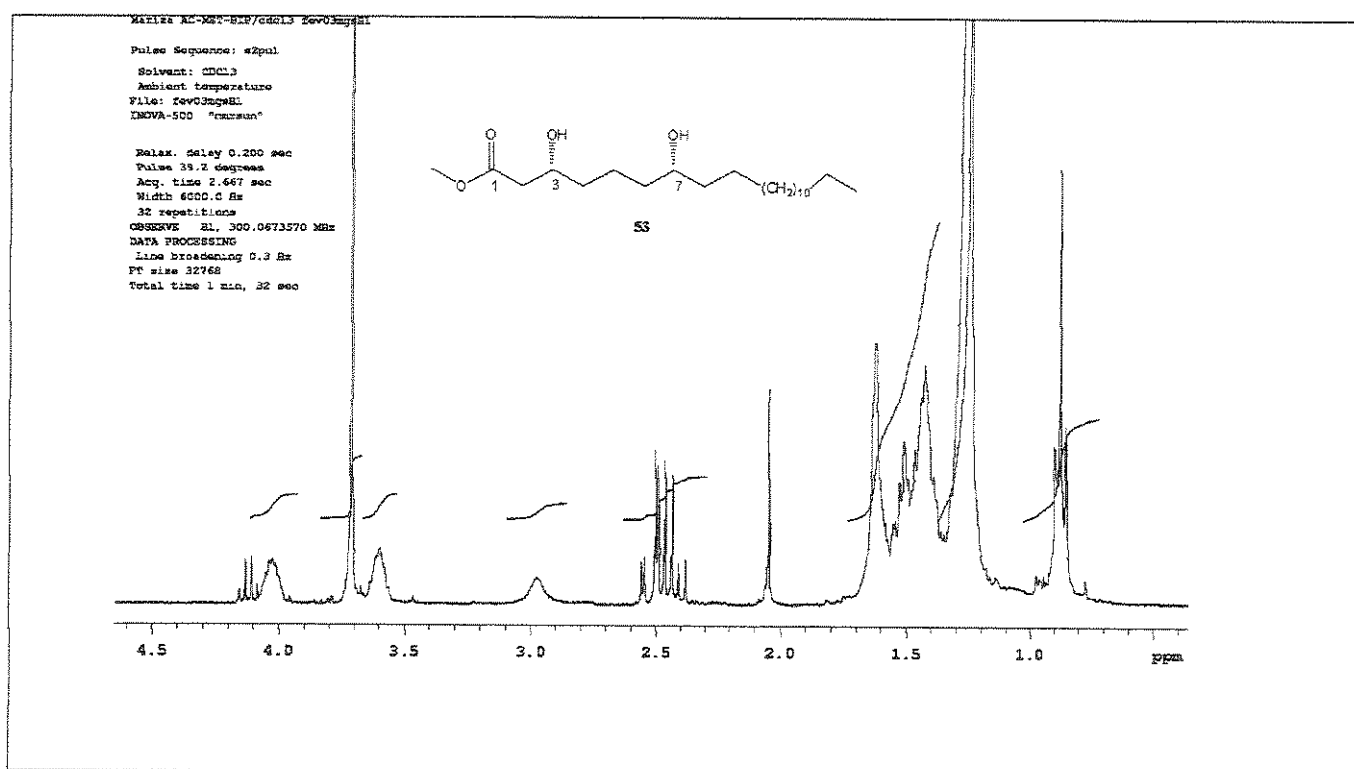
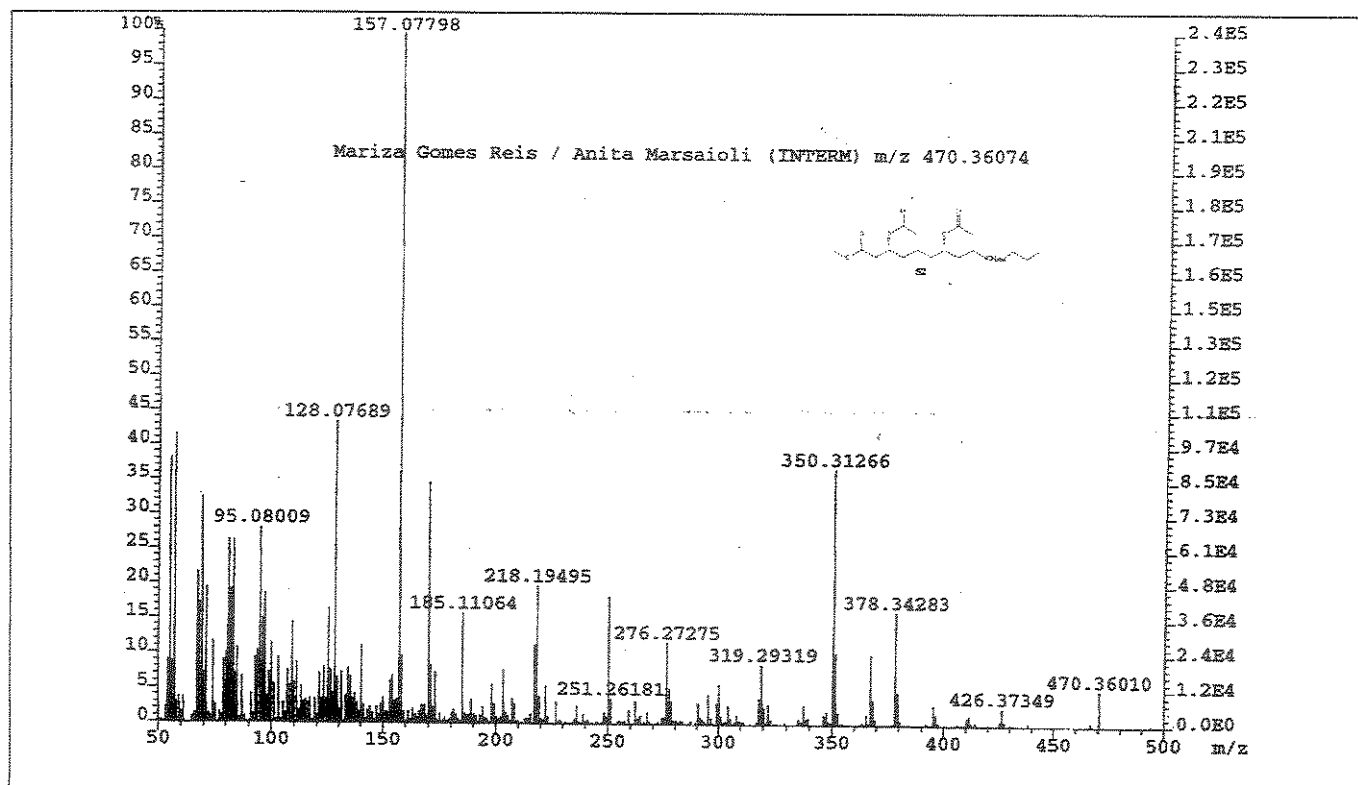


Figura 172. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 52.



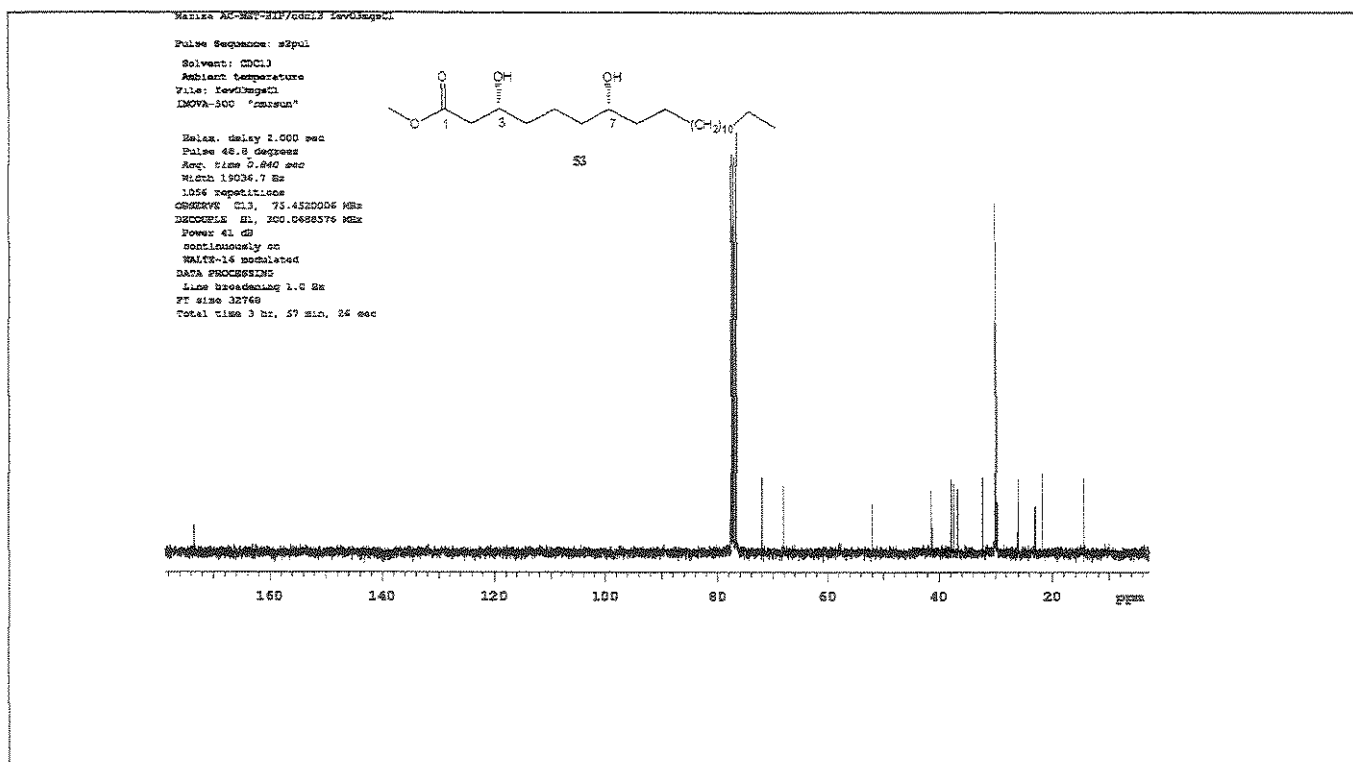


Figura 175. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 53.

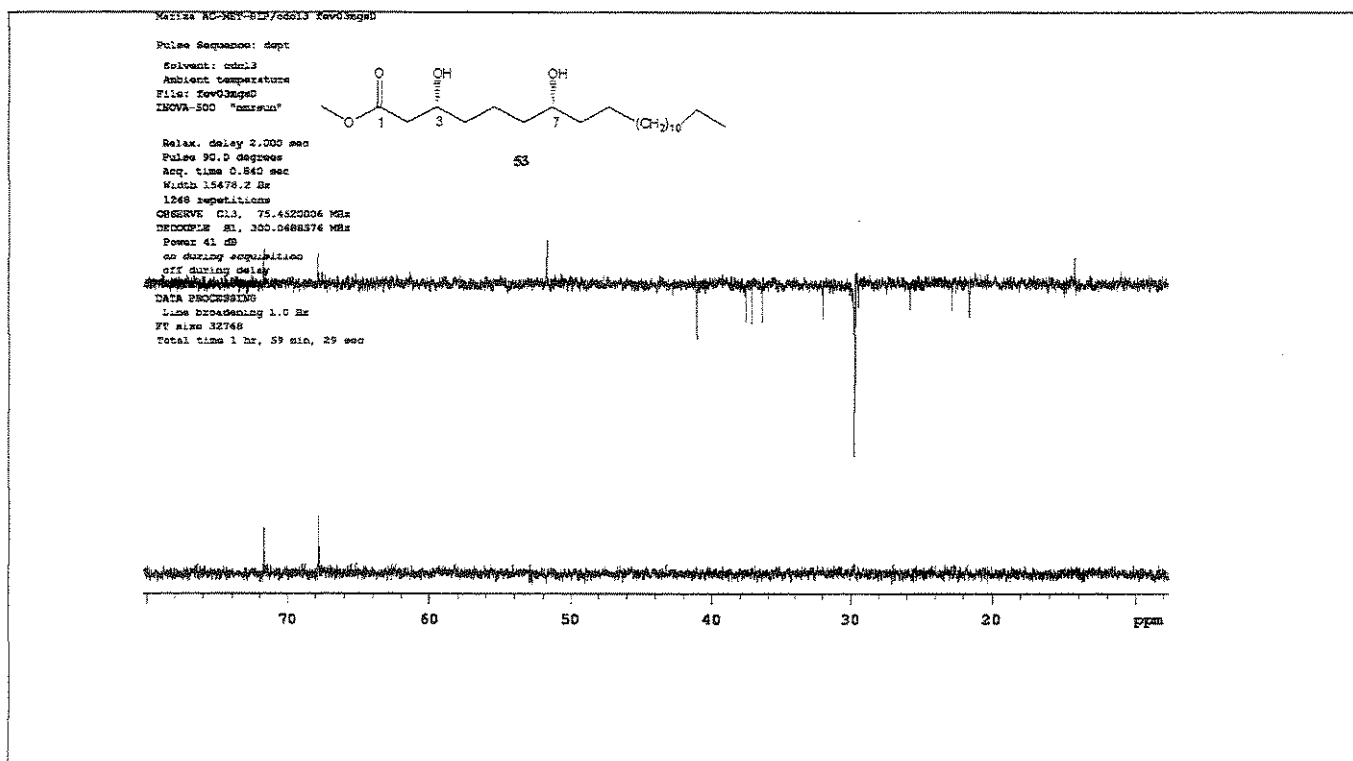


Figura 176. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) do composto 53.

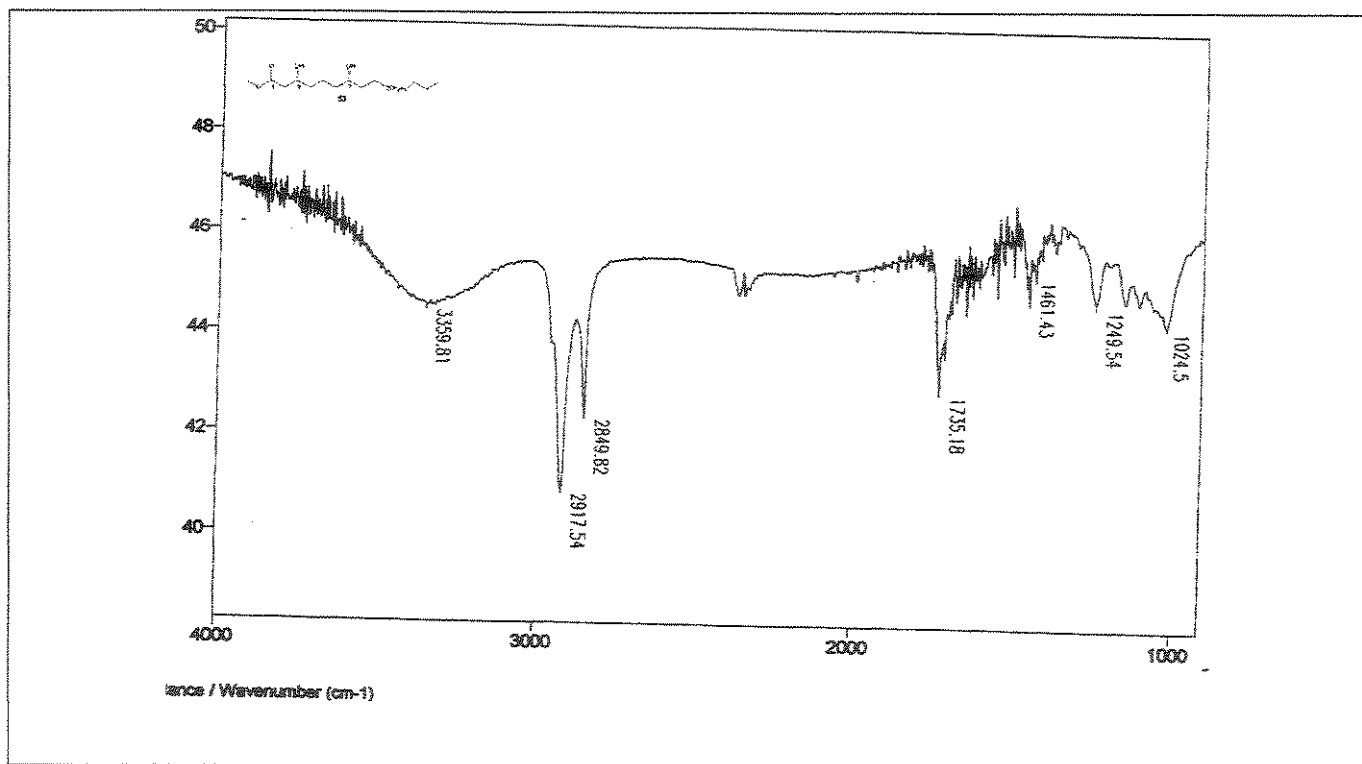


Figura 177. Espectro no Infra Vermelho (KBr) do composto 53.

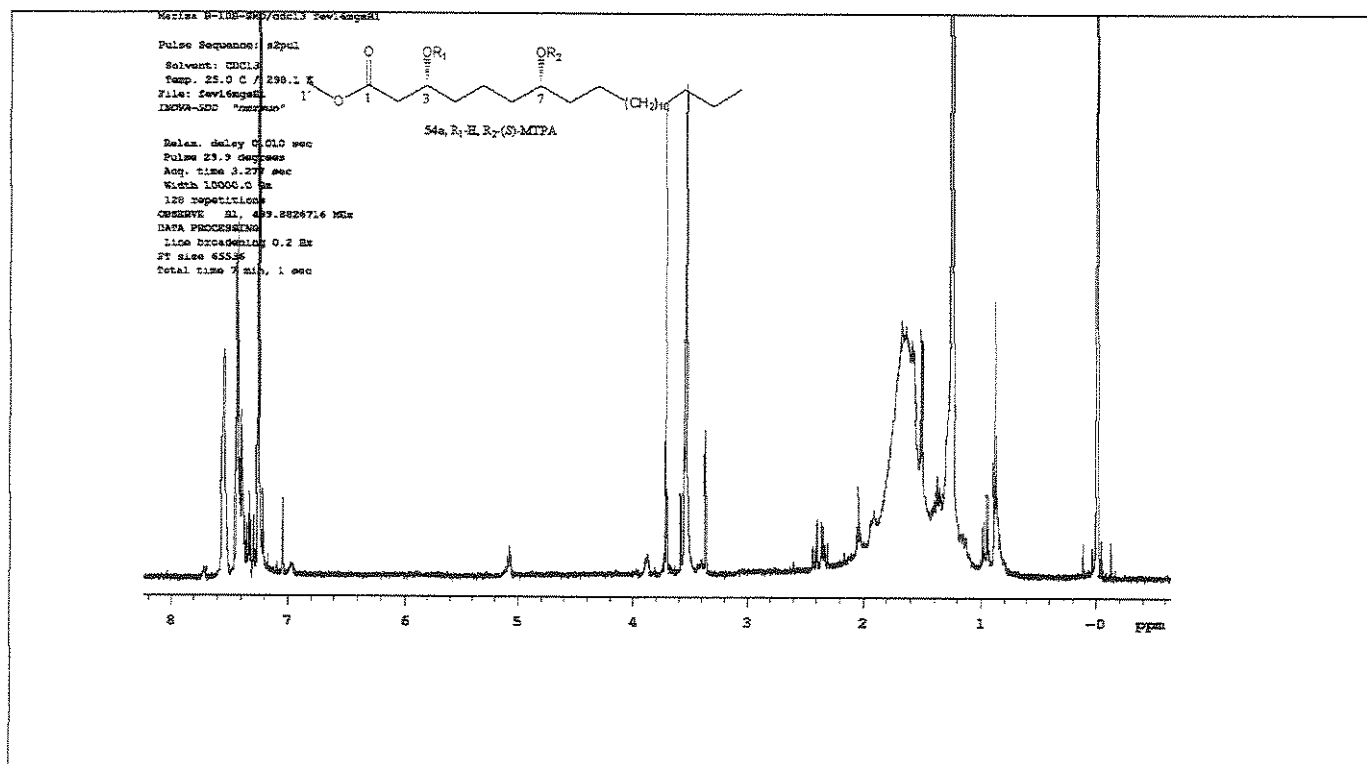


Figura 178. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 54a

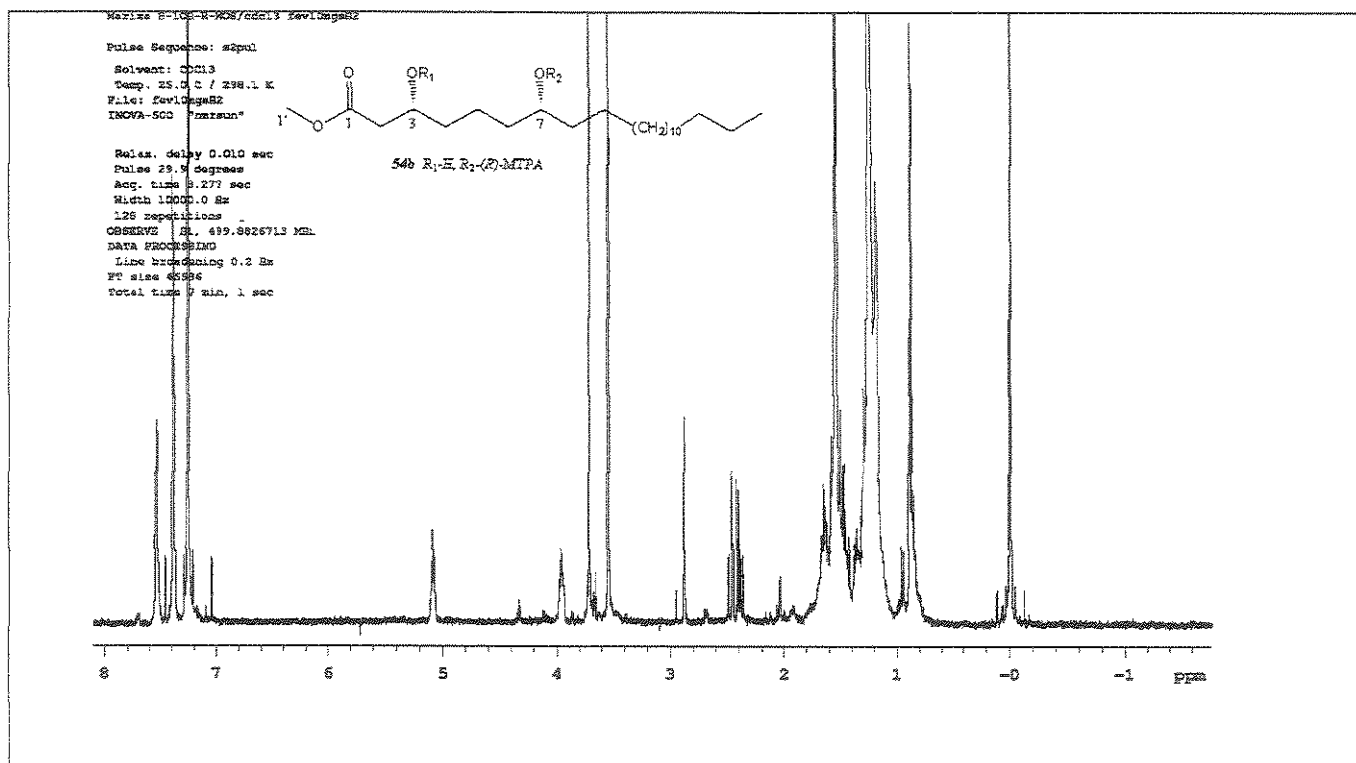


Figura 179. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 54b.

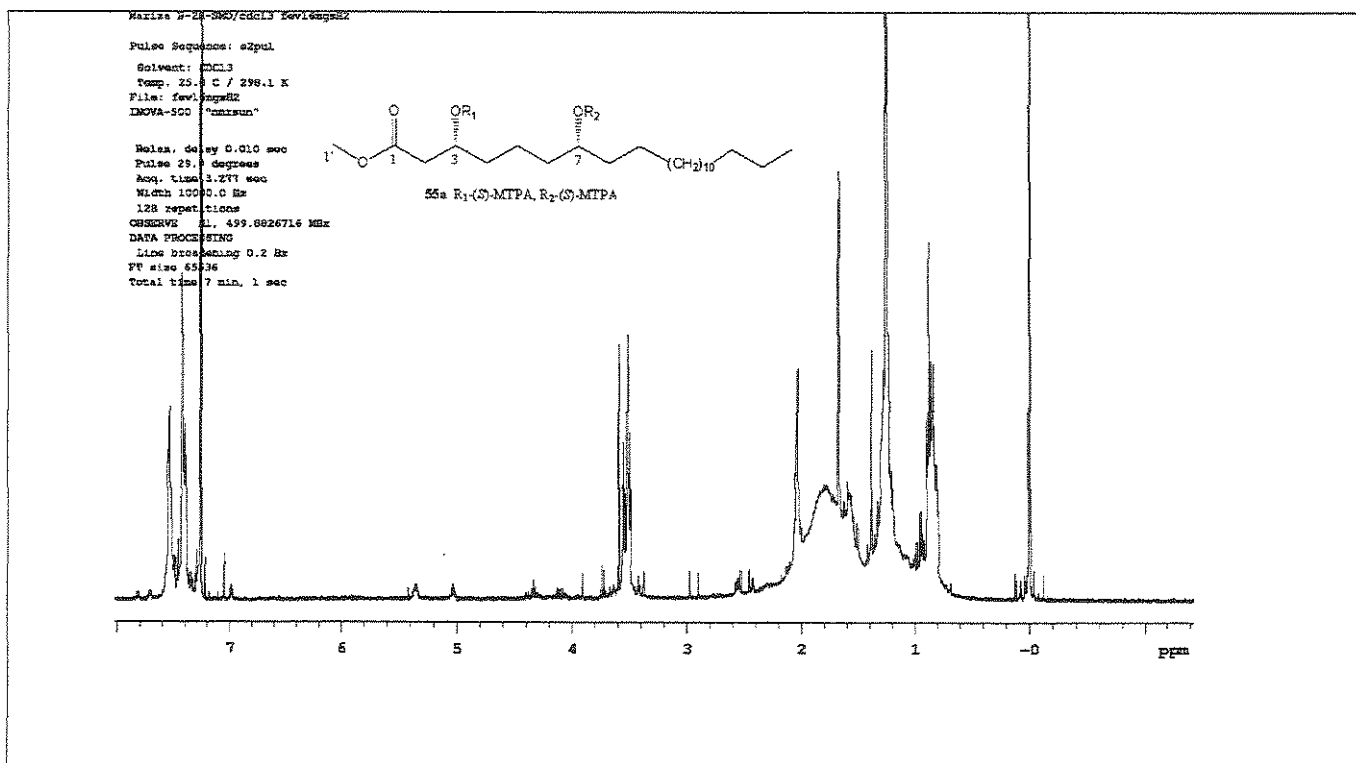


Figura 180. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 55a

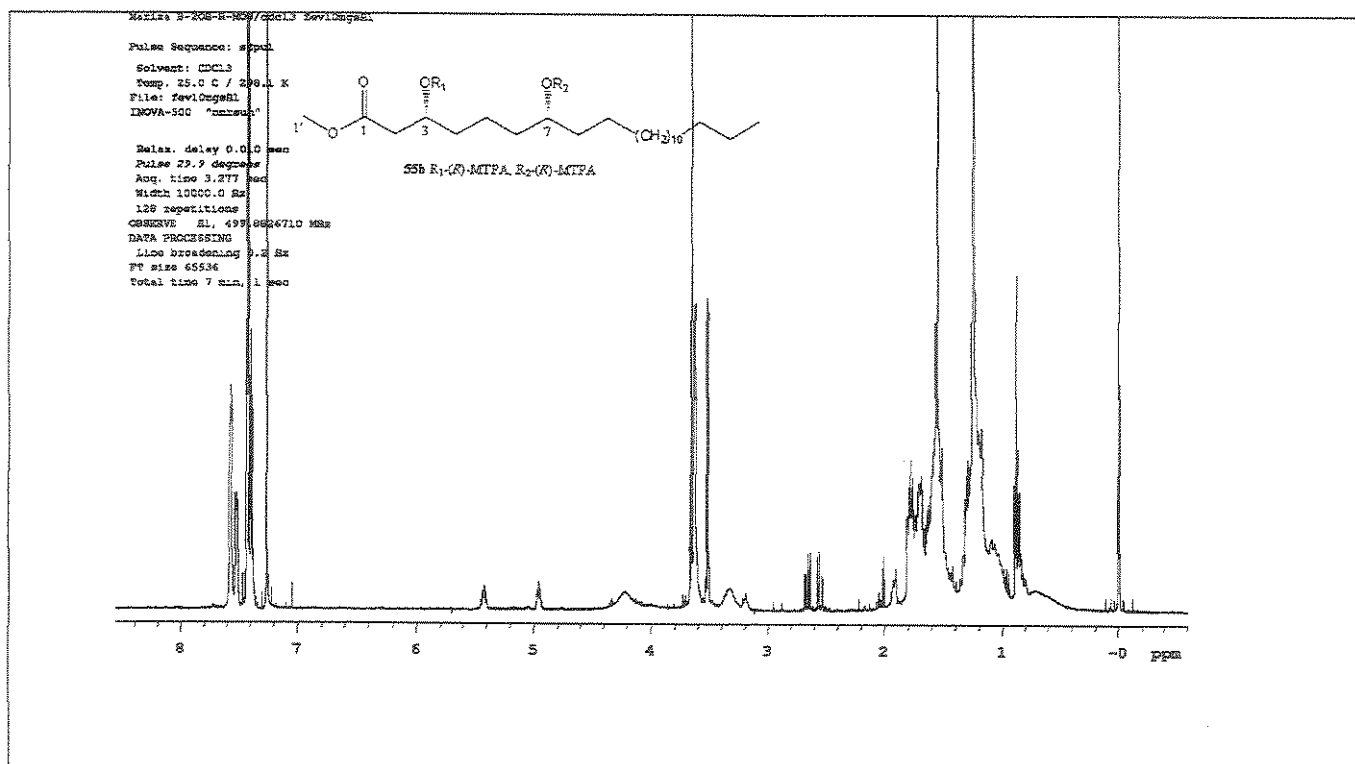


Figura 181. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 55b.

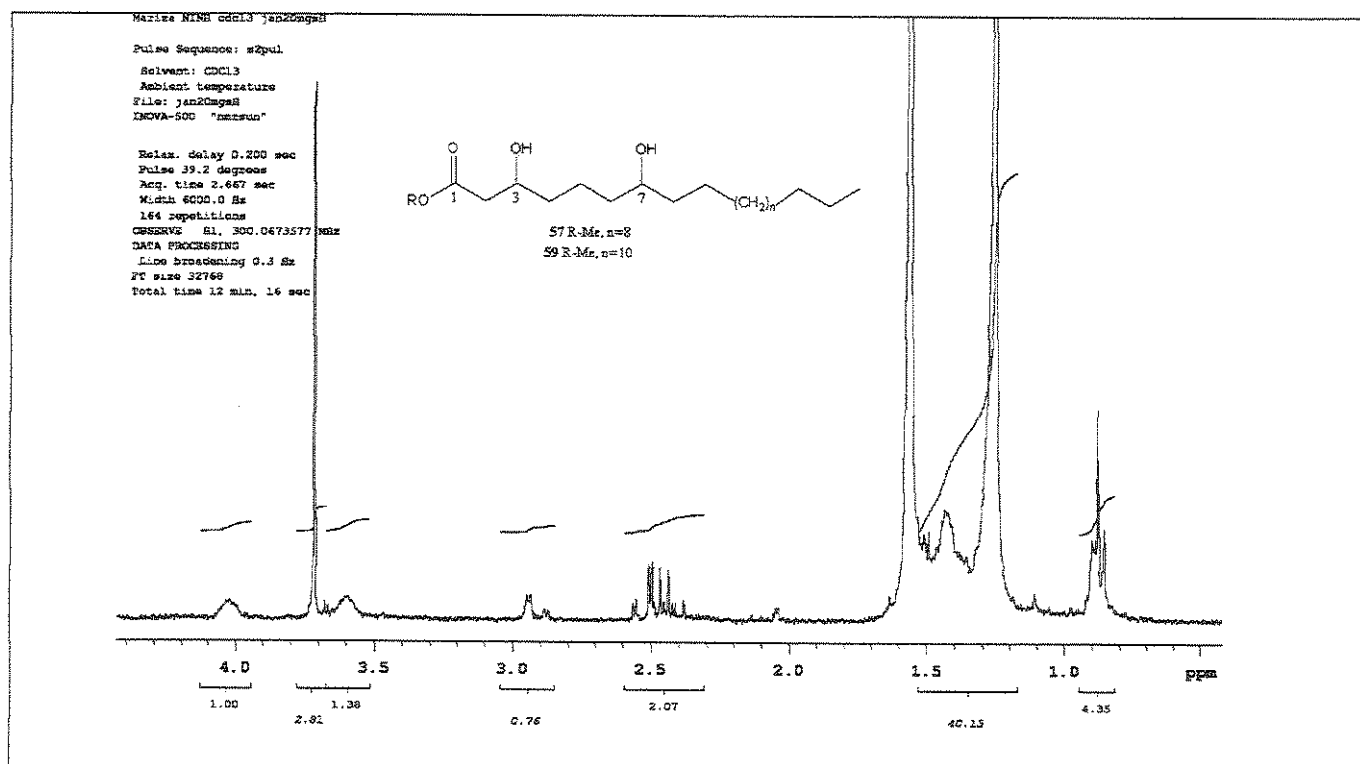


Figura 182. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 57 e 59.

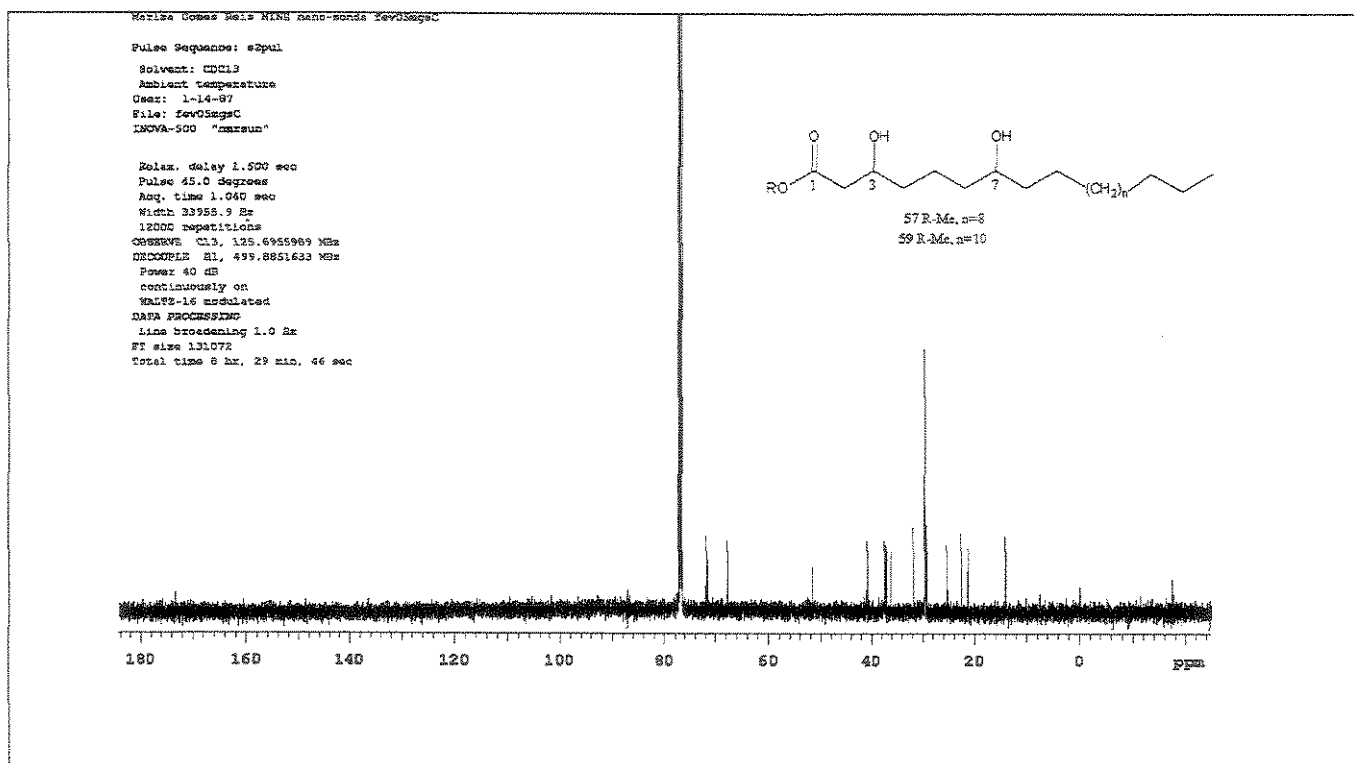


Figura 183. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) dos compostos 57 e 59.

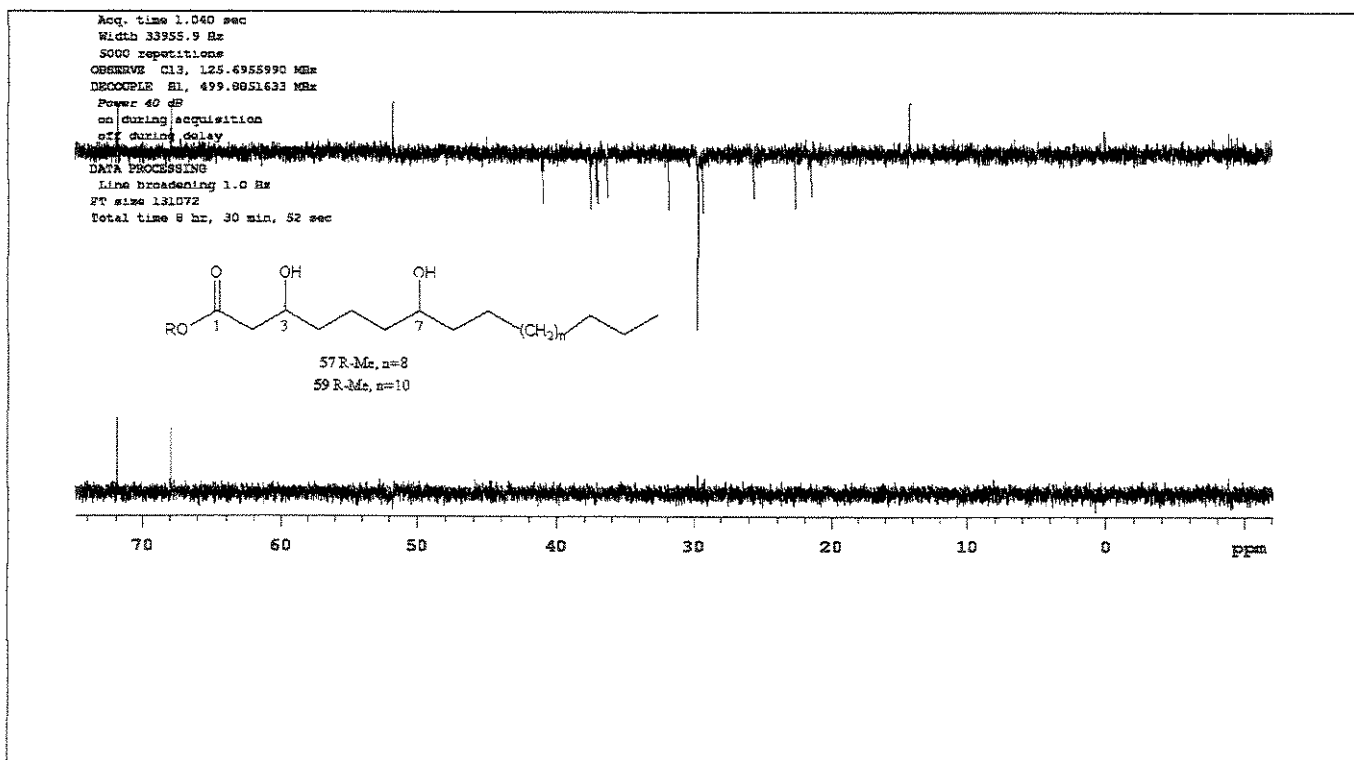


Figura 184. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (125 MHz, CDCl_3) dos compostos 57 e 59.

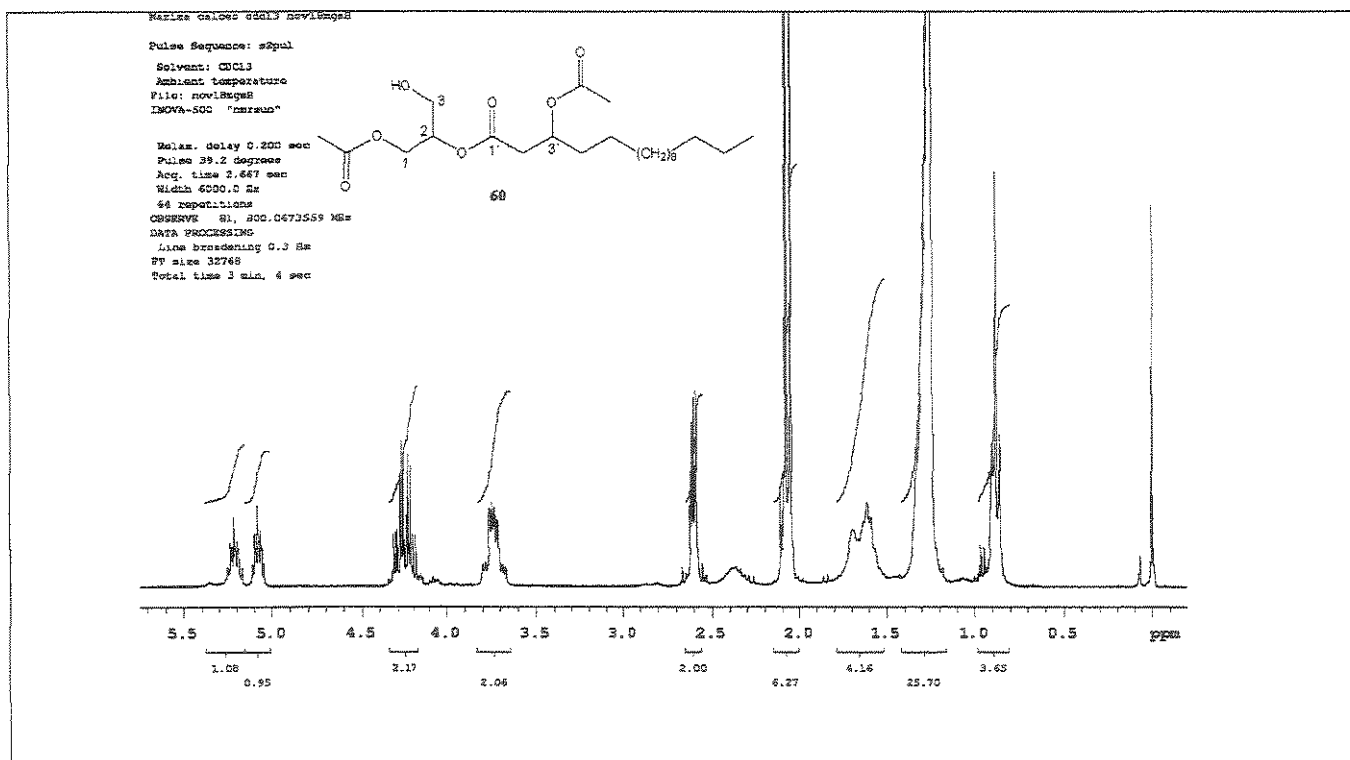


Figura 185. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 60.

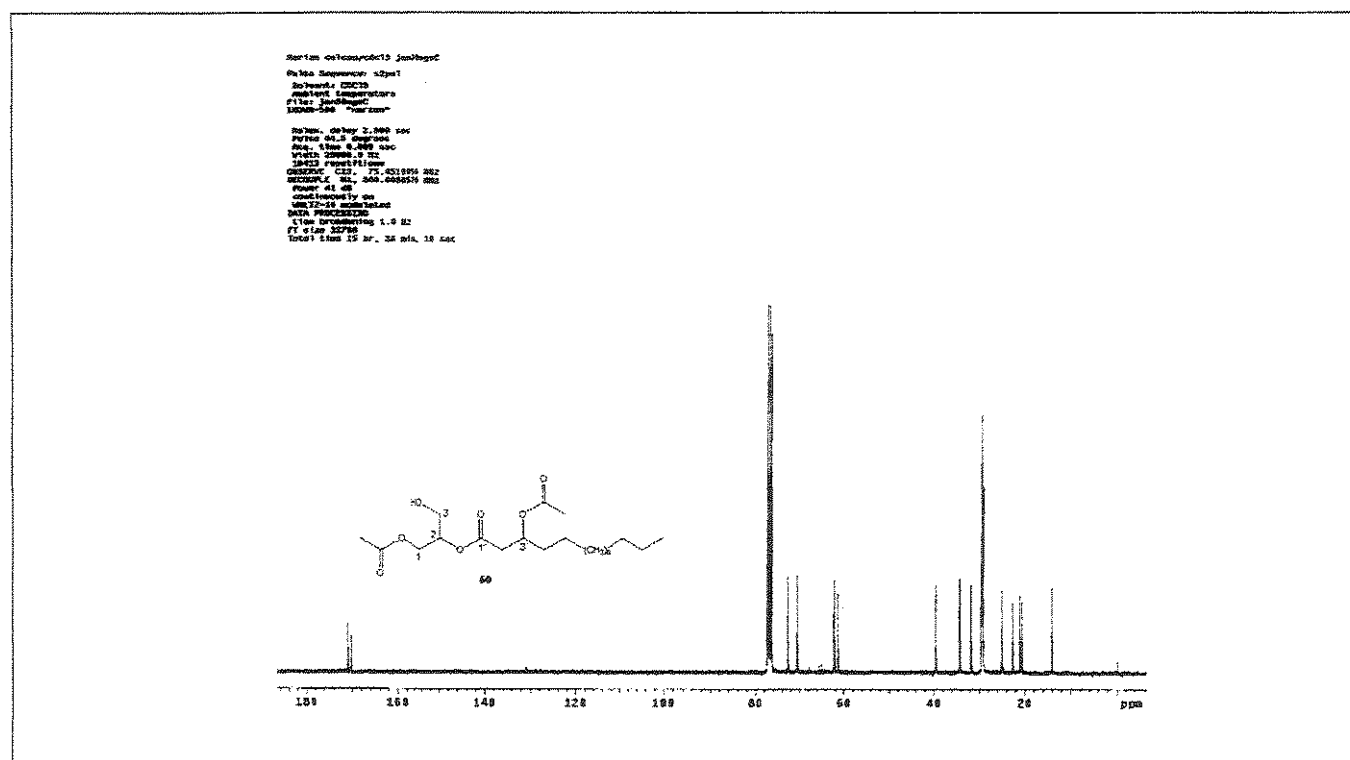


Figura 186. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 60.

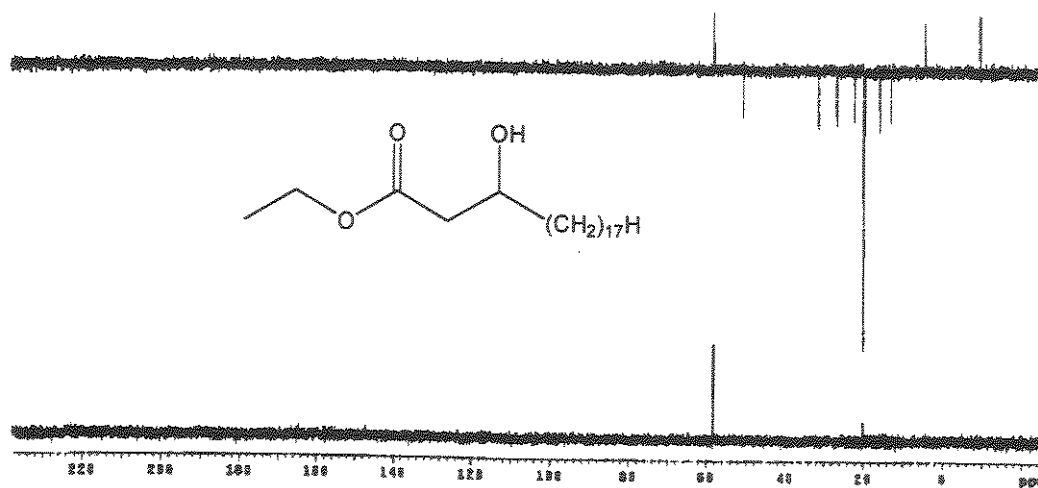


Figura 191. Espectro de RMN de ¹³C: a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75,45 MHz, CDCl₃) do composto 62.

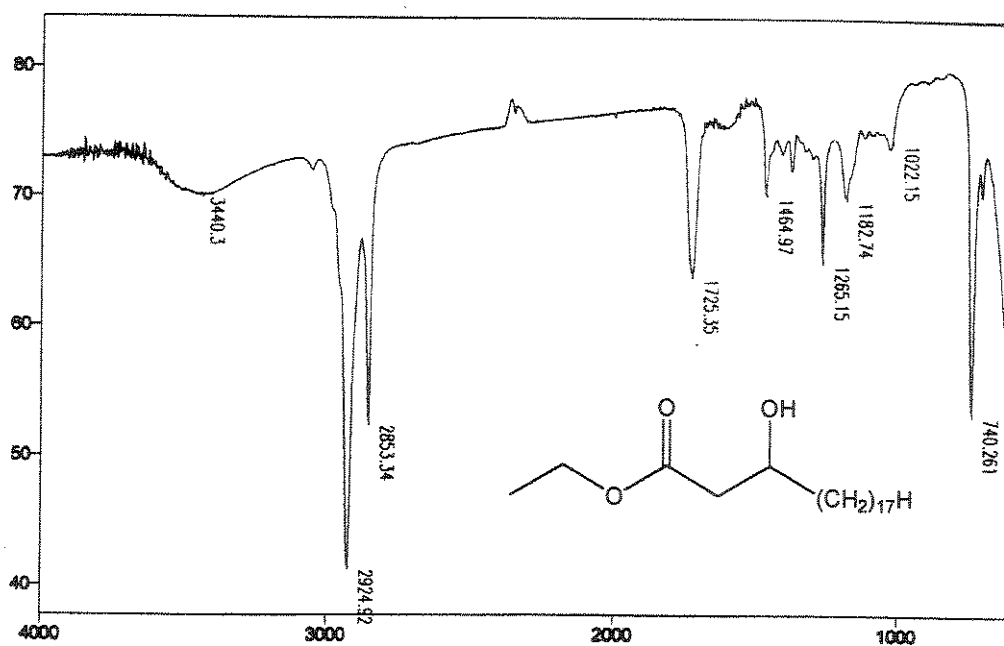


Figura 192. Espectro no infravermelho (filme) do composto 62.

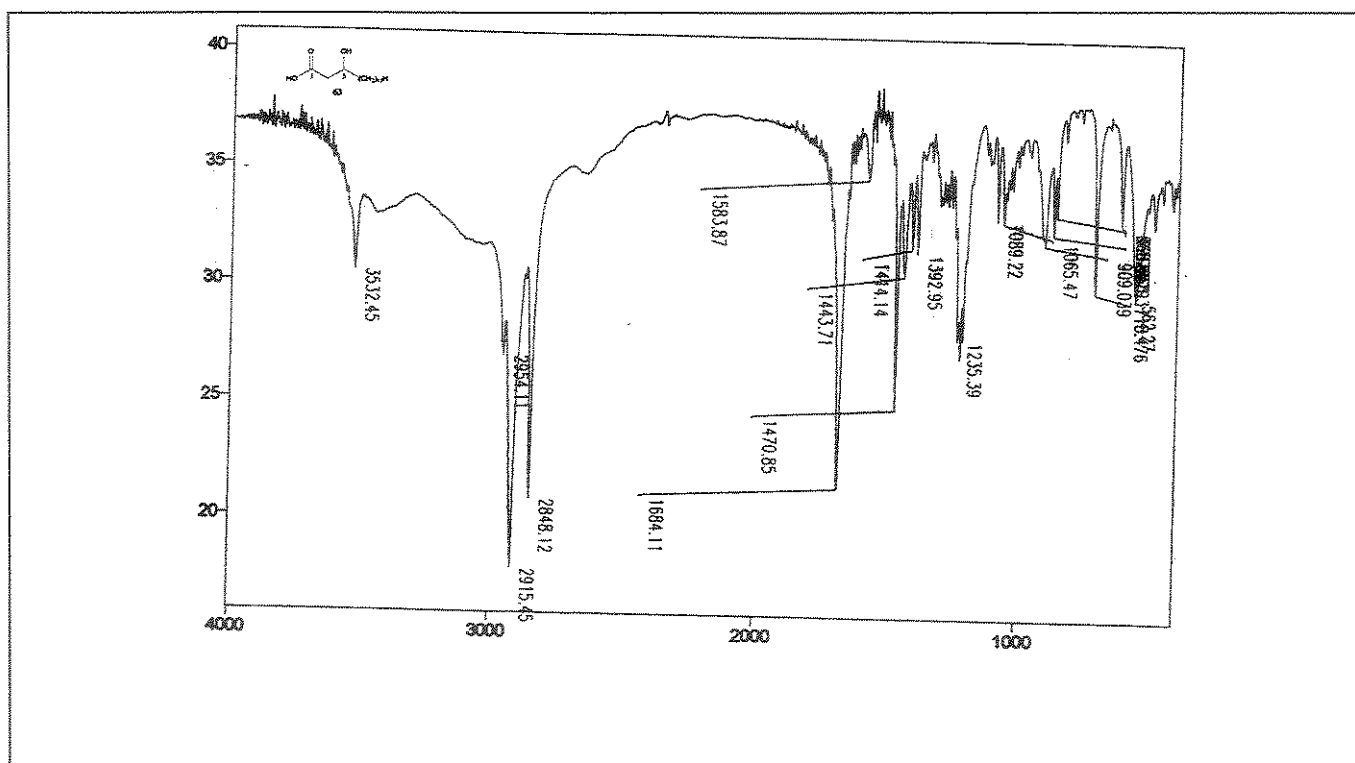


Figura 195. Espectro no Infra Vermelho (KBr) do composto 63.

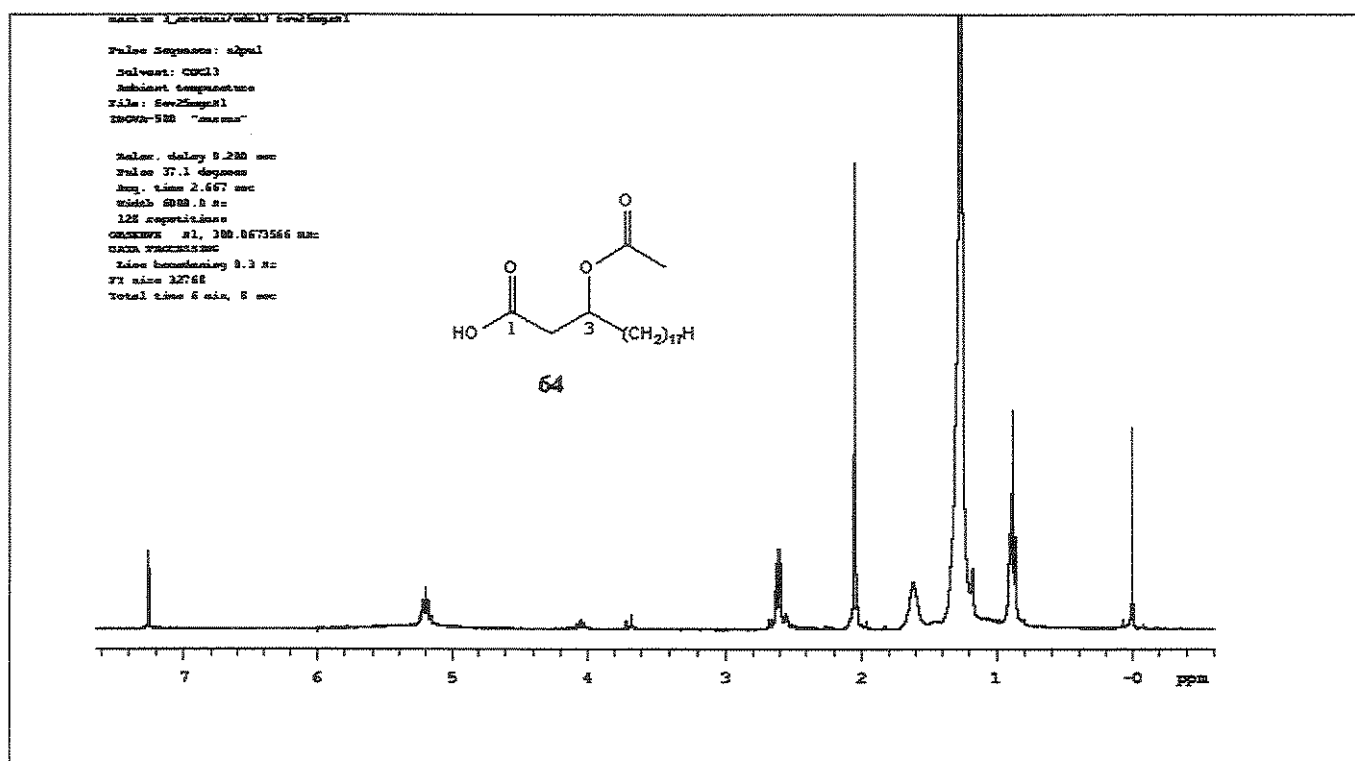


Figura 196. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 64.

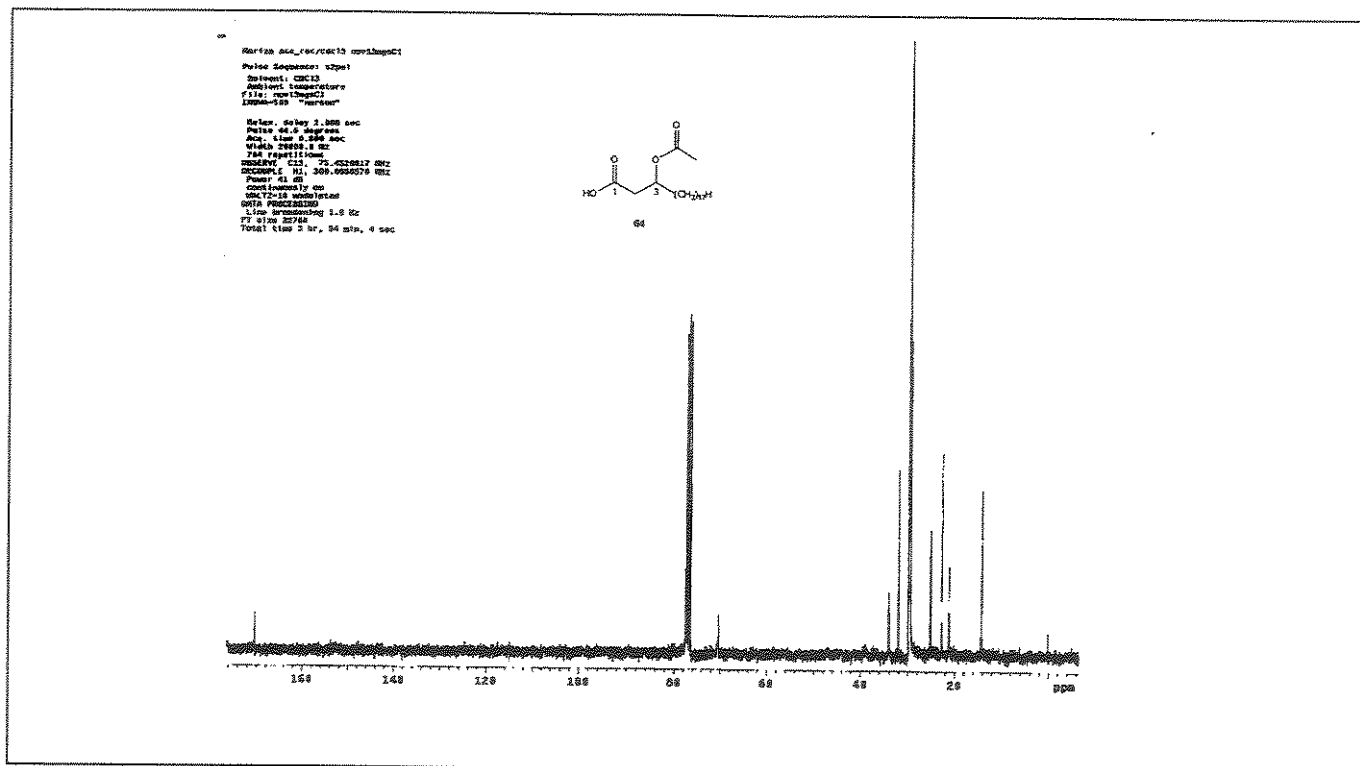


Figura 197. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 64.

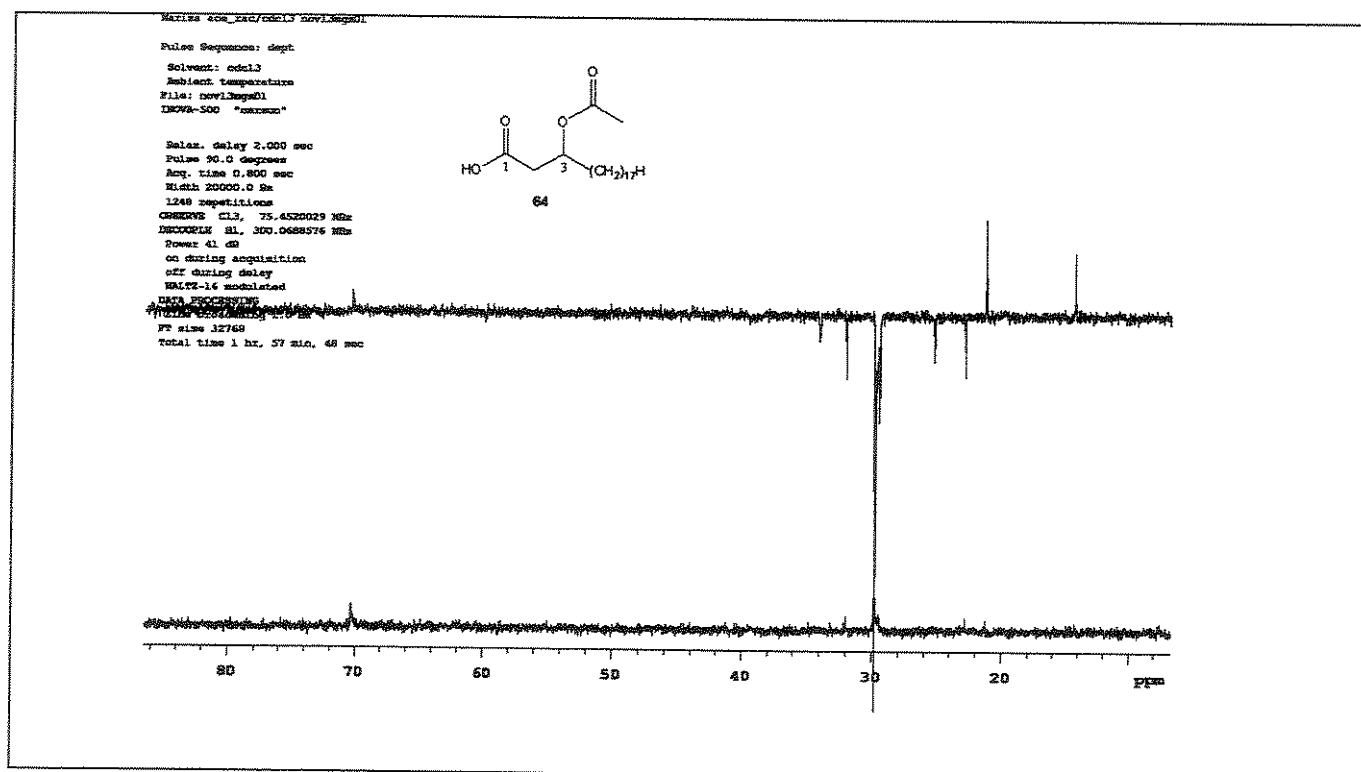


Figura 198. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 64.

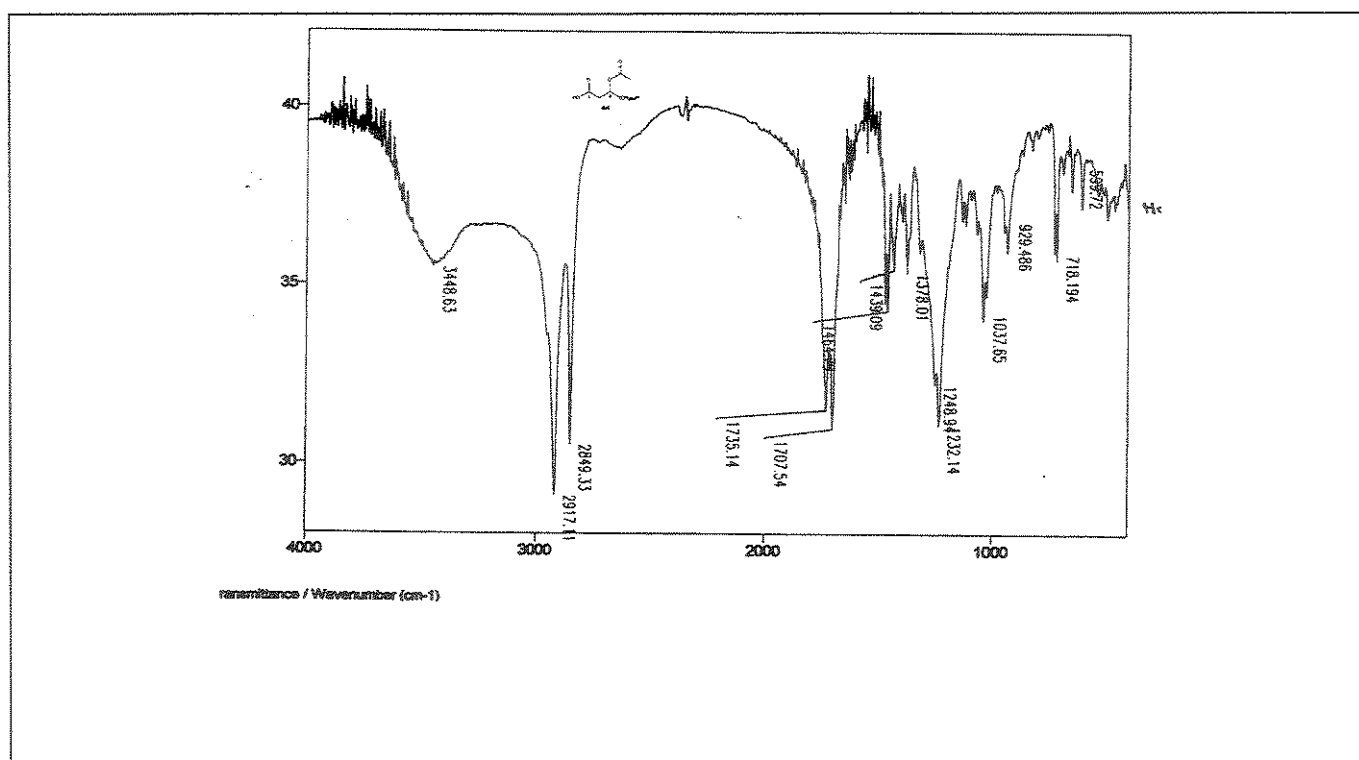


Figura 199. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 64.

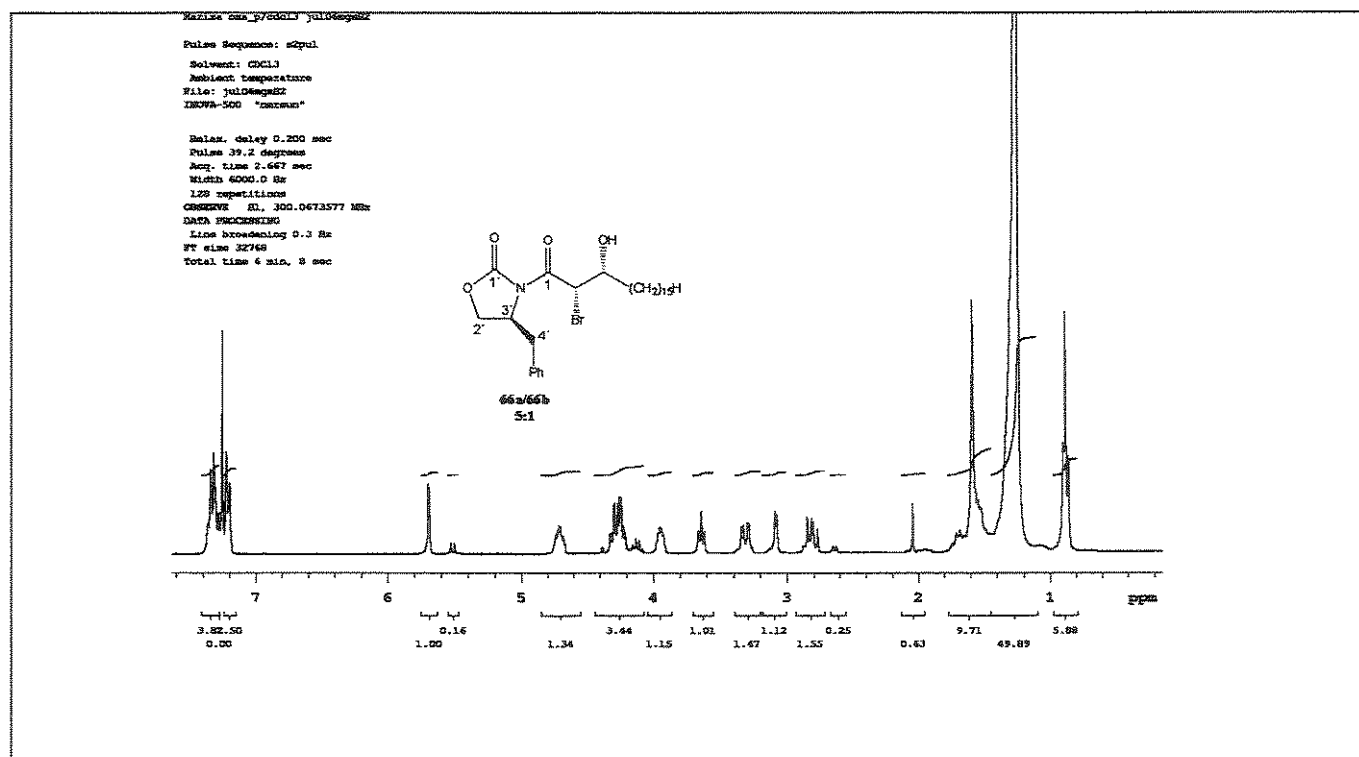


Figura 200. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) dos compostos 66a/66b.

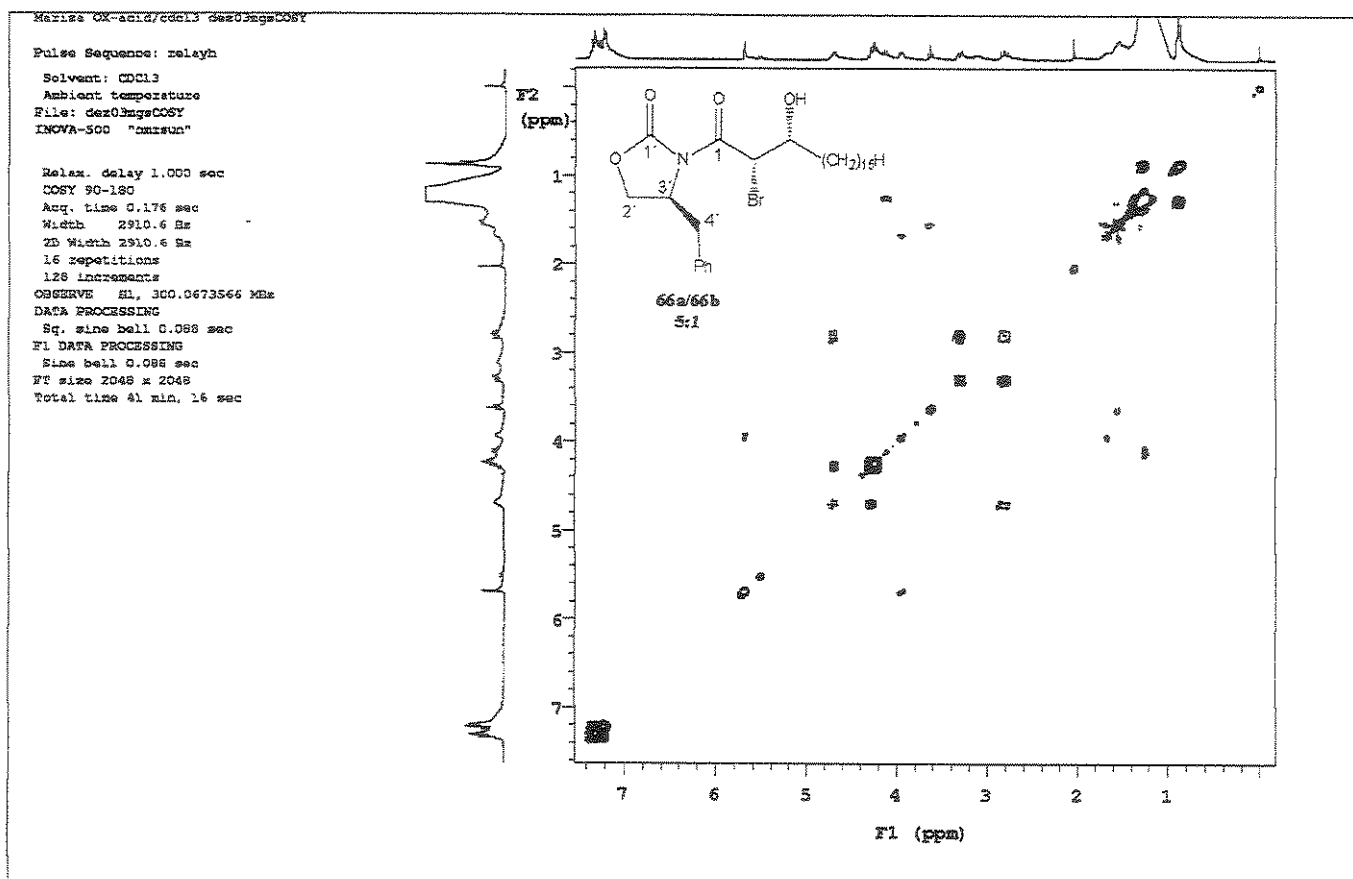


Figura 203. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^1H -COSY(300 MHz, CDCl_3) do composto 66a/66b.

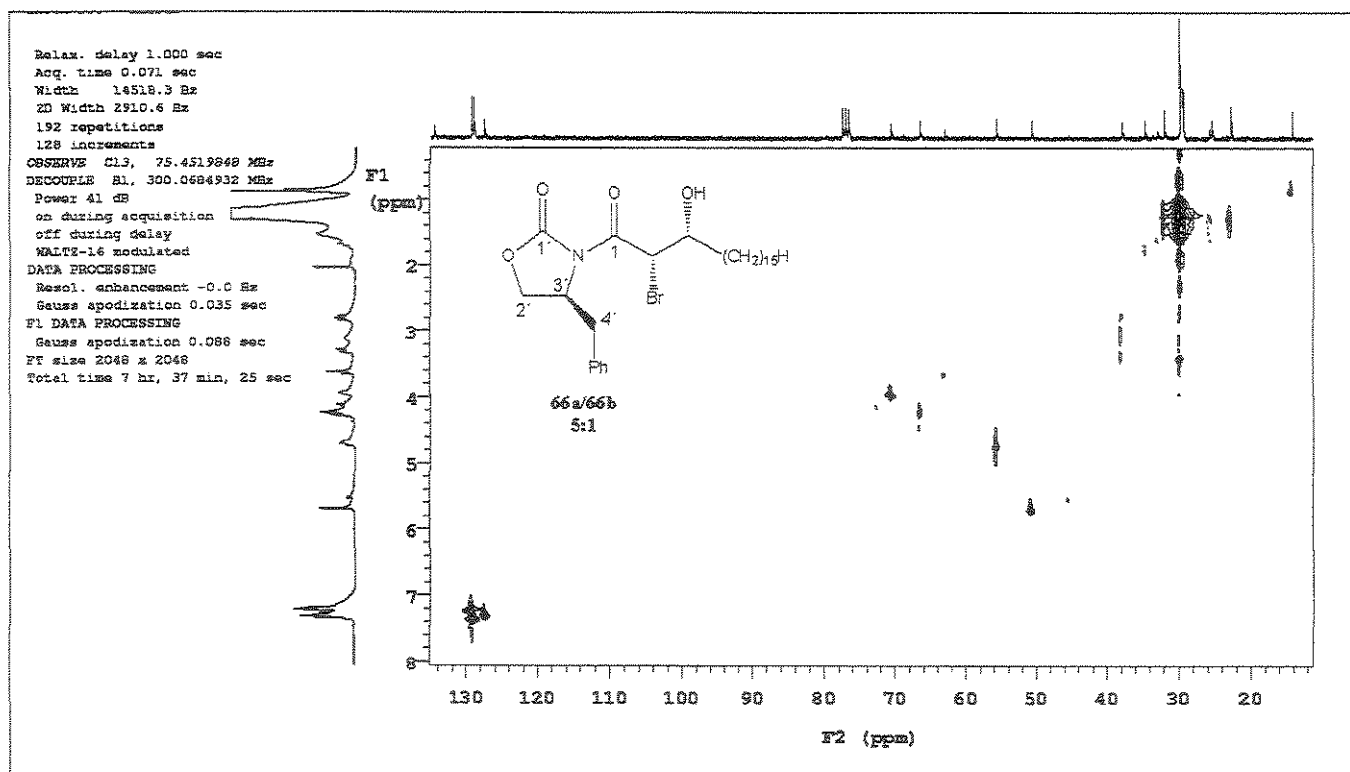


Figura 204. Mapa de contornos de RMN de 2D ^1H - ^{13}C - COLOQ (300 MHz, CDCl_3) do composto 66a/66b.

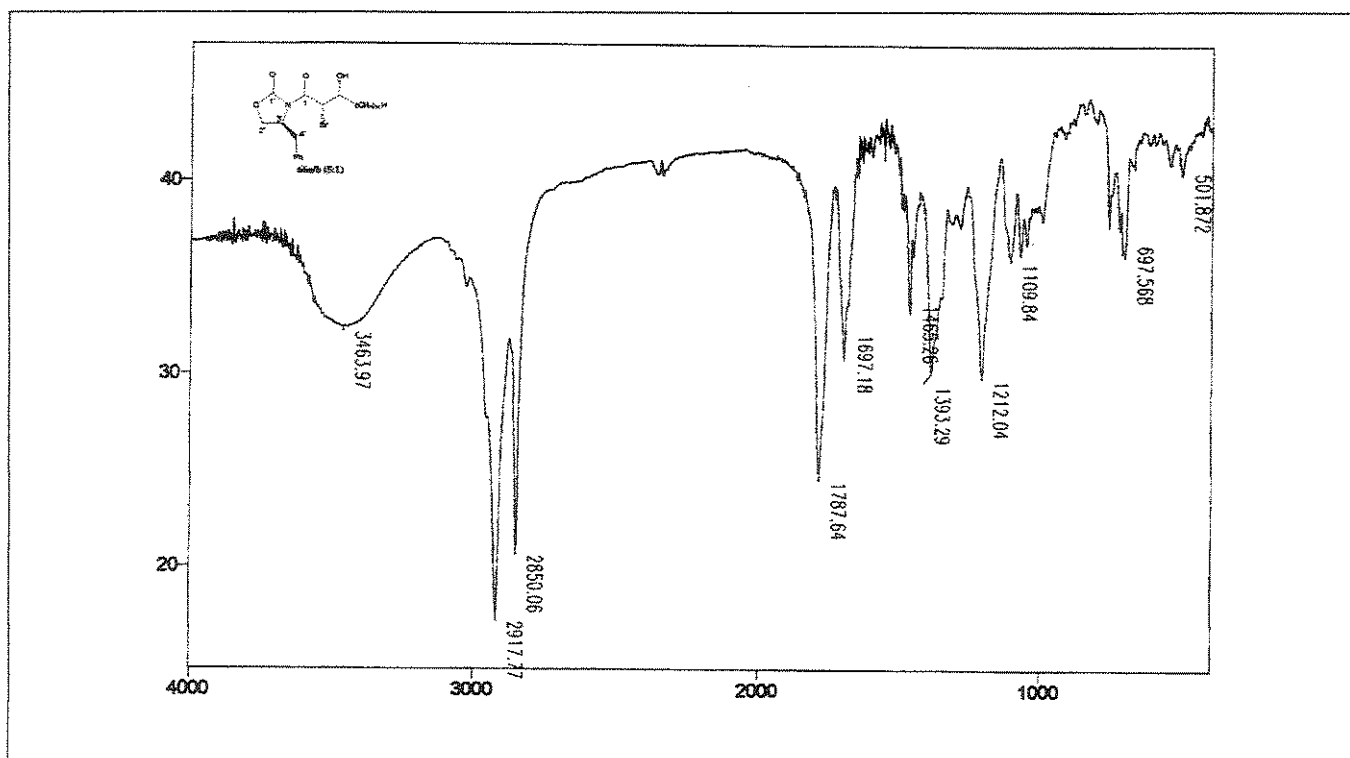


Figura 205. Espectro no Infra Vermelho (filme) dos compostos dos 66a/66b.

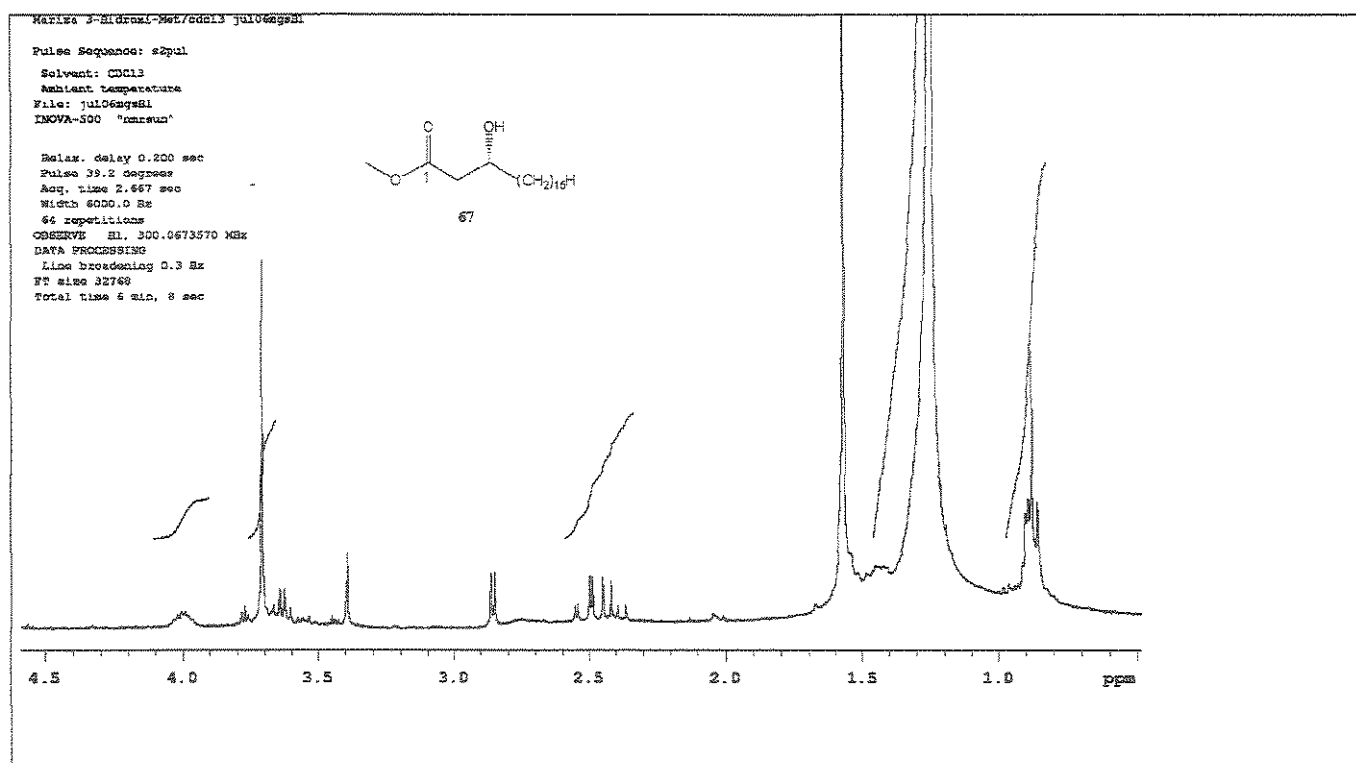


Figura 206. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 67.

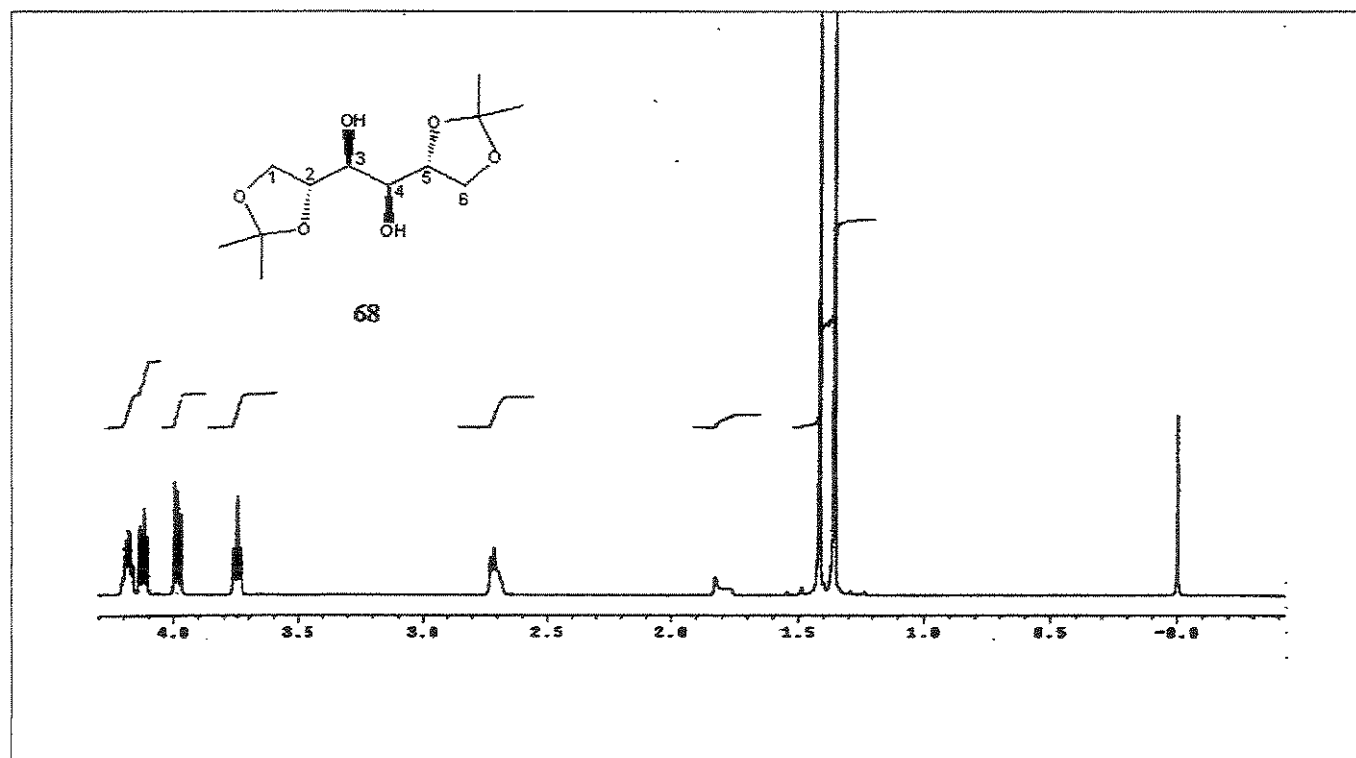


Figura 207. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) dos compostos 68.

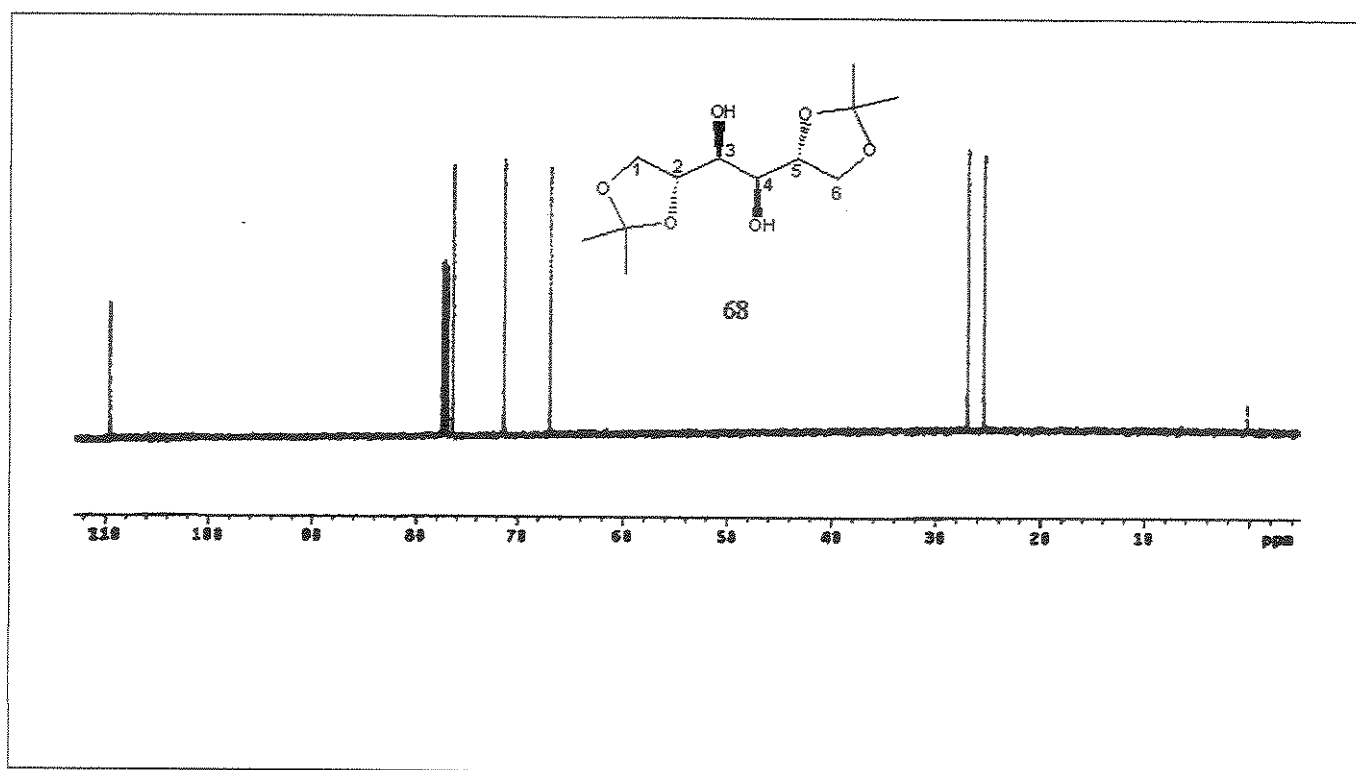


Figura 208. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) dos compostos 68.

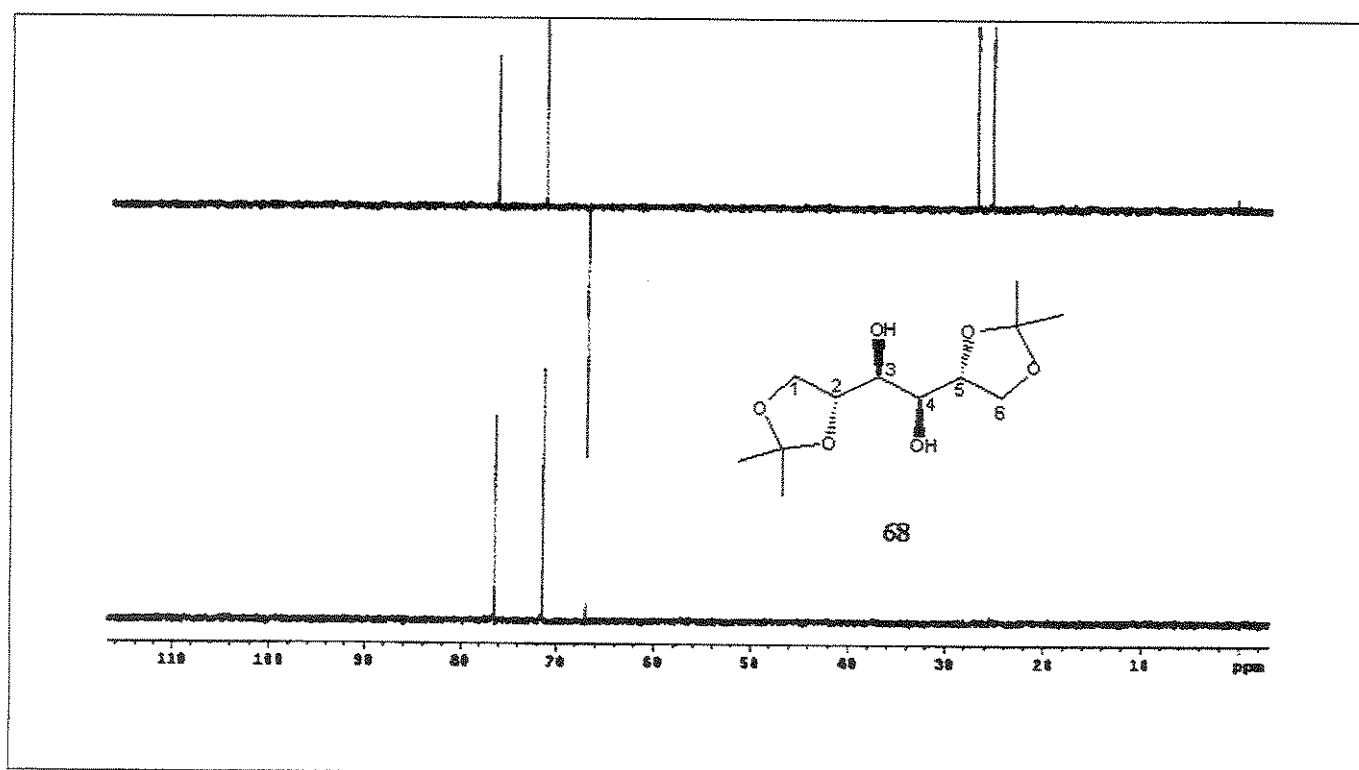


Figura 209. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 68.

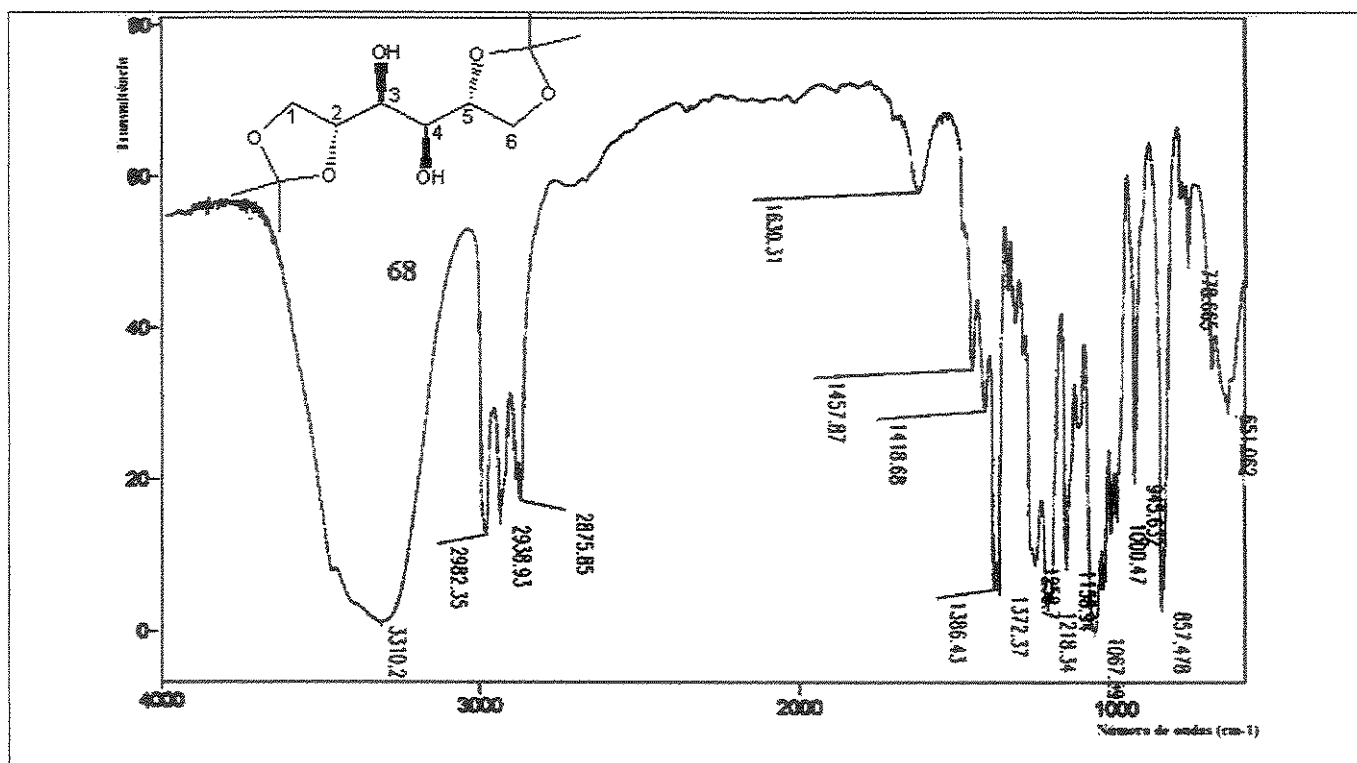


Figura 210. Espectro no Infra Vermelho (KBr) do composto 68.

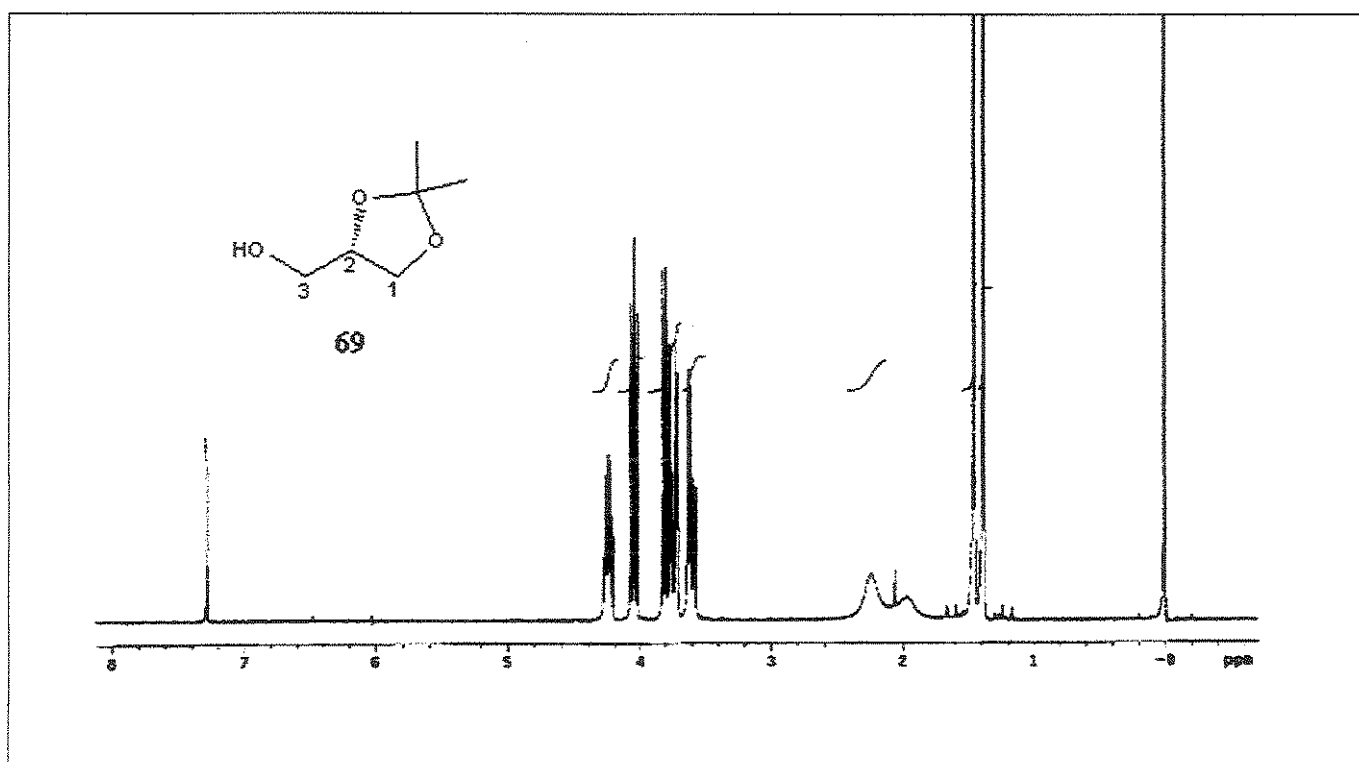


Figura 211. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) dos compostos 69.

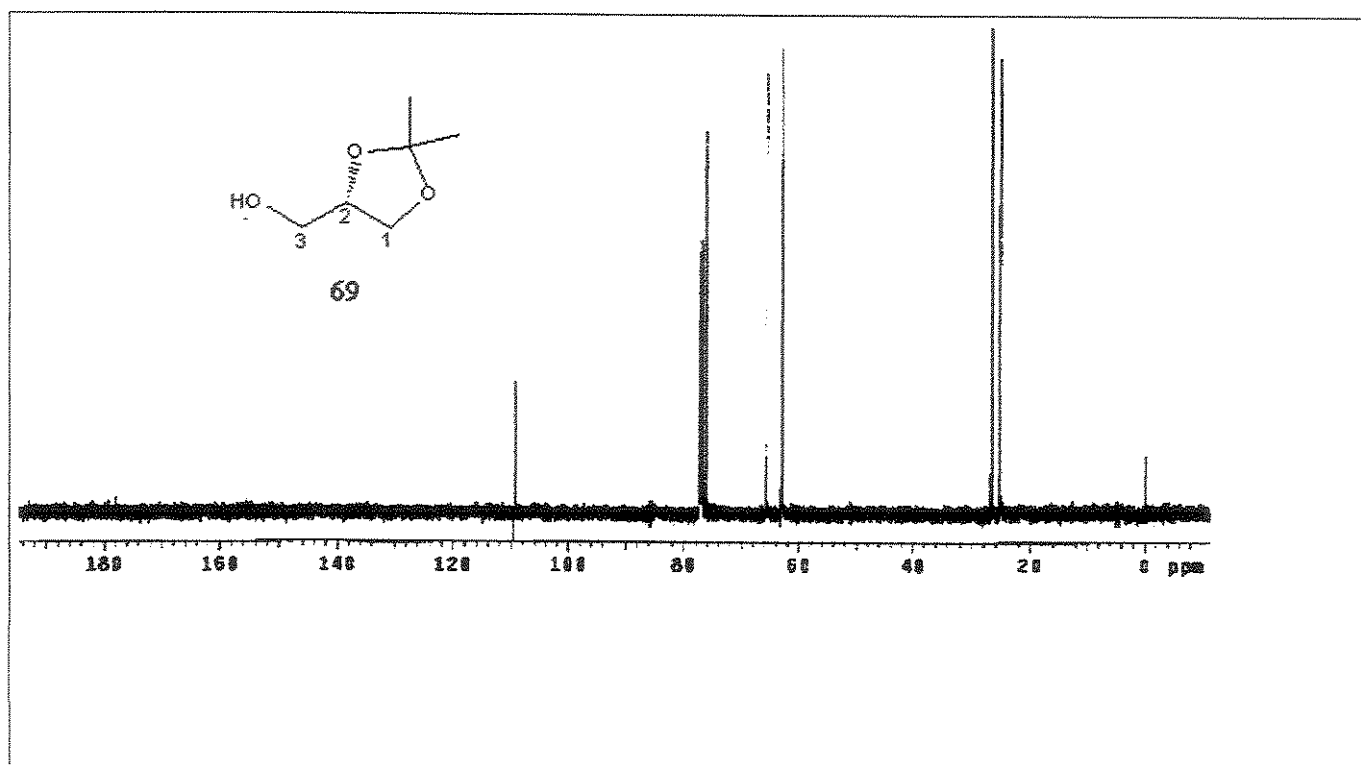


Figura 212. Espectro de RMN de ¹³C (500 MHz, CDCl₃) dos compostos 69.

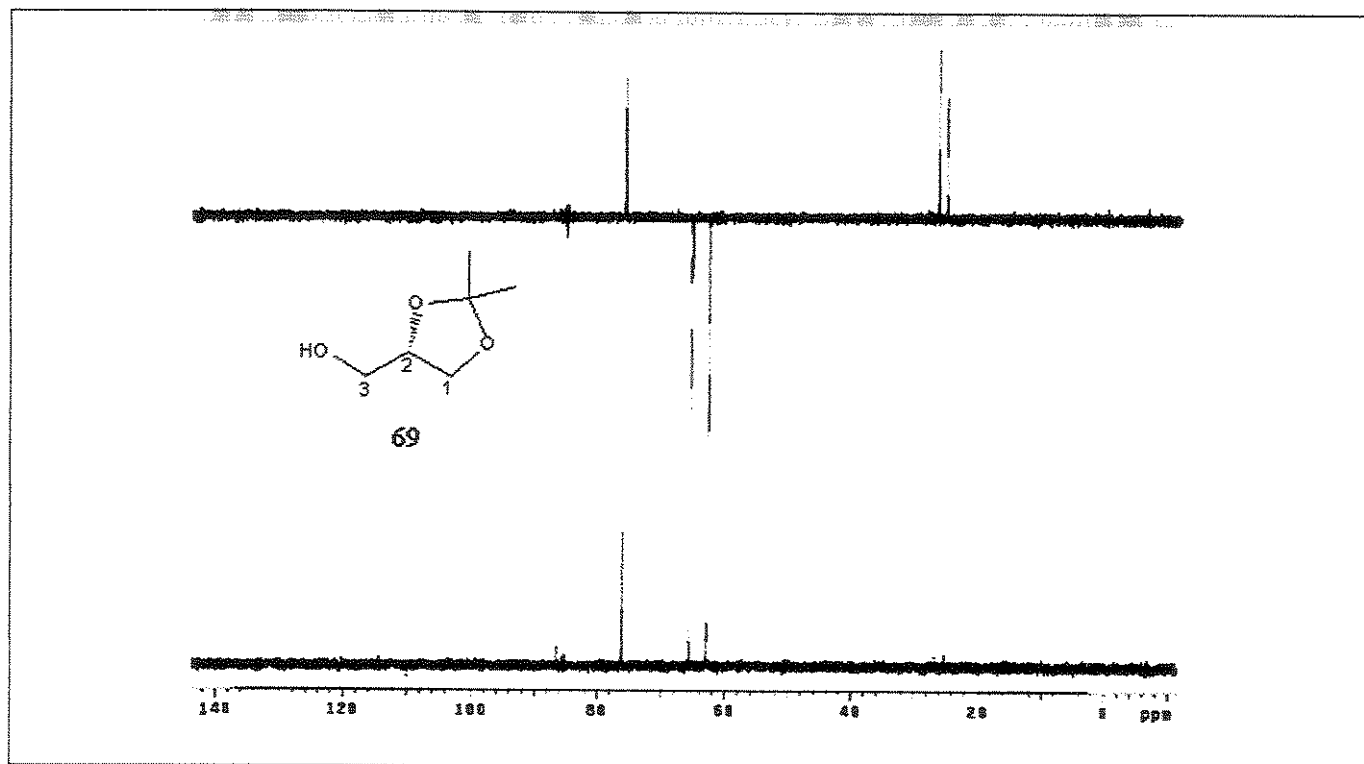


Figura 213. Espectro de RMN de ¹³C: a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl₃) do composto 69.

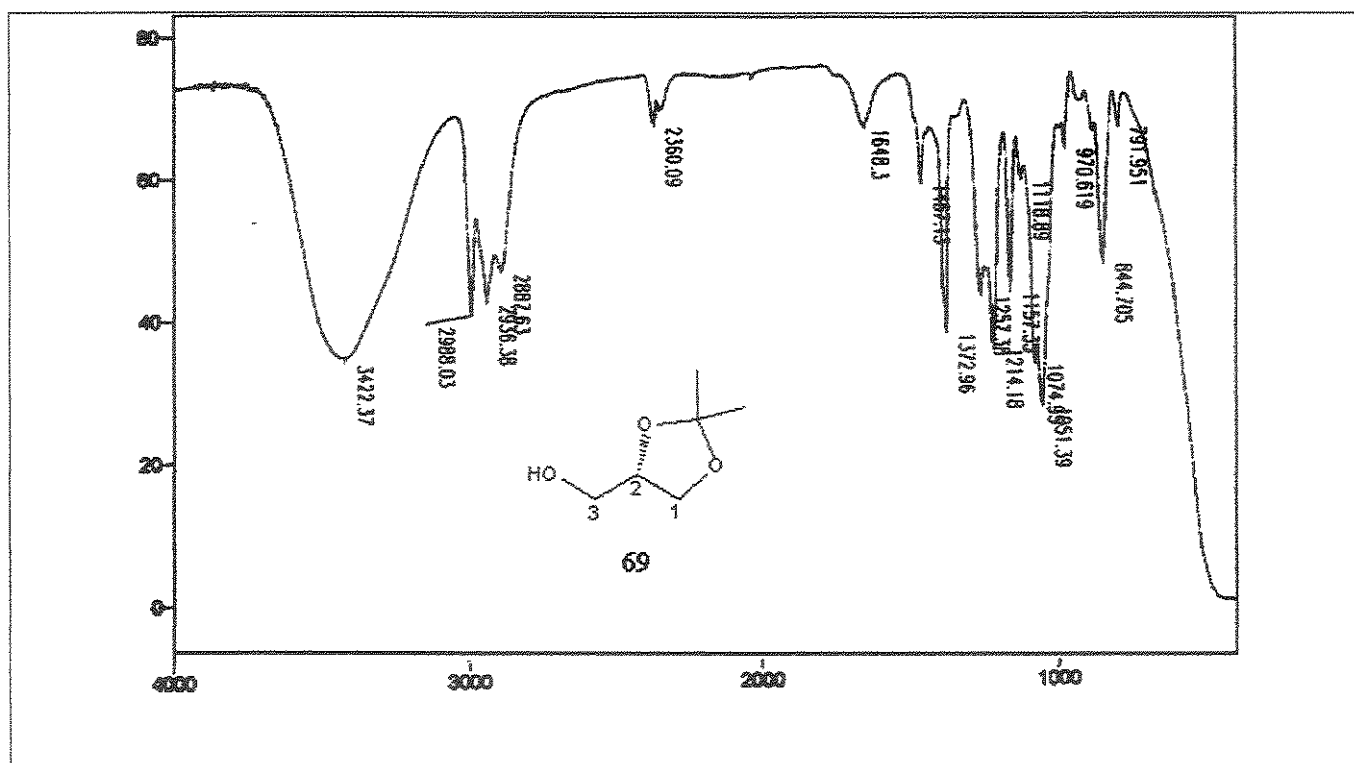


Figura 214. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 69.

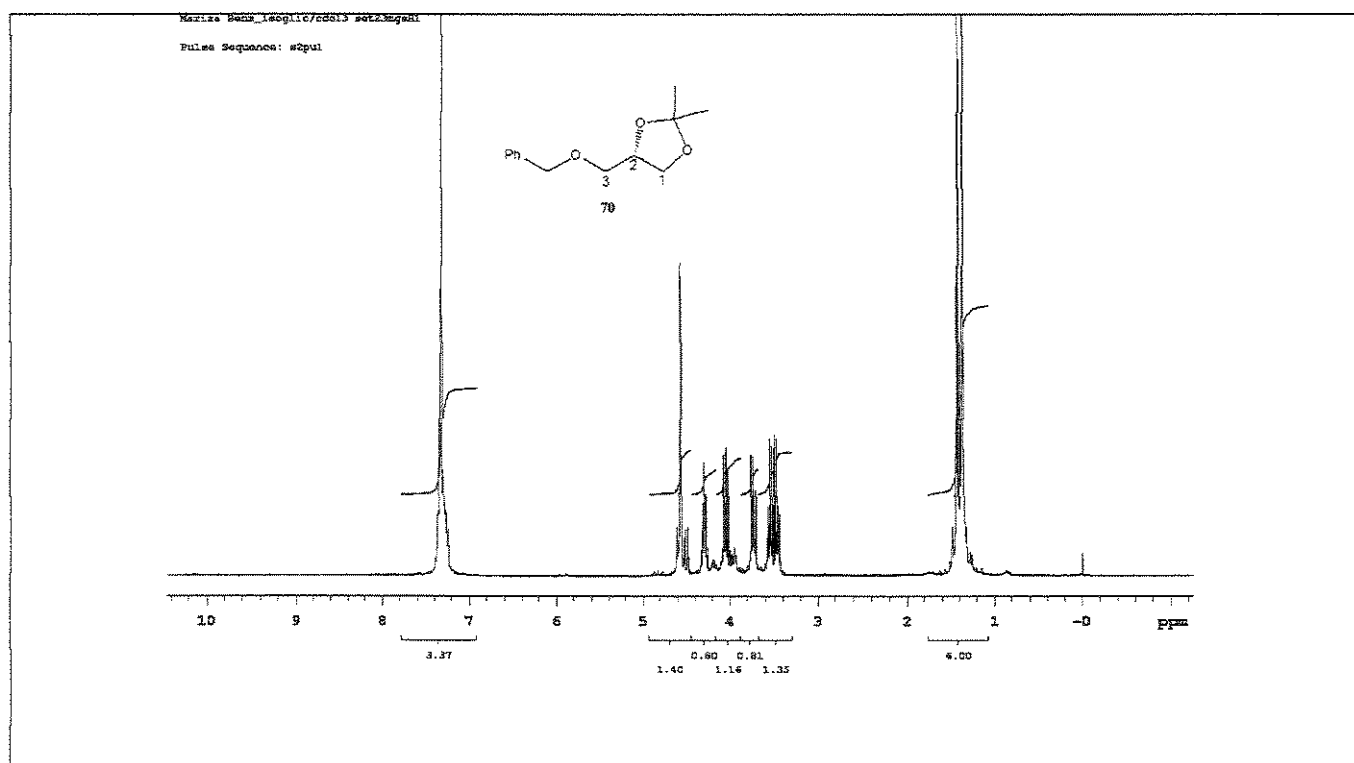


Figura 215. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 70.

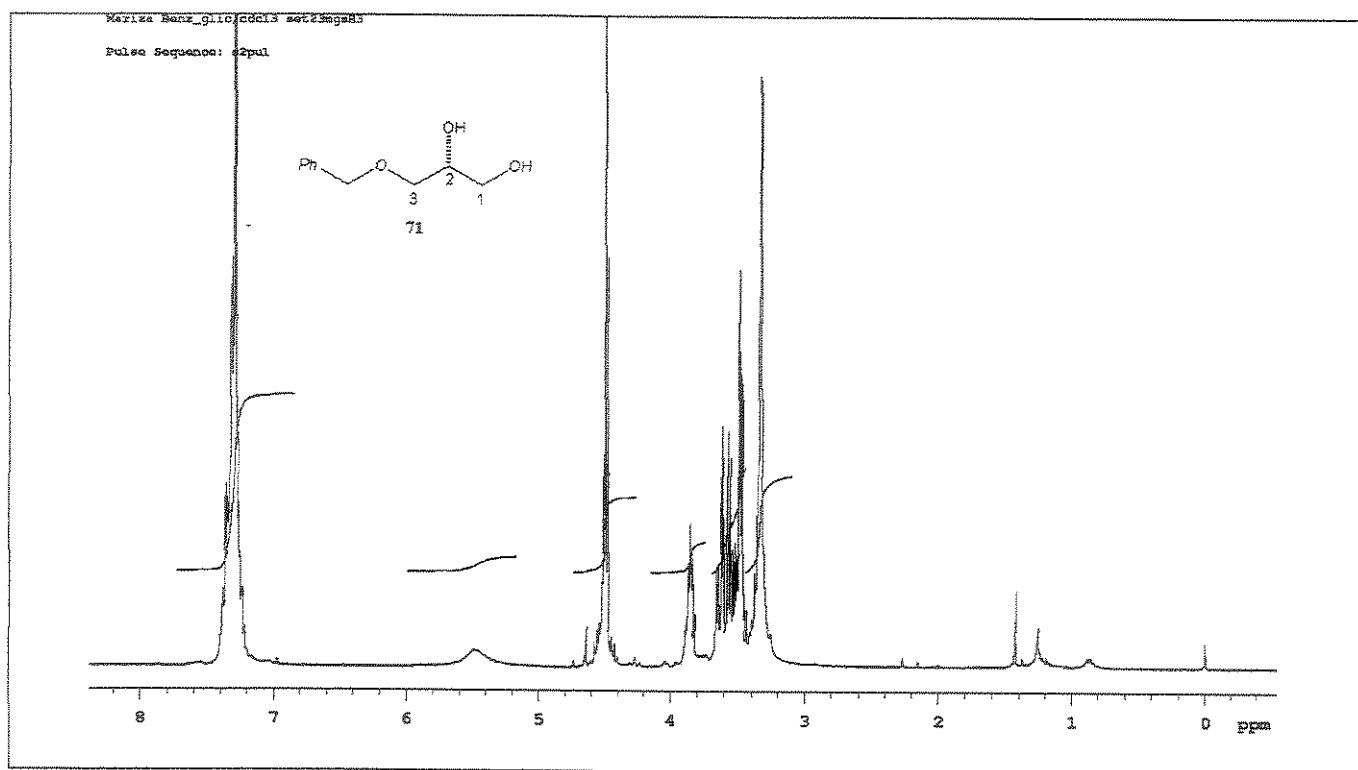


Figura 216. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 71.

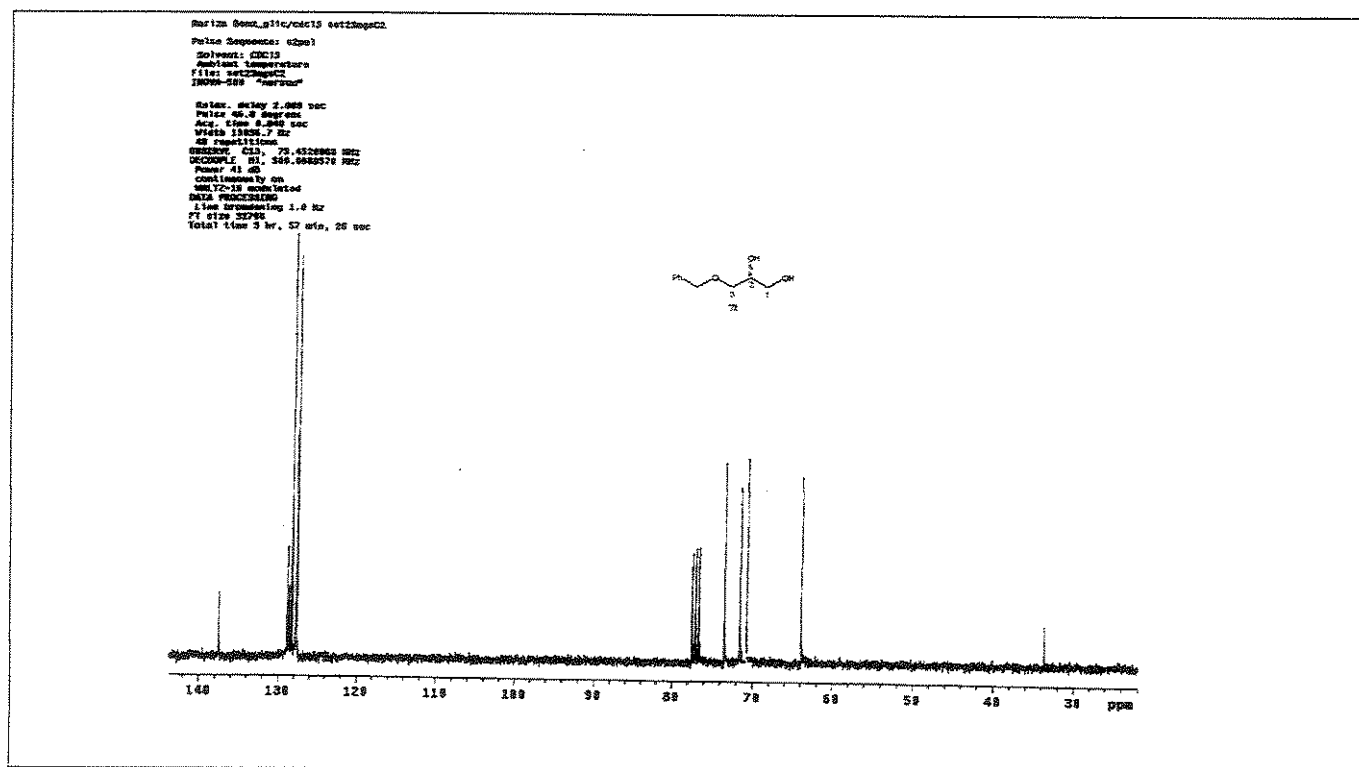


Figura 217. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 71.

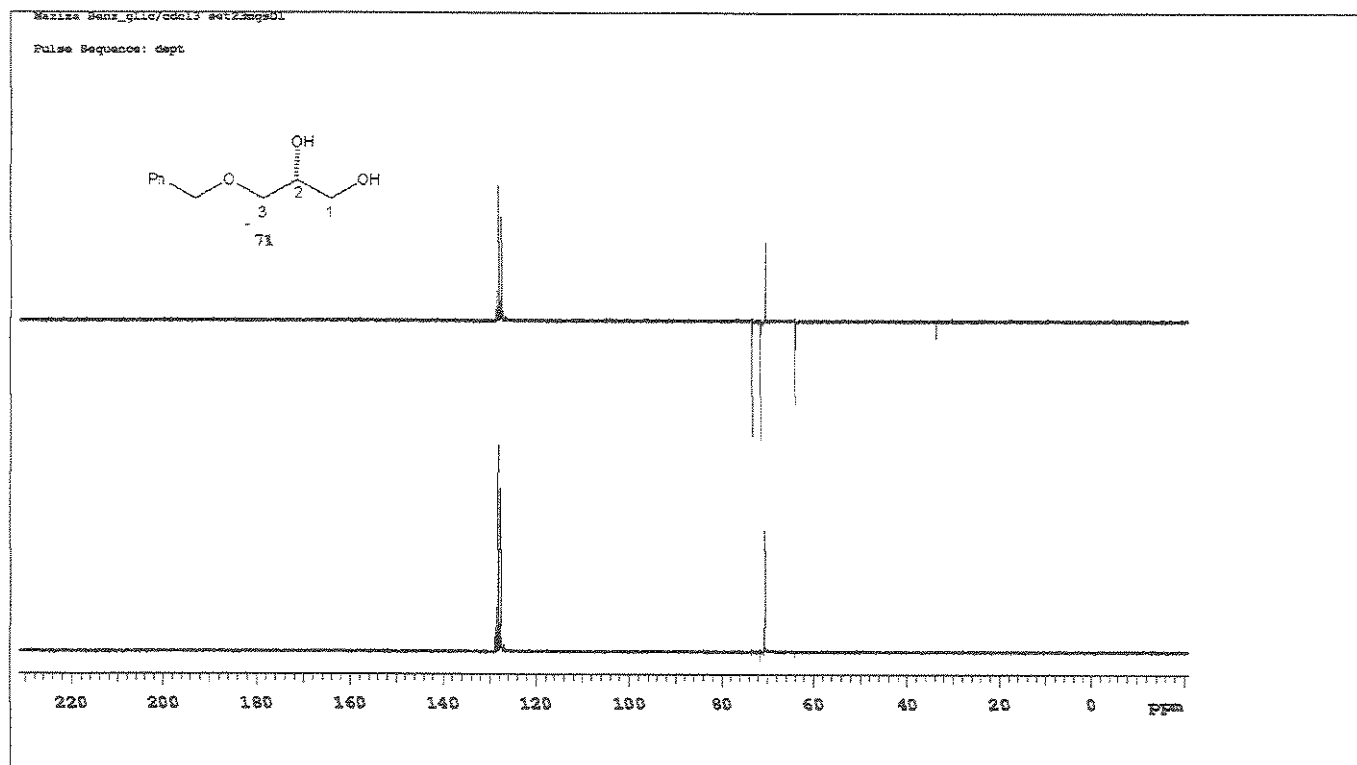


Figura 218. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 71.

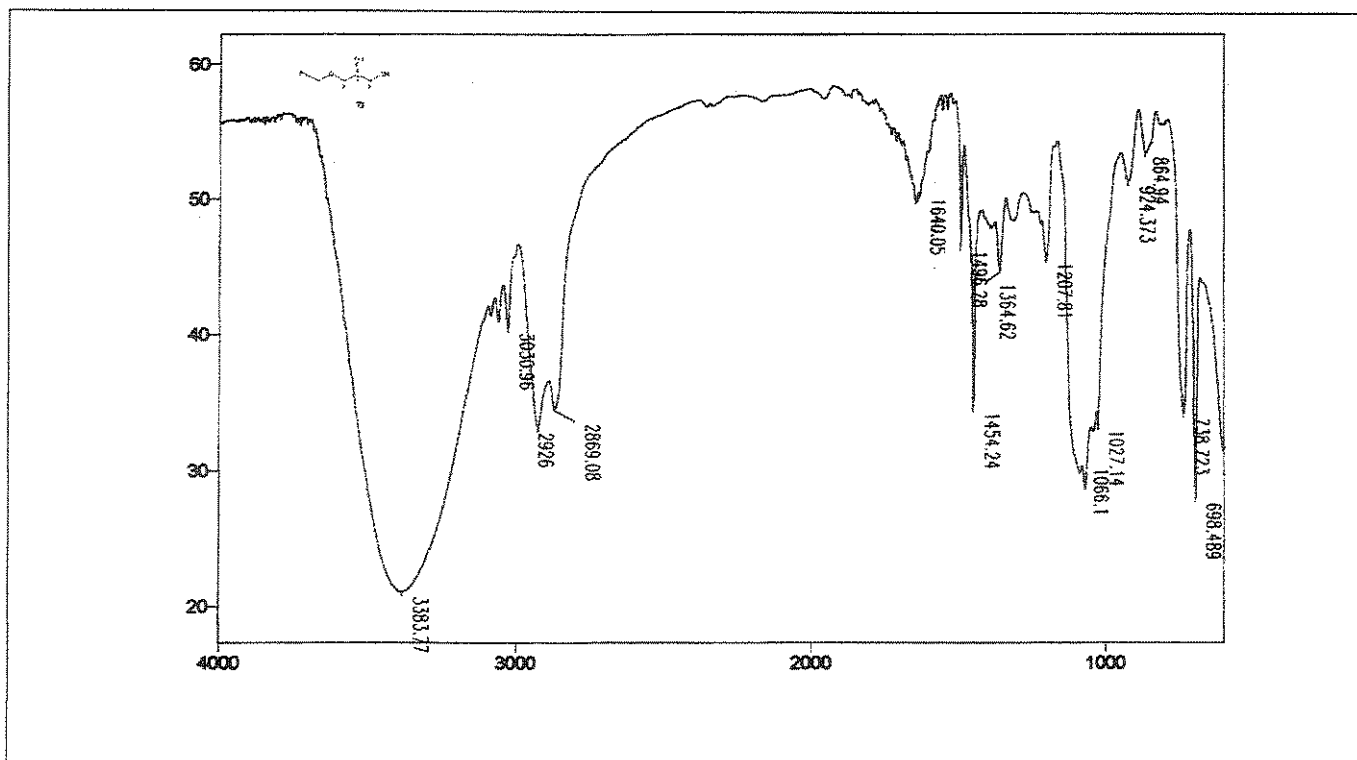


Figura 219. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 71.

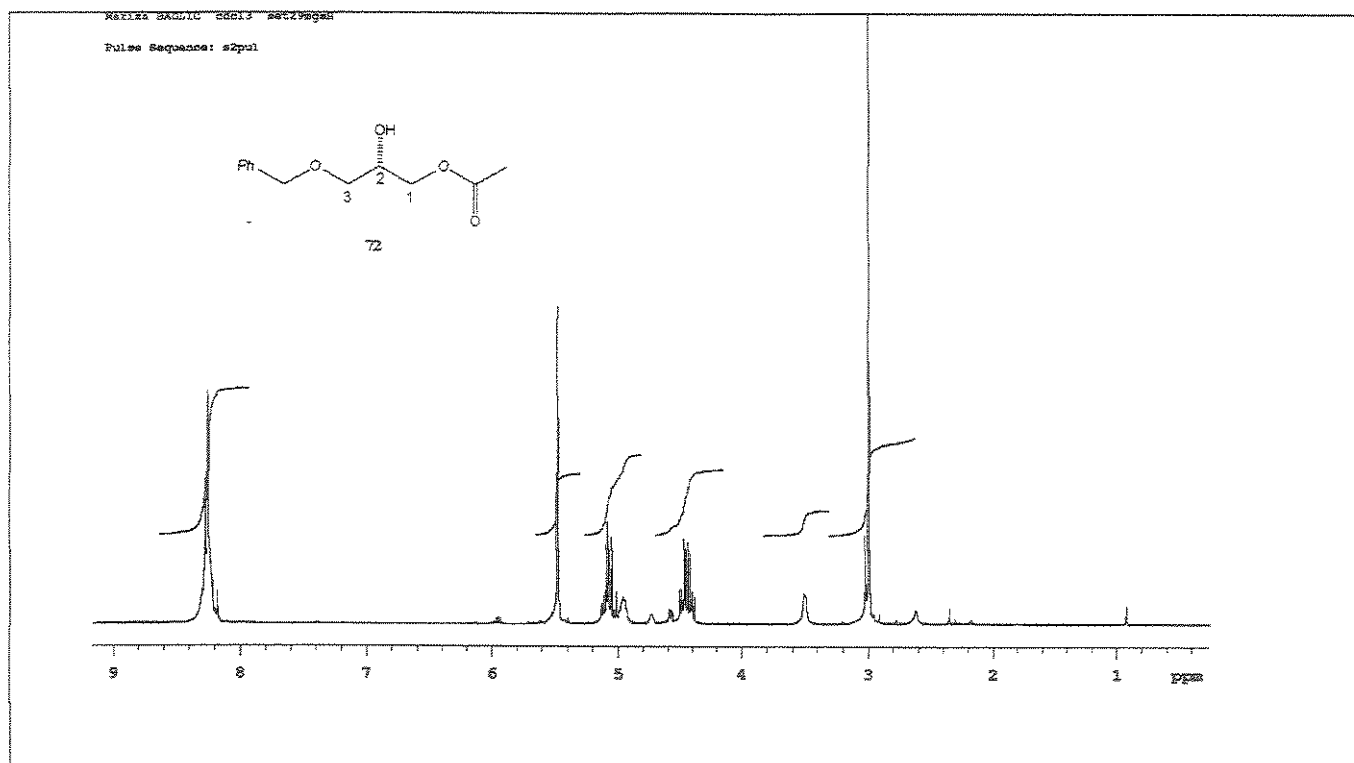


Figura 220. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 72.

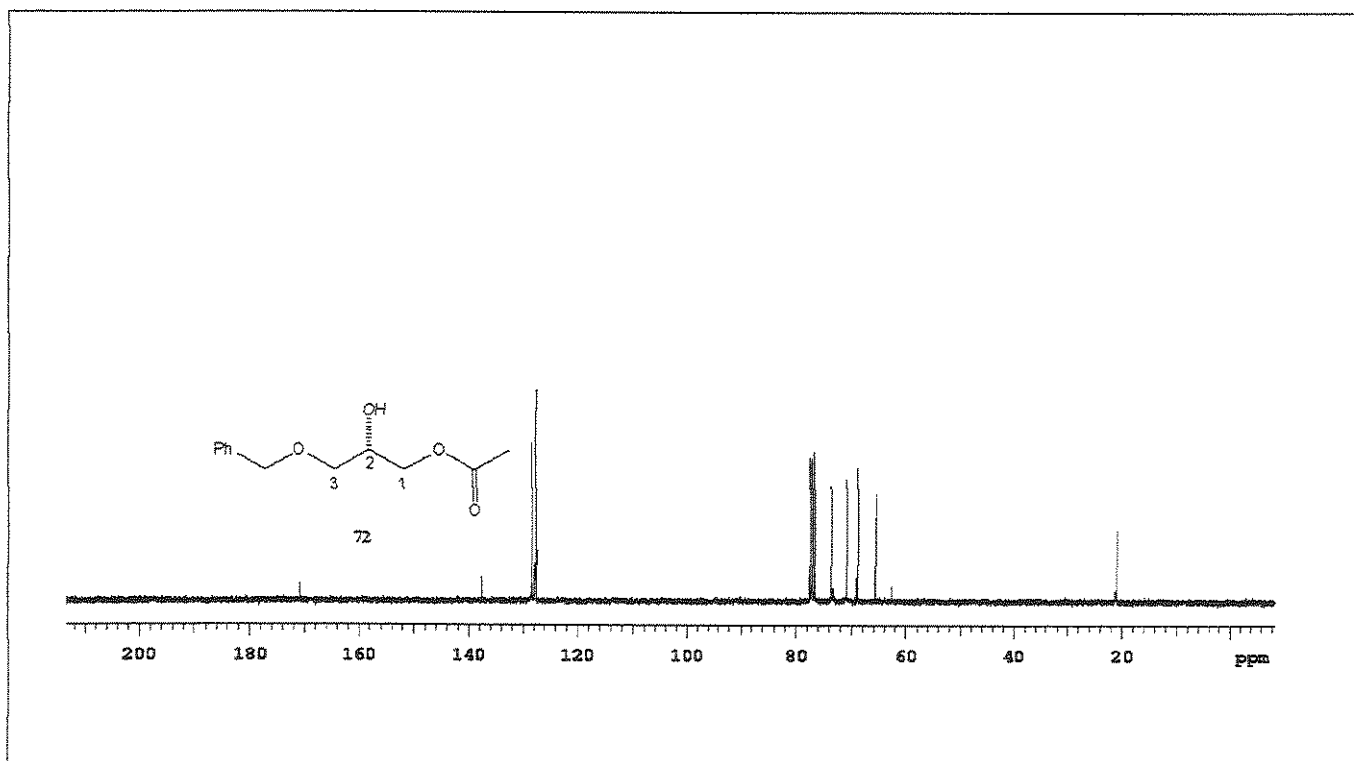


Figura 221. Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 72.

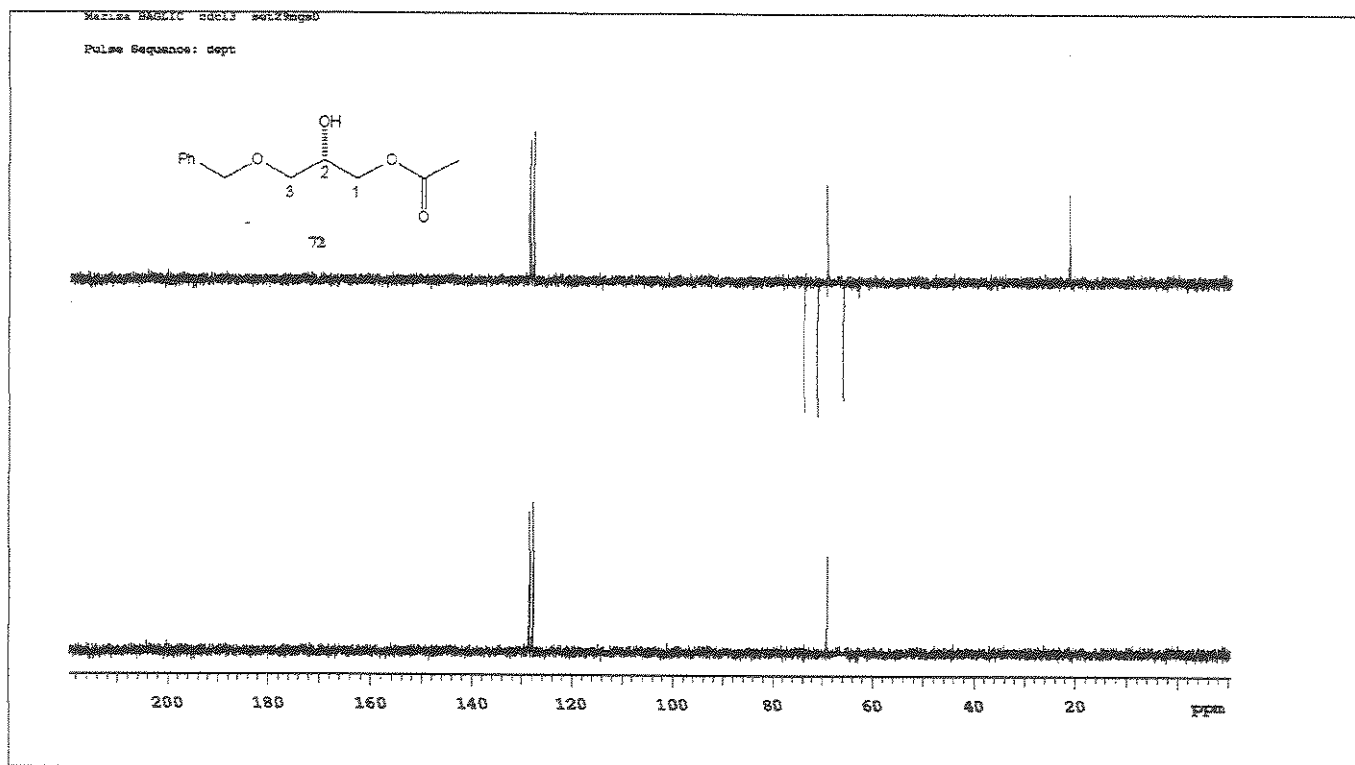


Figura 222. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 72.

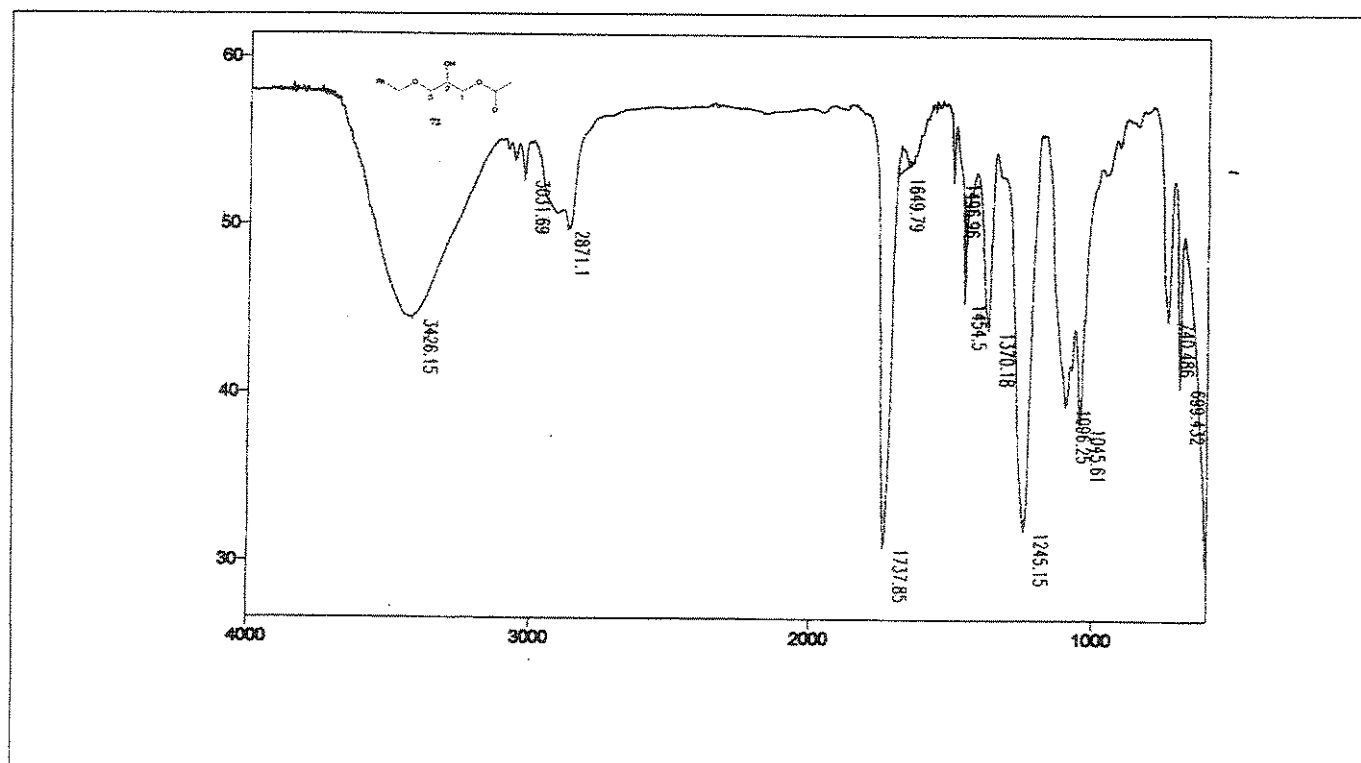


Figura 223. Espectro no Infra Vermelho (filme) do composto 72.

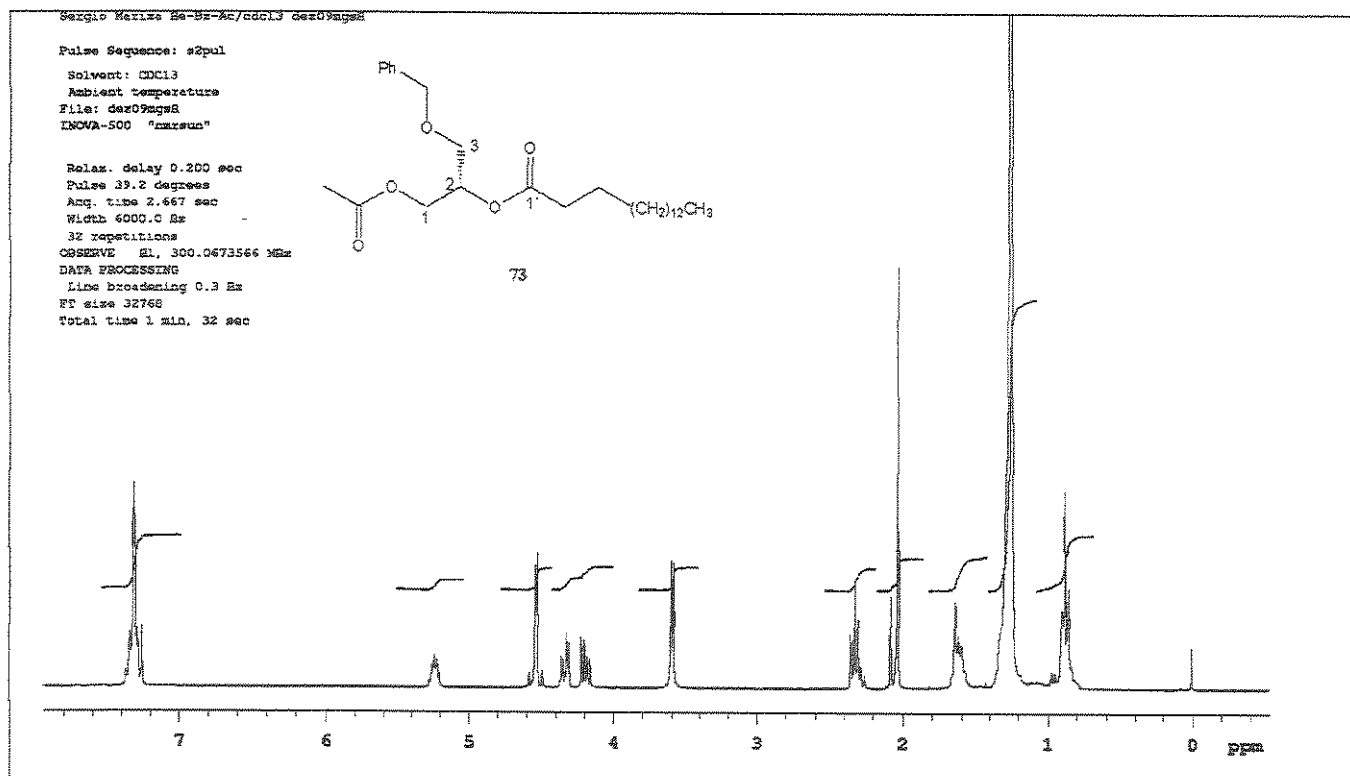


Figura 224. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 73.

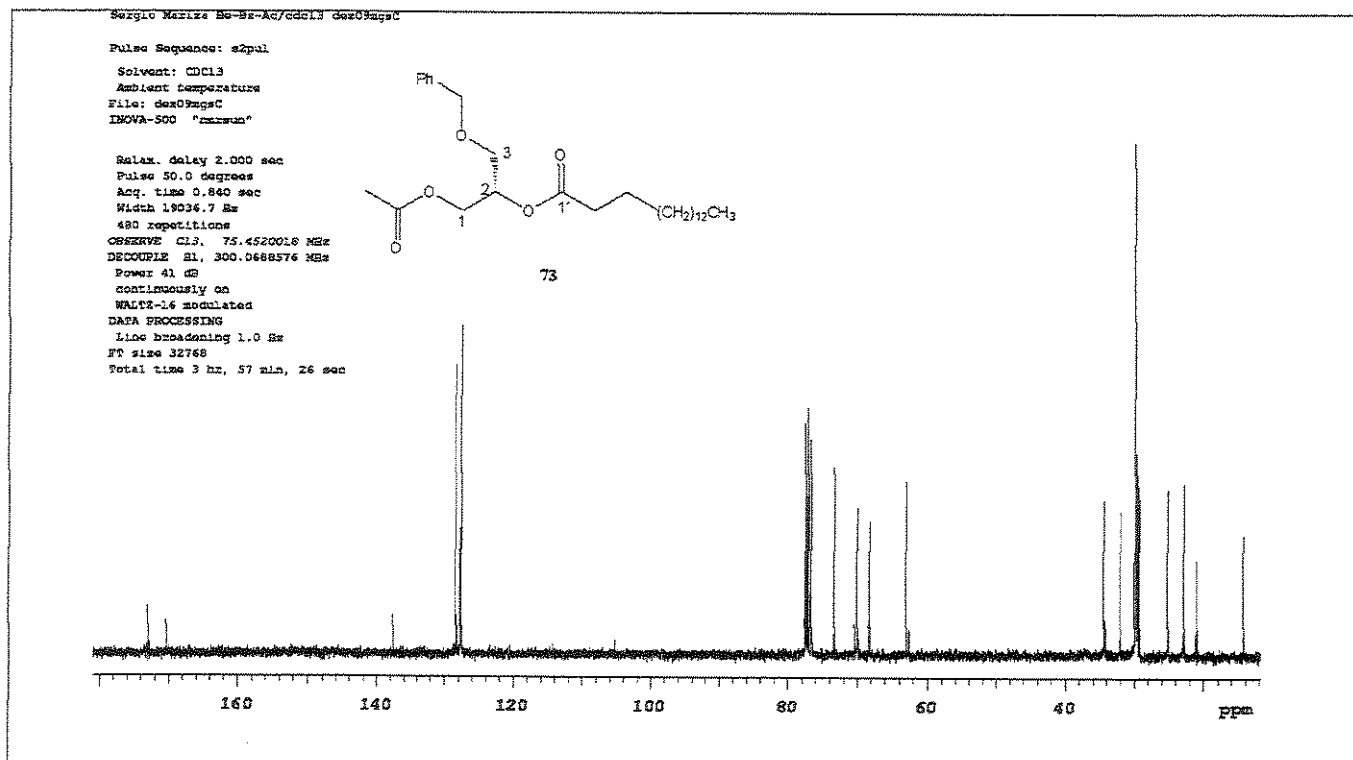


Figura 225. Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) dos compostos 73.

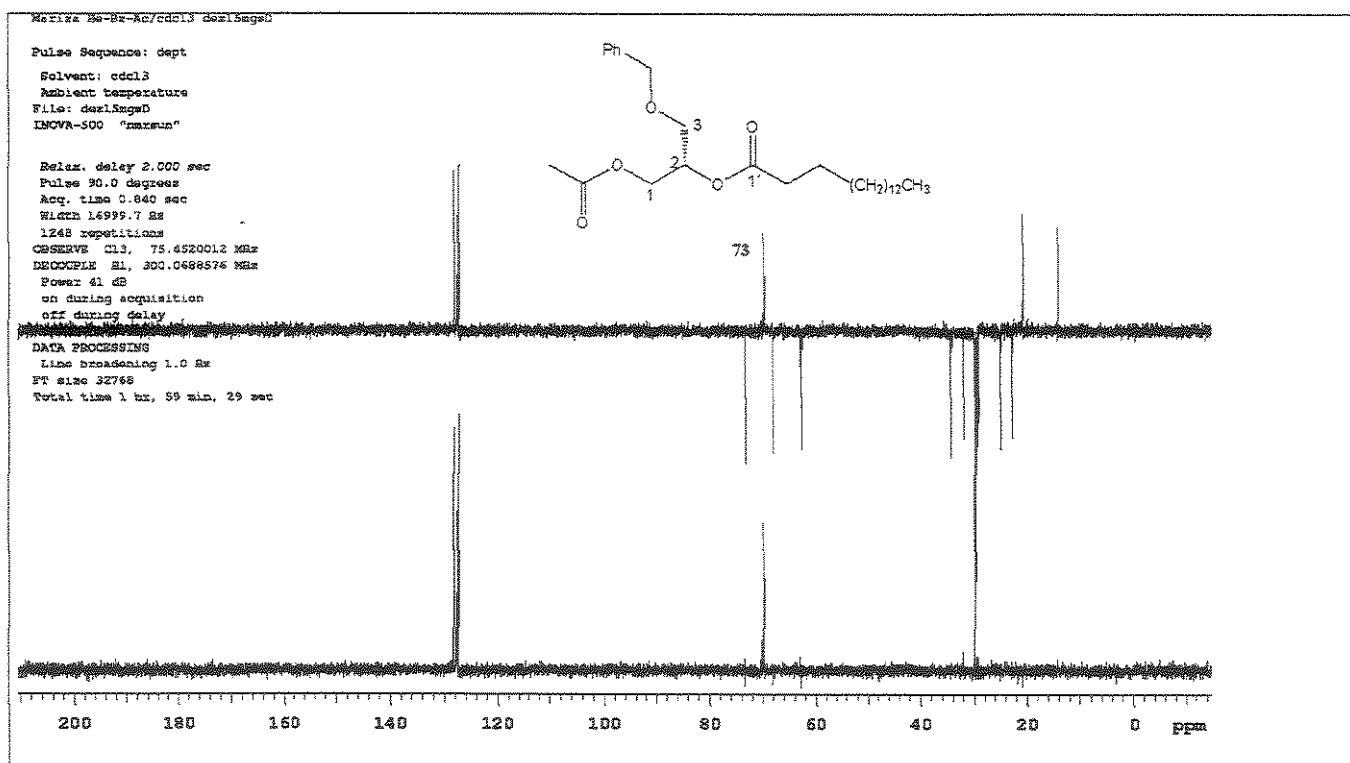


Figura 226. Espectro de RMN de ^{13}C : a)-DEPT 135° e b)-DEPT 90° (75.45 MHz, CDCl_3) do composto 73.