



UNICAMP

DANIELE FERNANDA DE OLIVEIRA ROCHA

**ESTUDO DE SEMIOQUÍMICOS DE OPILIÕES (LANIADORES:
ARACHNIDA) DA FAMÍLIA GONYLEPTIDAE: CARACTERIZAÇÃO,
SÍNTESE E BIOSÍNTESE**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

DANIELE FERNANDA DE OLIVEIRA ROCHA

**ESTUDO DE SEMIOQUÍMICOS DE OPILIÕES (LANIADORES: ARACHNIDA) DA
FAMÍLIA GONYLEPTIDAE: CARACTERIZAÇÃO, SÍNTESE E BIOSSÍNTESE**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
DANIELE FERNANDA DE OLIVEIRA ROCHA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
ANITA JOCELYNE MARSAIOLI.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR DANIELLE DANTAS DE SOUSA -
CRB8/6490 - BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

R582e	<p>Rocha, Daniele Fernanda de Oliveira (1982-). Estudo de semioquímicos de opiliões (Laniatores: Arachnida) da família Gonyleptidae: caracterização, síntese e biossíntese / Daniele Fernanda de Oliveira Rocha. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Produtos naturais. 2. Defesa química. 3. Diels-Alder, reação de. 4. Biossíntese. 5. RMN. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study of semiochemicals from harvestman (Laniatores: Arachnida) belonging to the family Gonyleptidae: characterization, synthesis and biosynthesis

Palavras-chave em inglês:

Natural products
Chemical defense
Diels-Alder, reaction
Biosynthesis
NMR

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutora em Ciências

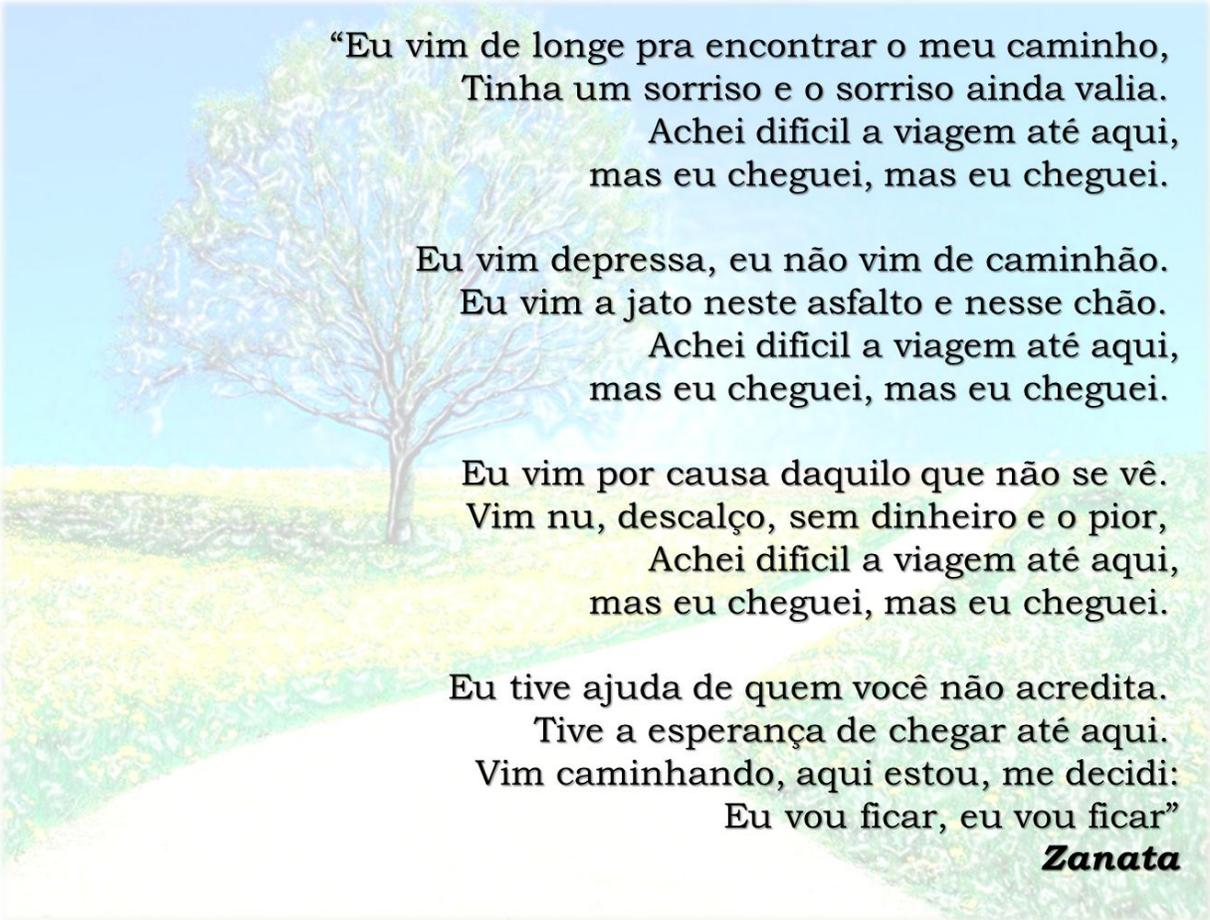
Banca examinadora:

Anita Jocelyne Marsaioli [Orientadora]
Mônica Tallarico Pupo
Roberto Gomes de Souza Berlinck
Fábio Cesar Gozzo
Paulo Mitsuo Imamura

Data de defesa: 16/08/2013

Programa de pós-graduação: Química

Dedico este sonho realizado
ao meu marido Marciel e às minhas filhas Maria
Cristina e Ana Beatriz (que está à caminho). Dedico
também aos meus pais, Regina e Edivaldo, e às minhas
irmãs, Gisele e Regiane. Eles, que nunca me deixaram
parar...e sempre me impulsionam a seguir em frente.

A painting of a tree in a field with a path leading towards it. The tree is on the left, and the path leads from the bottom left towards the tree. The background is a bright blue sky and a green field.

“Eu vim de longe pra encontrar o meu caminho,
Tinha um sorriso e o sorriso ainda valia.
Achei difícil a viagem até aqui,
mas eu cheguei, mas eu cheguei.

Eu vim depressa, eu não vim de caminhão.
Eu vim a jato neste asfalto e nesse chão.
Achei difícil a viagem até aqui,
mas eu cheguei, mas eu cheguei.

Eu vim por causa daquilo que não se vê.
Vim nu, descalço, sem dinheiro e o pior,
Achei difícil a viagem até aqui,
mas eu cheguei, mas eu cheguei.

Eu tive ajuda de quem você não acredita.
Tive a esperança de chegar até aqui.
Vim caminhando, aqui estou, me decidi:
Eu vou ficar, eu vou ficar”

Zanata

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes quatro anos muitas pessoas foram fundamentais para o andamento e conclusão deste trabalho. Coloco aqui alguns nomes, com muita gratidão e carinho.

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, fé e esperança, que me permitiram começar e terminar este trabalho.

A professora Dra. Anita J. Marsaioli, a quem serei eternamente grata pela acolhida e orientação na ciência e na vida. Espero levar muito de suas lições e de seu amor pelos produtos naturais para toda a vida. A diversidade das linhas de pesquisa, a estrutura física e a competência deste laboratório dão bases sólidas a quem passa por ele. Tenho muito orgulho de ter feito parte de minha formação acadêmica em seu grupo.

O colaborador Prof. Dr. Glauco Machado, do IB-USP, por partilhar as questões interessantes da ecologia de opiliões com a química.

Os (as) colegas de grupo, aqueles com quem partilhei as conquistas e as dificuldades da vida acadêmica, os “papos cabeça” e divagações sobre a vida e sobre a ciência. Sinto-me muito honrada por ter trabalhado com vocês e espero ainda ter muitas oportunidades de estarmos juntos em nossas carreiras de pesquisadores. Lucas, Célio, Bruna (e Arnaldo), Lair (e Ramon), Thiago, Michel, Haleem e Francine (e Silvio). Os “veteranos” Simone, Armando, Carla, Dávila, Cíntia, Diana e Adriana. Os técnicos Raphael, Fabiane, Priscila e Dona Maria Lopes, que tornaram nossa vida mais eficiente no laboratório, e à Simone Dias, sempre agilizando para que as coisas se resolvam prontamente. E uma lembrança especial da pós-doc Caroline Gonçalves e do parceiro Felipe Wouters, com quem tive a honra de trabalhar mais diretamente. Os momentos que vivemos foram fundamentais para minha formação e, certamente, sairei mais madura desta etapa também graças a vocês.

O Instituto de Química, através de seus funcionários, que nos proporcionam condições de desenvolver trabalhos de altíssima qualidade e visibilidade internacional. Os técnicos dos laboratórios institucionais: Ricardo (HPLC); Rita e Priscila (Massas); e em especial Anderson, Sônia e Paula (RMN), fazendo “milagres” para analisar minhas amostras super diluídas. Os funcionários da CPG Bel, Gabriela e Miguel, que

contribuem sempre com simpatia e paciência para o bom andamento de nossa vida acadêmica.

Os professores Luzia Koike, Paulo José Sarmenho Moran, José Augusto Rosário Rodrigues, Fábio César Gozzo e Ljubica Tasic, por suas valiosas contribuições em meus exames de qualificação, fundamentais para meu amadurecimento como cientista.

O apoio financeiro foi essencial para que tudo isso se realizasse. Agradeço à ANP/Petrobrás, pela bolsa concedida durante a maior parte de meu doutorado. À Pró-Reitoria de Pós Graduação, pela oportunidade de realizar estágio docente PED-A na Faculdade de Tecnologia de Limeira. À CPG, pelos auxílios concedidos para participação em congressos. À FAPESP e ao CNPq pelos demais auxílios financeiros.

No ambiente extra Unicamp, não posso deixar de agradecer o amor, a dedicação e a paciência de meu marido Marciel, sempre me incentivando a fazer o melhor. Aos meus pais, Edivaldo e Regina, e minhas irmãs, Gisele e Regiane, pelo apoio emocional e logístico nos cuidados com minha filha Maria Cristina e em tantos outros desafios. Também à minha sogra Maria Aparecida, por seu incentivo e apoio incondicional. Sem eles, certamente não seria possível dar um passo tão grande.

Enfim, agradeço imensamente a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta etapa tão importante fosse completada.

CURRICULUM VITAE

Daniele Fernanda de Oliveira Rocha

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2009-2013 Instituto de Química – Unicamp
Doutorado em ciências com ênfase em Química Orgânica
Título: Estudo de semioquímicos de opiliões (laníadores: arachnida) da família gonyleptidae: caracterização, síntese e biossíntese
Agências financiadoras: ANP/FUNCAMP e PRPG-Unicamp
- 2006-2008 Instituto de Química – Unicamp
Mestrado em Química Orgânica
Título: Estudo da redução de iminas
Agência financiadora: CNPq
- 2002-2005 Pontifícia Universidade Católica de Campinas
Bacharelado em Química Tecnológica
- 1997-2000 Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado - ETECAP
Curso técnico em química

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

2012. Estágio docente - PED A

2007 – 2008. Estágio docente - PED C

Pontifícia Universidade Católica de Campinas - PUC Campinas

2001 – 2006. Técnico de laboratório.

Buckman Laboratórios - BL

1999 – 2000. Estagiário nível técnico.

Embrapa Meio Ambiente - CNPMA

1999. Estagiário nível técnico.

PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS

1. Rocha, D. F. O.; Hamilton, K., Gonçalves, C. C. S.; Machado G., Marsaioli, A. J. 6-Alkyl-3,4-dihydro-2H-pyrans: chemical secretion compounds in neotropical harvestmen. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 658-663.

RESUMOS EM CONGRESSOS

1. Rocha, D. F. O., Marsaioli, A. J., Machado, G. Biosynthetic pathway of *Magnispina neptunus* benzoquinones (Arachnida: Opiliones). In: 2nd Latin American Meeting of Chemical Ecology, 2012, Huerta Grande - Argentina.
2. Rocha, D. F. O., Wouters, F. C., Machado, G., Marsaioli, A. J. Hetero Diels-Alder reaction to prolongate the lifetime chemical shield of *Iporangaia pustulosa* and *Neosadocus maximus* exudates (Arachnida, Opiliones, Laniatores) In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products, 2011, Ouro Preto - Brasil.
3. Rocha, D. F. O., Gonçalves, C. C. S., Machado, G., Marsaioli, A. J. Síntese de uma nova piranilcetona constituinte de secreções odoríferas de opiliões via hetero-Diels-Alder In: 34a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis - Brasil.
4. Rocha, D. F. O., Machado, G., Marsaioli, A. J. A new strategy of storing chemical defenses in the harvestmen *Iporangaia pustulosa* and *Neosadocus maximus* (Arachnida: Laniatores) In: 1st Latin American Meeting of Chemical Ecology, 2010, Colonia del Sacramento - Uruguai.
5. Rocha, D. F. O., Machado, G., Marsaioli, A. J. Chemical defenses in five neotropical harvestman species (Arachnida. Opiliones, Laniatores) In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products, 2009, São Pedro - Brasil.
6. Rocha, D. F. O., Braga, A. C. H. Reduction of imines with chirally modified borohydride In: 13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2009, São Pedro.

RESUMO

ESTUDO DE SEMIOQUÍMICOS DE OPILIÕES (LANIADORES: ARACHNIDA) DA FAMÍLIA GONYLEPTIDAE: CARACTERIZAÇÃO, SÍNTESE E BIOSÍNTESE

Opiliões são aracnídeos encontrados em todos os continentes, com mais de 6000 espécies descritas, e secretam uma mistura de compostos voláteis que atuam principalmente como defesa contra predadores naturais. A família Gonyleptidae, pertencente à subordem Laniatores, é a mais diversa química e morfológica e está presente em todo o território brasileiro. Assim, o estudo da identidade e da origem biossintética dos compostos presentes no exudato de espécimes desta família fornece informações filogenéticas, além de ser uma fonte de novos produtos naturais. Neste trabalho foram caracterizados os exudatos de cinco espécies de opiliões de diferentes subfamílias. As espécies *Cobania picea*, *Roeweria virescens* e *Serracutisoma proximum* secretam uma mistura benzoquinonas. Por outro lado, *Iporangaia pustulosa* e *Neosadocus maximus* produzem 1-hepten-3-ona e 1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)-pentan-1-ona. Este último foi descrito pela primeira vez na literatura, revelando uma nova classe de compostos com esqueleto piranil em opiliões, originados da reação de hetero-Diels-Alder *in vivo* de duas moléculas de vinil cetona. Também foi determinada a configuração absoluta da (*R*)-4-metil-1-hexen-3-ona produzida por *Acanthogonyleptes pulcher* e *Gonyleptes saprophilus*. Outras 4-metil-3-cetonas de insetos possuem configuração (*S*). Adicionalmente foi realizado o primeiro estudo biossintético com opiliões através da incorporação de precursores marcados com ^{13}C e espectroscopia de RMN de ^{13}C . Foram estudados *I. pustulosa*, que produz vinil cetona, e *Magnispina neptunus*, que produz benzoquinona, revelando que ambas as classes químicas são formadas através de unidades acetato e propionato pela via policetídica.

ABSTRACT

STUDY OF SEMIOCHEMICALS FROM HARVESTMAN (LANIATORES: ARACHNIDA) BELONGING TO THE FAMILY GONYLEPTIDAE: CHARACTERIZATION, SYNTHESIS AND BIOSYNTHESIS

Harvestmen are arachnids widespread in all continents, with more than 6,000 described species. They secrete a mixture of volatile compounds with the main function of defense against natural predators. The family Gonyleptidae belongs to the suborder Laniatores, is the most diverse in chemistry and morphology and is predominant in Brazil. Therefore, studying the identity and biosynthetic origin of this family exudate components gives phylogenetic information and is a source of new natural products. In this work five species exudate from different subfamilies were characterized. The species *Cobania picea*, *Roeweria virescens* and *Serracutisoma proximum* secrete a mixture of benzoquinones, while *Iporangaia pustulosa* and *Neosadocus maximus* produce 1-hepten-3-one and 1-(6-butyl-3,4-dihydro-2H-piran-2-yl)-pentan-1-one. The latter was described for the first time, and belongs to a new class of harvestman metabolites with piranyl moiety in harvestmen, which were rationalized as the hetero-Diels-Alder adduct of two vinyl ketone molecules. Additionally the absolute configuration of (*R*)-4-methyl-1-hexen-3-one from *Acanthogonyleptes pulcher* and *Gonyleptes saprophilus* was determined. Analogous 4-methyl-3-cetones from insects have *S* configuration. It was also performed the first biosynthetic investigation with harvestmen by ¹³C labeled precursors incorporation and ¹³C NMR. The studied species were *I. pustulosa* and *Magnispina neptunus*, which produce vinyl ketones and benzoquinones, respectively. The results revealed that these chemical classes are biosynthesized with acetate and propionate units via polyketide pathway.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac: acetato

ACP: proteína acil fosfopantetienilada carreadora

AT: aciltransferase

CCD: cromatografia de camada delgada

CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

COSY: *Correlation spectroscopy*

DA: Diels-Alder

DCC: *N, N*-dicicloexilcarbodiimida

DEPT: *distortionless enhancement by polarization transfer*

DH: desidratase

DIC: detector de ionização de chama

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMPU: 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetraidro-2(1*H*)pirimidinona

DMSO: dimetilsulfóxido

EM-EI: espectrometria de massas com ionização de elétrons

EM-IES: espectrometria de massas com ionização de eletrospray

ER: enoil redutase

*g*HMBC: *heteronuclear multiple bond correlation*

*g*HSQC: *heteronuclear single quantum correlation*

HDA: hetero-Diels-Alder

HOMO: *highest occupied molecular orbital*

IV: infravermelho

KR: cetoreductase

KS: β -cetoacilsintase

LUMO: *lowest unoccupied molecular orbital*

n-Bu-Li: *n*-butil-lítio

NOE: *Nuclear Overhauser Effect*

PKS: *polyketidesynthase*

Pr: propionato

RMN: ressonância magnética nuclear

SPME: *solid phase microextraction*

TBDMS-Cl: cloreto de tributildimetilsilano

*t*Bu-Li: *terc*-butil-lítio

TEA: trietilamina

THF: tetraidrofurano

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xxv
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xxvii
ÍNDICE DE TABELAS	xxix
ÍNDICE DE ANEXOS	xxx
1. Introdução.....	1
1.1. Ecologia química de artrópodes	2
1.1.1. Defesa química de artrópodes	3
1.2. Opiliões	4
1.2.1. Estratégias de defesa dos opiliões.....	6
1.2.2. Composição do exudato de opiliões.	8
2. Objetivos.....	11
3. Resultados e discussão	13
3.1. Caracterização química dos componentes do exudato de opiliões	13
3.2. Síntese do dímero da 1-hepten-3-ona (2): 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentan-1-ona (5)	21
3.2.1. Caracterização do novo produto natural 5	26
3.2.2. Quantificação do dímero 5 nos exudatos de <i>Iporangaia pustulosa</i> e <i>Neosadocus maximus</i>	29
3.3. Reação de hetero-Diels-Alder em opiliões	30
3.3.1. Análise de 5 de <i>Iporangaia pustulosa</i> e <i>Neosadocus maximus</i> por cromatografia com coluna quiral.	33
3.3.2. Finalidade da reação de HDA em opiliões	36
3.4. Determinação da configuração absoluta da 4-metil-1-hepten-3-ona (16)	39
3.5. Estudo da biossíntese de semioquímicos de opiliões.....	41

3.5.1. Estudo da biossíntese da vinil cetona 2 em <i>Iporangaia pustulosa</i>	43
3.5.2. Estudo da biossíntese da benzoquinona (41) em <i>Magnispina neptunus</i>	56
3.5.3. Considerações gerais sobre o metabolismo de propionato e metilmalonato em opiliões	62
4. Conclusões	65
5. Perspectivas futuras	67
6- Parte experimental	69
6.1. Equipamentos e métodos.....	69
6.2. Reagentes e solventes.....	71
6.3. Análise das secreções de opilião	72
6.3.1. Coleta das secreções	72
6.3.2. Caracterização química dos componentes do exudato de opiliões	72
6.3.3. Confirmação da estrutura da 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentan-1-ona (5) por co-injeção.....	74
6.3.4. Análise das glândulas	74
6.3.5. Determinação do índice de retenção (IR).....	74
6.3.6. Quantificação do dímero 5 nos indivíduos.	76
6.4. Métodos sintéticos	77
6.4.1. Síntese da 1-hepten-3-ona (2).....	77
6.4.2. Síntese de 5 a partir da 1-hepten-3-ona (2)	78
6.4.3. Síntese de 5 a partir da acroleína	78
6.4.4. Dimerização de 2 para obtenção de 5	80
6.4.5. Determinação da configuração absoluta da 4-metil-1-hepten-3-ona (16)	80
6.5. Estudo da degradação espontânea do dímero 5	82
6.5.1. Preparo das amostras.....	82
6.5.2. Análise de 2 no <i>headspace</i> por SPME em CG-EM	82

6.5.2. Análise de 5 em solução por CG-EM	83
6.6. Estudo da biossíntese de semioquímicos de opiliões.....	83
6.6.1. Coleta e alimentação dos opiliões.....	83
6.6.2. Análise das secreções	85
6.6.3. Síntese do [4- ¹³ C]metilmalonato de sódio	87
7. Anexos	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Algumas espécies de opiliões da subordem Laniatores.....	5
Figura 2. Mecanismos de liberação do exudato de opiliões.”	7
Figura 3. Alguns componentes de exudatos de opiliões pertencentes às diversas subordens.	9
Figura 4. Espécies de opiliões caracterizados quimicamente neste trabalho.....	13
Figura 5. Comparação dos cromatogramas dos exudatos de <i>Iporangaia pustulosa</i> e <i>Neosadocus maximus</i>	15
Figura 6. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 250,13 MHz) da secreção de <i>Iporangaia pustulosa</i> contendo 1-hepten-3-ona (2) como composto majoritário.	16
Figura 7. Cromatogramas das secreções de opiliões contendo benzoquinonas.....	17
Figura 8. Espectros de massas das benzoquinonas 3 e 4	18
Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C (125,7 MHz, CDCl_3 , TMS) do composto 5 proveniente da secreção concentrada de <i>Iporangaia pustulosa</i>	20
Figura 10. Comparação do composto 5 natural e sintético por CG-EM.	26
Figura 11. Comparação do composto 5 natural e sintético por RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125,71 MHz) e RMN de ^1H (CDCl_3 , 499,88 MHz).....	27
Figura 12. Experimento de RMN de ^1H com H-2 seletivamente desacoplado mostrando o multiplete simplificado em 1,56 ppm, atribuído ao H-3 da 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentan-1-ona (5).....	29
Figura 13. Cromatograma mostrando o aduto HDA 5 e dois análogos encontrados na glândula odorífera de <i>Neosadocus maximus</i> em solução de acetato de etila.	31
Figura 14. CG-DIC de A) 5 sintético, B) 5 no exudato de <i>Neosadocus maximus</i> e C) 5 no exudato de <i>Iporangaia pustulosa</i>	34
Figura 15. Cromatograma de CG-DIC da 4-metil-4-hexen-3-ona (16). A) <i>rac</i> - 16 ; B) (<i>S</i>)- 16 ; C) <i>rac</i> e (<i>S</i>)- 16 ; D) amostra natural; E) amostra natural e amostra racêmica.	41
Figura 16. Resultados do experimento de alimentação de indivíduos de <i>Iporangaia pustulosa</i> com [$^{13}\text{C}_3$]propionato. A) Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do exudato contendo 2 como composto majoritário. B) Expansão dos sinais de ^{13}C das posições enriquecidas, mostrando padrões de acoplamento ^{13}C - ^{13}C	45

Figura 17. Espectros de RMN de ^{13}C (125,71 MHz) dos experimentos de biossíntese de 2 em <i>Iporangaia pustulosa</i> em CDCl_3 . As flechas pretas indicam os sinais de referência e as vermelhas indicam as posições enriquecidas.	46
Figura 18. Espectros de RMN de ^{13}C (125,71 MHz) dos experimentos de biossíntese de 2 em <i>Iporangaia pustulosa</i> em benzeno- d_6 . As flechas pretas indicam os sinais de referência e as vermelhas indicam as posições enriquecidas.	48
Figura 19. Estrutura da kirromicina.	55
Figura 20. Biossíntese proposta para 2 , 43 e 44 e cromatograma do exudato de <i>Iporangaia pustulosa</i> sem solvente contendo traços de intermediários biossintéticos análogos ao composto majoritário 2	56
Figura 21. Espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3) do experimento de biossíntese de 41 em <i>Magnispina neptunus</i> . Flechas pretas: sinais de referência. Flechas azuis: posições enriquecidas.	57
Figura 22. Benzoquinonas e hidroquinonas correspondentes encontradas em exudatos de opiliões da família Gonyleptidae.	61
Figura 23. Curva obtida na análise de hidrocarbonetos por CG-EM para determinação do índice de retenção de compostos do exudato de opiliões.	75
Figura 24. Curva de calibração para quantificação de 5 nos exudatos de opiliões.	76
Figura 25. Curva de saturação da fibra de SPME.	83

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Possível dimerização de 2 via hetero-Diels-Alder gerando o pirano 5	19
Esquema 2. Espectro de massas e fragmentação da 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)-pentan-1-ona (5).	20
Esquema 3. Síntese de 2 e as diferentes tentativas de obtenção de 5 via reação de hetero-Diels-Alder.	22
Esquema 4. Proposta de síntese da piranil cetona 5 via acroleína.	23
Esquema 5. Proteção do piranilálcool 12	24
Esquema 6. Novas condições da reação de hetero-Diels-Alder para obtenção de 5	25
Esquema 7. Síntese de 5 via reação de HDA.	26
Esquema 8. Adutos HDA encontrados em opiliões das espécies <i>Gonyleptes saprophilus</i> , <i>Sodreana barbiellini</i> e <i>Sodreana leprevosti</i> , pertencentes à família Gonyleptidae.	30
Esquema 9. Possíveis adutos HDA encontrados formados a partir das vinil cetonas 1 e 2 . As porções em vermelho indicam a molécula que age como hetero-dieno.	31
Esquema 10. Reações realizadas pelas candidatas a Diels-Alderases reportadas na literatura.	35
Esquema 11. Reação realizada pela SpnF, primeira Diels-Alderase reportada na literatura.	36
Esquema 12. Reações hetero-Diels-Alder entre os componentes do exudato de <i>Iporangaia pustulosa</i> e <i>Neosadocus maximus</i>	36
Esquema 13. Degradação espontânea do dímero 5 via retro-hetero-Diels-Alder analisada por CG-EM.	38
Esquema 14. Rota sintética para obtenção da cetona (<i>S</i>)- 16	40
Esquema 15. Esquema geral da biossíntese de policetídeos. KS (β -cetoacilsintase); AT (aciltransferase); ACP (proteína acil fosfopantetienilada carreadora); ER (enoil redutase); DH (desidratase); KR (cetoreductase). Adaptação da referência 53.	42
Esquema 16. Padrão de marcação de 2 obtido pela alimentação de indivíduos de <i>Iporangaia pustulosa</i> com precursores marcados com ^{13}C . Círculos coloridos indicam a posição da marcação. Os círculos verdes indicam enriquecimento esperado e os	

magentas indicam enriquecimento não esperado. O tamanho dos círculos varia de acordo com a intensidade da marcação isotópica.	44
Esquema 17. Esquema geral da rota biossintética proposta para 2 em <i>Iporangaia pustulosa</i> . A) Condensação de propionil-CoA com metilmalonil-CoA; B) Condensação com metilmalonil-CoA; C) Redução, desidratação, redução, hidrólise do tio éster e descarboxilação; D) Desidrogenação.	48
Esquema 18. Rota biossintética proposta para 1-hepten-3-ona (2) em <i>Iporangaia pustulosa</i> a partir da alimentação com [4- ¹³ C]metilmalonato e padrão de marcação isotópica observado.	50
Esquema 19. Metabolismo de [1- ¹³ C]acetato pela rota dos aminoácidos metionina e treonina.	51
Esquema 20. Rota biossintética proposta para 1-hepten-3-ona (2) em <i>Iporangaia pustulosa</i> a partir da alimentação com [1- ¹³ C]acetato e padrão de marcação isotópica observado.	52
Esquema 21. Rota biossintética proposta para 1-hepten-3-ona (2) em <i>Iporangaia pustulosa</i> a partir da alimentação com [1- ¹³ C]glicose e padrão de marcação isotópica observado.	53
Esquema 22. A) Rota biossintética proposta para 2-etil-1,4-benzoquinona (41) em <i>Magnispina neptunus</i> . B) Padrão de marcação isotópica observado a partir da alimentação com [1- ¹³ C]acetato e [4- ¹³ C]metilmalonato. Círculos pretos indicam marcação com ¹³ C. Círculo vermelho indica marcação inesperada.	58
Esquema 23. Biossíntese da unidade iniciadora C ₃ da 2-etil-1,4-benzoquinona (41) em <i>Magnispina neptunus</i>	59
Esquema 24. Rota biossintética proposta para benzoquinonas e fenóis encontrados em opiliões da família Gonyleptidae. Círculos pretos indicam uma unidade acetato descarboxilada.	60
Esquema 25. Aspectos gerais do metabolismo de propionato para <i>Iporangaia pustulosa</i> e <i>Magnispina neptunus</i>	63
Esquema 26. Rota biossintética de vinil cetona e benzoquinona em <i>Iporangaia pustulosa</i> e <i>Magnispina neptunus</i>	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Análise de CG-EM dos exudatos de <i>Cobania picea</i> , <i>Iporangaia pustulosa</i> , <i>Neosadocus maximus</i> , <i>Roeweria virescens</i> e <i>Serracutisoma proximum</i>	14
Tabela 2. Tentativas de aquilação da dupla ligação para obter 9 , intermediário sintético de 5	25
Tabela 3. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) e de ^{13}C (125,7 MHz, CDCl_3 , TMS) da 1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)pentanona (5) sintética e natural.	28
Tabela 4. Análise por CG-EM da composição das glândulas e exudatos de <i>Iporangaia pustulosa</i> e <i>Neosadocus maximus</i> (amostras coletadas de diferentes indivíduos).	32
Tabela 5. Razões da área do monômero 2 / área do dímero 5 analisadas por CG-EM.	37
Tabela 6. CG-EM da degradação do dímero 5 ao longo do tempo.	38
Tabela 7. Marcação isotópica de 1-hepten-3-ona (2) de <i>Iporangaia pustulosa</i> após incorporação de $^{13}\text{C}_3$ propionato.	45
Tabela 8. Marcação da 1-hepten-3-ona (2) por alimentação de <i>Iporangaia pustulosa</i> com substratos marcados com ^{13}C	47
Tabela 9. Marcação da 2-etil-1,4-benzoquinona (41) por alimentação de <i>Magnispina neptunus</i> com precursores marcados com ^{13}C	58
Tabela 10. Análise de hidrocarbonetos por CG-EM para determinação do índice de retenção (IR) dos compostos de exudato de opiliões.	75
Tabela 11. Curva de calibração para quantificação de 5 por CG-EM.	76
Tabela 12. Quantificação de 5 nos exudatos de opiliões.	77
Tabela 13. Detalhes dos parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^{13}C do estudo biossintético com opiliões.	86

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de RMN de ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , CHCl_3) do exudato bruto de <i>Iporangaia pustulosa</i> contendo 1-hepten-3-ona (2) como composto majoritário.....	89
Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 90° e 135° (250 MHz, CDCl_3 , CHCl_3) do exudato bruto de <i>Iporangaia pustulosa</i> contendo 1-hepten-3-ona (2) como composto majoritário.	90
Anexo 3. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 250,13 MHz, CHCl_3) do exudato bruto de <i>Neosadocus maximus</i> contendo 1-hepten-3-ona (2) como composto majoritário.....	91
Anexo 4. Espectro de RMN de ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , CHCl_3) do exudato bruto de <i>Neosadocus maximus</i> contendo 1-hepten-3-ona (2) como composto majoritário.....	92
Anexo 5. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 90° e 135° (250 MHz, CDCl_3 , CHCl_3) do exudato bruto de <i>Neosadocus maximus</i> contendo 1-hepten-3-ona (2) como composto majoritário.	93
Anexo 6. Espectro de EM-IE da 1-hepten-3-ona (2).....	94
Anexo 7. Mapa de contorno do experimento de RMN HSQC ^{13}C - ^1H (CDCl_3 , TMS) da 1-hepten-3-ona (2) sintética. Sinais marcados com * correspondem ao éter etílico utilizado como solvente na síntese de 2.....	95
Anexo 8. Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato bruto de <i>Serracutisoma proximum</i> contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (4) como composto majoritário.....	96
Anexo 9. Espectro de RMN de ^{13}C (125,7 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato bruto de <i>Serracutisoma proximum</i> contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (4) como composto majoritário.....	97
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 90° e 135° (125,7 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato de <i>Serracutisoma proximum</i> contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (4) como composto majoritário.....	98
Anexo 11. Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato de <i>Roweria virescens</i> contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (4) como composto majoritário.	99
Anexo 12. Espectro de RMN de ^{13}C (125,7 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato de	

<i>Roweria virescens</i> contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (4) como composto majoritário.	100
Anexo 13. Espectro de IES-EM da 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentanona (5) natural.	101
Anexo 14. Espectro de RMN de ¹ H (499,89 MHz, CDCl ₃ , TMS) do exudato de <i>Iporangaia pustulosa</i> concentrada, contendo 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentanona (5) como composto majoritário.	102
Anexo 15. Espectro de RMN de ¹³ C – DEPT 90° e 135° (125,7 MHz, CDCl ₃ , TMS) da 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentanona (5) sintética.	103
Anexo 16. Mapa de contorno do experimento de RMN HSQC ¹³ C - ¹ H (CDCl ₃ , TMS) da 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentanona (5) sintética.	104
Anexo 17. Mapa de contorno do experimento de RMN <i>g</i> COSY ¹ H - ¹ H (CDCl ₃ , TMS) da 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentanona (5) sintética.	105
Anexo 18. Espectro de IV (filme) da 1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentanona (5) sintética.	106
Anexo 19. Espectro de EM-IE do 1-(6- <i>H</i> -3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentan-1-ol (12).	107
Anexo 20. Espectro de EM-IE do 1-(6- <i>H</i> -3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentan-1- <i>terc</i> -butildimetilsililoxano (13).	107
Anexo 21. Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 250,13 MHz, TMS) da <i>N</i> -metoxi- <i>N</i> ,2-dimetilbutanamida (39).	108
Anexo 22. Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 62,90 MHz, TMS) da <i>N</i> -metoxi- <i>N</i> ,2-dimetilbutanamida (39).	109
Anexo 23. Espectro de IE-EM da <i>N</i> -metoxi- <i>N</i> ,2-dimetilbutanamida (39).	110
Anexo 24. Espectro de RMN de ¹³ C - DEPT 90° e 135° (CDCl ₃ , 62,90 MHz) da <i>N</i> -metoxi- <i>N</i> ,2-dimetilbutanamida (39).	111
Anexo 25. Espectro de IE-EM da 4 -metil-1-hexen-3-ona (16).	112
Anexo 26. Mapa de contorno do experimento de RMN ¹³ C - ¹ H HMBC (CDCl ₃ , TMS) da 2-etil-1,4-benzoquinona (41).	113
Anexo 27. Expansões do mapa de contorno do experimento de RMN ¹³ C - ¹ H HMBC (CDCl ₃ , TMS) da 2-etil-1,4-benzoquinona (41).	114
Anexo 28. Espectro de RMN de ¹³ C (62,9 MHz, D ₂ O, CCl ₄) do [4- ¹³ C]metilmalonato de	

sódio.	115
Anexo 29. Espectro massas de ionização por eletron spray de alta resolução do [4- ¹³ C]metilmalonato de sódio.	116

1. Introdução

Os produtos naturais despertam o interesse dos químicos há séculos, devido as suas aplicações como medicamentos, corantes, pesticidas, aromas e fragrâncias. Porém, explorar as razões da existência natural de tais compostos, também chamados de metabólitos secundários, já é um interesse mais recente. Hoje é amplamente conhecido que alguns dos metabólitos secundários regulam sistemas biológicos, servindo de sinalizadores moleculares, ou semioquímicos (do grego, *semeion* = sinal).¹

Os semioquímicos desempenham funções vitais para seus emissores, e às vezes, para os organismos que recebem este sinal químico. Podem funcionar como agentes de *quorum sensing* entre bactérias, atrativos de gametas para fungos e algas, feromônios sexuais e de alarme para insetos, atrativos de polinizadores de plantas e ainda como defesa química contra predadores naturais. O conhecimento da estrutura dos semioquímicos, assim como da rota biossintética para sua obtenção, pode ajudar na elucidação da informação química que está sendo transmitida.¹

Quase todos os organismos utilizam a sinalização química, de bactérias a mamíferos,² e os semioquímicos são divididos de acordo com sua ação. Os feromônios envolvem comunicação intraespecífica, como feromônios sexuais, de trilha e de alarme. Os aleloquímicos compreendem comunicação interespecíes e são subdivididos de acordo com o benefício ao emissor: os alomônios, como compostos de camuflagem e defesa, são benéficos ao emissor; os cairomônios, como sinais de seleção de presas, são benéficos somente ao receptor; e finalmente os sinomônios, envolvidos em interações simbióticas, beneficiam a ambos.² Embora esta classificação seja eficiente, alguns compostos podem apresentar mais de uma ação biológica, como as 1,4-benzoquinonas produzidas pelo besouro *Melontha hippocastani*, que atuam como feromônios sexuais e também como defesa química contra micro-organismos.³ É

¹ Meinwald, J. *J. Nat. Products* **2011**, *74*, 305–309

² Francke, W.; Schulz, S. Pheromones. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Vol. 8 - *Miscellaneous Natural Products Including Marine Natural Products, Pheromones, Plant Hormones, and Aspects of Ecology*. Amsterdam: Pergamon Press, **1999**, 197-261

³ Ruther, J.; Podsiadlowski, L.; Hilker, M. *Chemoecology* **2001**, *11*, 225-229

importante finalizar este parágrafo comentando que existe também a sinalização química entre células de um mesmo organismo através dos hormônios, assunto que não será abordado neste trabalho.

Ecologia química é a disciplina que estuda estes sistemas de informação química, abordando tanto a estrutura das moléculas envolvidas, quanto à informação que é transmitida.⁴ Contudo, esta é uma área em constante expansão, considerada um dos maiores desafios da química de produtos naturais.¹

1.1. Ecologia química de artrópodes

Os artrópodes pertencem a um filo de animais formados pelos grupos Crustacea (caranguejos, lagostas, camarões e outros), Chelicerata (aranhas, carrapatos, ácaros, opiliões, escorpiões e outros), Miriapoda (milípedes, centípedes e outros) e finalmente, Hexapoda ou Insecta (formigas, besouros, percevejos e outros). Eles foram os primeiros organismos a emergir do mar e, embora sejam taxonomicamente separados, muitos aspectos de seu desenvolvimento são comuns, permitindo algumas comparações entre os insetos e outros artrópodes. Um exemplo desta convergência é a similaridade entre a defesa química de aranhas, milípedes e opiliões e a dos insetos.⁵

Para sobreviverem, os artrópodes produzem diversos semioquímicos que regulam suas interações inter- e intraespecíficas, como defesa contra predadores e infecções, na comunicação e socialização, no funcionamento do seu ciclo de vida e ainda enfrentando obstáculos impostos pelas condições ambientais.⁶ A maior parte dos semioquímicos de artrópodes são moléculas pequenas, relativamente voláteis e são facilmente levados pelo ar ou pela água até alcançar o receptor.¹ Os semioquímicos de artrópodes apresentam ampla variedade estrutural e são construídos a partir da combinação de poucos blocos construtores e rotas biossintéticas parecidas, mantendo o arsenal enzimático quase inalterado ao longo da história evolutiva destes animais.⁵

⁴ Eisner, T.; Meinwald, J. Preface In: *Chemical Ecology: The Chemistry of Biotic Interaction*. Washington: National Academy Press, **1995**.

⁵ Morgan, E. D. *Biosynthesis in Insects – Advanced Edition*. Cambridge: RSC Publishing, **2010**, 1-10

⁶ Dossey, A. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1737–1757

Segundo Meinwald e Eisner, pioneiros da ecologia química, este foi o diferencial que permitiu a posição dominante dos insetos e artrópodes relacionados, que possuem maior diversidade em número de espécies quando comparados aos outros organismos.⁷

O estudo químico e biossintético dos metabólitos secundários de artrópodes é uma fonte rica de informações, devido à grande variedade de espécies ainda por serem desvendadas, e fornece informações bioquímicas, ecológicas, e biotecnológicas que são úteis na busca por novos medicamentos e compostos bioativos,⁶ assim como na organização taxonômica⁸ e ecológica¹ destes invertebrados.

A maior parte do conhecimento de ecologia química de artrópodes se trata de feromônios e origina da elucidação química e/ou comportamental de mais de 1500 espécies de insetos, sendo previsto que existam mais de 875.000 no total. A maioria dos estudos de elucidação estrutural e biossíntese de metabólitos secundários de artrópodes visa espécies de interesse econômico, como pragas agrícolas,⁹ além de considerar a disponibilidade do espécime na natureza, a quantidade de metabólitos produzida e a possibilidade de criação em laboratório, já que trabalhar com quantidades escassas de material para caracterização química e testes biológicos é um dos principais desafios da ecologia química.⁶ Estes fatores fazem dos estudos com insetos muito mais abundantes na literatura quando comparados com os de aracnídeos e de outros artrópodes produtores de venenos, exudatos repelentes e feromônios.⁵

1.1.1. Defesa química de artrópodes

A defesa química engloba substâncias que protegem o emissor contra predação, ataque ou infecção. Entre os animais terrestres, o grupo dotado de defesa química mais diversificada é o dos artrópodes, que geralmente produz moléculas simples, porém, eficientes.⁷ Embora fascinante, esta modalidade de defesa dos artrópodes começou a

⁷ Meinwald, J.; Eisner, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 14-18

⁸ Reynolds, T. *Phytochemistry* **2007**, 2887-2895

⁹ Tillman, J. A.; Seybold, S. J.; Jurenka, R. A.; Blomquist, G. J. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *29*, 481-514

ser explorada apenas nos anos 1950, por Eisner, Meinwald e Blum nos EUA, Schildknecht na Alemanha e Pavan na Itália.¹⁰

O estudo dos semioquímicos de defesa, assim como de produtos naturais em geral, envolve a caracterização estrutural; síntese química para confirmar a identidade da molécula e obter quantidades suficientes e puras para testes biológicos; e ocasionalmente estudos biossintéticos e de bioatividade, como repelência e toxicidade. Geralmente, o maior desafio é obter uma amostra natural pura em quantidade suficiente para identificação, já que muitas vezes os compostos são produzidos em pouca quantidade, na forma de misturas e podem se degradar quando utilizados métodos cromatográficos, ou mesmo em contato com oxigênio. Os compostos podem estar concentrados em glândulas passíveis de “ordenha” ou distribuídos na hemolinfa, obrigando a obtenção dos mesmos através do extrato total do indivíduo.

Classes químicas comuns de defensivos de artrópodes são aldeídos, ácidos, fenóis e benzoquinonas, mas também são encontrados esteroides e alcaloides, que possuem a estrutura mais complexa. Além de moléculas defensivas repelentes e irritantes, alguns artrópodes produzem moléculas de ataque, como as neurotoxinas que em aranhas e vespas são constituídas de poliaminas, glicosídeos sulfatados e peptídeos.^{7,11}

1.2. Opiliões

Os opiliões são aracnídeos (Arachnida, Opiliones) que apresentam corpo compacto, oito pernas longas e duas glândulas odoríferas laterofrontais no cefalotórax. Quando sofrem distúrbio, os opiliões liberam secreções por estas glândulas, podendo conter várias substâncias voláteis de odor forte e característico, indicando que sua função seja de defesa química (Figura 1). Estas características são refletidas nos nomes populares deste aracnídeo que, no mundo todo, tem relação com suas pernas longas ou com o cheiro forte da sua secreção. No Brasil, os opiliões são conhecidos

¹⁰ Laurent, P.; Braekman, J. C.; Daloze, D. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *240*, 167-229

¹¹ Blum, M. S. *Ann. Rev. Entomol.* **1987**, *32*, 381-413

como aranha fedida, pois são muito semelhantes a estes outros aracnídeos.¹²



Gagrellinae
(Sclerosomatidae)



Iporangaia pustulosa
(Gonyleptidae)



Ampheres leucopheus
(Gonyleptidae)



Leiobunum royali
(Sclerosomatidae)



Acutisoma longipes
(Gonyleptidae)

Figura 1. Algumas espécies de opiliões da subordem Laniatores.¹³

Opiliões têm hábitos discretos, vivendo em locais escuros e úmidos, como cavernas, embaixo de pedras e na vegetação. Têm atividade noturna e ficam escondidos durante o dia. Orientam-se principalmente tateando com o segundo par de pernas, que é mais alongado do que os outros. São onívoros, mas se alimentam principalmente de restos de outros animais. Podem ser susceptíveis a ataques de predadores naturais e a infecções microbianas, devido aos seus hábitos alimentares.¹²

Embora pouco conhecidos, os opiliões constituem a terceira maior ordem de aracnídeos, logo depois das ordens Acari (ácaros e carrapatos) e Araneae (aranhas). Apresentam-se em mais de 6000 espécies, que são distribuídas em todos os

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

¹³ Fotos do Prof. Dr. Glauco Machado. Algumas estão disponíveis em <http://ecologia.ib.usp.br/opilio/photo.html>, acessado em 16/04/2013

continentes e divididas em 4 subordens. Cyphophthalmi é a subordem mais antiga, com 6 famílias e 130 espécies, e seus indivíduos são muito pequenos, com corpo de até 1 mm de diâmetro. Eupnoi é dividida em 6 famílias e 1780 espécies, que têm como características o corpo mole e pernas bem longas. Dyspnoi é dividida em 7 famílias e 290 espécies, características do hemisfério norte. E finalmente, Laniator é a subordem com maior diversidade química, morfológica e comportamental, predominante das zonas tropicais do hemisfério sul, com 26 famílias e 3748 espécies.¹⁴ Os espécimes liberam substâncias pelas glândulas laterofrontais características das subordens, fazendo do estudo destas secreções uma ferramenta importante na construção da filogenia deste aracnídeo,^{15,16,17}

1.2.1. Estratégias de defesa dos opiliões

Os opiliões são animais pacatos, mas possuem diversos inimigos naturais, como os predadores. Pássaros, mamíferos, aranhas, sapos e formigas se alimentam destes aracnídeos, que por sua vez, desenvolveram diversas estratégias de defesa. Estas estratégias visam evitar o encontro com o predador, como a coloração críptica ou camuflagem, ou ainda aumentar as chances de sobrevivência em caso de encontro, quando o predador não detecta ou não reconhece o opilião. A resposta pode ser também evasiva, como fingir-se de morto (tanatose), vibrar as pernas rapidamente para confundir o predador (*leg bobbing*) ou perder voluntariamente uma perna, que mantém movimento rítmico enquanto o opilião foge (autotomia). Pode ainda haver a retaliação, quando o opilião utiliza armamentos físicos, como pedipalpos e quelicera, ou a liberação de defesas químicas, liberadas pelas glândulas odoríferas.¹⁸

¹⁴ Eisner, T.; Alsop, D.; Meinwald, J. Secretions of opilionids, whip scorpions and pseudoscorpions. In: *Handbook of Experimental Pharmacology (Arthropod Venoms)*, vol. 48. Berlim: Springer-Verlag, **1978**, 87–99

¹⁵ Hara, M. R.; Cavalheiro, A. J.; Gnaspini, P.; Santos, D. Y. A. C. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 1210-1225

¹⁶ Raspotnig, G. *Biol. Serbica* **2012**, *34*, 5-18

¹⁷ Caetano, D. S.; Machado, G. *Cladistics* **2013**, doi: 10.1111/cla.12009

¹⁸ Gnaspini, P.; Hara, M. R. In: *Harvestmen: the Biology of Opiliones*. Eds. Pinto-da-Rocha, R.; Machado, G.; Giribet, G. Harvard: University Press, **2007**, 334-399

A defesa química é o mecanismo mais estudado entre os opiliões, e o mais eficiente para as subordens Cyphophtalmi e Laniator. Entre os Laniatores, a secreção pode ser diluída no fluido entérico, que é regurgitado e escorre por canaletas pelo corpo do opilião até alcançar as glândulas odoríferas (Figura 2-A). Esta diluição é desejável, pois a produção dos compostos tem alto custo energético. Além disso, algumas moléculas são instáveis em solução aquosa, como a benzoquinonas, e não podem ser armazenadas em meio aquoso. A liberação também pode ocorrer sem diluição, quando a mistura de componentes voláteis forma uma gota de exudato sobre a glândula odorífera (Figura 2-B). De qualquer maneira, após a formação do glóbulo de exudato, forma-se um escudo químico, onde a secreção é lentamente volatilizada. Algumas espécies aplicam o exudato no agressor com o segundo par de pernas ou liberam-na em forma de jatos, que podem ser direcionados ao predador (Figura 2-C).¹⁸

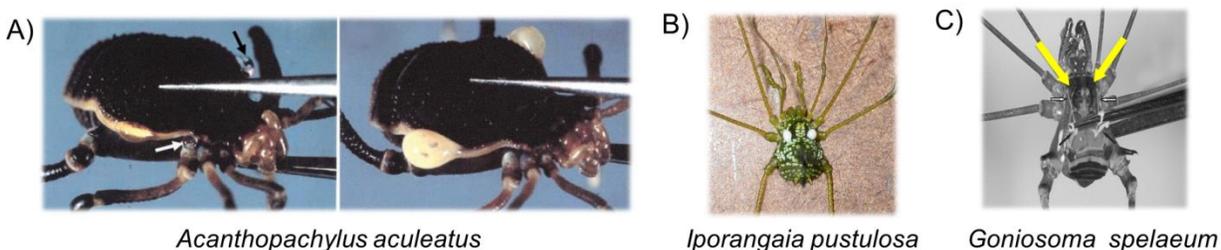


Figura 2. Mecanismos de liberação do exudato de opiliões.^{22,13,23}

O primeiro estudo químico com secreções de opiliões foi realizado nos anos 1950, identificando benzoquinonas com atividade antibacteriana no Laniator *Acantopachylus aculeatus*.¹⁹ Em 1975, foi relatada a atividade antifúngica de 4-metil-1-heptanona, um componente comum a opiliões da sub-ordem Eupnoi.²⁰ Desde então, a secreção de defesa se mostrou efetiva também contra predadores naturais, como formigas e algumas espécies de sapos, aranhas, lagartos e aranhas, embora alguns predadores, como pequenos mamíferos, sintam irritação sem desistir da presa.^{21,22,23}

¹⁹ a) Estable, C.; Ardao, M. I.; Brasil, N. P.; Fieser, L. F. *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4942; b) Fieser, L. F.; Ardao, M. I. *J. Amer. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 774-781

²⁰ Cole, L. K.; Blum, M. S.; Roncadori, R. W. *Mycologia* **1975**, *67*, 701-708

²¹ Duffield, R. M.; Olubajo, O.; Wheeler, J. W.; Shear, W. A. *J. Chem. Ecol.* **1981**, *7*, 445-452

²² Machado, G.; Carrera, P. C.; Pomini, A. M.; Marsaioli, A. J. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 2519-2539

Além da proteção contra inimigos naturais, agregação e alarme também já foram relatados como função biológica destas secreções.²⁴

1.2.2. Composição do exudato de opiliões.

Até 2012, representantes de todas as subordens já haviam sido caracterizados quimicamente, totalizando 85 espécies e mais de 70 compostos pertencentes a diferentes classes químicas. A composição varia apresentando exudatos com um único composto, o que é raro, a misturas de até 20 substâncias.¹⁶ De maneira geral, naftoquinonas²⁵ e compostos acíclicos como etil e metil cetonas^{25b,25c,25e,26} são característicos de Cyphophthalmi, Eupnoi e Dyspnoi. Os Laniatores apresentam uma ampla diversidade química, e podem ser divididos em Insidiatores, que produzem compostos nitrogenados^{16,27} e terpenos,^{27a} enquanto os Grassatores produzem fenóis^{15,21,28} e benzoquinonas,^{15,23,28a,28b,28c,29} juntamente com vinil cetonas e diidropiranos^{15,30} (Figura 3). Ainda não foi estabelecida uma ligação entre a química dos

²³ Eisner, T.; Rossini, C.; Gonzalez, A.; Eisner, M. *J. Exp. Biol.* **2004**, *207*, 1313-1321

²⁴ Machado, G.; Bonato, V.; Oliveira, P. S. *Naturwissenschaften* **2002**, *89*, 357-360

²⁵ a) Wiemer, D. F.; Hicks, K.; Meinwald, J.; Eisner, T. *Experientia* **1978**, *34*, 969-970; b) Raspotnig, G.; Fauler, G.; Leis, M.; Leis, H. J. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 1353-1368; c) Jones, H. J.; Shear, W. A.; Giribet, G. *J. Arachnol.* **2009**, *37*, 147-150; d) Raspotnig, G.; Leutgeb, V.; Schaidler, M.; Komposch, C. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36*, 158-162; e) Raspotnig, G.; Schwab, J.; Karaman, I. *J. Chem. Ecol.* **2012**, *38*, 437-440

²⁶ a) Blum, M. S.; Edgar, A. L. *Insect Biochem.* **1971**, *1*, 181-188; b) Meinwald, J.; Kluge, A. F.; Carrel, J. E.; Eisner, T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1467-1468; Jones, T. H.; Conner, W. E.; Kluge, A. F.; Eisner, T.; Meinwald, J. *Experientia* **1976**, *32*, 1234-1235; c) Jones, T. H.; Meinwald, J.; Hicks, K.; Eisner, T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 419-422; d) Ekpa, O.; Wheeler, J. W.; Cokendolpher, J. C.; Duffield, R. M. *Comp. Biochem. Physiol.* **1985**, *81B*, 555-557

²⁷ a) Ekpa, O.; Wheeler, J. W.; Cokendolpher, J. C.; Duffield, R. M. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 1315-1318; b) Raspotnig, G.; Schaidler, M.; Föttinger, P.; Komposch, C.; Karaman, I. *J. Chem. Ecol.* **2011**, *37*, 912-921

²⁸ a) Eisner, T.; Jones, T. H.; Hicks, K.; Silberglied, R. E.; Meinwald, J. *J. Chem. Ecol.* **1977**, *3*, 321-329; b) Roach, B.; Eisner, T.; Meinwald, J. *J. Chem. Ecol.* **1980**, *6*, 511-516; c) Acosta, L. E.; Poretti, T. I.; Mascarelli, P. E. *Bonn. Zool. Beitr.* **1993**, *44*, 19-31; d) Pomini, A. M.; Machado, G. *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, *36*, 369-376; e) Shear, W. A.; Jones, T. H.; Snyder, A. J. *Bull. British Arachnol. Soc.* **2010**, *15*, 27-28; f) Shear, W. A.; Snyder, A. J.; Jones, T. H.; Garaffo, H. M.; Andriamaharavo, N. R. *J. Arachnol.* **2010**, *38*, 126-127; g) Pomini, A. M.; Machado, G.; Pinto-da-Rocha, R.; Macías-Ordóñez, R.; Marsaioli, A. J. *Bioch. Syst. Ecol.* **2010**, *38*, 300-308

²⁹ a) Gnaspini, P.; Cavalheiro, A. J. *J. Arachnol.* **1998**, *26*, 81-90; b) Föttinger, P.; Acosta, L. E.; Leis, H.; Raspotnig, G. *J. Arachnol.* **2010**, *38*, 584-587

³⁰ Rocha, D. F. O.; Hamilton, K.; Gonçalves, C. C. S.; Machado, G.; Marsaioli, A. J. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 658-663

Laniatores com a das outras subordens de opiliões, já que ainda há muitos táxons a serem explorados quimicamente, e estas informações podem ser partes importantes deste quebra-cabeça. O estudo da secreção de opiliões é bastante desafiador para biólogos e químicos, já que é uma fonte de novos produtos naturais amplamente inexplorada e com uma grande diversidade estrutural entre as subordens, além de ser uma ferramenta que relaciona a taxonomia e a filogenia.¹⁶

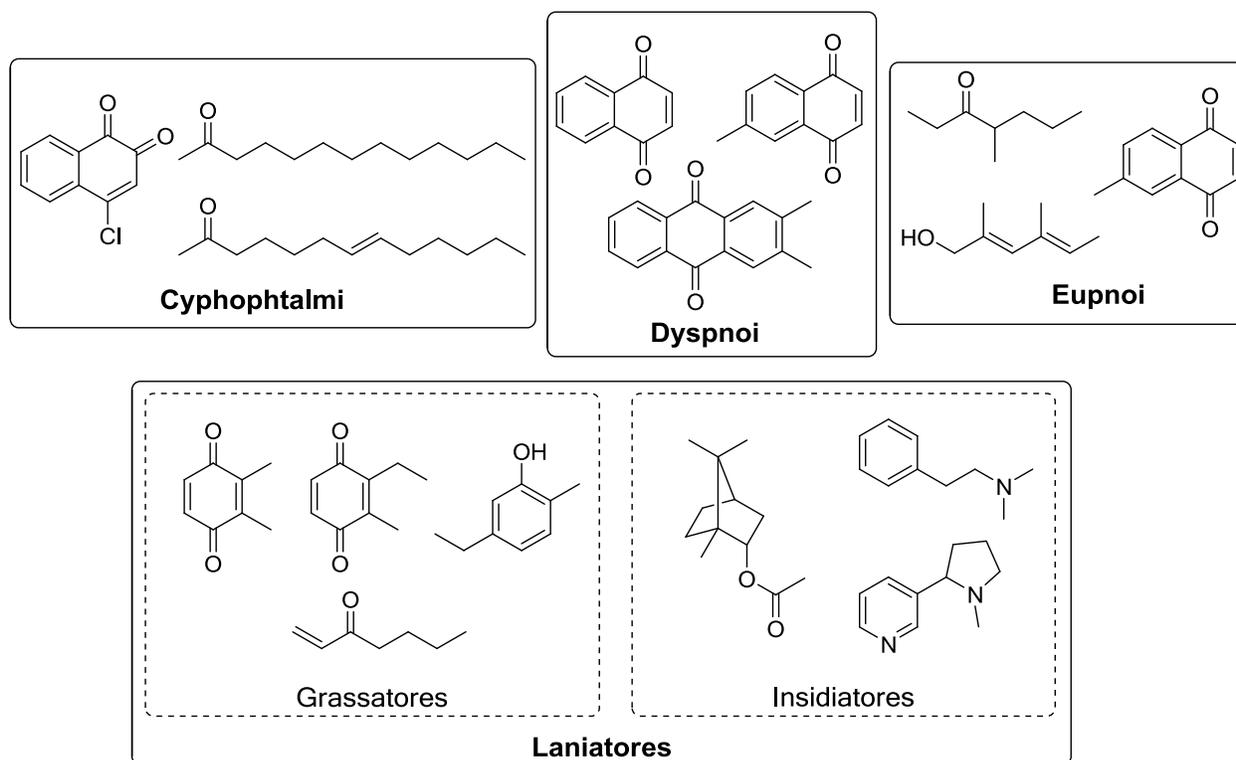


Figura 3. Alguns componentes de exudatos de opiliões pertencentes às diversas subordens.

A subordem Laniatores é a mais estudada, porém, é a que apresenta características mais diversas e maior número de espécies. Dentro desta subordem, a superfamília Gonyleptoidea (infra-ordem Grassatores) compreende 97,5% das espécies brasileiras, e está distribuída desde o sul da América do Sul até o norte da América Central.¹⁵ Possui cerca de 820 espécies descritas, com 16 subfamílias¹⁷ e compreende

aproximadamente 13% de todas as espécies de opiliões.³¹ A maior parte das publicações é sobre opiliões da família Gonyleptidae, e recentemente, as informações ecológicas, comportamentais e químicas foram aplicadas na construção da filogenia desta família, definindo padrões evolucionários entre os membros deste grupo.¹⁷

Na maioria dos trabalhos, os compostos das secreções foram detectados e caracterizados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), às vezes sem completa determinação estrutural de vários compostos e seus isômeros.¹⁶ Apesar das informações disponíveis sobre a identidade dos componentes das secreções de várias espécies, os diferentes mecanismos de liberação e a morfologia da glândula odorífera, a defesa química desta subordem ainda possui muitas lacunas a serem exploradas.¹⁸ Um exemplo é a origem biossintética dos compostos do exudato, que pode fornecer informações sobre as relações evolucionárias entre as espécies de opiliões. Apesar da relevância destes compostos, suas rotas biossintéticas nunca foram propostas com base em evidências experimentais.³²

³¹ Kury, A. B. *Rev. Iber. Aracnol.* **2003**, (vol. Especial monografico) *1*, 1–325

³² Morgan, E.D. *Biosynthesis in Insects- Advanced Edition*. Cambridge: RSC Publishing, **2010**, 147-178

2. Objetivos

O objetivo geral desta tese foi analisar quimicamente várias espécies da família Gonyleptidae pertencentes a diferentes subfamílias, visando a melhor compreensão da química destes produtos naturais. Para tanto, os objetivos específicos são:

- Caracterização química dos exudatos de cinco espécies de opiliões: *Cobania picea* (Cobaniinae), *Iporangaia pustulosa* (Progonyleptoidellinae), *Neosadocus maximus* (Gonyleptinae), *Roeweria virescens* (Pachylinae), e *Serracutisoma proximum* (Goniosomatinae).
- Síntese de compostos relevantes encontrados nestes exudatos.
- Determinação da configuração absoluta da 4-metil-1-hexen-3-ona, componente do exudato de *Acanthogonyleptes pulcher* e *Gonyleptes saprophilus* (Gonyleptinae), previamente caracterizados.
- Estudo das rotas biossintéticas de 1-hepten-3-ona e 2-etil-1,4-benzoquinona através de alimentação de *Iporangaia pustulosa* e *Magnispina neptunus*, respectivamente, com precursores marcados com ^{13}C .

3. Resultados e discussão

Esta tese foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Glauco Machado, do Instituto de Biociências da USP - São Paulo, o qual é responsável pela coleta e identificação dos opiliões, e extração dos exudatos.

3.1. Caracterização química dos componentes do exudato de opiliões

As secreções de cinco espécies de opiliões da família Gonyleptidae foram caracterizadas quimicamente: *Cobania picea* (Cobaniinae), *Iporangaia pustulosa* (Progonyleptoidellinae), *Neosadocus maximus* (Gonyleptinae), *Roeweria virescens* (Pachylinae) e *Serracutisoma proximum* (Goniosomatinae) (Figura 4). Os exudatos de *I. pustulosa*, *N. maximus* e *R. virescens* haviam sido estudados apenas por CG-EM,¹⁵ e não haviam publicações com a composição do exudato de *S. proximum* e *C. picea*. As secreções das cinco espécies foram caracterizadas por CG-EM e ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C. As espécies estudadas foram divididas em dois grupos, um contendo cetonas e outro grupo contendo benzoquinonas como compostos majoritários (Tabela 1), o que é condizente com as classes comumente encontradas em opiliões Laniatores da infra-ordem Grassatores. Adicionalmente, foi identificada uma classe não descrita antes em opiliões.



Figura 4. Espécies de opiliões caracterizados quimicamente neste trabalho.

Tabela 1. Análise de CG-EM dos exudatos de *Cobania picea*, *Iporangaia pustulosa*, *Neosadocus maximus*, *Roeweria virescens* e *Serracutisoma proximum*.

Composto	Índice de retenção	Íons característicos (m/z)	Espécies	Abundância relativa ^a
	758	112[M ⁺], 97, 84, 70, 55, 41	<i>N. maximus</i>	1,7%
	801	112[M ⁺], 97, 83, 70, 55, 41	<i>I. pustulosa</i> <i>N. maximus</i>	79,0% 79,2%
	1098	136[M ⁺], 107, 82, 79, 65, 54	<i>I. pustulosa</i> <i>N. maximus</i> <i>S. proximum</i> <i>R. virescens</i> <i>C. picea</i>	3,0% 2,0% 67,1% 72,0% 57,0%
	1185	150[M ⁺], 122, 121, 107, 82, 79, 67, 54	<i>I. pustulosa</i> <i>S. proximum</i> <i>R. virescens</i> <i>C. picea</i>	4,4% 32,9% 28,0% 43,0%
	1691	224[M ⁺], 139, 182, 97, 95, 85, 79, 69, 55, 41	<i>I. pustulosa</i> <i>N. maximus</i>	13,6% 15,6%
Não identificado	1858	156[M ⁺], 155, 127, 85, 57, 55, 42, 41	<i>N. maximus</i>	1,5%

^a *C. picea* (N= 15), *I. pustulosa* (N= 22), *N. maximus* (N= 39), *R. virescens* (N= 2), *S. proximum* (N= 5); medida realizada com o conjunto de indivíduos de cada espécie

As espécies *I. pustulosa* e *N. maximus* secretam vinil cetonas como compostos majoritários. Ambas as secreções têm 1-hepten-3-ona (**2**) como componente majoritário e apresentaram o composto **5** em menor abundância (Figura 5). O RMN de ¹H da secreção de *I. pustulosa*, contendo a cetona **2** como componente majoritário (Figura 6), foi caracterizado pela presença de um tripleto em δ 0,91 ppm, relativo a 3 hidrogênios,

confirmando que o composto natural não é ramificado.³³ O espectro de massas de **2** (Anexo 6) apresenta um pico base de m/z 55, proveniente da clivagem α , e o pico de m/z 70, proveniente do rearranjo de McLafferty. A composição do exudato de *N. maximus* já foi descrita na literatura contendo 5-metil-1-hexen-3-ona (**1**) como componente majoritário,¹⁵ enquanto encontramos apenas 1,5% desse composto em nossas análises.

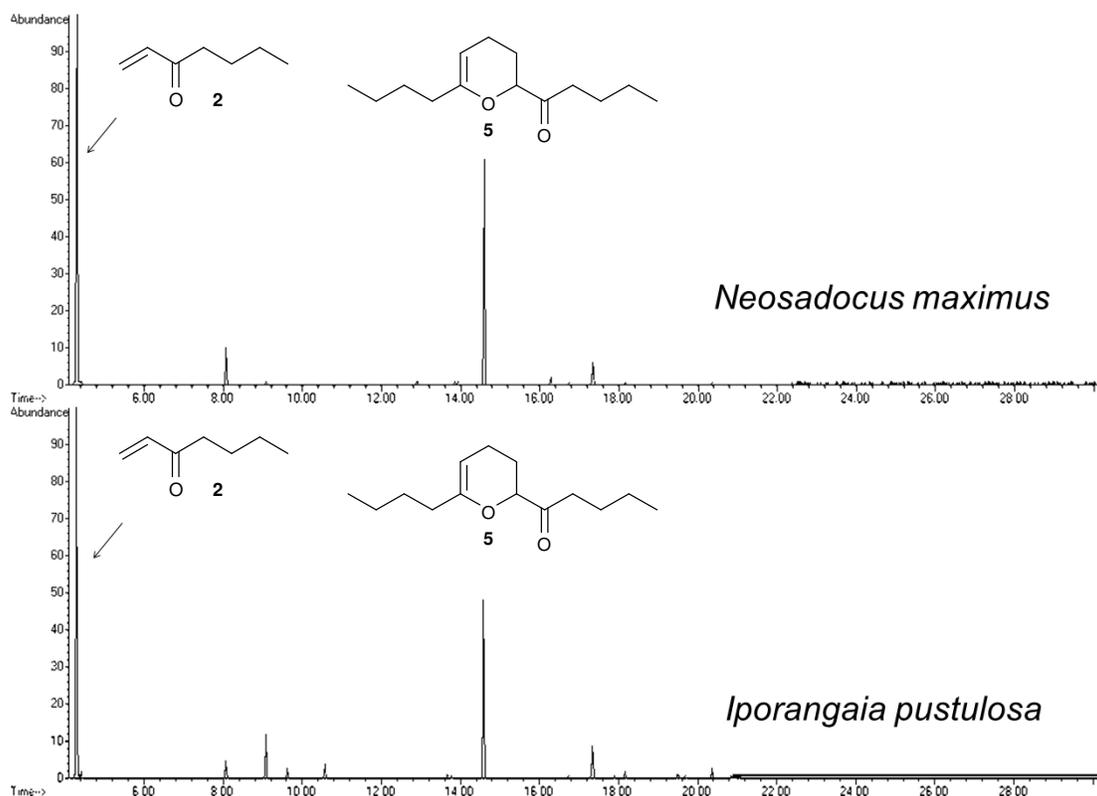


Figura 5. Comparação dos cromatogramas dos exudatos de *Iporangaia pustulosa* e *Neosadocus maximus*.

³³ A cetona **2** já foi caracterizada: Hesse, M.; Vavrecka, von M. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 438-444

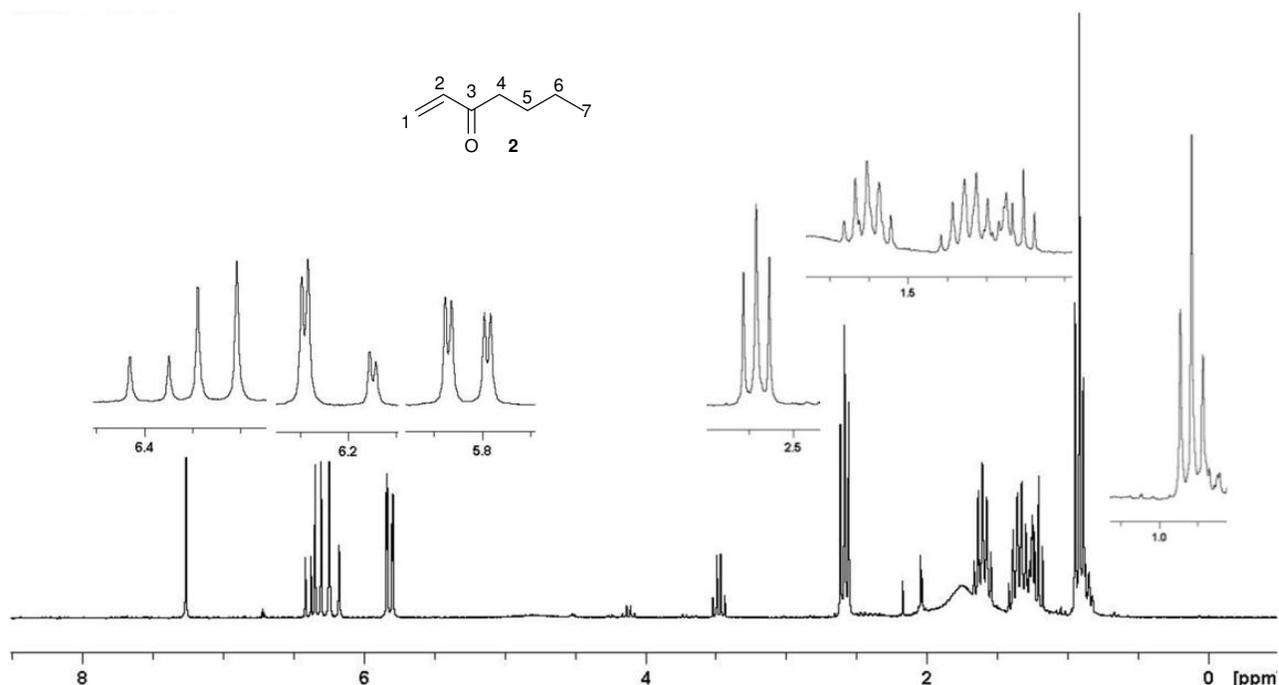


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 250,13 MHz) da secreção de *Iporangaia pustulosa* contendo 1-hepten-3-ona (**2**) como composto majoritário.

As espécies *C. picea*, *S. proximum* e *R. virescens* secretam misturas de 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona (**3**) e 2-etil-3-metil-1,4-benzoquinona (**4**) (Figura 7, Tabela 1). As benzoquinonas **3** e **4** já foram relatadas no opilião *Goniosoma longipes*,²² e os espectros de massas e de RMN foram condizentes com os da literatura. Os espectros de massas de **3** e **4** têm o pico de m/z 54 intenso, indicando a substituição em apenas um lado do anel (Figura 8). A presença do grupo etil na benzoquinona **4** foi evidenciada pelo sinal de CH_2 em 12,8 ppm no espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) (Anexo 10). Entre os Laniatores, principalmente na família Gonyleptidae, as secreções de defesa são compostas por misturas de até 7 substâncias, geralmente benzoquinonas e fenóis alquilados.¹⁸

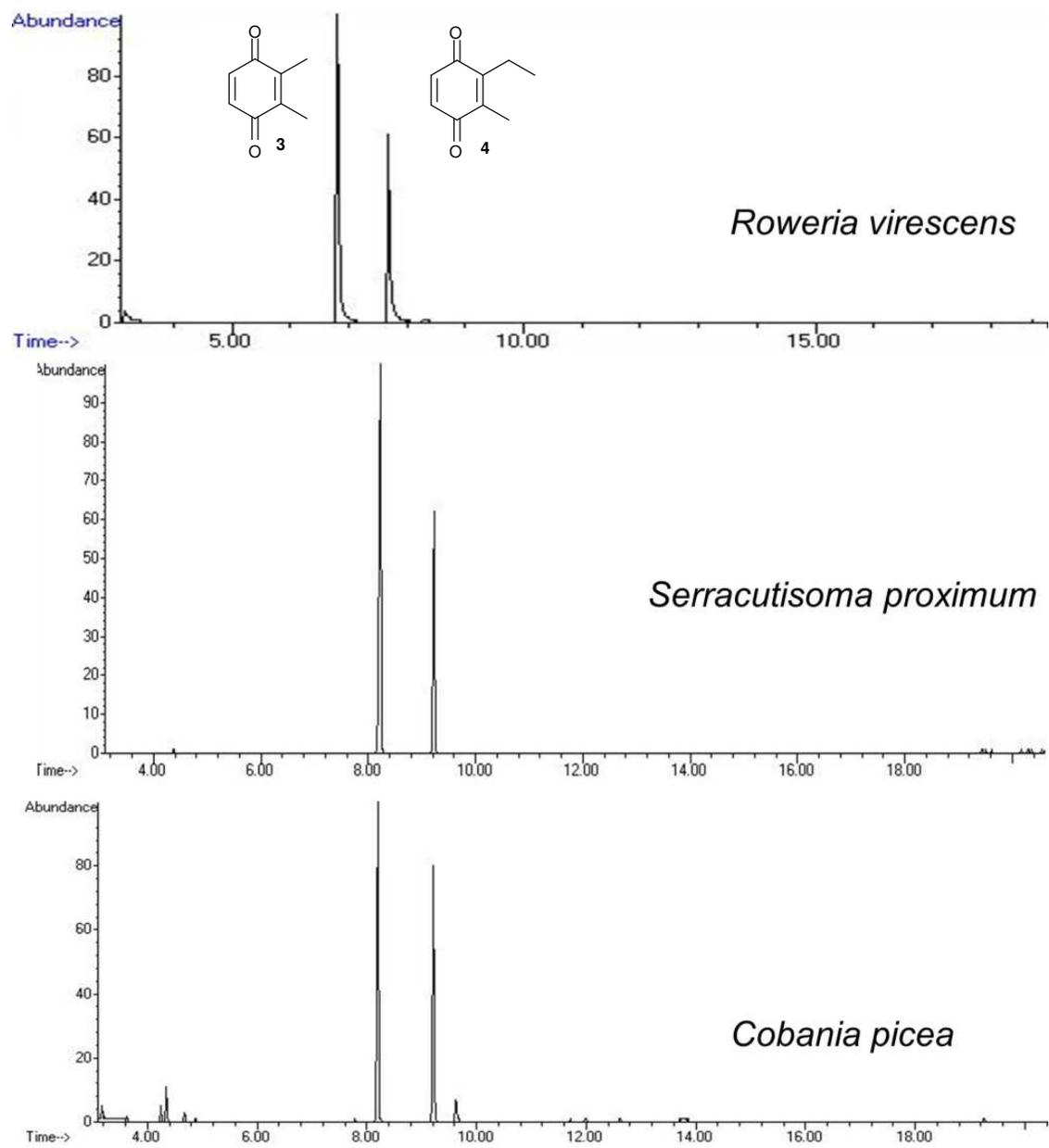


Figura 7. Cromatogramas das secreções de opiliões contendo benzoquinonas.

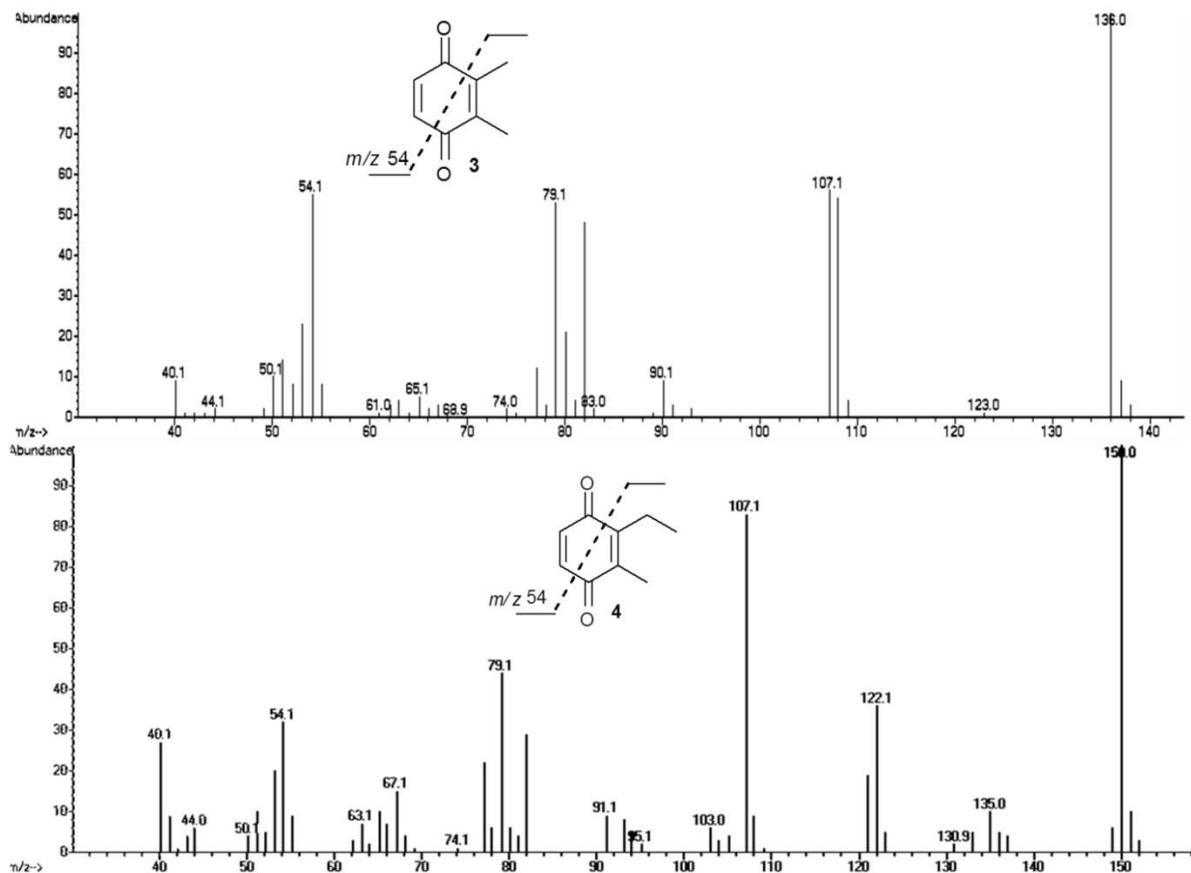
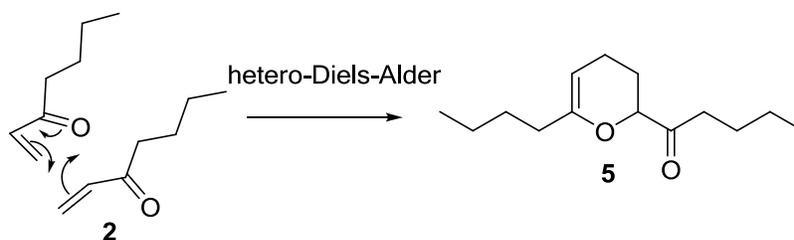


Figura 8. Espectros de massas das benzoquinonas **3** e **4**.

Nos exudatos de *I. pustulosa* e *N. maximus* foi detectado o composto **5**, de íon molecular de m/z 224, juntamente com a vinil cetona **2** (Figura 5). Uma análise mais detalhada do seu espectro de massas revelou que o mesmo possuía um íon molecular e fragmentação coerente com um dímero de **2**, com o dobro da massa molar (112 g.mol^{-1}). A dimerização de **2** poderia ocorrer via uma cicloadição [4+2] de Diels-Alder (DA), que depende da sobreposição de orbitais π de dois sistemas insaturados, um dienófilo e um 1,3-dieno para formar um anel de seis membros de maneira concertada, chamado aduto. Quando a reação DA envolve heteroátomos, a mesma é denominada de hetero-Diels-Alder (HDA). O aduto formado em uma reação de HDA pode ser um derivado piranil como o sugerido para o esqueleto do composto **5** (Esquema 1).³⁴

³⁴ Jørgensen, K. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2093-2102



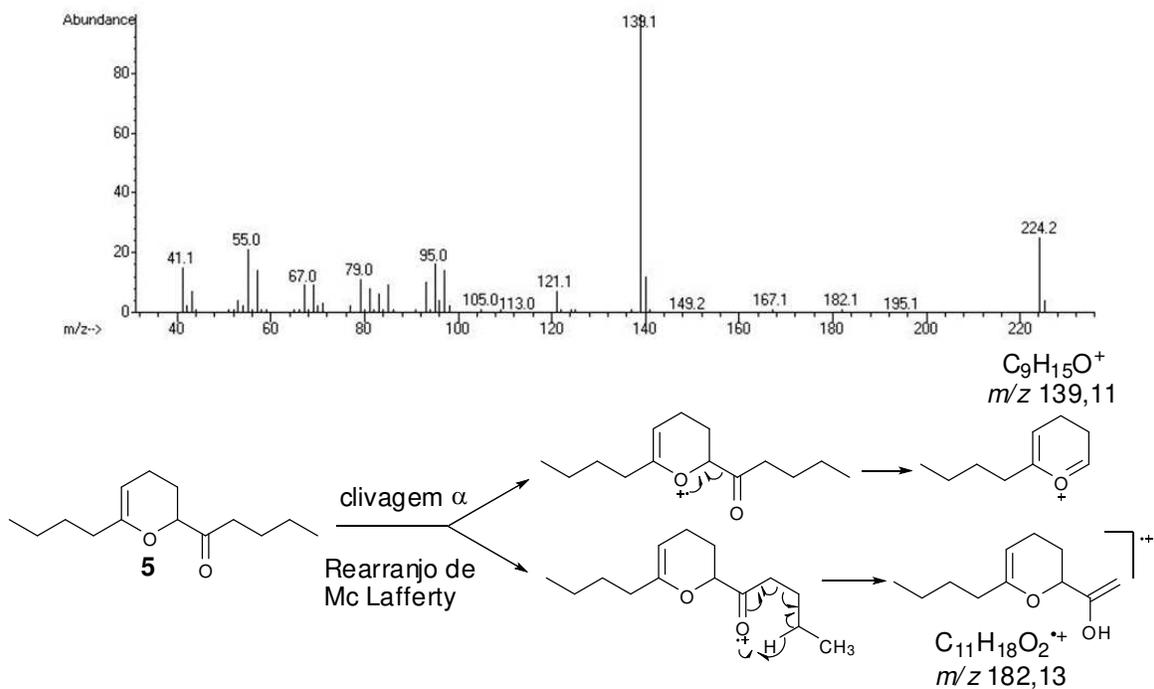
Esquema 1. Possível dimerização de **2** via hetero-Diels-Alder gerando o pirano **5**.

A estrutura do possível aduto HDA 1-(6-butil-3,4-diidro-2*H*-piran-2-il)-pentan-1-ona (**5**) foi proposta levando em conta o padrão de fragmentação por EM, onde a clivagem α à carbonila dá origem ao pico base de m/z 139 e o rearranjo de McLafferty justifica o fragmento de m/z 182 (Esquema 2). Esta proposta de fragmentação corrobora com o relato de que piranos substituídos com carbonilas sofrem preferencialmente a perda do substituinte ao invés da retro HDA na fragmentação.³⁵ Adicionalmente, o espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray mostrou o pico $[M + H]^+$ de m/z 225,1852 (Anexo 13), condizente com a massa 225,1849 calculada para $C_{14}H_{25}O_2$.

A secreção de *I. pustulosa* foi concentrada para retirada de solvente e da vinil cetona **2**, e novamente analisada. Foram detectados 14 sinais no espectro de RMN de ^{13}C , que foram classificados por RMN de ^{13}C (DEPT 135) (2 metilas, 7 metilenos, 1 metino, 2 carbonos olefínicos de uma dupla ligação trissubstituída e 1 carbonila), confirmando a estrutura proposta (Figura 9). Os carbonos olefínicos em 153,5 e 95,6 ppm, o metino em 80,1 ppm e os dois metilenos em 19,3 e 37,8 ppm são próximos aos deslocamentos químicos da 1-(6-metil-3,4-diidro-2*H*-piran-2-il)1-etanona, uma piranil cetona mais simples da literatura.³⁶ Embora o RMN de 1H tenha mostrado vários sinais de impurezas, a análise da amostra natural sinalizou que a estrutura sugerida da piranil cetona **5** estava correta, com um hidrogênio vinílico em 4,52 ppm e vários hidrogênios alifáticos na região entre 1,5 e 2,5 ppm (Anexo 14). A completa caracterização exigiu a análise do padrão sintético.

³⁵ Morizur, J-P.; Mercier, J.; Sarraf, M. *Org. Mass Spectrom.* **1982**, *17*, 327-330

³⁶ Weyerstahl, P.; Krohn, K. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3503-3514



Esquema 2. Espectro de massas e fragmentação da 1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)-pentan-1-ona (**5**).

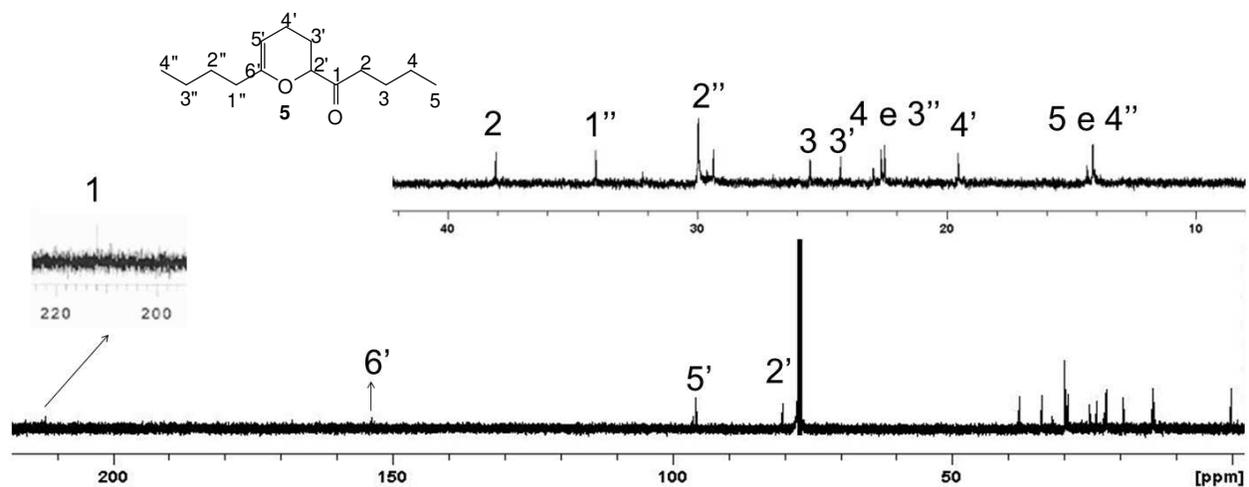


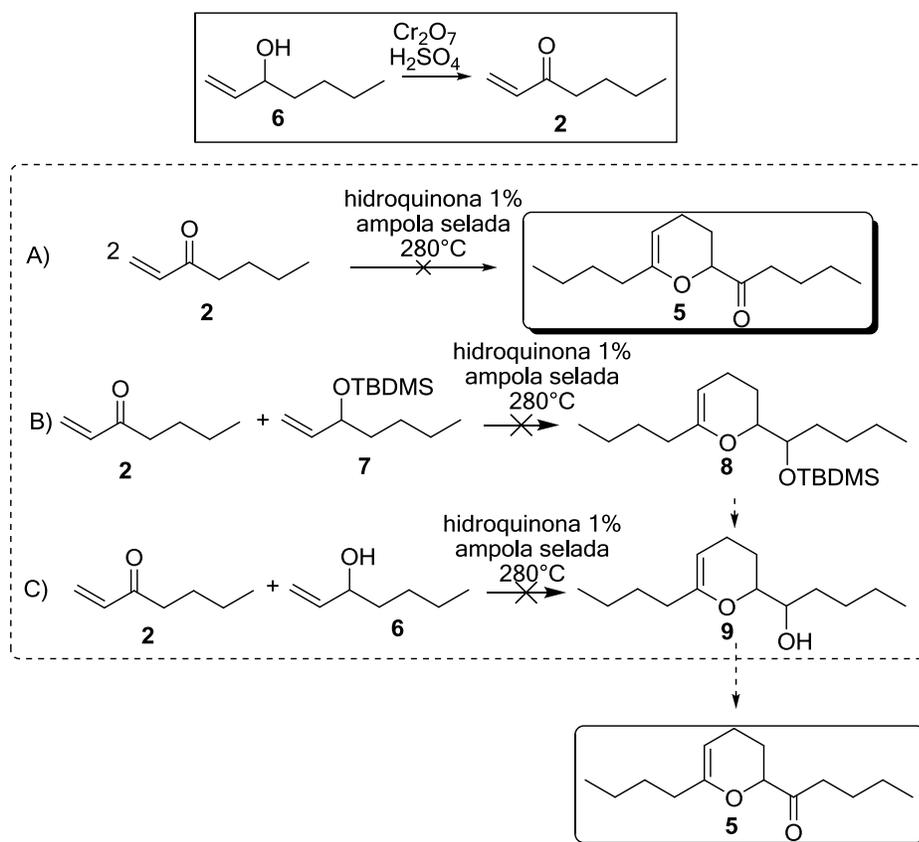
Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C (125,7 MHz, $CDCl_3$, TMS) do composto **5** proveniente da secreção concentrada de *Iporangaia pustulosa*.

3.2. Síntese do dímero da 1-hepten-3-ona (2): 1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)pentan-1-ona (5)

A vinil cetona **2** foi obtida pela oxidação do 1-hepten-3-ol (**6**) nas condições de Jones (Esquema 3).³⁷ As primeiras tentativas de reação de HDA foram feitas em ampola selada, à temperatura de 200°C, por 24h, inspiradas na dimerização da metil-vinil-cetona disponível na literatura,³⁶ com e sem utilização da hidroquinona (Esquema 3-A). O banho de areia foi inicialmente utilizado para a primeira etapa, mas é muito heterogêneo, pois quanto mais longe da chapa menor temperatura. A temperatura foi homogeneizada somente após a calibração da chapa de aquecimento com banho de óleo com agitação. Porém, em todos os casos, foram formados produtos colaterais de ciclização e polimerização, sem formação do produto desejado **5**.

A reação de dimerização de **2** por HDA é complicada porque ambos dieno e dienófilo são moléculas idênticas, com maior dificuldade de interação entre o HOMO e LUMO.³⁴ Buscando variar o nível energético do dieno e do dienófilo, preparamos a reação na ampola entre a cetona **2** e o álcool **6**, e também com o álcool protegido **7** (Esquema 3-B e C). Estas condições não geraram os adutos **8** e **9** a serem oxidados para formação da piranil cetona **5**.

³⁷ Fillion, E.; Trépanier, V. E.; Mercier, L. G.; Remorova, A. A.; Carson, R. J. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 1091–1094

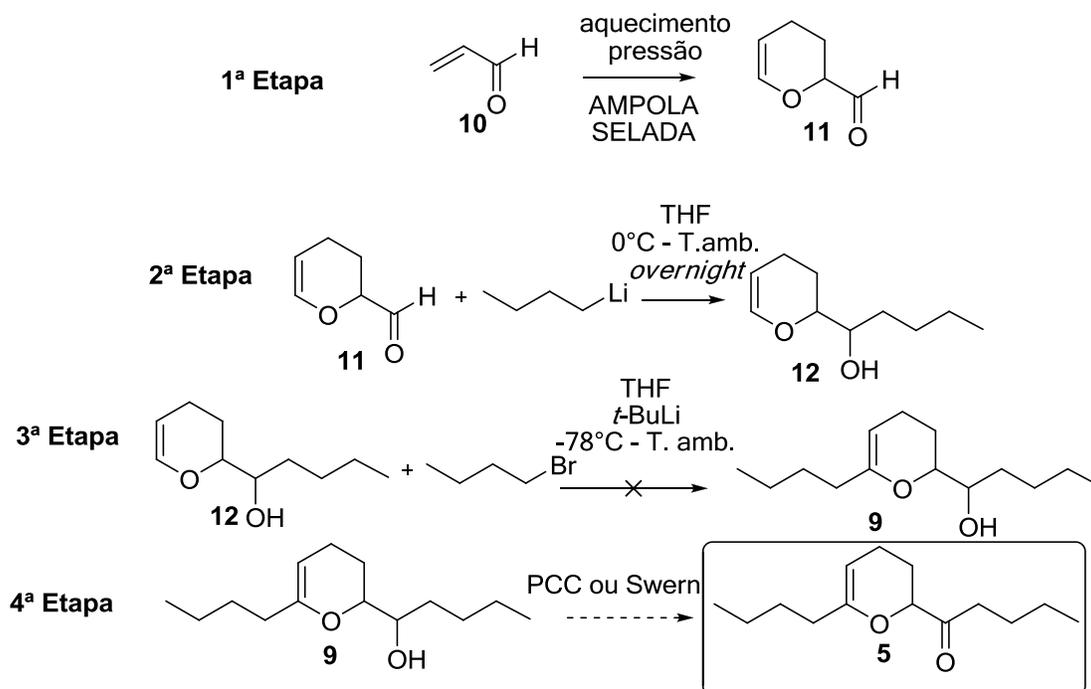


Esquema 3. Síntese de **2** e as diferentes tentativas de obtenção de **5** via reação de hetero-Diels-Alder.

Como a reação de hetero-Diels-Alder da cetona **2** não foi alcançada, uma nova busca na literatura pela dimerização da acroleína inspirou a adaptação de novos testes em ampola para a obtenção de **5**.³⁸ Tentamos então uma metodologia alternativa, com a alquilação do dímero da acroleína e posterior oxidação (Esquema 4).³⁹

³⁸ a) Karpyak, N. M.; Makitra, R. G.; Polyuzhin, I. P.; Marshalok, G. A.; Koval'skii, Y. P. *Russ. J. Gen. Chem.* **2009**, *79*, 2373-2376; b) Smith, C. W.; Norton, D. G.; Ballard, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 5273-5280

³⁹ a) Boeckman Jr, R. K.; Bruza, K. J. *Tetrah. Lett.* **1981**, *37*, 3997-4006; b) Mundy, B. P.; Bjorklund, M. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3899-3902



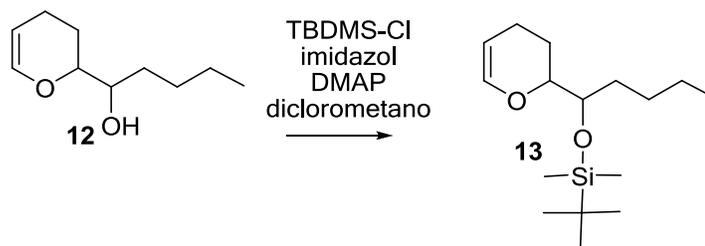
Esquema 4. Proposta de síntese da piranil cetona **5** via acroleína.

A primeira etapa gerou o aduto **11** com rendimento de 53% em temperatura de 200°C. A segunda etapa foi uma modificação da literatura, gerando a alquilação da carbonila do aldeído **11** com consumo de todo o material de partida. Apesar da formação de álcoois e produtos colaterais a partir do butil-lítio, o método se mostrou bastante eficiente. Não foi possível isolar o piranil álcool **12** por cromatografia em coluna, pois os produtos secundários formados a partir do butil-lítio têm o mesmo fator de retenção por cromatografia de camada delgada que o produto desejado. A síntese foi continuada mesmo sem o produto puro, mas a terceira etapa não se completou nestas condições.

Buscando a purificação de **12**, foi feita a proteção da hidroxila com cloreto de *t*-butil-dimetilsilano (TBDMS-Cl) (Esquema 5).⁴⁰ Apesar do consumo total do material de partida, o rendimento foi de apenas 22,5%, fato atribuído à hidrólise do TBDMS-Cl pela grande quantidade de ácido gerada, e o contato com a sílica da coluna de

⁴⁰ Gonçalves, C. C. S. *Síntese total das Basiliskamidas A e B e Síntese do fragmento C1-C9 da Dictiostatina*, Tese de Doutorado, **2010**, Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Brasil

cromatografia. Um isolamento eficiente foi obtido por coluna de sílica gel dopada com trietilamina (TEA) em hexano, sem utilizar pressão. A proteção do álcool **12** também visava diminuir os sítios de possível consumo do reagente de lítio, para a geração de **13**.



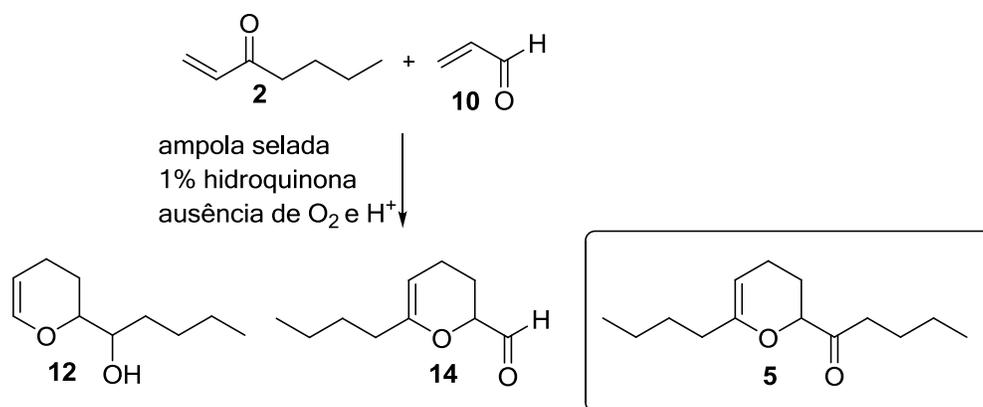
Esquema 5. Proteção do piranilálcool **12**.

Além da proteção do álcool **12**, outras alterações foram feitas no método de alquilação, como variação na proporção dos reagentes e tempo de reação, e também a utilização 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetraidro-2(1*H*)pirimidinona (DMPU) como base para facilitar a extração do H olefínico de **12**. Apesar dos cuidados em utilizar solventes e reagentes tratados e titular o *t*Bu-Li, não foi obtido o álcool **9** pela alquilação da dupla ligação. Um resumo de todas as tentativas da 3^a etapa está na Tabela 2.

Ainda utilizando a dimerização da acroleína como estratégia para construir o esqueleto diidropirano, foram realizados novos testes em ampola para a obtenção de **2** (Esquema 6).³⁸ As novas condições exigiram temperatura de 280°C, ausência total de ácidos e atmosfera inerte dentro da ampola, além da presença de hidroquinona como catalisador. Buscávamos o aldeído **14**, com a cadeia butil na dupla ligação do anel piranil, já que a entrada do grupo butil na carbonila do aldeído foi alcançada com facilidade. O mesmo foi obtido, mas para nossa surpresa, foi também formado o dímero desejado **5**.

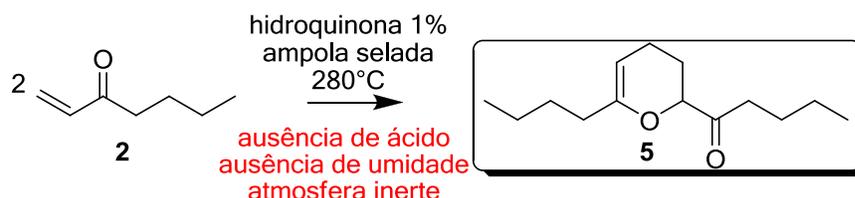
Tabela 2. Tentativas de aquilação da dupla ligação para obter **9**, intermediário sintético de **5**.

Mat. de partida	BuLi (eq)	BrBu (eq)	Condições da retirada do H	Tempo (h)	Reag/prod (% CG-EM)
12	BuLi (2)	2	-78°C -0°C	24	33,4
	BuLi (2)	2	-78°C -0°C	72	52,2
	<i>t</i> -BuLi (3,5)	4	-78°C -0°C	3	23,6
	<i>t</i> -BuLi (3,5)	4	-78°C - 0°C	24	34,3
	<i>t</i> -BuLi (3)	1	0°C -temp. amb	16	21,4
	<i>t</i> -BuLi (2,5)	1,1	0°C -temp. amb, 1,5 eq	16	-
	<i>t</i> -BuLi (2,5)	3,5	0°C -temp. amb, <i>t</i> -BuLi titulado	16	-
13	<i>t</i> -BuLi (2,5)	3,5	0°C -temp. amb, BrBu tratado	16	88
	BuLi (8)	10	0°C - temp. amb	16	139
	<i>t</i> -BuLi (8)	10	0°C -temp. amb, 1,1 eq	16	-



Esquema 6. Novas condições da reação de hetero-Diels-Alder para obtenção de **5**.

Sob as mesmas condições da reação acima, o teste contendo apenas a cetona **2** e hidroquinona 1% produziu o dímero **5** com 57,1% de rendimento (Esquema 7). O composto **5** é inédito na literatura, e nos permitiu identificar e caracterizar o metabólito presente no exudato.



Esquema 7. Síntese de **5** via reação de HDA.

3.2.1. Caracterização do novo produto natural **5**.

As secreções de *I. pustulosa* e *N. maximus* foram analisadas por CG-EM e reforçadas com a mistura sintética de **2** e **5** (Figura 10), confirmando que os compostos são idênticos. Esta confirmação também foi obtida comparando os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figura 11). A síntese do composto **5** permitiu a descrição deste produto natural inédito na literatura, com sua completa caracterização espectroscópica (Figura 11).

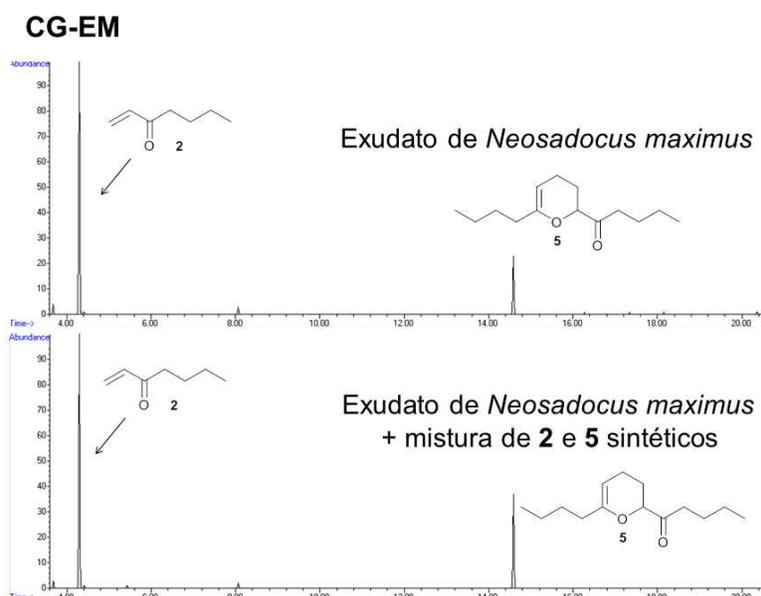


Figura 10. Comparação do composto **5** natural e sintético por CG-EM.

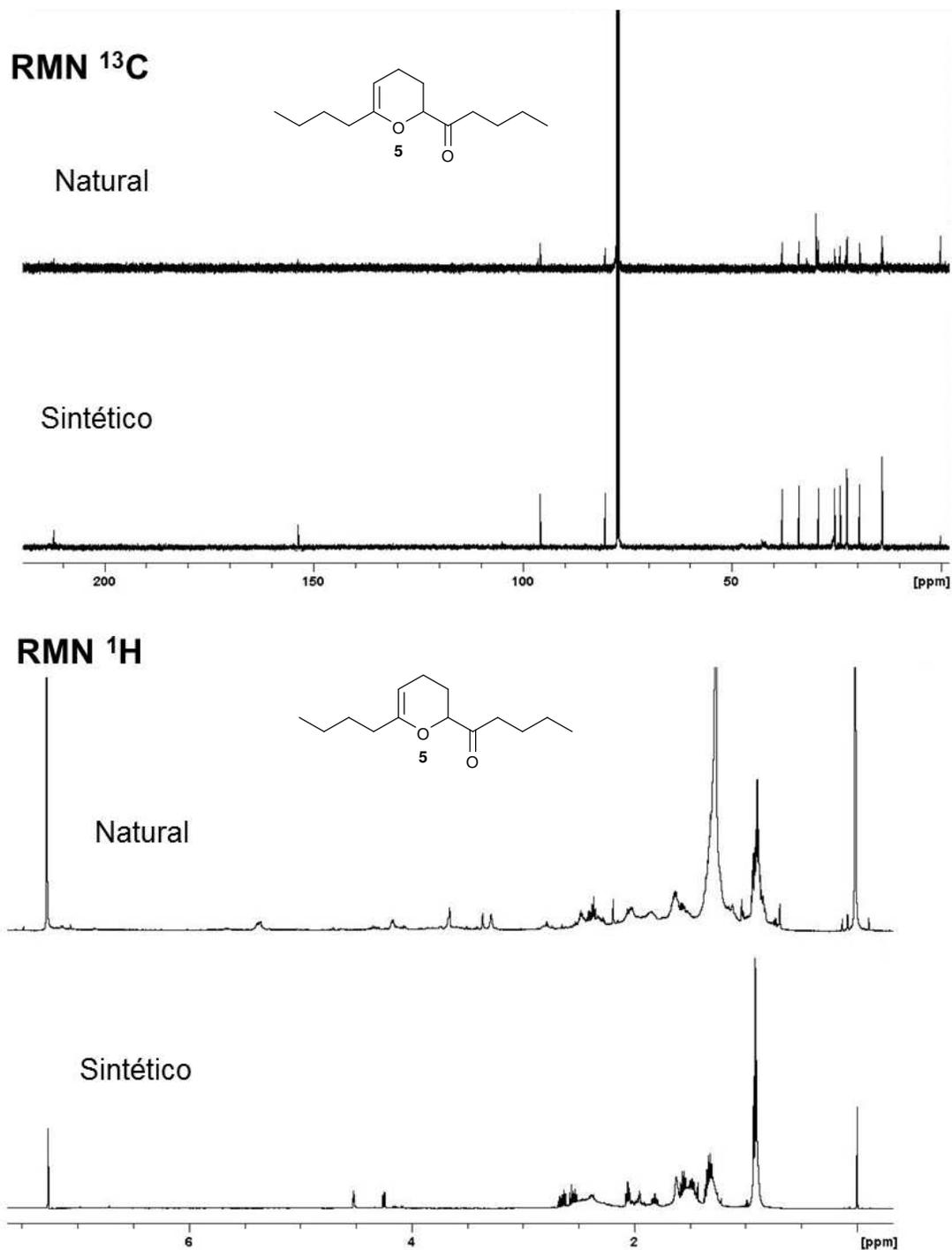
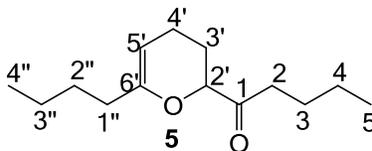


Figura 11. Comparação do composto **5** natural e sintético por RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125,71 MHz) e RMN de ^1H (CDCl_3 , 499,88 MHz).

Tabela 3. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3 , TMS) e de ^{13}C (125,7 MHz, CDCl_3 , TMS) da 1-(6-butil-3,4-diidro-2*H*-piran-2-il)pentanona (**5**) sintética e natural.



Posição	Sintético ^a		5 Natural ^b
	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)	δ_{C} , mult.	δ_{C}
1	-	211,8, C	211,8
2	2,65, 2,55, dd (17,7, 7,4)	37,8, CH ₂	37,8
3	1,56, m	25,2, CH ₂	25,2
4	1,30, m	22,3, ^c CH ₂	22,3 ^c
5	0,91 (7,3)	13,9, ^d CH ₃	13,9 ^d
2'	4,25, dd, (8,6, 3,1)	80,2, CH	80,1
3'	1,82, 1,98, m	24,0, CH ₂	24,0
4'	1,98, 2,00, m	19,3, CH ₂	19,3
5'	4,52, t (3,4)	95,6, CH	95,6
6'	-	153,5, C	153,5
1''	2,06, t (7,7)	33,8, CH ₂	33,8
2''	1,48, m	29,1, CH ₂	29,7
3''	1,30, m	22,4, ^c CH ₂	22,4 ^c
4''	0,91, t (7,3)	14,0, ^d CH ₃	13,9 ^d

^a Baseado em RMN de ^1H e de ^{13}C (totalmente desacoplado e DEPT-90 e DEPT-135) e experimentos de RMN 2D *g*COSY (^1H - ^1H) e HSQC (^1H - ^{13}C 1J).^b Exudato de *I. pustulosa* após a remoção da 1-hepten-3-ona (**2**).^{c,d} Sinais intercambiáveis na coluna.

Os sinais H-2'' e H-3 foram discriminados com experimento de desacoplamento seletivo. Irradiando-se o sinal de H-2, o sinal correspondente ao H-3 foi simplificado no espectro de RMN de ^1H de **5** (Figura 12).

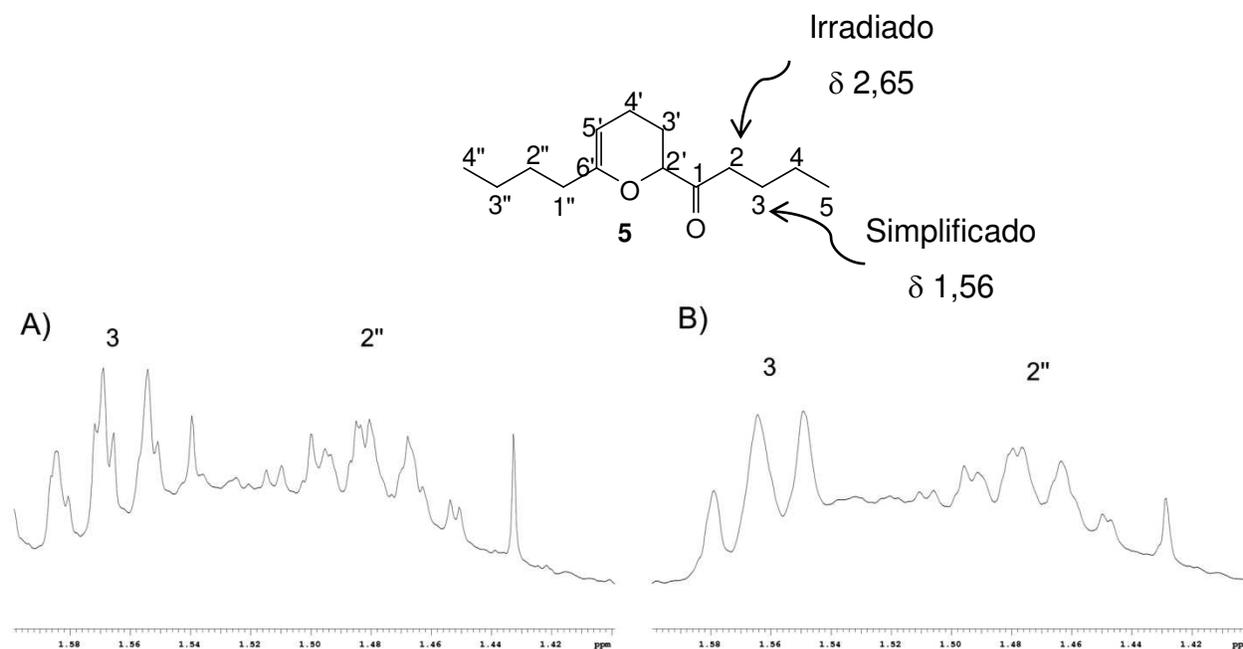


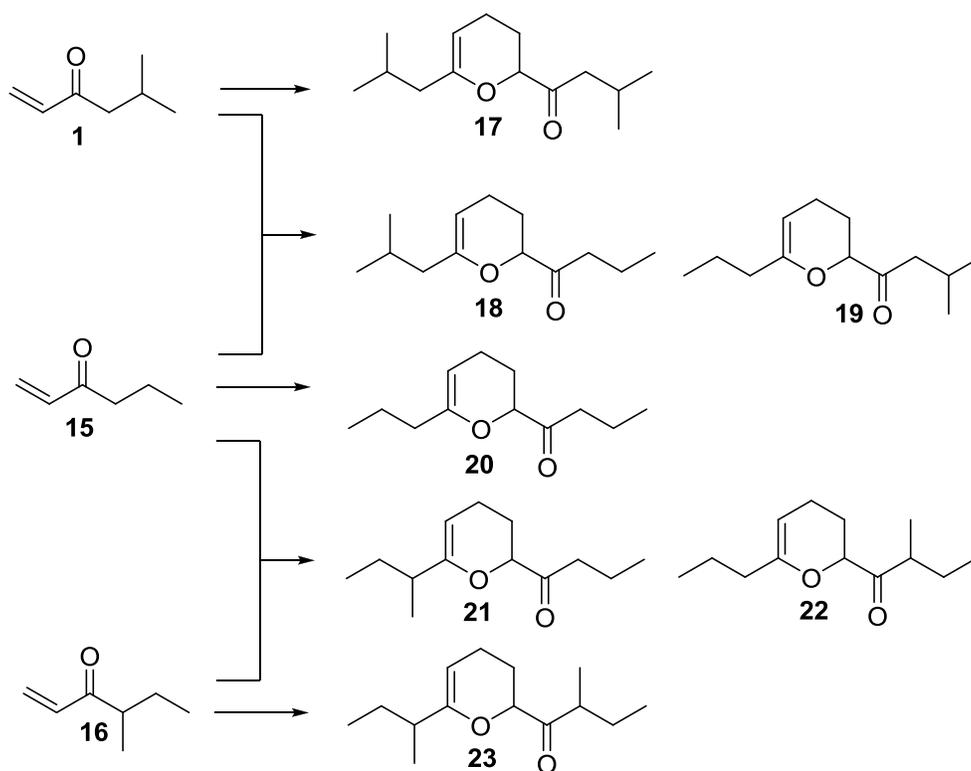
Figura 12. Experimento de RMN de ^1H com H-2 seletivamente desacoplado mostrando o multiplete simplificado em 1,56 ppm, atribuído ao H-3 da 1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)pentan-1-ona (**5**).

3.2.2. Quantificação do dímero **5** nos exudatos de *Iporangaia pustulosa* e *Neosadocus maximus*

O padrão sintético do dímero permitiu construir uma curva de calibração e calcular a massa de dímero por indivíduo (Figura 24). Segundo os resultados obtidos, a espécie *I. pustulosa* libera 3,7 μg de **5** por indivíduo, enquanto *N. maximus* libera uma quantidade bem menor, 0,7 μg de **5** por indivíduo. Considerando que a proporção entre monômero e dímero nas duas espécies é semelhante (Tabela 1), podemos dizer que a secreção de *I. pustulosa* é mais concentrada, favorecendo a análise química dos compostos **2** e **5** através deste exudato.

3.3. Reação de hetero-Diels-Alder em opiliões

O padrão sintético permitiu comprovar que o composto **5** encontrado em *I. pustulosa* e *N. maximus* é de fato uma piranil cetona, com esqueleto inédito entre os compostos de exudatos de opiliões.³⁰ Esta nova classe de compostos está presente em outras três espécies de opiliões da família Gonyleptidae estudadas em nosso grupo de pesquisas, que possuem vinil cetonas ramificadas de 7 carbonos e adutos HDA análogos a **5** (Esquema 8).⁴¹



Esquema 8. Adutos HDA encontrados em opiliões das espécies *Gonyleptes saprophilus*, *Sodreana barbiellini* e *Sodreana leprevosti*, pertencentes à família Gonyleptidae.⁴¹

⁴¹ Wouters, F. C. *Semioquímicos de Opiliões da Família Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones)*. Dissertação de mestrado, **2011**, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil

Além disso, a análise do conteúdo das glândulas odoríferas de *I. pustulosa* e *N. maximus* por CG-EM mostrou diversos compostos minoritários que não foram detectados na análise do exudato diluído em solvente orgânico (Figura 13). A presença de análogos de **5** nesta análise revela que a regioseletividade da reação hetero-Diels-Alder se mantém, formando sempre o mesmo esqueleto 1-(6-alkil-3,4-dihidro-2H-piran-2-il)cetona. A formação de diferentes compostos se dá pela troca de papéis heterodieno e heterodienófilo entre as vinil cetonas presentes na secreção (Esquema 9). Sugerimos para os compostos identificados como análogos de **5** as estruturas **17**, **24** e **25**, que possuem tempo de retenção próximos ao de **5** e o mesmo padrão de fragmentação por EM por impacto de elétrons (IE-EM), com íon molecular de m/z 224 e pico base de m/z 139.

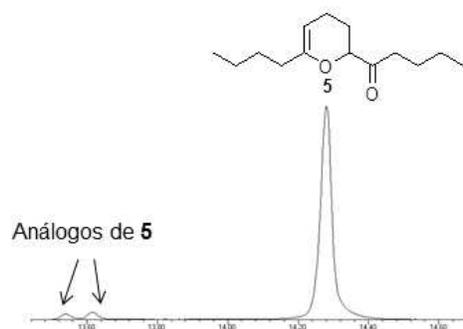
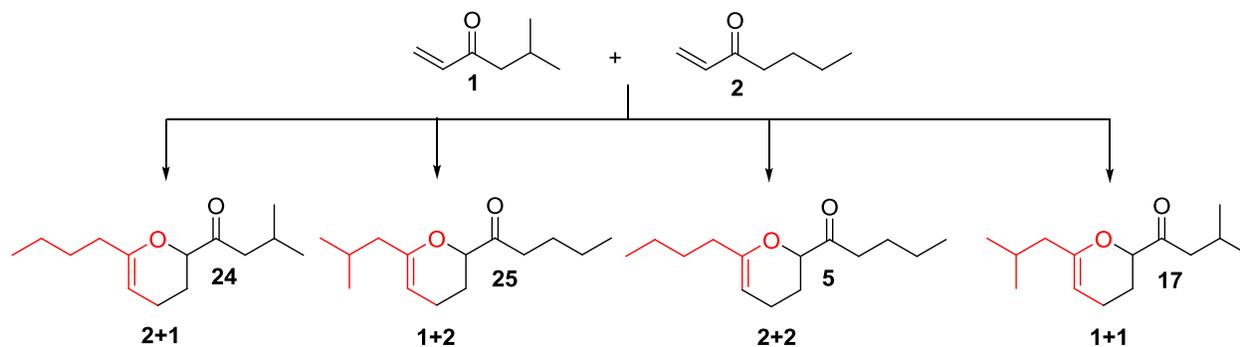


Figura 13. Cromatograma mostrando o aduto HDA **5** e dois análogos encontrados na glândula odorífera de *Neosadocus maximus* em solução de acetato de etila.



Esquema 9. Possíveis adutos HDA encontrados formados a partir das vinil cetonas **1** e **2**. As porções em vermelho indicam a molécula que age como hetero-dieno.

Tabela 4. Análise por CG-EM da composição das glândulas e exudatos de *Iporangaia pustulosa* e *Neosadocus maximus* (amostras coletadas de diferentes indivíduos).

Composto (tempo de retenção (min))	<i>I. pustulosa</i>		<i>N. maximus</i>	
	Exudato (%)	Glândula (%)	Exudato (%)	Glândula (%)
5-Metil-1-hexen-3-ona (3,8) (1)	-	1,6	1,7	9,9
1-Hepten-3-ona (4,2) (2)	79,0	74,1	79,2	68,7
3-Heptanona (4,3)	-	1,6	-	1,0
2,3-Dimetil-1,4-benzoquinona (7,8) (3)	3,0	2,7	2,0	-
2-Etil-3-metil-1,4-benzoquinona (8,8) (4)	4,4	7,5	-	-
(C ₃ H ₇)-1,4-Benzoquinona (9,4)	-	0,7	-	-
2,6-Dietil-1,4-benzoquinona (10,3)	-	1,6	-	-
Não identificado (13,5)	-	0,5	-	-
Isômero de 5 (13,5)	-	-	-	0,4
Isômero de 5 (13,6)	-	-	-	0,6
1-(6-butil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)pentan-1-ona (14,3) (5)	13,6	9,7	15,6	19,4
Não identificado (16,4)	-	-	1,5	-

A regioseletividade também foi observada para as outras três espécies de opiliões que contêm piranos, nas quais são formados diversos adutos provenientes de duas vinil cetonas diferentes, chamados heterodímeros (Esquema 8).⁴¹ Pode-se observar que a tendência para a reação HDA varia entre as espécies, bem como a de formação de hetero-adutos.

Reações de DA são consideradas a origem de compostos vários produtos naturais, mesmo sem estudos biossintéticos dos mesmos.⁴² Estas reações são muito úteis na química sintética, pois geram sistemas carbocíclicos com alta régio e

⁴² a) Oikawa, H.; Tokiwano, T. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 321-352; b) Stocking, E. M.; Williams, R. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3078-3115; c) Lian, G.; Yu, B. *Chem. Biodiv.* **2010**, *7*, 2660-2691

estereosseletividade, muitos deles com importantes atividades biológicas.⁴³ Estas características aumentam o interesse na química dos produtos naturais biossintetizados por reações de DA.

Compostos com esqueleto piranil semelhante ao de **5** foram isolados de plantas como *Arnica sachalinensis* (Asteraceae)⁴⁴ e *Isodon rubescens* var. *rubescens*.⁴⁵ Entre opiliões, as espécies *Iporangaia pustulosa* e *Iguapeia melanocephala* foram estudadas por Hara e colaboradores,¹⁵ quando foi detectado um composto de *m/z* 224 rotulado como não identificado, presente na mesma secreção que a cetona **2**.

3.3.1. Análise de **5 de *Iporangaia pustulosa* e *Neosadocus maximus* por cromatografia com coluna quiral.**

A síntese química do aduto **5** mostrou que são necessárias condições especiais na dimerização da vinil cetona **2**, como temperatura, pressão, ausência de umidade e de ácido e presença de catalisador hidroquinona. Por isso, espera-se que a obtenção biossintética de **5** ocorra via uma enzima hetero-Diels-Alderase. Um dos indícios da participação enzimática seria a predominância de um enantiômero, que pode ser detectada pela medida do excesso enantiomérico.^{42a}

A resolução dos enantiômeros de **5** foi obtida com a coluna capilar Lipodex E em CG acoplado ao detector de ionização de chama (DIC) (Figura 14). A análise da amostra natural revelou razão de quase 1:1 entre os enantiômeros. Embora decepcionantes, estes resultados não excluem o envolvimento de uma enzima hetero-Diels-Alderase, pois o dímero **5** pode estar sofrendo racemização espontânea via enolização. Um dos indícios de que a reação de DA é biológica é o isolamento do aduto juntamente com o precursor,^{42a} o que reforça ainda mais a hipótese aqui lançada, pois encontramos nas duas espécies o monômero **2** junto com o dímero **5**.

⁴³ W. Carruthers. *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*. Oxford: Pergamon, **1990**

⁴⁴ Passreiter, C. M.; Willuhn, G.; Weber, H.; Schleifer, K. J. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2997-3006

⁴⁵ Han, Q.; Lu, Y.; Zhang, L.; Zheng, Q.; Sun, H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2833-2837

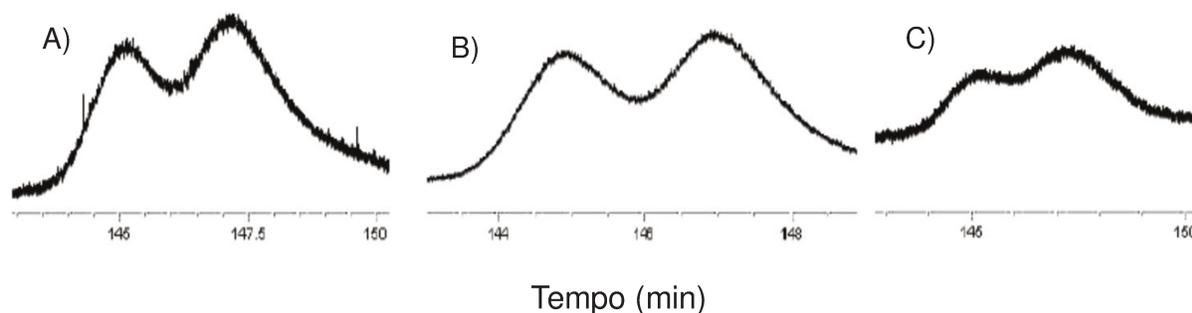


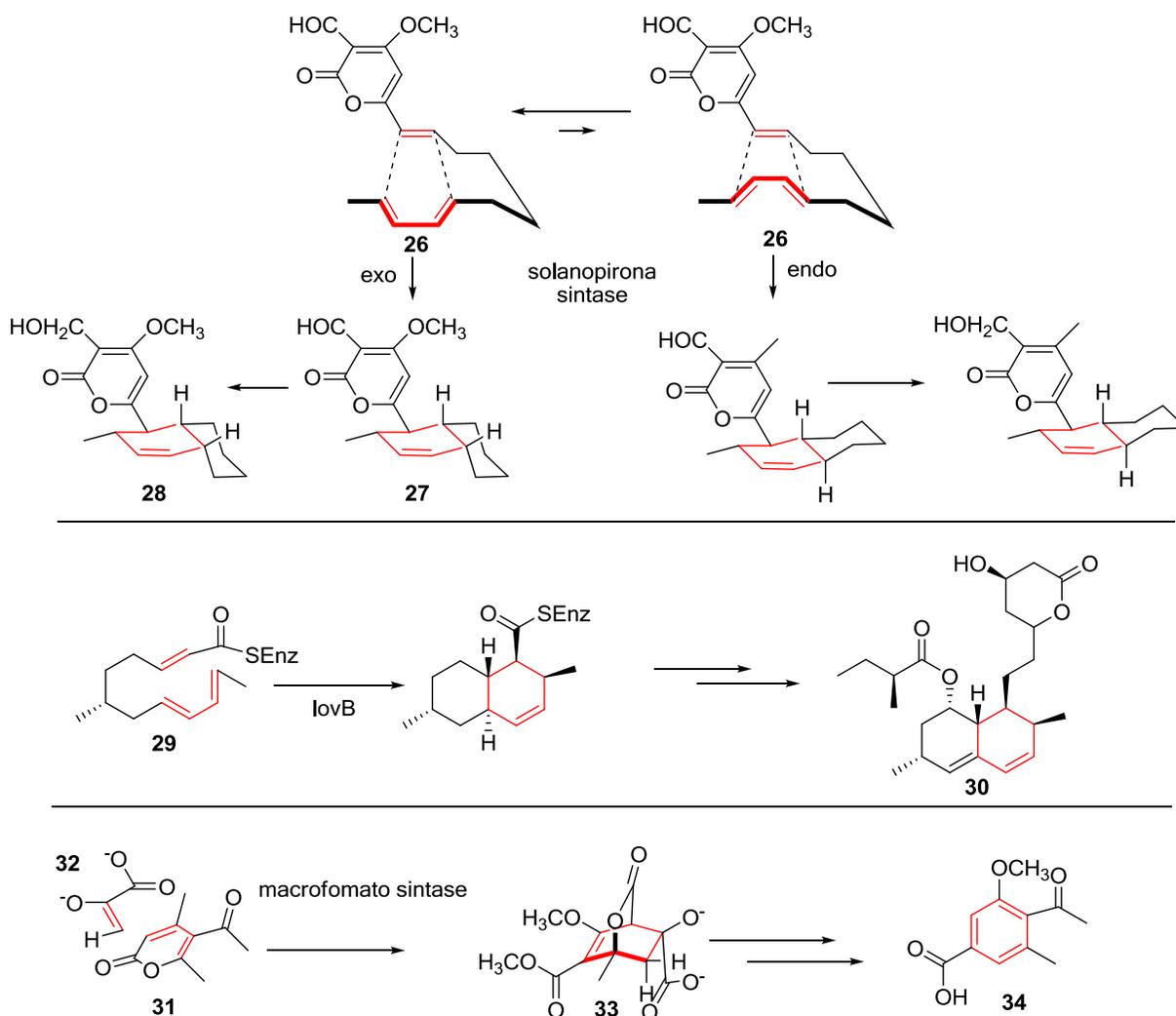
Figura 14. CG-DIC de A) **5** sintético, B) **5** no exudato de *Neosadocus maximus* e C) **5** no exudato de *Iporangaia pustulosa*.

Até 2011, apenas três enzimas candidatas a Diels-Alderase foram relatadas na literatura (Esquema 10). A solanapyrona sintase foi a primeira a ser reportada, isolada do fungo fitopatogênico *Alternaria solani*. Ela catalisa a cicloadição [4+2] intramolecular de **26** formando **27** com alto *e.e.* e *exo*-seletividade de 6:1 na formação da solanapirona A (**28**).^{46a} A lovastatina monacetídeo sintase (LovB), foi isolada do fungo *Aspergillus terreus* e participa da ciclização do hexacetídeo **29**, precursor do produção do fármaco anti-colesterol lovastatina (**30**).^{46b} A macrofomato sintase foi isolada do fungo fitopatogênico *Macrophoma commelinae* e transforma a 2-pirona **31** através da sua cicloadição [4+2] com enol piruvato **32**, seguida de descarboxilação e desidratação do intermediário bicíclico **33**, formando o ácido macrofômico (**34**).^{46c} Estas enzimas realizam mais de uma reação química, por isso, é difícil elucidar completamente seu mecanismo e comprovar que a formação do cicloaduto ocorre de maneira concertada, sem formação de intermediários.⁴⁷ Entre elas, a macrofomato sintase foi mais detalhadamente estudada, e há várias evidências de que a cicloadição ocorre em duas etapas, excluindo-a do páreo.⁴⁸

⁴⁶ a) Oikawa, H.; Katayama, K.; Suzuki, Y.; Ichihara, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1321-1322; b) Auclair, K.; Sutherland, A.; Kennedy, J.; Witter, D. J.; Van den Heever, J. P.; Hutchinson, C. R.; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11519-11520; c) Watanabe, K.; Oikawa, H.; Yagi, K.; Ohashi, S.; Mie, T.; Ichihara, A.; Honma, M. *J. Biochem.* **2000**, *127*, 467-473

⁴⁷ a) Williams, R. M.; Stocking, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3078-3115; b) Kelly, W. L. *Nature* **2011**, *473*, 35-36

⁴⁸ a) Guimarães, C. R. W.; Udier-Blagović, M.; Jorgensen, W. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3577-3588; b) Serafimov, J. M.; Gillingham, D.; Kuster, S.; Hilvert, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7798-7799

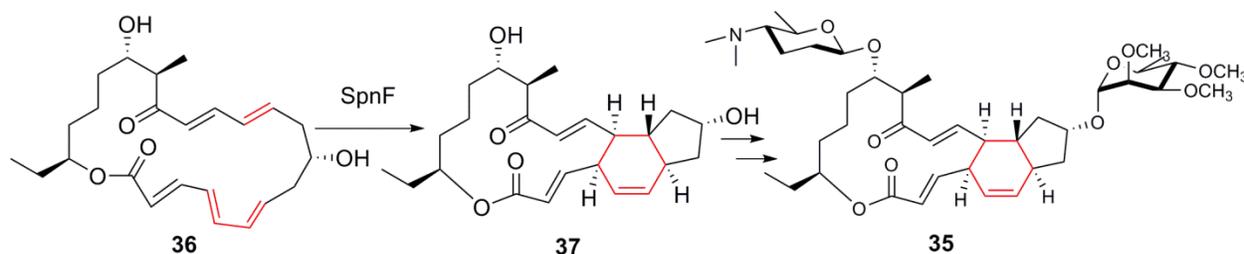


Esquema 10. Reações realizadas pelas candidatas a Diels-Alderases reportadas na literatura.

Kim e colaboradores isolaram da bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, enzima SpnF, que participa da biossíntese da spinosina A (**35**), um inseticida ambientalmente correto.^{49a} Esta enzima realiza somente o passo da cicloadição de **36** na formação do intermediário **37**, que é glicosilado e metilado para gerar o produto final (Esquema 11). Foi comprovado por cálculos teóricos que o mecanismo utilizado é concertado,^{49b} clamando assim o título de primeira Diels-Alderase descrita. Este relato de uma Diels-Alderase isolada de bactéria indica a possibilidade dos opiliões ou seus organismos

⁴⁹ a) Kim, H. J.; Rusczycky, M. W.; Choi, S.-H.; Y-N.; Liu, H.-W. *Nature* **2011**, 473, 109–112; b) Hess Jr., B. A.; Smentek, L. *Org. Biomol. Chem.* **2012** DOI: 10.1039/c2ob25827g

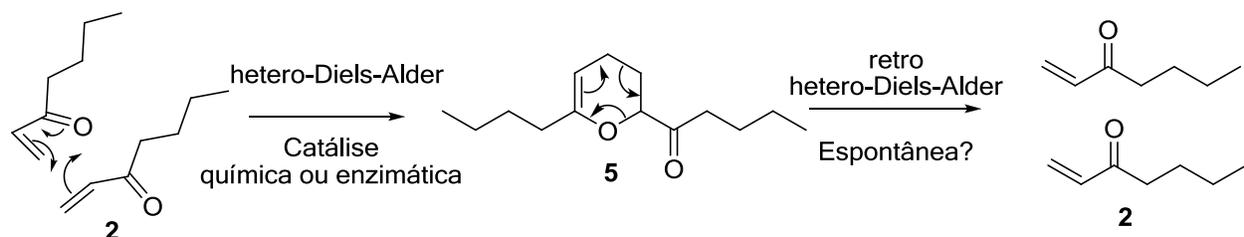
endossimbiontes possuírem uma enzima hetero-Diels-Alderase capaz de dimerizar a vinil cetona **2** e produzindo o dímero **5** em condições bem mais amenas do que no laboratório.



Esquema 11. Reação realizada pela SpnF, primeira Diels-Alderase reportada na literatura.

3.3.2. Finalidade da reação de HDA em opiliões

As peculiaridades e exigências de uma reação de HDA nos levaram a questionar as razões da dimerização de **2** nos exudatos de *I. pustulosa* e *N. maximus*, assim como de vinil cetonas análogas em outras espécies de opiliões da família Gonyleptidae.⁴¹ Uma hipótese é de que os opiliões poderiam utilizar a dimerização para estocar quantidades maiores de **2**, que é altamente volátil, e que poderia ser de fato o composto de defesa a ser liberado contra os predadores. A formação do dímero no organismo seria por uma reação HDA enzimática entre duas moléculas de **2**, que podem ser regeneradas espontaneamente através de uma reação de retro HDA (Esquema 12). Desta maneira, no momento da exudação uma reação de retro HDA geraria novamente o monômero **2**.



Esquema 12. Reações hetero-Diels-Alder entre os componentes do exudato de *Iporangaia pustulosa* e *Neosadocus maximus*.

As composições da glândula e do exudato foram comparadas por CG-EM e se revelaram bastante similares (Tabela 5). Assim, podemos inferir que o processo de exudação não aumenta a quantidade de monômero por uma reação de retro-HDA. Em todas as condições, a quantidade de dímero **5** é muito menor do que a quantidade de monômero **2**, sugerindo que a formação de duas moléculas de **2** a partir de **5** via retro HDA seja espontânea.

Tabela 5. Razões da área do monômero **2**/ área do dímero **5** analisadas por CG-EM.

Espécie	Secreção em solução ^a	Glândula em solução ^b	Exudato sem solvente ^c
<i>Iporangaia pustulosa</i>	5,8	7,7	21,7
<i>Neosadocus maximus</i>	5,1	3,5	Não analisado

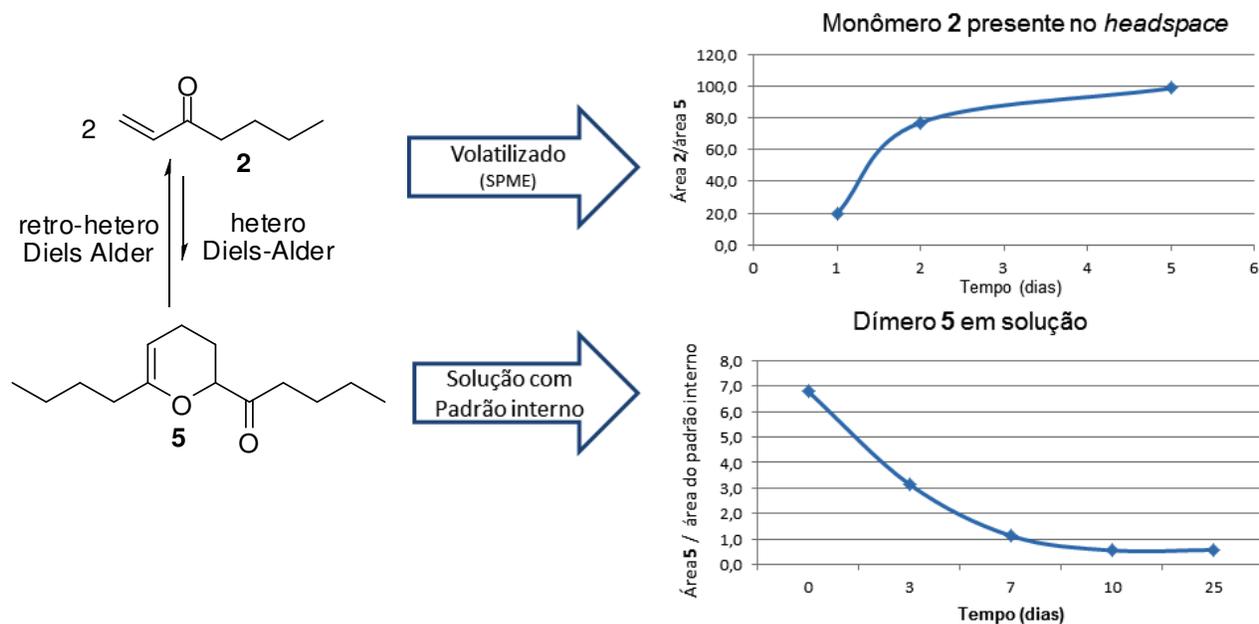
^a solvente acetato de etila bidestilado; ^b glândula retirada do indivíduo e macerada em acetato de etila bidestilado; ^c exudato coletado com seringa e injetado sem solvente

Lançamos então a hipótese de que o dímero **5** prolonga a ação da secreção, formando um escudo químico no corpo do opilião por mais tempo, pois o monômero **2** é muito mais volátil que o dímero **5**. Assim, o dímero aderido na cutícula do opilião sofreria uma lenta reação de retro-HDA, liberando gradativamente a vinil cetona **2** e permitindo ao opilião refazer sua secreção de defesa antes de uma outra situação de perigo.

Para verificar a veracidade desta hipótese, o primeiro passo foi determinar em quanto tempo o aduto **5** sofre retro HDA espontânea. Então, uma quantidade conhecida de dímero ficou em repouso, dentro de um frasco fechado, à temperatura ambiente e sem solvente orgânico. Após certo período, cada amostra foi analisada por CG-EM. A formação de **2** foi monitorada pela análise do *headspace* via microextração em fase sólida (SPME, *Solid phase micro extraction*),⁵⁰ comparando a área dos picos de **2** e **5** ao longo do tempo. A diminuição da abundância de **5** em solução foi monitorada pela comparação da área do pico correspondente ao mesmo e do padrão interno adicionado

⁵⁰ Augusto, F.; Valente, A. L. P. *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 428-438

sempre na mesma quantidade. Foi observado que, no terceiro dia, havia metade da quantidade inicial do dímero **5**, que permaneceu constante do 10^o ao 25^o dia (Esquema 13, Tabela 4).



Esquema 13. Degradação espontânea do dímero **5** via retro-hetero-Diels-Alder analisada por CG-EM.

Tabela 6. CG-EM da degradação do dímero **5** ao longo do tempo.

Método de detecção	Composto	Dias em repouso	Concentração relativa (%) ^a
SPME		1	19,8
		2	77,1
		5	98,7
Solução		1	100,0
		3	46,3
		7	16,6
		10	8,1
		25	8,4

^a [2] = Área monômero / (Área monômero + Área dímero); [5] = Área dímero / Área padrão interno.

Estes resultados mostram que a decomposição do dímero **5** em duas moléculas de **2** é espontânea e aumenta o tempo permanência da defesa química se comparado com o monômero **2** sozinho. O monômero **2** é muito mais volátil que **5**, então a reação retro HDA pode ser uma estratégia para estender o tempo de vida do escudo químico.

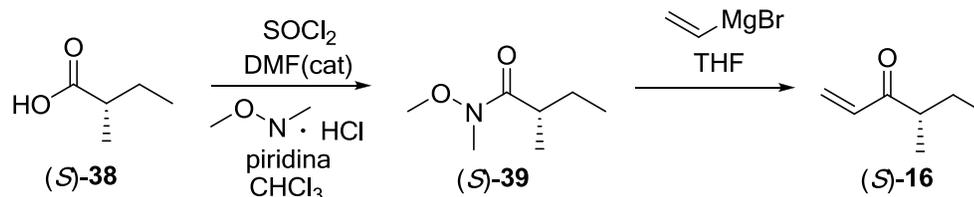
Adicionando estes resultados aos dados da literatura, foram encontrados indícios de que a reação de HDA seja responsável pela formação de piranil cetonas em oito espécies de opiliões: *Iporangaia pustulosa* e *Neosadocus maximus*, estudadas neste trabalho; *Iguapeia melanocephala*, estudada por Hara e colaboradores;¹⁵ e *Cadeadoius niger*, *Gonyleptes saprophilus*, *Pseudotrogulus funebris*, *Sodreana sodreana* e *Sodreana barbiellini*, estudados pelo Me. Felipe C. Wouters em nosso grupo de pesquisas.⁴¹ Estes relatos indicam que este tipo de mecanismo pode acontecer em outras espécies contendo vinil cetonas e bioensaios comparando a eficácia de **5** e **2** contra predadores naturais podem ajudar a entender melhor esta estratégia de defesa química.

3.4. Determinação da configuração absoluta da 4-metil-1-hepten-3-ona (16)

Em um estudo anterior, foram caracterizadas as secreções dos opiliões *Acanthogonyleptes pulcher* e *Gonyleptes saprophilus*, ambas com 4-metil-1-hexen-3-ona (**16**) como composto majoritário. Foi estabelecida uma rota sintética para a obtenção deste composto, possibilitando discriminar por CG-DIC com coluna quiral os enantiômeros *R*-**16** e *S*-**16** (11,6 min e 12,0 min). As análises indicaram que o enantiômero natural apresenta alto excesso enantiomérico, contudo, a configuração absoluta do produto natural não foi determinada.⁴¹

Para acessar esta informação, foi necessário obter uma amostra sintética de **16** enantiomericamente enriquecida, para ser comparada com as amostras racêmica e natural. A síntese de (*S*)-**16** repetiu a estratégia utilizada para a obtenção do racemato. Porém, neste caso partiu do ácido (*S*)-2-metil-butanóico (**38**) para a obtenção da amida

de Weinreb (**39**),⁵¹ que rendeu a (*S*)-**16** após uma reação de Grignard para a inserção do grupo vinila (Esquema 14).⁴¹



Esquema 14. Rota sintética para obtenção da cetona (*S*)-**16**.

O maior problema para a obtenção de (*S*)-**16** foi a racemização na posição 4 durante a reação com o brometo de vinil magnésio. Como a preparação deste reagente foi realizada no laboratório a partir do brometo de vinila gasoso, a concentração do reagente de Grignard não tinha precisão, podendo ocasionar uma enolização no centro α -carbonila pelo excesso de base. Mesmo com a utilização da solução de brometo de vinil magnésio comercial, a enolização continuou ocorrendo. Após várias tentativas, a solução foi a sililação da vidraria usada na síntese, um procedimento simples que finalmente permitiu a obtenção do produto (*S*)-**16**.⁵²

A análise de (*S*)-**16** e *rac*-**16** por CG-DIC e suas co-eluições mostraram os tempos de retenção de 11,6 min para o enantiômero *S* e de 12,0 min para o enantiômero *R*. A co-eluição dos exudatos de *G. saprophilus* e *A. pulcher* com o padrão racêmico mostrou que (*R*)-**16** é o enantiômero presente na amostra natural, com enriquecimento do pico em 12,0 min (Figura 15).

A cetona análoga 4-metilheptan-3-ona é feromônio de alarme da formiga *Atta texana* e é produzida com configuração (*S*), que mostrou-se 400 vezes mais ativa do que o enantiômero *R*.⁵³ Da mesma maneira, 4-metil-1-hepten-3-ona do bicho-pau *Agathemera elegans* apresenta configuração *S*.⁵² Não há relatos da configuração de outras 3-cetonas análogas na literatura, fazendo de nossos resultados a primeira descrição de uma 4-metil-3-cetona de artrópodes com configuração *R*.⁵⁴

⁵¹ Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetr. Lett.*, **1981**, 22, 3815-3815

⁵² Espinoza-Moraga, M.; Cornejo-Morales, R.; Santos, L. S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 1062-1064

⁵³ a) Riley, R. G.; Silverstein, R. M.; Moser, J. C. *Science* **1974**, 183, 760-762; b) Riley, R. G.; Silverstein, R. M. *Tetrahedron* **1974**, 30, 1171-1174

⁵⁴ Wouters, F. C.; Rocha, D. F. O.; Gonçalves, C. C. S.; Machado, G.; Marsaioli, A. J. *J. Nat. Prod.* **2013**,

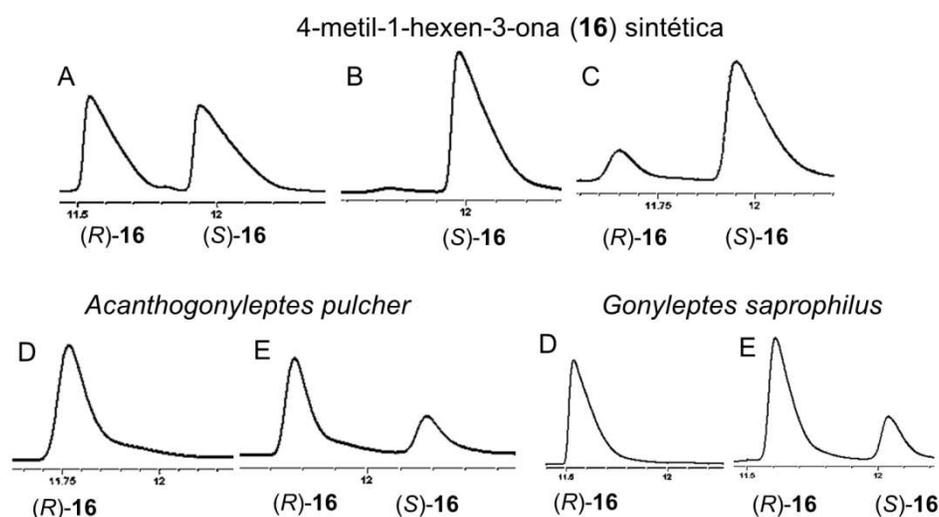
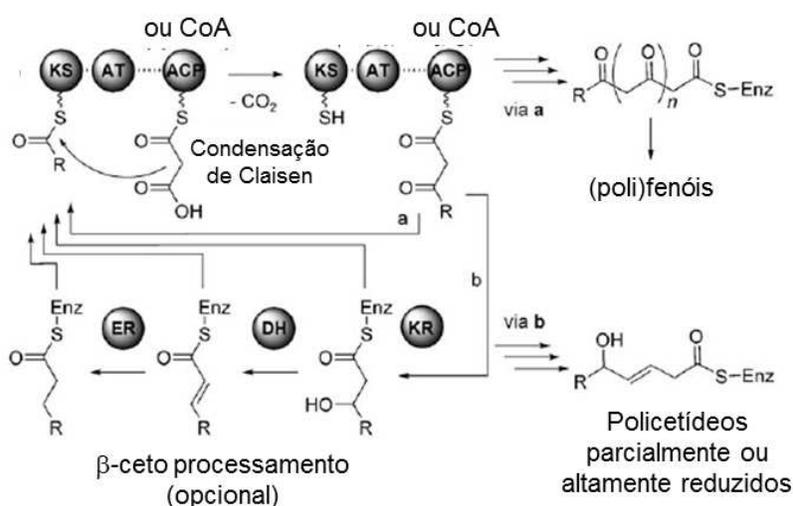


Figura 15. Cromatograma de CG-DIC da 4-metil-4-hexen-3-ona (**16**). A) *rac*-**16**; B) (S)-**16**; C) *rac* e (S)-**16**; D) amostra natural; E) amostra natural e amostra racêmica.

3.5. Estudo da biossíntese de semioquímicos de opiliões

Considerando a filogenia da família Gonyleptidae, a produção de benzoquinonas ocorreu primeiramente em uma espécie ancestral, que ao evoluir passou a produzir outros compostos como vinil cetonas e alquil fenóis.¹⁷ Do ponto de vista biossintético, é esperado que estas três classes de compostos tenham a mesma origem biossintética, com poucas alterações enzimáticas ao longo da história evolucionária desta família.⁵ Sendo assim, a rota dos policetídeos é adequada a esta hipótese. Nesta rota ocorrem combinações de acetato, propionato e outros ácidos carboxílicos ativados como ésteres acetil-CoA através de condensações de Claisen para formar a cadeia policetídica. Esta cadeia, por sua vez, pode sofrer transformações, como desidratações, reduções e ciclizações, dando origem a diversas estruturas (Esquema 15).⁵⁵

Policetídeos são utilizados por insetos para comunicação química e defesa contra inimigos naturais. Em plantas, fungos e bactérias, a biossíntese de policetídeos é realizada pelas policetídeo sintases (PKS, *polyketide synthase*). Embora não haja caracterização de uma enzima PKS de insetos ou de outros artrópodes relacionados, a grande variedade estrutural dos metabólitos de artrópodes é um indício da participação de PKS. Portanto, a produção de policetídeos por insetos pode ser um indício da presença de PKS provenientes destes organismos, ou ainda, da participação de microrganismos endossimbiontes na biossíntese de metabólitos secundários de artrópodes.⁵⁶



Esquema 15. Esquema geral da biossíntese de policetídeos. KS (β -cetoacilsintase); AT (aciltransferase); ACP (proteína acil fosfopantetienilada carreadora); ER (enoil redutase); DH (desidratase); KR (cetoreductase). Adaptação da referência 55.

A biossíntese de metabólitos secundários de opiliões nunca foi estudada, e com base na hipótese de Morgan de que os mesmos têm origem policetídica,³² realizamos experimentos de marcação isotópica com duas espécies de opiliões da família Gonyleptidae: *I. pustulosa*, que produz a vinil cetona **2** e a piranil cetona **5**, e *Magnispina neptunus*, que produz 2-metil-1,4-benzoquinona (**40**) e 2-etil-1,4-benzoquinona (**41**). A metodologia utilizada foi a administração de precursores

⁵⁶ Pankewitz, F.; Hilker, M. *Biol. Rev.* **2008**, *83*, 209-206

isotopicamente marcados, como [$^{13}\text{C}_3$]propionato, [$1\text{-}^{13}\text{C}$]acetato de sódio, [$4\text{-}^{13}\text{C}$]metilmalonato de sódio e [$1\text{-}^{13}\text{C}$]glicose.

Após a criação dos indivíduos em laboratório por um período de 2 meses, a incorporação de ^{13}C foi analisada pela comparação dos compostos do exudato dos grupos controle (antes da alimentação) e ensaio (alimentado com precursor marcado) através de RMN de ^{13}C . Os espectros foram adquiridos nas mesmas condições instrumentais quando relativas ao mesmo experimento, e um sinal do metabólito que não sofreu incorporação foi utilizado como referência para os cálculos. Os metabólitos estudados **2** e **41** foram caracterizados por RMN 2D (Anexo 7 e Anexo 26) para evitar erros na atribuição dos sinais, e assim, garantir a correta interpretação do padrão de marcação isotópica obtido. O monitoramento por RMN de ^{13}C permite determinar exatamente as posições enriquecidas na estrutura do metabólito que sofreu a incorporação dos precursores, dando informações importantes sobre sua rota biossintética.⁵⁷

As espécies escolhidas apresentavam boa taxa de sobrevivência em laboratório.⁵⁸ Além disso, os exudatos apresentam apenas dois compostos majoritários, permitindo a análise por RMN sem purificação prévia e utilizando pouca quantidade de amostra. Foram utilizados, em média, 30 indivíduos para cada grupo, mas a secreção analisada corresponde aos indivíduos que sobreviveram até o final do experimento, possibilitando a “ordenha” da secreção.

3.5.1. Estudo da biossíntese da vinil cetona 2 em *Iporangaia pustulosa*

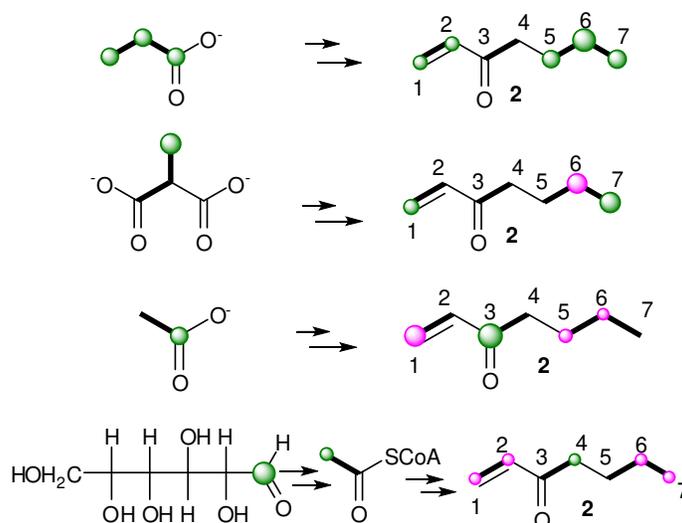
3.5.1.1. Alimentação com precursores marcados com ^{13}C

A biossíntese de **2**, componente majoritário do exudato de *I. pustulosa*, foi investigada pela alimentação de indivíduos com uma dieta de sardinha enlatada contendo [$1\text{-}^{13}\text{C}$]acetato de sódio, [$4\text{-}^{13}\text{C}$]metilmalonato de sódio e [$1\text{-}^{13}\text{C}$]glicose e

⁵⁷ Schneider, B. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 155-198

⁵⁸ Prof. Glauco Machado, comunicação pessoal.

[$^{13}\text{C}_3$]propionato de sódio. Este último fornece informações sobre a incorporação de unidades C_3 intactas em **2**, devido ao acoplamento ^{13}C - ^{13}C .⁵⁷ Os espectros de RMN de ^{13}C do exudato dos três grupos experimentais mostraram enriquecimento condizente com a condensação de unidades Pr+Ac+Pr na cadeia policetídica. Algumas posições apresentaram um enriquecimento inesperado, que será discutido mais adiante (Esquema 16).



Esquema 16. Padrão de marcação de **2** obtido pela alimentação de indivíduos de *Iporangaia pustulosa* com precursores marcados com ^{13}C . Círculos coloridos indicam a posição da marcação. Os círculos verdes indicam enriquecimento esperado e os magentas indicam enriquecimento não esperado. O tamanho dos círculos varia de acordo com a intensidade da marcação isotópica.

A alimentação dos indivíduos de *I. pustulosa* com [$^{13}\text{C}_3$]propionato gerou marcação nas posições C-1, C-2, C-5, C-6 e C-7 de **2**. A incorporação deste precursor aumentou a intensidade das linhas satélites correspondentes aos isotopômeros marcados em mais de uma posição (Figura 16, Tabela 7). Os dubletos em C-5 e C-7 e o duplo dubleto em C-6 apresentam constantes características de acoplamento ^{13}C - ^{13}C , comprovando a incorporação de [$^{13}\text{C}_3$]propionato nestas posições de **2**. Os dubletos satélites em C-1 e C-2 também sofreram aumento de intensidade, o que indica a incorporação de uma segunda unidade [$^{13}\text{C}_3$]propionato, a qual perde um carbono marcado.

Tabela 7. Marcação isotópica de 1-hepten-3-ona (**2**) de *Iporangaia pustulosa* após incorporação de [¹³C₃]propionato.

C	δ (ppm)	% ¹³ C- ¹³ C ^a	J c-c	
			(Hz)	Posição
1	127,9	15,25	66,85	2
2	136,6	16,17	66,87	1
3	201,2	Não enriquecido		
4	39,4	Não enriquecido		
5	26,1	39,18	27,51	6
6	22,4	48,63	34,73	7
			32,39	5
7	13,9	45,06	34,55	6

^a O enriquecimento é dado pela razão da soma das integrações das linhas satélites pela integração do sinal central em cada posição, multiplicada por 100.^{57,59}

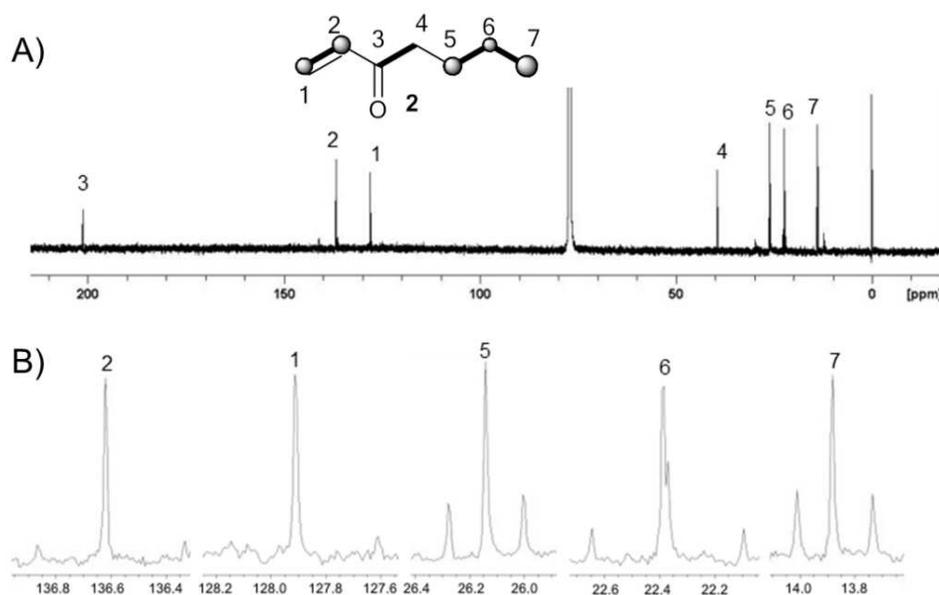


Figura 16. Resultados do experimento de alimentação de indivíduos de *Iporangaia pustulosa* com [¹³C₃]propionato. A) Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do exudato contendo **2** como composto majoritário. B) Expansão dos sinais de ¹³C das posições enriquecidas, mostrando padrões de acoplamento ¹³C-¹³C.

O grupo alimentado com [4-¹³C]metilmalonato gerou **2** marcado nas posições C-1 e C-7, corroborando com a incorporação de duas unidades C₃. As posições C-3 e C-4 não foram enriquecidas, sugerindo que estes carbonos provêm de uma unidade acetato. A incorporação de [1-¹³C]acetato enriqueceu **2** na posição C-3 (Figura 17, Tabela 8). Para interpretar os resultados do experimento com [1-¹³C]glicose é importante considerar que quando a mesma é metabolizada forma uma unidade acetato e uma unidade [2-¹³C]acetato depois do ciclo do ácido tri carboxílico, que gera enriquecimento em C-4. O enriquecimento causado por [1-¹³C]acetato (3,0%) é mais alto do que com [1-¹³C]glicose (1,3%), indicando uma incorporação indireta deste último precursor (Figura 18, Tabela 8).

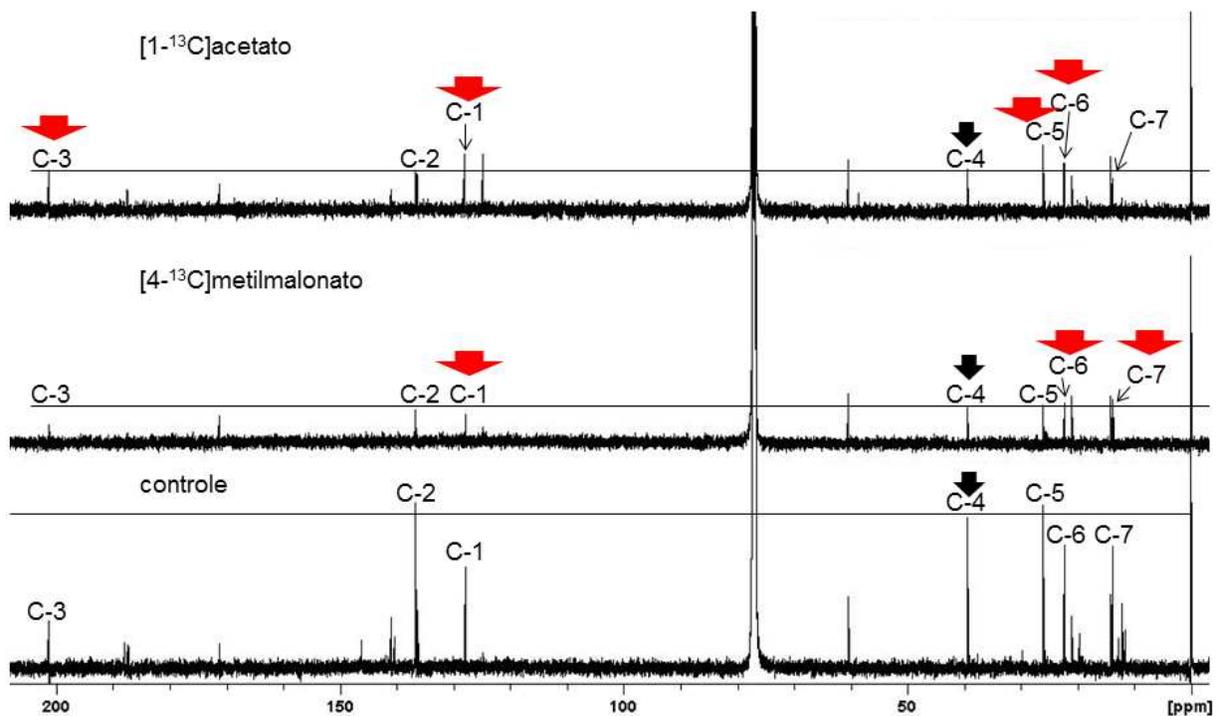
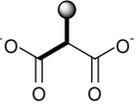
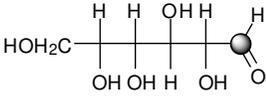


Figura 17. Espectros de RMN de ¹³C (125,71 MHz) dos experimentos de biossíntese de **2** em *Iporangaia pustulosa* em CDCl₃. As flechas pretas indicam os sinais de referência e as vermelhas indicam as posições enriquecidas.

Este padrão de marcação indica que a biossíntese de **2** ocorre pela rota dos policetídeos, apesar de não haver evidências da presença desta enzima em artrópodes. Baseados nestes resultados, nós propusemos uma rota biossintética para **2** iniciada com propionil-CoA, estendida por uma unidade C₂ malonil-CoA e por uma unidade C₃

metilmalonil-CoA (Esquema 17). Após a hidrólise do tioéster e descarboxilação, é gerado o análogo saturado **42**, que após desidrogenação, gera a vinil cetona **2**.

Tabela 8. Marcação da 1-hepten-3-ona (**2**) por alimentação de *Iporangaia pustulosa* com substratos marcados com ^{13}C .

C	δ (ppm)	Grupos experimentais					
		[1- ^{13}C]acetato		[4- ^{13}C]metilmalonato		[1- ^{13}C]glicose	
		r	Enriquecimento (%) ^a	r	Enriquecimento (%) ^a	r	Enriquecimento (%) ^a
							
1	127,9	2,3	2,5	1,2	1,3	Não mensurado ^b	
2	136,6	0,8	-	0,4	-	1,2	1,3
3	201,2	2,7	3,0	0,7	-	Não mensurado ^c	
4	39,4	1,0	-	1,0	-	1,2	1,3
5	26,1	1,5	1,6	1,0	-	1,0	-
6	22,4	1,2	1,3	1,3	1,4	1,2	1,3
7	13,9	0,8	-	1,4	1,5	1,2	1,3

^a Cálculo:⁵⁹ Para cada sinal de ^{13}C de **2** no espectro de RMN, a razão da altura do sinal foi calculada usando uma posição enriquecida e uma posição não enriquecida (C-4 para [1- ^{13}C]acetato e [4- ^{13}C]metilmalonato; C-5 para [1- ^{13}C]glicose) fornecendo o valor R ($R = \text{intensidade}_{\text{sinal}} / \text{intensidade}_{\text{posição referência (não enriquecida)}}$). O valor r ($r = R_{\text{grupo ensaio}} / R_{\text{grupo controle}}$) foi calculado para todas as posições de **2**. O enriquecimento em cada posição foi dado pelo produto de r por 1,1, que é a abundância natural de ^{13}C .

^b sinal de C-1 sobreposto com o sinal do solvente; ^c amostra diluída, sinal não apareceu no espectro.

⁵⁹ Maier, W.; Shneider, B.; Strack, D. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 521-524

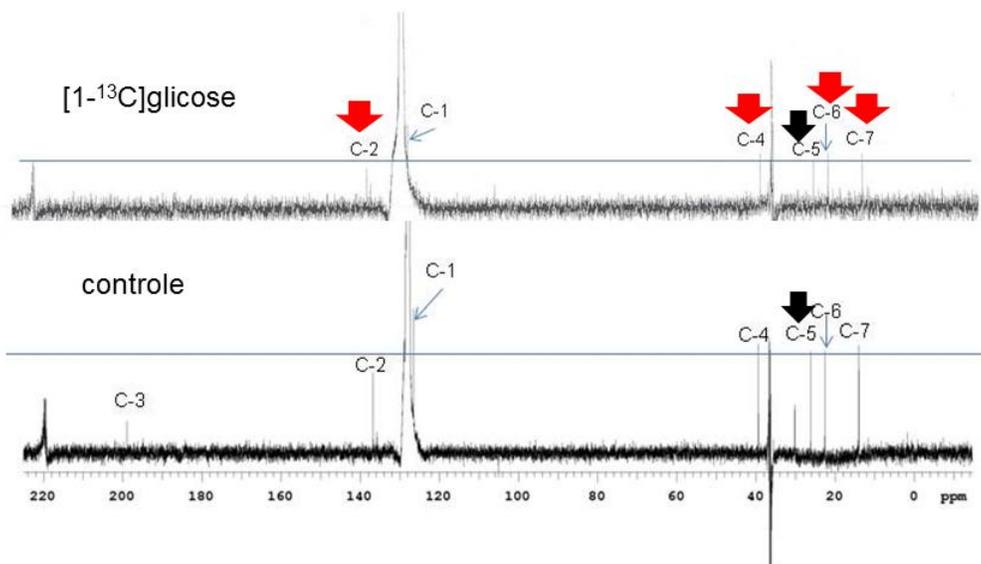
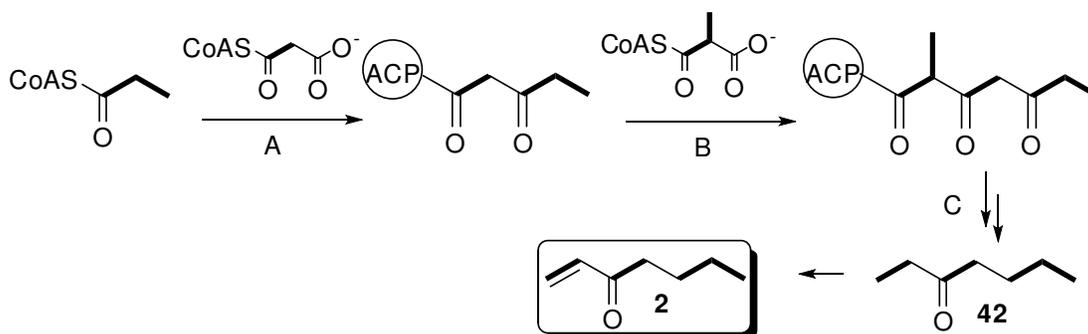


Figura 18. Espectros de RMN de ^{13}C (125,71 MHz) dos experimentos de biossíntese de **2** em *Iporangaia pustulosa* em benzeno- d_6 . As flechas pretas indicam os sinais de referência e as vermelhas indicam as posições enriquecidas.



Esquema 17. Esquema geral da rota biossintética proposta para **2** em *Iporangaia pustulosa*. A) Condensação de propionil-CoA com metilmalonil-CoA; B) Condensação com metilmalonil-CoA; C) Redução, desidratação, redução, hidrólise do tio éster e descarboxilação; D) Desidrogenação.

Uma cetona similar a **2**, 4-metil-3-hexanona, produzida pela formiga *Harpegnathos saltator* (Formicidae: Ponerinae), teve a rota biossintética estudada por Jarvis e colaboradores,⁶⁰ que propuseram uma combinação de unidades acetato e propionato. Entre os aracnídeos, o ácaro *Chortoglyphus arcuatus* (Arachnida, Astigmata), produz o feromônio de agregação (4*R*,6*R*,8*R*)-trimetildecano-2-ona (*chortolure*) a partir de quatro propionatos e um acetato.⁶¹ Não há relatos de estudos biossintéticos com aracnídeos, exceto este último com ácaros.

O mecanismo de dessaturação do precursor **42** (Esquema 17-D) não pôde ser elucidado nestes experimentos, mas parece ser realizado por uma desaturase não usual. As desaturases de insetos conhecidas não inserem duplas ligações em posições terminais e nem α,β -carbonila.⁶² Embora desconhecido, este mecanismo deve ser comum para a biossíntese de vinil cetonas em opiliões. Estes compostos são tão característicos da família Gonyleptidae que são chamados de *gonyleptidae ketones*, indicando que possuem a função ceto na posição 3 e uma insaturação α,β -carbonila.^{16,15,30}

Um exame mais detalhado dos resultados obtidos no experimento com [¹³C₃]propionato indica a existência de rotas biossintéticas distintas para as unidades C₃ iniciadoras e extensoras, evidenciadas pelo o enriquecimento de 15% em C-1 e C-2 é menor do que nas posições C-5, C-6 e C-7, que foi de ~44%. Além disso, analisando mais profundamente os resultados da alimentação com [4-¹³C]metilmalonato, [1-¹³C]acetato e [1-¹³C]glicose, podemos ver que diversas posições relativas a unidades C₃ foram marcadas de maneira inesperada por estes precursores (Esquema 16).

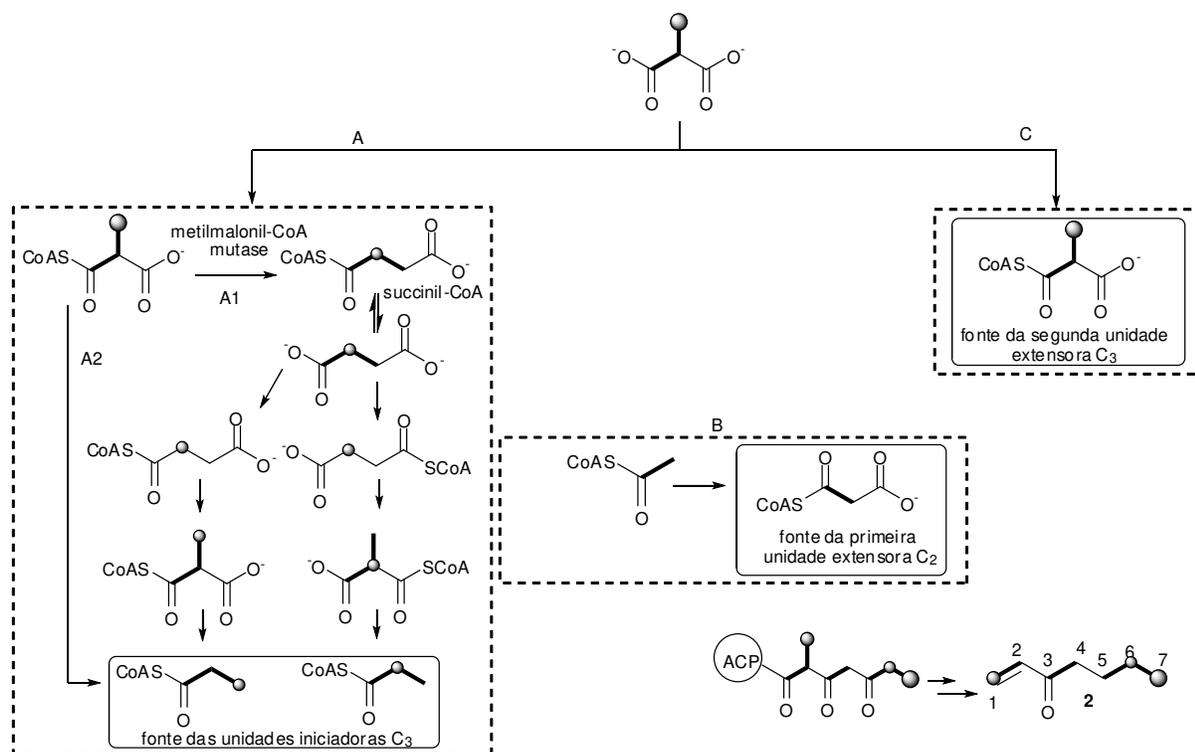
Quando oferecido [4-¹³C]metilmalonato a posição C-6 não deveria ser marcada, pois o esperado era apenas a marcação na posição C-7. Assim, o enriquecimento em C-6 (1,5%) e C-7 (2,3%) corrobora com duas fontes diferentes da unidade iniciadora. A incorporação em C-7, que é mais intensa, vem da incorporação direta do precursor descarboxilado, que forma [3-¹³C]propionato (Esquema 18-A2). Por outro lado, C-6 é enriquecida pela incorporação de [2-¹³C]propionato, fruto do embaralhamento da

⁶⁰ Jarvis, A. P.; Liebig, J.; Hölldobler, B.; Oldham, N. J. *Chem. Commun.* **2004**, 1196-1197

⁶¹ Schulz, S.; Fuhlendorff, J.; Steidle, J. L. M.; Collatz, J.; Franz, J. T. *ChemBioChem* **2004**, 5, 1500-1507

⁶² Morgan, E. D. *Biosynthesis in Insects – Advanced Edition*. Cambridge: RSC Publishing, **2010**, 72-76

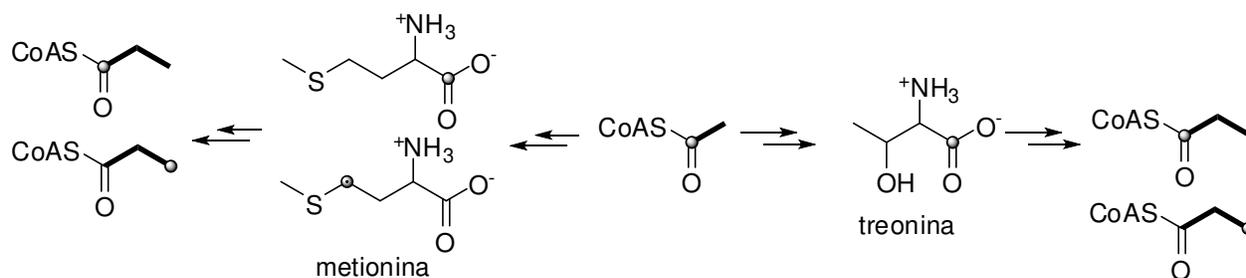
marcação pelo equilíbrio entre succinato e succinil-CoA após a participação da enzima metilmalonil-CoA mutase. Esta etapa gera o succinato, um intermediário simétrico, que possibilita a mudança de posição do carbono marcado na unidade C₃ quando volta a formar succinil-CoA (Esquema 18-A1).⁶³ O enriquecimento em C-1 (1,9%) era esperado, e vem da incorporação direta de [4-¹³C]metilmalonil-CoA como segunda unidade extensora (Esquema 18-C). A ausência de enriquecimento em C-2 e o enriquecimento em C-6 confirmam fontes distintas de unidades C₃ extensoras e iniciadoras. Outra informação importante obtida da alimentação com [4-¹³C]metilmalonato é que as posições referentes a unidades C₂ não são enriquecidas (Esquema 18 B), indicando que não ocorre a conversão de propionato/metilmalonato em acetato.



Esquema 18. Rota biossintética proposta para 1-hepten-3-ona (2) em *Iporangaia pustulosa* a partir da alimentação com [4-¹³C]metilmalonato e padrão de marcação isotópica observado.

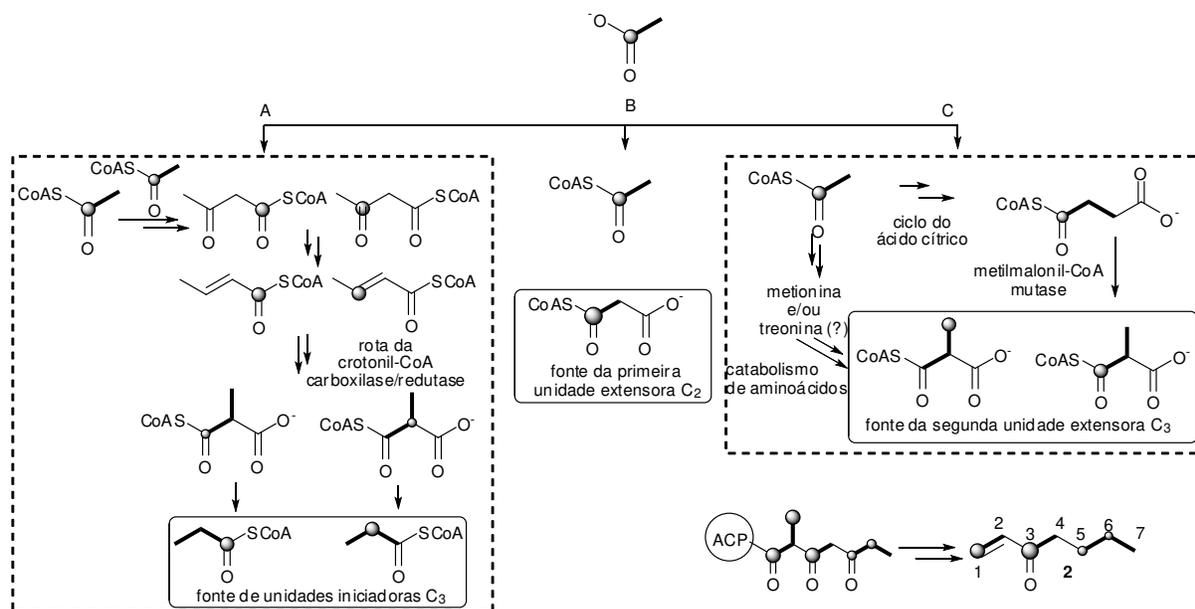
⁶³ Chan, Y. A.; Podevels, A. M.; Kevany, B. N.; Thomas, M. G. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 90-114

A marcação de **2** obtida com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato produziu enriquecimento nas posições C-1, C-3, C-5 e C-6, sendo que somente a posição C-3 era esperada (Esquema 16). As posições C-1, C-5 e C-6 são correspondentes a unidades propionato, indicando que o precursor C_2 foi convertido para C_3 . Assim como na alimentação com $[4-^{13}\text{C}]$ metilmalonato, a ausência de incremento na posição C-2 sugere um conjunto de unidades extensoras C_3 diferente das unidades iniciadoras, pois a posição C-6 é enriquecida. O enriquecimento similar em C-5 (1,8%) e C-6 (1,5%) sugere que estas marcações são provenientes do mesmo conjunto das unidades iniciadoras $[1-^{13}\text{C}]$ ou $[2-^{13}\text{C}]$ propionil-CoA. Estas unidades podem vir do acetato via crotonil-CoA carboxilase/reductase,⁶³ após a condensação de duas unidades acetyl-CoA e conversão em butirato, passando por metilmalonil-CoA (Esquema 20-A). A presença de metilmalonil-CoA mutase gera uma unidade $[1-^{13}\text{C}]$ metilmalonil-CoA, que quando incorporada como extensora, perde seu carbono na etapa de descarboxilação (Esquema 17) e não marca **2**. A posição C-1 (2,8%) é enriquecida por $[4-^{13}\text{C}]$ metilmalonil-CoA, que pode ser proveniente de metionina e/ou treonina sintetizadas a partir de $[1-^{13}\text{C}]$ acetato⁶⁴ (Esquema 20-C, Esquema 19), mas outros experimentos são necessários para esclarecer este padrão de marcação.



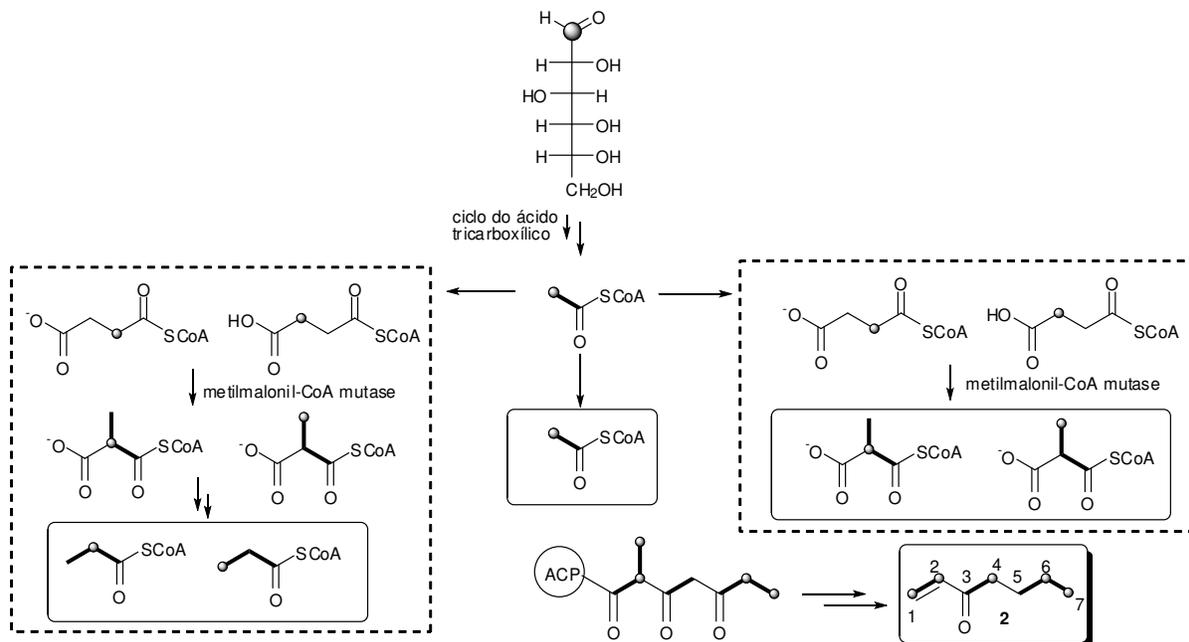
Esquema 19. Metabolismo de $[1-^{13}\text{C}]$ acetato pela rota dos aminoácidos metionina e treonina.

⁶⁴ Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry* 5 ed. New York: Freeman, 2008, 673-706



Esquema 20. Rota biossintética proposta para 1-hepten-3-ona (**2**) em *Iporangaia pustulosa* a partir da alimentação com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato e padrão de marcação isotópica observado.

A alimentação com $[1-^{13}\text{C}]$ glicose produziu enriquecimento em C-2, C-4, C-6 e C-7. Esta marcação também é consistente com nossa hipótese (Esquema 21), onde uma molécula de glicose quebra em duas unidades piruvato, que podem gerar uma unidade $[2-^{13}\text{C}]$ acetato e uma unidade acetato não marcada. As posições de enriquecimento neste grupo foram diferentes do grupo alimentado com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato e o enriquecimento foi menor. Não foi possível medir o enriquecimento no C-1 devido à sobreposição com o sinal do solvente. Como C-3 não foi observado no espectro devido à baixa concentração, podemos considerar que não houve incremento no sinal referente a esta posição. O carbono C-5 também não foi enriquecido. A ausência de enriquecimento nas posições C-3 e C-5 corrobora para nossa hipótese de duas unidades propionato e uma acetato formando a cadeia policetídica originária de **2** (Esquema 17).



Esquema 21. Rota biossintética proposta para 1-hepten-3-ona (**2**) em *Iporangaia pustulosa* a partir da alimentação com [1-¹³C]glicose e padrão de marcação isotópica observado.

A presença de metilmalonil-CoA mutase e de vitamina B₁₂ é comum entre os vertebrados, realizando a conversão de metilmalonil-CoA em succinil-CoA.⁶⁵ Contudo, os experimentos de biossíntese com *I. pustulosa*, que é um artrópode invertebrado, indicam a participação desta enzima (Esquema 18 e Esquema 20). Entre os insetos, apenas cupins que possuem vitamina B₁₂ e realizam esta conversão,^{66,67} mas a participação da metilmalonil-CoA mutase já foi reportada para outros artrópodes.⁶⁸ A participação desta enzima em insetos e artrópodes envolve tanto a transformação de succinato em propionato,^{66a} quanto a reação inversa de propionato para succinato.⁶⁸

⁶⁵ Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry* 5 ed. New York: Freeman, **2008**, 656-660

⁶⁶ a) Chu, A. J.; Blomquist, G. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *201*, 304-312; b) Wakayama, E. J.; Dillwith, J. W.; Howard, R. W.; Blomquist, G. J. *Insect Biochem.* **1984**, *14*, 175-179; c) Guo, L.; Quilici, D. R.; Chase, J.; Blomquist, G. J. *Insect Biochem.* **1991**, *21*, 327-333

⁶⁷ Blomquist, G. J.; Halankar, P. P.; Dwyer, L. A. Propionate and methyl malonate metabolism in insects, in: *ACS Symposium Series, Bioregulators for Pest Control*, Vol. 276. Washington D.C.: ACS, **1985**, 245-253

⁶⁸ a) Halarnkar, P. P.; Chambers, J. D.; Wakayama, E. J.; Blomquist, G. J. *Comp. Biochem. Physiol.* **1987**, *88B*, 869-873; b) Halarnkar, P. P.; Blomquist, G. J. *Comp. Biochem. Physiol.* **1989**, *92B*, 227-231

O equilíbrio entre succinato e succinil-CoA que gera o embaralhamento de sinais na alimentação com [4-¹³C]metilmalonato (Esquema 18-A) já foi relatado para a biossíntese do antibiótico creimicina por *Streptomyces* sp. MJ635-86F5. Este metabólito é formado por duas unidades propionato e onze acetato, com um metabolismo peculiar do propionato. A principal fonte deste precursor é a succinil-CoA proveniente do ciclo do ácido tricarboxílico, que é hidrolisada e forma o succinato, um intermediário simétrico. Assim, a marcação do precursor oferecido pode transferir-se para outra posição da succinil-CoA, formando dois isotopômeros diferentes.⁶⁹

Insetos que não possuem a enzima metilmalonil-CoA realizam o catabolismo de propionato através da oxidação para 3-hidróxi-propionato e descarboxilação, gerando acetato.^{67,68b,70} Esta transformação não foi detectada para *I. pustulosa*, já que as posições C-3 e C-5, correspondentes à unidade acetato, não foram marcadas quando alimentadas com [¹³C₃]propionato ou [4-¹³C]metilmalonato (Esquema 16).

A conversão de unidades C₂ em C₃ foi relatada na biossíntese de feromônios de besouros do gênero *Carpophilus* (Nitidulidae) onde ocorre a α-oxidação e descarboxilação do butirato,⁷¹ porém, este mecanismo não explica o padrão de marcação observado para a incorporação de [1-¹³C]acetato em *I. pustulosa*. Chan e colaboradores revisaram as fontes de propionato e metilmalonato em microorganismos, e a rota da crotonil-CoA carboxilase/redutase também transforma unidades C₂ em unidades C₃.⁶³ Neste caminho biossintético, duas moléculas acetato são condensadas e a cadeia policetídica é reduzida e desidratada formando crotonil-CoA, que após várias transformações, é convertida em metilmalonil-CoA, e então, em propionil-CoA. Esta rota foi relatada pela primeira vez para *Streptomyces cinnamomensis* como fonte de metilmalonil-CoA a qual é precursora de metabólitos secundários.⁷²

⁶⁹ Amagai, K.; Kudo, F.; Eguchi, T. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8559-8563

⁷⁰ Halarnkar, P. P.; Nelson, J. H.; Heisler, C. R.; Blomquist, G. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *236*, 526-534

⁷¹ a) Petroski, R. J.; Bartelt, R. J.; Weisleder, D. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *24*, 69-78; b) Bartelt, R. J.; Weisdler, D. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 429-438

⁷² Li, C.; Florova, G.; Akopiants, K.; Reynolds, K. A. *Microbiol.* **2004**, *150*, 3463-3472

O mecanismo de seleção dos blocos construtores que são carregados nos módulos das PKS ainda não foi totalmente elucidado e, às vezes, pode mostrar-se mais complexo do que a simples entrada de derivados de ácidos carboxílicos. Segundo Hertweck, o modo de ação das PKS modulares em bactérias pode ser alterado quando complexos enzimáticos participam desta seleção, com a utilização de conjuntos alternativos de unidades extensoras e outros blocos construtores.⁵⁵ Um exemplo é a biossíntese da kirromicina (Figura 19), um policetídeo de estrutura complexa produzido por *Streptomyces collinus*. Nesta rota biossintética, o carregamento de malonil-CoA, metilmalonil-CoA e etilmalonil-CoA é controlado por entidades trans-aciltransferase autônomas, que interagem com módulos específicos da PKS.⁷³ Embora estes relatos sejam relativos a micro-organismos, podem explicar parte da marcação inesperada observada no experimento de biossíntese com *I. pustulosa*.

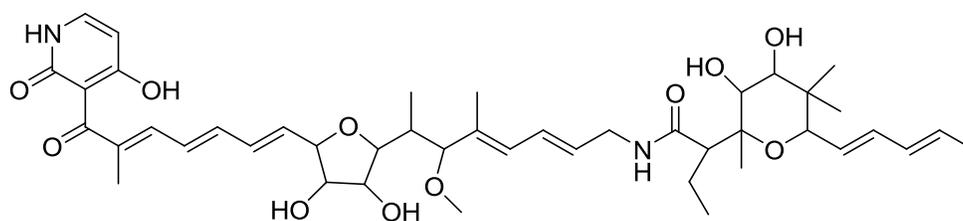


Figura 19. Estrutura da kirromicina.

3.5.1.2. Presença de análogos estruturais com origem biossintética semelhante

Na análise por CG-EM do exudato de *I. pustulosa* sem solvente e com o detector ativado durante toda a análise foram detectados análogos menores e mais voláteis do que **2**, como **43** e **44**, com 5 e 6 carbonos, respectivamente. A presença destes análogos dá informações sobre a formação de vinilcetonas em opiliões. Levando em conta a rota biossintética proposta para a vinil cetona **2**, a biossíntese inicia-se com a adição inicial de propionato (Pr), seguida de acetato (Ac) e propionato (Pr), o qual sofre

⁷³ Weber, T.; Laiple, K. J.; Pross, E. K.; Textor, A.; Grond, S.; Welzel, K.; Pelzer, S.; Vente, A.; Wohlleben, W. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 175-188

descarboxilação e mantém apenas os dois carbonos correspondentes ao grupo vinila e é representado como Pr* na Figura 20. Assim, para a formação de **2** (Pr+Ac+Pr) foi alterada com a adição de dois propionatos em sequência (Pr+Pr). No caso de **44**, a alteração na sequência foi a incorporação da unidade iniciadora acetato ao invés de propionato, incorporando duas unidades acetato seguidas pelo propionato.

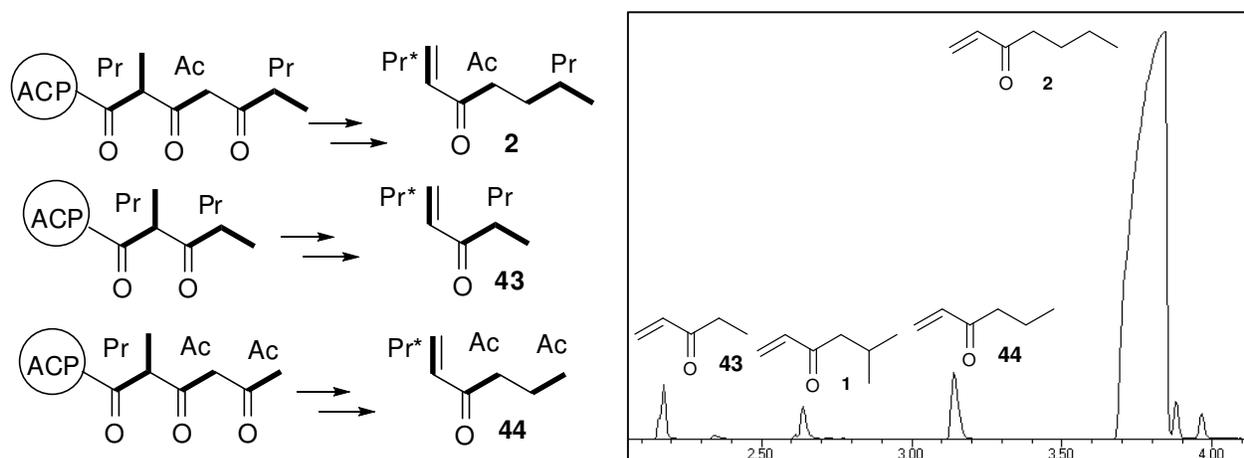


Figura 20. Biossíntese proposta para **2**, **43** e **44** e cromatograma do exudato de *Iporangaia pustulosa* sem solvente contendo traços de intermediários biossintéticos análogos ao composto majoritário **2**.

3.5.2. Estudo da biossíntese da benzoquinona **41** em *Magnispina neptunus*

Para verificar se a rota biossintética policetídica da vinil cetona **2** realizada por *I. pustulosa* é válida para espécies da família Gonyleptidae produtoras de outras classes de metabólitos, estudamos a biossíntese de benzoquinonas em *Magnispina neptunus*. Esta espécie foi quimicamente caracterizada anteriormente⁴¹ e o exudato contém 81,4% de 2-etil-1,4-benzoquinona (**41**) e 18,6% de 2-metil-1,4-benzoquinona (**40**). A atribuição dos sinais foi confirmada pela análise de RMN 2D (HMBC, Anexo 26, Tabela 9), o qual foi fundamental para a correta interpretação dos dados de incorporação dos precursores marcados.

Os indivíduos foram divididos em dois grupos experimentais e alimentados com [1-¹³C]acetato e [4-¹³C]metilmalonato e os exudatos analisados por RMN de ¹³C (Figura 21). O enriquecimento obtido foi característico da rota de compostos aromáticos policetídicos apresentando marcações em posições alternadas do anel aromático.

O grupo alimentado com [4-¹³C]metilmalonato comprovou que a cadeia policetídica é iniciada com propionato, pois a única posição enriquecida é a C-8. Esta marcação corresponde à incorporação de [3-¹³C]propionato, forma descarboxilada do precursor oferecido. Este resultado também mostra que o catabolismo de propionato para acetato via 3-hidroxi-propionato não ocorre, pois as porções da benzoquinona correspondentes a unidades acetato não foram marcadas.

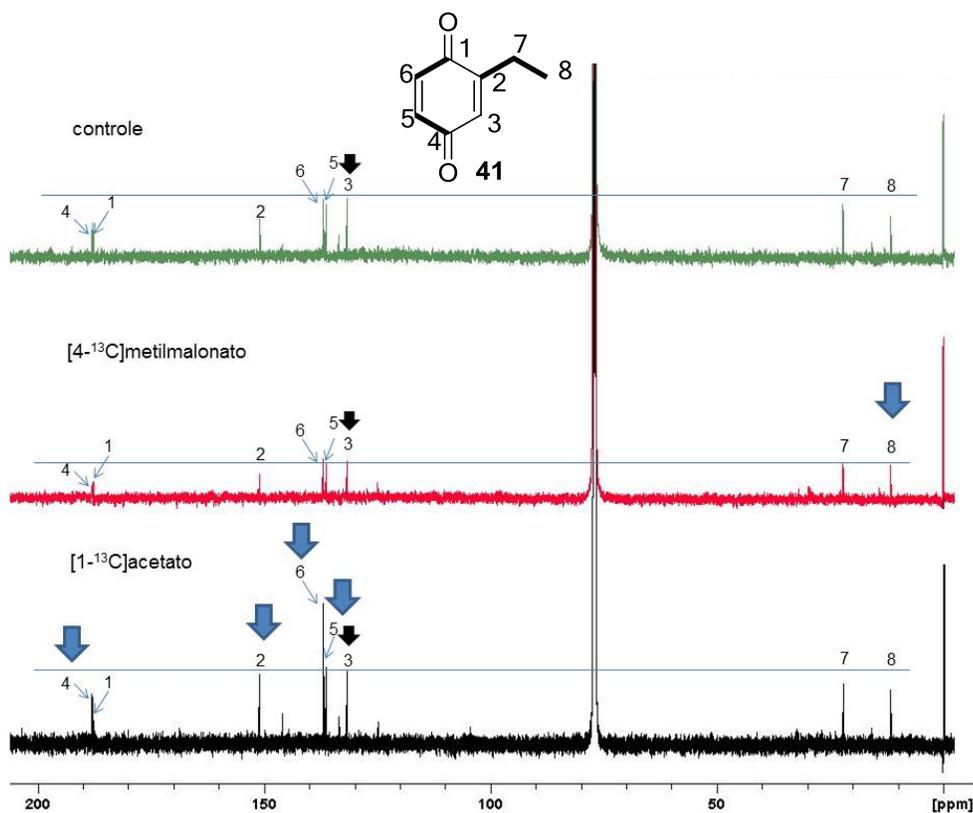
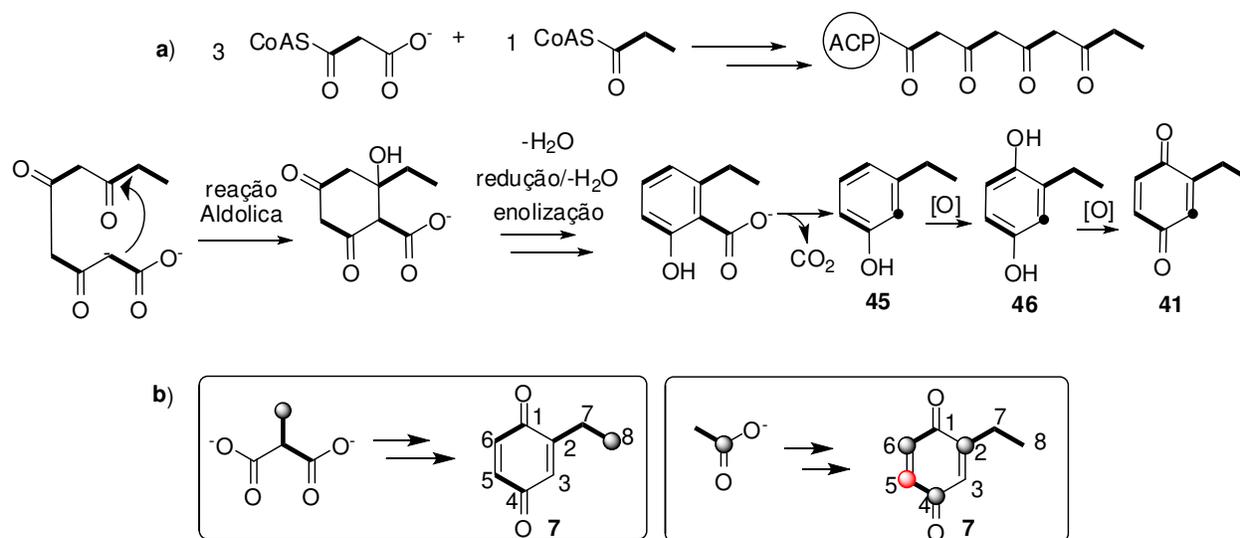


Figura 21. Espectros de RMN de ¹³C (CDCl₃) do experimento de biossíntese de **41** em *Magnispina neptunus*. Flechas pretas: sinais de referência. Flechas azuis: posições enriquecidas.

Tabela 9. Marcação da 2-etil-1,4-benzoquinona (**41**) por alimentação de *Magnispina neptunus* com precursores marcados com ^{13}C .

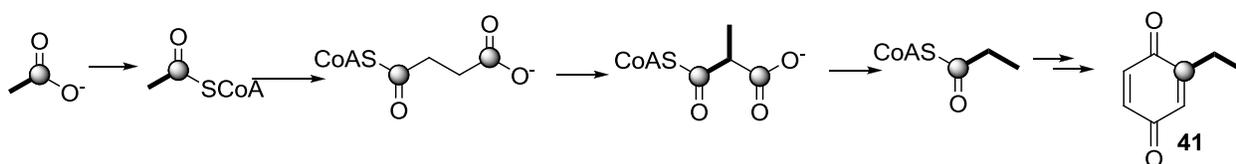
Posição	δ (ppm)	Enriquecimento (%) ^a	
		[1- ^{13}C]acetato	[4- ^{13}C] metilmalonato
1	187,5	-	-
2	150,9	1,6	-
3	131,7	-	-
4	187,9	1,3	-
5	136,3	1,3	-
6	136,8	2,1	-
7	22,1	-	-
8	11,6	-	1,4

^a C-3 utilizado como referência



Esquema 22. A) Rota biossintética proposta para 2-etil-1,4-benzoquinona (**41**) em *Magnispina neptunus*. B) Padrão de marcação isotópica observado a partir da alimentação com [1- ^{13}C]acetato e [4- ^{13}C]metilmalonato. Círculos pretos indicam marcação com ^{13}C . Círculo vermelho indica marcação inesperada.

No grupo alimentado com $[1-^{13}\text{C}]$ acetato, o enriquecimento nas posições C-4 (1,3%) e C-6 (2,2%) são provenientes da incorporação de duas unidades extensoras $[1-^{13}\text{C}]$ malonato. A última unidade extensora perde seu carbono marcado na forma de $^{13}\text{CO}_2$, não marcando o produto final. O enriquecimento em C-2 (1,6%) provem da incorporação de $[1-^{13}\text{C}]$ propionato, originado da conversão da unidade C_2 em C_3 via succinil-CoA. A biossíntese de **2** em *I. pustulosa* passa pelo mesmo mecanismo, porém a benzoquinona **41** de *M. neptunus* não apresentou embaralhamento de marcação na unidade C_3 .

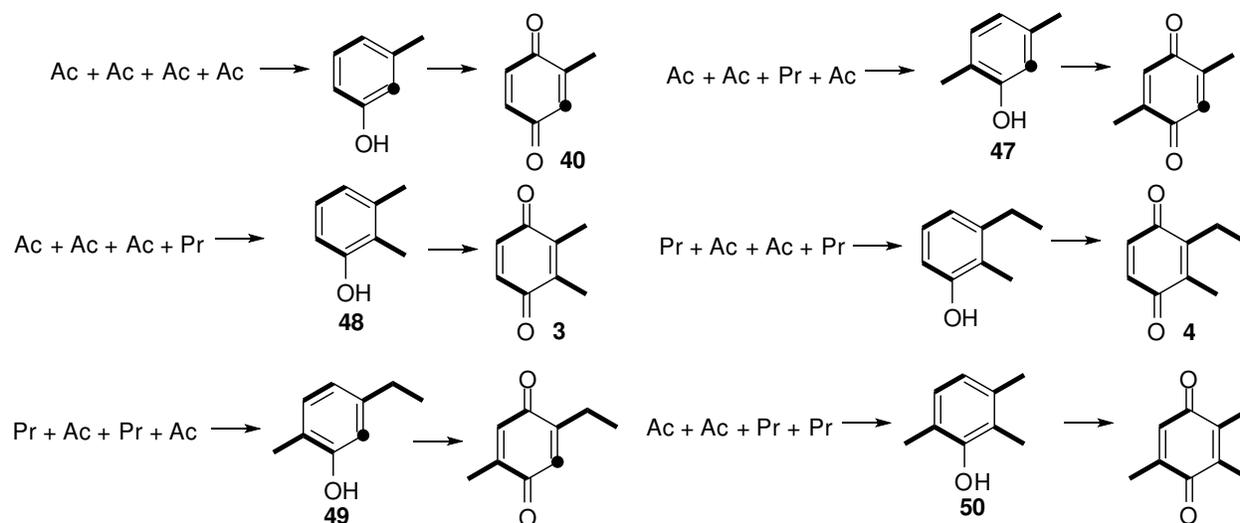


Esquema 23. Biossíntese da unidade iniciadora C_3 da 2-etil-1,4-benzoquinona (**41**) em *Magnispina neptunus*.

A marcação em C-5 por $[1-^{13}\text{C}]$ acetato é inesperada, pois esta posição corresponde ao C-2 do acetato. Contudo, o enriquecimento em C-4 e C-5, que pertencem à mesma unidade acetato é idêntico, e C-2 e C-6, que pertencem a duas unidades acetato distintas, enriqueceram 1,6% e 2,2%, respectivamente. Considerando que as três unidades extensoras são malonato, seu metabolismo deveria ser idêntico, e esta variação na marcação indica a existência de mais de uma rota para produzir e carregar malonato no domínio hipotético da PKS correspondente à segunda unidade extensora. Fatos semelhantes foram observados e sugeridos no experimento com *I. pustulosa*, porém, nas unidades C_3 .

A benzoquinona **40**, composto minoritário da secreção de *M. neptunus*, possui um substituinte metila, indicando que a troca da unidade iniciadora por um acetato muda a cadeia policetílica formada (Esquema 24). Este metabólito não pode ser analisado por RMN devido sua baixa abundância, contudo, seu caminho biossintético deve ser similar ao de **41**. Este raciocínio também pode ser aplicado a outras benzoquinonas detectadas em nove espécies da família Gonyleptidae.⁴¹ Para tanto,

alterações na organização das unidades extensoras e iniciadoras durante a formação da cadeia policetídica são responsáveis pela formação dos análogos alquil-1,4-benzoquinonas que ocorrem nesta família.⁴¹



Esquema 24. Rota biossintética proposta para benzoquinonas e fenóis encontrados em opiliões da família Gonyleptidae. Círculos pretos indicam uma unidade acetato descarboxilada.

Meinwald e colaboradores sugeriram que ambos os aminoácidos aromáticos, tirosina e fenilalanina, e acetato e propionato são precursores de benzoquinonas no besouro *Eleodes longicollis*. Porém, a biossíntese das benzoquinonas substituídas ocorre exclusivamente via policetídeos, pois a incorporação de acetato e propionato marcado ocorre somente em **40** e **41**.⁷⁴ Sun e Toia observaram a incorporação de 4 unidades [¹³C₂] acetato na biossíntese de 2,4-dihidroxiacetofenona na formiga *Rhytidoponera chalybaea*, mostrando a origem policetídica de compostos aromáticos em insetos.⁷⁵

A rota biossintética da benzoquinona **41** proposta pelo nosso grupo (Esquema 22)⁴¹ envolve a enolização das carbonilas da cadeia policetídica ciclizada e descarboxilação, gerando o fenol **45**. Este pode ser o passo final para a biossíntese dos fenóis **47-50** dos opiliões *Metarthrodes longipes*, *Mitopernoides variabilis* e

⁷⁴ Meinwald, J.; Koch, K. F.; Rogers Jr., J. E.; Eisner, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1590-1592

⁷⁵ Sun, C. M.; Toia, R. F. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 953-956

Progonyleptoidellus striatus (Esquema 24). A benzoquinona **3** e o fenol **49** são produzidos pelo opilião *Zygopachylus albimarginis*,⁷⁶ o que pode ser mais uma evidência de que opiliões utilizam a mesma rota biossintética para estas duas classes de metabólitos.

Continuando na rota biossintética proposta, a espécie fenólica **45** pode sofrer *p*-oxidação formando a *p*-hidroquinona **46**, que é oxidada novamente formando a *p*-benzoquinona **41**. Esta hipótese pode ser sustentada pela presença de benzoquinonas e de traços das 1,4-hidroquinonas correspondentes na secreção de algumas espécies de opiliões previamente investigadas (Figura 22). As espécies *S. proximum*, *R. virescens* e *C. picea*, estudadas neste trabalho, produzem as benzoquinonas **3** e **4**, que provavelmente têm a mesma origem biossintética.

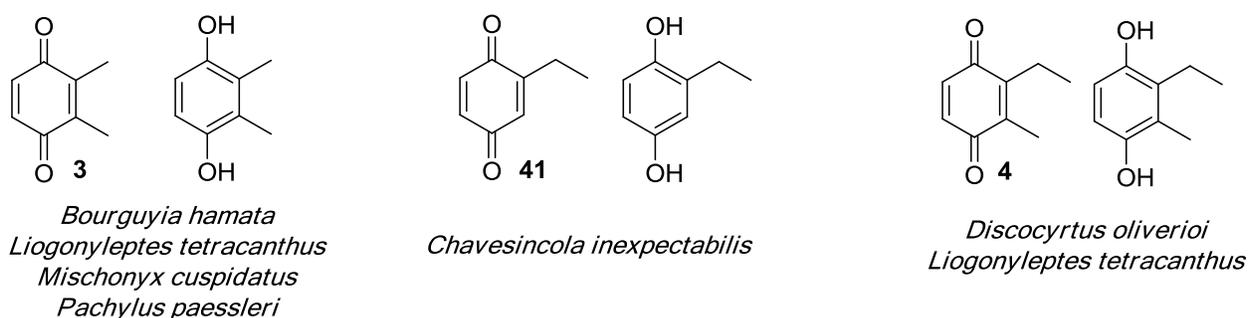


Figura 22. Benzoquinonas e hidroquinonas correspondentes encontradas em exudatos de opiliões da família Gonyleptidae.

Um exemplo clássico da oxidação de *p*-hidroquinonas é descrita para besouros bombardeiros (Carabidae), que por ação de catalase geram *p*-benzofenonas, água e calor.⁷⁷ Besouros da família Tenebrionidae também produzem 1,4-benzoquinonas a partir da oxidação de 1,4-hidroquinonas.^{11,78} Entre os artrópodes que não são insetos, milípedes também produzem benzoquinonas e hidroquinonas em suas secreções de

⁷⁶ Eisner, T.; Jones, T. H.; Hicks, K.; Silberglied, R. E.; Meinwald, J. *J. Chem. Ecol.* **1977**, *3*, 321-329

⁷⁷ a) Eisner, T. *J. Insect Physiol.* **1958**, *2*, 215-220; b) Schildknecht, H.; Holoubek, K. *Angew. Chem.* **1961**, *73*, 1-7; c) Eisner, T.; Jones, T. H.; Aneshansley, D. J.; Tschinkel, V. R.; Silberglied, R. E.; Meinwald, J. *J. Insect Physiol.* **1977**, *23*, 1383-1386

⁷⁸ a) Happ, G. M. *J. Insect Physiol.* **1968**, *14*, 1821-1837; b) Ikanl, R.; Cohen, E.; Shulov, A. *J. Insect Physiol.* **1970**, *16*, 2201-2206

defesa.⁷⁹ Mesmo sem experimentos de marcação isotópica, Deml e Huth sugeriram que a *p*-oxidação de hidroquinonas dá origem às benzoquinonas nestes artrópodes.^{79b}

3.5.3. Considerações gerais sobre o metabolismo de propionato e metilmalonato em opiliões

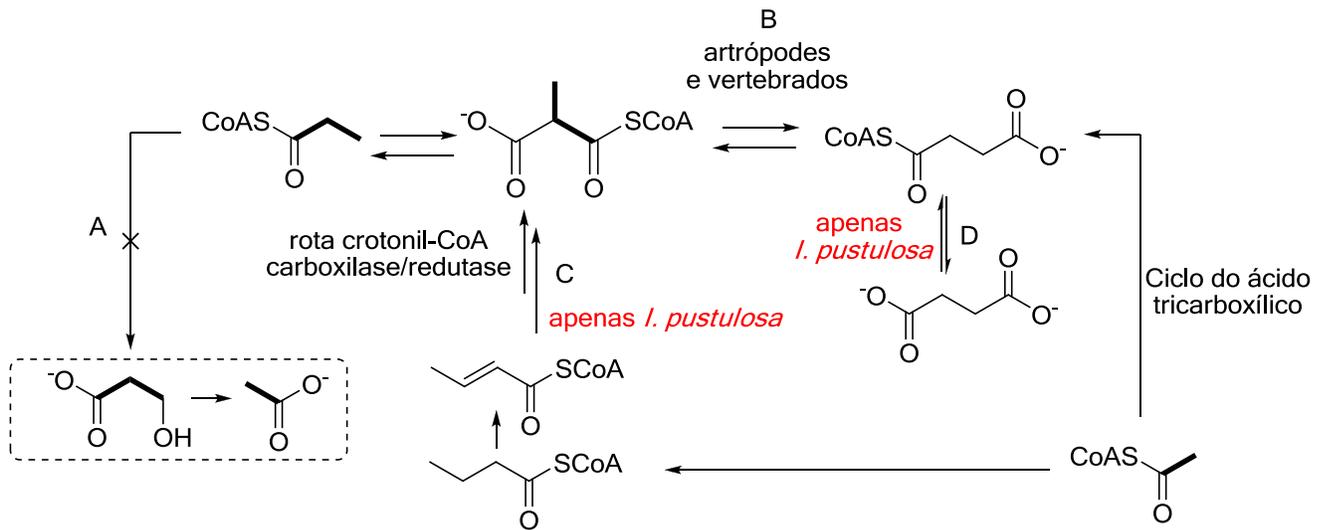
O catabolismo de propionato para acetato via 3-hidroxi-propionato relatado para insetos com ou sem vitamina B₁₂^{67,68b} não foi detectado em *M. neptunus*, bem como em *I. pustulosa* (Esquema 25-A). Este é um fator que diferencia o catabolismo de propionato nos artrópodes insetos e artrópodes que não são insetos relatados na literatura.^{67,68b} Nossos resultados indicam que opiliões catabolizam propionato para succinato via metilmalonil-CoA, devido à presença de metilmalonil-CoA mutase (Esquema 25-B).

De maneira análoga, a presença de metilmalonil-CoA mutase na conversão de unidades C₂ em C₃ e vice-versa parece ser uma chave metabólica importante na diferenciação de insetos e outros artrópodes. Esta atividade foi observada em ambas as espécies, com transformação de succinil-CoA (que pode ser proveniente do ciclo do ácido cítrico) em metilmalonil-CoA e vice-versa. Este resultado já era esperado para opiliões, já que artrópodes que não são insetos realizam esta conversão.⁶⁸

As fontes das unidades C₃ propionato e metilmalonato em *I. pustulosa* são diversificadas e complexas. O embaralhamento da marcação nas unidades C₃ iniciadora e extensora indica a participação da rota crotonil-CoA carboxilase/reductase e o equilíbrio succinil-CoA – succinato, respectivamente (Esquema 25-C e D). Porém, o mais intrigante é o padrão de marcação distinto nas unidades C₃, indicando a preferência por fontes diferentes quando iniciadora e quando extensora. Estudos mais detalhados são necessários para completo entendimento deste sistema, e os resultados

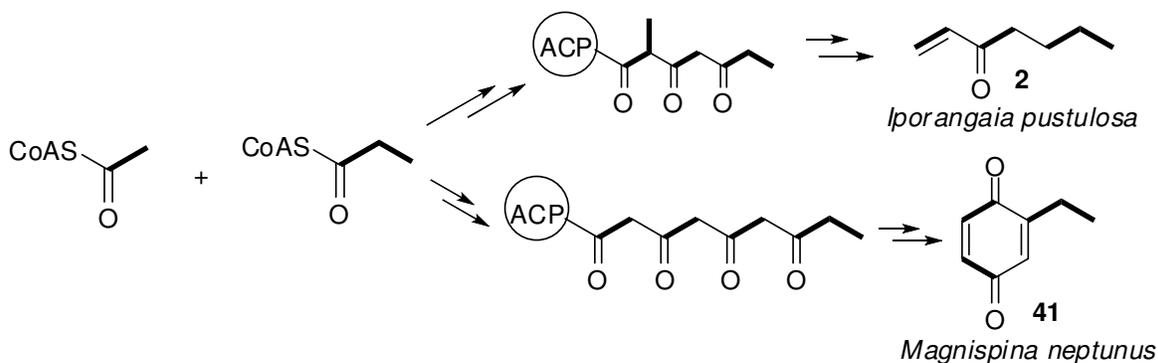
⁷⁹ a) Eisner, T.; Alsop, D.; Hicks, K.; Meinwald, J. Defensive secretions of millipeds. In: *Handbook of experimental pharmacology*, vol. 48. Ed. Bettini, S. Berlin: Springer, **1978**, 41–72; b) Deml, R.; Huth A. *Naturwissenschaften* **2000**, *87*, 80–82; c) Wu, X.; Buden, D. W.; Attygalle, A. B. *Chemoecology* **2007**, *17*, 131–138.; c) Vujisić, L. V.; Makarov, S. E.; Ćurčić, B. P. M.; Ilić, B. S.; Tešević, V. V.; Gođevac, D. M.; Vučković, I. M.; Ćurčić, S. B.; Mitić, B. M. *J. Chem. Ecol.* **2011**, *37*, 1358–1364

iniciais mostram que *I. pustulosa* é um organismo interessante para o estudo comparativo de rotas biossintéticas em artrópodes. Todavia, o metabolismo das unidades extensoras e iniciadoras em *M. neptunus* é mais simples, e nossos resultados indicam apenas um ponto da cadeia policetídica onde ocorre uma rota paralela de obtenção de unidade C₂.



Esquema 25. Aspectos gerais do metabolismo de propionato para *Iporangaia pustulosa* e *Magnispina neptunus*.

Os estudos biossintéticos de *M. neptunus* e de *I. pustulosa* nos permitem propor que a rota policetídica é comum nestas espécies filogeneticamente distantes (Esquema 26). Além disso, a marcação irregular em alguns pontos específicos da cadeia policetídica indicam diferentes fontes de propionato, caracterizando um metabolismo de propionato/metilmalonato em opções peculiar, que exige estudos mais aprofundados para maior entendimento deste sistema.



Esquema 26. Rota biossintética de vinil cetona e benzoquinona em *Iporangaia pustulosa* e *Magnispina neptunus*.

Considerando a filogenia de opiliões da família Gonyleptidae, a produção de benzoquinonas é uma plesiomorfia⁸⁰ que evoluiu em alguns táxons para a produção de vinil cetonas e alquil fenóis. Paralelamente, a evolução destes mesmos táxons alterou o habitat destes opiliões. Aquelas espécies que produzem benzoquinonas vivem embaixo de pedras ou troncos podres, enquanto as espécies que passaram a produzir fenóis ou vinil cetonas passaram a viver na vegetação, mais longe do chão.¹⁷ Esta tendência evolutiva parece utilizar o conjunto de enzimas e de unidades formadoras da cadeia policetídica de maneira a obter compostos adequados a esta mudança ambiental e aos riscos que o opilião enfrenta, como predadores naturais e micro-organismos patogênicos.

As rotas lançadas aqui contribuem para o melhor entendimento da evolução das estratégias biossintéticas dessa família, bem como maior compreensão do arsenal enzimático responsável pela produção dos metabólitos secundários de opiliões.

⁸⁰ Característica primitiva que foi modificada a outra mais recente.

4. Conclusões

A caracterização química das secreções de defesa de opiliões contribui tanto para a organização filogenética das espécies, quanto para a descoberta de novos produtos naturais. Os exudatos das cinco espécies de opiliões estudadas aqui foram caracterizados por CG-EM e RMN, dando maior segurança na determinação da estrutura dos compostos. As espécies podem ser divididas em dois grupos, um contendo majoritariamente benzoquinonas e outro contendo vinil cetonas e piranil cetonas. Juntamente com estes dados, foi reportada a nova piranil cetona **5**, encontrada no exudato de duas espécies (*I. pustulosa* e *N. maximus*).³⁰ É a primeira vez que um composto de esqueleto di-hidropirano como **5** é reportado em opiliões.

Através da síntese química de **5**, foi possível realizar sua completa caracterização estrutural. As condições de ausência de umidade e de ácido, atmosfera inerte e alta temperatura e pressão são essenciais para que a reação hetero-Diels-Alder ocorra entre as moléculas da vinil cetona **2**, formando o aduto **5**. Embora o produto natural seja racêmico, estas exigências indicam a participação de uma enzima hetero-Diels—Alderase, viabilizando a biossíntese de **5** nas condições amenas *in vivo*. A presença de piranil cetonas análogas a **5** junto com outras vinil cetonas revela que esta classe de compostos é característica de um clado da família Gonyleptidae.

A determinação da configuração absoluta da vinil cetona (*R*)-**16**, componente das secreções de três espécies de opiliões, foi determinada através da síntese de *rac*-**16** e (*S*)-**16** e análise por CG-DIC com coluna quiral. Assim, foi revelado que o produto natural tem configuração *R* com >99% de *e.e.*, o que é contrário a dois relatos de 4-metil-3-cetonas produzidas por insetos.

Os estudos da biossíntese de **2** mostram que *I. pustulosa* segue a mesma rota sugerida para formigas, besouros e ácaros na produção de policetídeos acíclicos, com incorporação mista de unidades acetato e propionato. Considerando que a produção de vinil cetonas é comum para várias subfamílias da família Gonyleptidae (Gonyleptinae, Hernandariinae, Sodreaninae, Progonyleptoidellinae e Caelopyginae),^{15,30,41} o caminho biossintético formulado provavelmente é similar em outras espécies desta família. Esta hipótese é apoiada pelo estudo de *M. neptunus* (subfamília Heteropachylinae) na

produção da benzoquinona **41**, confirmando que a cadeia policetídica é formada por unidades acetato e propionato para a biossíntese tanto de vinil cetonas quanto de benzoquinonas. Porém, as etapas após a condensação destas unidades são distintas para as duas classes de compostos.

Há indícios da participação da metilmalonil-CoA mutase e algumas transformações paralelas na biossíntese de vinil cetonas em *I. pustulosa* e *N. maximus*. Contudo, o metabolismo de propionato em *M. neptunus* parece ser mais simples, envolvendo apenas a incorporação direta dos precursores oferecidos. Nenhuma das espécies estudadas realiza o catabolismo de propionato via 3-hidróxi-propionato, característico de insetos. Nossos resultados com a biossíntese vinil cetonas e benzoquinonas de opiliões, os primeiros na literatura, indicam que o metabolismo de propionato é um diferencial entre a biossíntese de metabólitos secundários em insetos e artrópodes que não são insetos.

5. Perspectivas futuras

Os resultados obtidos neste trabalho abrem caminho para vários outros estudos. Um tópico é a descoberta de uma nova classe de compostos de opiliões, obtidos pela reação de HDA. Esta investigação pode ser expandida para outras espécies da família Gonyleptidae que produzem vinil cetonas e seus dímeros. A confirmação de uma hetero-Diels-Alderase envolvida na obtenção destes adutos heterocíclicos pode trazer importante contribuição, tanto para o conhecimento da biossíntese destes compostos, quanto para a obtenção de piranos com outras atividades biológicas.

O desenvolvimento da síntese de **5** permite a obtenção de quantidades suficientes do composto puro para a realização de bioensaios com predadores naturais, tais como aranhas e formigas. Esses testes podem avaliar qual dos compostos (**2** ou **5**) tem maior efeito biológico, bem como compreender melhor a estratégia de defesa química das duas espécies estudadas.

Estudos biossintéticos com espécies de opiliões da família Gonyleptidae que produzem fenóis ainda não foram realizados. Estas informações podem auxiliar no entendimento das relações entre as rotas biossintéticas das três principais classes de metabólitos de exudatos desta família: benzoquinonas, fenóis e vinil cetonas. Além disso, estudos de biologia molecular poderiam comprovar a presença de metilmalonil-CoA mutase nestes aracnídeos.

6- Parte experimental

6.1. Equipamentos e métodos

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM): cromatógrafo à gás modelo 6890, marca Agilent/ Hewlett Packard e amostrador automático Agilent 7683B Series para 8 frascos. Espectros de massas foram obtidos com um detector seletivo de massas Hewlett Packard 5973 a 70 eV, 3,95 scans s^{-1} , varrendo de íons de m/z entre 40 e 450. Temperatura do injetor 250°C e interface 280°C. Hélio de alta pureza utilizado como gás de arraste com fluxo 1 mL^{-1} . Volumes de injeção de 1 μL foram utilizados no modo *splitless* para amostras naturais e *split* 1:20 para amostras sintéticas a 1 $mg.mL^{-1}$.

Método A: As análises das amostras naturais e sintéticas utilizaram programação de temperatura 50°C a 200°C com incremento de 10°C min^{-1} , e até 290°C a 16°C min^{-1} , com espera de 5 min. A coluna capilar utilizada foi a de sílica fundida HP-5 (30m x 0,25mm x 0,25mm).

Método B: A determinação do índice de retenção usou a temperatura de 50°C a 290°C com uma rampa de 4°C min^{-1} e mantida a 290°C por 20 min, a injeção foi feita em modo *splitless*, co-injetando as amostras naturais com uma mistura de hidrocarbonetos C_8 , C_{11} , C_{17} , C_{25} e C_{32} . A coluna capilar utilizada foi a de sílica fundida HP-5 (30m x 0,25mm x 0,25mm).

Método C: A análise do *headspace* por SPME utilizou fibra Supelco Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) 75 μm (*Black/plain*) e com padrão interno: undecano (0,5 $mg.mL^{-1}$) em hexano. Programação de temperatura 50°C a 200°C com incremento de 10°C. min^{-1} , e até 290°C a 16°C min^{-1} , com espera de 5 min. A coluna capilar utilizada foi a de sílica fundida HP-5 (30m x 0,25mm x 0,25mm).

Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC):

cromatógrafo à gás modelo 6890, marca Agilent. As temperaturas do injetor e do detector foram 220 e 250°C, respectivamente. Amostrador automático Agilent 6850 Series para 27 frascos, com injeção de 1 µL de amostra.

a) A análise de **5** utilizou coluna quiral do tipo similar a Lipodex E [octakis (3-*O*-butiril-2,6-di-*O*-pentil) γ -cyclodextrina] (28 m x 0.25 mm x 0.25 µm), que foi preparada pelo Prof. Ademir F. Morel da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Programação de temperatura a 85°C por 160 min, de 85 a 180°C a 10°C.min⁻¹ e mantida a 180°C por 10 min. H_{2(g)} de alta pureza como gás de arraste com fluxo de 1 mL.min⁻¹.

b) A análise de **16** empregou coluna Chrompack Chirasil ciclodextrina CB (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com temperatura de 40 °C a 100 °C a 3 °C min⁻¹, de 100 a 180 °C a 30 °C min⁻¹ e mantida a 180 °C por 20 min. H_{2(g)} de alta pureza como gás de arraste com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

Espectrometria de massas com ionização por eletronspray (EM-IES):

espectrômetro de massas híbrido LTQ-Orbitrap Thermo Fischer Scientific. N_{2(g)} usado para nebulização, dessolvatação e dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation* - CID). A amostra foi diluída em MeOH, com infusão direta em um fluxo de 10 µL min⁻¹ e detectada no modo positivo. *Sheat gas* = 8, voltagem do *spray* = 3,5 kV, voltagem do capilar= 43 V, temperatura do capilar= 275°C. Experimentos de varredura completa (faixa *m/z* 150–400) foram feitos em armadilha de íons (*trap*) linear e também no Orbitrap. Massas adquiridas como um perfil de dados a uma resolução de 30.000 em *m/z* 400. O controle automático de ganho (*automatic gain control*-AGC) da população de íons alvo em espectro de massas de varredura foi 50.000 para LTQ-MS e 500.000 para Orbitrap-MS, e a população alvo para MSⁿ foi ajustada para 10.000 para LTQ-MS. Dados espectrais analisados com software Xcalibur Thermo Finnigan.

Ressonância magnética nuclear (RMN): foram utilizados equipamentos Bruker Avance DPX 5,87 T operando a 250,13 MHz para RMN de ^1H e 62,89 MHz para ^{13}C ; Varian Inova 11 T, operando a 499,88 MHz para RMN de ^1H e 125,70 MHz para ^{13}C , Bruker Avance 500 MHz, operando a 499,88 MHz para RMN de ^1H ou 125,70 MHz para ^{13}C ou Bruker Avance 400 MHz, operando a 62,90 MHz para RMN de ^1H . CDCl_3 foi usado como solvente, exceto quando indicado, e tetrametilsilano (TMS, 0,0 ppm) como referência interna. As análises foram realizadas à temperatura ambiente. Os deslocamentos químicos (δ) foram relatados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades foram indicadas conforme as convenções: s, singlete; d, dubleto; t, tripleto; m, multiplete; dd, duplo dubleto. Os espectros de DEPT-135 apresentam carbonos metila (CH_3) e metino (CH) como sinais positivos e carbonos metilenos (CH_2) como sinais negativos, enquanto os carbonos quaternários não aparecem neste espectro. Os espectros de DEPT-90 apresentam apenas os sinais positivos dos carbonos CH. Os parâmetros de aquisição estão descritos e cada espectro de RMN na seção Anexos.

Infra-vermelho (IV): os espectros no infra-vermelho foram obtidos em espectrofotômetro modelo Nicolet 380 FT-IR, marca Thermo Scientific, com acessório Smart Performer-ATR para análise de amostras em filme. As absorções foram expressas em número de onda (cm^{-1}).

Cromatografia de camada delgada (CCD): placas de alumínio Merck F₂₅₄ e as manchas visualizadas em UV (254 nm) ou com revelador *p*-anisaldeído sulfúrico (*p*-anisaldeído (5 %), ácido acético glacial (50 mL) e ácido sulfúrico concentrado (1 mL)). A fase móvel foi preparada com hexano/acetato 8:2.

6.2. Reagentes e solventes

Todos os solventes utilizados foram de grau analítico, bi-distilados antes do uso quando utilizados para diluição de amostras naturais. O algodão utilizado foi tratado por

extrações sucessivas com diclorometano bi-destilado e o solvente evaporado sob vácuo antes do uso.

6.3. Análise das secreções de opilião

6.3.1. Coleta das secreções

Os opiliões e suas secreções de defesa foram coletados pelo colaborador Prof. Dr. Glauco Machado, do IB-USP. Indivíduos de *S. proximum*, *I. pustulosa*, *N. maximus* e *R. virescens* foram coletados em fragmentos da Mata Atlântica no Parque Estadual Intervales (24° 14' S; 48°04'W; 800 m alt.), estado de São Paulo. Indivíduos de *C. picea* foram coletados na divisa de um fragmento de Mata Atlântica próximo ao Parque Nacional Itatiaia, (22°15'S; 44°34' W; 2.100 m alt.), estado de Minas Gerais. Todos os indivíduos foram levados ao laboratório e mantidos vivos em frascos plásticos, contendo um pedaço de algodão umedecido para manter a umidade do recipiente. O exudato foi coletado pressionando-se as glândulas produtoras com algodão tratado. O líquido absorvido foi extraído com CDCl_3 para análises de RMN e CG-EM, e com acetato de etila bidestilado para análises de CG-EM. Entre 7 e 30 indivíduos de cada espécie foram utilizados para cada extração.

6.3.2. Caracterização química dos componentes do exudato de opiliões

4-metil-1-hexen-3-ona (**1**).¹⁵ CG-EM m/z 112 [M^+] (11%), 97 (24%), 70 (71%), 57 (16%), 55 (100%), 43 (10%), 41 (20%). Tempo de retenção: 3,8 min (por CG-EM, método A).

1-hepten-3-ona (**2**).³³ RMN de ^1H (250,13 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 0,91 (3 H, t, $J = 7,25$, H-7), 1,21-1,40 (2 H, m, H-6), 1,50-1,68 (2 H, m, H-5), 2,58 (2 H, t, $J = 7,3$, H-4), 5,81 (1 H, dd, $J = 1,60$ e 10,13, H-1), 6,21 (1 H, dd, $J = 1,60$ e 17,66, H-1), 6,39 (1 H, dd, $J = 10,13$ e

17,66, H-2); RMN de ^{13}C (62,89 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 3,9 (C-7), 22,6 (C-6), 26,1 (C-5), 39,3 (C-4), 127,9 (C-1), 136,6 (C-2), 201,2 (C-3); CG-EM m/z 112 [M^+] (1%), 108,97 (20%), 83 (11%), 70 (74%), 55 (100%), 41 (15%); Tempo de retenção 4,4 min (por CG-EM, método A).

2,3-dimetil-1,4-benzoquinona (**3**).²² RMN de ^1H (acetona- d_6 , 499,88 MHz) δ 2,01 (3 H, s), 6,79 (3 H, s). RMN de ^{13}C (acetona- d_6 , 125,70 MHz) δ 187,9 (C-1,C-4), 141,3 (C-2,C-3), 136,9 (C-5,C-6), 11,9 (C-7, C-8); CG-EM m/z 136 [M^+] (100%), 107 (50%), 82 (40%), 79 (44%), 65 (4%), 54 (43%); Tempo de retenção 8,2 min (por CG-EM, método A).

2-etil-3-metil-1,4-benzoquinona (**4**).²² RMN de ^1H (499,88 MHz, acetona- d_6 , TMS) δ 1,13 (3 H, t, $J=7,56$), 2,04 (3 H, s), 2,52 (2 H, q, $J=7,57$); RMN de ^{13}C (125,70 MHz, acetona- d_6 , TMS) δ 146,3 (C1), 137,0 (C-5,C-6), 19,9 (C-7), 12,8 (C-8), 11,4 (C-9); CG-EM m/z 150 [M^+] (100%), 135 (10%), 122 (35%), 121 (17%), 107 (86%), 82 (22%), 79 (45%), 67 (15%), 54 (30%); Tempo de retenção 9,2 min (por CG-EM, método A).

1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)pentan-1-ona (**5**) óleo amarelo; IV (filme) ν_{max} 2955, 1711, 1675, 736 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 499,88 MHz, TMS) δ 4,52 (1 H, t, $J = 3,2$, H-5'), 4,25 (1 H, dd, $J = 8,8$ e $3,1$, H-2'), 2,65 e 2,55 (cada 1 H, dt, $J = 17,7$ e $7,4$, H-2), 2,06 (2 H, t, $J = 7,7$, H-1"), 2,00 e 1,98 (cada 1 H, m, H-4'), 1,98 e 1,82 (cada 1 H, m, H-3'), 1,56 (2 H, m, H-3), 1,48 (2 H, m, H-2"), 1,30 (4 H, m, H-4, H-3"), 0,91 (6 H, t, $J=7,3$, H-5, H-4"); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125,71 MHz) δ 211,8 (C, C-1), 153,5 (C, C-6"), 95,6 (CH, C-5'), 80,2 (CH, C-2'), 37,8 (CH_2 , C-2), 33,8 (CH_2 , C-1"), 29,1 (CH_2 , C-2"), 25,2 (CH_2 , C-3), 24,0 (CH_2 , C-3'), 22,25 (CH_2 , C-4 ou C-3)'), 22,34 (CH_2 , C-4 ou C-3"), 19,3 (CH_2 , C-4'), 13,90* (CH_3 , C-5 ou C-4"), 13,89* (CH_3 , C-5 ou C-4"); CG-EM m/z 224 [M^+] (25), 182 (1), 139 (100), 97 (13), 95 (17), 85 (9), 79 (13), 69 (11), 55 (24), 41 (19); Tempo de retenção 1,7 min (por CG-EM, método A); EM-IES m/z [$\text{M} + \text{H}]^+$ 225,1852 (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_2$ 225,1849). *Sinais descritos com duas casas decimais para possibilitar diferenciação.

6.3.3. Confirmação da estrutura da 1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)pentan-1-ona (5) por co-injeção

As amostras das secreções de *I. pustulosa* e *N. maximus* em acetato de etila foram analisadas em CG-EM. Posteriormente, 10 μL de amostra natural foram reforçados com 10 μL de 1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)pentan-1-ona (5) e 1-hepten-3-ona (2) sintéticos na concentração 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em acetato de etila, e as misturas foram analisadas separadamente. Foi observado aumento na abundância relativa de ambos os compostos.

6.3.4. Análise das glândulas

Cinco indivíduos das espécies *I. pustulosa* e *N. maximus* foram dissecados sob um microscópio e suas glândulas retiradas após a remoção do esqueleto dorsal, onde as mesmas ficam aderidas (procedimento realizado pelo Prof. Dr. Glauco Machado). As glândulas foram estocadas em um frasco contendo CDCl_3 . Diferentes frascos foram usados para cada espécie. Para liberar os exudatos em solvente, as glândulas foram maceradas dentro do frasco. As amostras foram analisadas por CG-EM.

6.3.5. Determinação do índice de retenção (IR)

A co-injeção das amostras das espécies *S. proximum* e *N. maximus* com padrões de hidrocarbonetos possibilitou a construção de uma curva de índice de retenção *versus* tempo de retenção (Tabela 10, Figura 23). Os hidrocarbonetos utilizados (C_8 , C_{11} , C_{17} , C_{25} e C_{32}) foram adquiridos da marca Aldrich e utilizados em solução 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabela 10. Análise de hidrocarbonetos por CG-EM para determinação do índice de retenção (IR) dos compostos de exudato de opiliões.

Número de carbonos	Tempo (min)	Índice de retenção (número de C • 100)
8	3,945	800
11	12,532	1100
17	32,425	1700
25	51,548	2500
32	64,907	3200

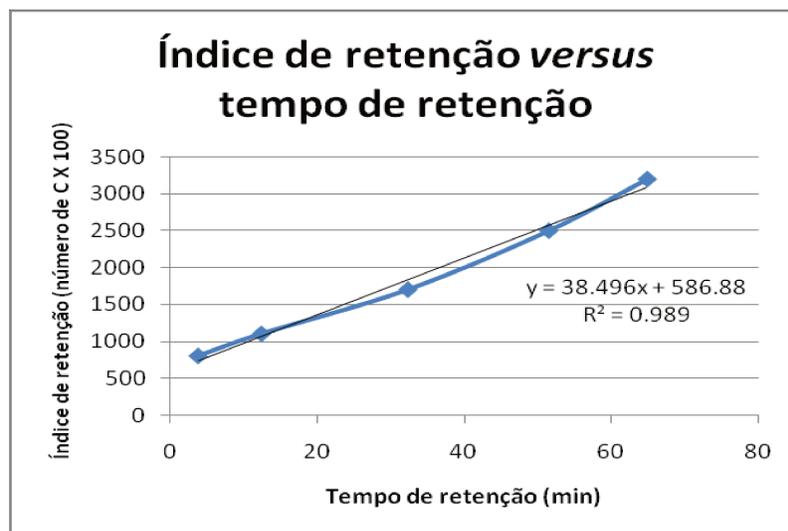


Figura 23. Curva obtida na análise de hidrocarbonetos por CG-EM para determinação do índice de retenção de compostos do exudato de opiliões.

A curva obtida gerou a equação $IR= 38,496X + 586,88$ por regressão linear. Substituindo o valor de X na equação da reta, foi possível calcular o índice de retenção dos compostos dos exudatos.

6.3.6. Quantificação do dímero 5 nos indivíduos.

Uma curva de calibração com o dímero 5 sintético foi analisada por CG-EM com concentrações conhecidas, em presença de undecano 1 mg.mL^{-1} como padrão interno (PI) na proporção 1:1. A razão entre a área dos picos de 5 e do PI foram comparadas (Tabela 11, Figura 24).

Tabela 11. Curva de calibração para quantificação de 5 por CG-EM.

Amostra (mg.mL^{-1})	Área	Área padrão	R (I/II)
	dímero (I)	interno (II)	
0,5	4397134	143976	30,54
0,25	1649141	110613	14,91
0,125	742348	212398	3,50
<i>Iporangaia pustulosa</i>	180066	37017	4,86
<i>Neosadocus maximus</i>	480320	31234	15,38

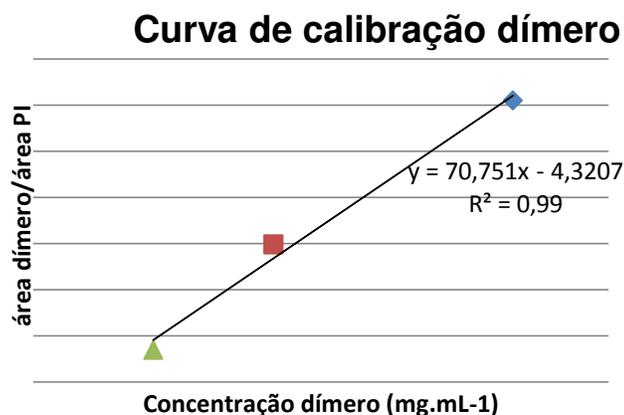


Figura 24. Curva de calibração para quantificação de 5 nos exudatos de opiliões.

As amostras de exudato diluídas em acetato de etila bidestilado também foram analisadas nas mesmas condições, e a razão dos picos foi plotada na curva de calibração obtida, determinando a concentração real de cada amostra. Este valor foi multiplicado por 2, devido à diluição 1:1 da amostra inicial, dividido pelo volume total de cada amostra para encontrar a massa inicial, e dividida pelo número de indivíduos exudados para obter a secreção (Tabela 12).

Tabela 12. Quantificação de **5** nos exudatos de opiliões.

Amostra	conc. (mg.mL ⁻¹)	conc. real (mg.mL ⁻¹) • 2	V amostra (mL)	m (mg.10 ⁻³)	m(mg)/ indivíduo
<i>Iporangaia pustulosa</i>	0,13	0,26	3,1	0,084	0,003807
<i>Neosadocus maximus</i>	0,28	0,56	4,9	0,114	0,002914

6.4. Métodos sintéticos

6.4.1. Síntese da 1-hepten-3-ona (2)³⁷

Em um balão de 20 mL foram adicionados 570 mg de 1-hepten-3-ol (5 mmol) e 3 mL de acetona. Aos poucos, sob agitação e banho de gelo, foi adicionado o reagente de Jones (13,66g de CrO₃ em 20 mL de água, 11,5 mL de H₂SO₄ concentrado com volume final de 50 mL em água) em um total de aproximadamente 4 mL. A mistura foi lavada com NaOH 2 mol L⁻¹ aquoso saturado e extraída com éter. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente removido à temperatura ambiente. Foram obtidas 129 mg de 1-hepten-3-ona, com rendimento de 40,6%.

1-hepten-3-ona (2).³³ óleo incolor. RMN de ¹H (250,13 MHz, CDCl₃, TMS) δ 0,91 (3 H, t, J = 7,3, H-7), 1,21-1,40 (2 H, m, H-6), 1,50-1,68 (2 H, m, H-5), 2,58 (2 H, t, J = 7,3, H-4), 5,81 (1 H, dd, J = 1,6 e 10,1, H-1), 6,21 (1 H, dd, J = 1,6 e 17,7, H-1), 6,39 (1 H, dd, J =

10,1 e 17,7, H-2); RMN de ^{13}C (62,89 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 3,9 (CH_3 , C-7), 22,6 (CH_2 , C-6), 26,1 (CH_2 , C-5), 39,3 (CH_2 , C-4), 127,9 (CH_2 , C-1), 136,6 (CH , C-2), 201,2 (C, C-3); CG-EM m/z 112 [M^+] (1%), 97 (20%), 83 (11%), 70 (74%), 55 (100%), 41 (15%).

6.4.2. Síntese de 5 a partir da 1-hepten-3-ona (2)

6.4.2.4. Proteção do 1-hepten-3-ol (6)⁴⁰

Em um balão de 20 mL foi adicionado o 1-hepten-3-ol (6) (57 mg, 0,5 mmol) com TBDMS-Cl (120 mg, 0,8 mmol), imidazol (0,9 mmol, 61,3 mg) e uma ponta de espátula de DMAP (4-dimetilaminopiridina) em diclorometano (3 mL) sob atmosfera de $\text{N}_{2(g)}$. Após 16 h a mistura foi extraída com NaCl aquoso saturado, a parte orgânica foi seca com MgSO_4 e o solvente removido. O produto não foi isolado, mas a conversão foi de 100% (CG-EM).

1-hepten-3-(*tert*-butildimetilsililoxano) (7). CG-EM m/z 213 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$] (4%), 171 (100%), 143 (8%), 115 (13%), 75 (40%); Tempo de retenção 9,35 min (por CG-EM, método A).

6.4.3. Síntese de 5 a partir da acroleína

6.4.3.1. Dimerização da acroleína³⁸

Em uma ampola de vidro foi colocada acroleína (4,195 mL). A ampola foi selada e submetida a aquecimento em banho de óleo a 200°C por 3h. A mistura foi filtrada e lavada com diclorometano para separar os polímeros insolúveis. Após evaporar o solvente, foram obtidas 5,137g, com 53% de rendimento.

3,4-diidro-2*H*-piranil-2-carboxaldeído (11). Óleo incolor. CG-EM m/z 112 [M^+] (40%), 83 (100%), 66 (9%), 55 (57%); Tempo de retenção 4,31min (por CG-EM, método A).

6.4.3.2. Alquilação da carbonila do aldeído **11**^{39a}

Em um balão de 10 mL foram adicionados 1,12g (10 mmol) de (**11**). Sob atmosfera de N_{2(g)}, foi adicionado 0,5 mL de THF anidro. A mistura foi resfriada a 0°C e 3,5 mL de butil-lítio 10 mol.L⁻¹ (35 mmol). Após alcançar temperatura ambiente, a mistura foi agitada por 2 h. O tratamento foi feito com NH₄Cl aquoso saturado, extração com éter e lavagem com NaCl aquoso saturado, secagem com MgSO₄ e evaporação do solvente. O produto foi purificado em coluna de sílica gel dopada com trietilamina, com fase móvel hexano. Porém, não foi possível obtê-lo isolado dos álcoois indesejados.

1-(6-*H*-3,4-diidro-2*H*-piran-2-il)pentan-1-ol (**12**). CG-EM *m/z* 170 [M⁺] (21%), 95 (33%), 83 (100%), 69 (45%), 57 (37%), 41 (25%); Tempo de retenção 10,89 min (por CG-EM, método A).

6.4.3.3. Alquilação da dupla ligação de **12**

As várias tentativas de alquilação da dupla ligação do composto **9** estão sumarizadas na Tabela 2. Todas as reações foram feitas com THF anidro, sob fluxo de N_{2(g)} e os reagentes de lítio foram adicionados em baixa temperatura. O tratamento da reação foi feito com NH₄Cl aquoso saturado, extração com éter e lavagem com NaCl aquoso saturado, secagem com MgSO₄ e evaporação do solvente. Nenhum produto chegou a ser purificado devido à baixa porcentagem detectada por CG-EM.

1-(6-butyl-3,4-diidro-2*H*-piran-2-il)pentan-1-ol (**9**). CG-EM *m/z* 226 [M⁺] (7%), 169 (9%), 151 (51%), 139 (55%), 121 (33%), 95 (56%), 83 (100%), 69 (26%), 57 (45%), 41 (30%); Tempo de retenção 15,58 min (por CG-EM, método A).

6.4.3.4. Proteção do 1-(6-*H*-3,4-diidro-2*H*-piran-2-il)pentan-1-ol (**12**).⁴⁰

Em um balão de 20 mL foi adicionado o bruto da reação anterior contendo **12** (338 mg,

equivalente a 1,8 mmol de **12** juntamente com TBDMS-Cl (458 mg, 3,04 mmol), imidazol (414 mg, 6,08 mmol) e uma ponta de espátula de DMAP em 12mL de diclorometano sob atmosfera de N_{2(g)}. Após 16h a mistura foi lavada com solução de NaCl aquosa saturada e a parte orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, com posterior evaporação do solvente. O rendimento foi de 22,5%.

1-(6-*H*-3,4-diidro-2*H*-piran-2-il)pentan-1-(*terc*-butildimetilsililoxano) (**13**). Líquido incolor. CG-EM *m/z* 269 [M⁺-CH₃] (2%), 227 (100%), 201 (22%), 171 (19%), 115 (16%), 75 (53%); Tempo de retenção 15,15 min (por CG-EM, método A).

6.4.4. Dimerização de **2** para obtenção de **5**

A 1-hepten-3-ona (**2**) obtida via oxidação de Jones foi filtrada em sílica recentemente ativada, lavada com acetato de etila bidestilado, e o solvente foi evaporado. Em uma ampola de vidro foram colocados 112 mg de **2** com 2 mg de hidroquinona (1%). A ampola foi purgada com N_{2(g)}, selada e submetida a aquecimento em banho de óleo a 180°C por 3 h. Após este período, os cristais de hidroquinona foram removidos por filtração e a 1-hepten-3-ona (**2**) que não reagiu foi eliminada com fluxo de nitrogênio em temperatura ambiente. Foram obtidas 63,9 mg de **5** (57,1% de rendimento).

6.4.5. Determinação da configuração absoluta da 4-metil-1-hepten-3-ona (**16**)

6.4.5.1. Síntese da amida de Weinreb (*S*)-**39**

Em um balão de fundo redondo foram adicionados ácido (*S*)-2-metil-butanóico (9,06 mmol, 1 mL) e dimetilformamida (0,45 mmol; 5 mol%). Ambos foram resfriados em banho de gelo, e foi adicionado cloreto de tionila (10,42 mmol, 0,76mL) gota a gota. O sistema alcançou temperatura ambiente e ficou sob agitação por 1 h. O excesso de HCl foi removido cuidadosamente com fluxo de nitrogênio. Foram adicionados clorofórmio

(75 mL) e *N,O*-dimetilhidroxilamina (9,97 mmol, 0,972 g). Após resfriamento do sistema foi adicionada piridina (22.65 mmol, 2.2 mL). Depois de 1 h à temperatura ambiente, a reação foi lavada com água, seca sob MgSO₄ anidro e a piridina foi removida com solução aquosa de CuSO₄ saturada. O produto foi purificado em cromatografia de coluna de sílica gel e eluída com hexano/acetato de etila em proporções crescentes, dando 0,68 g de um óleo incolor (52% de rendimento).

(*S*)-*N*-metoxi-*N*,2-dimetilbutanamida ((*S*)-**39**). Óleo incolor. RMN de ¹H (250,13 MHz, CDCl₃) δ 3,69 (3 H, s), 3,19 (3 H, s), 2,75-2,84 (1 H, m), 1,58-1,81 (1 H, m), 1,39-1,47 (1 H, m), 1,11 (3 H, d, ³J = 6.9), 0,89 (3H, t, ³J = 7,4); RMN de ¹³C (62,89 MHz, CDCl₃) δ 171,3 (C, CO), 61,6 (CH₃, OCH₃), 37,0 (CH), 32,5 (CH₃, NCH₃), 27,0 (CH₂), 17,3 (CH₃, HCCH₃), 12,2 (CH₃, H₂CCH₃); CG-EM *m/z* 145 [M⁺] (9%), 85 (45%), 61 (16%), 57 (100%), 41 (22%); Tempo de retenção 6,37 min (por CG-EM, método A).

6.4.5.2. Síntese de (*S*)-**16**

Para evitar a racemização do produto, toda a vidraria utilizada foi sililada com cloreto de tetrametilsilano (TMS-Cl) recentemente destilado. Em um balão de fundo redondo foi adicionado Mg^o (39,5 mmol, 0,96 g) em THF anidro (10 mL). A esta suspensão, foi adicionada uma solução de brometo de vinila em THF anidro (aproximadamente 1 mol.L⁻¹, 3 mL). A reação foi refluxada até o consumo total do magnésio e transferida com uma seringa para um balão contendo (*S*)-**39** (2,07 mmol, 300 mg) em THF (3 mL). A reação foi agitada por 16 h em temperatura ambiente, lavada com NH₄Cl saturado e extraída com éter etílico. A fase orgânica foi seca sobre MgSO₄ anidro e o éter etílico foi removido por destilação fracionada. Não foi possível separar o THF do produto, que é muito volátil, e no final foi obtida uma solução de (*S*)-**16** em THF.

4-metil-3-hexen-3-ona (**16**).⁸¹ CG-EM *m/z* 112[M⁺] (15%), 97 (12%), 84 (35%), 83 (12%), 69 (12%), 58 (28%), 56 (23%), 55 (100%), 41 (29%); Tempo de retenção 4,11 min (por CG-EM, método A).

6.5. Estudo da degradação espontânea do dímero 5

6.5.1. Preparo das amostras

Foi preparada uma solução de **5** sintético em tolueno grau HPLC na concentração de 2 mg.mL⁻¹. Foram colocados 250 µL desta solução em vários frascos e o solvente foi evaporado em fluxo de nitrogênio, perfazendo uma massa de 5 mg por amostra. Os frascos foram tampados e selados com parafilme, mantidos em temperatura ambiente, e cada amostra foi analisada com diferentes tempos de degradação.

6.5.2. Análise de **2** no *headspace* por SPME em CG-EM

Após o tempo de degradação de cada amostra, a seringa coletora foi introduzida no frasco e a fibra ficou exposta ao *headspace* por 3 min (tempo determinado através da curva de saturação, Figura 25). A fibra foi recolhida e novamente exposta no injetor do CG-EM (Método C). A razão entre a área dos picos de monômero **2** e dímero **5** foi determinada e comparada entre as amostras com diferentes tempos de decomposição (Esquema 13).

⁸¹ Hammen, P. D.; Braisted, A. C.; Northrup, D. L. *Synth. Comm.* **1991**, *21*, 2157-2163

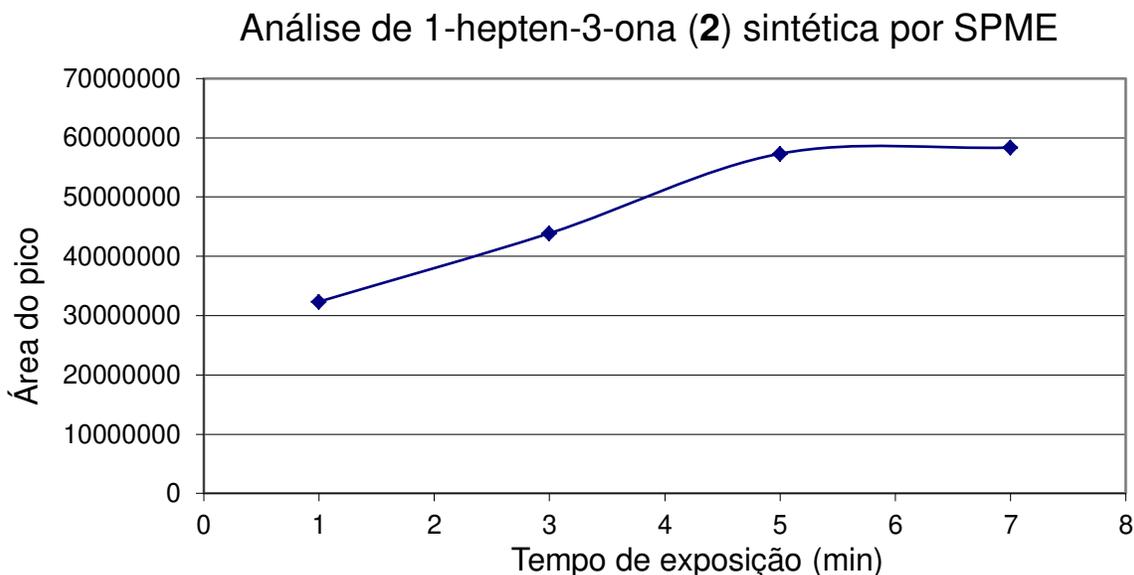


Figura 25. Curva de saturação da fibra de SPME.

6.5.2. Análise de 5 em solução por CG-EM

Após a análise do *headspace*, foi introduzido no frasco com uma seringa 0,025 mL de ftalato de metila (padrão interno) em tolueno grau HPLC $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e 0,4875 mL de tolueno grau HPLC, perfazendo uma concentração de $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$. A solução foi prontamente injetada em CG-EM (Método A) e a razão entre as áreas dos picos do dímero 5 e do padrão interno foi determinada e comparada entre as amostras com diferentes tempos de decomposição (Esquema 13).

6.6. Estudo da biossíntese de semioquímicos de opiliões

6.6.1. Coleta e alimentação dos opiliões

Os indivíduos de *I. pustulosa* foram coletados no Parque Estadual Intervales no estado de São Paulo e de *M. neptunus* foram coletados em Arraial D'Ajuda, estado da Bahia.

Antes de iniciar os experimentos, uma pressão dorso-ventral foi aplicada para esvaziar os sacos glandulares e o exudato foi absorvido em algodão tratado e classificado como grupo controle. Os exudatos foram coletados em algodão tratado e extraídos com CDCl_3 ou benzeno- d_6 (para o experimento de $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ glicose de *I. pustulosa*). Os precursores oferecidos foram $[^{13}\text{C}_3]$ propionato de sódio (Aldrich), $[4\text{-}^{13}\text{C}]$ metilmalonato de sódio (síntese descrita no item 6.4.3.), $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ acetato de sódio (Cambridge Isotope Laboratories, CIL) e $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ glicose (CIL). O número de indivíduos analisados corresponde aos que sobreviveram ao período de alimentação, que foi de 60 dias. Durante este período, a troca de ração e a manutenção dos frascos contendo os indivíduos foram realizadas a cada dois dias.

6.6.1.1. Experimento com *Iporangaia pustulosa*

O conjunto de indivíduos foi dividido em quatro grupos e alimentados com sardinha enlatada marca Gomes da Costa contendo os precursores marcados: 1) 5% m/m de $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ acetato (n=14 indivíduos); 2) 5% m/m de $[4\text{-}^{13}\text{C}]$ metilmalonato (n=11 indivíduos); 3) 1% m/m de $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ glicose (n=10 indivíduos) e $[^{13}\text{C}_3]$ propionato (n=28 indivíduos). O grupo controle foi composto pelo exudato de 30 indivíduos, extraído antes da alimentação. A alimentação foi realizada por 60 dias, exceto para o grupo $[^{13}\text{C}_3]$ propionato de *I. pustulosa*, que foi alimentado por 30 dias. Durante este período, os indivíduos foram mantidos isolados uns dos outros em frascos plásticos transparentes, contendo um algodão úmido para manter a umidade do recipiente e um pedaço de isopor como suporte para o animal se movimentar.

6.6.4.2. Experimento com *Magnispina neptunus*

O conjunto de indivíduos foi dividido em dois grupos e alimentados com ração para cães enlatada marca Dog Show contendo 5% dos precursores marcados: 1) $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ acetato (n= 40 indivíduos) e 2) $[4\text{-}^{13}\text{C}]$ metilmalonato (n= 30 indivíduos). O grupo controle foi composto pelo exudato de 68 indivíduos, extraído antes da alimentação. Os

indivíduos foram mantidos em grupos de 5 indivíduos em placas de petri com algodão umedecido.

6.6.2. Análise das secreções

A análise de RMN de ^{13}C dos exudatos foi feita em um equipamento Bruker Avance III 11 T ou um Varian Inova 11 T (para o grupo $[1-^{13}\text{C}]$ glicose do experimento com *I. pustulosa*), ambos operando a 125,75 MHz, 25°C, tempo de aquisição 0,55 s, e coleta de aproximadamente 40.000 *scans*, tomando número igual de repetições para amostras do mesmo experimento (ensaio e controle). Os detalhes dos parâmetros de aquisição e processamento estão listados na Tabela 13. Os cálculos de enriquecimento são mostrados abaixo das tabelas referentes aos experimentos (Tabela 7, Tabela 8 e Tabela 9).

Tabela 13. Detalhes dos parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^{13}C do estudo biossintético com opiliões.

Parâmetro	valor
PROBHD	5mm PABBO BB
PULPROG	Zgig30
TD	65536
DS	4
SWH (Hz)	29761.904
FIDRES (Hz)	0.454131
AQ (sec)	1.1010048
RG	2050
DW (μsec)	16.800
DE (μsec)	6.50
TE	298.1
D1	10.00000000
D11	0.03000000
TD0	1
SFO1 (MHz)	125.7049807
P1	10.00
NUC1	13C
PLW1 (W)	91.00000000
SFO2 (MHz)	499.8719995
NUC2	1H
CPDPRG	Waltz 16
PCPD2 (μsec)	80.00
PLW2 (W)	26.85300064
PLW12 (W)	0.58421999
PLW13	
F2 Prossessing	
SI	131072
SF (MHz)	125.6924110
WDW	EM
SSB	0
LB (Hz)	2.00
GB	0
PC	1.40

6.6.3. Síntese do [4-¹³C]metilmalonato de sódio

6.6.3.1. Esterificação do ácido malônico⁸²

Em um balão de 100 mL foram adicionados ácido malônico (Aldrich, 2,0 g, 20 mmol), 30 mL de metanol tratado e iodo metálico (0,1 g). A mistura foi refluxada por 24h. Após este período o metanol foi retirado e o bruto reacional foi lavado com tiosulfato de sódio aquoso saturado e extraído com éter etílico. A fase orgânica foi lavada com água, seca com sulfato de magnésio e filtrada em sílica. Após a evaporação de éter, foram obtidas 1,4 g de éster malonato de metila, um óleo marrom, com 48% de rendimento.

6.6.3.2. Metilação do éster malônico^{60,83}

Em um balão de 50 mL foram adicionados metanol tratado (20 mL) e sódio metálico (aproximadamente 300 mg) sob banho de gelo. Após agitação por 1 h foi adicionado o malonato de dimetila (1,4 g, 10 mmol). Após alcançar a temperatura ambiente, sob agitação, foi adicionado ¹³CH₃I (0,9 mL, 15 mmol). A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 24h. Após este período o metanol foi evaporado sob vácuo e o bruto foi re-dissolvido em diclorometano/metanol 9:1 (25 mL). Foi adicionado NaOH 2 mol.L⁻¹ metanólico (20 mL, 40 mmol) e a mistura foi agitada por 10 minutos. O precipitado formado foi lavado com diclorometano e seco sob vácuo. Foi obtido 0,8 g de um sólido branco, 38% de rendimento.

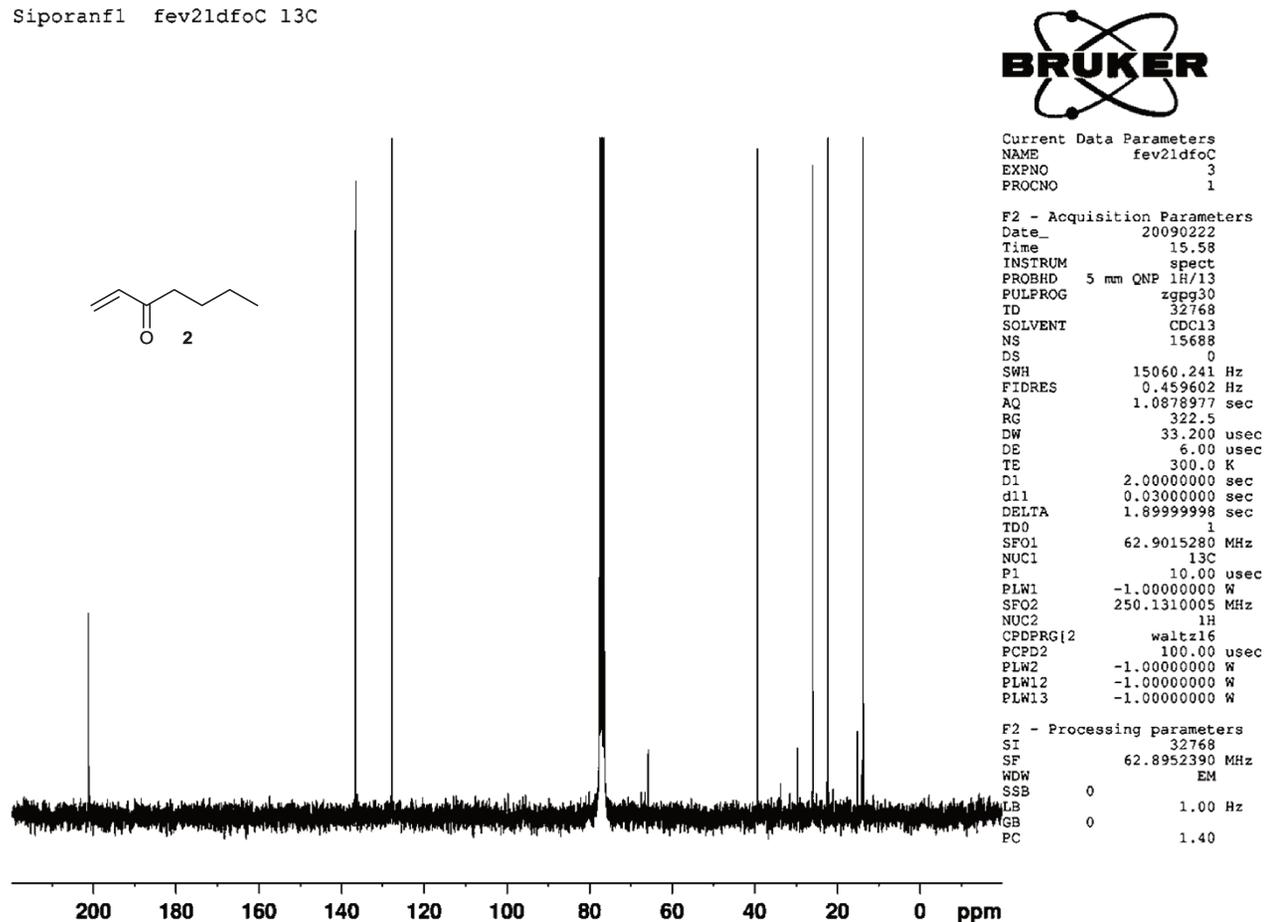
[4-¹³C] metilmalonato de sódio. ν_{\max} . 1579,46 cm⁻¹ (CO); RMN de ¹H (250,13 MHz, D₂O, H₂O) δ forma ceto: 3,15-3,26 (1H, qd, ³J_{H-H}= 7,3 e ²J_{C-H}=4,4, CH), 1,28 (3H, dd, ³J_{H-H}=7,3 e ¹J_{C-H}= 128,4, ¹³CH₃); forma enol: 1,49 (3H, d, ¹J_{C-H}=128,4, ¹³CH₃); RMN de ¹³C (62,90 MHz, D₂O, CCl₄) forma ceto: 14,8 (¹³CH₃); forma enol: 22,2 (¹³CH₃); EM-IES *m/z* [M+Na]⁺ 185,98290 (calculado para C₃¹³CH₄Na₃O₄⁺ 185.98362).

⁸² Ramalinga, K.; Vijayalakshmi, P.; Kaimal, T. N. B. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 879-882

⁸³ Theodorou, V.; Skobridis, K.; Tzakosb, A. G.; Ragoussisc, V. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8230-8233

7. Anexos

Siporanf1 fev21dfoC 13C



Anexo 1. Espectro de RMN de ^{13}C (250 MHz, CDCl_3 , CHCl_3) do exudato bruto de *Iporangia pustulosa* contendo 1-hepten-3-ona (**2**) como composto majoritário.

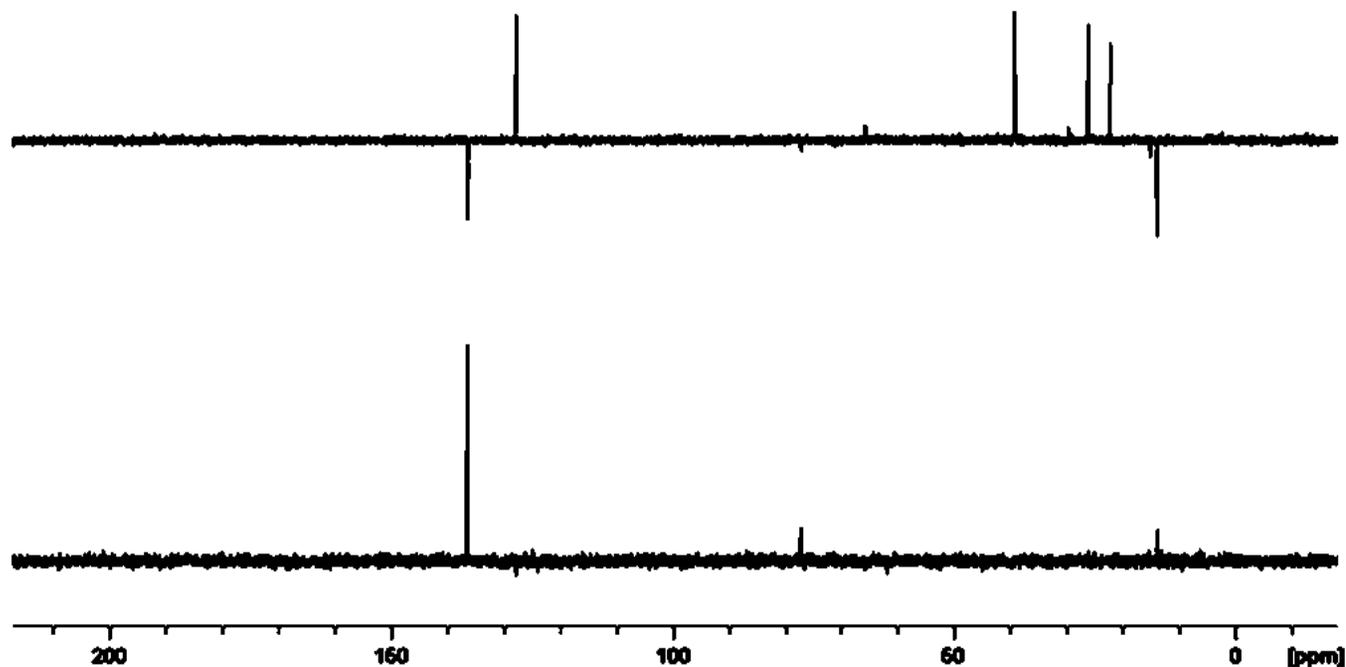
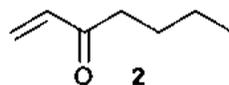
Siporanf1 fev21dfoC



Current Data Parameters
NAME fev21dfoC
EXPNO 2
PROCNO 1

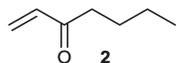
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20090222
Time 2.14
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG dept90
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 5000
DS 0
SWH 15060.241 Hz
FIDRES 0.459602 Hz
AQ 1.0878977 sec
RG 912.3
DW 33.200 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
CNST2 145.000000
D1 2.0000000 sec
d2 0.00344828 sec
dL2 0.00002000 sec
DELTA 0.00001273 sec
TD0 1
SFO1 62.9015280 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
p2 20.00 usec
PLW1 -1.00000000 W
SFO2 250.1310005 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
P3 13.00 usec
p4 26.00 usec
PCPD2 100.00 usec
PLW2 -1.00000000 W
PLW12 -1.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 62.8952390 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



Anexo 2. Espectro de RMN de ¹³C – DEPT 90° e 135° (250 MHz, CDCl₃, CHCl₃) do exudato bruto de *Iporangaia pustulosa* contendo 1-hepten-3-ona (2) como composto majoritário.

Daniele - CDC13 - sneomax1

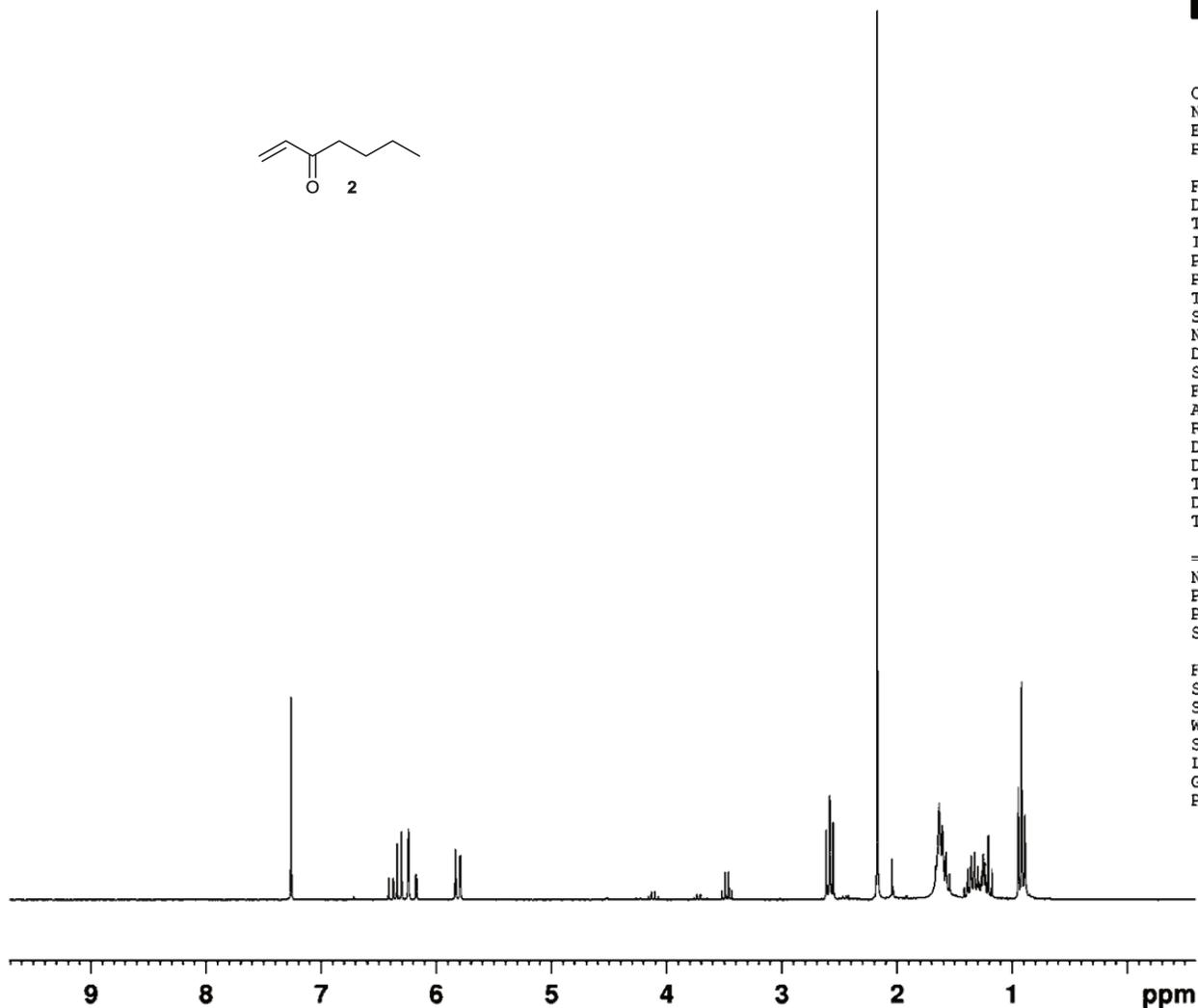


Current Data Parameters
NAME fev24dfoH1
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20090224
Time 17.25
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDC13
NS 32
DS 0
SWH 5175.983 Hz
FIDRES 0.157958 Hz
AQ 3.1653888 sec
RG 2048
DW 96.600 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 13.00 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 250.1315447 MHz

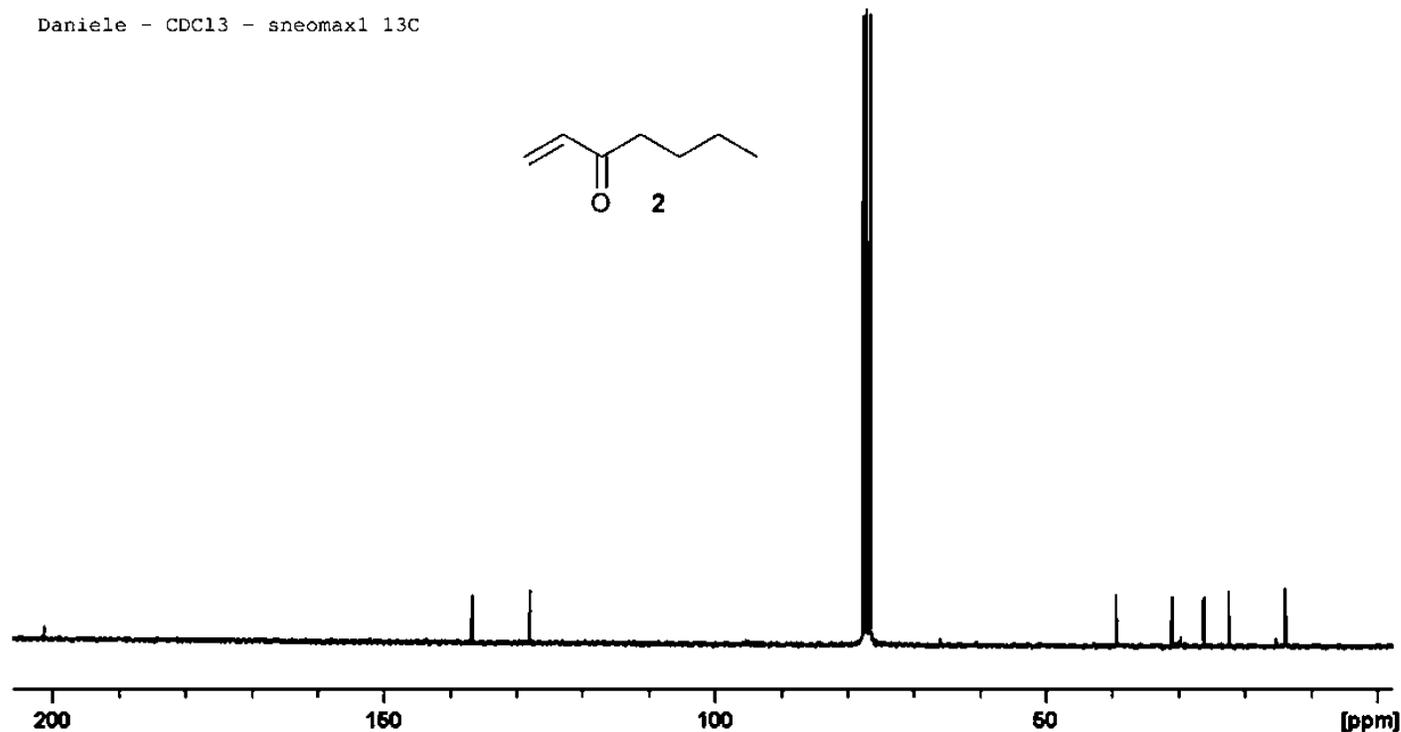
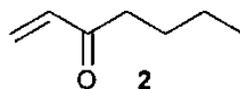
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 250.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Anexo 3. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 250,13 MHz, CHCl_3) do exudato bruto de *Neosadocus maximus* contendo 1-hepten-3-ona (2) como composto majoritário.



Daniele - CDCl₃ - sneomax1 13C



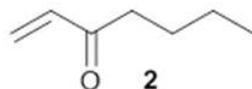
```
Current Data Parameters
NAME fev24dfoC
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20090225
Time 14.59
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 14477
DS 0
SWH 15060.241 Hz
FIDRES 0.459602 Hz
AQ 1.0878977 sec
RG 256
DW 33.200 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.89999998 sec
TD0 1
SFO1 62.9015280 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 -1.00000000 W
SFO2 250.1310005 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 100.00 usec
PLW2 -1.00000000 W
PLW3 -1.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 62.8952390 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
```

Anexo 4. Espectro de RMN de ¹³C (250 MHz, CDCl₃, CHCl₃) do exudato bruto de *Neosadocus maximus* contendo 1-hepten-3-ona (**2**) como composto majoritário.

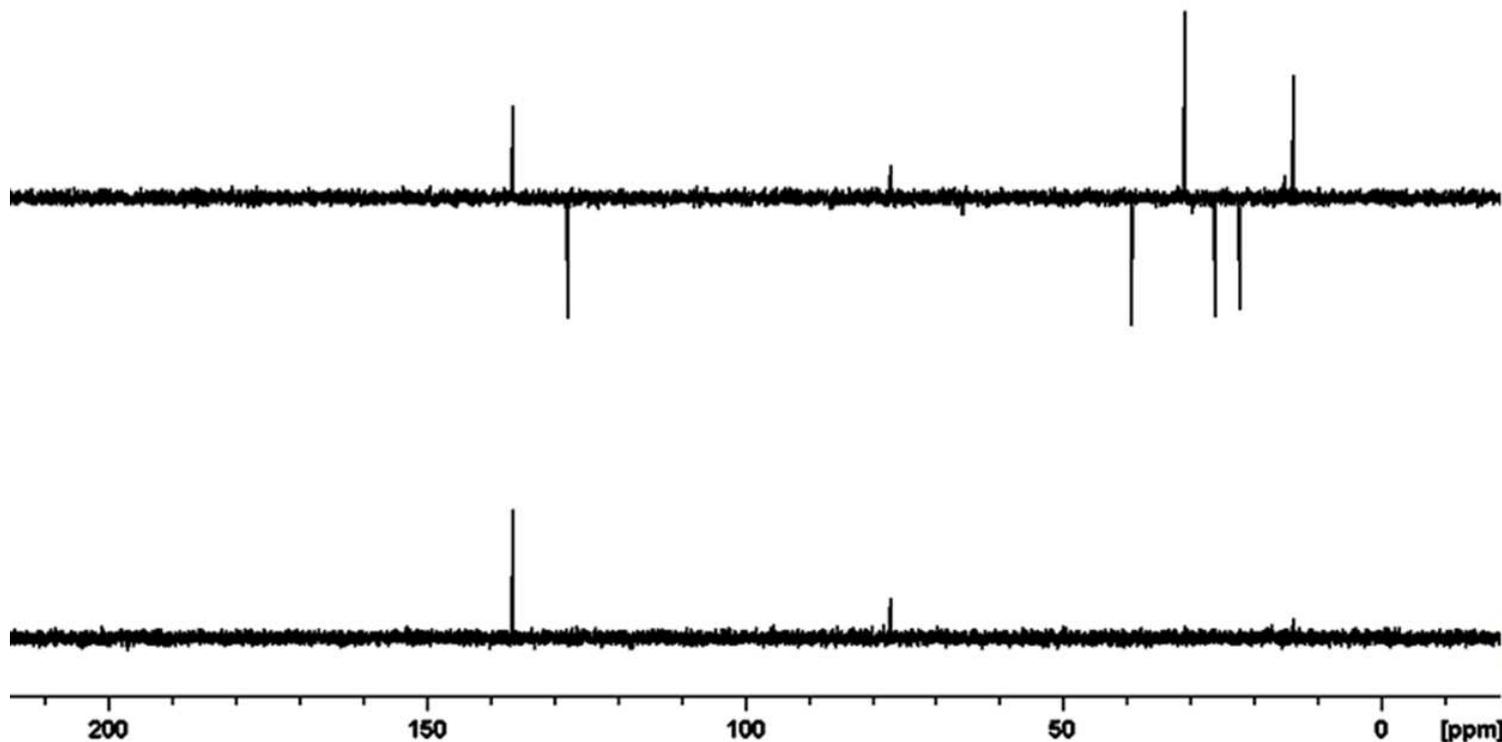
Daniele - CDCl₃ - sneomax1



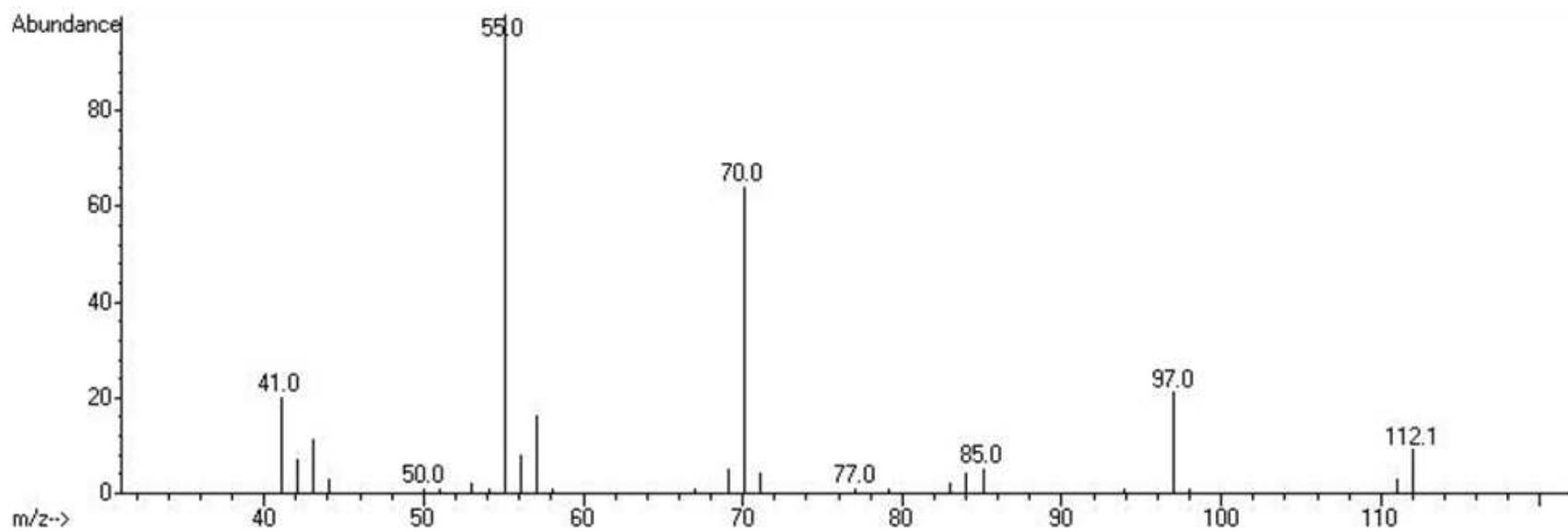
Current Data Parameters
NAME fev24dfc
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20090224
Time 21.57
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG dept135
TD 32768
SOLVENT CDCl₃
NS 5000
DS 0
SWH 15060.241 Hz
FIDRES 0.459602 Hz
AQ 1.0878977 sec
RG 1625.5
DW 33.200 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
CNST2 145.0000000
D1 2.0000000 sec
d2 0.00344828 sec
d12 0.00002000 sec
JELTA 0.00001273 sec
fD0 1
SFO1 62.9015280 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
p2 20.00 usec
PLW1 -1.00000000 W
SFO2 250.1310005 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
P3 13.00 usec
p4 26.00 usec
PCPD2 100.00 usec
PLW2 -1.00000000 W
PLW12 -1.00000000 W

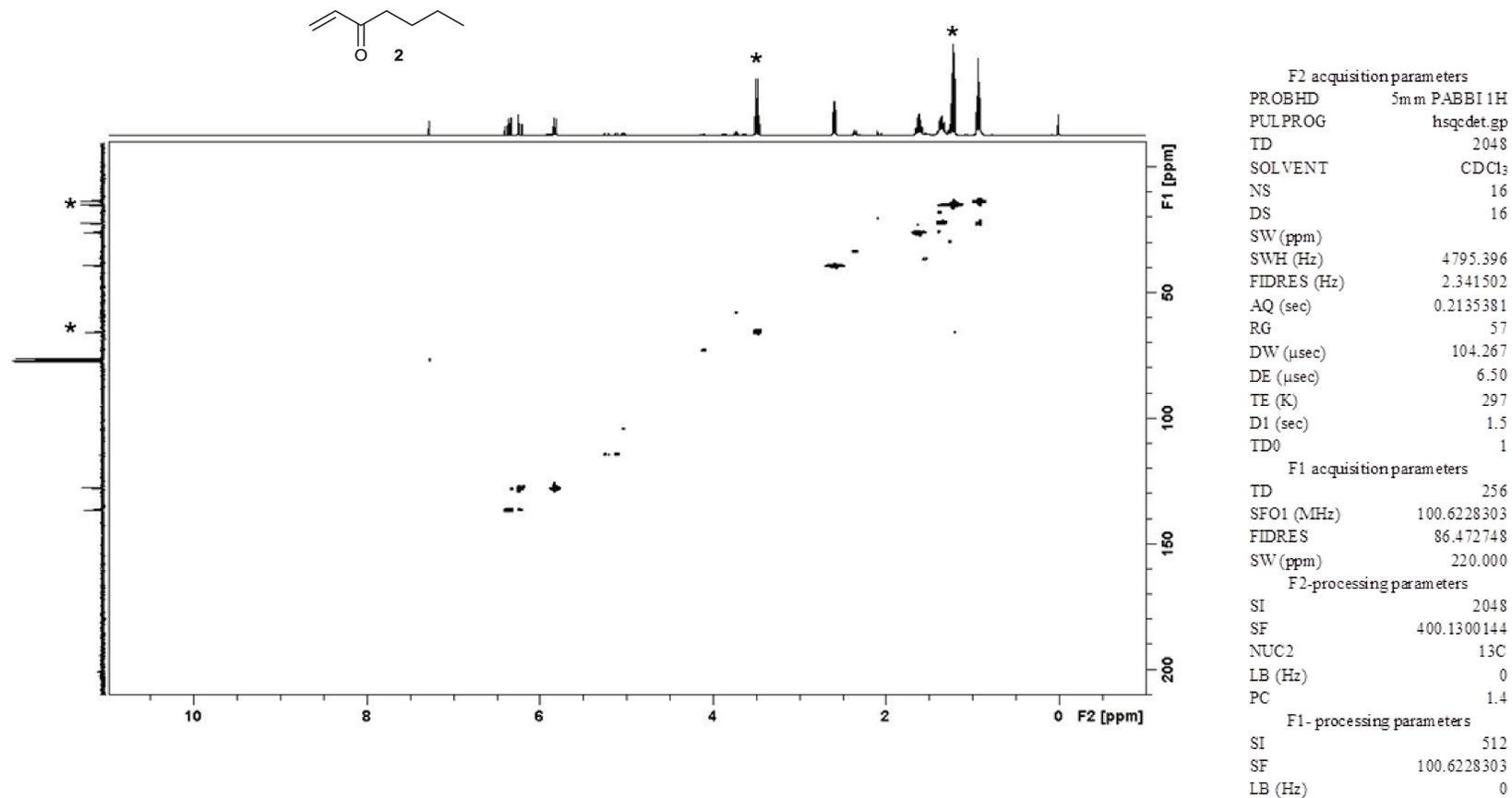
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 62.8952390 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



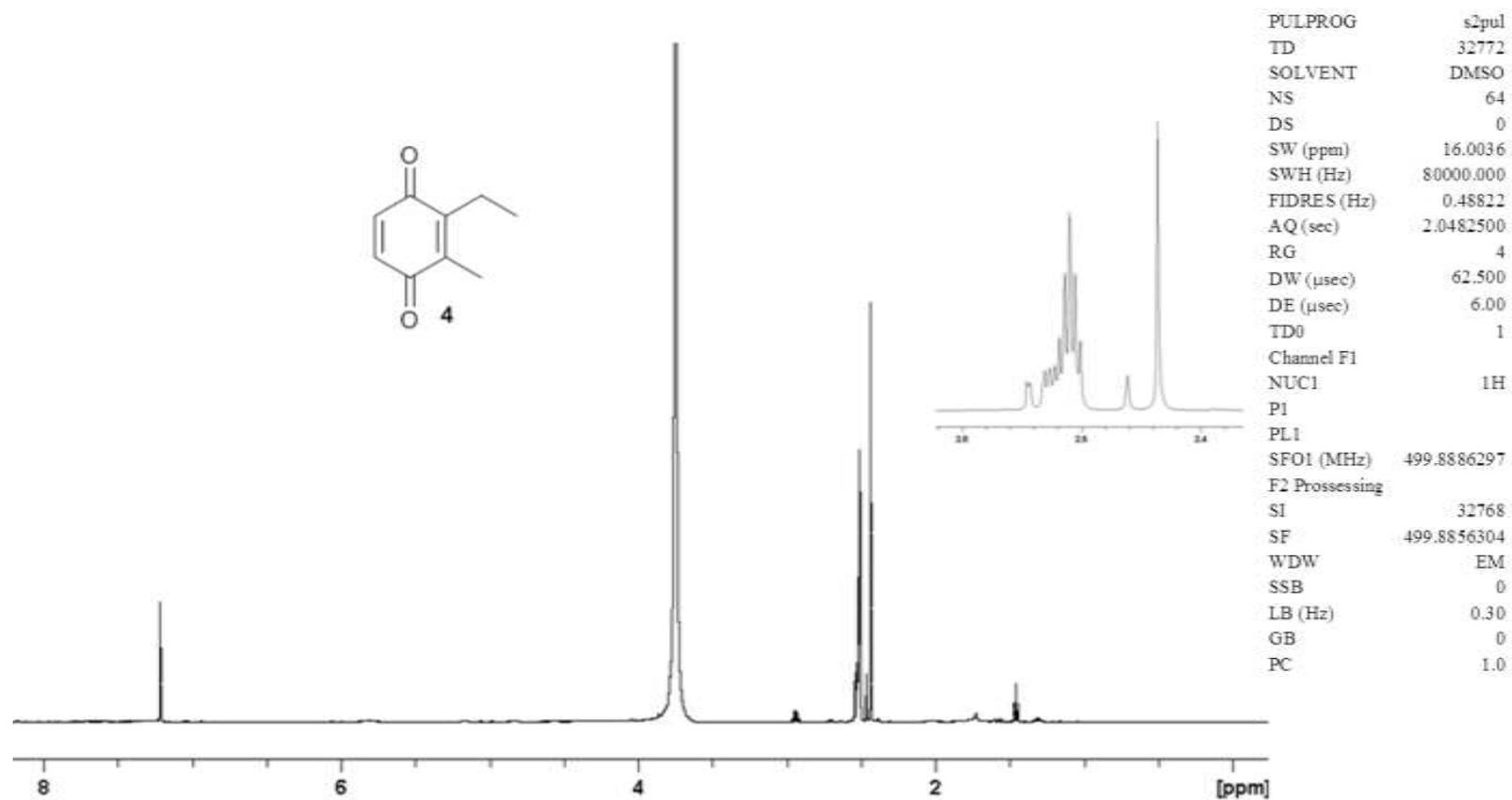
Anexo 5. Espectro de RMN de ¹³C – DEPT 90° e 135° (250 MHz, CDCl₃, CHCl₃) do exudato bruto de *Neosadocus maximus* contendo 1-hepten-3-ona (2) como composto majoritário.



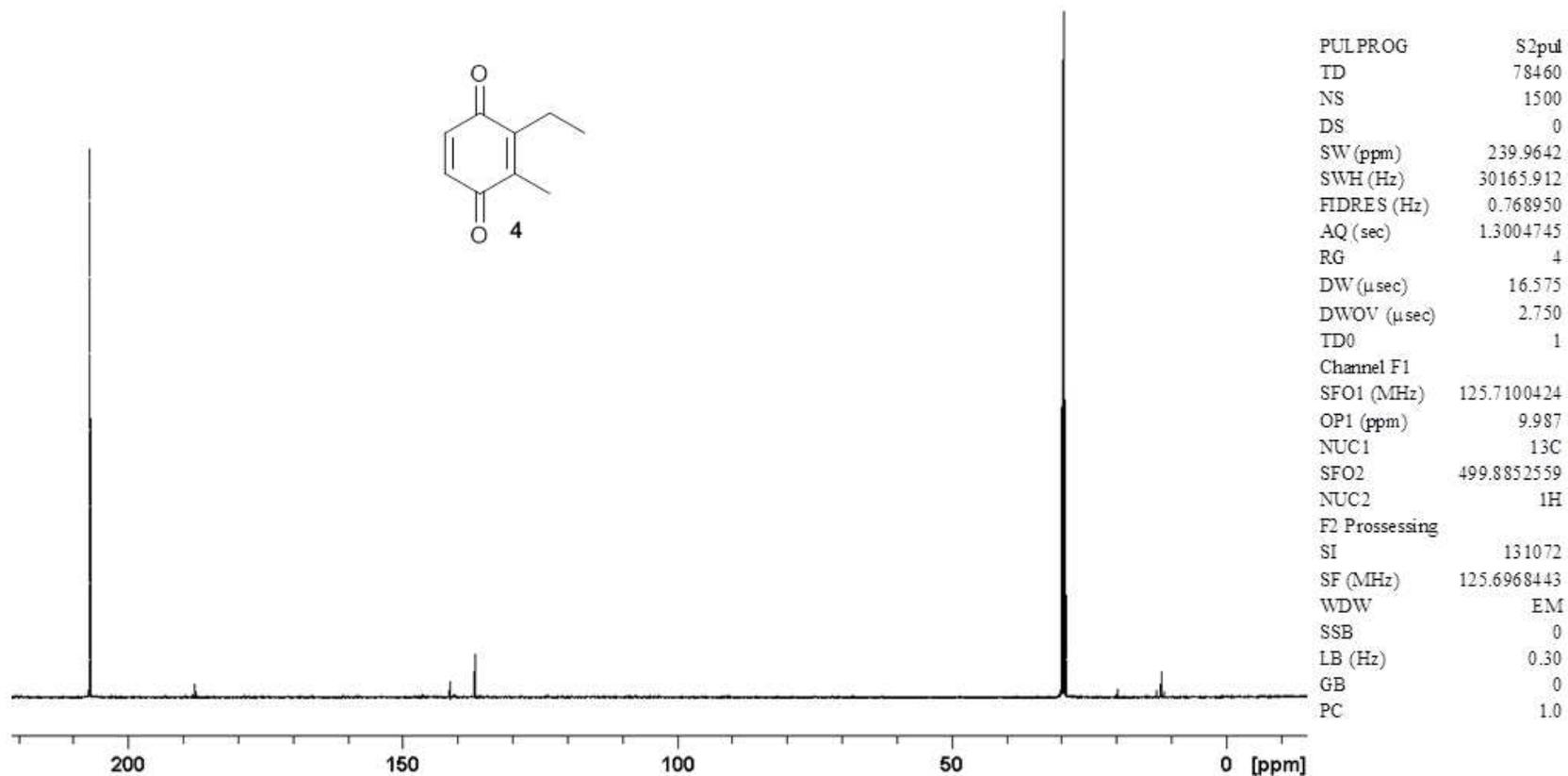
Anexo 6. Espectro de EM-IE da 1-hepten-3-ona (2).



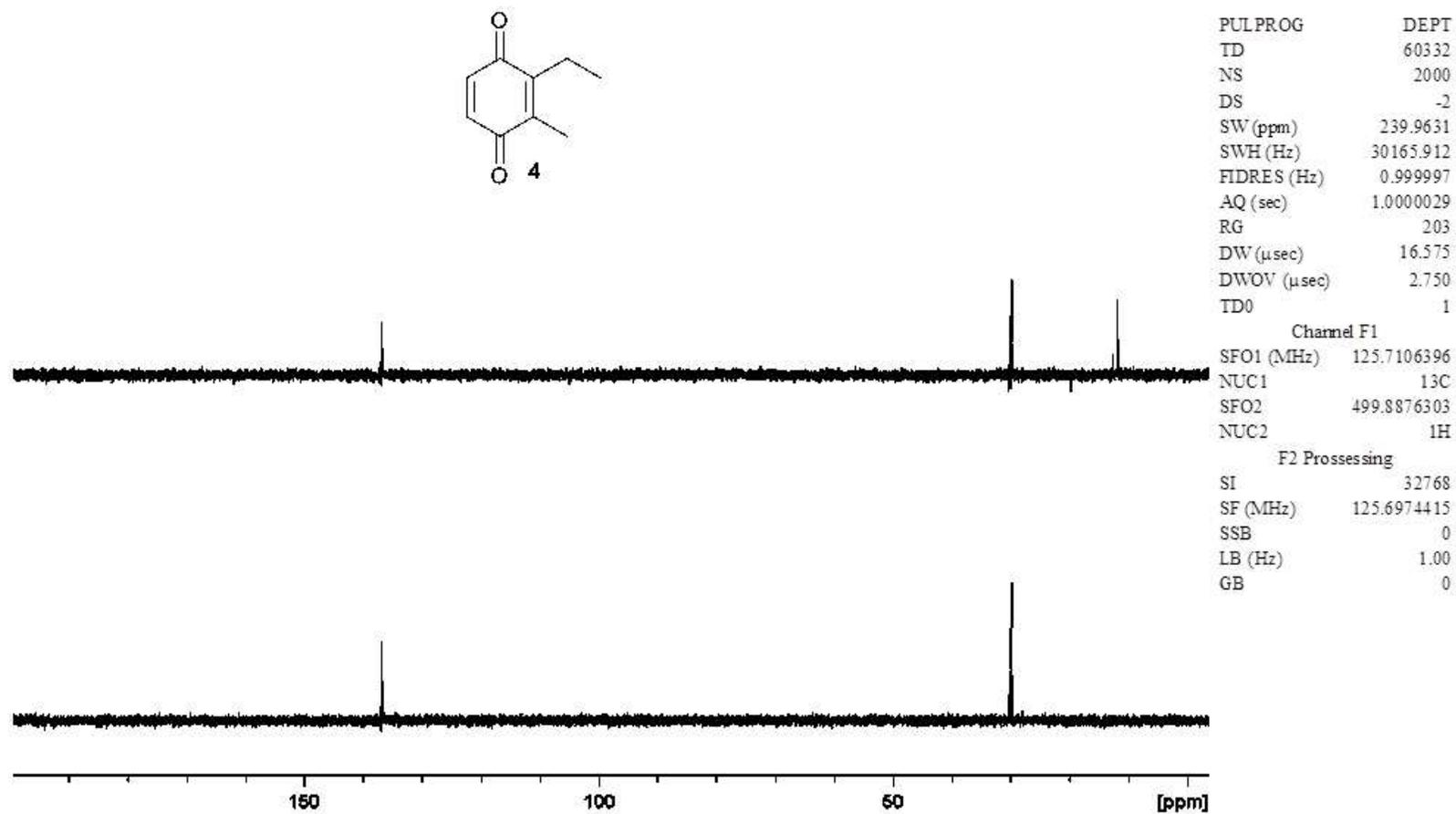
Anexo 7. Mapa de contorno do experimento de RMN HSQC ^{13}C - ^1H (CDCl_3 , TMS) da 1-hepten-3-ona (**2**) sintética. Sinais marcados com * correspondem ao éter etílico utilizado como solvente na síntese de **2**.



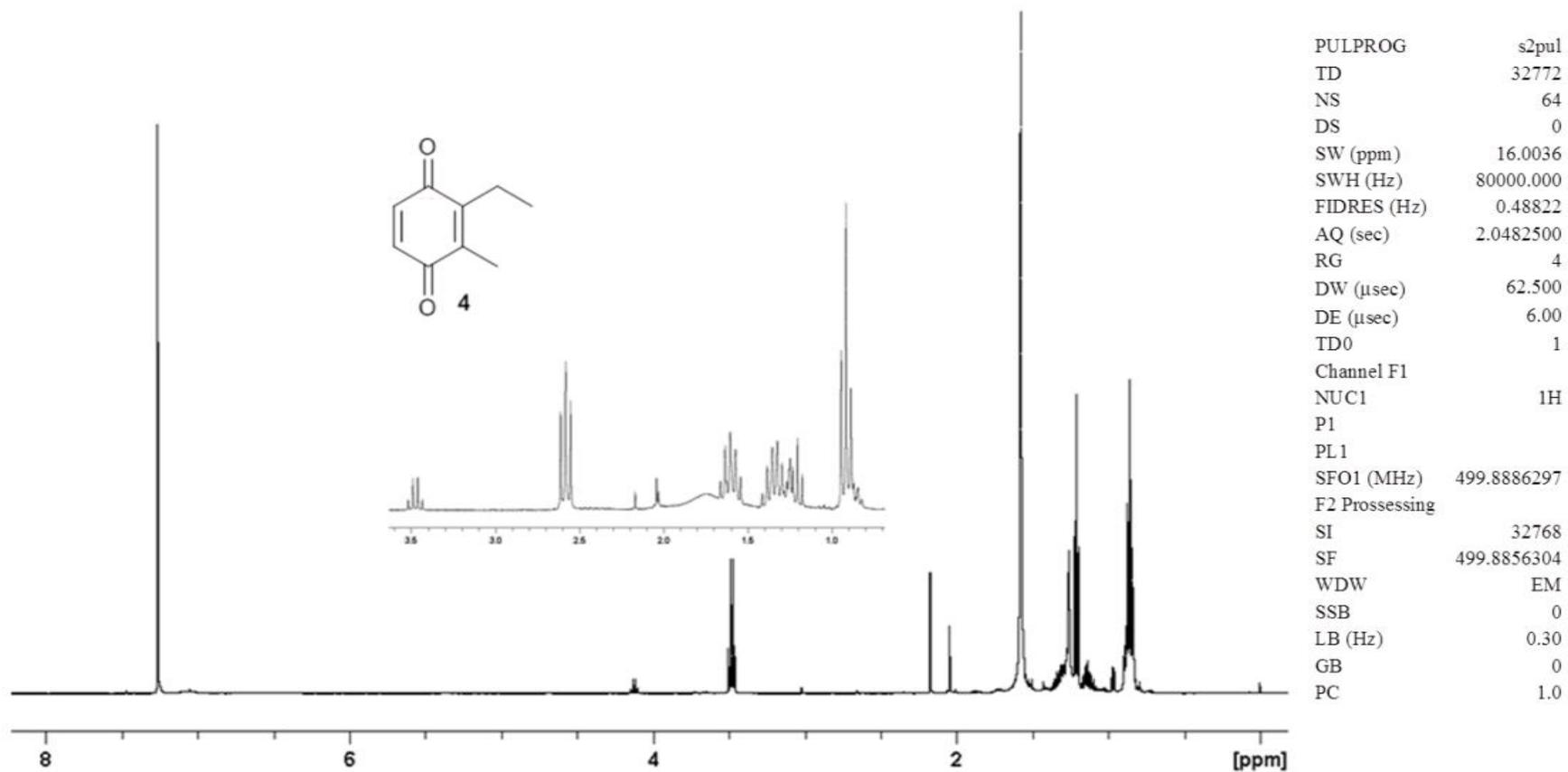
Anexo 8. Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato bruto de *Serracutisoma proximum* contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (**4**) como composto majoritário.



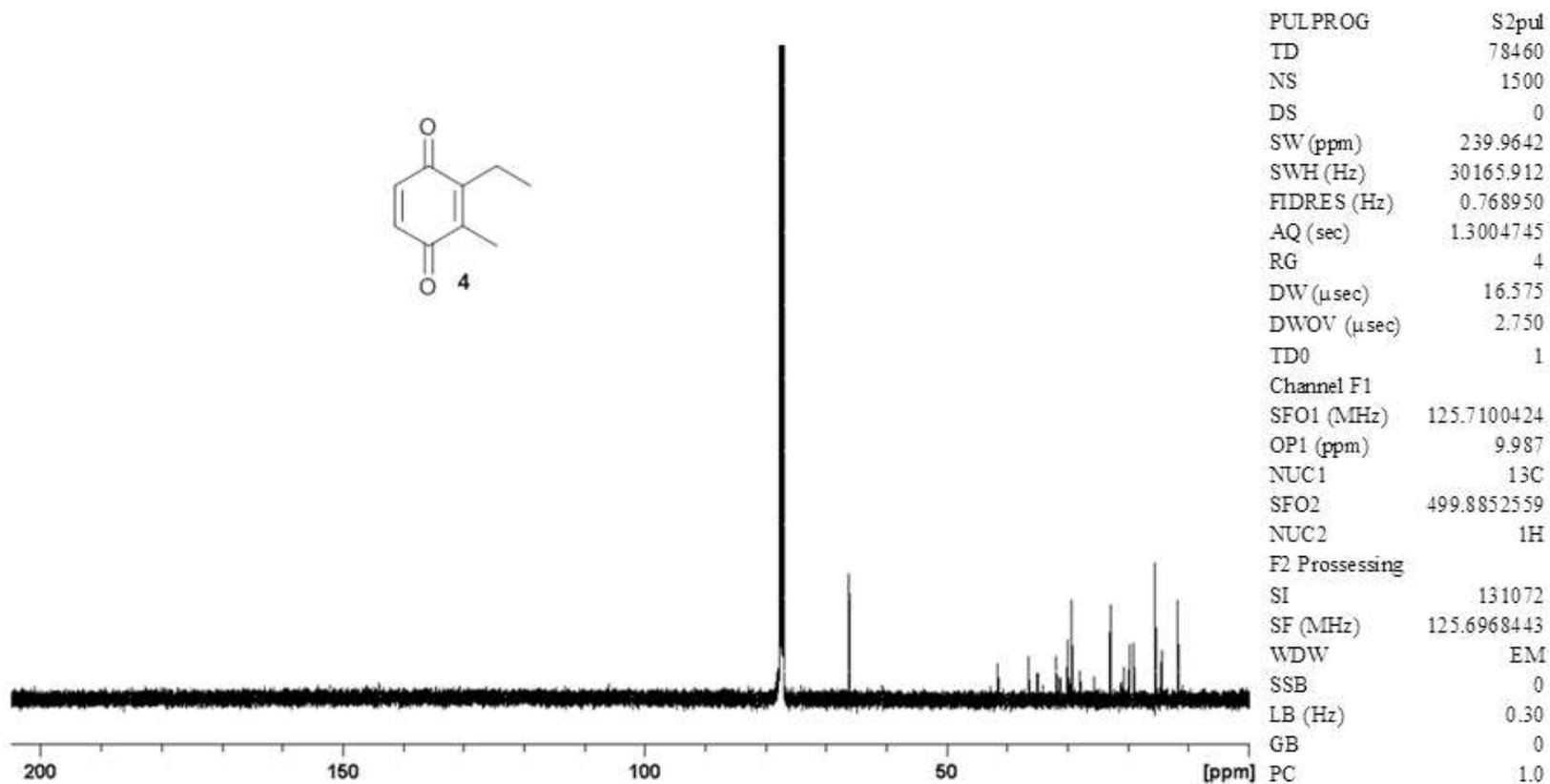
Anexo 9. Espectro de RMN de ^{13}C (125,7 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato bruto de *Serracutisoma proximum* contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (4) como composto majoritário.



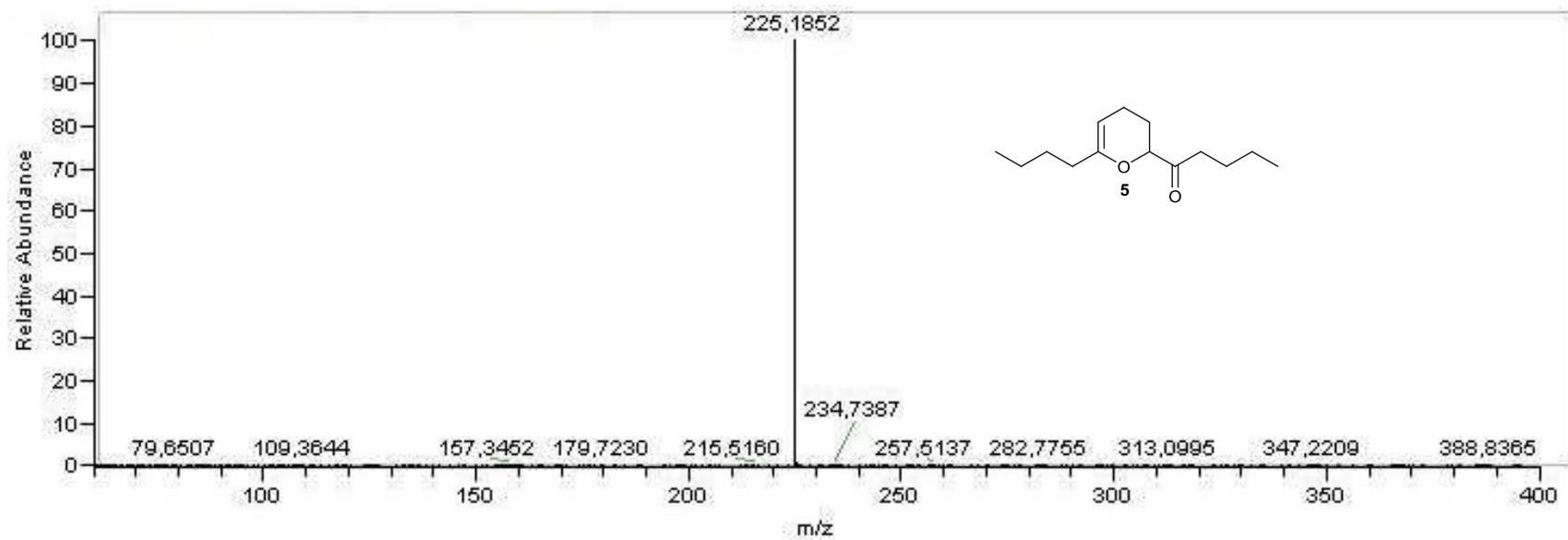
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 90° e 135° (125,7 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato de *Serracutisoma proximum* contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (**4**) como composto majoritário.



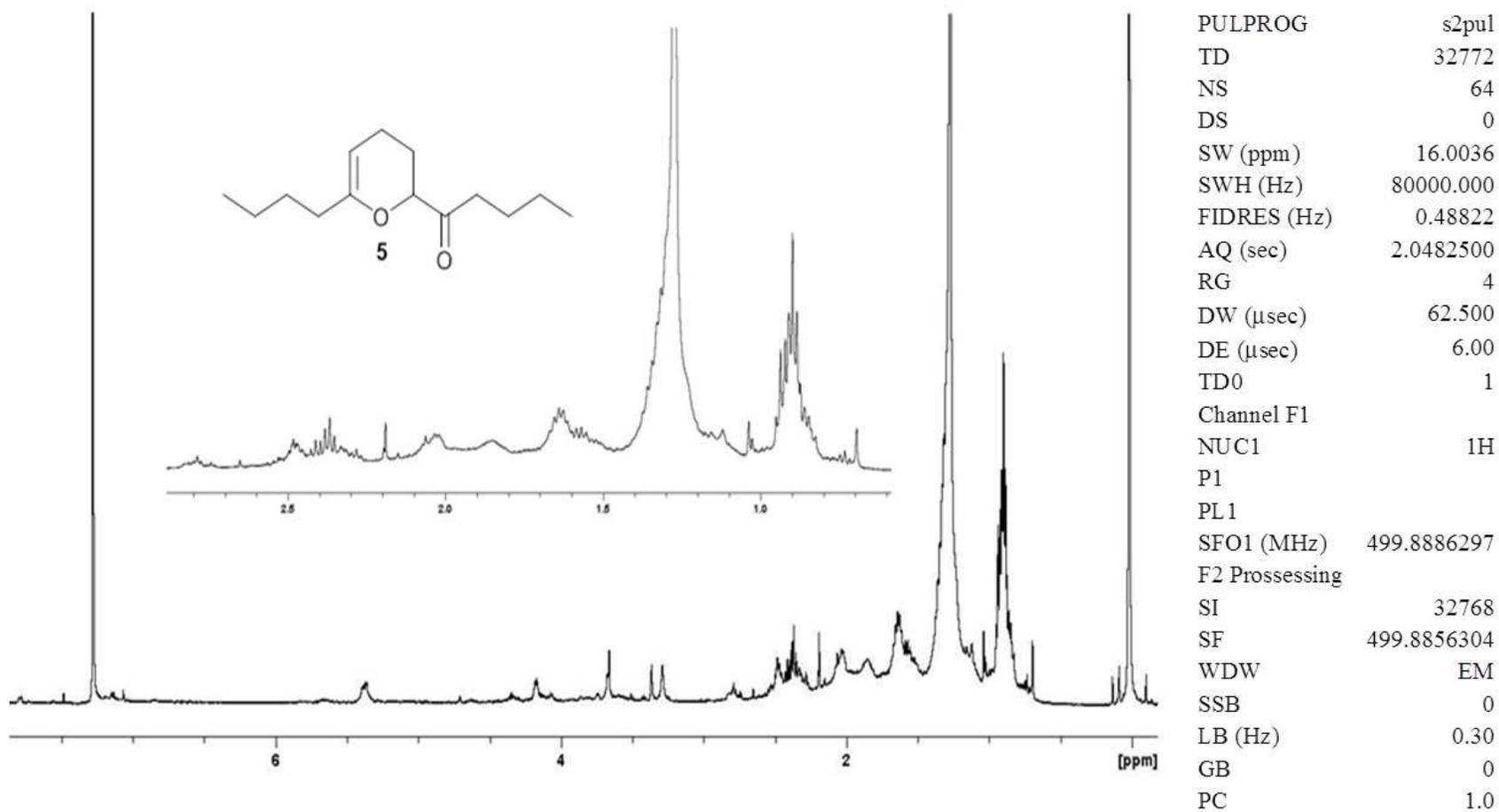
Anexo 11. Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato de *Roweria virescens* contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (**4**) como composto majoritário.



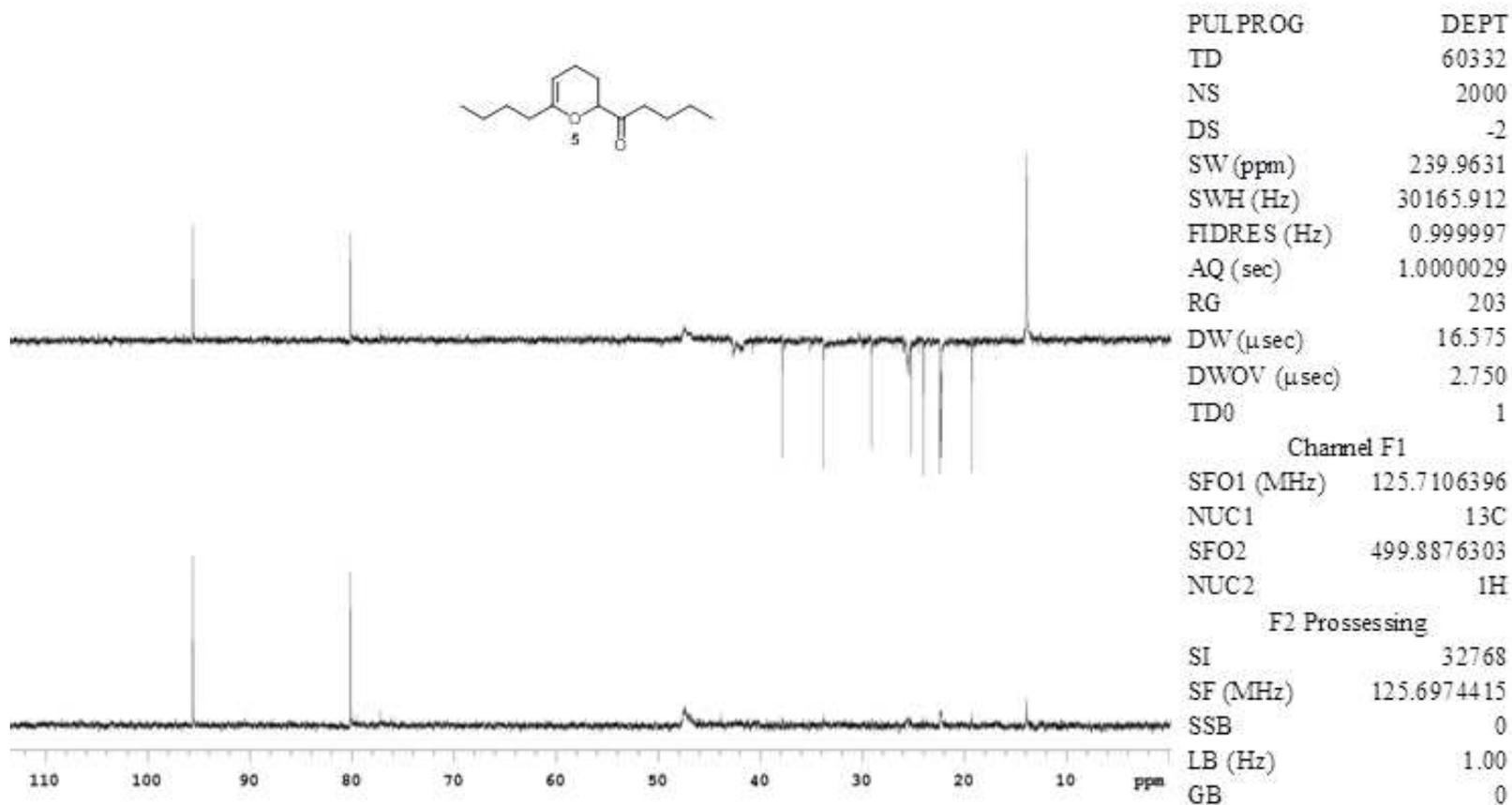
Anexo 12. Espectro de RMN de ^{13}C (125,7 MHz, acetona- d_6 , DMSO) do exudato de *Roweria virescens* contendo 2-etil,3-metil-1,4-benzoquinona (**4**) como composto majoritário.



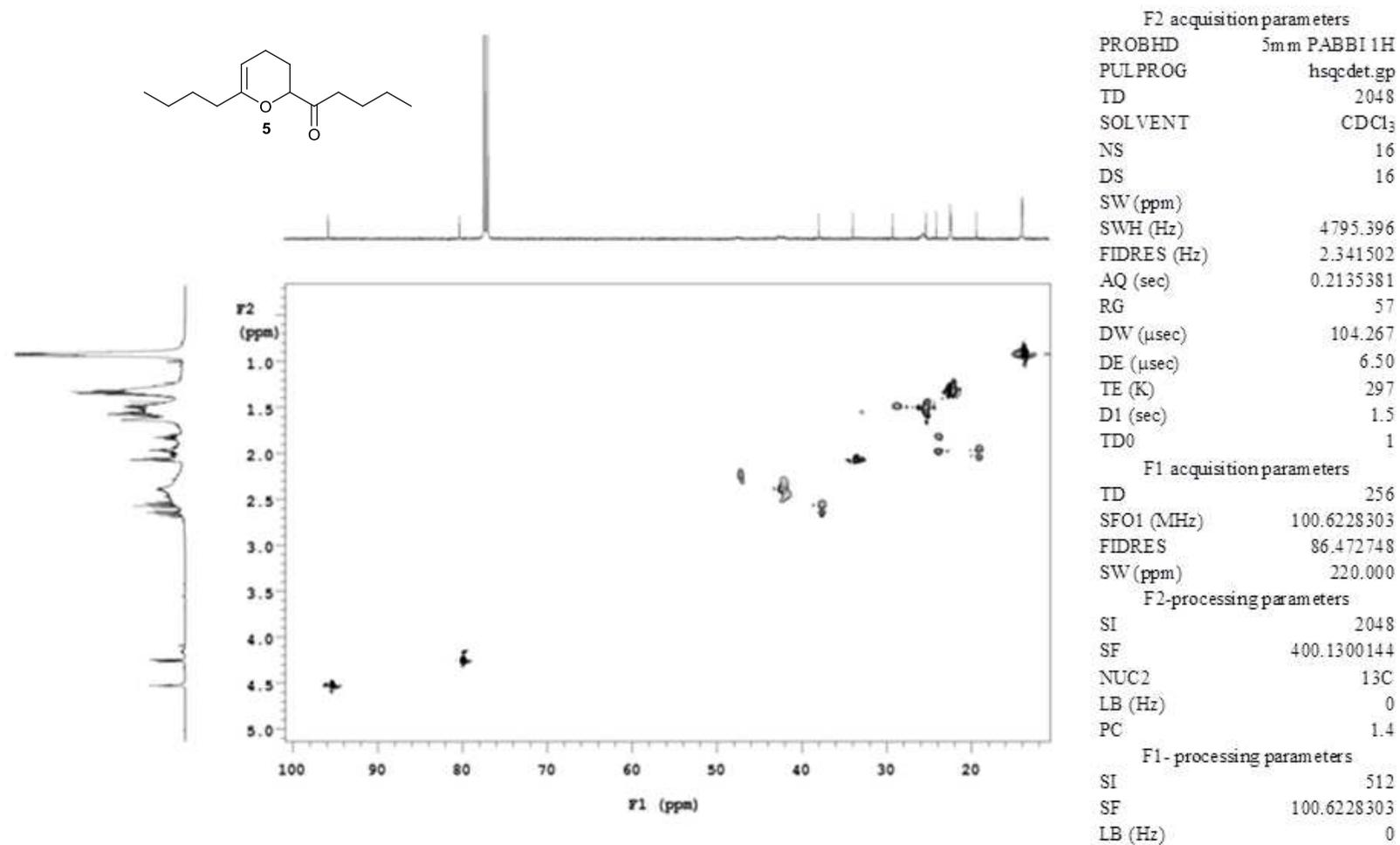
Anexo 13. Espectro de IES-EM da 1-(6-butyl-3,4-diidro-2*H*-piran-2-il)pentanona (**5**) natural.



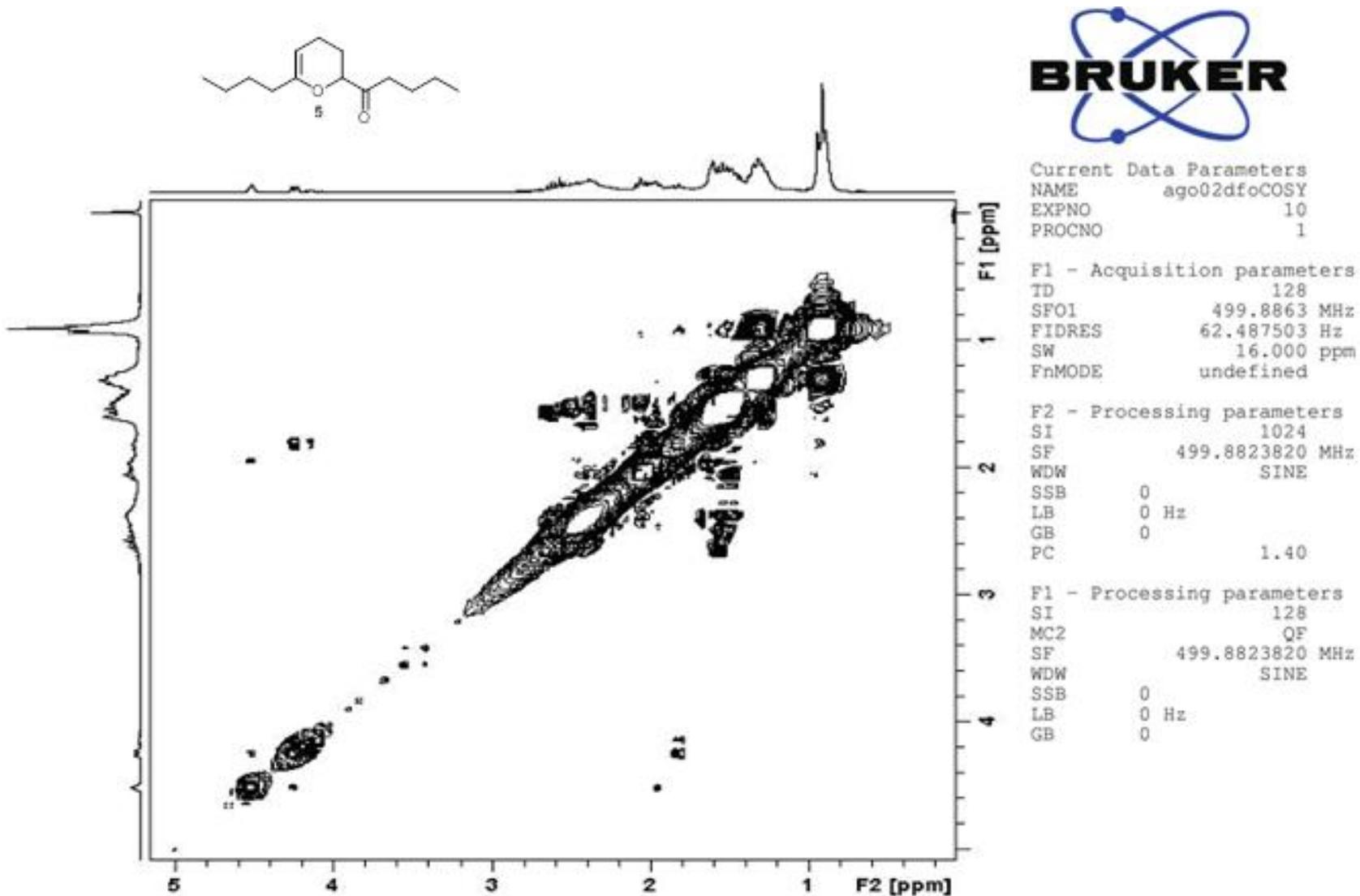
Anexo 14. Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, CDCl_3 , TMS) do exudato de *Iporangaia pustulosa* concentrada, contendo 1-(6-butyl-3,4-dihidro-2H-piran-2-il)pentanona (**5**) como composto majoritário.



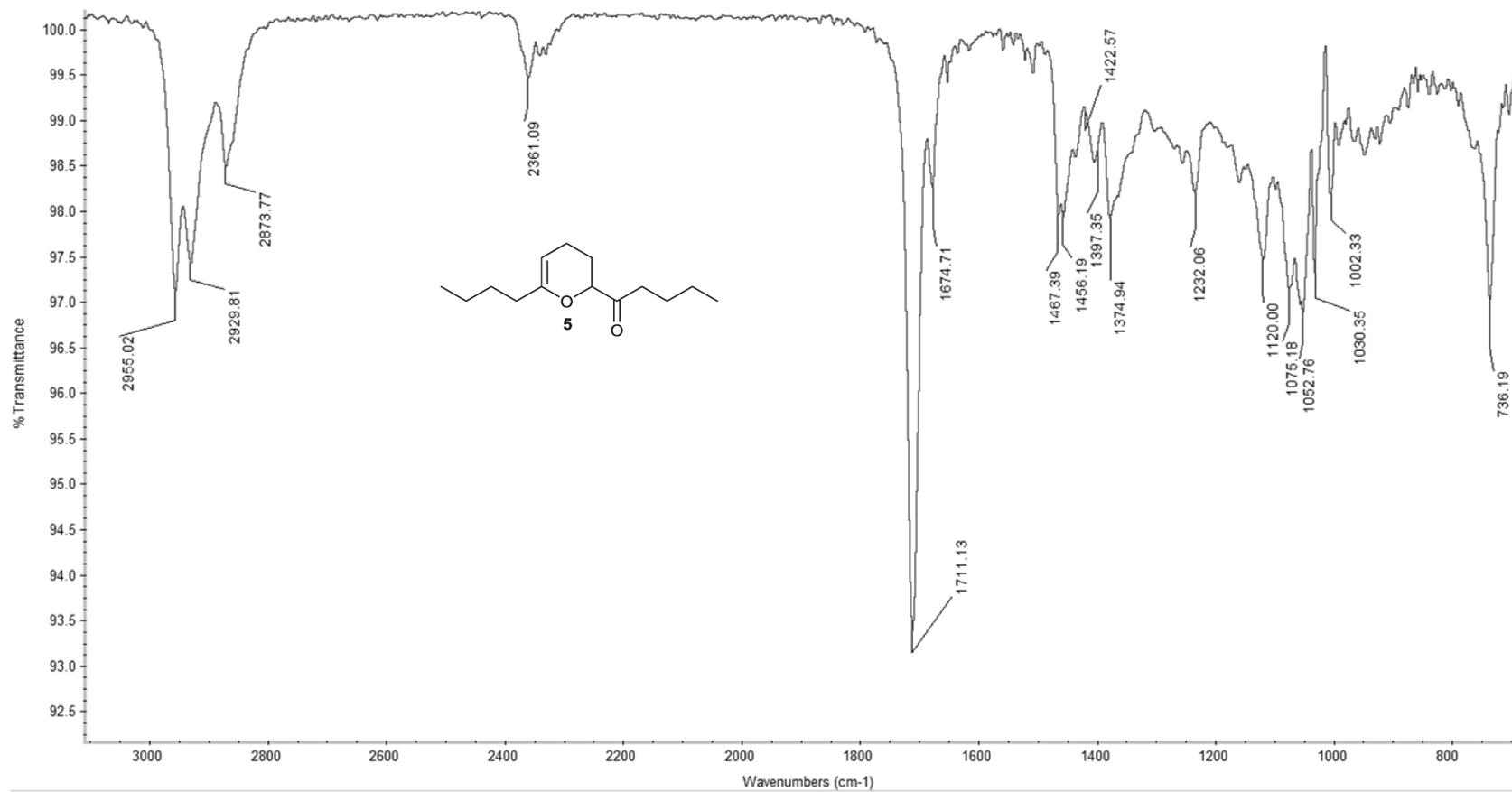
Anexo 15. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 90° e 135° (125,7 MHz, CDCl_3 , TMS) da 1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)pentanona (**5**) sintética.



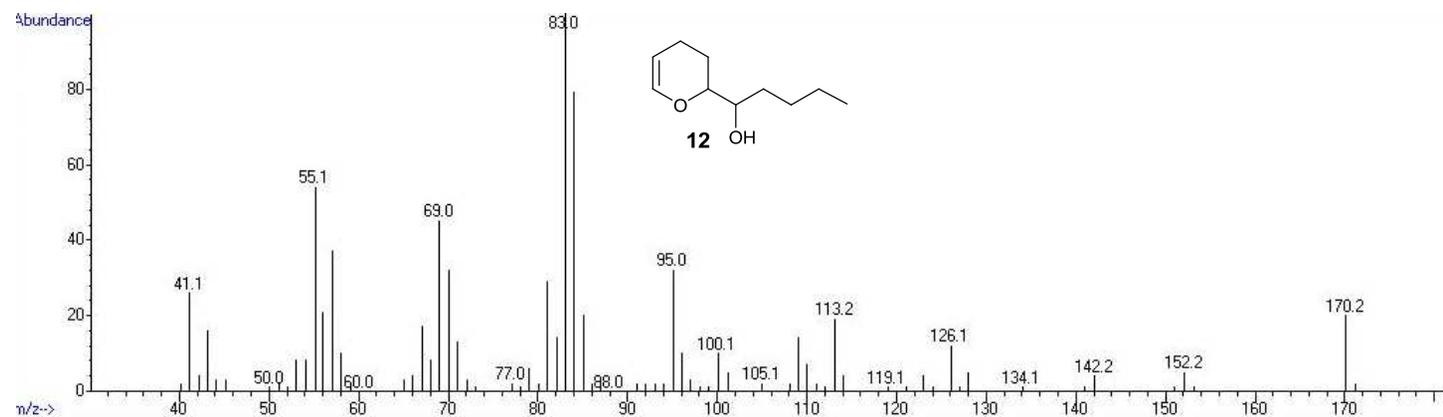
Anexo 16. Mapa de contorno do experimento de RMN HSQC ^{13}C - ^1H (CDCl_3 , TMS) da 1-(6-butil-3,4-diidro-2H-piran-2-il)pentanona (5) sintética.



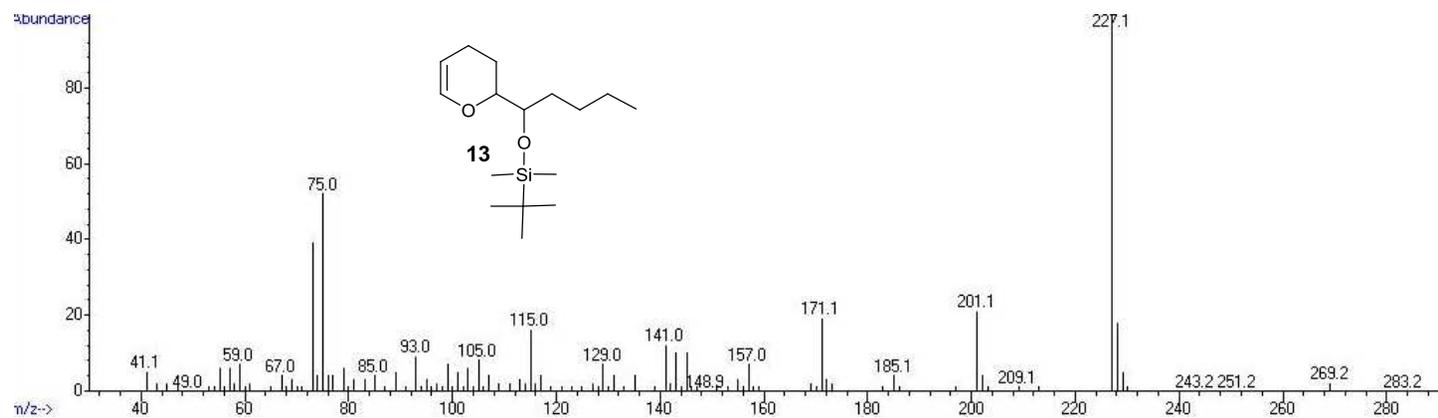
Anexo 17. Mapa de contorno do experimento de RMN g COSY ^1H - ^1H (CDCl_3 , TMS) da 1-(6-butil-3,4-diidro-2*H*-piran-2-il)pentanona (**5**) sintética.



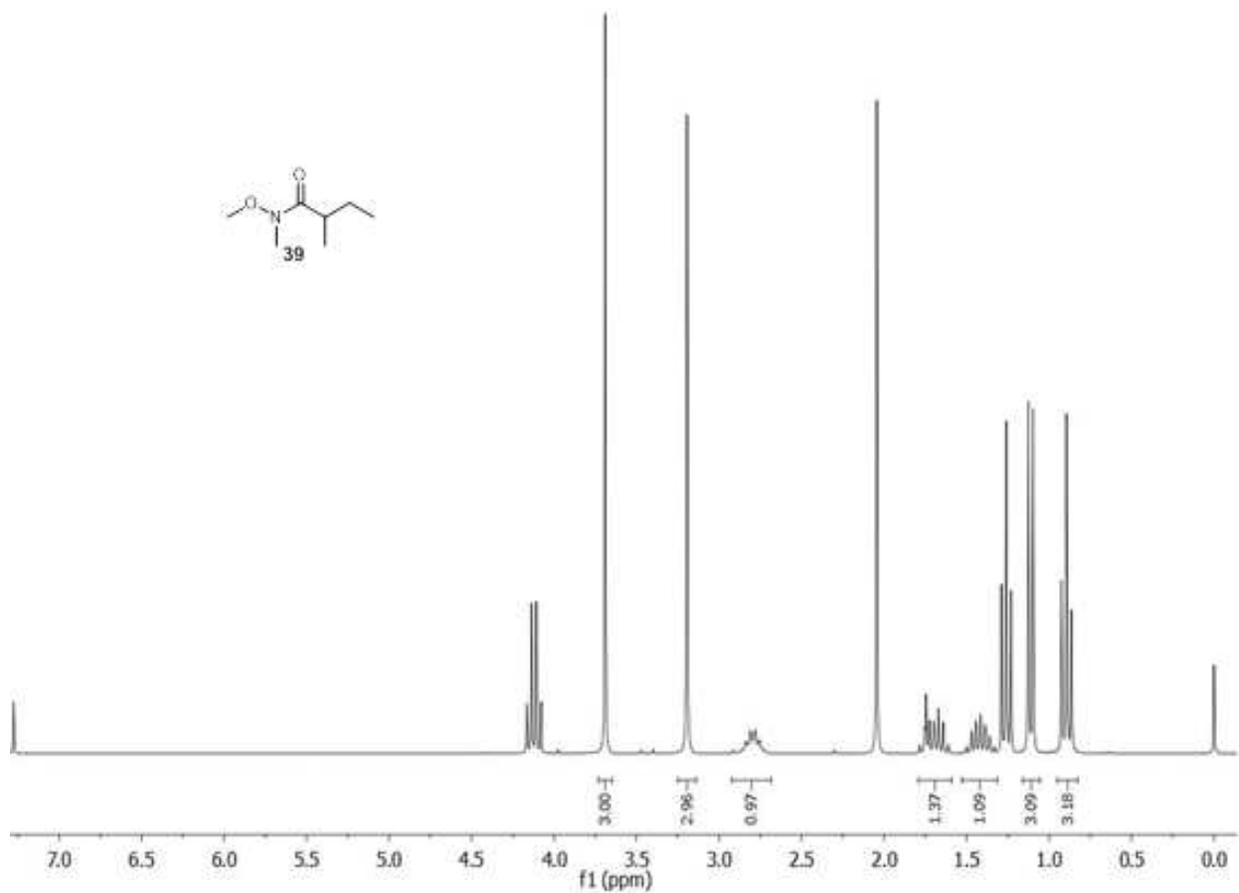
Anexo 18. Espectro de IV (filme) da 1-(6-butyl-3,4-diidro-2H-piran-2-il)pentanona (5) sintética.



Anexo 19. Espectro de EM-IE do 1-(6-*H*-3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)pentan-1-ol (**12**).



Anexo 20. Espectro de EM-IE do 1-(6-*H*-3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)pentan-1-*tert*-butildimetilsiloxano (**13**).



```

INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm QNP 1H/13
PULPROG      zg30
TD           32768
SOLVENT      CDC13
NS           32
DS           0
SWH          5175.983 Hz
FIDRES       0.157958 Hz
AQ           3.1653888 sec
RG           2048
DW           96.600 usec
DE           6.00 usec
TE           300.0 K
D1           1.00000000 sec
TD0          1

```

```

===== CHANNEL f1 =====
NUC1         1H
P1           13.00 usec
PL1          -6.00 dB
SFO1         250.1315447 MHz

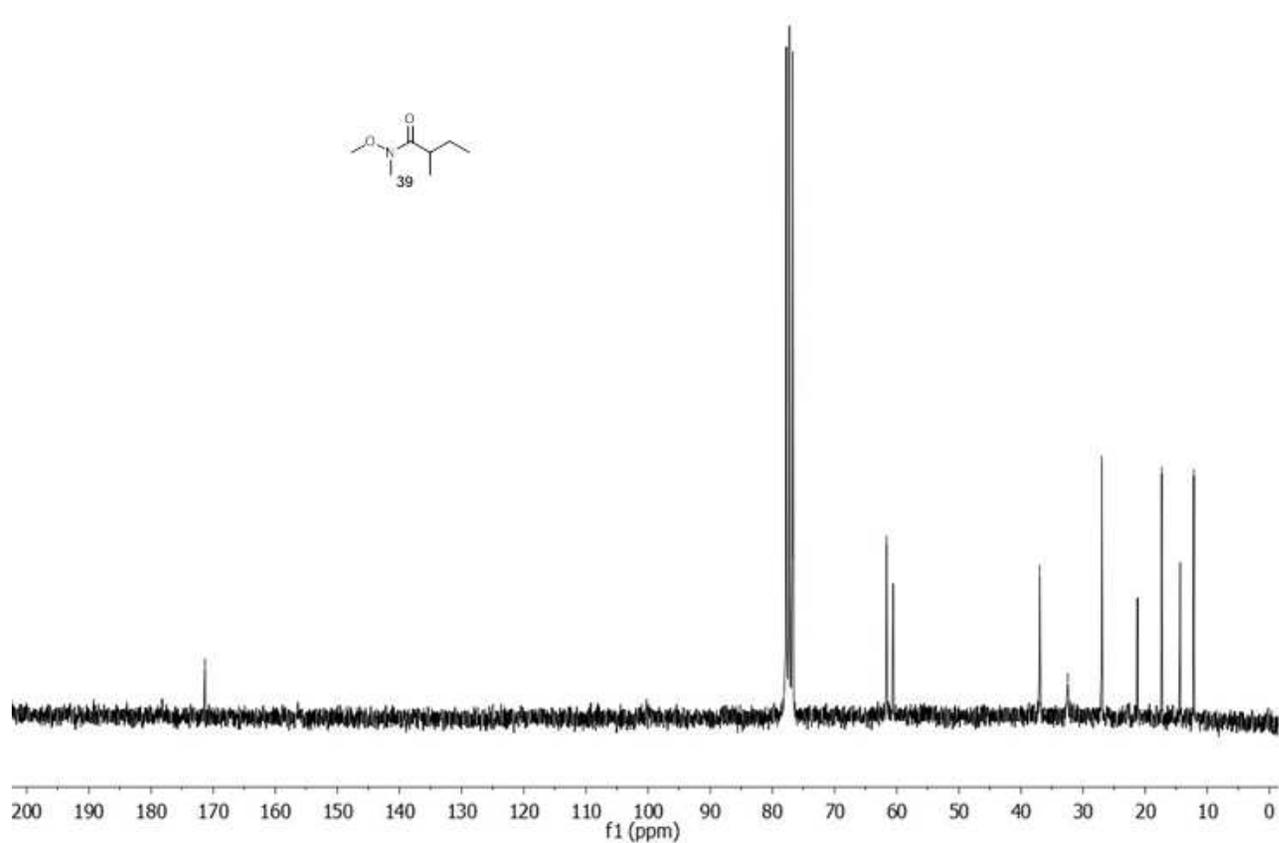
```

```

F2 - Processing parameters
SI           32768
SF           250.1300000 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.30 Hz
GB           0
PC           1.00

```

Anexo 21. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 250,13 MHz, TMS) da *N*-metoxi-*N*,2-dimetilbutanamida (**39**).



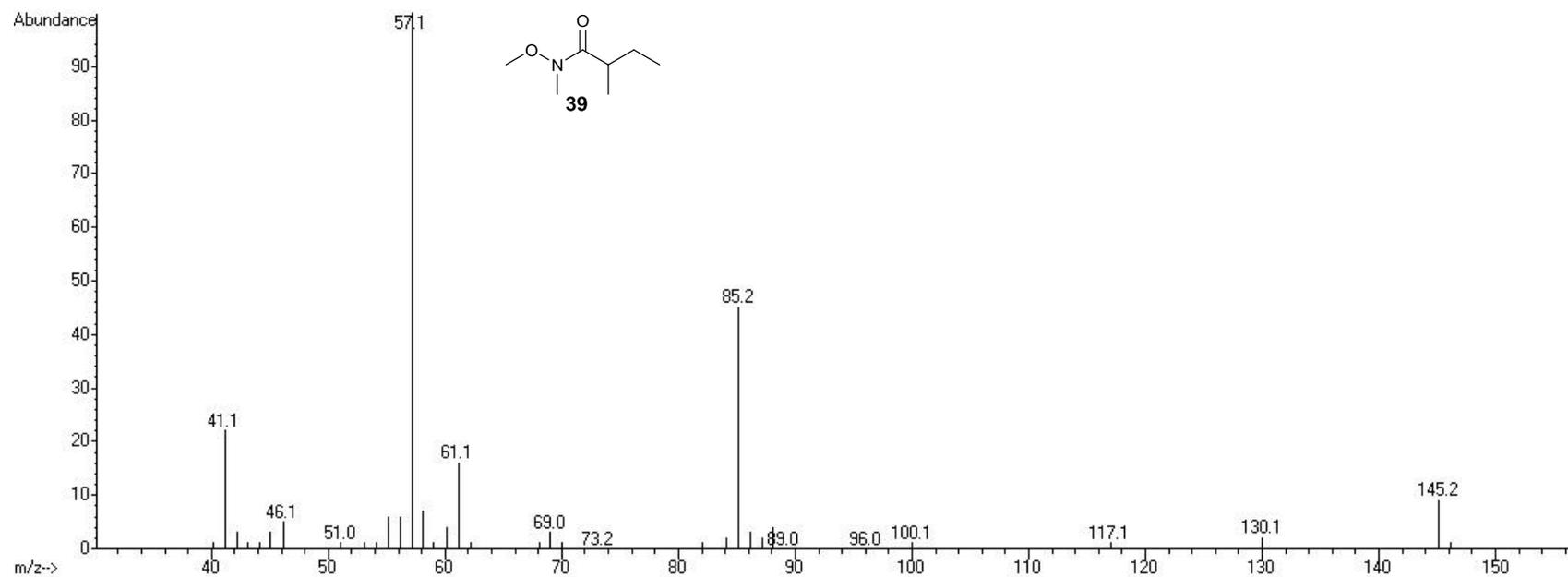
```

PULPROG      zgpg30
TD            32768
SOLVENT      CDC13
NS            14477
DS            0
SWH           15060.241 Hz
FIDRES        0.459602 Hz
AQ            1.0878977 sec
RG            256
DW            33.200 usec
DE            6.00 usec
TE            300.0 K
D1            2.00000000 sec
d11           0.03000000 sec
DELTA         1.89999998 sec
TD0           1
SFO1          62.9015280 MHz
NUC1          13C
P1            10.00 usec
PLW1          -1.00000000 W
SFO2          250.1310005 MHz
NUC2          1H
CPDPRG[2]    waltz16
PCPD2         100.00 usec
PLW2          -1.00000000 W
PLW12         -1.00000000 W
PLW13         -1.00000000 W

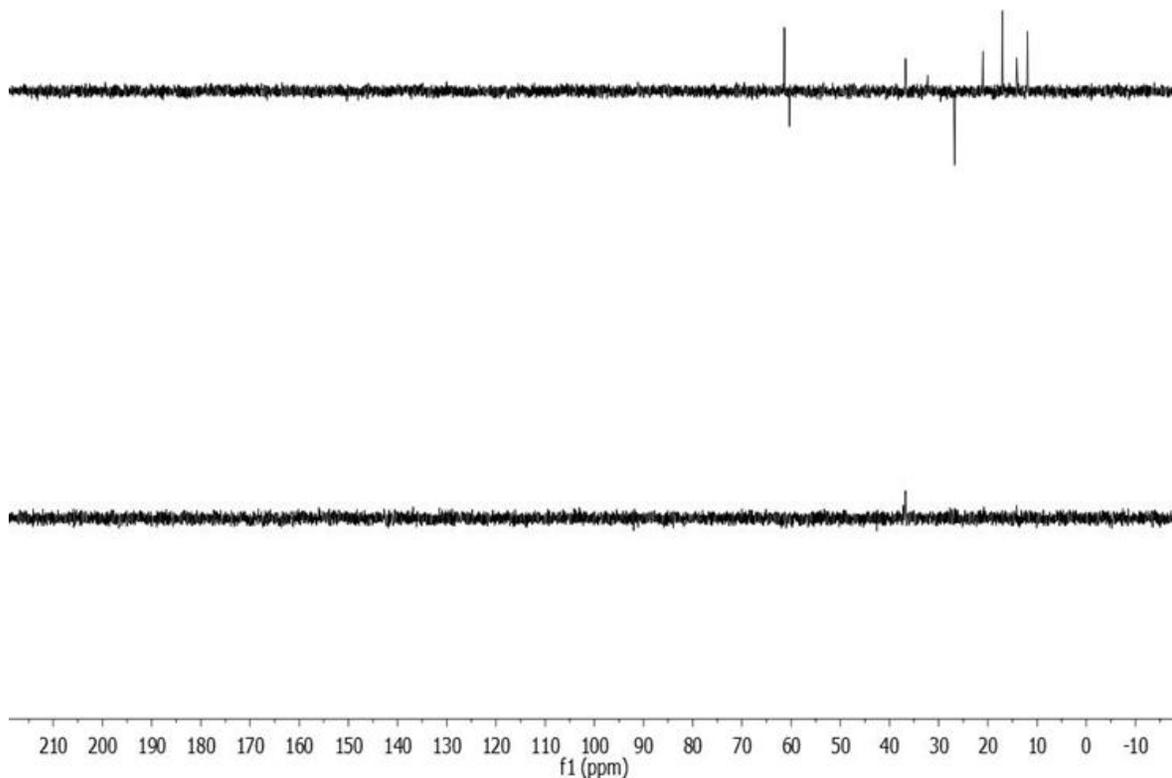
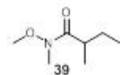
F2 - Processing parameters
SI            32768
SF            62.8952390 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40

```

Anexo 22. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 62,90 MHz, TMS) da *N*-metoxi-*N*,2-dimetilbutanamida (**39**).

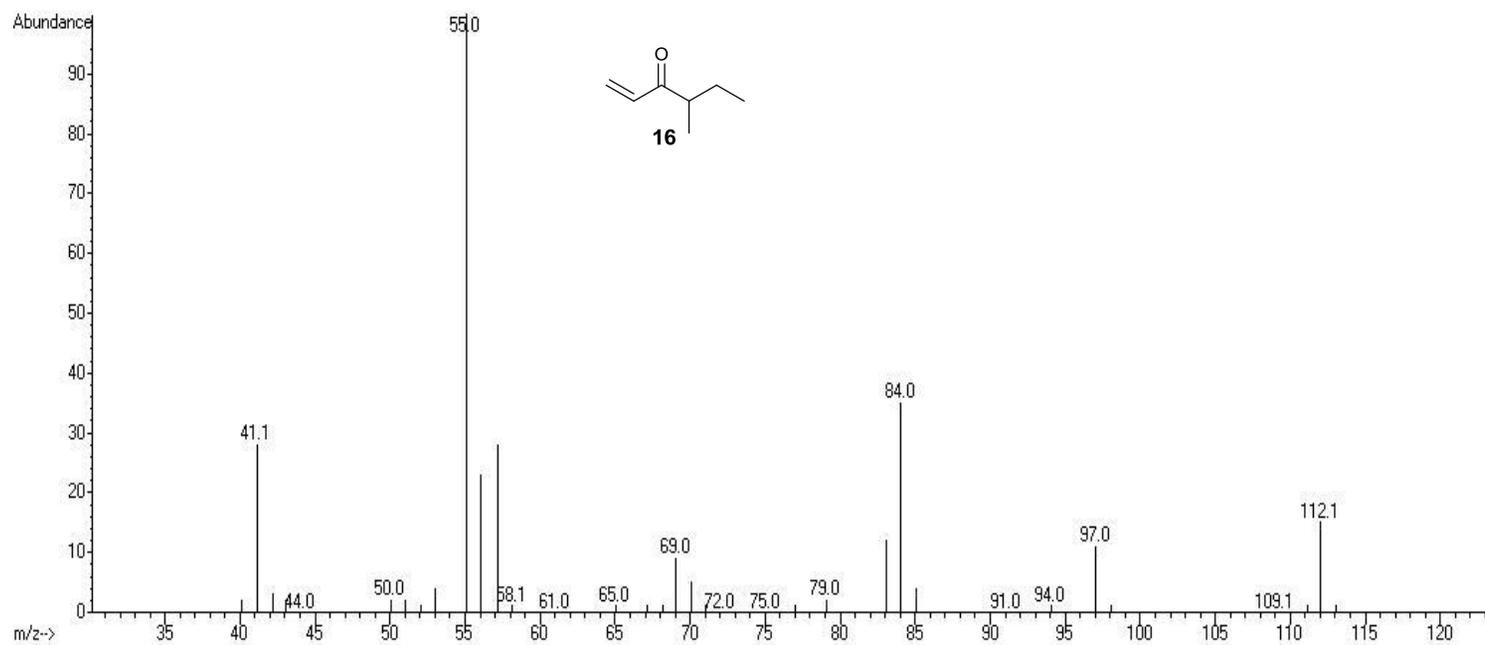


Anexo 23. Espectro de IE-EM da *N*-metoxi-*N*,2-dimetilbutanamida (**39**).

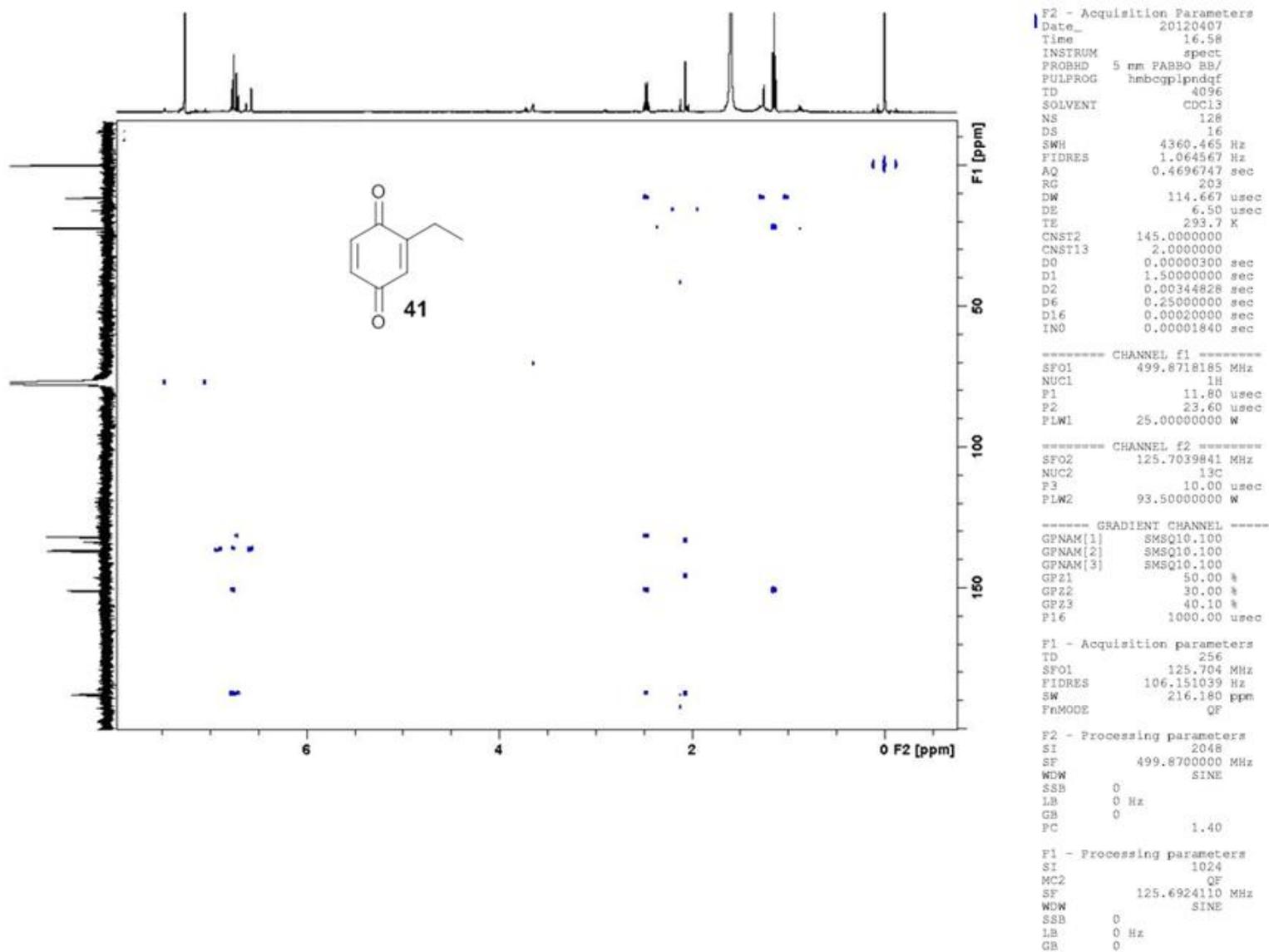


TD	32768
SOLVENT	CDC13
NS	5000
DS	0
SWH	15060.241 Hz
FIDRES	0.459602 Hz
AQ	1.0878977 sec
RG	912.3
DW	33.200 usec
DE	6.00 usec
TE	300.0 K
CNST2	145.0000000
D1	2.00000000 sec
d2	0.00344828 sec
d12	0.00002000 sec
DELTA	0.00001273 sec
TD0	1
SFO1	62.9015280 MHz
NUC1	13C
P1	10.00 usec
p2	20.00 usec
PLW1	-1.00000000 W
SFO2	250.1310005 MHz
NUC2	1H
CPDPRG[2	waltz16
P3	13.00 usec
p4	26.00 usec
PCPD2	100.00 usec
PLW2	-1.00000000 W
PLW12	-1.00000000 W
F2 - Processing parameters	
SI	32768
SF	62.8952390 MHz
NDW	EM
SSB	0
LB	1.00 Hz
GB	0
PC	1.40

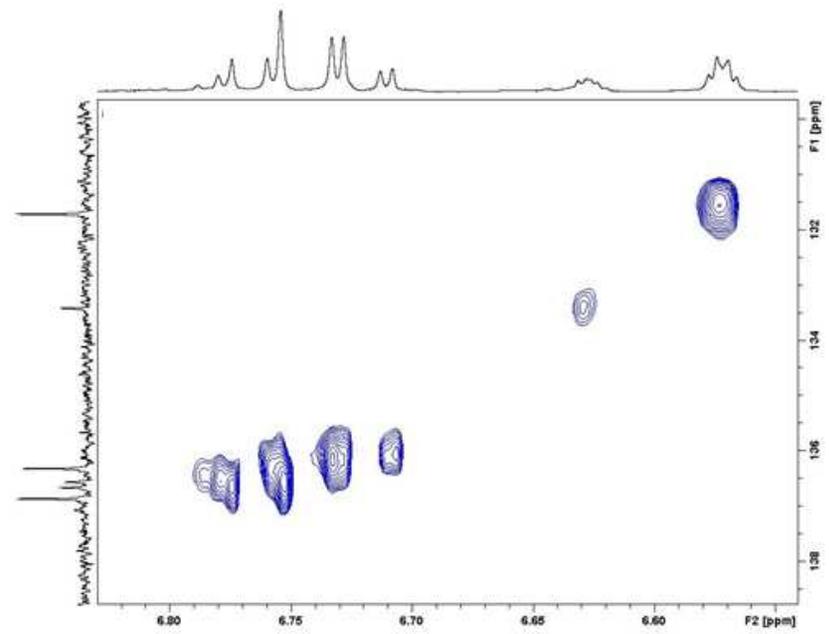
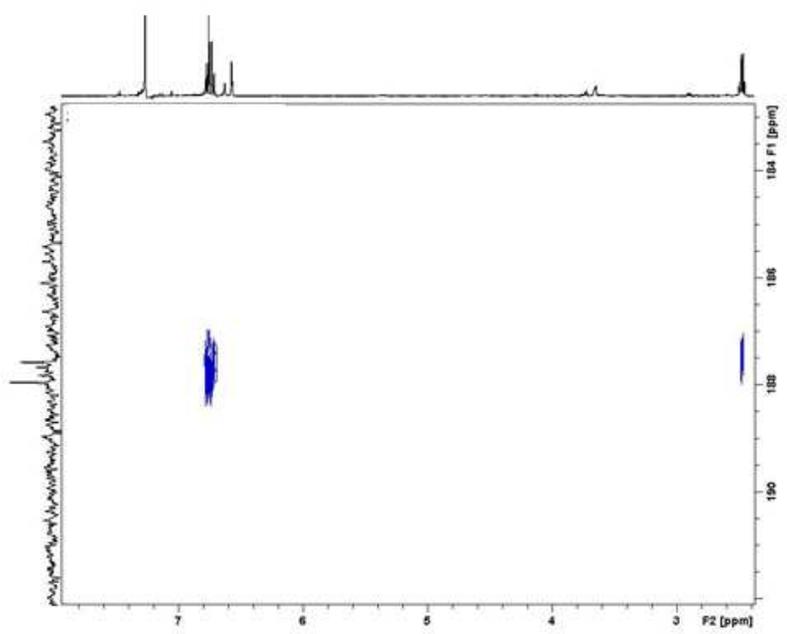
Anexo 24. Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT 90° e 135° (CDCl_3 , 62,90 MHz) da *N*-metoxi-*N*,2-dimetilbutanamida (**39**).



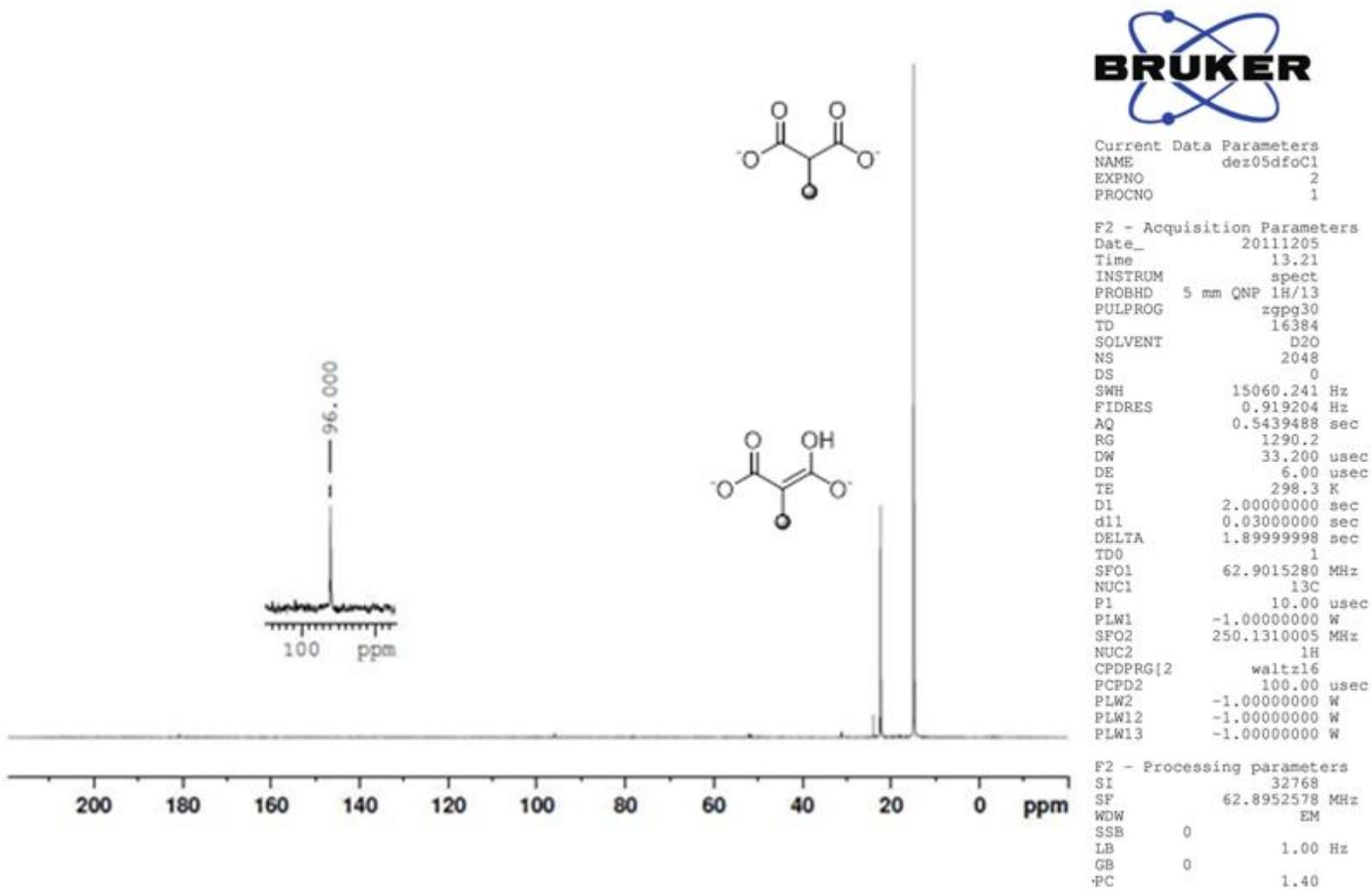
Anexo 25. Espectro de IE-EM da 4 -metil-1-hexen-3-ona (**16**).



Anexo 26. Mapa de contorno do experimento de RMN ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , TMS) da 2-etil-1,4-benzoquinona (**41**).

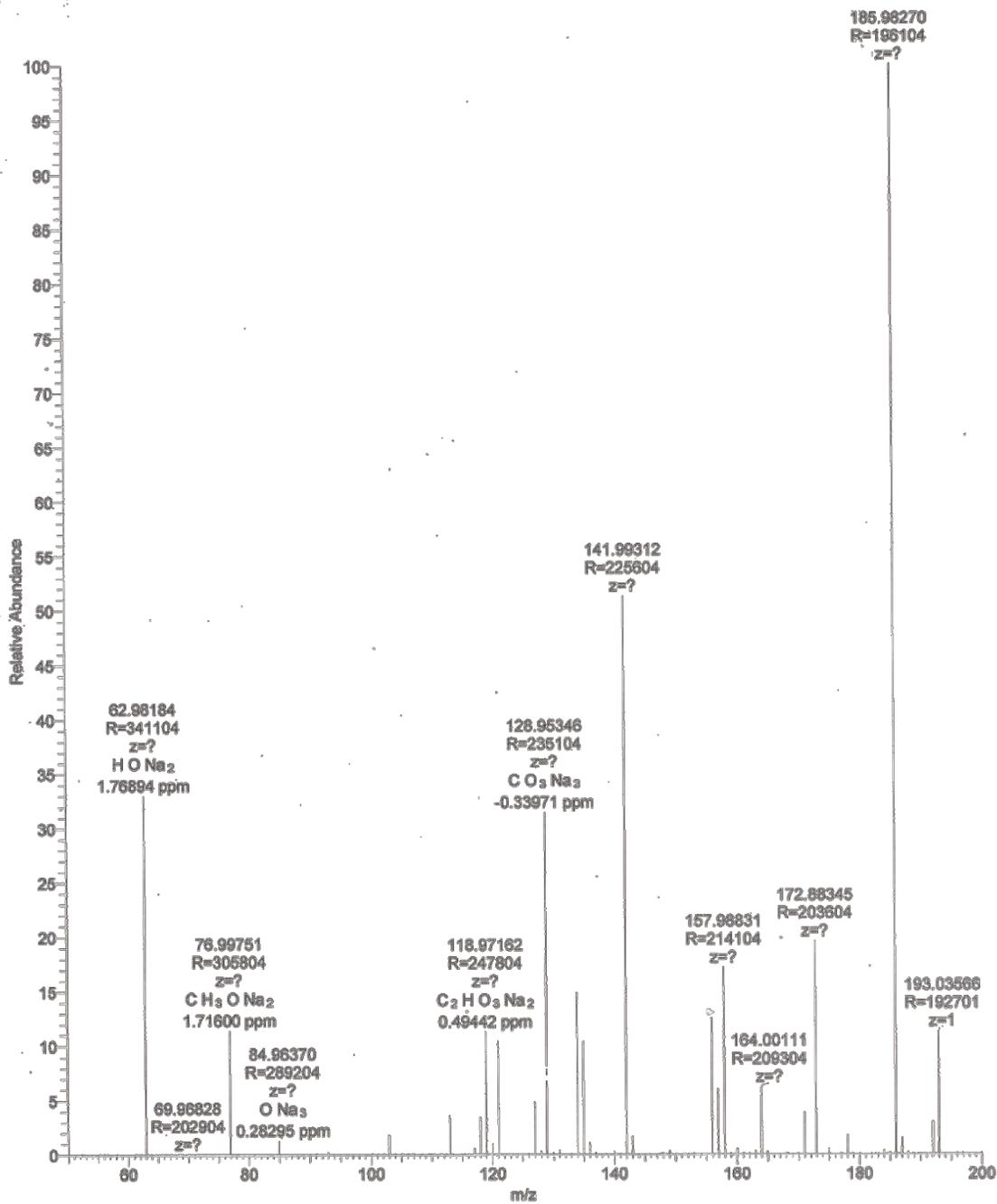


Anexo 27. Expansões do mapa de contorno do experimento de RMN ^{13}C - ^1H HMBC (CDCl_3 , TMS) da 2-etil-1,4-benzoquinona (**41**).



Anexo 28. Espectro de RMN de ^{13}C (62,9 MHz, D_2O , CCl_4) do $[4\text{-}^{13}\text{C}]$ metilmalonato de sódio.

metilmalonato positivo #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 2.93E6
T: FTMS + c ESI Full ms [50.00-200.00]



Anexo 29. Espectro massas de ionização por eletrón spray de alta resolução do [4-¹³C]metilmalonato de sódio.