

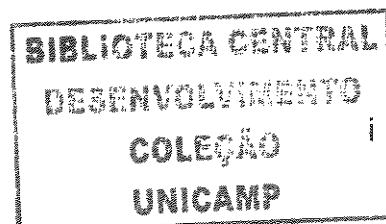
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Ecologia química de Maxillariinae, *Spathodea campanulata* e
Meliponiinae**

Tese apresentada pela aluna do curso de doutorado
em química, **ADRIANA FLACH**, ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de "*Doctor Scientiae*"

Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli
Orientadora

CAMPINAS
SÃO PAULO - BRASIL
JULHO 2005



DATA	EX
CHAMADA	
T/UNICAMP	
F512.2	
EX	
MO BC	65722
OC	16-86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
ECO	11.00
ATA	21.9.05
CPD	

6 JUL 30 5149

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

F592e Flach, Adriana.
Ecologia química em *Maxillariinae*, *Spathodea*
campanulata e *Meliponiinae* / Adriana Flach. --
Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto
de Química.

1. Terpenos. 2. Voláteis. 3. Recompensas florais.
I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Instituto de Química.
III. Título.

Título em inglês: Chemical ecology in *Maxillariinae*, *Spathodea*, *campanulata* and *Meliponiinae*

Palavras-chave em inglês: Terpenes, Volatiles, Floral rewards

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutora em Química Orgânica

Banca examinadora: Anita Jocelyne Marsaioli, Paulo Mitsuo Imamura, Sebastião Ferreira Fonseca, Maria Fátima da Graça Fernandes da Silva, Ademir Farias Morel

Data de defesa: 28/07/2005

Ao meu grande amor, Luiz, meu marido maravilhoso ao qual agradeço o carinho, compreensão, amor e o indispensável apoio neste trabalho.

Aos meus pais pelo exemplo de vida e o amor que sempre me dedicaram, acreditando no meu ideal e vibrando a cada etapa vencida.

Aos meus irmãos e suas famílias pelo carinho e apoio.

A Tia Rosa, ao Tio Miro ("in memoriam") e família que me acolheu com carinho para que eu tivesse condições de estudar e pela agradável amizade que é mantida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a realização de meus sonhos profissionais e pessoais.

Gostaria de expressar meus profundos agradecimentos a todos aqueles que colaboram e compartilharam com o desenvolvimento deste trabalho.

Inicialmente a Profa. Dra. Anita, minha orientadora, pela confiança a mim depositada. Ao CNPq e a FAPESP (Processo nº: 02/07029-0) pela bolsa de estudos concedida e ao Departamento de Química da UFRR pelo apoio para que eu pudesse concluir este trabalho. A ESALQ e ao Instituto de Botânica de São Paulo pelo acesso a suas coleções que permitiram este estudo.

Ao Dr Rodrigo B. Singer, pela excelente colaboração, pelas horas de sol observando a polinização em que aproveitávamos para trocar informações, pela confiança em meu trabalho e pela agradável amizade. Agradeço também a amizade de Samantha Koehler e Rosana. À Profa. Dra. Maria do Carmo E. do Amaral e o Dr. Volker Bittrich sem os quais a colaboração não seria possível. Ao Dr. W.E. Kerr e Cristiano Menezes pela colaboração que foi essencial para este trabalho. A Dr^a Eda Flavia Lotufo que nos presenteou com as abelhas do último capítulo desta tese.

Aos colegas e amigos pelos momentos dentro e fora do laboratório: Samisia, Mariza, Georgiana, Fernando, Paulo, Eduardo, Lu Chen, Lucimar, Suzan, Armando, Adriana, Mary Ângela, Isis, Diego e Letícia. Ao amigo Alexsandro pela amizade e ajuda na derivatização com DMDS.

Aos amigos: Sérgio, Virgu, companheiros de discussões noturnas, e a Carla e Eduardo Pilau, pela amizade.

Aos professores do bloco A5-100 pelo agradável convívio e a troca de idéias durante o tradicional cafezinho. Aos funcionários do IQ-UNICAMP que muito contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

A Dona Maria, técnica do laboratório, agradeço de todo o coração pelo competente trabalho e pela convivência agradável.

Aos amigos que se espalharam pelo Brasil e que apesar da distância continuam sempre perto: Dudu, Miriam, Irene e Neusa. Ao Prof. Dr. Ademir F. Morel, por sua paixão pela química, ética, competência e amizade.

CURRICULUM VITAE

Dados gerais

- Nome :Adriana Flach
- Naturalidade: Cerro Largo - RS
- Nacionalidade: Brasileira
- Filiação: Nelson Flach e Maria Margarida Flach.
- e-mail: aflach@gmail.br
- Endereço profissional:
Universidade Federal de Roraima, Campus Paricarana, Bloco III,
Departamento de Química, Sala 308. Boa Vista – RR.

Formação Acadêmica

Graduação:

Curso: Química Licenciatura Plena
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Obtenção: 1998

Pós-Graduação:

Curso: Mestrado em Química Orgânica
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Orientadora: Prof. Dr. Ademir Farias Morel
Dissertação: “Estudo do óleo essencial de *Calea serrata* Less. (Asteraceae)”
Obtenção: 2000.

- Artigos publicados em revistas científicas:

- A new cyclopeptide alkaloid from the bark of *Waltheria douradinha*, *Tetrahedron Letters*, **1999**, 40, 9205.
- Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*, *Planta Medica* **2002**, 68, 836.
- The chemistry of pollination in selected brazilian *Maxillariinae* orchids: floral rewards and fragrance,,: *Journal of Chemical Ecology* **2004**, 30, 1039-1050.

- Sexual mimicry in *Mormolyca ringens* (Orchidaceae: Maxillariinae), *Annals of Botany* **2004**, 93,755..
- Floral scent of *Eleocharis elegans* (Kunth) Roem. & Schult. (Cyperaceae) , *Biochemical Systematics and Ecology* **2005**, 33, 675.

Atuação Profissional

1. Universidade Federal de Santa Maria - Diretório Central de Estudantes

- Cargo: *Professora de Química do Curso Extensivo e Intensivo do Pré-Vestibular.*
- Período: *agosto de 1996 a janeiro de 1997.*

2 Escola Estadual De 1° e 2° Graus Professora Margarida Lopes

- Cargo: *Professora de Química na Segunda série do ensino médio.*
- Período: *março a julho de 1998.*

3 Curso pré-vestibular Arca de Noé

- Cargo: *Professora de do Curso Extensivo*
- Período: *agosto de 1998 a janeiro de 1999*

4 Colégio Militar de Santa Maria

- Cargo: *oficial técnico temporário:*
- Atuação didática: *Professora de Química*
- Período: *fevereiro de 2000 a fevereiro de 2002*

Ensino superior:

1 Universidade Federal de Santa Maria

- Cargo: *Docência Orientada em Química Orgânica*
- Período: *1º Semestre de 1999.*

RESUMO

ECOLOGIA QUÍMICA DE MAXILLARIINAE, *SPATHODEA CAMPANULATA* E MELIPONIINAE

Adriana Flach

Orientadora : Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Palavras-chave: ecologia química, Maxillariinae, néctar, Meliponiinae.

O presente trabalho foi dividido em três partes todas relacionadas a química das relações entre os seres vivos. Na primeira parte do trabalho estudou-se a química da polinização de orquídeas da subtribo Maxillariinae em termos da composição dos voláteis e recompensas florais coletadas pelos polinizadores. Discutiu-se também os compostos envolvidos na atração dos polinizadores de *Mormolyca ringens* e *Trigonidium obtusum*. Identificou-se, nesta etapa uma série de compostos: hidrocarbonetos, terpenos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, etc. Em um segundo momento determinou-se a composição química do néctar de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae), uma planta relatada como tóxica. Identificou-se, além de carboidratos, compostos secundários como terpenos, esteróides e carboidratos acetilados. Também foram identificados os constituintes voláteis: 1-octen-3-ol e 1-octen-3-ona. Na última parte do trabalho explorou-se a modificação química das ceras de duas espécies de abelhas que estabeleceram uma relação de convivência em um mesmo ninho. A composição química das ceras de operárias de colônias puras e de colônias mistas de *M. scutellaris* apresentaram perfis químicos diferentes produzindo nas colônias puras uma série de *n*-alcanos e *n*-alcenos enquanto que a colônia mista apresentou elevado percentual de acetato de triacontanila. As ceras das colônias de *M. rufiventris* apresentaram variações nas proporções de hidrocarbonetos.

ABSTRACT

CHEMICAL ECOLOGY IN MAXILLARIINAE, *SPATHODEA* *CAMPANULATA* AND MELIPONIINAE

Adriana Flach

Advisor: Prof^a Dr^a Anita Jocelyne Marsaioli

Key words: chemical ecology, Maxillariinae, nectar, Meliponiinae

This work is presented in three distinct parts, all of them concerning the chemistry involved in inter-specific relations. In the first part we discuss the pollination chemistry of orchids, subtribe Maxillariinae, in terms of floral volatiles and rewards collected by pollinators. It is also discussed the compounds involved in pollinators attraction by *Mormolyca rigens* and *Trigonidium obtusum*. At this stage we have identified hydrocarbons, terpenes, alcohols, aldehydes, ketones, esters, etc. In the second chapter we analyzed the chemical composition of *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae) nectar. Occurrence which has been considered toxic, due to the dead insects inside the flower. Moreover, we identified some secondary metabolites as terpenes, steroids and acetylated sugars. Volatile compounds as 1-octen-3-ol and 1-octen-3-one were also identified. The last part explores the chemical modification in waxes from two bees species that established coexistence in the same nest. We compare the chemical modification of waxes from worker bees in pure and mixed colonies of *Meliponia rufiventris* and *Melipona scutellaris*. Revealing that the ratio of alkanes, alkenes, were altered in *M. rufiventris* colonies. *M. scutellaris* pure colonies produce alkanes and alkenes and the chemistry of mixed colonies were altered producing high ratio of triacontanyl acetate.

ÍNDICE

	página
Lista de Abreviaturas.....	xix
Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de Figuras.....	xxiii
Lista de Esquemas.....	xxv
Lista de Espectros.....	xxvii
Lista de Cromatogramas.....	xxxi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1.1. O processo da polinização.....	01
1.1.1. A influência das cores na seleção dos polinizadores.....	02
1.1.2. A importância dos voláteis.....	05
1.1.3. A importância das secreções da flores.....	06
1.2. Relações entre os insetos	09
1.3. Métodos para detecção de atividade de compostos em insetos.....	11
1.4. Objetivos Gerais deste trabalho.....	16
2. QUÍMICA DA POLINIZAÇÃO EM MAXILLARIINAE.....	17
2.1. Introdução.....	19
2.1.1. A subtribo da Maxillariinae.....	20
2.1.2. O fenômeno da pseudocópula.....	22
2.1.2.1. O fenômeno em <i>Mormolyca ringens</i>	23
2.1.2.2. O fenômeno de polinização em <i>Trigonidium obtusum</i> Lindl.....	25
2.2. Objetivos deste capítulo.....	25
2.3. Discussão dos resultados.....	26
2.3.1. Análise dos voláteis.....	26
2.3.2. Química da polinização em Maxillariinae através do mimetismo sexual.....	53
2.3.2.1. Análise dos extratos hexânicos de <i>Mormolyca ringens</i>	54
2.3.2.2. A pseudocópula em <i>Trigonidium obtusum</i> Lindl.....	64
2.3.3. Estudo das recompensas florais de algumas espécies de Maxillariinae.....	67
3. ESTUDO DO NÉCTAR DE SPATHODEA CAMPANULATTA.....	86

3.1. Introdução.....	86
3.1.1. Revisão sobre o estudo de néctar.....	86
3.1.2. <i>Spathodea campanulatta</i> (Bignoniaceae)	90
3.2. Objetivos deste capítulo.....	93
3.3. Resultados e Discussão.....	93
3.3.1. Estudo de metodologia para análise do néctar.....	93
3.3.2. Identificação direta dos compostos presentes no néctar.....	99
3.3.3. Análise indireta dos constituintes do néctar.....	100
3.3.4. Análise dos componentes voláteis do néctar.....	109
3.3.5. Investigação da toxicidade do néctar e AFLVT, SC18, AFLV4, SC19 para abelhas e borboletas.....	110
3.4. Conclusão parcial II.....	111
4. ESTUDO DAS RELAÇÕES ECOLÓGICAS ENTRE DUAS ESPÉCIES DE ABELHAS MELIPONINAE.....	112
4.1. Introdução.....	112
4.2. Objetivos do capítulo.....	114
4.3. Discussão dos resultados.....	114
4.3.1. Coleta das abelhas e obtenção dos extratos.....	114
4.3.2. Análise dos extratos das colônias de <i>Melipona rufiventris</i> por CG-EM.....	115
4.3.3. Análise dos extratos das colônias de <i>Melipona scutellaris</i> por CG-EM.....	117
4.3.4. Determinação da posição das duplas ligações.....	118
4.4. Conclusão parcial III.....	122
5. CONCLUSÃO GERAL.....	123
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	124
6.1. Materiais e métodos gerais empregados em todo o estudo.....	124
6.1.1. Espectrometria de RMN de ^1H	124
6.1.2. Espectrometria de RMN de ^{13}C	124
6.1.3. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.....	125
6.1.4. Espectrometria de infravermelho.....	125
6.1.5. Rotação óptica.....	126
6.1.6. Métodos cromatográficos.....	126

6.1.7. Tratamento dos solventes	127
6.2. Experimentos envolvendo o estudo da química da polinização em Maxillariinae (Orchidaceae)	128
6.2.1. Localização das plantas e datas da coletas.....	128
6.2.2. Obtenção dos voláteis por coleta dinâmica	129
6.2.3. Obtenção dos índices de retenção de Kovat's.....	130
6.2.4. Obtenção de extratos de flores de <i>Mormolyca ringens</i> não polinizada.....	131
6.2.5. Obtenção de extratos de flores de <i>Mormolyca ringens</i> polinizada.....	132
6.2.6. Obtenção do padrão de cinamato de etila para comparação com constituintes do extrato das flores de <i>Mormolyca ringens</i>	132
6.2.7. Obtenção do padrão de cinamato de metila para comparação com constituintes do extrato das flores de <i>Mormolyca ringens</i>	133
6.2.8. Obtenção dos extratos cefálicos de rainhas virgens <i>Scaptotrigona postica</i>	133
6.2.9. Coleta de machos de <i>Nannotrigona testaceicornis</i> para realização de experimentos de eletroantenografia.....	134
6.2.10. Teste de atividade das antenas de machos de <i>N. testaceicornis</i> frente aos voláteis e extratos hexânicos de flores não polinizadas de <i>M. ringens</i>	134
6.2.11. Obtenção dos extratos das glândulas de ceras de rainhas virgens de <i>Scaptotrigona postica</i>	135
6.2.12. Determinação da posição da dupla dos compostos insaturados.....	135
6.2.13. Coleta de flores para obtenção do extrato para estudo das recompensas florais.....	136
6.2.14. Extração das recompensas.....	136
6.2.15. Sililação das recompensas	137
6.2.16. Purificação dos extratos obtido de <i>Maxillaria cerifera</i>	137
6.2.17. Purificação da recompensa de <i>Maxillaria friedrichsthali</i>	139
6.3. Estudo do néctar de <i>Spathodea campanulata</i> (Bignoniaceae).....	141
6.3.1. Coleta do néctar.....	141
6.3.2. Extração do néctar.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CG	cromatografia gasosa
EM	espectrometria de massas
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
IR	índice de retenção
IK	índice de Kovats
FID	"flame ionization detector"
eV	elétons-volt
Hz	Hertz
IE	impacto eletrônico
m/z	razão entre a massa e o fragmento e sua respectiva carga elétrica
M ⁺ .	íon molecular
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
DEPT	" <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> "
MHz	megahertz
J	constante de acoplamento
δ	deslocamento químico em partes por milhão
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CCD	cromatografia em camada delgada
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Espectro de RMN bidimensional de correlação C, H a uma ligação)
HMBC	Espectro de RMN bidimensional de correlação C, H a mais de uma ligação
IR	Índice de Retenção

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1. Composição química da fragrância de <i>Encyclia odoratissima</i> , obtida por coleta dinâmica e injeção de sólidos. * compostos que não possuem índice de retenção na literatura, mas que apresentaram índice de similaridade na biblioteca Wiley275 superior a 95%.....	30
Tabela 2. Composição química dos voláteis florais de <i>Maxillaria gracilis</i> (MG), <i>M. marginata</i> (MM), <i>M. chrysantha</i> (MC), <i>M. picta</i> (MP), <i>M. ubatubana</i> (MU).....	33
Tabela 3. Composição química dos voláteis florais emitidos por <i>Trigonidium obtusum</i> (TO), <i>T. turbinatum</i> (TT) e <i>T. egertonianum</i> (TE).(*= identificação pela biblioteca Wiley 275 com confiabilidade maior que 95%).....	38
Tabela 4 Composição da fragrância floral de <i>Mormolyca ringens</i>	40
Tabela 5. Composição química da fragrância floral de <i>M. leucaimata</i>	42
Tabela 6. Composição química dos voláteis florais de <i>M. jenischiana</i>	44
Tabela 7. Constituição química dos voláteis florais de <i>M. rufescens</i>	46
Tabela 8 Composição dos voláteis florais de <i>M. oroleuca</i>	47
Tabela 9. Composição dos voláteis de <i>M. alba</i> *= índice de similaridade superior à 95% em relação à biblioteca Wiley275.....	49
Tabela 10. Composição da fragrância floral de <i>M. barbosa</i>	51
Tabela 11. Composição química da fragrância floral de <i>M. tenuifolia</i>	52
Tabela 12. Compostos identificados no extrato cefálico de <i>S. postica</i>	57
Tabela 13. Composição química dos extratos hexânicos de <i>M. ringens</i> polinizada e não polinizada e do extrato hexânico da rainha virgem de <i>S. postica</i>	60
Tabela 14. Média (5 repetições) de alteração na corrente elétrica entre duas antenas de machos de <i>Nannotrigona testaceicornis</i> à diferentes amostras.....	62
Tabela 15. Composição química dos extratos da flor de <i>T. obtusum</i> polinizada e não polinizada.....	65
Tabela 16. Atribuições dos sinais (δ em ppm) de ^1H (499,89 MHz) e ^{13}C (125,69MHz) para o cicloartenal, em CDCl_3	74
Tabela 17. Atribuições dos sinais (δ em ppm) de ^1H (499,89 MHz) e ^{13}C (125,69MHz) para o cicloartenol, em CDCl_3	78
Tabela 18. Composição química da recompensa de <i>Maxillaria violaceo punctata</i> , determinada por comparação com padrões.....	81
Tabela 19. Composição química da recompensa de <i>Maxillaria valenzuelana</i> , determinada por comparação com padrões.....	82
Tabela 20. Composição química da recompensa de <i>Maxillaria villosa</i> , determinada por comparação com padrões.....	83
Tabela 21. Composição química da recompensa de <i>Maxillaria rufescens</i> , determinada por comparação com padrões.....	84
Tabela 22 Composição dos carboidratos encontrados na fração aquosa do néctar das flores de <i>S. campanulata</i>	100

Tabela 23. Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos para o cicloeucalenol (CDCl ₃ , 300, 067 MHz).....	106
Tabela 24. Dados de RMN de ¹³ C das α e β -amirinas da literatura e da mistura SC19.....	108
Tabela 25. Constituintes químicos das glândulas de ceras de operárias de <i>M. rufiventris</i> e <i>M. scutellaris</i> em colônias puras e mistas.....	120
Tabela 26. Dados das coletas de fragrâncias.....	128

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Estrutura de uma flor envolvida na polinização.....	2
Figura 2. Espectro da visão humana e da visão dos principais polinizadores.....	3
Figura 3. Betalaínas encontradas no extrato das pétalas de um híbrido de Cactaceae.....	4
Figura 4. a) Flor de <i>Eustoma grandiflorum</i> ; b) flor de <i>Dianthus caryophyllus</i> . Pigmentos responsáveis pela cor das pétalas destas flores.....	5
Figura 5. Compostos extraídos das resinas florais de <i>Clusia</i>	8
Figura 6. a) Olfatômetro em “Y” e b) Túnel de vento.....	13
Figura 7. Antena de inseto e os detalhes das células receptoras.....	14
Figura 8. a) Antenas de inseto conectadas a eletrodos com auxílio de gel condutor, b) esquema da aplicação da amostra sobre a antena.....	14
Figura 9. Exemplo de um cromatograma e eletroantenograma.....	15
Figura 10. Estrutura floral básica de uma orquídea.....	16
Figura 11. Abelha com a representação de suas glândulas principais.....	23
Figura 12. Polinização em <i>Mormolyca ringens</i> : A) machos de <i>N. testaceicornis</i> disputando o labelo de <i>M. ringens</i> , B) macho de <i>N. testaceicornis</i> retirando o polinário; C) macho chegando à outra flor com o polinário; D) macho com polinário aderido no escutelo e E) macho de <i>N. testaceicornis</i> copulando com a superfície do labelo. Fotografias cedidas pelo Dr. Rodrigo B. Singer.....	24
Figura 13. Polinização em <i>T. obtusum</i> pelos machos de <i>P. droyana</i> . A) machos sobrevoando a flor, B) machos em contato com a flor, C) macho saindo da flor, D) macho com comportamento de cópula com a flor, E) macho com o polinário aderido no escutelo saindo da flor, F) macho com o polinário.....	25
Figura 14. Espécies de orquídeas que tiveram sua fragrância estudada.....	27
Figura 15. Espécies de Maxillariinae cujas recompensas florais foram estudadas.....	69
Figura 16. Metodologia padrão para análise de recompensas do labelo de Maxillariinae.....	70
Figura 17. Composto sintetizado por Anjaneyulu.....	72
Figura 18. Conformações do esqueleto dos cicloartanóis.....	74
Figura 19. Estrutura do cicloartenol.....	79
Figura 20. Análise por SPME utilizando néctar de <i>S. campanulata</i>	100

LISTA DE ESQUEMAS

	página
Esquema 1. Reações de obtenção dos padrões de cinamato de metila(1) e cinamato de etila (3) através de ácido cinâmico (2).....	54
Esquema 2. Reação de derivatização com DMDS e I ₂ e sua fragmentação característica.....	56
Esquema 3. Reação de oxidação do 1-octen-3-ol.....	110

LISTA DE ESPECTROS

	página
E 1. Espectro de massas do <i>p</i> -vinil fenol a 70 eV.....	152
E 2. Espectro de massas do 2-metoxi-4-vinil fenol a 70 eV.....	152
E 3. Espectro de massas do 1,2-dietil-benzeno a 70 eV.....	152
E 4. Espectro de massas do 1-etil-2,3-dimetil benzeno a 70 eV.....	152
E 5. Espectro de massas de um dos isômeros do álcool fenil-butilico, a 70 eV.....	153
E 6. Espectro de massas do 3-etil acetofenona, a 70 eV.....	153
E 7. Espectro de massas do 4-etil acetofenona, a 70 eV.....	153
E 8. Espectro de massas do miristato de isopropila, a 70 eV.....	153
E 9. Espectro de massas do 1-tetradecanol, a 70 eV.....	154
E 10. Espectro de massas do cinamato de metila, ácido cinâmico e cinamato de etila a 70 eV.....	154
E 11. Espectro de RMN de ¹ H do cinamato de metila, a 300, 07 MHz em CDCl ₃	155
E 12. Espectro de RMN de ¹ H do cinamato de etila (300, 07 MHz, CDCl ₃)....	155
E 13. Espectro de massas de um <i>n</i> -alcano (n-heptacosano) a 70 eV.....	156
E 14. Espectro de massas do 9-pentacoseno e de seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.....	156
E 15. Espectro de massas do 9-tricoseno e seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.....	157
E 16. Espectro de massas do 9-heptacoseno e do seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.....	157
E 17. Espectro de massas do 9-nonacoseno e do seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.....	158
E 18. Espectro de massas do 9-hentriaconteno e seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.....	158
E 19. Espectro de massas do octadecadienal a 70 eV.....	159
E 20. Espectro de massas do 2-heptanol a 70 eV.....	159
E 21. Espectro de massas do 2-nonanol a 70 eV.....	159
E 22. Espectro de massas do 2-undecanol a 70 eV.....	159
E 23. Espectro de massas do 2-tridecanol a 70 eV.....	160
E 24. Espectro de massas a 70 eV do acetato de 19-tetracosenila e de seu derivado DMDS.....	160
E 25. Espectros de massa a 70 eV dos derivados dimetildissulfetos dos acetatos de 13-docosenila (a), acetato de 17-hexacosenila (b), acetato de 19-octacosenila(c), acetato de 21-triacontenila (d), acetato de 23-dotriacontenila.....	161
E 26. Espectros de massa do butirato de 17-hexacosenila e de seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.....	162
E 27. Espectro de massa a 70 eV do butirato de 19-octacosenila e de seu derivado dimetildissulfeto.....	162
E 28. Espectro de RMN de ¹³ C, DEPT 135 e 90 (CDCl ₃ , 499,89 MHz) do extrato hexânico da flor não polinizada de <i>T. obtusum</i>	163

E 29. Espectro de massas a 70 eV de MC encontrado na recompensa de <i>Maxillaria cerifera</i> , após ser submetido a sililação com BSTFA.....	163
E 30. Espectro de massas a 70 eV de MC1.....	163
E 31. Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.....	164
E 32. Espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (125,69 MHz, CDCl_3) de MC1.....	164
E 33. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90 e DEPT 135) a 125, 69 MHz em CDCl_3 para MC1.....	165
E 34. Expansão do mapa de contorno do espectro de RMN de 2D de correlações ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC) a 499,89 MHz para o ^1H e 125,69 MHz para o ^{13}C	165
E 35. Expansão do espectro do E 34.....	166
E 36. Mapas de contorno de RMN de 2D das correlações ^1H - ^{13}C a longa distância (<i>g</i> -HMBC) a 499,89 MHz para o ^1H e 125,69 MHz para o ^{13}C em CDCl_3 para o composto MC1.....	166
E 37. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo em δ 6,48 NOESY1D (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.....	167
E 38. Espectro de RMN NOESY1D com pulso sobre δ 0,34 (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.....	167
E 39. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo sobre δ 0,55 (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.....	168
E 40. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo sobre δ 3,28 (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.....	168
E 41. Espectro de massas a 70 eV de MFC2F11.....	169
E 42. Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, CDCl_3) de MFC2F11.....	208
E 43. Espectro de RMN de ^{13}C de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (125,69 MHz, CDCl_3) de MFC2F11.....	170
E 44. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135 e DEPT 90) a 125,69 MHz, em CDCl_3 de MFC2F11.....	170
E 45. Mapa de contornos do espectro de RMN 2D das correlações ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC) a 499,89 MHz, em CDCl_3 de MFC2F11.....	171
E 46. Expansão do espectro E 45.....	171
E 47. Expansão do espectro E 45.....	172
E 48. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo sobre δ 0,55 (499,89 MHz, CDCl_3) de MFC2F11.....	172
E 49. Espectro de RMN de NOESY1D com pulso seletivo sobre δ 3,23 (499,89 MHz, CDCl_3) de MFC2F11.....	173
E 50. Espectro de RMN de NOESY1D com pulso seletivo sobre δ 0,90 (499,89 MHz, CDCl_3) de MFC2F11.....	173
E 51. Espectro de massas obtido para MB1 a 70 eV.....	174
E 52. Espectros de massas do colesterol (a) e estigmasterol (b) identificados no néctar de <i>Spathodea campanulata</i> , obtidos a 70 eV.....	174
E 53. Espectro de massas do composto principal da fração SC18.....	175
E 54. Espectro RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) de SC18.....	175

E 55. Espectro de RMN de ^{13}C de RMN de $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ (75,45 MHz, CDCl_3) de SC18.....	176
E 56. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90 e DEPT 135) a 75,45 MHz, em CDCl_3 , de SC18.....	176
E 57. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo sobre o sinal de H-19 endo (499,89 MHz, CDCl_3) de SC18.....	177
E 58. Espectro de RMN NOESY1D (499,89 MHz, CDCl_3) de SC18.....	177
E 59. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo sobre o sinal de H-29 (499,89 MHz, CDCl_3) de SC18.....	178
E 60. Espectro de massas da α e β -amirinas(a e b, respectivamente) a 70 eV.....	178
E 61. Espectro de RMN de ^{13}C de RMN de $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ (125,69 MHz, CDCl_3) de SC19.....	179
E 62. Espectro de massas da 1-octen-3-ona presente nos voláteis do néctar de <i>S. campanulata</i> a 70 eV.....	179
E 63. Espectro de massas do componente principal das ceras de <i>M. scutellaris</i> de colônia invadida a 70 eV.....	179
E 64. Espectro de RMN de ^1H do componente majoritário da cera da colônia mista de <i>M. scutellaris</i> (CDCl_3 , 300,07 MHz).....	180
E 65. Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 135 e 90 (CDCl_3 , 125,69 MHz, CDCl_3) da cera da colônia mista de <i>M. scutellaris</i>	180

LISTA DE CROMATOGRAMAS

página

C 1. Cromatogramas de íons totais da fragrância de <i>Encyclia odoratissima</i> obtido por: a) coleta dinâmica e b) por injeção de sólidos em coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25µm). Condições da análise: temperatura do forno de 50°C a 290°C(15 min) a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	31
C 2. Cromatogramas de íons totais de fragrâncias florais de espécies da aliança <i>Maxillaria picta</i> , obtido por coleta dinâmica, em coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25µm), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	34
C 3. Cromatogramas de íons totais da fragrância floral de <i>Trigonidium cf turbinatum</i> , <i>T. obtusum</i> e <i>T. egeronianum</i> , obtido por headspace dinâmico, em coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	38
C 4. Cromatograma de íons totais obtido da fragrância floral de <i>M. ringens</i> utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	41
C 5. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de <i>Maxillaria leucaimata</i> utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	42
C 6. Cromatograma de íons totais obtido da fragrância de <i>Maxillaria jenischiana</i> utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	44
C 7. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de <i>Maxillaria rufescens</i> utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	46
C 8. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância de <i>Maxillaria oroleuca</i> utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	47
C 9. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de <i>Maxillaria alba</i> utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	49
C 10. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de <i>M. barbosae</i> utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	51

C 11. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de <i>Maxillaria tenuifolia</i> utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	53
C 12. Cromatogramas de íons totais do extrato de <i>Mormolyca ringens</i> não polinizada (a) e polinizada (b). Condições da análise: coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 310°C(20 min), 4°C/min, 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	54
C 13. Cromatograma de íons totais do extrato cefálico de rainhas virgens de <i>S. postica</i> . Condições da análise: coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 310°C(20 min) a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	58
C 14. Cromatograma de íons totais do extrato hexânico da cutícula de rainhas virgens de <i>Scaptotrigona postica</i> . Condições da análise: coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 310°C (20 min) a um gradiente de 4°C/min, com fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	59
C 15. Cromatograma de íons totais dos voláteis obtidos por coleta dinâmica de <i>M. ringens</i> destacando o 2-heptanol, obtido por extração de íons.....	61
C 16. Cromatogramas de íons totais, obtido do extrato da flor de <i>Trigonidium obtusum</i> : a) não polinizada; b) polinizada. Condições da análise: coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 310°C(20 min) a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	63
C 17. Cromatograma de íons totais da recompensa de <i>M. cerifera</i> sililada com BSTFA, obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m) 150°C-310°C(15min) r=10°C/min inj. 260°C, f=1mL/min.....	68
C 18. Cromatograma de íons totais do extrato da recompensa de <i>M. friedrichsthalii</i> sililado. Obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m) 150°C-310°C(15min) r=10°C/min inj. 260°C, f=1mLmin.....	74
C19 .Cromatograma de íons totais do extrato sililado da cera do labelo de <i>M. brasiliensis</i> obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m) 150°C-310°C(15min) r=10°C/min inj. 260°C, f=1mL/min.....	78
C 20. Cromatograma de íons totais do extrato sililado da cera do labelo de <i>M. violaceo punctata</i> obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura de forno de 150°C a 310°C (15min) a uma razão de 10°C/min e temperatura de injetor de 260°C e fluxo constante de 1mL/min.....	79
C 21. Cromatograma de íons totais do extrato sililado da cera do labelo de <i>M. valenzuelana</i> obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura de forno de 150°C a 310°C(15min), 10°C/mi, 1mL/min.....	80
C 22. Cromatograma de íons totais do extrato sililado da cera do labelo de <i>M. villosa</i> obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura de forno de 150°C a 310°C(15min),10°C/min, fluxo constante de 1mL/min.....	81

C 23. Cromatograma de íons totais do extrato sililado da cera do labelo de <i>M. rufescens</i> obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura de forno de 150°C a 310°C(15min) a uma razão de 10°C/min e temperatura de injetor de 260°C e fluxo constante de 1mL/min.....	82
C 24. Cromatograma de íons totais do néctar de <i>Spathodea campanulata</i> , obtido em coluna HP5(30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), com temperatura do forno de 35°C(5min) elevada a 290°C(15 min) a uma razão de 4°C/min, com fluxo de gás hélio de 1 mL/min e temperatura de injetor de 260°C.....	95
C 25. Cromatograma de íons totais dos compostos (AFN2B) obtidos do néctar de <i>Spathodea campanulata</i> , através de extração com acetato de etila.....	98
C 26. Cromatograma de íons totais do néctar de <i>S. campanulata</i> sililado, obtido em coluna HP5, 30m, 150°C-290°C(15 min), $r = 2^\circ\text{C/min}$, $f = 1,3$ mL/min.....	99
C 27. Cromatograma de íons totais do líquido da sépala de <i>Spathodea campanulata</i> . Obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), com temperatura do forno de 35°C(5min) elevada a 290°C(15 min) a uma razão de 4°C/min, com fluxo de gás hélio de 1 mL/min e temperatura de injetor de 260°C.....	100
C 28. Cromatograma de íons totais do líquido da fração SC18. Obtido em coluna HP5 (30m, 0,25mm, 0,25 μ m) utilizando um programa de temperaturas de 35°C(5 min)-290°C(15 min), a uma razão de 4°C/min e fluxo de hélio constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.....	102
C 29. Cromatograma de íons totais dos compostos voláteis do néctar de <i>Spathodea campanulata</i>	109
C 30. Cromatogramas de íons totais da cera do abdômen de operárias de <i>M. rufiventris</i> : a) de colônia pura e b) de colônia mista (invasora). Obtido em coluna HP-5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), com temperatura do forno de 50°C elevada a 310°C(15 min) a uma razão de 6°C/min, com fluxo de gás hélio de 1 mL/min e temperatura de injetor de 240°C.....	116
C 31. Cromatogramas de íons totais da cera do abdômen de operárias de <i>M. scutellaris</i> : a) de colônia pura e b) de colônia invadida (mista). Obtido em coluna HP-5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), com temperatura do forno de 50°C elevada a 310°C(15 min) a uma razão de 6°C/min, com fluxo de gás hélio de 1 mL/min e temperatura de injetor de 240°C.....	118

1 INTRODUÇÃO GERAL

Entre as várias áreas da química, encontra-se a ecologia química, que estuda as relações entre os seres vivos, estas são mediadas por sons e das moléculas que participam das cores, dos aromas e das secreções que são mediadoras destas interações. Estudar estes fenômenos significa decodificar a linguagem química da vida.

1.1 O processo da polinização:

Das relações entre os seres vivos destaca-se o mutualismo existente entre as flores e os agentes polinizadores. Estes últimos em busca de material para sua alimentação e de suas larvas, construção de ninhos ou local para ovoposição acabam por realizar a polinização. Esse processo pode ser mais bem entendido, observando inicialmente as principais estruturas de uma flor que estão envolvidas neste fenômeno (Figura 1):

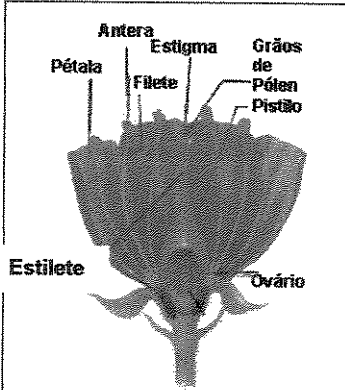
	<ul style="list-style-type: none">- Pétalas: normalmente são coloridas, e conferem beleza às flores.As partes reprodutivas são:- Gineceu: órgão feminino das flores. O pistilo é uma unidade do gineceu formada pelo ovário, estilete e estigma. O estilete é um filamento que se prolonga a partir do ovário e em cuja extremidade se acha o estigma. Através do estilete, o tubo polínico desce e penetra no ovário, onde se opera a fecundação.- Androceu: órgão masculino, formado pelo conjunto de estames. O estame é um filete que sustenta a antera, na qual se formam os grãos de pólen.
---	---

Figura 1. Estrutura de uma flor envolvida na polinização.

A polinização consiste na transferência de pólen das anteras para o estigma de uma flor, ação indispensável para a produção de frutos e sementes.

Existem dois tipos de polinização:

- **Polinização direta ou autopolinização:** os grãos de pólen caem sobre o estigma da mesma flor onde foi produzido. Esse tipo não traz muitas vantagens para o vegetal, já que não permite a variabilidade genética.
- **Polinização indireta ou cruzada:** os grãos de pólen são transportados de uma flor para outra flor da mesma espécie. Esta polinização é considerada mais vantajosa, pois permite a variabilidade genética. A polinização indireta exige a participação de agentes polinizadores, os quais podem ser o vento, pássaros, insetos, morcegos, água, homem, entre outros.

A escolha do polinizador não se dá por acaso. Quando olhamos um jardim florido podemos observar flores de todas as formas, cores e aromas, além de uma série de insetos/pássaros pousando sobre cada uma delas, se observarmos durante vários dias iremos verificar que existe uma preferência nesta visita, o motivo dessa preferência envolve vários fatores que serão discutidos nos próximos itens.

1.1.1 A influência das cores na seleção dos polinizadores

O campo de visão dos seres vivos não é igual, alguns tem visão pobre enquanto outros conseguem detectar a região do infravermelho e do ultravioleta (Figura 2).

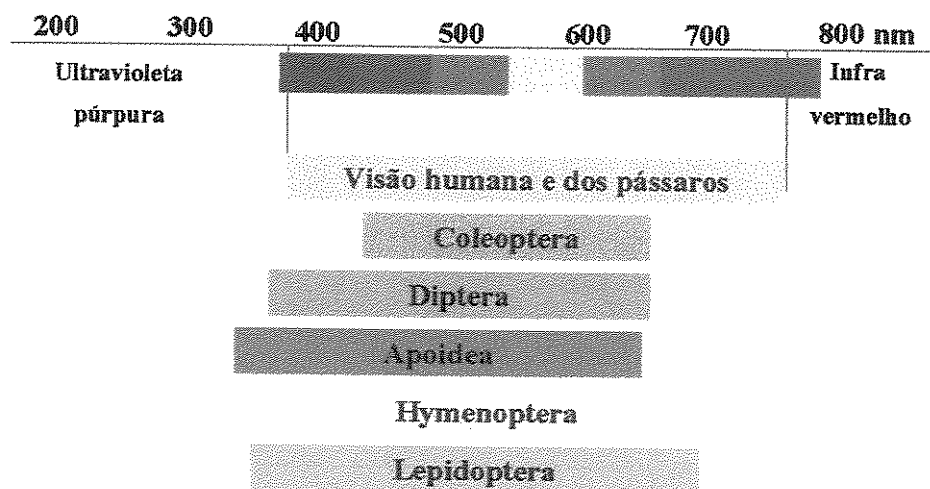


Figura 2. Espectro da visão humana e da visão dos principais polinizadores.

Os insetos noturnos não necessitam de uma visão apurada no que se relaciona às cores, assim, os besouros têm visão pobre, são fotofóbicos e atraídos por aromas, as mariposas noturnas preferem o branco que é mais visível no crepúsculo ou nas noites iluminadas apenas com a luz da lua. Os roedores noturnos e morcegos são essencialmente cegos às cores, sendo guiados por fragrâncias. As borboletas e mariposas diurnas preferem flores cor-de-rosa, vermelhas, laranja e amarelas. Vespas reconhecem cores como o marrom, vermelho escuro, rosa e amarelo, pois em sua maioria são carnívoras e estas cores lembram as cores do sangue e da carne. As abelhas em geral têm preferência por amarelo e azul. Em contrapartida a visão dos pássaros se assemelha muito à visão humana e a maioria das flores por eles polinizadas, são vermelhas.

Os compostos responsáveis pelas cores possuem as mais variadas estruturas, sendo em sua maioria altamente insaturados e freqüentemente estão ligados a carboidratos. Os carotenóides são responsáveis pelo amarelo e laranja, os flavonóides pelo branco, amarelo, vermelho e azul e as antocianinas dão cor às pétalas de diversas espécies de plantas. Uma revisão recente de Harborne contém a estrutura de vários pigmentos com as mais variadas estruturas (antocianinas, flavonas, flavonóis e flavonóides glicosídicos, chalconas, dihidrochalconas e flavanonas) que juntamente com os metais podem formar complexos que são responsáveis pelas cores³⁴. Neste, relata os componentes responsáveis pela cor das pétalas do cacto híbrido (*Schlumbergera x buckleyi*), foram identificados como betalaínas (Figura 3).

³⁴ Harborne, J.B.; Williams, C.A.; *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, *18*, 310.

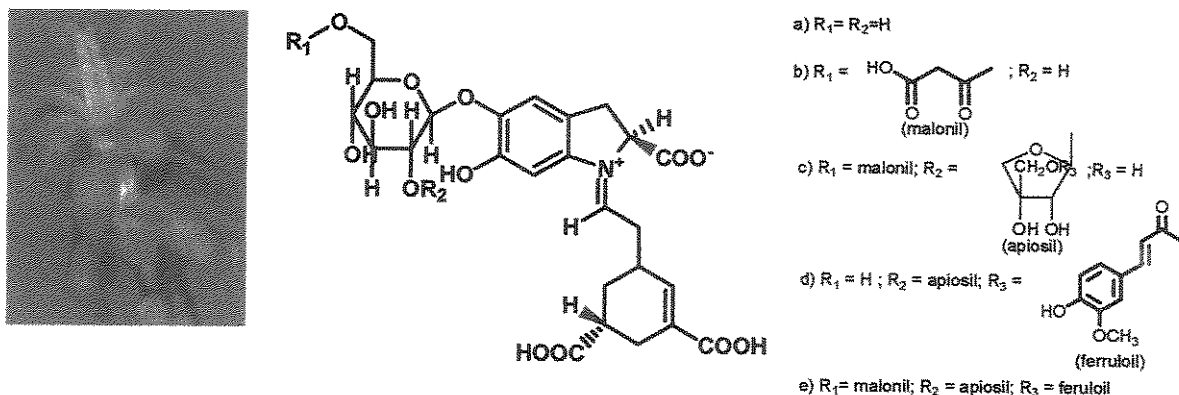


Figura 3. Betalaínas encontradas no extrato das pétalas de um híbrido de Cactaceae.

Em *Eustoma grandiflorum* e *Dianthus caryophyllus* (Gentianaceae)³⁵ foram identificadas várias antocianinas (Figura 4).

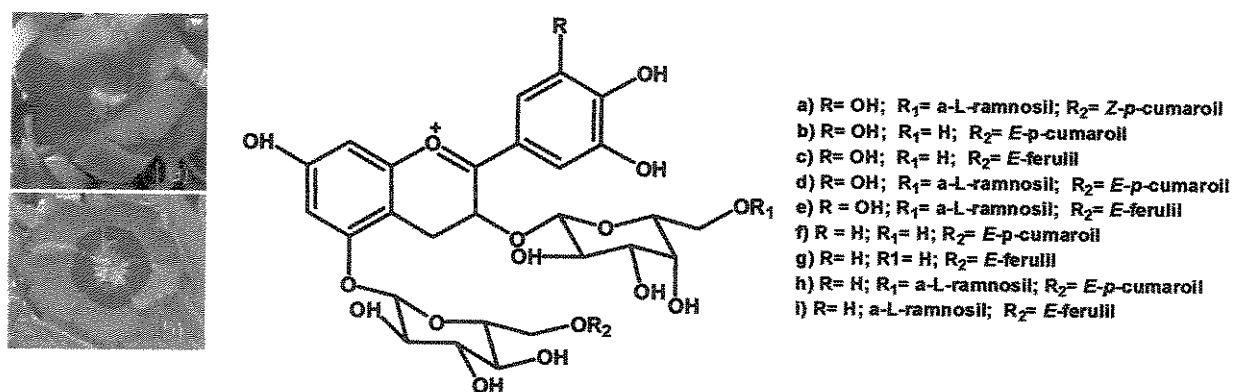


Figura 4. a) Flor de *Eustoma grandiflorum*; b) flor de *Dianthus caryophyllus*. Pigmentos responsáveis pela cor das pétalas destas flores².

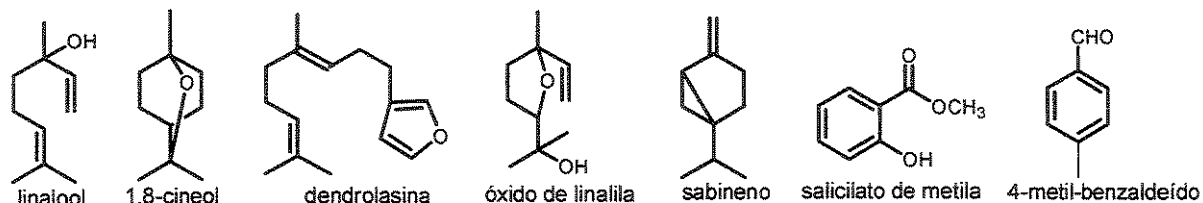
1.1.2 A importância dos voláteis

A maioria das flores liberam substâncias voláteis que possuem um papel importante na atração e seleção dos polinizadores. São produzidas em todas as estruturas das flores (nas plantas menos evoluídas) ou pelos osmóforos (nas

³⁵ Markham, K. R.; Gould, K. S.; Winefield, C.S.; Mitchell, K.A.; Bloor, S.J.; Boase, M.R.; *Phytochemistry* 2000, 55, 327.

plantas mais evoluídas), sendo mantidas na forma de precursores até a liberação ao ar. Apresentam, em geral, composição complexa, incluindo terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos não oxigenados e oxigenados), compostos aromáticos e alifáticos, aminas, derivados de ácidos graxos e ésteres metílicos; aminas e sulfetos, hidrocarbonetos, variando qualitativa e quantitativamente entre as espécies. A produção desses compostos na planta segue um complexo sistema biosintético. Espécies próximas filogeneticamente e morfologicamente podem ser confundidas pela sua forma e como estratégia produzem fragrâncias diferentes que servem como guia para o polinizador³⁶.

Em espécies de plantas do gênero *Ficus* cada uma é polinizada por uma espécie diferente de vespas, que ovopositam dentro das flores e assim realizam a polinização. No estudo dos voláteis emitidos por estas plantas foram encontrados compostos específicos à espécie e outros comuns entre elas. Somente na espécie *Ficus fulva* foi encontrada a dendrolasina, em *F. condesa* o linalol e o 1,8-cineol, em *F. deltoidea* foi encontrado o óxido de linalila. Em *F. microcarpa* foram identificados compostos de rotas biossintéticas distintas: sabineno, salicilato de metila e 4-metil-benzaldeído. Cada um dos quais é específico de cada espécie de *Ficus*³⁷.



Os principais métodos para coleta destes compostos são: hidrodestilação, arraste a vapor, coleta dinâmica e estática, além da injeção de sólidos. A detecção é realizada principalmente por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de

³⁶ Dressler, R.L., *Rev. Biol. Trop.* **1968**, 15,143,.

³⁷ (a) Grison-Pigé, L.; Bessiere, J.M.; Hossaert-Mckey, M.; *J. Chem. Ecol.* **2002**, 28, 283. (b) Grison-Pigé, L.; Hossaert-Mckey, M.; Greeff, J.M.; Bessiere, J.M.; *Phytochemistry* **2002**, 61, 61. (c) Song, Q.; Yang, D.; Zhang, G.; Yang, C.; *J. Chem. Ecol.* **2001**, 10,1929. (d) Grison, L.; Edwards, A.A.; Hossaert-Mckey, M.; *Phytochemistry* **1999**, 52, 1293. (e) Giberneau, M.; Buser, H.R.; Frey, J.E.; Hossart-Mckey, M.; *Phytochemistry* **1997**, 46, 241.

massas e a identificação através do índice de retenção de Kovat's, comparação do espectro de massas com a literatura e injeção com reforço de padrões.

1.1.3 A importância das secreções das flores

Além das cores e fragrâncias as flores produzem secreções que são coletadas pelos polinizadores, com as mais variadas funções. Estas secreções são muitas vezes chamadas de “recompensas florais” como se fossem uma recompensa oferecida ao polinizador em troca do transporte do pólen. Entre estas secreções, o néctar é um líquido exsudado pela flor utilizado como fonte de energia para os polinizadores. O horário de excreção e o volume de néctar excretado (0,03 µL em *Anacardium excelsum*, polinizada por abelhas e 10-15 mL em algumas espécies da família Bombacaceae, polinizadas por morcegos) variam de acordo com a planta. Em sua constituição encontramos uma alta concentração de açúcares³⁸, além de alguns aminoácidos^{39,40}, íons (Na⁺, K⁺, Ca⁺², etc.), compostos voláteis⁴¹ e pequena concentração de compostos secundários. Destes compostos já foram identificados por métodos clássicos: carboidratos, aminoácidos e íons. Também foram estudados os voláteis, e a presença de compostos secundários por métodos indiretos que foram motivados pela toxidez de alguns néctares⁴².

As resinas florais, outra secreção coletada pelas abelhas são conhecidas em duas famílias de Angiospermas: Euphorbiaceae (espécies do gênero *Dalechampia* L.)⁴³ e Guttiferae (espécies dos gêneros *Clusia* L., *Clusiella* Planch.

³⁸ Davis, A.R.; Pylatuik, J.D.; Pradis, J.C.; Low, N.H.; *Planta*, **1998**, 205, 305.

³⁹ Prys-Jones, O.E.; Willmer, P. G.; *Biol. J. Linn. Soc.* **1995**, 45, 373.

⁴⁰ Meritt, S.Z.; *J. Chem. Ecol.* **1996**, 22, 1133.

⁴¹ Franich, R. A.; Ecroyd, C. E.; Kroese, H.W.; Steward, D.; *Phytochemistry* **1995**, 40, 1387.

⁴² (a) Paula, V.F.; Barbosa, L.C.A. Demuner, A.J.; Campos, L.A.O. ; Pinheiro, A. L.; *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, **1997**, 49, 4.

(b) Gowan, E.; Lewis, B.A.; Turgeon, R.; *J. Chem. Ecol.* **1995**, 21, 1781. (c)

Masters, A.R.; *J. Chem. Ecol.* **1991**, 17, 195. (d) Adler, L.S.; *Oikos*, **2000**, 91, 409.

(e) Harborne, J.B.; *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 361.

⁴³ Armbruster, W.S. *Amer. J. Bot.*, **1984**, 71, 1149.

& Triana⁴⁴ e uma espécie do gênero *Tovomitopsis*). A utilização destas resinas na construção ou vedação de seus ninhos⁴⁵ sugere que de alguma maneira, este material deva prevenir e/ou reduzir a infestação de microorganismos e outros agentes predadores⁴⁶. Investigações sobre a composição química das resinas florais de espécies de *Dalechampia* mostraram a presença de triterpenos⁴⁷, enquanto que as de *Clusia* são compostas basicamente por benzofenonas poliisopreniladas⁴⁸. Estes tipos de compostos e outras estruturas benzofenônicas do tipo 2,4,6-triidroxi-benzofenonas e alquil-aril-cetonas poliisopreniladas foram também isoladas nos gêneros *Garcinia*, *Clusiella* e *Rhoedia* (subfamília *Clusioideae*) não somente na resina mas em diversos órgãos da planta^{48,49}. Outras classes de compostos como flavonóides, xantonas, ácidos fenólicos, lactonas e sesquiterpenos foram isolados desta família. Na Figura 5 estão alguns compostos isolados de resinas florais de *Clusia*. Este isolamento e identificação foram realizados pelos métodos clássicos utilizados em fitoquímica.

⁴⁴ Planchon, J.E., Triana, J. *Ann. Sci. Nat.*, sér. 4, Bot. **1982**, 13, 306.

⁴⁵ Roubik, D.W. *Ecology and Natural History of Tropical Bees*, Cambridge University Press, N.Y., **1989**.

⁴⁶ Schwarz, H.F., *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* **1948**, 90, 1.

⁴⁷ Armbruster, W.S. *Amer. J. Bot.*, **1984**, 71, 1149.

⁴⁸ (a) De Oliveira, C. M.; Porto, A. M.; Bittrich, I. V.; Marsaioli, A. J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6427. (b) De Oliveira, C. M.; Porto, A. M.; Bittrich, I. V.; Marsaioli, A. J. *Phytochemistry*. **1999**, 50, 1073. (c) Porto, A.L.M., Machado, S.M.F., de Oliveira, C. M.A., Bittrich, V., Amaral, M.C.E., Marsaioli, A.J. *Phytochemistry*, **2000**, 55, 755. (d) Cuesta-Rubio, O.; Velez-Castro, H.; Frontana-Urbe, B.A.; Cárdenas, J. *Phytochemistry*. **2001**, 57, 279.

⁴⁹ (a) Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Pinheiro, R. M.; Radics, L. *Phytochemistry* **1988**, 27, 2305. (b) Hussain, R. A.; Owegby, A. G.; Parimoo, P.; Waterman, P. G. *Planta Médica* **1982**, 44, 78. (c) Olivares, E. M.; Gonzáles, J. G.; Delle Monache, F. *Phytochemistry* **1994**, 36, 473. (d) Henry, G. E.; Jacobs, H.; McLean, S.; Reynolds, W.; Yang, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4575. (e) Cuesta-Rubio, O.; Cuellar Cuellar, A.; Rojas, N.; Velez Castro, H.; Rastrelli, L.; Aquino, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1013. (f) Alves, T.M.A.; Alves, R.O.; Romanha, A.J.; Dos Santos, M.H.; Nagem, J.T.; Zani, C.L. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 369.

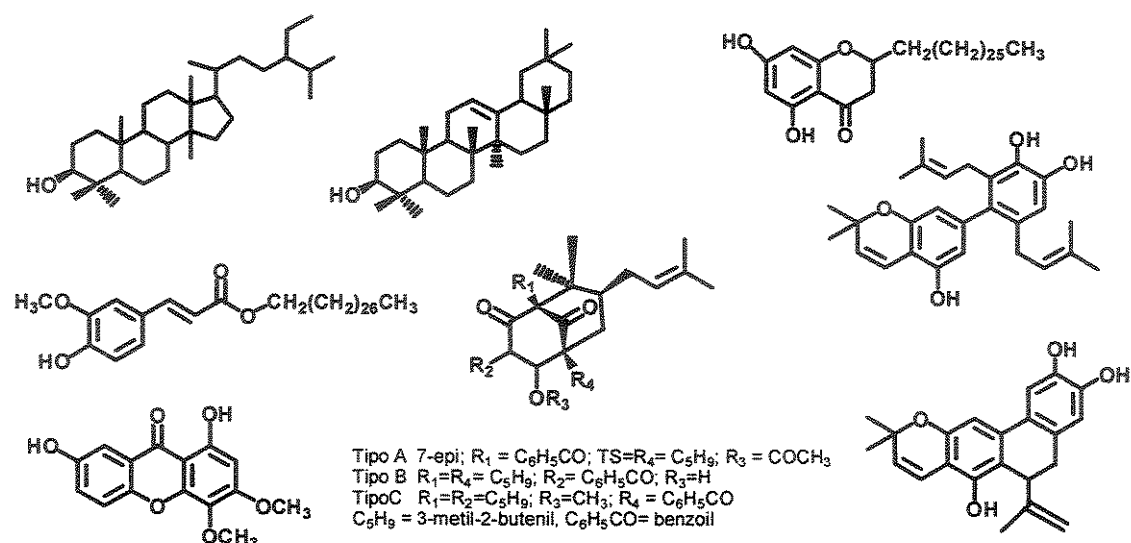


Figura 5. Compostos extraídos das resinas florais de *Clusia*.

Os óleos florais não voláteis são outra recompensa coletada principalmente por abelhas e são encontrados em alguns gêneros de dez famílias de plantas (Iridaceae, Krameriaceae, Malpighiaceae, Orchidaceae, Scrophulariaceae, Curcubitaceae, Gesneriaceae, Primulaceae, Melastomataceae e Solanaceae). As abelhas coletam estes óleos que misturados com néctar e pólen são utilizados para a alimentação das larvas, assim como na construção de células impermeáveis⁵⁰. Os principais constituintes são: esteróides, ácidos e ésteres de cadeia longa, alcanos e acilgliceróis⁵¹. Nosso grupo de pesquisa fez um intenso estudo dos constituintes dos óleos de espécies do gênero *Oncidium* (Orchidaceae)⁵².

O pólen, além de carregar o gameta masculino também é uma fonte de alimento. Todas as larvas de abelhas dependem do pólen como fonte de proteínas e lipídios. As abelhas se distinguem de outros insetos por possuírem pêlos onde os grãos de pólen aderem e são transportados. Outros animais também se utilizam do pólen, incluindo besouros⁵³, mariposas primitivas, borboletas do gênero

⁵⁰ Buchmann, S.P.; *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **1987**, *18*, 343.

⁵¹ Reis, M.G., de Faria, M.D., Amaral, M.C.E., Marsaioli, A.J., *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8519.

⁵² Reis, M.G.; Pansarim, E.R.; da Silva, U.F.; Marsaioli, A.J.; *Arkivoc* **2004**, *6*, 103.

⁵³ Rickson, F.R.; Cresti, M.; Beach, J.H.; *Oecologia* **1990**, *82*, 424.

Heliconius, alguns marsupiais e morcegos. A composição química básica do pólen é: aminoácidos e proteínas em média com 16-45% do pólen seco, mono e dissacarídeos (glicose, frutose e sacarose) de 4-10% e lipídeos 1-20%. Além destes são encontrados também os carotenos que conferem a cor ao pólen e compostos voláteis que conferem um aroma acentuado ao mesmo. Variações destes constituintes ocorrem tanto qualitativamente quanto quantitativamente.

1.2 Relações entre os insetos

Outra relação ecológica importante é a relação entre os insetos, esta pode ser interespecífica (entre indivíduos de espécies diferentes) e intraespecífica (entre indivíduos da mesma espécie), sendo mediadas por substâncias chamadas de semioquímicos. O estudo destes compostos tem despertado grande interesse da química e da entomologia desde a década de 50. Vale a pena destacar que nem sempre uma única substância é a responsável pelo comportamento e sim uma mistura de componentes que agem de forma sinérgica, cada um deles desempenhando um papel que em conjunto com outros provoca o efeito final.

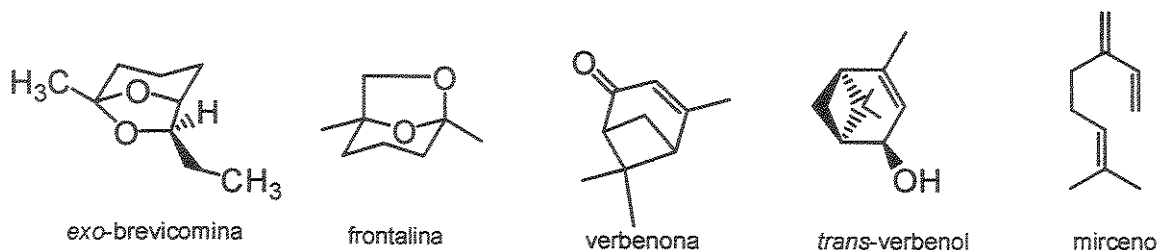
Os feromônios (do grego: *Pherein* = carregar e *horman*= estimular) são os compostos que mediam as interações intraespecíficas de comunicação entre os indivíduos, enquanto os alomônios são responsáveis pela comunicação entre os indivíduos de espécies diferentes.

Um exemplo da ação dos feromônios é em *Apis mellifera*, onde a rainha produz o ácido 9-ceto-2-*trans*-decenóico em suas glândulas mandibulares que inibe o desenvolvimento de ovários nas operárias⁵⁴.

Em *Dendroctonus brevicomis* (um coleóptero que ataca espécies de *Pinus*) a fêmea penetra na árvore e produz um feromônio, a *exo-brevicomina*, que juntamente com o mirceno liberado pelo hospedeiro (árvore), atrai os machos. Os machos produzem então, outro composto, a *frontalina*, que sinergiza os dois compostos anteriores, provocando a atração de ambos os sexos. Após a cópula,

⁵⁴ Czezug, B., *Apidologie* **1981**, 12, 107.

verbenona e *trans*-verbenol são liberados para impedir a atração de novos indivíduos, estabilizando a população destes indivíduos na planta⁵⁵.



Entre os alomônios encontramos uma série de componentes que mediam as interações entre plantas e os polinizadores, onde a flor emite compostos que sinalizam a presença de alguma recompensa.

A comunicação entre os seres vivos é controlada por uma série de fatores fisiológicos e do ambiente. Diversos fatores fisiológicos podem agir simultaneamente, determinando a ocorrência e magnitude da produção e liberação de compostos, bem como a resposta do indivíduo a estes compostos químicos.

A intensidade de luz, especialmente em virtude das flutuações diárias, controla a hora de atividade do inseto em relação ao feromônio, assim como os insetos dependem de uma determinada variação de temperatura para o seu desenvolvimento e reprodução. A comunicação também depende da velocidade do vento, sendo a ocorrência de turbulências no ar, um fator prejudicial na dissipação e conseqüente detecção do odor.

Embora os feromônios/alomônios sejam, geralmente, substâncias químicas simples, um só feromônio normalmente é uma mistura de vários componentes. Num só reservatório de uma glândula, que na maioria dos insetos só pode ser visualizada com auxílio de uma lupa, podem existir mais de 30 componentes, tornando laborioso o estudo completo da elucidação da mensagem química e de seu significado ecológico.

Um estudo interessante foi realizado com a formiga *Oecophylla longinoda*, que constrói seus ninhos com folhas verdes, usando para tanto, as suas larvas

⁵⁵ Kumar, D.N.; Rao, B.V.; Ramanjaneyulu, G.S.; *Tetrahedron: Asymetry* **2005**, *16*, 1611.

que possuem uma secreção que une as folhas umas as outras. Possui seu território marcado quimicamente e ataca colônias de outras espécies e da mesma espécie. Seu sistema de alarme, bastante eficiente, conta com quatro glândulas, uma das quais é a glândula mandibular, que contém mais de trinta compostos, dos quais somente quatro desempenham papel direto no sistema de alarme. Estes compostos apresentam alta, mas diferenciada volatilidade; e a manifestação das atitudes depende da liberação de cada substância na mistura. Assim, o hexanal apresenta ação nas operárias verificando-se um aumento na locomoção (rápidas corridas), mudanças de direção, ostentação das mandíbulas abertas e antenas levantadas. O 1-hexanol emite informações às operárias sobre a direção a ser seguida. As substâncias: 3-undecanona e 2(Z)-octenal, liberadas nesta ordem, provocam atração até a fonte do estímulo e disposição para mordidas⁵⁶.

Pelo exposto podemos verificar a complexidade dos estudos dos compostos envolvidos nas relações ecológicas entre os insetos, no entanto as técnicas analíticas têm colaborado com este estudo que é muito útil para o controle de pragas evitando assim o uso de inseticidas que possuem impactos ecológicos altos e toxidez cumulativa no solo e nos alimentos.

Nosso grupo está ingressando no estudo destas relações ecológicas de insetos com o desenvolvimento deste trabalho.

1.3 Métodos para detecção de atividade de compostos em insetos

Ao estudarmos uma relação ecológica normalmente encontramos uma série de compostos que fazem parte dos extratos de plantas e insetos, entretanto nem todos os compostos encontrados nestes extratos estão envolvidos na relação ecológica. Para determinarmos qual (is) o (s) composto (s) ativo (s) dispomos de diversos bioensaios que iremos discutir brevemente nos próximos parágrafos.

A primeira etapa para quem quer realizar um bioensaio é determinar qual é o comportamento que se quer avaliar, normalmente esta escolha se dá pela

⁵⁶ Bradshaw, J.W.S.; Baker, R.; Howse, P.E.; Higgs, M.D.; *Physiol. Ent.* **1979**, *4*, 27.

observação comportamental do inseto livre na natureza. Feito isto é necessário traçar um procedimento padrão levando em conta todos os fatores internos e externos que podem afetar o experimento. Também é importante selecionar métodos estatísticos que padronizarão os dados coletados.

Outro fator decisivo é escolher quais as amostras que serão “oferecidas” ao inseto (extratos, compostos puros, etc), esta escolha é muito importante, pois é um dos fatores que influencia a escolha da metodologia a ser utilizada.

Os ensaios com compostos voláteis envolvem principalmente os olfatômetros e os túneis de vento, sendo o olfatômetro uma versão mais sofisticada do túnel de vento. Não existem equipamentos comerciais, podendo assim, ser construídos de diversas formas. O túnel de vento (Figura 6b) pode ser construído com uma caixa que pode chegar a 2-3 m de comprimento e a amostra pode estar contida em um papel de filtro onde o vento de um ventilador arrasta os voláteis e observa-se se o inseto é atraído em direção ao mesmo. O olfatômetro em “Y” é um dos mais comuns (Figura 6a). Um tubo de vidro em Y é conectado por uma das saídas a uma bomba de vácuo e as duas outras saídas são utilizadas para a amostra a ser testada e para o controle do experimento, o inseto é colocado no início do tubo e verifica-se se o mesmo se move em direção à via onde o ar está arrastando os voláteis da amostra, ou do controle, ou se não provoca nenhuma mudança. Possui uma desvantagem, pois o inseto não pode voar e isto pode ser um fator limitante⁵⁷.

Estas duas metodologias dependem da observação do comportamento do inseto frente ao estímulo, sendo o Homem o observador, para que possamos determinar as substâncias ativas de um extrato devemos realizar este experimento com os extratos e repeti-lo com as substâncias puras até que se possa determinar qual a responsável por aquele comportamento.

Existem modificações deste método, além de outros métodos que também utilizam o poder de observação humano. No entanto, as técnicas eletrofisiológicas fogem deste contexto e serão discutidas a seguir.

⁵⁷ Millar, J.G.; Haynes, K.F.; *Methods in Chemical Ecology*, vol.1, Library of Congress Cataloging-in Publication Data, **1998**.

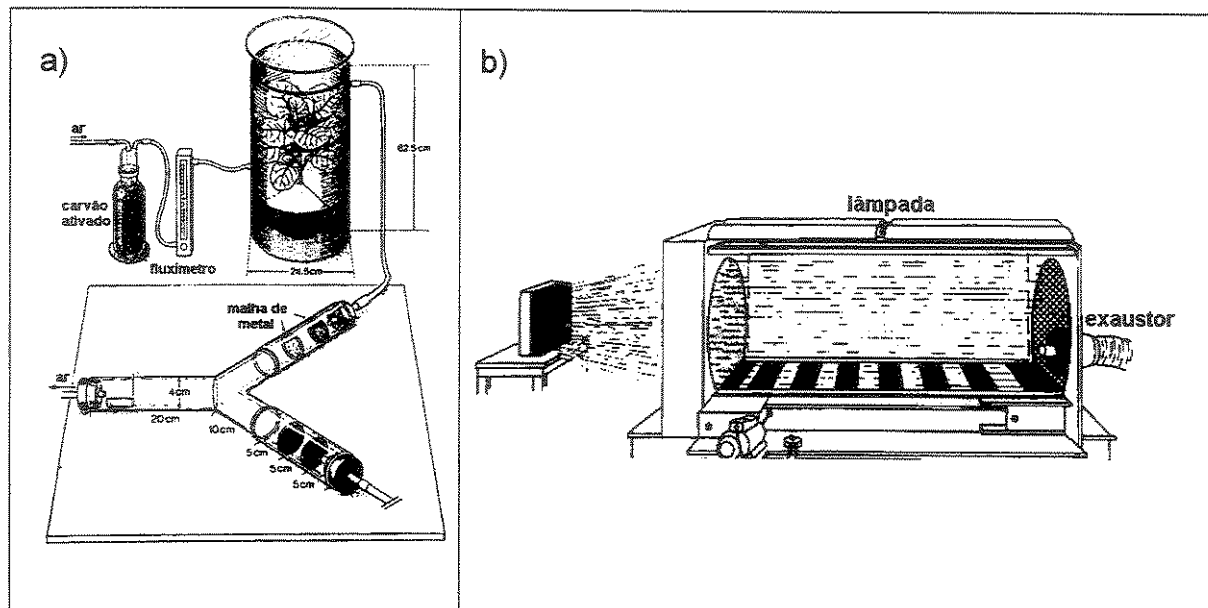


Figura 6. a) Olfatômetro em "Y" e b) Túnel de vento.

As técnicas eletrofisiológicas têm sido utilizadas para identificar os semioquímicos, particularmente de insetos, cujos receptores são acessíveis. Entre estas técnicas está o detector por eletroantenografia (EAD) que utiliza os receptores encontrados nas antenas dos insetos.

O EAD foi originalmente desenvolvido por Schneider^{58,59} que descobriu que haviam pequenas flutuações elétricas entre a base e a ponta da antena de um inseto quando esta era estimulada com feromônios. Seu primeiro estudo foi medir a resposta eletrofisiológica de machos do bixo da seda frente aos compostos voláteis da glândula sexual feminina. O método foi aperfeiçoado e hoje existem aparelhos comerciais disponíveis. O método está baseado na utilização da antena dos insetos que possui sensilas olfatórias (Figura 7) que estão ligadas a células receptoras e axônios e que quando excitadas por compostos ativos causam um impulso elétrico que pode ser medido.

⁵⁸ Schneider, D.; *Experientia* **1957**, *13*, 89.

⁵⁹ Schneider, D.; *Z. Vergl. Physiol.* **1957**, *45*, 405.

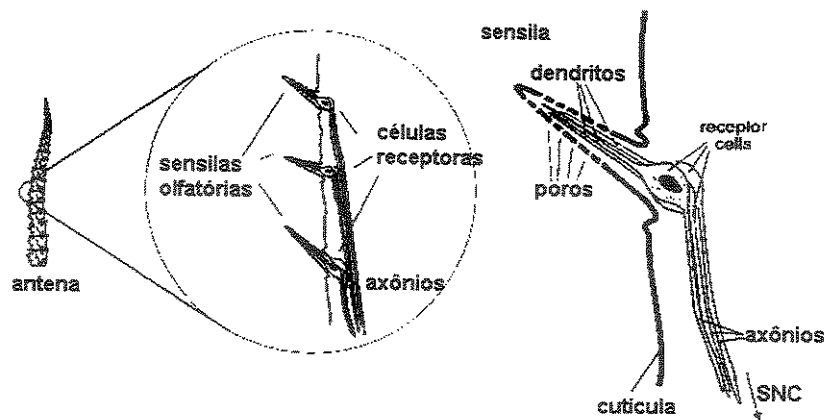


Figura 7. Antena de inseto e os detalhes das células receptoras.

Para medir a resposta, as antenas são conectadas a dois eletrodos (Figura 8a) com ajuda de um gel condutor e a amostra é aplicada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur que contém papel de filtro embebido com a amostra contendo os possíveis compostos ativos pela qual passa ar umedecido (Figura 8b).

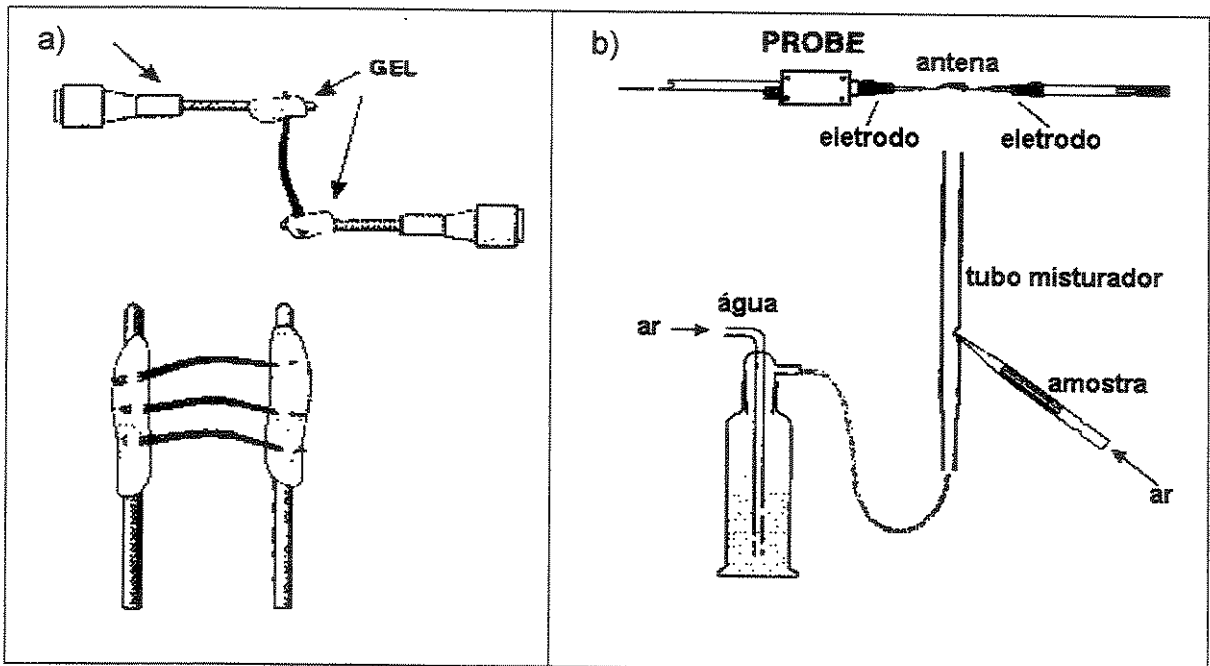


Figura 8. a) Antenas de inseto conectadas a eletrodos com auxílio de gel condutor, b) esquema da aplicação da amostra sobre a antena.

Este sistema está acoplado a um amplificador e este, a um computador onde os dados são armazenados, após várias repetições do experimento os dados recebem tratamento estatístico adequado para que se possa determinar se

a amostra é ativa ou não. Inicialmente são utilizados extratos, portanto, uma resposta indica que um ou mais componentes da mistura são ativos, no entanto não é possível determinar qual (is) dele(s) é (são) responsável (is) por esta atividade. Para resolver este problema existem duas alternativas: a primeira delas é a utilização de padrões de compostos que fazem parte da constituição do extrato, a outra é acoplar o EAD a um cromatógrafo que fará a separação dos constituintes dos extratos que separados serão submetidos à antena (CG-EAD). No segundo método a amostra é dividida ao final da coluna cromatográfica entre dois detectores: o FID (detector de ionização por chama) e o EAD, permitindo assim que se possa obter tanto o cromatograma quanto o eletroantenograma (Figura 9), podendo assim determinar as posições dos compostos ativos. Este método é o mais utilizado, pois os extratos são complexos e muitas vezes constituídos por moléculas quirais não disponíveis comercialmente e que são separadas e apenas o (s) constituinte (s) ativo (s) podem ser posteriormente sintetizados de forma conveniente diminuindo o custo do processo.

Na Figura 9 pode-se visualizar um cromatograma do extrato hexânico de uma flor de *Ophrys speculum* e um eletroantenograma de antenas de machos de *Capsoscolia ciliata* onde os compostos ativos são aqueles que apresentam deflexões negativas no EAD (n^{os} 1, 2 e 7) ⁹⁹.

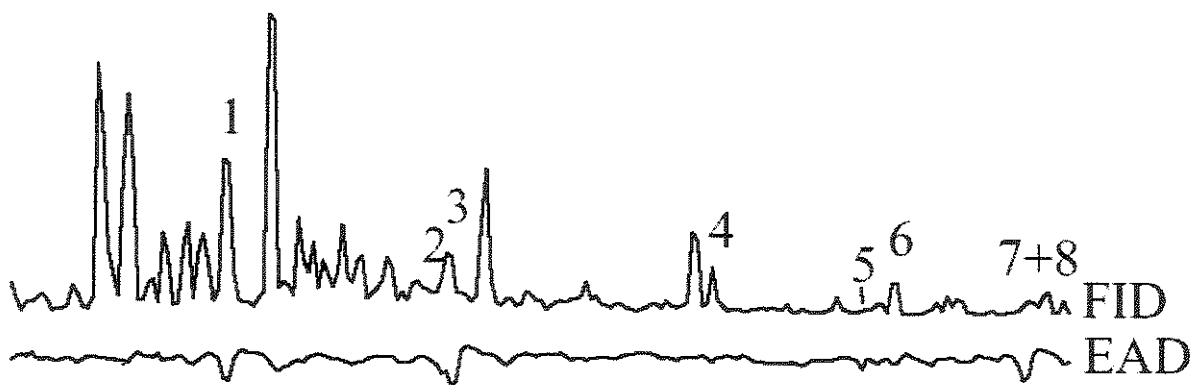


Figura 9. Exemplo de um cromatograma e eletroantenograma.

O EAD e o CG-EAD são métodos que detectam compostos ativos, no entanto não determinam qual comportamento que mediam. Para que se tenha este dado é necessário que se procedam experimentos com o inseto vivo frente

aos padrões utilizando o poder de observação humano e registrando o comportamento fotograficamente ou através de imagem de vídeo.

1.4 Objetivos gerais deste trabalho:

Nosso grupo vem trabalhando com a ecologia química há algum tempo, já foram realizados diversos trabalhos envolvendo este tema, principalmente em duas famílias de plantas: Orchidaceae e Clusiaceae. Na família Orchidaceae foram realizados estudos dos constituintes voláteis de diversas espécies de orquídeas onde foram identificados como uma mistura de mono e sesquiterpenos, aromáticos, derivados de ácidos graxos, entre outros^{60,61}, além de estudos de recompensas florais na forma de óleos fixos de orquídeas da subtribo Oncidiinae, estes permitiram a identificação de hidrocarbonetos, triterpenos, ésteres, diacil e triacilgliceróis.

Este trabalho é mais uma etapa de um estudo interdisciplinar com pesquisadores do Instituto de Biologia da Unicamp e de outras universidades federais (UFU e UFSCar). Para o melhor entendimento, dividimos as discussões em três capítulos, que possuem os seguintes objetivos gerais para este estudo:

- investigar a química da polinização de orquídeas da subtribo Maxillariinae
- **Capítulo 2;**
- determinar a composição química do néctar de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae) - **Capítulo 3;**
- estudar a modificação química provocada por uma relação ecológica entre duas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae)- **Capítulo 4.**

As justificativas para a escolha destes temas serão apresentadas nos três capítulos correspondentes.

⁶⁰ Reis, M.G., *A contribuição da química para o estudo de Orchidaceae e seus polinizadores*, Dissertação de Mestrado, Unicamp, **2000**.

⁶¹ Silva, U.F., *Moléculas orgânicas voláteis: papel das mesmas em ecologia química, caminhos de fragmentação em espectrometria de massas e síntese*, Tese de Doutorado, Unicamp, **2001**.

2 QUÍMICA DA POLINIZAÇÃO EM MAXILLARIINAE

2.1 Introdução

O fascínio pelas orquídeas foi registrado há muitos séculos, onde Theophrastus e Carolus Linnaeus foram os pioneiros no estudo destas plantas. O filósofo grego Theophrastus (372-287 a.C.) e seu discípulo Aristóteles usaram pela primeira vez o termo "*orchis*" em seu tratado "*Phytology*" para descrever tubérculos subterrâneos de orquídeas do mediterrâneo com a forma de testículos. No primeiro século d.C. o médico Dioscorides em seu tratado medicinal "*Materia Medica*" descreveu o uso de orquídeas com poderes afrodisíacos. No meio do século XVIII Carolus Linnaeus não só estabeleceu o gênero *Orchis*, como estendeu a aplicação deste nome para uma nova família de plantas.

A família Orchidaceae faz parte das monocotiledôneas, abrangendo cerca de 7% das Angiospermas, sendo considerada uma das maiores famílias deste grupo. De acordo com a classificação de Dressler⁶², a família Orchidaceae é dividida em cinco subfamílias: Apostasioidae, Cypripedioideae, Epidendroideae, Spiranthoideae e Orchidoideae. A família apresenta mais de 19.000 espécies distribuídas pelo mundo, com sua maior diversidade nos trópicos, sendo o Brasil um país com um grande número de espécies (cerca de 100). Embora sejam encontradas em locais situados entre o nível do mar e 4000 m de altitude, as orquídeas são mais numerosas na faixa que se situa entre 500 a 2000 m acima do nível do mar. Estão distribuídas em todos os continentes, com exceção do Ártico e Antártico e 94-95% estão concentradas nos Trópicos. Possuem uma variada morfologia com flores de várias cores, formatos, aromas e tem conquistado um espaço privilegiado como plantas ornamentais com espécies nativas e híbridas. A maioria das espécies são epífitas⁶³, porém existem espécies rupícolas⁶⁴,

⁶² Dressler, R. L., *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, Oregon. 314 pp, 1993.

⁶³ Vegetal que vive sobre outro sem retirar nutrientes, apenas apoiando-se nele.

⁶⁴ Que vive nas rochas.

terrestres, palustres⁶⁵ e saprofíticas⁶⁶. As flores são muito apreciadas por sua beleza, sendo polinizadas por mariposas, abelhas, vespas, moscas, borboletas e pássaros.

A morfologia básica das orquídeas é constituída de 3 sépalas, 3 pétalas, sendo uma diferenciada, mais colorida e que é chamada de labelo. O pólen encontra-se em forma de esferas aglomeradas que são chamadas de polinário (Figura 10). Algumas espécies possuem polinização direta ou autopolinização, no entanto outras sofrem polinização indireta ou cruzada, mediada pelos agentes polinizadores, que exercem um papel importante na especiação das plantas floríferas. A família Orchidaceae é tida como uma das mais evoluídas no que se refere às estratégias utilizadas para atração do polinizador.



Figura 10. Estrutura floral básica de uma orquídea.

Algumas orquídeas possuem um aroma expressivo e que pode estar relacionado com a atração e seleção dos polinizadores. O levantamento mais completo com voláteis de Orchidaceae foi realizado por Kaiser⁶⁷, que coletou amostras de mais de 100 espécies de orquídeas de gêneros diferentes, obtendo

⁶⁵ Que vive em pauis e lagoas.

⁶⁶ Vegetal, superior ou inferior, desprovido de clorofila, como certas orquídeas, que se nutre de animais ou vegetais em decomposição.

⁶⁷ Kaiser, R.; *The scents of orchids: olfactory and chemical investigations*; Editions Roche, Basel, 1993.

assim um vasto arquivo de compostos desta família de plantas, no entanto não realizou nenhum estudo da importância destes compostos para a polinização. Recentemente uma nova espécie de orquídea recebeu o nome de *Coryanthus kaiseriana* G. Gerlach, em homenagem ao seu estudo em aromas de orquídeas⁶⁸, o pesquisador é diretor da unidade de aromas naturais da empresa Givaudan, renomada em pesquisa de compostos para perfumaria.

Um fenômeno raro e interessante que demonstra a capacidade de atração do polinizador ocorre no gênero *Ophrys* onde ocorre mimetismo sexual⁶⁹. O polinizador, machos de abelhas ou vespas, apresenta um comportamento descrito como “pseudocópula” com o labelo da flor, que possui uma morfologia de modo a parecer com a fêmea. Uma revisão de 1990 traz o estudo químico de 30 espécies de *Ophrys* tanto dos voláteis obtidos por coleta dinâmica quanto do extrato hexânico da flor, contém também estudos etológicos e de cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia.⁷⁰ Estes estudos revelaram complexa constituição química dos voláteis emitidos pela planta e dos extratos hexânicos da flor. Os compostos presentes no extrato do labelo foram identificados como uma série de alcanos de cadeia normal e alcenos (constituintes principais), além de aldeídos, ácidos carboxílicos e ésteres de cadeia longa, enquanto que nos voláteis foram identificados uma série de mono e sesquiterpenos, álcoois, aldeídos, ésteres e ácidos. Considerando que a atração sexual é dos machos os pesquisadores investigaram as secreções das glândulas das rainhas virgens destas espécies. Esta investigação demonstrou que alguns compostos encontrados nos voláteis das orquídeas foram encontrados também no extrato cefálico das rainhas e constituintes encontrados no extrato hexânico das flores foram também identificados na cera de rainhas.

A ação dos compostos sobre os machos foi estudada através de cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia e confirmados através da exposição dos machos aos extratos. Observou-se então que o comportamento de cópula ocorre apenas com extrato da cera da fêmea e do labelo da flor e que os

⁶⁸ *Chemical & Engineering News* de 15 de dezembro de 2003, página 12.

⁶⁹ Wolf, T.; *Oikos* **1950**, 2, 20.

⁷⁰ Karin, A.; Karlson, B.; *Phytochemistry* **1990**, 29, 1359.

voláteis são apenas responsáveis pela atração a longa distância^{71,72}. Os estudos revelaram também que a visita dos polinizadores cessa assim que a polinização se realiza esta observação levou ao estudo dos voláteis emitidos pela flor e do extrato do labelo após a polinização revelando um decréscimo de produção de compostos ativos identificados anteriormente e um acréscimo de produção de outros compostos, estudos da ação destes compostos frente ao polinizador revelaram sua ação repelente⁷³.

Outra estratégia utilizada para atrair o polinizador são as recompensas florais como: óleos voláteis e aromáticos (subtribos Stanhopeinae e Catasetinae)⁷⁴, néctar, pólen, óleos não voláteis. Os óleos não voláteis de orquídeas da subtribo Oncidiinae foram extensivamente estudados em nosso grupo e revelaram em sua constituição di e triacilgliceróis, ácidos graxos, alguns triterpenos e hidrocarbonetos⁷⁵.

A presença de ceras no labelo e sua coleta por abelhas foram verificadas na subtribo Maxillariinae, sua função ainda não foi descrita e os constituintes químicos são alvo do nosso estudo.

2.1.1 A subtribo Maxillariinae

A subtribo Maxillariinae corresponde a aproximadamente 472 espécies de orquídeas de distribuição exclusivamente neotropical. No Brasil ocorrem cerca de 100 espécies, sendo pelo menos metade delas exclusivamente brasileiras⁷⁶. Esta subtribo está dividida em sete gêneros: *Maxillaria*, *Scuticaria*, *Cryptocentrum*, *Cyrtidium*, *Mormolyca*, *Sepalosaccus*, *Trigonidium*. Apesar deste grupo possuir

⁷¹ Schiestl, F.P.; Ayasse, M.; Paulus, H.F.; Löstedt, C.; Hansson, B.S.; Ibarra, F.; Francke, *Nature* **1999**, 399, 421.

⁷² Schiestl, F.P.; Ayasse, M.; Paulus, H.F.; Löstedt, C.; Hansson, B.S.; Ibarra, F.; Francke, W.; *J. Comp. Physiol. A.* **2000**, 186, 567.

⁷³ Schiestl, F.P.; Ayasse, M.; *Oecologia* **2001**, 126, 531.

⁷⁴ Braga, P.I.; *Acta Amazonica* **1976**, 6, 433.

⁷⁵ Reis, M.G., de Faria, A.D., Bittrich, V., Amaral, M.D.E., Marsaioli, A.J., *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, 11, 600.

⁷⁶ Pabst, G.F.J.; Dungs, F.; *Orchidaceae brasiliensis II*, Hildesheim, *Brücke-Verlag Kurt Schmorsow*, **1977**.

flores bastante semelhantes quanto a sua estrutura básica, elas parecem apresentar uma grande variedade de fragrâncias florais e de recompensas florais, tais como: ceras, resinas, néctar, pólen e compostos aromáticos diversos.

Com respeito aos voláteis de Maxillariinae, Kaiser estudou os emitidos por cinco espécies desta subtribo, sendo *Maxillaria picta* a única espécie brasileira. Em sua análise podemos verificar que os compostos encontrados seguem uma rota biossintética mista, predominando em algumas a rota do ácido chiquímico, enquanto que em outras predomina a rota do acetato. Foram encontrados em todas as espécies: 6-metil-5-hepten-2-ona, *n*-nonanal, *n*-decanal, α -copaeno, limoneno e α -pineno.

A primeira referência com respeito à ocorrência de ceras no labelo foi feita por Braga (1977) em espécies amazônicas do gênero *Maxillaria* polinizadas por vespas que coletam essas ceras⁷⁷.

A constituição química das ceras de *Maxillaria cerifera*, *M. notyoglossa* e *M. acuminata*, todas da mesma aliança (*M. acuminata*) foi estudada por métodos histoquímicos e revelaram similaridade na composição, sendo compostas por lipídios e proteínas⁷⁸. Esta afirmação é muito abrangente, pois a definição geral para lipídios é: "compostos de origem biológica que dissolvem em solventes apolares como clorofórmio e éter etílico"⁷⁹. Várias classes de compostos orgânicos podem satisfazer esta condição: triacilgliceróis, ácidos de cadeia longa (ácidos graxos), terpenos e terpenóides, esteróides, prostaglandinas, fosfolipídeos e ésteres de cadeia longa.

A taxonomia das espécies centroamericanas e andinas da subtribo Maxillariinae têm sido estudada em profundidade⁸⁰, mas ainda não existe uma

⁷⁷ Braga, P.L.S., *Acta Amazônica* **1977**, 2, 80.

⁷⁸ Davies, K.L.; Turner, M.P.; Greg, A.; *Ann. Bot.* **2003**, 9, 439.

⁷⁹ Solomons, G.; Fryle, C.; *Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.; vol. 7, p1142, **2000**.

⁸⁰ (a) Atwood, J. T. *Selbyana* **1998**, 10, 76. (b) Atwood, J. T., *Orchids of Costa Rica, Part I*. Icones Plantarum Tropicarum. 14, **1989**. (c) Atwood, J. T., *Lindleyana* **1993**, 8, 25. (d) Atwood, J. T., *Lindleyana* **1994**, 9, 227. (e) Atwood, J. T., *Maxillaria* as a subset of the Costa Rican Orchid Flora. Pp: 328-331. In C.E.B. Pereira (Ed.):

revisão integral das espécies brasileiras de Maxillariinae, embora alguns agrupamentos foram estudados por Brieger⁸¹, com base apenas em caracteres vegetativos. Um amplo estudo da filogenia de espécies de *Maxillariinae* está sendo realizado por dois grupos, um brasileiro do IB da Unicamp e outro da Universidade da Flórida baseado em caracteres genéticos de seqüenciamento de DNA.

2.1.2 O fenômeno de pseudocópula

Na tribo Maxillariinae o fenômeno de pseudocópula é relatado para duas espécies que são objeto de nosso estudo, são elas: *Mormolyca ringens* e *Trigonidium obtusum*.

Já que estamos falando de pseudocópula do polinizador com a flor vamos falar sobre os polinizadores. Estas orquídeas são polinizadas por abelhas da subfamília Meliponinae (ordem: Hymenoptera, família: Apidae) que são conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, por possuírem ferrões atrofiados sendo, portanto, incapazes de ferroar. São agrupadas em três tribos: Trigonini, Meliponini e Lestrimelitini. Meliponini é formada por apenas um gênero: *Melipona*, encontrado apenas na região Neotropical (América do Sul, Central e Ilhas do Caribe) enquanto que Trigonini agrupa um grande número de gêneros e está distribuída em toda a área de distribuição da subfamília. Todas as espécies de Meliponinae são eusociais, ou seja, possuem divisão em castas. As colônias são constituídas por muitas operárias (centenas até uma centena de milhar, dependendo da espécie) que realizam as tarefas de construção e manutenção da estrutura física da colônia, coleta e processamento do alimento, cuidado das crias e defesa. São constituídas, também por uma rainha responsável pela postura de ovos que vão dar origem às fêmeas (rainhas ou operárias) e a pelo menos, uma parte dos machos (que em algumas espécies podem ser filhos de operárias). Os

Proceedings of the 15th World Orchid Conference, Rio de Janeiro. Naturalia, Turriers, France, 1997. (f) Atwood, J. T., *Selbyana* 1999, 19, 254.

⁸¹ Brieger, F. G.; *Botanische Jahrb.* 1977, 97, 548.

machos são produzidos em grande número em certas épocas do ano e podem realizar algumas tarefas dentro da colônia, além de fecundarem a rainha, durante o vôo nupcial. Normalmente, alguns dias após emergirem as novas abelhas, são expulsos da colméia. Sua comunicação é bastante avançada e baseada na emissão de compostos voláteis, utilizados para sinalizar perigo, alimento, sexo oposto, que podem ser sentidos a longa distância e também compostos que são liberados por glândulas como as de cera que são utilizados para construção de ninhos, como umectante do exoesqueleto, além de outras funções que serão discutidas mais tarde. A Figura 11 é de uma abelha com suas glândulas principais.

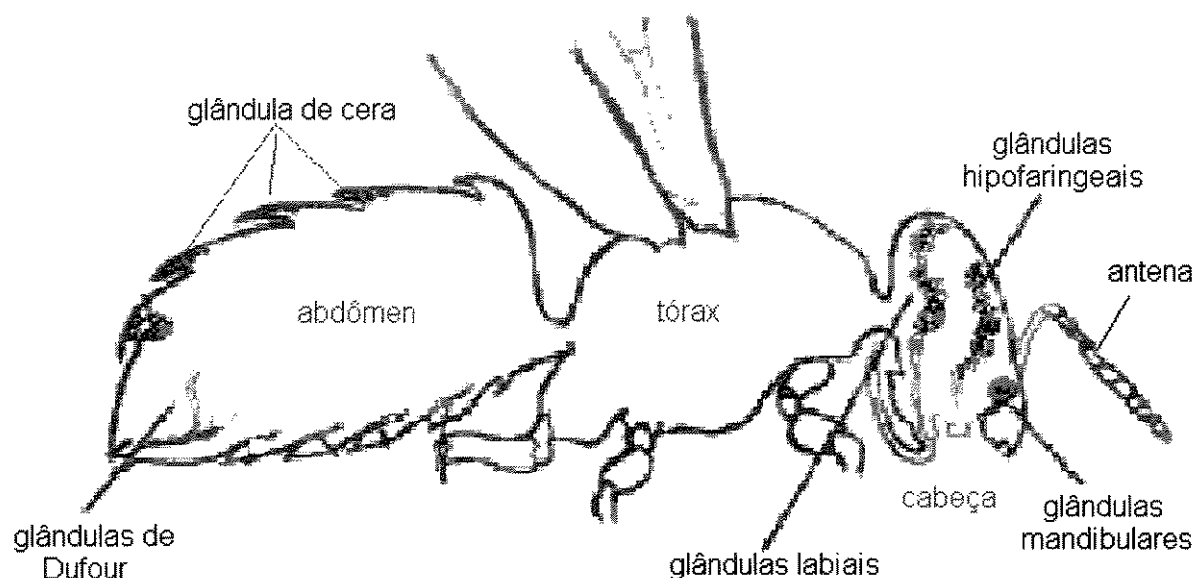


Figura 11. Abelha com a representação de suas glândulas principais.

Discutiremos agora o fenômeno de pseudocópula nas duas espécies de Maxillariinae em estudo.

2.1.2.1 O fenômeno em *Mormolyca ringens*

Mormolyca ringens não oferece nenhum tipo de recompensa para os polinizadores e atrai um grande número de machos que apresentam um comportamento de cópula com o labelo, comportamento este que cessa quando a

flor é polinizada. Os polinizadores foram identificados como sendo machos de abelhas sem ferrão da tribo Meliponini: *Nannotrigona testaceicornis* e *Scaptotrigona* sp.

Nannotrigona testaceicornis possui aproximadamente 4 mm e sua distribuição geográfica abrange um imenso território de clima tropical que se estende do Norte do Paraná até os Estados Unidos da América. O fenômeno da polinização está representado na Figura 12.

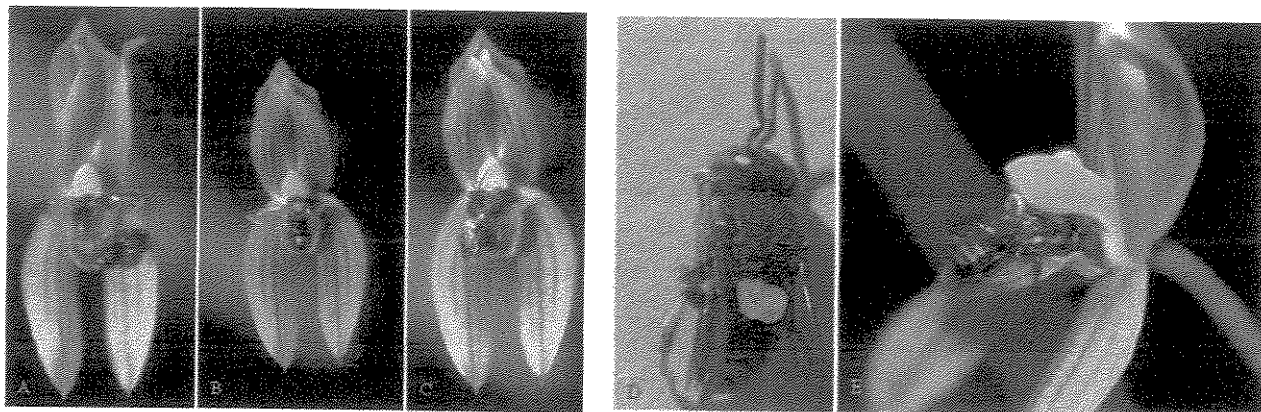


Figura 12. Polinização em *Mormolyca ringens*: A) machos de *N. testaceicornis* disputando o labelo de *M. ringens*, B) macho de *N. testaceicornis* retirando o polinário; C) macho chegando à outra flor com o polinário; D) macho com polinário aderido no escutelo e E) macho de *N. testaceicornis* copulando com a superfície do labelo. Fotografias cedidas pelo Dr. Rodrigo B. Singer.

Outra espécie que poliniza *M. ringens* é *Scaptotrigona postica* (Apidae, Meliponinae) também uma abelha sem ferrão, no entanto maior que *N. testaceicornis*. A composição química dos voláteis cefálicos desta espécie já foi estudada⁸² e um interessante resultado foi obtido acerca da produção destes voláteis e a atratividade da rainha. Enquanto a rainha virgem produz altas concentrações de álcoois com a hidroxila na posição 2, após 10-12 dias as mesmas produzem adicionalmente também altas proporções dos produtos de oxidação destes compostos (cetonas) apresentando-se ainda atrativas. No entanto, após a fecundação, as rainhas produzem altas concentrações de ésteres

⁸² Engels, W.; Engels, E.; Francke, W.; *Invert. Reprod. and Develop.* 1997, 30, 251.

e não são mais atrativas para os machos. Observou-se também que rainhas muito novas e muito velhas produzem altas concentrações de ácidos carboxílicos que funcionam como repelentes.

2.1.2.2 A polinização em *Trigonidium obtusum* Lindl

T. obtusum é polinizada (Figura 13) por machos de *Plebeia droyana* (Apidae, Meliponinae) que apresentam comportamento de pseudocópula com a flor. Borg-Karlson e Tengo⁸³ afirmaram que os insetos são atraídos pela estrutura do labelo que imita fêmeas de Hymenoptera e pelo aroma que pode mimetizar o feromônio feminino destas abelhas.

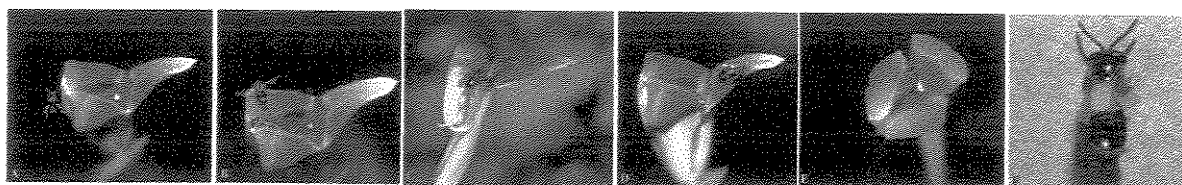


Figura 13. Polinização em *T. obtusum* pelos machos de *P. droyana*. A) machos sobrevoando a flor, B) machos em contato com a flor, C) macho saindo da flor, D) macho com comportamento de cópula com a flor, E) macho com o polinário aderido no escutelo saindo da flor, F) macho com o polinário.

Esta planta é visitada em abundância por estes machos e nenhum outro inseto participa de sua polinização nos locais observados até o momento. A visita cessa quando a flor é polinizada.

2.2 Objetivos deste capítulo:

Estudos realizados pelo Dr. Rodrigo B. Singer e a doutoranda Samantha Koehler (IB- Unicamp) demonstraram que em termos de estratégia de polinização as orquídeas da subtribo Maxillariinae podem ser divididas em três grupos:

⁸³ Borg-Karlson, ^aK., Tengo, J.; *J.f Chem. Ecol.* 1986, 12, 1927.

- as que apresentam aroma acentuado e que não oferecem recompensa para o polinizador;
- as que provocam comportamento de cópula pelo polinizador e que não possuem material para ser coletado pelo mesmo;
- as que não apresentam aroma acentuado mas oferecem material que é coletado pelo polinizador.

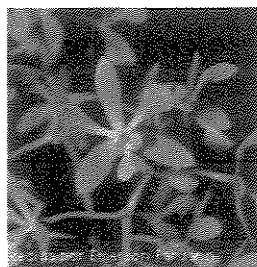
Desta forma foi objetivo desta parte do trabalho o estudo de orquídeas pertencentes aos três grupos acima citados, ficando assim dividido:

- estudo dos voláteis de 16 espécies que não possuem recompensa;
- estudo da química envolvida no fenômeno de pseudocópula;
- estudo da constituição química da recompensa de algumas espécies de Maxillariinae.

2.3 Discussão dos resultados

2.3.1 Análise dos voláteis

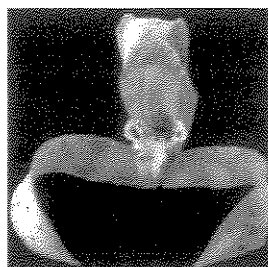
Analisamos 16 espécies de orquídeas da subtribo Maxillariinae (Figura 14) que não apresentam material para a coleta do polinizador e discutiremos sua composição a seguir. Todas estas flores são pequenas, medindo de 1 a 3 cm de tamanho em seu diâmetro maior e as plantas estão cultivadas no Instituto de Botânica de São Paulo (São Paulo – SP), no orquidário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Piracicaba – SP) e no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Campinas – SP).



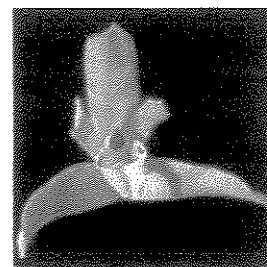
*Encyclia
odoratissima*



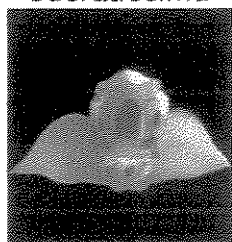
*Maxillaria
chrysantha*



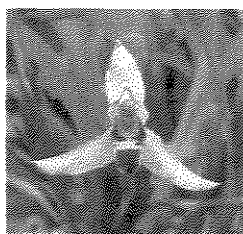
Maxillaria ubatubana



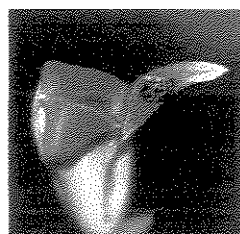
Maxillaria picta



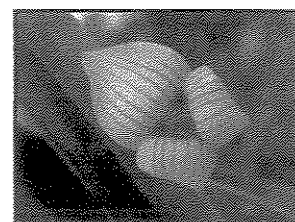
M. gracilis



M. marginata



T. obtusum



T. egertonianum



T. turbinatum



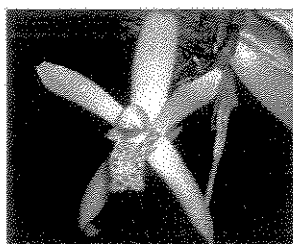
Mormolyca ringens



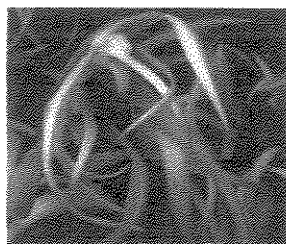
M. leucaimata



M. jenischiana



M. rufescens



M. ocroleuca



M. alba



M. tenuifoliae

Figura 14. Espécies de orquídeas que tiveram sua fragrância estudada.

a) Estudo da metodologia adequada para a coleta dos voláteis:

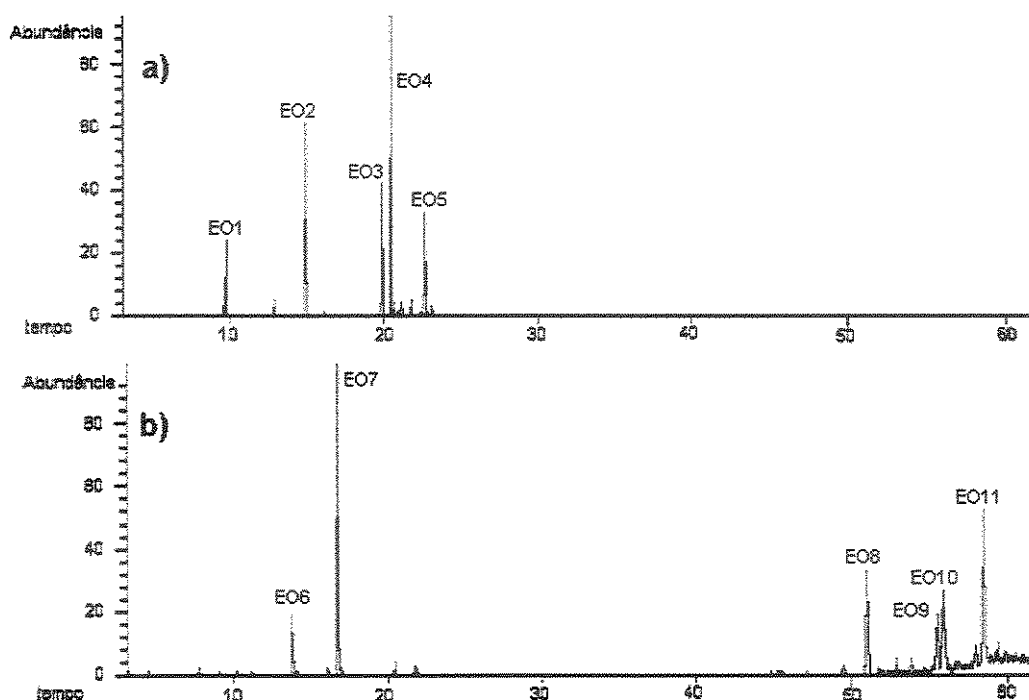
Realizamos uma primeira análise exploratória a fim de avaliar qual o melhor método de coleta dos voláteis florais. Para isto, selecionamos *Encyclia odoratissima*, uma orquídea que possui uma grande quantidade de flores e fragrância facilmente detectada pelo olfato humano. Com o objetivo de determinar a constituição da fragrância optou-se por fazer dois tipos de análise: uma utilizando coleta dinâmica e outra a injeção de sólidos, com um injetor construído em nosso laboratório⁸⁴. No cromatograma de íons totais (C 1) obtido para estas fragrâncias florais foi verificada uma distinta composição química que foi confirmada pela análise dos espectros de massa, índice de retenção e comparação com a literatura⁸⁵.

No método da coleta dinâmica devemos tomar cuidado com contaminações do ambiente onde a planta se encontra, para remediar este problema sempre realizamos uma coleta do ar do ambiente utilizando o mesmo polímero adsorvente. Esta amostra é analisada e havendo coincidência com algum composto encontrado na análise da flor, este é então descartado.

Curiosamente os compostos principais encontrados na análise por injeção de sólidos foram: *p*-vinil-fenol (E 1, pg. 152), 2-metoxi-4-vinil-fenol (E 2, pg. 152) e o ácido cinâmico, que não foram encontrados por coleta dinâmica. Alguns compostos como: α -*trans*-bergamoteno (35% na coleta dinâmica e 4,3% no experimento de injeção de sólidos), linalol e γ -cariofileno foram encontrados nas duas análises. Na análise por injeção de sólidos foram detectados ácidos graxos de alto peso molecular e derivados do furfural.

⁸⁴ da Silva U.F., Borba E.L., Semir J., Marsaioli A.J.; *Phytochemistry* **1999**, 50, 31.

⁸⁵ Adams, R.P.; *Identification of essential oils by gas chromatography/mass spectrometry*, Allured Publications, Illions, **1995**.



C 1. Cromatogramas de íons totais da fragrância de *Encyclia odoratissima* obtido por: a) coleta dinâmica e b) por injeção de sólidos em coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m). Condições da análise: temperatura do forno de 50°C a 290°C(15 min) a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Para descartarmos a possibilidade de erro na coleta do pedaço da flor a ser inserido no injetor de sólidos, realizamos várias análises com pedaços diferentes da flor (pétala, labelo e sépala), no entanto os resultados anteriores se confirmaram. Uma das explicações para este fato é que na flor os compostos voláteis estão na forma de precursores que são liberados lentamente ao ar, na coleta dinâmica são coletados e concentrados no polímero por várias horas e então analisados, enquanto na injeção de sólidos um pequeno pedaço é inserido no injetor o que diminui muito a concentração destes compostos que ficam mascarados por compostos fixos da flor ou artefatos (furfural e seus derivados) de degradação térmica de carboidratos^{86,87}.

⁸⁶ Stahl, E.; Herting, T.; *Chromatographia* **1974**, 7, 637.

Tabela 1. Composição química da fragrância de *Encyclia odoratissima*, obtida por coleta dinâmica e injeção de sólidos. * compostos que não possuem índice de retenção na literatura, mas que apresentaram índice de similaridade na biblioteca Wiley275 superior a 95%.

Composto	Ir calculado	Ir literatura	% relativa headpace/nº em C 1	% relativa injeção sólidos/ nº em C 1
furfural	832	830	-	0,3
5-metil-furfural	960	962	-	0,1
trans- β -ocimeno	1053	1050	-	0,2
o-guaiacol	1083	1086	-	1,2
benzoato de metila	1090	1091	0,9	-
linalol	1102	1098	6,8/EO1	0,7
benzenoetanol	1110	1110	-	1,8
salicilato de metila	1191	1190	1,6	-
p-vinil fenol*	1225	-	-	18,5/EO6
5-hidroximetil furfural*	1235	-	-	1,8
acetato de 4-etil-fenila	1259	1256	21,0 /EO2	-
indol	1287	1288	0,3	-
4-vinil-2-metoxi-fenol*	1317	-	-	35,6/EO7
cinamato de metila	1382	1379	-	0,5
γ -cariofileno	1404	1404	14,0/EO3	2,5
α -trans-bergamoteno	1434	1436	35,0/EO4	4,3/ EO8
ácido cinâmico	1440	1438	-	14,6/EO9
cis- β -farneseno	1444	1443	1,2	-
α -humeleno	1455	1454	0,2	-
trans- β -farneseno	1458	1458	1,7	-
germacreno D	1480	1480	1,6	-
α -muroleno	1500	1499	0,2	-
α -bisaboleno	1504	1504	0,1	-
cis,cis- α -farneseno	1509	1508	11,5/EO5	-
β -curcumeno	1513	1512	0,5	-
cis- γ -bisaboleno	1516	1515	0,2	-
δ -cadineno	1524	1524	0,8	-
hidrato de sesquisabineno	1544	1545	0,1	-
ocidentalol	1549	1548	-	0,5
ácido tetradecanóico	1763	1762	-	1,1
ácido hexadecanóico	1969	1965	-	1,0
não identificados	-	-	6,6	14,0/EO10 e EO11
TOTAL			100,0%	100,0%

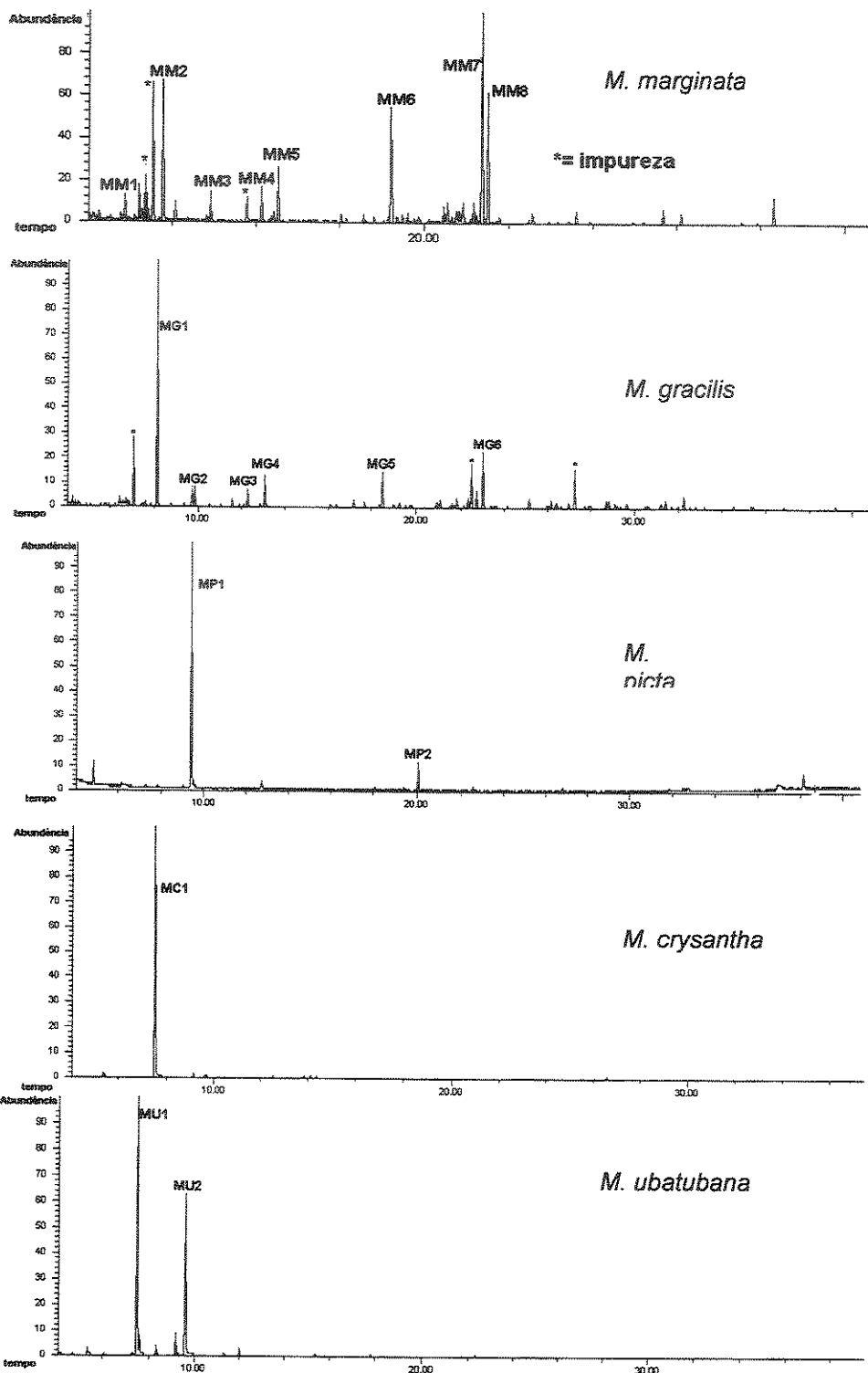
⁸⁷ Uobe, K.; Nishid, K.; Inoue, H.; Tsutsui, M.; *J. Chromatography* **1980**, 193, 83.

Considerando que o objetivo do nosso projeto é a análise de compostos envolvidos no fenômeno da polinização, a obtenção das amostras através de coleta dinâmica ou estática (SPME) permite capturar os compostos que são liberados pela flor e que podem estar atraindo os polinizadores. Como a maioria das coletas foram realizadas nos orquidários do Instituto de Botânica de São Paulo e da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, optamos pela coleta dinâmica onde as amostras são dessorvidas do polímero adsorvente com o auxílio de solventes e assim são transportadas em caixas contendo gelo seco. As coletas realizadas no orquidário do Instituto de Botânica da Unicamp foram realizadas pelo mesmo método a fim de manter um padrão de análise.

b) Análise de voláteis da aliança *Maxillaria picta*

Dentro da subtribo Maxillariinae encontramos uma divisão que é chamada de Aliança. As orquídeas *M. picta* Hooker, *M. ubatubana* Hoehne *M. chrysantha* Barbosa Rodrigues, *M. gracilis* Loddiges e *M. marginata* Fenzl. fazem parte da aliança *M. picta*. Estas orquídeas são epífitas e não oferecem recompensas para os polinizadores que são operárias de abelhas *Trigona*. As três primeiras espécies são confundidas quando visualizadas separadamente, pois são morfologicamente semelhantes. *M. picta*, *M. gracilis* e *M. ubatubana* são exclusivamente brasileiras e encontradas na Floresta Atlântica (ES, RJ, SP, SC, RS e MG), enquanto que *M. chrysantha* é encontrada também no Suriname. Já *M. marginata* é encontrada na Colômbia, Equador e Brasil (BA, RJ, SP, PR, SC, RS)⁸⁸. Os voláteis dessas espécies foram coletados e analisados por cromatografia gasosa e identificados, os resultados obtidos podem ser visualizados em C 2 e Tabela 2.

⁸⁸ Pabst, G.F.J.; Dungs; F. ; *Orchidaceae Brasilienses*; Brücke-verlag 1977; Vol. II, pg. 184



C 2. Cromatogramas de íons totais de fragrâncias florais de espécies da aliança *Maxilaria picta*, obtido por coleta dinâmica, em coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Tabela 2. Composição química dos voláteis florais de *Maxillaria gracilis* (MG), *M. marginata* (MM), *M. chrysantha* (MC), *M. picta* (MP), *M. ubatubana* (MU).

Composto	Ir _c	Ir _i	MG % /nº no C 2	MM % /nº no C 2	MC % /nº no C 2	MP% /nº no C 2	MU% /nº no C 2
α -pineno	935	939	-	0,4	-	5,8	2,4
benzaldeído	960	961	-	-	2,5	-	2,1
6-metil-5-hepten- 2-ona	989	985	1,3	2,6/MM1	-	1,1	0,1
mesitileno	1000	994	0,8	0,8	-	-	-
<i>n</i> -octanal	1005	1001	-	-	-	-	0,1
<i>p</i> -cimeno	1032	1026	0,2	-	-	-	-
limoneno	1036	1031	0,2	9,0/ MM2	-	-	0,1
1,8-cineol	1029	1033	-	-	-	-	0,1
álcool benzílico	1036	1032	-	-	-	-	0,3
fenil acetaldeído	1043	1043	-	-	91,0	-	47,5/ MU1
<i>cis</i> - β -ocimeno	1045	1040	0,2	-	-	-	-
<i>trans</i> - β -ocimeno	1054	1050	30,3/ MG1	1,3	-	-	3,7
acetofenona	1073	1065	0,3	0,3	-	-	-
<i>cis</i> -óxido de linalool	1071	1074	-	-	-	-	0,1
<i>trans</i> - óxido de linalool	1091	1088	0,3	0,5	-	-	-
linalol	1102	1098	2,8/ MG2	0,2	-	70,5/ MP1	3,8
<i>n</i> -undecano	1099	1100	-	-	2,3	-	-
<i>n</i> -nonanal	1104	1102	3,0	1,9/ MM3	-	-	-
álcool fenil etílico	1114	1110	-	-	2,0	-	35,7/ MU2
naftaleno	1182	1179	3,0/ MG3	2,9/ MM4	-	-	-
α -terpineol	1190	1189	-	0,6	-	-	1,4
dodecano	1200	1200	-	0,8	-	-	-
<i>n</i> -decanal	1206	1204	4,9/ MG4	4,4/ MM5	-	2,6	0,3
δ -elemeno	1338	1339	0,1	0,1	-	-	-
α -cubebeno	1350	1351	0,6	-	-	-	-
α -ialangeno	1371	1372	0,2	-	-	-	-
α -copaeno	1375	1376	5,7/ MG5	9,6/ MM6	-	-	0,2
β -elemeno	1392	1391	0,2	0,6	-	-	-
<i>n</i> -tetradecano	1400	1399	0,7	0,9	-	-	-

Continuação da Tabela 2							
α -gurjuneno	1410	1409	0,1	-	-	-	-
<i>cis</i> - α -bergamoteno	1416	1415	0,3	0,4	-	1,1	-
<i>trans</i> -cariofileno	1419	1418	0,1	0,1	-	-	-
diidro- β -ionona	1426	-	-	-	-	9,6/ MP2	-
β -gurjuneno	1432	1432	0,1	0,2	-	-	-
aromadendreno	1443	1439	0,1	0,1	-	-	-
cusimeno	1451	1447	-	0,1	-	-	-
acetona de geranila	1456	1453	0,9	1,5	-	-	-
α -humuleno	1453	1454	0,1	-	-	-	-
aloaromadendreno	1461	1461	1,0	2,0	-	-	-
γ -muroleno	1477	1477	0,6	1,0	-	-	-
germacreno D	1480	1480	0,2	1,0	-	-	-
<i>ar</i> -curcumeno	1484	1483	-	1,9	-	-	-
α -selineno	1495	1494	0,1	0,3	-	-	-
α -muroleno	1501	1499	1,7	2,0	-	-	-
(<i>E,E</i>)- α -farneseno	1510	1508	-	0,6	-	-	-
2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metil-fenol	1514	1512	2,6	17,7/ MM7	2,0	-	-
δ -cadineno	1524	1524	9,7/ MG6	11,6/ MM8	-	0,9	0,2
α -calacoreno	1544	1542	0,4	0,6	-	-	-
1- <i>epi</i> -cubenol	1628	1627	0,2	0,1	-	-	-
não identificados			26,3	22,0	0,2	8,4	1,9
TOTAL			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Roman Kaiser⁸⁹, perfumista da empresa Givaudan®, já estudou os voláteis de *M. picta* obtidos pelo método da coleta dinâmica. Comparando os resultados confirmamos a semelhança apenas pela presença de α -pineno, 6-metil-5-hepten-2-ona, *n*-decanal e linalol. Na análise de Kaiser o componente principal da fragrância floral é o estragol (42,5%), no entanto o mesmo não foi encontrado em nossa análise, onde o linalol predomina com 70,5%. Realizamos a análise em triplicata com flores frescas não polinizadas, no entanto este composto não foi detectado em nenhuma das análises.

⁸⁹ R. Kaiser, *The scents of orchids: olfactory and chemical investigations*, Editiones Roche, Basel, 1993.

Comparando os cromatogramas podemos observar maior complexidade em *M. gracilis* e *M. marginata*. Estes possuem em comum, naftaleno (3,0 e 2,9%), *n*-decanal (4,9 e 4,4%), α -copaeno (5,7 e 9,6%), δ -cadineno (9,7 e 11,6%), entre outros compostos em menor concentração. Estas espécies, no entanto, diferem nos componentes principais o *trans*- β -ocimeno (30,3%) em *M. gracilis* e o 2,6-di-*terc*-butil-4-metil-fenol (17,7%) em *M. marginata*. *Maxillaria marginata* possui 9% do aldeído *n*-nonanal, que está ausente em *M. gracilis*.

Em *Maxillaria chrysantha*, *M. picta* e *M. ubatubana* encontramos menor complexidade. Enquanto em *M. ubatubana* e *M. chrysantha* encontramos altas concentrações de fenil acetaldeído (91,0 e 47,5%, respectivamente) em *M. picta* há 47,5% de linalol. Em *M. ubatubana* encontramos o álcool fenil etílico em alta concentração (37,5%), este também está presente em *M. chrysantha* em pequena concentração (2%). Em *M. picta* encontramos 9,6% de diidro β -ionona, que está ausente nas outras fragrâncias. Quanto à rota biossintética predominante encontramos uma predominância da via do ácido chiquímico em *M. chrysantha* e *M. ubatubana*, enquanto em *M. picta* e *M. gracilis* predomina a rota do acetato, em *M. marginata* encontramos compostos provenientes tanto da rota do chiquimato quanto do acetato, sem predominância significativa de nenhuma.

O 2,6-di-*terc*-butil-4-metil-fenol é citado na literatura como artefato, podendo estar presente em mangueiras que fazem parte das conexões do sistema de coleta de voláteis ou em tampas de frascos utilizados para armazenar a solução até a análise. Como este composto foi encontrado em algumas de nossas análises procedemos à análise por coleta dinâmica por 8 horas, utilizando o mesmo sistema de mangueiras e frascos de armazenamento de amostras. Após dessorção e concentração da amostra e análise por CG-EM não verificamos a presença deste composto na análise, sendo desta forma assumido como constituinte dos voláteis emitidos pelas plantas.

c) Fragrâncias de orquídeas do gênero *Trigonidium*

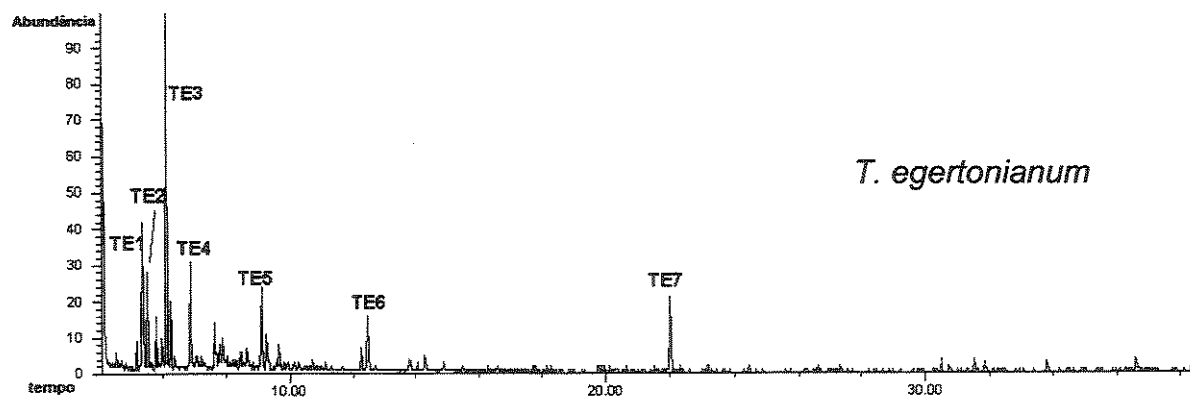
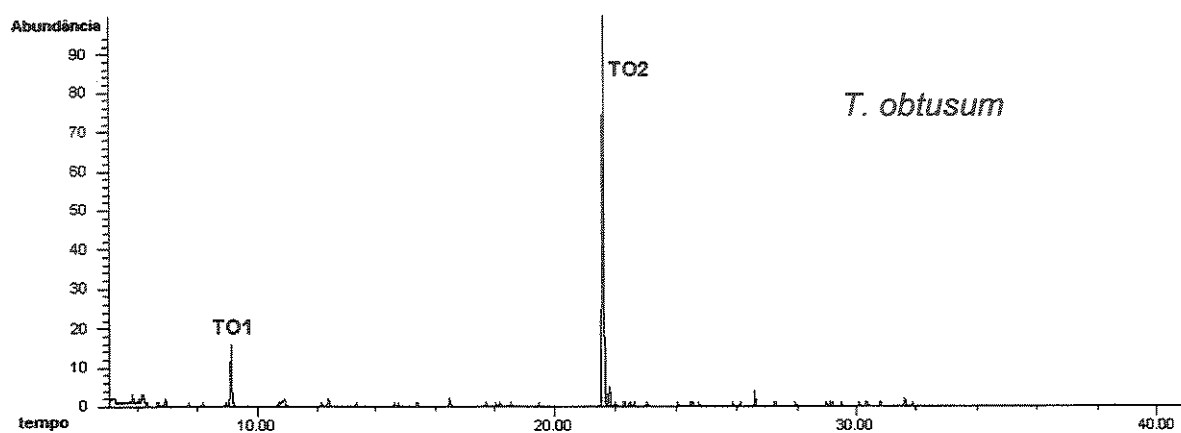
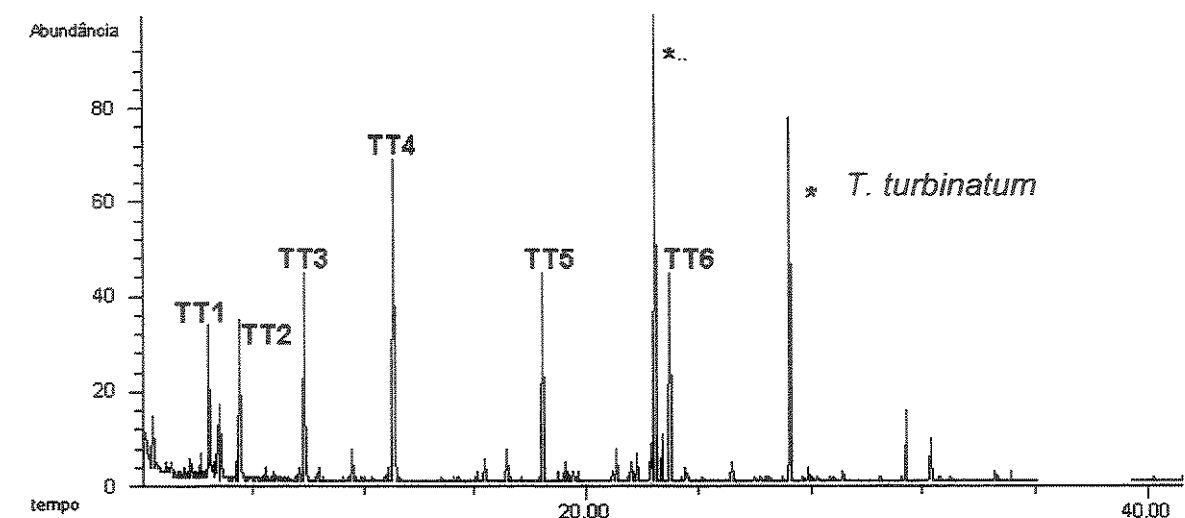
Estudamos três espécies de orquídeas deste gênero: *T. obtusum*, *T. egertonianum* e *T. turbinatum*.

Trigonidium obtusum Lindley (Orchidaceae: Maxillariinae), é uma orquídea terrestre polinizada por machos de *Plebeia droryana* (Meliponinae).

Trigonidium turbinatum Reichenbach f. é uma orquídea encontrada na região Amazônica, na América Central, na região da cidade do Panamá e na Zona do Canal e difere de *T. obtusum* pela coloração arroxeada de suas folhas. Já *Trigonidium egertonianum* Bateman ex Lindley foi encontrada no México, Guatemala, Belize, El Salvador, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Columbia e Equador, suas flores possuem um detalhe azulado.

As flores destas espécies apresentam aroma muito suave, quase imperceptível ao olfato humano e que persiste por poucas horas, cessando após a polinização, quando cessa também a visita do polinizador.

Observando os cromatogramas obtidos dos voláteis dessas espécies (C 3) pode-se perceber que a fragrância floral de *T. turbinatum* possui um maior número de componentes, onde temos compostos distribuídos por todo o cromatograma enquanto na fragrância de *T. obtusum* encontramos apenas dois compostos e em *T. egertonianum* há uma série de compostos concentrados no início do cromatograma.



C 3. Cromatogramas de íons totais da fragrância floral de *Trigonidium cf turbinatum*, *T. obtusum* e *T. egertonianum*, obtido por headspace dinâmico, em coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Tabela 3. Composição química dos voláteis florais emitidos por *Trigonidium obtusum* (TO), *T. turbinatum* (TT) e *T. egertonianum* (TE).(*= identificação pela biblioteca Wiley 275 com confiabilidade maior que 95%).

Compostos	Ir _c	Ir _i	TT %	TO%	TE%
β -pineno	983	981	1,0	-	-
6-metil-5-hepten-2-ona	989	985	7,6/TT1	-	1,5
mesitileno	994	994	1,0	-	24,5 TE1
<i>n</i> -decano	999	1000	-	-	4,5
<i>n</i> -octanal	1005	1001	3,6/ TT2	-	1,4
1,2,4-trimetil benzeno	1020	1023	-	-	9,1/TE2
<i>p</i> -cimeno	1023	1026	0,6	-	2,5
limoneno	1036	1031	6,8	-	2,5
1,2-dietil benzeno*	1047	-	-	-	6,0/ TE3
<i>trans</i> - β -ocimeno	1054	1050	0,5	-	-
1-etil-2,3-dimetil benzeno*	1056	-	-	-	11,3/ TE4
acetofenona	1073	1065	0,4	-	-
<i>n</i> -undecano	1099	1100	-	-	7,8/ TE5
<i>n</i> -nonanal	1103	1098	11,1/ TT3	12,6	-
naftaleno	1182	1179	0,5	-	-
<i>n</i> -dodecano	1200	1200	-	-	1,7
<i>n</i> -decanal	1206	1204	18,3/ TT4	-	5,7/ TE6
δ -elemeno	1338	1339	0,1	-	-
α -cubebeno	1350	1351	0,1	-	-
α -ialangeno	1371	1372	0,4	-	-
α -copaeno	1375	1376	11,0/TT5	-	-
β -elemeno	1392	1391	0,4	-	-
<i>n</i> -tetradecano	1400	1399	1,1	-	-
<i>cis</i> - α -bergamoteno	1416	1415	0,4	-	-
aloaromadendreno	1461	1461	1,7	-	-
γ -muroleno	1477	1477	1,0	-	-
germacreno D	1480	1480	1,1	-	-
<i>ar</i> -curcumeno	1484	1483	1,6	-	-
<i>trans</i> - β -ionona	1480	1485	0,3	-	-
pentadecano	1500	1500	-	87,3	-
α -muroleno	1501	1499	2,8	-	-
2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol	1514	1512	2,5	-	6,7 TE7
δ -cadineno	1524	1524	12,0/ TT6	-	-
α -calacoreno	1544	1542	0,8	-	-
1- <i>epi</i> -cubenol	1628	1627	0,1	-	-
não identificados			10,9	0,1	14,8
TOTAL			100,0	100,0	100,0

Em *T. turbinatum* (Tabela 3) predominam os aldeídos *n*-nonanal e *n*-decanal, além dos hidrocarbonetos insaturados α -copaeno e δ -cadineno e também a cetona 6-metil-5-hepten-2-ona, em *T. obtusum* é possível identificar o hidrocarboneto saturado pentadecano que está ausente nos demais voláteis e *n*-nonanal. Já em *T. egertonianum* predominam compostos aromáticos, como 1-etil-2,3-dimetil benzeno (E 4, pg. 152), 1,2-dietil benzeno (E 3, pg. 152), mesitileno, 1,2,4-trimetil benzeno e 2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol (Tabela 3). Estes resultados demonstram um padrão totalmente distinto entre as espécies, apesar de pertencerem ao mesmo gênero. O que pode ser explicado pela alta similaridade morfológica entre as flores que adotam como estratégia a produção de fragrâncias diferentes para poder selecionar o polinizador⁹⁰.

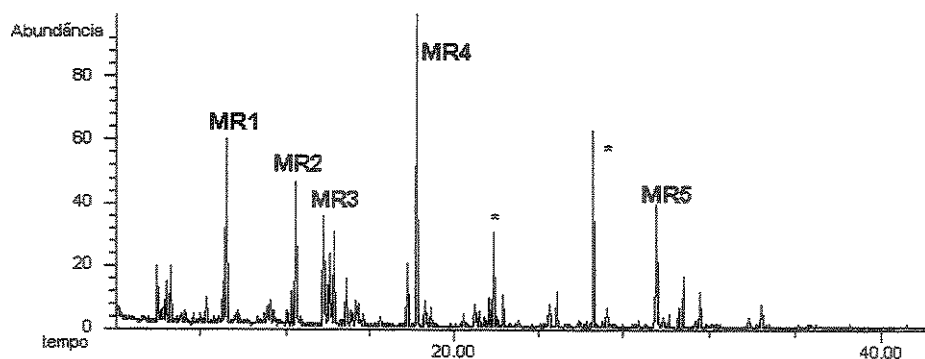
d) Fragrância floral de *Mormolyca ringens* (Lindley) Schlechter

Esta orquídea é epífita e foi descrita em 1849 por John Lindley como *Trigonidium ringens* e transferida para *Mormolyca ringens*, por R. Schlechter em 1914. Essa espécie produz inflorescências na base de seus pseudobulbos possuindo cada inflorescência uma única flor. Estas possuem um leve aroma e são polinizadas por machos de abelhas sem ferrão de duas espécies: *Nannotrigona testaceicornis* e *Scaptotrigona postica* (Meliponinae).

Buscando determinar a constituição química realizamos a coleta da fragrância de três flores de *Mormolyca ringens* (ESA 7247) pelo método de coleta dinâmica. Em C 4 podemos ver o cromatograma de íons totais obtidos através da análise desta fragrância por CG-EM.

A análise dos índices de retenção de Kovat's e dos espectros de massas, e estes comparados aos da biblioteca Willey²⁷⁵ permitiram a identificação de uma série de compostos que fazem parte dos voláteis emitidos pela flor (Tabela 4).

⁹⁰ Dressler, R.L., *Rev. Biol.Trop.*, **1968**, 15,143.



C 4. Cromatograma de íons totais obtido da fragrância floral de *M. ringens* utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Tabela 4 Composição da fragrância floral de *Mormolyca ringens*. * = índice de similaridade superior a 95%.

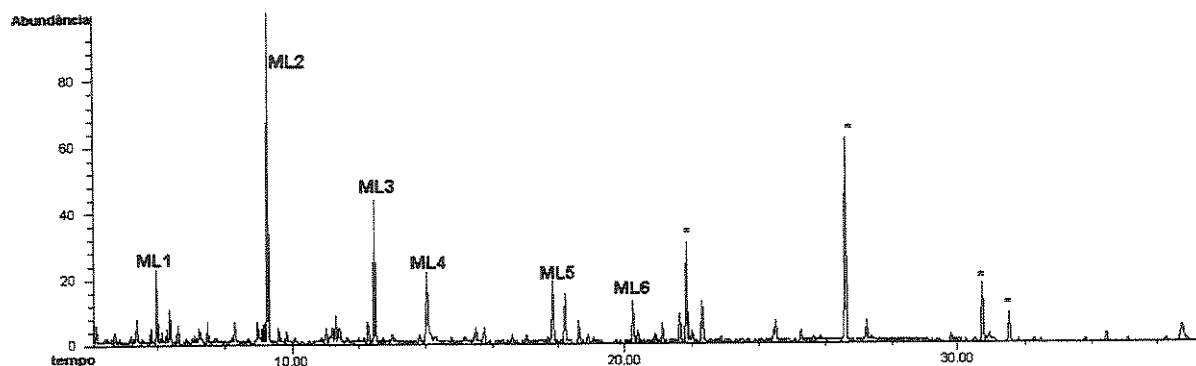
Compostos	Ir_c	Ir_i	(%)/n° do C 4
6-metil-5-hepten-2-ona	989	985	2,7
<i>n</i> -octanal	999	1001	2,9
alcool benzílico	1034	1032	0,8
<i>cis</i> -arbusculona	1051	1052	1,1
<i>n</i> -octanol	1071	1070	2,3
<i>n</i> -undecano	1100	1100	2,5
<i>n</i> -nonanal	1104	1102	10,0/MR1
butirato de <i>n</i> -hexila	1188	1192	1,1
<i>n</i> -dodecano	1199	1199	1,4
<i>n</i> -decanal	1205	1204	7,4/MR2
3-etil acetofenona*	1262	-	6,2/MR3
4-etil acetofenona*	1281	-	3,0
α -copaeno	1374	1376	3,1
<i>n</i> -hexanoato de <i>n</i> -hexila	1386	1383	18,0/MR4
não identificado	1399	-	1,5
<i>n</i> -dodecanal	1409	1407	1,4
aloaromadendreno	1458	1461	0,5
γ -muroleno	1476	1477	1,7
<i>ar</i> -curcumeno	1484	1483	1,2
α -muroleno	1501	1499	0,7
γ -cadineno	1513	1513	1,1
<i>cis</i> -calameneno	1522	1521	3,0
miristato de isopropila*	1817	-	1,0
tetradecanol*	1820	-	1,7
não identificados	-	-	13,7//MR5
TOTAL			100.0

e) Análise de fragrâncias florais de outras espécies do gênero *Maxillaria*

Buscando avaliar se existe um padrão de constituição de voláteis na subtribo Maxillariinae foram avaliadas fragrâncias de outras espécies do gênero *Maxillaria*: *M. leucaimata*, *M. rufescens*, *M. jenischiana*, *M. oroleuca*, *M. alba*, *M. barbosae*, *M. tenuifolia*.

Maxillaria leucaimata Barbosa Rodrigues

Maxillaria leucaimata é uma orquídea epífita brasileira encontrada nos estados do Amazonas, Pará, Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais. Não possui recompensas florais. É polinizada por abelhas sem ferrão do gênero *Trigona* que ficam sobrevoando as flores em enxames, segundo o Dr. Rodrigo Singer (comunicação pessoal), elas parecem ser atraídas por uma espécie de "feromônio de agregação", pois ficam vários dias sobrevoando a mesma. A análise dos voláteis (C 5 e Tabela 5) mostra os aldeídos *n*-nonanal, *n*-decanal e *p*-anisaldeído como constituintes principais, além de uma série de outros compostos.



C 5. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de *Maxillaria leucaimata* utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

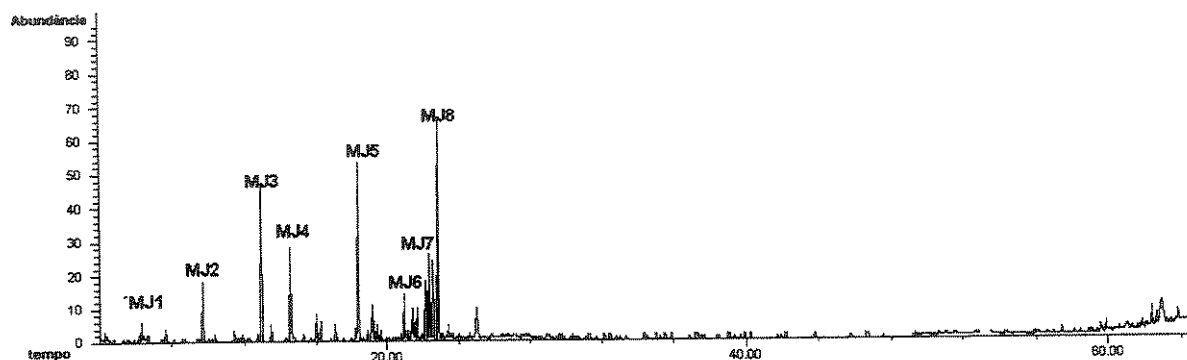
Tabela 5. Composição química da fragrância floral de *M. leucaimata*.

Composto	Ir _c	Ir _i	<i>M.</i> <i>leucaimata</i> %/ n° no C 5
α -pineno	936	939	0,6
benzaldeído	960	961	1,9
6-metil-5-hepten-2-ona	989	985	4,2/ML1
mesitileno	995	994	0,9
<i>n</i> -octanal	1003	1001	2,0
limoneno	1028	1031	0,3
álcool benzílico	1035	1032	1,3
fenil acetaldeído	1043	1043	1,2
<i>n</i> -undecano	1099	1100	1,1
<i>n</i> -decano	1000	1000	0,3
<i>n</i> -nonanal	1104	1102	19,6/ML2
álcool fenil etílico	1114	1110	1,4
acetato de <i>m</i> -cresol	1165	1163	1,1
mentol	1174	1173	1,9
naftaleno	1182	1179	0,4
diidro-carveol	1190	1192	0,2
<i>n</i> -dodecano	1200	1200	1,5
<i>n</i> -decanal	1206	1204	9,5/ML3
<i>p</i> -anisaldeído	1252	1252	7,4/ML4
<i>n</i> -tridecano	1300	1299	1,5
<i>n</i> -undecanal	1307	1306	1,1
α -cubebeno	1350	1351	0,7
α -copaeno	1375	1376	0,7
acetato de geranila	1385	1383	3,5/ML5
<i>n</i> -tetradecano	1400	1399	0,1
dodecanal	1408	1407	0,7
acetona de geranila	1454	1453	3,0/ML6
aloaromadendreno	1460	1461	1,0
γ -muroleno	1476	1477	0,8
6-metil- γ -(<i>E</i>)-ionona	1479	1479	0,3
<i>ar</i> -curcumeno	1483	1483	1,2
α -muroleno	1500	1499	2,0
γ -cadineno	1513	1513	0,8
<i>cis</i> -calameneno	1523	1521	3,3
α -calacoreno	1544	1542	0,2
heptadecano	1699	1700	1,5
não identificados			8,6
TOTAL			100,0

***Maxillaria jenischiana* (Reichenbach f.) Schlechter**

Enquanto as outras espécies de *Maxillaria* que estudamos possuem aromas agradáveis, lembrando mel, chocolate, baunilha, *Maxillaria jenischiana* possui aroma desagradável lembrando a alguns, chulé, a outros, roupa suja. É encontrada na Venezuela, Equador, Brasil (MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RO).

A análise da fragrância floral (C 6 e Tabela 6) revelou uma série de compostos e como componentes principais os aldeídos *n*-decanal e *p*-anisaldeído, além dos hidrocarbonetos insaturados α -copaeno e δ -cadineno. Um organossulfurado: 3-metil-tio-1-hexanol foi encontrado na análise o que poderia justificar o aroma desagradável da flor.



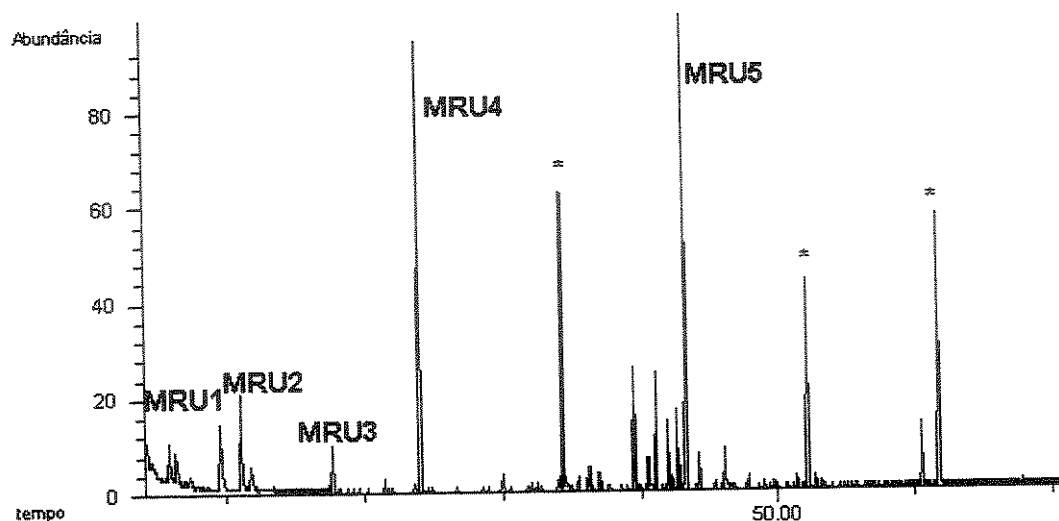
C 6. Cromatograma de íons totais obtido da fragrância de *Maxillaria jenischiana* utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Tabela 6. Composição química dos voláteis florais de *M. jenischiana*.

Composto	Ir _c	Ir _i	<i>M. jenischiana</i> %
6-metill-5-hepten-2-ona	989	985	2,4/MJ1
<i>n</i> -octanal	1005	1001	0,4
<i>p</i> -cimeno	1032	1026	0,5
acetofenona	1073	1065	0,3
<i>n</i> -nonanal	1106	1098	3,6/MJ2
álcool fenil etílico	1114	1110	0,2
mentol	1174	1173	0,3
naftaleno	1182	1179	0,4
3-metiltio-1-hexanol	1203	1203	0,5
<i>n</i> -decanal	1206	1204	10,0/MJ3
<i>p</i> -anisaldeído	1252	1252	8,6/MJ4
δ -elemeno	1338	1339	0,1
α -cubebeno	1350	1351	0,2
α -ialangeno	1371	1372	0,2
α -copaeno	1375	1376	13,6/MJ5
β -elemeno	1392	1391	0,8
<i>n</i> -tetradecano	1400	1399	0,1
α -gurjuneno	1410	1409	0,1
<i>cis</i> - α -bergamoteno	1416	1415	1,0
<i>trans</i> -cariofileno	1419	1418	0,1
β -gurjuneno	1432	1432	0,2
aromadendreno	1443	1439	0,2
acetona de geranila	1456	1453	0,3
aloaromadendreno	1461	1461	3,6
γ -muroleno	1477	1477	0,1
germacreno D	1480	1480	0,1
<i>ar</i> -curcumeno	1484	1483	3,0
<i>trans</i> - β -ionona	1480	1485	0,1
α -selineno	1495	1494	0,7
α -muroleno	1501	1499	4,6/MJ6
2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol	1514	1512	5,3/MJ7
δ -cadineno	1524	1524	18,6/MJ8
α -calacoreno	1544	1542	1,7
não identificados			16,5
TOTAL			100,0

***Maxillaria rufescens* Lindley**

Maxillaria rufescens é encontrada na Guatemala, Belize, Honduras, Costa Rica, Panamá, Trinidad, nas Guianas, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e no Brasil (AC, AM, BA, ES, RJ, SP, PR, SC, RS, MG) chama a atenção por seu aroma que lembra baunilha, no entanto na análise de seus voláteis não encontramos em sua composição a vanilina. Foram identificados como componentes principais o *n*-decanal, α -copaeno e δ -cadineno (C 7 e Tabela 7).



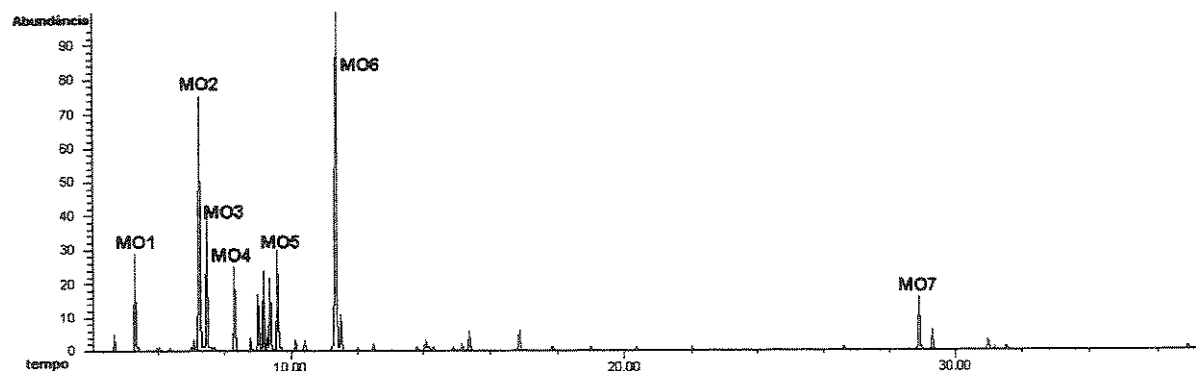
C 7. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de *Maxillaria rufescens* utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Tabela 7. Constituição química dos voláteis florais de *M. rufescens*.

Composto	Ir _c	Ir _i	<i>M. rufescens</i> %/ n° no C 7
benzaldeído	960	961	5,3/MRU1
6-metil-5-hepten-2-ona	989	985	4,0
<i>n</i> -nonanal	1106	1098	2,4
<i>n</i> -decanal	1206	1204	21,8/MRU2
α -copaeno	1375	1376	13,0/MRU3
β -elemeno	1392	1391	0,5
<i>cis</i> - α -bergamoteno	1416	1415	0,7
aromadendreno	1443	1439	2,8
acetona de geranila	1456	1453	5,5
germacreno D	1480	1480	1,2
<i>ar</i> -curcumeno	1484	1483	5,1
α -muroleno	1501	1499	2,9
δ -cadineno	1524	1524	28,0/MRU4
α -calacoreno	1544	1542	1,6
não identificados			5,2
TOTAL			100,0

***Maxillaria oroleuca* Loddiges ex Lindley**

Esta orquídea encontra-se distribuída no Equador e no Brasil (ES, RJ, SP, PR, SC e MG). Apresenta grande quantidade de flores de características diferentes das demais, sendo brancas com traços em laranja.



C 8. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância de *Maxillaria oroleuca* utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Tabela 8 Composição dos voláteis florais de *M. ocroleuca*.

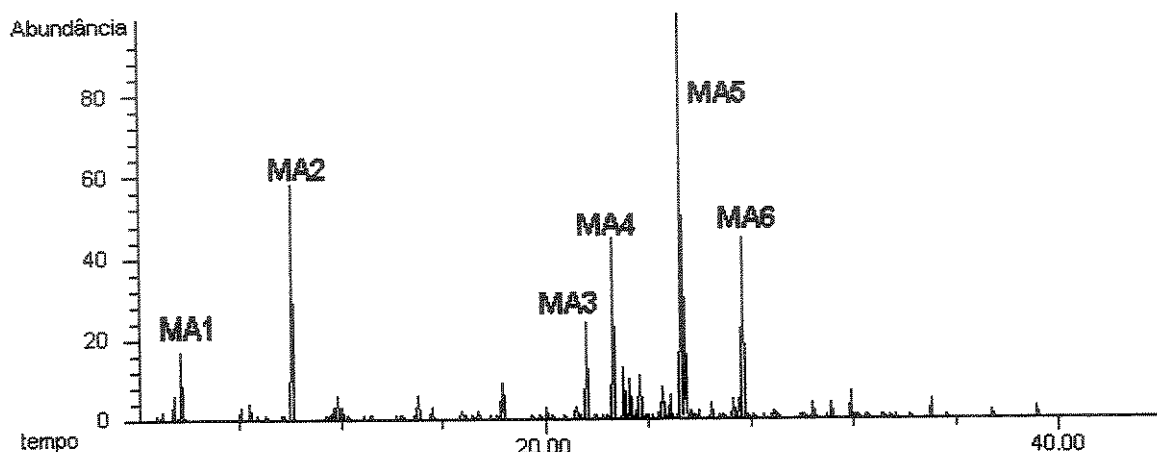
Composto	Ir _c	Ir _i	<i>M. ocroleuca</i> % ^o no C 8
α-pineno	928	939	0,7
benzaldeído	960	961	4,9/MO1
6-metil-5-hepten-2-ona	989	985	0,1
limoneno	1036	1031	0,2
1,8-cineol	1029	1033	0,4
álcool benzílico	1036	1032	18,6/MO2
acetofenona	1073	1065	7,1/MO3
óxido de <i>cis</i> -linalol	1071	1074	4,4/MO4
óxido de <i>trans</i> -linalol	1091	1088	0,7
linalol	1102	1098	4,3/MO5
benzoato de metila	1095	1091	3,4
<i>n</i> -nonanal	1106	1098	0,7
álcool fenil etílico	1114	1110	6,5
epoxilimoneno	1138	1139	26,1/MO6
<i>p</i> -anisaldeído	1252	1252	0,9
acetato de 2-fenil etila	1258	1256	0,3
3-etil acetofenona*	1263	-	0,3
4-etil-acetofenona*	1281	-	0,2
acetato de óxido de <i>trans</i> -linalol	1288	1285	0,3
α-copaeno	1375	1376	0,2
1,3,5-trimetoxi benzeno*	1411	-	0,2
<i>trans</i> -cariofileno	1419	1418	0,1
<i>trans</i> -β-farneseno	1457	1458	0,2
2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol	1514	1512	0,1
<i>cis</i> -calameneno	1523	1521	0,1
benzoato de benzila	1763	1762	4,0/MO7
não identificados			15,0
TOTAL			100,0

***Maxillaria alba* (Hook.) Lindl**

Espécie de *Maxillaria* encontrada na Guiana Francesa e no Brasil (estados do Mato Grosso do Sul e Goiás).

A análise de sua fragrância revelou a presença de uma série de compostos (C 9), entre os quais os ésteres: butanoato de butila, acetato de hexila, benzoato de metila, hexanoato de butila, butirato de benzila, salicilato de metila e caprilato de benzila (Tabela 9). Também foram identificados uma série de mono e

sesquiterpenos não oxigenados entre os quais: *trans*-ocimeno (11,9%), β -cariofileno (10,4%), *E,E*- α -farneseno (24,9%) e β -curcumeno (8,5%).



C 9. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de *Maxillaria alba* utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

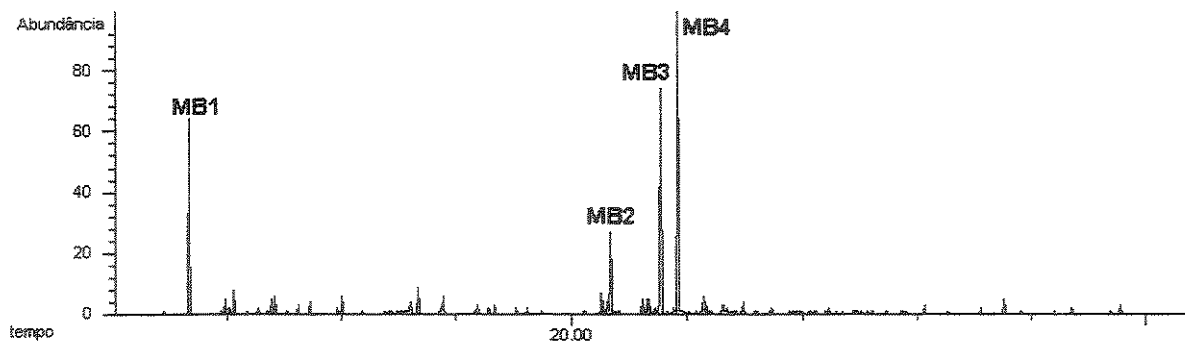
Tabela 9. Composição dos voláteis de *M. alba* *= índice de similaridade superior à 95% em relação à biblioteca Wiley275.

Composto	Ir _c	Ir _i	%/ n° no C 9
<i>n</i> -heptanol	873	867	0,3
2-heptanona	890	889	1,0
heptanal	900	899	2,9/MA1
6-metil-5-hepten-2-ona	982	985	0,5
<i>n</i> -butanoato de <i>n</i> -butila	994	993	0,8
<i>n</i> -octanal	1002	1001	0,1
acetato de <i>n</i> -hexila	1010	1008	0,2
limoneno	1028	1031	0,1
1,8-cineol	1032	1033	0,2
<i>cis</i> - β -ocimeno	1035	1040	0,2
<i>trans</i> - β -ocimeno	1045	1050	11,9/MA2
óxido de <i>trans</i> -linalol	1086	1088	0,3
2-nonanona	1089	1091	0,2
benzoato de metila	1093	1091	0,8
linalol	1098	1098	1,5
<i>n</i> -nonanal	1104	1102	0,6
álcool fenil etílico	1110	1110	0,2
<i>trans</i> -óxido de linalol	1138	1139	0,3
<i>n</i> -hexanoato de <i>n</i> -butila	1189	1188	0,1
salicilato de metila	1190	1190	2,2
<i>n</i> -decanal	1205	1204	0,8
<i>E</i> -ocimenona	1241	1239	0,2
antranilato de metila	1337	1337	0,1
butirato de benzila	1345	1345	0,1
α -cubebeno	1351	1351	0,2
α -copaeno	1375	1376	0,7
caprilato de benzila	1387	-	5,9/MA3
β -cariofileno	1419	1418	10,4/MA4
γ -elemeno	1432	1433	3,2
aromadendreno	1439	1439	2,5
acetona de geranila	1445	1443	0,6
<i>trans</i> - β -farneseno	1455	1458	2,9
γ -curcumeno	1477	1480	0,9
<i>ar</i> -curcumeno	1481	1483	2,1
α -zingibereno	1492	1495	1,4
<i>E,E</i> - α -farneseno	1506	1508	24,9/MA5
β -curcumeno	1510	1512	8,5/MA6
δ -cadineno	1525	1524	0,4
<i>cis</i> -calameneno	1532	1532	1,0
dendrolasina	1572	1574	1,1
<i>trans-trans</i> -farnesal	1735	1735	1,8
não identificados			5,9
TOTAL			100,0

***Maxillaria barbosa* Loefgren ex Porto Faria**

Maxillaria barbosa possui um aroma pouco acentuado e é encontrada nos estados de SP e RJ.

Através da análise do C 10 podemos verificar quatro componentes principais, que foram identificados como sendo o monoterpene não oxigenado α -pineno e os sesquiterpenos não oxigenados dauceno, bergamoteno e farneseno.



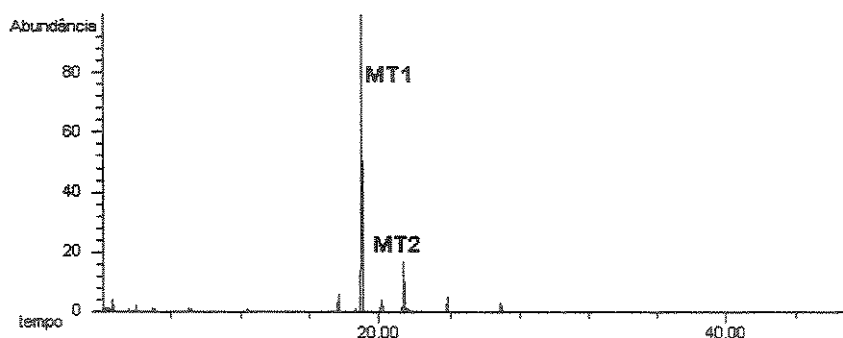
C 10. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de *M. barbosa* utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Tabela 10. Composição da fragrância floral de *M. barbosae*.

Composto	Ir _c	Ir _i	<i>M. barbosae</i> %/nº no C 10
<i>n</i> -heptanal	901	899	0,3
α -pineno	938	939	12,5/MBA1
sabineno	971	976	0,2
β -pineno	977	980	1,1
6-metil-5-hepten-2-ona	985	985	0,5
mirceno	988	991	1,7
<i>n</i> -octanal	1002	1001	0,3
<i>p</i> -cimeno	1024	1026	0,3
limoneno	1029	1031	1,0
1,8-cineol	1032	1033	1,4
<i>cis</i> - β -ocimeno	1045	1040	0,2
<i>trans</i> - β -ocimeno	1055	1050	0,6
<i>cis</i> -hidrato de sabineno	1069	1068	0,9
α -óxido de pineno	1098	1095	0,4
<i>n</i> -nonanal	1101	1102	1,4
álcool fenil etílico	1110	1110	0,1
3-nonen-1-ol	1152	-	0,2
terpin-4-ol	1180	1177	2,2
<i>n</i> -decanal	1205	1204	1,6
<i>E</i> -ocimenona	1239	1239	0,1
α -ialangeno	1369	1372	1,8
α -copaeno	1375	1376	1,1
dauceno	1378	1380	7,6/MBA2
β -burboneno	1383	1384	0,3
β -cubebeno	1387	1390	0,2
α - <i>cis</i> -bergamoteno	1412	1415	1,4
<i>trans</i> -cariofileno	1419	1418	1,9
γ -elemeno	1426	1433	0,6
α - <i>trans</i> -bergamoteno	1433	1436	21,4/MBA3
<i>trans</i> β -farneseno	1452	1458	28,4/MBA4
germacreno D	1480	1480	1,8
<i>E,E</i> - α -farneseno	1505	1508	1,7
β -bisaboleno	1508	1509	0,7
δ -cadineno	1512	1513	0,1
7- <i>epi</i> - α -selineno	1517	1517	0,3
<i>cis</i> -calameneno	1521	1521	0,1
<i>trans</i> - γ -bisaboleno	1526	1533	1,8
α -calacoreno	1540	1542	0,1
óxido de cariofileno	1581	1581	0,3
não identificados			1,5
TOTAL			100,0

***Maxillaria tenuifolia* Lindl.**

Maxillaria tenuifolia é originária do México e Nicarágua, apresenta um aroma muito acentuado, lembrando côco. A fragrância apresentou como constituinte principal o *trans*-cariofileno. Também foi identificada uma lactona, a δ -decalactona (Tabela 11), que possui as características aromáticas de côco.



C 11. Cromatograma de íons totais, obtido da fragrância floral de *Maxillaria tenuifolia* utilizando coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 290°C a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Tabela 11. Composição química da fragrância floral de *M. tenuifolia*.

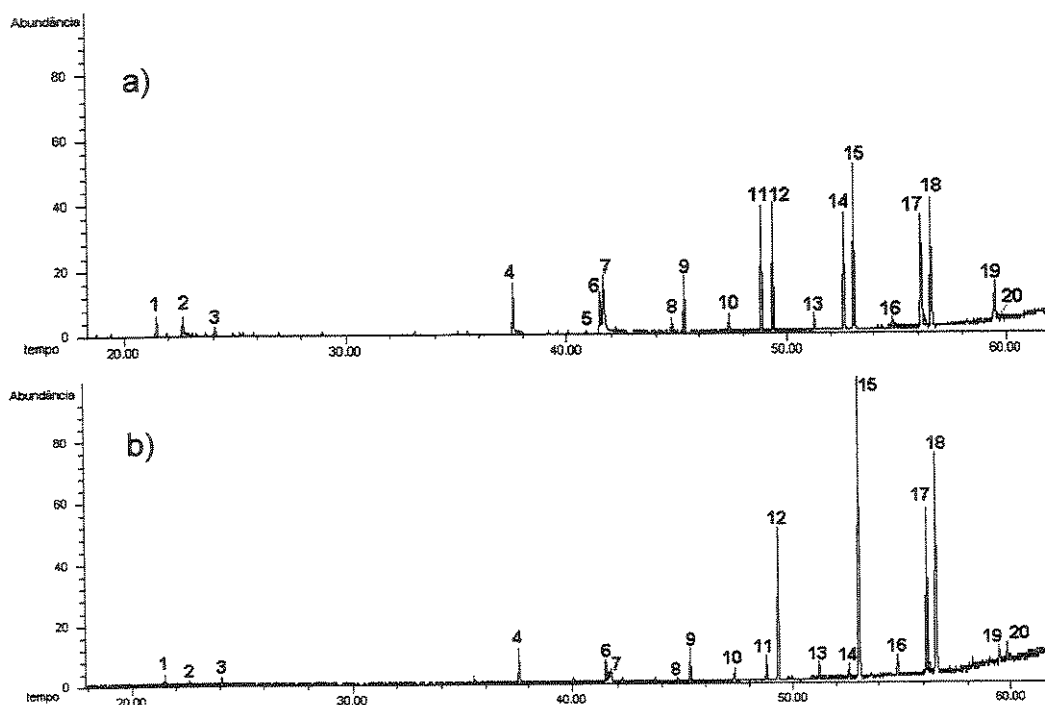
Composto	Ir _c	Ir _i	% relativo
cumeno	930	926	0,2
α -pineno	942	939	1,3
sabineno	975	976	0,3
β -pineno	977	980	0,5
mirceno	990	991	1,0
limoneno	1030	1031	0,4
1,8-cineol	1032	1033	0,3
<i>n</i> -undecano	1099	1099	0,4
<i>n</i> -nonanal	1102	1102	0,6
<i>n</i> -decanal	1203	1204	0,3
α -copaeno	1373	1376	3,3
<i>cis</i> -cariofileno	1402	1404	0,5
<i>trans</i> -cariofileno	1415	1418	68,7/MT1
acetona de geranila	1448	1453	2,3
δ -decalactona	1492	1493	12,5/MT2
óxido de cariofileno	1577	1581	3,8
não identificados			3,6
TOTAL			100,0

2.3.2 Química da polinização em *Maxiillariinae* através de mimetismo sexual

Neste estudo nós seguimos a metodologia descrita para as orquídeas do gênero *Ophrys* que se baseia no estudo dos extratos hexânicos da flor e sua comparação com extratos de rainhas virgens da espécie que poliniza a mesma.

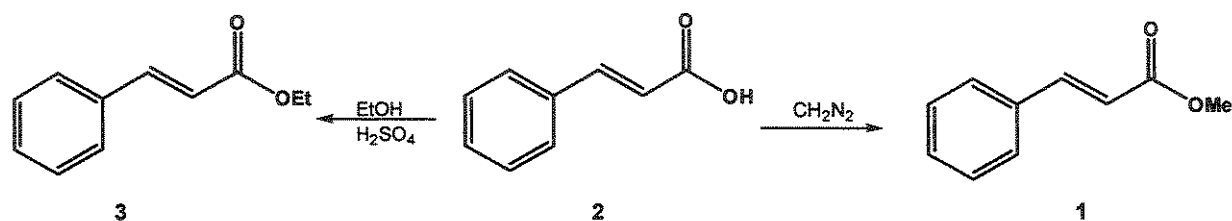
2.3.2.1 Análise dos extratos hexânicos de *Mormolyca ringens*

Foram preparados extratos hexânicos de flores de *Mormolyca ringens* não polinizadas e polinizadas, correspondendo a sua fase atrativa e não atrativa para os polinizadores. Estes extratos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (C 12a e C 12b, respectivamente).



C 12. Cromatogramas de íons totais do extrato de *Mormolyca ringens* não polinizada (a) e polinizada (b). Condições da análise: coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 310°C(20 min), 4°C/min, 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Podemos verificar nos cromatogramas diferenças significativas, principalmente em **11**, **14** e **19**, além do desaparecimento de **5** no extrato da flor polinizada. Realizamos inicialmente a análise dos espectros de massa a fim de identificar os componentes desta mistura. Assim, para **1**, **2**, **3** foram obtidos os espectros de massas com íons moleculares m/z 162, 147 e 176 (E 10, pg.154), respectivamente, com base na fragmentação foi sugerido que os mesmos poderiam ser correspondentes ao cinamato de metila, ácido cinâmico e cinamato de etila, respectivamente. Para confirmarmos as estruturas foram obtidos os dois ésteres de maneira sintética. O cinamato de metila foi obtido pela simples metilação do ácido cinâmico com diazometano e o cinamato de etila foi obtido pela esterificação do mesmo reagente com etanol em meio ácido (Esquema 1), a obtenção destes padrões foi checada pelo seu espectro de massas e RMN de ^1H (E 11, pg. 155 e E 12, pg.155). Para confirmar a presença destes compostos nos extratos realizou-se a injeção do extrato com reforço destes padrões.



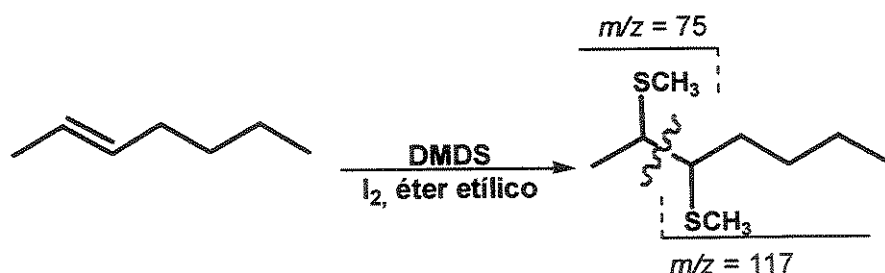
Esquema 1. Reações de obtenção dos padrões de cinamato de metila(**1**) e cinamato de etila (**3**) através de ácido cinâmico (**2**).

Os compostos do C 12 correspondentes aos números: **6**, **7** apresentaram como íons moleculares m/z 256, 280 e foram identificados através da injeção com reforço dos padrões de ácido palmítico e ácido linoleico. Avaliamos os compostos **9**, **10**, **12**, **13**, **15**, **16**, **18** e **20** que apresentaram íons moleculares m/z 324, 338, 352, 366, 380, 394, 408 e 436, respectivamente. Estes compostos apresentaram uma seqüência de fragmentação com picos afastados uns dos outros por 14 unidades de massas, onde o maior pico de cada aglomerado corresponde a um fragmento $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, geralmente acompanhado dos fragmentos C_nH_{2n} e $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ que possuem menor intensidade. Nestes espectros os picos mais intensos

correspondem a C₃ e C₄ e suas intensidades vão diminuindo gradativamente (E 13, pg.156). Esta fragmentação é coerente com *n*-alcanos⁹¹, que foram confirmados através de comparação com padrões.

Os compostos nº 8, 11, 14, 17 e 19 foram identificados como *n*-alcenos através da análise do padrão de seus espectros de massas. No entanto a posição da dupla ligação não pode ser determinada pela simples análise dos espectros de massas destes compostos.

Há na literatura^{92,93} uma metodologia adequada para determinar a posição da dupla ligação através de reações de derivatização com dimetildissulfeto e iodo, reação esta representada pelo Esquema 2. Esta metodologia se mostrou adequada, pois pode ser utilizada para extratos, fornecendo os produtos com alto rendimento, alta estereosseletividade e sem formação de produtos laterais que possam afetar as análises. Os produtos formados através da inserção de grupos -SCH₃, nos carbonos da dupla ligação, apresentam uma fragmentação característica na espectrometria de massas com a clivagem na ligação C-C entre os dois grupos -SCH₃ formando assim dois íons de alta intensidade que permitem assim a determinar a posição da dupla .



Esquema 2. Reação de derivatização com DMDS e I₂ e sua fragmentação característica.

Assim para o composto nº 11 que apresentou íon molecular *m/z* 350 que sugeria a fórmula molecular C₂₅H₅₀. Após a reação com dimetildissulfeto o espectro de massas do derivado apresentou íon molecular com *m/z* 444, com os

⁹¹ Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C.; *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, Editora Guanabara Koogan S.A., quinta edição, p.14, 1994.

⁹² Francis, G.W.; Veland, K.; *J. Chromatography* 1981, 219, 379.

⁹³ Buser, H-R.; Arn, H.; Guerin, P.; Rauscher, S.; *Anal. Chem.* 1983, 55, 818.

fragmentos principais m/z 173 e 271, que permitiram identificar o composto como sendo o 9-pentacoseno (E 14, pg. 156).

O mesmo foi realizado para os demais *n*-alcenos, sendo possível desta maneira identificar como presentes na mistura: 9-tricoseno, 9-heptacoseno, 9-nonacoseno e 9-hentriaconteno através da análise de seus derivados dimetildissulfeto (E 15, pg. 157; E 16, pg. 158; E 17, pg. 158; E 18, pg. 158).

A presença destes componentes, principalmente de *n*-alcanos e *n*-alcenos, foi relatada no extrato hexânico de orquídeas do gênero *Ophrys* e no extrato de abelhas/vespas que realizam a polinização das mesmas.

Quanto à natureza biossintética dos hidrocarbonetos estes são produzidos a partir de ácidos graxos. Estes ácidos graxos tanto saturados (palmitico, esteárico), quanto insaturados (oleico, linoleico) são produzidos seguindo a rota do acetato, e todos contêm número par de carbonos. A partir destes, são produzidos os hidrocarbonetos saturados (provenientes dos ácidos saturados) e insaturados (provenientes dos ácidos insaturados) através da descarboxilação dos mesmos produzindo assim hidrocarbonetos de número ímpar de carbonos^{94, 95}.

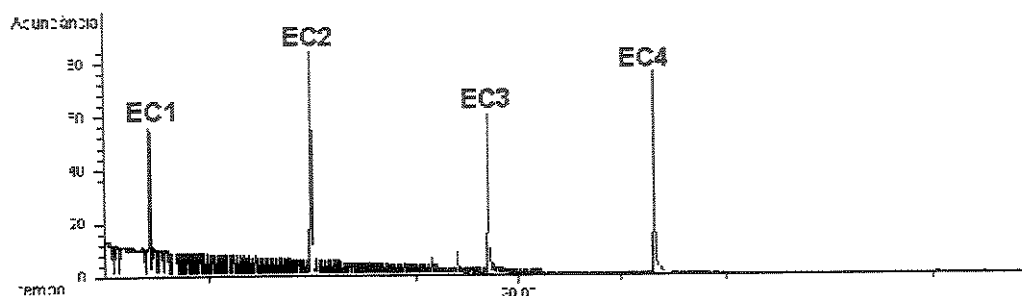
Análise dos constituintes de rainhas virgens de *Scaptotrigona postica*

Através da colaboração com o Prof. Dr. W.E. Kerr e de seu aluno Cristiano Menezes, especialistas em abelhas, da Universidade Federal de Uberlândia, que induziram a produção de rainhas *in vitro*, foi possível a obtenção de 10 rainhas virgens de *Scaptotrigona postica*. As mesmas foram resfriadas por 15 minutos em freezer a -10°C sendo posteriormente decapitadas. As cabeças foram maceradas e submetidas à extração com acetato de etila. O restante do corpo foi lavado com hexano, obtendo-se assim o extrato das ceras cuticulares do corpo.

⁹⁴ Samuels, A.L.; Kunst, L.; *Prog.Lipid Res.* **2003**, 42, 51.

⁹⁵ Reed, J.R.; Hernandez, P.; Blomquist, G.J.; Feyersen, R.; Reitz, R.C; *Insect Molecular Biology* **1996**, 26, 267.

A análise do extrato cefálico das rainhas virgens de *S. postica* através de CG-EM (C 13) permitiu identificar uma série de álcoois (E 20, pg. 159; E 21, pg. 159; E 22, pg. 159, E 23, pg. 160). A posição da hidroxila foi determinada como 2 devido ao pico com m/z 45 ($\text{CH}_3\text{-CH}^+\text{OH}$) resultante da clivagem na ligação C-C vizinha ao átomo de oxigênio.



C 13. Cromatograma de íons totais do extrato cefálico de rainhas virgens de *S. postica*. Condições da análise: coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm), temperatura do forno de 50°C a 310°C(20 min) a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Na Tabela 12 encontramos a composição química deste extrato. Estes já foram encontrados⁹⁶ em outras abelhas sem ferrão (Meliponinae) e confirmam que a rainha estava em sua fase mais atrativa.

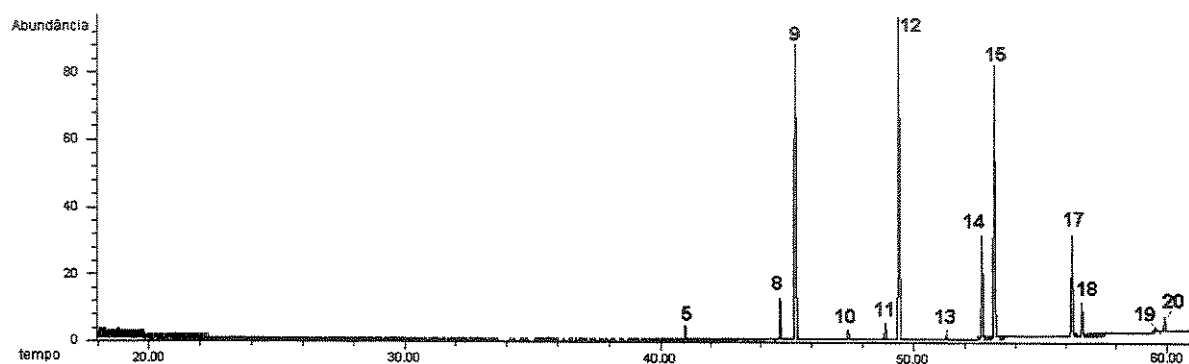
Tabela 12. Compostos identificados no extrato cefálico de *S. postica*.

Composto	% relativo/nº do C 13
2-heptanol	28,3/EC1
2-nonanol	25,6/EC2
2-undecanol	19,1/EC3
2-tridecanol	27,0/EC4
TOTAL	100,0

⁹⁶ Francke, W.; Lübke, G.; Schröder, W.; Reckziegel, A.; Fonseca, V.I.; Kleinert, A.; Engels, W.; Hartfelder, K.; Radtke, R.; Engels, W.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 562.

Partimos então para a análise do extrato expelido pelas glândulas de cera (Figura 11, pg. 23) também chamado de extrato cuticular. O extrato cuticular é citado como responsável pela proteção contra ressecamento da cutícula⁹⁷, no entanto outros estudos têm demonstrado que estes são semioquímicos importantes no reconhecimento sexual e para a reprodução⁹⁸ o que foi comprovado para os estudos com orquídeas do gênero *Ophrys*⁹⁹, já citado anteriormente.

Reduzimos o volume do extrato hexânico a poucos microlitros através de uma leve corrente de nitrogênio gasoso e 1µL foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Através do C 14 podemos verificar a semelhança no perfil com os cromatogramas obtidos para os extratos hexânicos de *M. ringens* não polinizada e polinizada.



C 14. Cromatograma de íons totais do extrato hexânico da cutícula de rainhas virgens de *Scaptotrigona postica*. Condições da análise: coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura do forno de 50°C a 310°C (20 min) a um gradiente de 4°C/min, com fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

Realizamos a identificação dos compostos utilizando o mesmo protocolo já descrito para os extratos de *M. ringens*. Através deste estudo detectamos que o extrato cuticular é menos complexo que o extrato da flor.

⁹⁷ Hadley, N.F.; *Am. Scient.* **1980**, *68*, 546.

⁹⁸ Howard, R.W.; Blomquist, G.J *Ann. Rev. Entomol.* **1982**, *27*, 149.

⁹⁹ Ayasse, M.; Schiestl, F.P.; Paulus, H.F.; Ibarra, F.; Francke, W.; *Proc. R. Soc. Lond.B*, **2003**, *270*, 517.

Cruzamento de dados

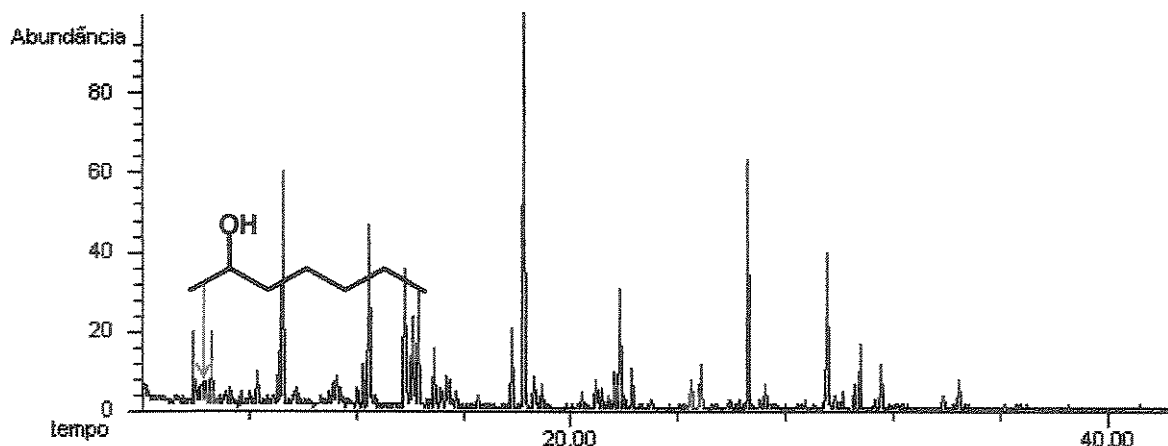
A Tabela 13 apresenta a constituição química dos extratos hexânicos de *M. ringens* polinizada e não polinizada e do extrato cuticular de rainhas virgens de *S. postica* com seus respectivos percentuais relativos. Compostos que estavam presentes em *M. ringens*, como: o ácido cinâmico e seus ésteres, os ácidos palmítico e linoleico, além do octadecadienal (E 19, pg. 159) não foram encontrados no extrato de *S. postica*. Os ácidos e ésteres são comuns em plantas e podem ter sido extraídos da flor e não ter qualquer relação com a polinização dos mesmos.

Observou-se a diminuição da concentração de 9-pentacoseno e 9-heptacoseno na flor polinizada, além do aumento de *n*-heptacosano e *n*-nonacosano, além de outras variações menores. Encontramos uma série de compostos em comum no extrato da flor e no extrato cuticular revelando um mimetismo em que a flor sintetiza os mesmos compostos encontrados na cutícula da rainha virgem, o que pode ser responsável pelo comportamento de cópula do macho sobre a mesma.

Levando em conta que os compostos voláteis podem ser levados pelo ar à longa distância enquanto os não voláteis só podem ser “sentidos” a curta distância, pode-se supor que os voláteis florais podem ser responsáveis pela atração a longa distância enquanto os compostos identificados no extrato da flor podem estar relacionados com o fenômeno da pseudocópula. Encontramos vários compostos em comum entre os extratos cuticulares da rainha virgem e dos extratos hexânicos florais, no entanto os voláteis florais não apresentaram, inicialmente, compostos coincidentes com os extratos cefálicos da rainha. Decidimos então fazer uma minuciosa busca através de extração de íons nas análises por coleta dinâmica, assim pudemos encontrar íons que podem corresponder ao 2- heptanol, nesta amostra (C 15).

Tabela 13. Composição química dos extratos hexânicos de *M. ringens* polinizada e não polinizada e do extrato hexânico da rainha virgem de *S. postica*.

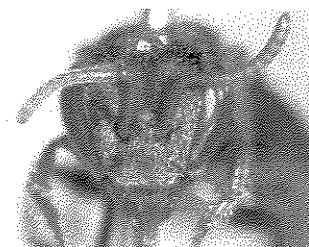
Nº do pico	Composto	Extrato hexânico da flor não polinizada	Extrato hexânico da flor polinizada	Extrato hexânico da cutícula da rainha virgem de <i>S. postica</i>	Método de identificação
1	cinamato de metila	1,35	1,00	-	EM, Padrão
2	ácido cinâmico	2,23	0,01	-	EM, Padrão
3	cinamato de etila	1,20	0,80	-	EM, Padrão
4	ácido palmítico	4,62	3,20	-	EM, Padrão
5	<i>n</i> -heneicosano	0,30	-	0,99	EM, padrão
6	ácido linoleico	3,50	2,61	-	EM, Padrão
7	octadecadienal	7,88	1,60	-	EM, biblioteca Wiley275 >95%
8	9-tricoseno	1,05	1,40	3,13	EM, derivatização com DMDS
9	<i>n</i> -tricosano	4,50	3,10	24,34	IR, EM, Padrão
10	<i>n</i> -tetracosano	1,36	1,11	0,68	IR, EM, Padrão
11	9-pentacoseno	10,20	2,02	1,34	EM, derivatização com DMDS
12	<i>n</i> -pentacosano	10,40	13,50	26,15	IR, EM, Padrão
13	<i>n</i> -hexacosano	1,21	1,60	0,66	IR, EM, Padrão
14	9-heptacoseno	9,70	1,15	7,99	EM, derivatização com DMDS
15	<i>n</i> -heptacosano	14,20	28,00	21,80	IR, EM, padrão
16	<i>n</i> -octacosano	1,25	2,02	-	IR, EM, padrão
17	9-nonacoseno	10,10	16,20	8,38	EM, derivatização com DMDS
18	<i>n</i> -nonacosano	11,40	20,10	2,65	IR, EM, Padrão
19	9-hentriaconteno	3,45	0,28	0,69	EM, derivatização com DMDS
20	<i>n</i> -hentriacontano	0,10	0,3	1,20	IR, EM, Padrão
TOTAL		100,0	100,0	100,0	



C 15. Cromatograma de íons totais dos voláteis obtidos por coleta dinâmica de *M. ringens* destacando o 2-heptanol, obtido por extração de íons.

Eletroantenografia

Buscando avaliar a capacidade de atração de machos de *Nannotrigona testaceicornis* por voláteis liberados pelas flores realizamos um experimento de eletroantenografia utilizando as antenas de machos desta espécie (detalhe da cabeça na fotografia ao lado) frente ao



extrato hexânico da flor de *Mormolyca ringens* e amostras de voláteis de flores frescas (sem terem sido polinizadas). Este trabalho foi realizado em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Arlene Corrêa (Departamento de Química Orgânica da UFSCar e responsável pelo aparelho de eletroantenograma).

Foram utilizados extratos e os solventes em que estes estavam dissolvidos, na Tabela 14 encontramos os resultados obtidos.

Tabela 14. Média (5 repetições) de alteração na corrente elétrica entre duas antenas de machos de *Nannotrigona testaceicornis* à diferentes amostras.

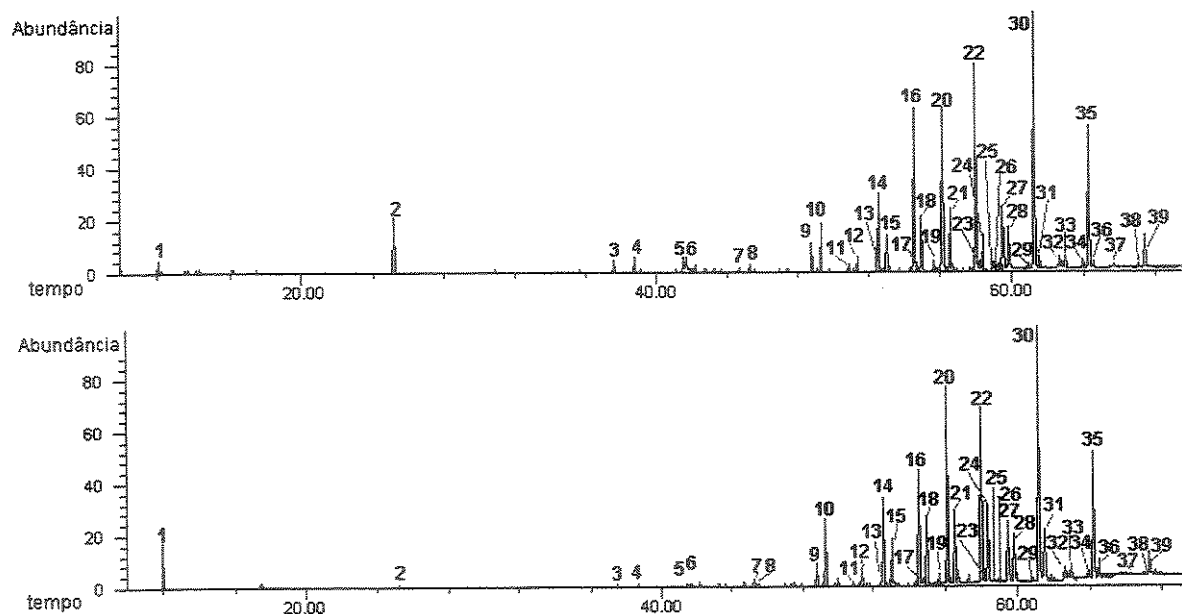
Amostra	Concentração	Quantidade submetida à análise	Varição de corrente obtida nas antenas da abelha
Hexano	100%	5 μ L	0,382 mV
Extrato hexânico da flor	1mg/mL	5 μ L	0,409 mV
Diclorometano	100%	5 μ L	0,489 mV
Extrato em diclorometano dos voláteis obtidos por <i>headspace</i> dinâmico	indeterminada	5 μ L	0,520 mV

Conforme podemos verificar, ambos os extratos apresentaram resposta à antena do macho de *Nannotrigona testaceicornis*. Realizamos apenas 5 experimentos devido a carência de machos vivos para a análise pois os mesmos são muito sensíveis e não resistem por muito tempo ao cativeiro. No entanto algumas observações importantes foram realizadas como o tempo de vida da antena que é de apenas de 15 min exigindo assim uma adequação do experimento a estas condições.

2.3.2.2 A pseudocópula em *Trigonidium obtusum* Lindl.

Buscando entender este fenômeno realizamos o mesmo estudo com *T. obtusum*. Realizamos também extração da flor com hexano antes e após a polinização e podemos verificar a diferença nos perfis em C 16.

O perfil dos compostos do extrato foi traçado com base nos espectros de massas. A identificação dos *n*-alcanos e *n*-alcenos foi realizada da mesma maneira que nos extratos de *Mormolyca ringens*. Assim identificamos os *n*-alcanos: pentadecano (2), tricosano (8), pentacosano (10), heptacosano (15), octacosano (17), nonacosano (21), triacontano (23) e hentriacontano (28) e os *n*-alcenos: 9-tricoseno (7), 9-pentacoseno (9), 9-heptacoseno (14), 9-nonacoseno (20), hentriacontadieno (25 e 26) e o 9-hentriaconteno (27).



C 16. Cromatogramas de íons totais, obtido do extrato da flor de *Trigonidium obtusum*: a) não polinizada; b) polinizada. Condições da análise: coluna HP5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do forno de 50°C a 310°C(20 min) a um gradiente de 4°C/min, com um fluxo constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

O perfil dos compostos do extrato foi traçado com base nos espectros de massas. A identificação dos *n*-alcanos e *n*-alcenos foi realizada da mesma maneira que nos extratos de *Mormolyca ringens*. Assim identificamos os *n*-alcanos: pentadecano (2), tricosano (8), pentacosano (10), heptacosano (15), octacosano (17), nonacosano (21), triacontano (23) e hentriacontano (28) e os *n*-alcenos: 9-tricoseno (7), 9-pentacoseno (9), 9-heptacoseno (14), 9-nonacoseno (20), hentriacontadieno (25 e 26) e o 9-hentriaconteno (27).

O pico 11 apresentou íon molecular m/z 450 e uma fragmentação inicial pela eliminação de 60 uma, que é característica de perda de uma molécula de ácido acético (CH_3COOH). O restante do espectro nos permite afirmar que o composto se trata de um composto de cadeia longa não ramificado e que tem a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{O}_2$. Realizamos a derivatização com dimetildissulfeto que forneceu como íons principais m/z 173 e m/z 371 (E 24, pg. 160) . Este

experimento permitiu que se determinasse a posição da dupla no carbono 9 contando-se a partir do carbono terminal. A posição do grupo acetila não pode ser determinada pelo espectro de massas.

O mesmo protocolo foi seguido para identificar o acetato de docosenila, acetato de tetracosenila, acetato de hexacosenila, acetato de triacontenila além do acetato de dotriacontenila, todos estes também apresentaram a dupla na posição 9 em relação ao carbono terminal (E 25, pg. 161).

A identificação de outros dois compostos (29 e 34) com íon molecular m/z 450 e 478, respectivamente, foi possível graças a sua fragmentação inicial onde houve a perda de 88 uma em ambos os compostos que foi atribuída pela a uma molécula de ácido butanóico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$) que com o reforço das demais fragmentações nos permitiram inferir as fórmulas moleculares $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{O}_2$ e $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_2$, respectivamente. A derivatização com dimetildissulfeto foi essencial para determinar as posições das duplas, sendo estes identificados como butirato de hexacosenila e butirato de octacosenila com a posição da dupla a 9 carbonos em relação ao carbono terminal do éster (E 26, pg. 162, E 27, pg. 162).

Como a quantidade de extrato disponível era pequena não foi possível o isolamento dos constituintes. Assim, para determinarmos a posição dos grupos acetila e butirila realizamos uma análise por RMN de ^{13}C , DEPT 135 e 90 (E 28, pg. 163) que mostrou 2 sinais de metilenos na região de carbonos carbinólicos em δ 63,54 e δ 65,11, caracterizando assim os grupos acetila e butirila como provenientes de álcoois primários.

A Tabela 15 contém a composição química dos extratos da flor polinizada e não polinizada. A determinação completa dos componentes não foi concluída devido à complexidade da amostra e sua massa reduzida que não nos permitiu utilizar nenhum método usual de separação cromatográfica, por outro lado, a coleta de uma maior quantidade de material não foi possível, pois as plantas são encontradas apenas em orquidários de Universidades que apresentam número reduzido de plantas cujas flores foram quase que totalmente coletadas para este estudo.

Podemos observar que ocorrem variações na concentração de vários compostos, entre eles o pentadecano e o 9-nonacoseno. Não foi possível realizar a comparação destes extratos com os extratos cefálicos e glândulas de cera, pois não foi possível a obtenção até o momento de rainhas virgens de *Plebeia droryana*.

Tabela 15. Composição química dos extratos da flor de *T. obtusum* polinizada e não polinizada.

Nº do pico	Composto	<i>T. obtusum</i> não polinizada	<i>T. obtusum</i> polinizada	Método de identificação
1	<i>n</i> -nonanal	0,47	1,84	IR e EM
2	<i>n</i> -pentadecano	2,46	0,08	IR, EM e padrão
3	ácido palmítico	0,85	0,190	IR, EM, padrão
4	ciclohexadecano	0,70	0,14	EM, Wiley275
5	ácido linoleico	1,03	0,20	IR, EM, padrão
6	não identificado	1,29	0,01	-
7	9-tricoseno	0,29	0,27	EM, derivatização
8	tricosano	0,31	0,36	IR, EM, padrão
9	9-pentacoseno	1,36	1,12	EM, derivatização
10	pentacosano	2,39	3,50	IR, EM, padrão
11	acetato de docos-13-enila	0,41	0,27	EM, derivatização
12	acetato de docosanila	0,77	1,00	EM
13	não identificado	1,19	0,62	-
14	9-heptacoseno	4,22	4,73	EM, derivatização
15	heptacosano	1,55	1,88	IR, EM, padrão
16	acetato de tetracos-15-enila	8,36	5,91	EM, derivatização
17	octacosano	0,32	0,31	IR, EM, padrão
18	não identificado	3,01	3,97	-
19	nonacosadieno	0,53	0,61	EM, derivatização
20	9-nonacoseno	10,33	4,33	EM, derivatização
21	nonacosano	3,23	11,90	IR, EM, padrão
22	acetato de hexacos-17-enila	11,46	10,16	EM
23	triacontano	0,53	0,77	IR, EM, padrão
24	não identificado	1,64	3,46	-
25	entriacontadieno(isômero 1)	0,12	0,18	EM
26	entriacontadieno (isômero 2)	0,20	0,40	EM

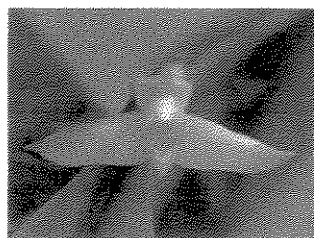
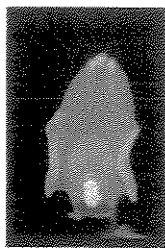
Continuação da Tabela 15				
27	9-hentriaconteno	5,26	5,60	IR, EM, padrão
28	hentriacontano	2,60	3,48	IR, EM, padrão
29	butirato de 17-hexacosenila	0,36	0,18	EM, derivatização
30	acetato de octacos-19-enila	15,76	15,18	EM, derivatização
31	não identificado	0,74	2,33	-
32	não identificado	1,19	0,75	-
33	não identificado	1,19	0,35	-
34	butirato de 19-nonacosenila	0,66	0,33	EM, derivatização
35	acetato de triacont-21-enila	8,80	7,84	EM, derivatização
36	não identificado	0,55	0,84	-
37	não identificado	0,37	0,44	-
38	não identificado	0,28	0,24	-
39	acetato de dotriacont-23-enila	2,20	1,92	EM, derivatização
40	não identificado	0,72	0,95	-
	TOTAL		100,0	

2.3.3 Estudo das recompensas florais de algumas espécies de Maxillariinae

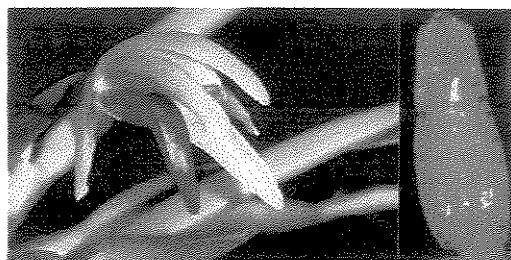
Na terceira parte deste capítulo propusemos a análise de recompensas encontradas no labelo de sete espécies de orquídeas, são elas: *Maxillaria cerifera*, *M. brasiliensis*, *M. friedrichsthalii*, *M. violaceo-punctata*, *M. valenzuelana*, *M. rufescens* e *M. villosa* (Figura 15).



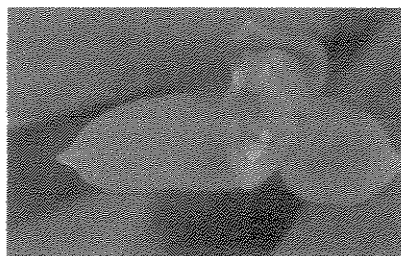
Maxillaria cerifera



Maxillaria brasiliensis



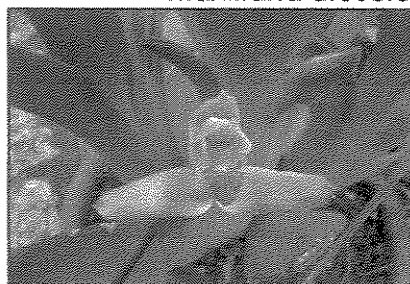
Maxillaria friedrichsthalii



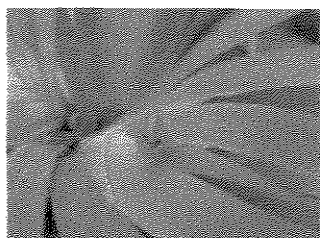
Maxillaria discolor



Maxillaria rufescens



Maxillaria violaceo punctata



Maxillaria valenzuelana

Figura 15. Espécies de Maxillariinae cujas recompensas florais foram estudadas.

Estas orquídeas apresentam secreções aparentes no labelo, na forma de cristais (*M. cerifera*), em forma de uma pasta (*M. brasiliensis*, *M. violaceo-punctata* e *M. valenzuelana*), ou de um líquido transparente viscoso (*M. friedrichsthali*). Em algumas espécies, entretanto, não estão expostas dentro de tricomas (*M. rufescens* e *M. villosa*) que são coletados pelas abelhas.

Adotamos uma metodologia padrão para a análise destas recompensas (Figura 16) que foi aplicada na análise das sete espécies de Maxillariinae estudadas.

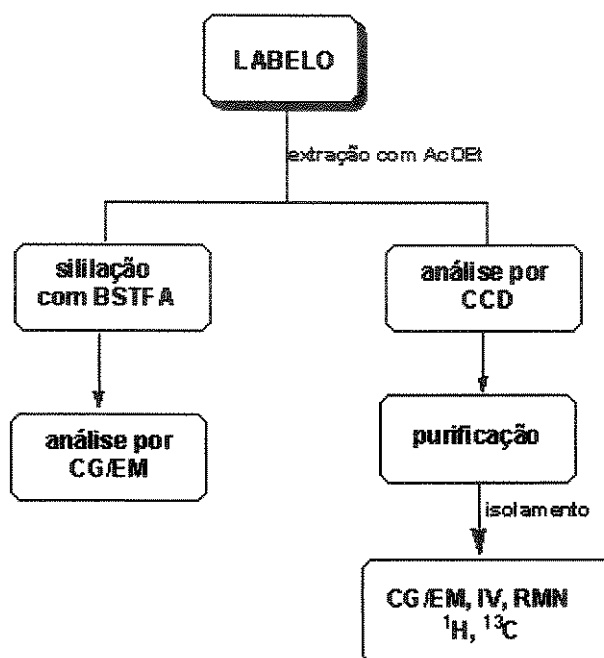
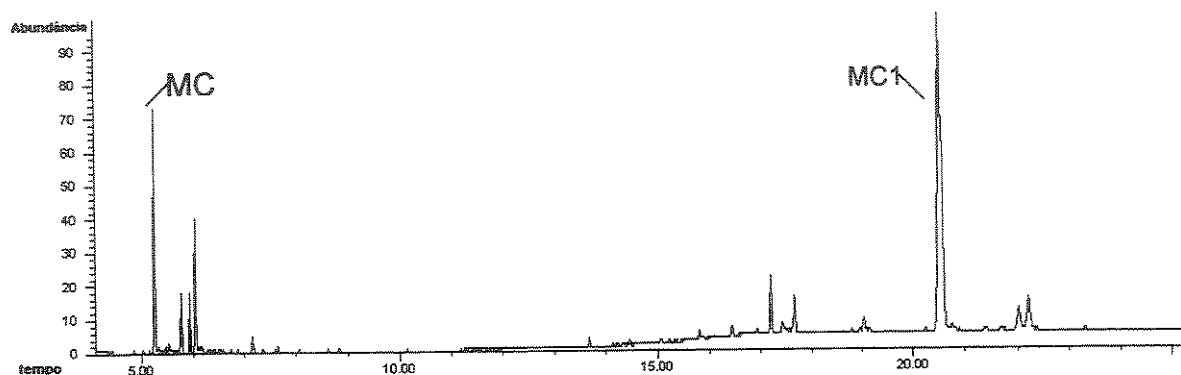


Figura 16. Metodologia padrão para análise de recompensas do labelo de Maxillariinae.

a) Análise da recompensa floral de *Maxillaria cerifera* Barbosa Rodrigues

Maxillaria cerifera possui cristais brancos em seu labelo e esses cristais são coletados ativamente por operárias, no entanto sabe-se que as abelhas coletam secreções de plantas que farão parte da estrutura do ninho e da própolis.

A recompensa de 45 flores foi extraída rapidamente com acetato de etila, filtrada e evaporada em rota-evaporador, 2 mg do extrato obtido foram sililados com *bis*-(trimetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA) e analisados por CG-EM (C 17).



C 17. Cromatograma de íons totais da recompensa de *M. cerifera* sililada com BSTFA, obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m) 150°C-310°C(15min) $r=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ inj. 260°C, $f=1\text{mL}/\text{min}$.

Através dos espectros de massas destes compostos verificamos a predominância de triterpenos, no entanto encontramos 12% (percentual relativo) de um composto que segundo a biblioteca Wiley275 do espectrômetro de massas foi sugerida como sendo o chiquimato tetra(trimetilsililado) (E 29, pg. 163).

Procedemos à purificação desta recompensa através de cromatografia em coluna e obtivemos na fração 96-100 (5 mg), um sólido branco que em CCD se apresentava como uma única mancha, para o qual foi adotado o código MC1. Este foi analisado por CG-EM, onde visualizamos o mesmo como o constituinte principal da recompensa. O espectro de massas apresentou íon molecular m/z 440 uma. (E 30, pg. 163) e fragmentação que poderia indicar um triterpeno da classe dos cicloartanos contendo no anel A uma hidroxila¹⁰⁰.

A amostra foi submetida à ressonância magnética de hidrogênio (E 31, pg. 164), revelando em seu espectro dois dubletos em δ 0,34 (1H) e δ 0,55 (1H), com constante de acoplamento de 4,5 Hz cada um, estes sinais são característicos de hidrogênios diasterotópicos do metileno de um ciclopropano. Em δ 3,28 (dd, $J=11,5$ Hz e 4,0 Hz) encontramos um sinal com integração para um hidrogênio,

¹⁰⁰Audier, H. E.; Beugelmans, R.; Das, B.C.; *Tetrahedron Lett.* **1966**, 36, 4341.

que corresponde a hidrogênio de um carbono carbinólico, em δ 6,48 (*td*, $J = 6,5$ e $1,5$ Hz) um tripleto duplo de um metino atribuído a uma dupla ligação. Observa-se também em δ 9,39 um singlete característico de hidrogênio aldeídico. Cinco singletos em δ 0,81(3H); 0,90(3H); 0,97(3H), 0,98 (3H) e 1,76 (3H) correspondentes a 5 metilas angulares e um dubleto em δ 0,93 (*d*, 3H, $J = 6,0$ Hz) de uma metila ligada a metino.

No espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (E 32, pg. 164) podemos visualizar o carbono aldeídico em δ 195,46, dois sinais à δ 139,08 e 155,65 correspondentes à dupla ligação, em δ 78,82 além de uma série de sinais entre δ 9,0 e 55,0, totalizando 30 sinais. Os espectros de RMN de ^{13}C (DEPT 90 e DEPT 135) (E 33, pg. 165) nos permitiram afirmar a presença de 6 metilas, 11 metilenos e 6 metinos.

Através de uma consulta na literatura sobre compostos que possuem este perfil, encontramos um artigo que relata a síntese de um composto da classe dos cicloartenóis contendo um aldeído na cadeia lateral ¹⁰¹ (Figura 17), já isolado anteriormente da planta *Mangifera indica* L., no entanto a referência citada¹⁰² não foi encontrada. Quanto aos dados de ressonância magnética nuclear do cicloartenal não encontramos nenhuma atribuição de RMN para o mesmo. Os únicos dados da literatura para este composto são o ponto de fusão (129-131°C) e a rotação óptica ($[\alpha]_D +44,5^\circ$; CHCl_3 , *c.* 0,9), o primeiro experimento não foi realizado e a medida da rotação revelou um valor diferente $[\alpha]_D +24,0^\circ$ (CHCl_3 , *c.* 1,7) do encontrado na literatura.

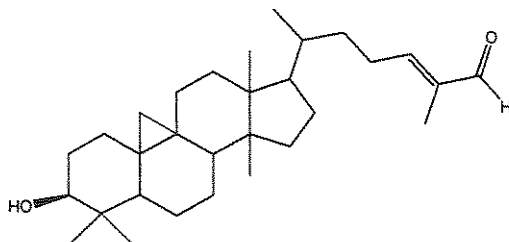


Figura 17. Composto sintetizado por Anjaneyulu.

¹⁰¹ Anjaneyulu, V.; Prasad, K.H.; *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1985**, *24*, 1075.

¹⁰² Anjaneyulu, V.; Prasad, K.H.; Connol, J.d.; Ravi, K.K.; *Phytochemistry*, (communicated).

Os espectros de RMN de 2D correlacionando ^1H - ^{13}C à uma ligação (HSQC) (E 34, pg. 165; E 35, pg. 166) permitiram confirmar a presença do anel ciclopropânico pela correlação dos sinais do espectro de RMN de ^1H em δ 0,34 e 0,55 com o sinal do carbono em δ 29,71. Também observamos a correlação do hidrogênio δ 3,28 com o carbono δ 78,82 e do hidrogênio em δ 6,48 e o carbono em δ 155,65, atribuídos ao carbinol e ao metino da dupla ligação, respectivamente. Outros acoplamentos podem ser visualizados na Tabela 15.

Através do mapa de contorno do espectro de RMN de 2D das correlações ^1H - ^{13}C à longa distância (*g*-HMBC) (E 36, pg. 166) podemos verificar a correlação dos hidrogênios em δ 2,0 e 2,3 (C-23) com o carbono em δ 195,46 (C-26), com os carbonos da dupla ligação em δ 155,65 (C-24) e 139,08 (C-25) e com o carbono em δ 34,77 (C-22). O hidrogênio em δ 6,48 está correlacionando com a metila em δ 9,17, que pode ser atribuída como C-27. As metilas em δ 14,00 (C-30) e 25,44 (C-29) tiveram sua posição confirmada pela sua correlação com o hidrogênio carbinólico em δ 3,28 (H-3). Os hidrogênios em δ 0,34 e 0,55 apresentaram acoplamentos com os carbonos em δ 19,94 (C-9), 26,06 (C-10), 47,98 (C-8) e 31,96 (C-1). As demais correlações estão na Tabela 16.

A geometria (*Z* ou *E*) da dupla ligação foi determinada através de experimentos de nOe, utilizando a técnica de RMN de ^1H (NOESY 1D). A excitação seletiva do sinal em δ 6,48 (sinal do hidrogênio da dupla) observamos incrementos no sinal em δ 9,39 (hidrogênio do aldeído), assim, podemos afirmar que a geometria da dupla ligação é *E* (E 37, pg. 167).

Para determinarmos a configuração relativa dos grupos ligados ao esqueleto principal utilizamos o experimento de RMN de ^1H (NOESY 1D). Primeiramente incidimos um pulso seletivo sobre o sinais dos hidrogênios do anel ciclopropânico em δ 0,34 e δ 0,55.

Ao aplicarmos um pulso seletivo sobre o sinal em δ 0,34 (RMN de ^1H , NOESY1D) observamos apenas o incremento no sinal do hidrogênio δ 0,55 (E 38, pg. 167). No entanto quando aplicamos um pulso seletivo ao sinal em δ 0,55 (E 39, pg. 168) observamos incrementos nos sinais em δ 0,81 (H-30), δ 1,52 (H-8), δ

0,80 (H-6) e menor em δ 0,97 (H-18). Estes incrementos permitiram inferir a posição *endo* para este sinal em relação ao triterpeno. O incremento com a metila H-30, hidrogênios H-8 e H-18, num dos hidrogênios da posição H-6, definem estas posições como sendo β . O incremento no hidrogênio (H-8) da fusão dos anéis B e C nos leva a afirmar que a fusão destes anéis é *cis*.

Continuando nosso estudo incidimos um pulso seletivo sobre o hidrogênio carbinólico (H-3) e observamos incrementos (E 40, pg. 168) nos hidrogênios da metila da posição 29 e de H-5 e de um dos hidrogênios nas posições 1 e 2.

Através deste espectro e do anterior podemos afirmar que a fusão dos anéis A e B é *trans*.

Estudo conformacional

A conformação do esqueleto do cicloartano que já foi estudado por Milon e colaboradores que através de cálculos de minimização de energia e dos incrementos de NOE propuseram três possíveis conformações para este esqueleto, as quais estão em equilíbrio dinâmico rápido. (Figura 18).

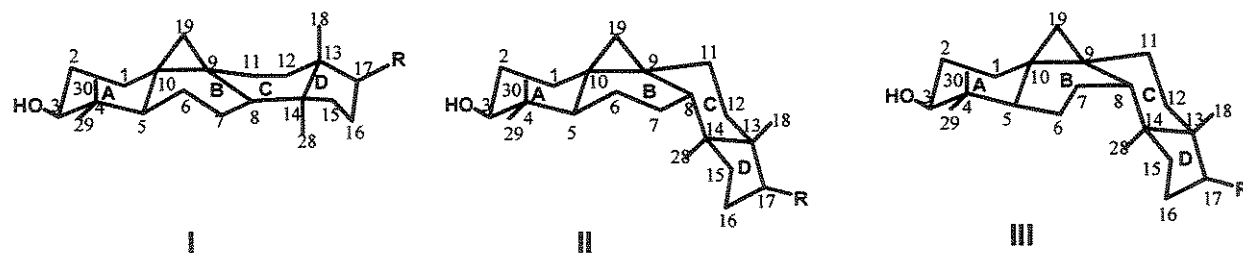


Figura 18. Conformações do esqueleto dos cicloartanóis.

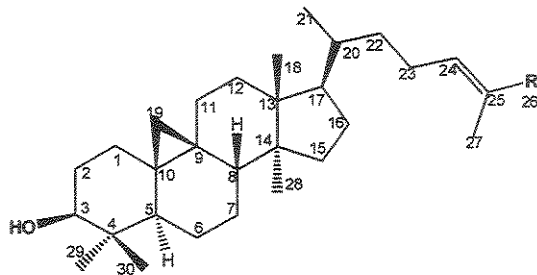
Estas três conformações se interconvertem rapidamente, porém cada uma delas existe em proporções distintas relacionadas à estabilidade relativa de cada uma. Baseado neste fato e observando os estudos de incrementos de nOe que realizamos anteriormente podemos realizar um estudo das conformações da nossa molécula. Analisando o incremento observado na metila 18 quando irradiamos o H-19 *endo* e comparando com as três conformações podemos verificar que este incremento só poderia ser observado na conformação I.

Analisando as três conformações em relação ao H-6 β este apresenta incremento quando o H-19 *endo* é irradiado, além do deslocamento químico deste que é de δ 0,80 que é influenciado pelo hidrogênio *endo* do anel ciclopropânico. Estas observações indicam que a conformação III pouco contribui no equilíbrio de I, II e III, pois nesta conformação H-7 β é que estaria na posição axial e sofreria influência quando irradiamos esta posição.

Quanto à conformação dos anéis C e D, Milon observou incrementos em um dos hidrogênios das posições H-7, H-15, H-12, H-17, H-11 e H-16, quando irradiou a metila H-28 o que confirmaria a presença da conformação I. Na conformação II a distância entre a metila H-28 e o H-11 (3,22 Å) faz com que não seja observado incremento em H-11 quando irradiamos esta metila, no entanto como este sinal está sobreposto com H-16 e é difícil concluir a respeito da presença ou não da conformação II.

O que podemos afirmar pelos incrementos é que a conformação I é predominante em solução e que III deve ser minoritária.

Tabela 16. Atribuições dos sinais (δ em ppm) de ^1H (499,89 MHz) e ^{13}C (125,69MHz) para o cicloartenal, em CDCl_3 .¹⁰³



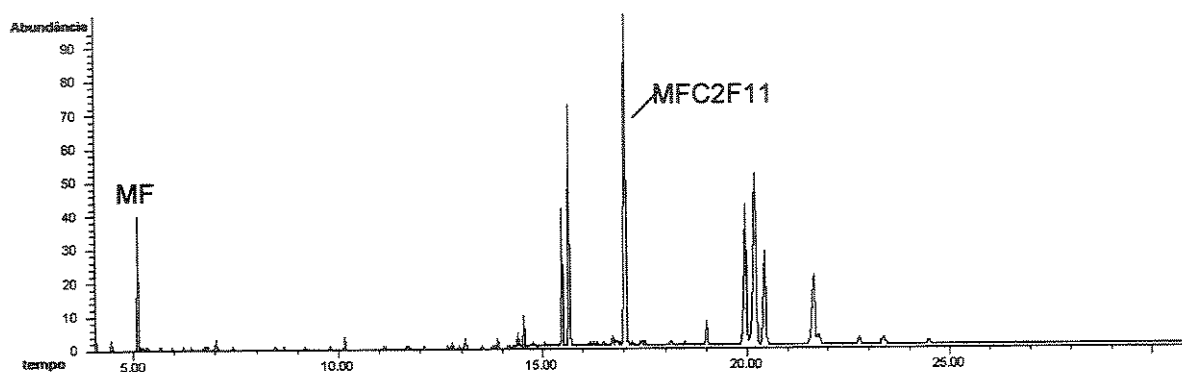
Nº do C	R= -CH ₃ *		R= -HC=O		HMBC
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C	
1	1,18 e 1,50	32,06	1,26 e 1,58 (m)	31,96	-
2	1,62 e 1,72	30,48	1,58 (β , m) e 1,78, (α , m)	30,48	-
3	3,22	78,90	3,28 (α , dd, J=11,5 e 4,0 Hz)	78,82	2, 4, 29, 30
4	-	40,56	-	40,42	-
5	1,27	47,22	1,30 (β , dd, J = 12,5 e 4,0 Hz)	47,08	-
6	0,76 e 1,62	21,17	0,80 (β , dq, J= 12,5; 12,5; 12,5 e 2,5 Hz) e 1,60 (m)	21,10	-
7	1,13 e 1,38	26,06	1,08 e 1,32 (m)	26,01	-
8	1,56	48,00	1,52 (β , dd, J= 12,0 e 4,0 Hz)	47,98	-
9	-	20,12	-	19,94	-
10	-	26,25	-	26,06	-
11	1,12 e 2,09	26,60	1,10 e 1,98 (m)	26,42	-
12	1,75	33,02	1,63 (m)	32,88	-
13	-	45,40	-	45,37	-
14	-	48,91	-	48,83	-
15	1,43	35,65	1,42 (m)	35,52	-
16	1,48 e 2,08	28,18	1,32 e 1,94 (m)	28,20	-
17	1,76	52,38	1,61 (m)	52,18	-
18	1,13	18,05	0,98 (β , s)	18,08	12
19	0,28 e 0,55	29,90	0,34('exo', d, J=4,5 Hz) e 0,55 ('endo', d, J= 4,5 Hz)	29,71	1, 8, 9, 10
20	1,62	35,94	1,45 (m)	35,99	17
21	1,12	18,31	0,93 (d, J = 6,0 Hz)	18,10	18, 22
22	1,30 e 1,76	36,44	1,24 e 1,62 (m)	34,77	-
23	2,18 e 2,30	25,02	2,0 e 2,3 (m)	26,06	22, 24, 25
24	5,42	125,35	6,48 (td, J = 6,5 e 1,5 Hz)	155,65	26
25	-	130,84	-	139,08	-
26	1,75	17,64	9,39 (s)	195,46	25
27	1,83	25,70	1,76 (s)	9,17	24, 25, 26

¹⁰³ Milon, A.; Nakatani, Y.; Kintzinger, J.P.; Ourisson, G.; *Helv. Chim. Acta* **1989**, 72, 1.

Continuação da Tabela 17					
28	1,03	19,36	0,90 (α , s)	19,32	-
29	1,14	25,49	0,97 (α , s)	25,44	3, 4, 5, 30
30	0,99	14,04	0,81 (β , s)	14,00	3, 4, 29

b) Estudo da recompensa do labelo de *Maxillaria friedrichsthalii* Reichenbach f.

Maxillaria friedrichsthalii é uma orquídea que possui um líquido transparente viscoso no início e no final do labelo, que é coletado por abelhas. Este líquido foi coletado e submetido à silição e analisado por CG-EM (C 18). A análise dos espectros de massas revelou a presença de um triterpeno em sua composição da classe dos cicloartanóis (MFC2F11) e o pico MF foi identificado como o chiquimato de tetra(trimetilsilila).



C 18. Cromatograma de íons totais do extrato da recompensa de *M. friedrichsthalii* siliado. Obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m) 150°C-310°C(15min) $r=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ inj. 260°C, $f=1\text{mLmin}$.

Coletamos 27 flores e obtivemos 100 mg de extrato de acetato de etila. Este extrato foi submetido à cromatografia em coluna. Uma das frações foi submetida a novo fracionamento onde se obteve 6 mg de um composto (MFC2F11) homogêneo em CCD. Este foi submetido às técnicas de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

Análise do composto MFC2F11

O composto MFC2F11 (6 mg) foi analisado por CG-EM e verificou-se por esta técnica a presença de um único composto. No espectro de massas (E 41, pg. 169) observou-se o íon molecular de m/z 426.

O composto foi submetido à RMN de ^1H em CDCl_3 e neste espectro (E 42, pg. 169) pode-se observar um grande número de sinais entre δ 0,80 e 2,00, entre os quais sete sinais são correspondem à metilas; em δ 0,34 e δ 0,55 são encontrados dois dubletos representando os hidrogênios diastereotópicos do ciclopropano ligado ao anel B do triterpeno, além de um sinal complexo em δ 3,29 e um duplo tripleto em δ 5,10, correspondendo, respectivamente, à um hidrogênio carbinólico e uma dupla ligação.

No espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ foram observados 30 sinais (E 43, pg. 170). Em δ 125,22 e δ 130,85 encontramos os sinais dos carbonos da dupla ligação e em δ 78,79 o sinal de um carbono carbinólico. Os demais sinais entre δ 13,97 e 52,24 correspondem ao esqueleto do triterpeno e da cadeia lateral. O espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90 e 135) permitiu determinar a presença de 7 metilas, 11 metilenos e 6 metinos (E 44, pg. 170).

Quando comparamos os deslocamentos de ^1H e ^{13}C com dados da literatura encontramos grande similaridade com os obtidos para o cicloartenol (Figura 19) cujos dados de ressonância magnética nuclear e conformações foram revisados por Milon e colaboradores¹⁰³.

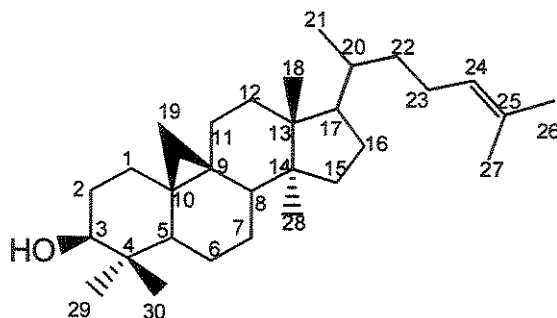


Figura 19. Estrutura do cicloartenol.

Analisando os mapas de contorno do espectro de RMN de 2D correlacionando ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC) podemos ver a correlação do hidrogênio δ 3,28 com o carbono em δ 78,79 e do hidrogênio em δ 5,10 com o δ 125,22, além dos hidrogênios em δ 0,34 e 0,55 com o carbono δ 29,88 (E 45, pg. 171; E 46, pg. 171; E 47, pg. 172). Após comparação com os dados da literatura confirmamos que o composto isolado se trata realmente do cicloartenol.

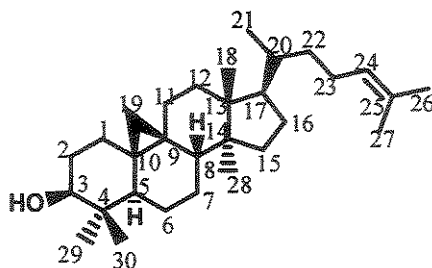
Para estudarmos a configuração relativa de alguns grupos utilizamos a técnica de RMN de ^1H de diferença de nOe, utilizando a técnica de NOESY 1D. Incidimos um pulso seletivo sobre o sinal em δ 0,55 (H-19, *endo*), e observamos incrementos (E 48, pg.172) no sinal de H-8, em δ 0,81 (H-30) e δ 0,98 (H-18), além do sinal do hidrogênio em δ 0,34 ppm (H-19, *exo*) e δ 0,80 (H-6), o que nos permite afirmar que todos estes sinais estão na posição β . O incremento do sinal do hidrogênio H-8, permite afirmar que a fusão dos anéis B e C é *cis*.

A posição β para a hidroxila, foi determinada através de um experimento de RMN de ^1H (NOESY 1D) (E 49, pg. 173) onde incidimos um pulso sobre o hidrogênio carbinólico (H-3) e verificamos incrementos nos sinais da metila 29 (α) e de um dos hidrogênios nas posições 1 e 2 (α). Foram observados também incrementos nos sinais do metino da posição 5 (α), permitindo caracterizar a fusão dos anéis A e B como sendo *trans*.

Outro experimento de RMN de ^1H (NOESY 1D) onde incidimos o pulso sobre o sinal da metila 28 (E 50, pg. 173) e observamos incrementos nos sinais de um dos hidrogênios das posições 16, 11, 15 e 12 que já são esperados para esta irradiação. Foi observado também um incremento para o sinal do hidrogênio na posição 17, que nos leva a assinalar sua posição como α .

Através dos dados obtidos pelos espectros de massas, RMN uni e bidimensionais identificamos todos os sinais do cicloartenol, estes dados se encontram na Tabela 17.

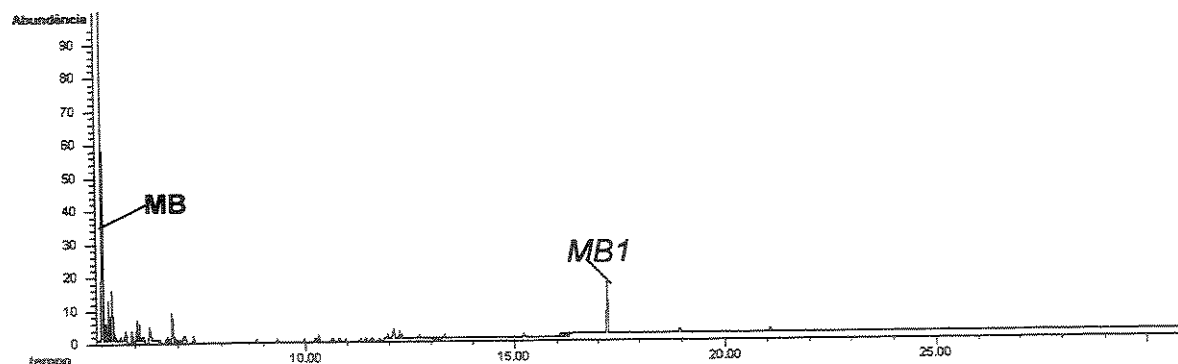
Tabela 17. Atribuições dos sinais (δ em ppm) de ^1H (499,89 MHz) e ^{13}C (125,69MHz) para o cicloartenol., em CDCl_3 .



Posição	literatura*		MFC2F11	
	$\delta\ ^1\text{H}$	$\delta\ ^{13}\text{C}$	$\delta\ ^1\text{H}$	$\delta\ ^{13}\text{C}$
1	1,18 e 1,50	32,06	1,25 (β , <i>m</i>) e 1,56 (α , <i>m</i>)	31,93
2	1,62 e 1,72	30,48	1,58 (β , <i>m</i>) e 1,76 (α , <i>m</i>)	30,33
3	3,22	78,90	3,23 (α , <i>dd</i> , $J=12,0$ e $4,0$ Hz)	78,79
4	-	40,56	-	40,43
5	1,27	47,22	1,28 (α , <i>m</i>)	47,07
6	0,76 e 1,62	21,17	0,78 (β , <i>dd</i> , $J=12,5$ e $4,0$ Hz) e 1,58 (α , <i>m</i>)	21,09
7	1,13 e 1,38	26,06	1,10 (α , <i>m</i>) e 1,90 (β , <i>m</i>)	25,98
8	1,56	48,00	1,54 (β , <i>dd</i> , $J=12,0$ e $4,0$ Hz)	47,95
9	-	20,12	-	19,95
10	-	26,25	-	26,01
11	1,12 e 2,09	26,60	1,10 (α , <i>m</i>) e 1,90 (β , <i>m</i>)	26,43
12	1,75	33,02	1,63 (α e β)	32,84
13	-	45,40	-	45,23
14	-	48,91	-	48,75
15	1,43	35,65	1,37 (α e β , <i>m</i>)	35,54
16	1,48 e 2,08	28,18	1,30 (β , <i>m</i>) e 1,91 (α , <i>m</i>)	28,11
17	1,76	52,38	1,58 (α)	52,24
18	1,13	18,05	0,97 (β , <i>s</i>)	18,00
19	0,28 e 0,55	29,90	0,34 (' <i>exo</i> ', <i>d</i> , $J=4,0$ Hz) e 0,55 (' <i>endo</i> ', <i>d</i> , $J=4,5$ Hz)	29,88
20	1,62	35,94	1,40 (<i>m</i>)	35,85
21	1,12	18,31	0,89 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz)	18,20
22	1,30 e 1,76	36,44	1,10 (<i>m</i>) e 1,45 (<i>m</i>)	36,30
23	2,18 e 2,30	25,02	1,86 (<i>m</i>) e 2,10 (<i>m</i>)	24,90
24	5,42	125,35	5,10 (<i>td</i> , $J=6,5$; $6,5$ e $1,5$ Hz)	125,22
25	-	130,84	-	130,85
26	1,75	17,64	1,62 (<i>s</i>)	17,61
27	1,83	25,70	1,68 (<i>s</i>)	25,70
28	1,03	19,36	0,90 (α , <i>s</i>)	19,27
29	1,14	25,49	0,97 (α , <i>s</i>)	25,40
30	0,99	14,04	0,81 (β , <i>s</i>)	13,97

c) Estudo da recompensa do labelo de *Maxillaria brasiliensis* Brieger e Illg

Maxillaria brasiliensis apresenta em seu labelo uma pasta viscosa, as abelhas a coletam rapidamente assim que a flor abre e a polinizam a flor.



C 19. Cromatograma de íons totais do extrato siliado da cera do labelo de *M. brasiliensis* obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m) 150°C-310°C(15min) $r=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ inj. 260°C, $f=1\text{mL}/\text{min}$.

O primeiro composto (MB) (47,6% do total) foi dado pela biblioteca Wiley 275 com 99% de confiabilidade como sendo o tetra (trimetilsilil) chiquimato.

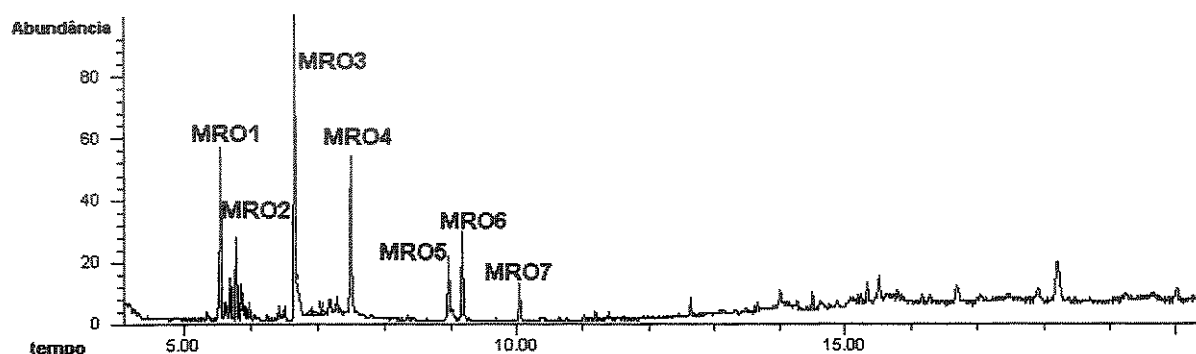
Procedemos a um fracionamento utilizando coluna cromatográfica. Nesta purificação obtivemos 1,5 mg de um composto (MB1). Este foi submetido à análise por CG-EM (E 51, pg. 174).

Pelo CG-EM observou-se que o tempo de retenção e espectro de massas era semelhante à do cicloartenol que isolamos da recompensa de *M. friedrichsthalii*. Os tempos de retenção também são muito semelhantes. Para confirmar se realmente havíamos isolado o mesmo composto, MB1 foi analisado por RMN de ^1H que confirmou que MB1 é realmente o cicloartenol.

d) Estudo da recompensa do labelo de *Maxillaria violaceo punctata* Rchb.f

Maxillaria violaceo punctata, apresenta uma pasta viscosa em seu labelo, as abelhas a coletam rapidamente assim que a flor abre. O polinizador desta espécie ainda não foi identificado, apenas verificou-se a coleta das secreções e a polinização.

Coletamos a recompensa de 5 flores e submetemos a sililação e analisamos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetria de massas (C 20).



C 20. Cromatograma de íons totais do extrato sililado da cera do labelo de *M. violaceo punctata* obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura de forno de 150°C a 310°C (15min) a uma razão de 10°C/min e temperatura de injetor de 260°C e fluxo constante de 1mL/min.

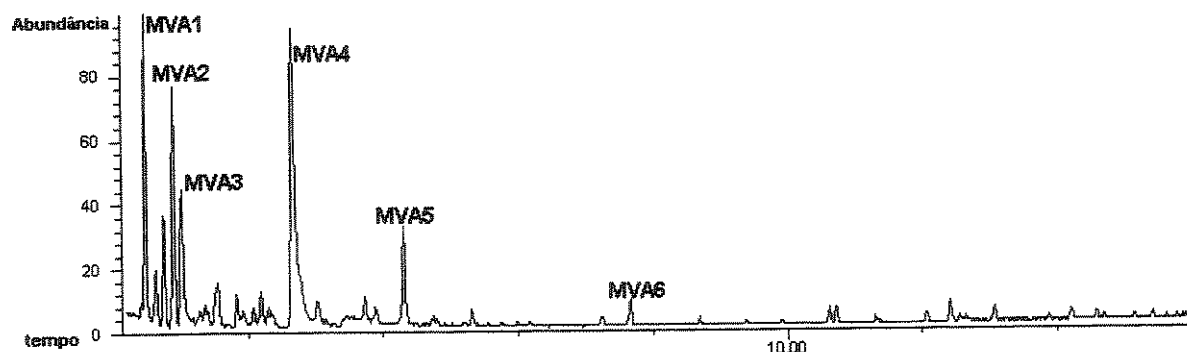
Com base nos espectros de massas podemos afirmar a ausência de triterpenos nesta recompensa e com o auxílio de padrões identificamos os compostos presentes na mesma (Tabela 18).

Tabela 18. Composição química da recompensa de *Maxillaria violaceo punctata*, determinada por comparação com padrões.

Composto	%/nº no C 1
Ácido chiquímico	10,0/ MRO1
sorbose	6,0/ MRO2
umbeliferona	3,0
ácido cinâmico	27,0/ MRO3
Ácido palmítico	17,0/ MRO4
Ácido oléico	4,0/ MRO6
Ácido esteárico	8,0/ MRO7
Não identificados	25,0 MRO5
TOTAL	100,0

e) Estudo da recompensa do labelo de *Maxillaria valenzuelana* (A. Rich) Nash

Em *Maxillaria valenzuelana* a recompensa está em forma de tricomas, para sua análise utilizamos 5 labelos que foram extraídos com acetato de etila, sililados e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (C 21).



C 21. Cromatograma de íons totais do extrato sililado da cera do labelo de *M. valenzuelana* obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura de forno de 150°C a 310°C(15min), 10°C/mi, 1mL/min.

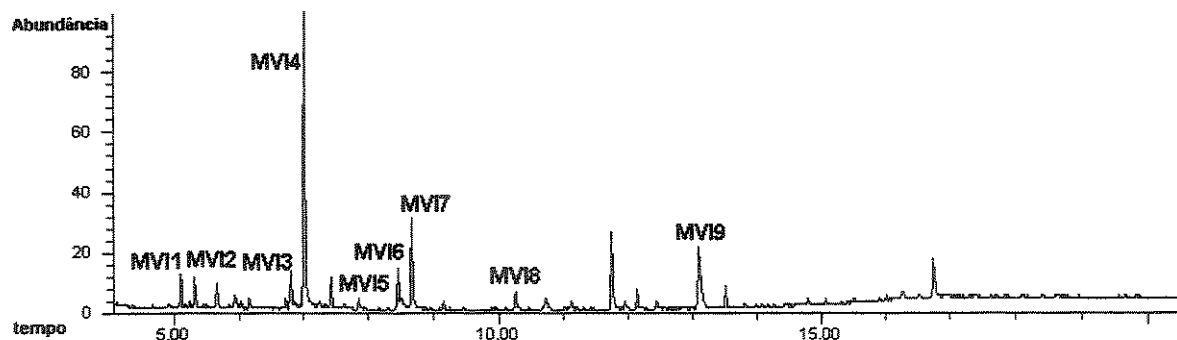
Através da análise dos espectros de massas foram identificados os compostos presentes nestes tricomas, sendo em sua maioria ácidos graxos e uma cumarina (Tabela 19).

Tabela 19. Composição química da recompensa de *Maxillaria valenzuelana*, determinada por comparação com padrões.

Composto	%/nº no C 21
Ácido chiquímico	15,0/ MVA1
sorbose	14,0/ MVA2
umbeliferona	10,0/ MVA3
ácido cinâmico	31,0/ MVA4
Ácido palmítico	7,0/ MVA5
Ácido oléico	1,5/ MVA6
Não identificados	21,5
TOTAL	100,0

f) Estudo da recompensa do labelo de *Maxillaria villosa* (Barb. Rodr.) Cogn.

Maxillaria villosa possui sua recompensa em tricomas que são raspados por abelhas. Sua constituição química foi determinada após a extração de 4 labelos com auxílio de solvente (acetato de etila), sililação e análise por CG-EM (C 22), comparação com padrões e análise dos espectros de massas.



C 22. Cromatograma de íons totais do extrato sililado da cera do labelo de *M. villosa* obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura de forno de 150°C a 310°C(15min),10°C/min, fluxo constante de 1mL/min.

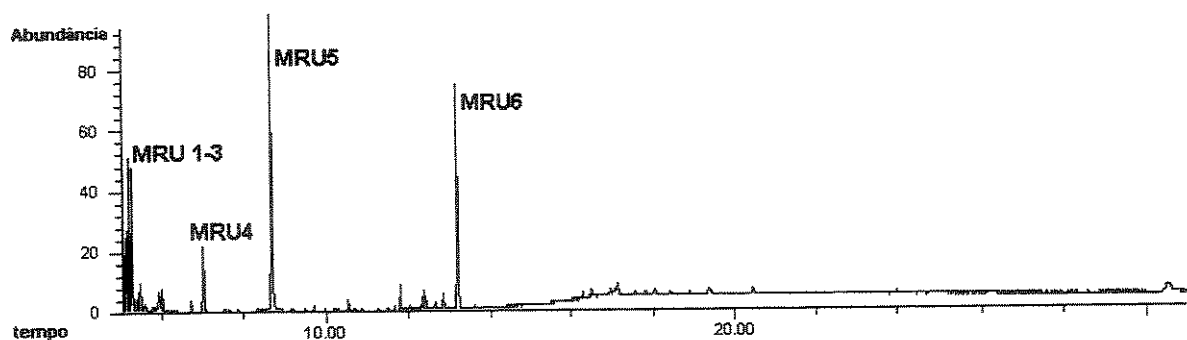
Na Tabela 20 encontramos os compostos identificados nesta recompensa, principalmente ácidos de cadeia longa, um carboidrato e um alceno.

Tabela 20. Composição química da recompensa de *Maxillaria villosa*, determinada por comparação com padrões.

Composto	%/ nº no C 22
Ácido chiquímico	3,0/MVI1
sorbose	4,0/MVI2
Ácido palmitoleico	4,0/MVI3
Ácido palmítico	35,0/MVI4
Ácido heptadecanóico	2,0/MVI5
Ácido oléico	6,0/MVI6
Ácido esteárico	12,0/MVI7
Ácido eicosanóico	4,0/MVI8
nonacosano	9,0/MVI9
Não identificados	21,0
TOTAL	100,0

g) Estudo da recompensa do labelo de *Maxillaria rufescens*

Maxillaria rufescens, possui além de fragrância, tricomas¹⁰⁴ que são raspados pelas abelhas. Análise histoquímica das papilas do labelo revelaram a presença de proteínas, amido e lipídeos¹⁰⁵. Desta forma extraímos o labelo com acetato de etila e procedemos à análise por CG-EM (C 23).



C 23. Cromatograma de íons totais do extrato sililado da cera do labelo de *M. rufescens* obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura de forno de 150°C a 310°C(15min) a uma razão de 10°C/min e temperatura de injetor de 260°C e fluxo constante de 1mL/min.

¹⁰⁴Singer, R.B.; Koehler, S.; *Ann. Bot.* **2004**, 93, 39.

¹⁰⁵Davies, K.L., Turner, M.P, *Ann. Bot.* **2004**, 93, 75.

Nesta recompensa foi possível identificar dois ácidos orgânicos, dois carboidratos e um hidrocarboneto (Tabela 21).

Tabela 21. Composição química da recompensa de *Maxillaria rufescens*, determinada por comparação com padrões.

Composto	%/ nº no C 23
ácido chiquímico	10,0/MRU1
frutose	11,0/MRU2
sorbose	11,0/MRU3
ácido palmítico	8,0/MRU4
ácido esteárico	30,0/MRU5
esqualeno	20,0/MRU6
TOTAL	100,0

2.4 Conclusão parcial I

Este é o primeiro estudo envolvendo a química da polinização em Maxillariinae.

O estudo dos voláteis permitiram a identificação de mais de cem componentes diferentes entre hidrocarbonetos, aldeídos, mono e sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados, entre outros. A análise de espécies próximas filogeneticamente reforçou que espécies morfologicamente semelhantes se utilizam de mecanismos químicos diferentes para atrair os polinizadores.

O estudo da química da pseudocópula foi o primeiro da América Latina e também o primeiro da subtribo Maxillariinae. Em *Mormolyca ringens* ficou evidenciado o mimetismo da planta com a rainha virgem e em *Trigonidium obtusum* estudos futuros deverão investigar se o mesmo ocorre.

A química das recompensas florais revelou a presença de triterpenos da classe dos cicloartanóis em algumas espécies enquanto outras tiveram como principais constituintes ácidos graxos e alguns carboidratos.

3 ESTUDO DO NÉCTAR DE *SPATHODEA CAMPANULATTA*

3.1 Introdução

O néctar é utilizado para atrair polinizadores e serve como alimentação para insetos, formigas e larvas, entretanto é pouco estudado quanto a sua constituição química. A bibliografia sobre o assunto está baseada na composição dos carboidratos¹⁰⁶, proteínas, aminoácidos e íons inorgânicos. No entanto poucas investigações foram realizadas buscando a determinação de outros constituintes químicos. Estima-se que outros compostos podem estar presentes devido à toxidez de alguns néctares e pelo aroma de outros.

O transporte dos compostos secundários no néctar não é conhecido, entretanto o processo de secreção está bem estudado. O néctar é secretado por glândulas chamadas de nectários, localizadas em tecidos florais ou extraflorais, podendo ser encontrado em vários tipos de tecidos incluindo cálice, corola, estames e carpelo.

As plantas se modificam tanto morfológicamente quanto quimicamente a fim de preservar sua sobrevivência. A toxidez do néctar está associada à defesa das plantas contra o "roubo", mas é controlada para não afetar a sua polinização.

3.1.1 Revisão sobre o estudo de néctar

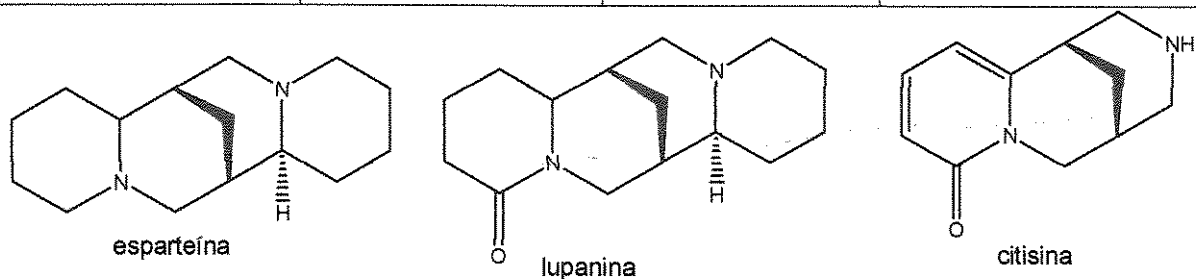
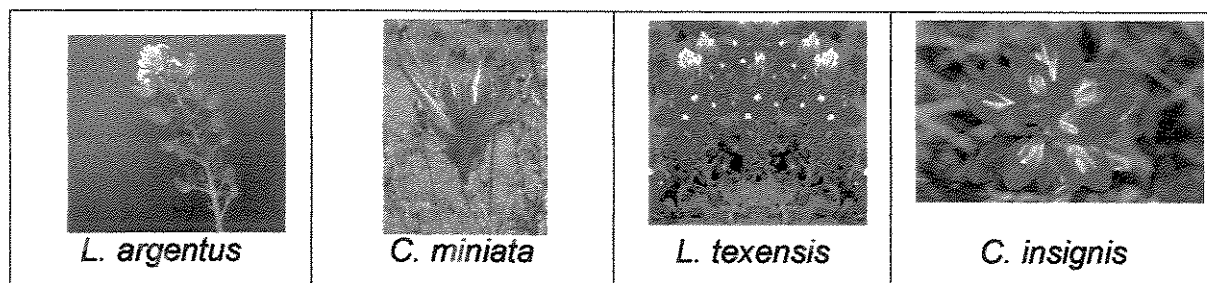
As interações entre herbívoros, plantas e seus polinizadores são na maioria das vezes, estudadas separadamente. Muitas plantas ao mesmo tempo em que atraem os polinizadores também procuram escapar da ação de predadores. Um dos trabalhos mais interessantes encontrados na literatura realizado por Adler¹⁰⁷ estuda a relação entre os hemiparasitas¹⁰⁸ em duas associações *Castilleja-*

¹⁰⁶ Davis, A. R.; Pylatuik, J.D.; Paradis, J.C.; Low, N. H.; *Planta*, **1998**, 205, 305.

¹⁰⁷ Adler, L. S., Wink, M., *Bioch. Syst. Ecol.* **2001**, 29, 551.

¹⁰⁸ Parasitismo caracterizado pela presença de folhas verdes que permitem à planta realizar a fotossíntese e no qual o parasito só extrai do hospedeiro a seiva -

Lupinus. Investigou-se a transferência de alcalóides quinolizidínicos dos hospedeiros, *Lupinus texensis* e *Lupinus argenteus* (Fabaceae) para folhas, tecidos florais e néctar de *Castilleja indivisa* e *Castilleja miniata* (Scrophulariaceae), respectivamente. Foram encontrados alcalóides (esparteína, lupanina, e citisina) nas folhas, cálices e gineceu de muitas plantas de *Castilleja*. Com o objetivo de extrair alcalóides do néctar realizou uma extração ácido-base e o extrato obtido foi analisado através de CG-EM. Para identificação dos alcalóides determinou o índice de Kovats e comparou os espectros de massas e os índices de retenção da esparteína, lupanina e citisina. A quantidade de alcalóides foi menor que 1 µg em 150 – 200 µL de néctar, o autor não descartou a possibilidade de os mesmos terem sido obtidos através de uma contaminação na coleta ou no manuseio no laboratório. Quanto à visitação de herbívoros foi observado um menor índice nas plantas com maior quantidade de alcalóides, e estas puderam produzir mais flores que foram menos atacadas e tiveram maior visita de polinizadores^{109,110}. Neste experimento foi comprovada a defesa química através do seqüestro de alcalóides de uma outra planta, no entanto a presença de alcalóides no néctar não foi comprovada.

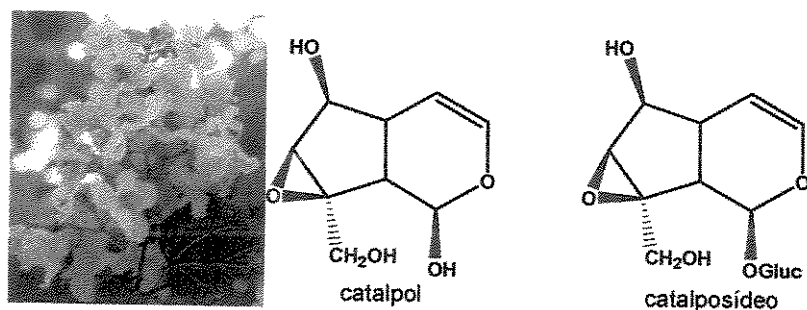


Outro trabalho investigou a toxidez do néctar de *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae) em que as folhas, flores, frutas, casca do tronco são compostas

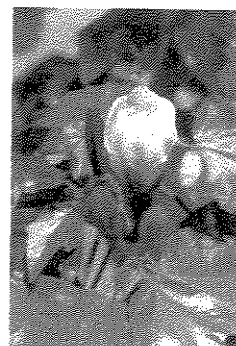
¹⁰⁹ Adler, L. S., *The Am. Nat.*, 2000, 156.

¹¹⁰ Adler, L. S., Kardan, R, Strauss, S. Y., *Ecology*, 2001, 82, 2032.

por uma mistura de 15 iridóides glicosídicos. Foi observado que a larva *Cedratomia catalpae* não se alimenta das folhas desta planta mesmo quando mantidas em inanção. Realizou-se um experimento para determinar se o néctar de *Catalpa speciosa* continha iridóides glicosídicos através do fornecimento de duas soluções: uma contendo néctar de *C. speciosa* e outra de sacarose. Verificou-se que existe uma preferência pela solução de sacarose enquanto o néctar quando consumido provocou comportamentos anormais como: regurgitação, locomoção lenta e desorientada, o que evidenciou a presença de outros compostos no néctar. Realizou-se, então, outro bioensaio para investigar a presença de catalpol e catalposídeo no néctar, forneceu-se então uma solução contendo estes dois compostos e uma solução de sacarose. Observou-se que também havia preferência pela solução de sacarose. É importante observar que nestes experimentos a toxicidade foi indiretamente atribuída, pois os iridóides não foram detectados diretamente a partir do néctar. No entanto experimentos realizados com os polinizadores de *C. speciosa* mostraram que os mesmos não são afetados pelos iridóides glicosídicos¹¹¹ o que é esperado.



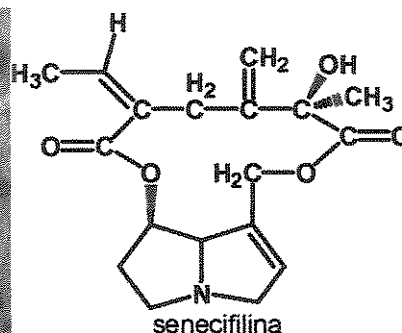
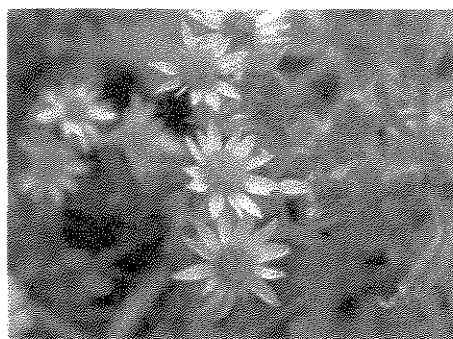
Em flores de *Ochroma lagopus* Swartz (Bombacaceae) também foi observada a mortalidade de insetos em plantas dos estados de São Paulo e Minas Gerais. O grande número de insetos mortos sugere a presença de toxinas no néctar ou no pólen. Para avaliar a toxidez do néctar foram realizados experimentos confinando um grupo de 10 abelhas adultas em



¹¹¹ Stephenson, A.; *J. Chem. Ecol.* **1982**, *8*, 1025.

uma placa de *Petri* contendo um pequeno chumaço de algodão embebido com 2 mL de néctar. O índice de mortalidade era maior assim que o néctar era coletado da flor e decrescia com o tempo, o que sugere que os compostos responsáveis pelo efeito tóxico sejam voláteis ou muito instáveis e facilmente degradáveis. O estudo dos constituintes químicos deste néctar levou à determinação dos carboidratos glicose, frutose e sacarose e de dezesseis aminoácidos. Embora não tenha sido identificada a substância responsável pela toxidez do néctar, ficou evidente o não-envolvimento de açúcares ou aminoácidos ¹¹².

Um fato comum é a presença de compostos secundários no mel, como o mesmo é produzido através da coleta de néctar das plantas supõe-se que os compostos secundários sejam provenientes do néctar coletado. A presença dos alcalóides pirrolizidínicos (entre eles senecifilina) no néctar de *Senecio jacobaeae* L. foi sugerida, pois estes alcalóides foram encontrados como contaminantes de mel produzidos em regiões de alta concentração desta planta. ¹¹³



Além da hipótese de que os compostos secundários seriam os responsáveis pela toxidez do néctar, outras teorias existem. Ehlers e Olesen relataram que nas orquídeas das espécies *Epipactis purpurata* e *E. helleborine*, a toxidez é devida à presença de etanol. Este composto não seria produzido pela planta, mas sim por microrganismos que infectam o néctar (provenientes do ar ou de patas de vespas que o coletam). Após beber o néctar, as vespas tornam-se lentas e parecem intoxicadas.

¹¹² Paula, V.; Barbosa, L.C.A.; Denmuner, A.J.; Campos, L.A.; Pinheiro, A.L.; *Ciência e Cultura* **1997**, 49, 274.

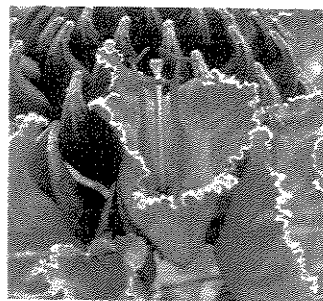
¹¹³ Deinzer, M. L.; Thompson P. A.; *Science*, **1977**, 195, 497.

Alguns néctares apresentam aroma acentuado e a identificação dos constituintes voláteis do néctar de flores femininas e masculinas de *Dactylanthus taylorii*, obtidos por hidrodestilação, revelaram que o mesmo é constituído principalmente por esqualeno. A fragrância compreende uma mistura de álcoois butenílicos, pentenílicos, benzílicos e etil-fenílicos; nerol, geraniol e os ésteres etílicos dos ácidos benzóico, salicílico e cinâmico. O néctar da inflorescência das plantas femininas apresenta aproximadamente cinco vezes mais álcool benzílico que as plantas masculinas.¹¹⁴

Pelo acima exposto, pode-se perceber que o estudo do néctar em relação aos seus constituintes minoritários foi realizado apenas de formas indiretas, sendo a detecção destes compostos, de maneira direta, muito importante para confirmar estas suposições e importantes para a compreensão de sua função ecológica, seja de controladores do roubo, atração de polinizadores e ação antimicrobiana.

3.1.2 *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae)

Como pode ser observado no item anterior, o estudo dos componentes do néctar até o momento, está relacionado à sua presença em outras partes da planta, no entanto nunca foi detectado e identificado quimicamente diretamente do mesmo. Achamos que este fato não deveria ser desprezado, mas que deveríamos buscar confirmá-lo ou não, aprofundando os estudos.



Spathodea campanulata pertence à família Bignoniaceae e popularmente chamada de tulipa africana ou tulipa de Gabon e é nativa da África e encontrada abundantemente nos Camarões. Devido à sua resistência e à beleza de suas

¹¹⁴ Ecroyd, C.E.; Franich, R.A.; Kjoese, H. W.; Steward, D.; *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1387.

flores, encontra-se espalhada pelo mundo, sendo utilizada na medicina popular no tratamento de edemas, desinteria, úlceras, gonorréia, diarreia e como antídoto¹¹⁵. Flores desta planta são polinizadas na sua região de origem por pássaros e, no Panamá, por morcegos. O beija-flor da espécie *Eupetomena macroura* (Trochilidae) freqüentemente visita as flores e coleta o néctar direto da flor ou perfurando os botões na base da corola.

Existem várias afirmações de que o néctar desta planta é tóxico por ser comum à presença de insetos mortos na parte interna das flores e algumas especulações de morte de pássaros. Por este motivo foi escolhida e porque contém uma grande quantidade de néctar e pode ser encontrada em todo o campus da Unicamp.

Tsamo foi o pesquisador que mais estudou os metabólitos desta planta. Do extrato clorofórmico do caule foram isolados quatro triterpenos: ácido 3- β -acetoxioleanólico (SC1), ácido siaresinólico (SC2), 3- β -acetoxi-12-hidroxiolean-28,13-olídio (SC3) e ácido oleanólico (SC4)¹¹⁶. Este mesmo pesquisador isolou também do caule o triterpeno ácido spathódico (SC5) e o 3-O- β -D-glucopiranosídeo sitosterol (SC6). Do extrato acetoacetílico das folhas foi isolado o hidroxiesterol spatodol (SC 7) e o β -sitosterol (SC8).

Entre as plantas da família Bignoniaceae é raro encontrarmos triterpenos, apenas a β -amirina (SC9) foi encontrada em *Bignonia unguiscai* e *Halophragma adenophyllum*.

Extratos hexânicos, clorofórmicos e aquosos da casca do caule foram investigados a cerca de sua atividade antimalarial para *Plasmodium berghei berghei* em ratos. Os extratos hexânico e clorofórmico apresentaram atividade com supressão de 22 a 80% e 52 a 74%, respectivamente, quando submetidos a doses de 50 a 400 mg/Kg¹¹⁷. Amusan¹¹⁸ isolou os compostos ativos sendo eles o

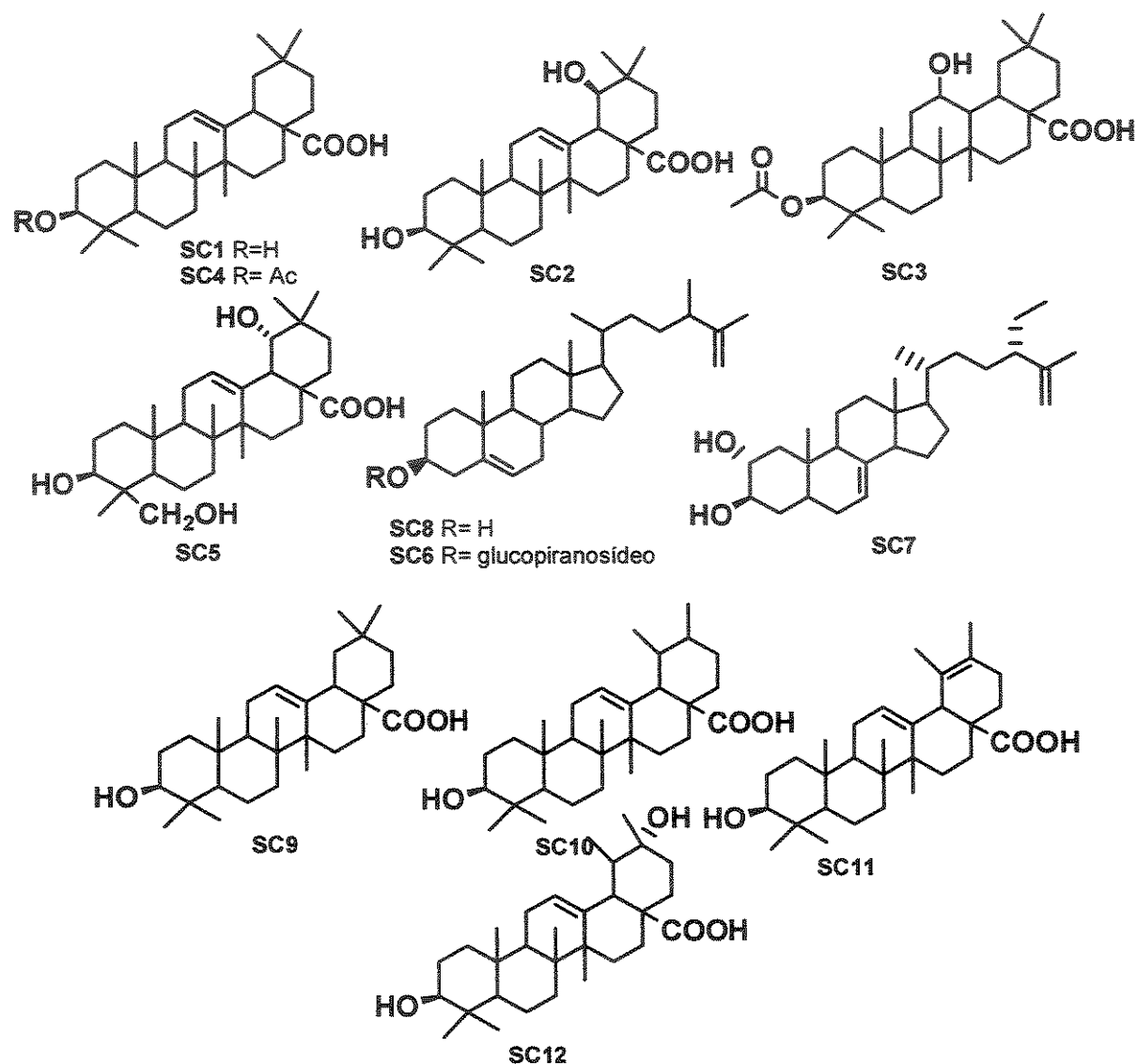
¹¹⁵ Nguela, S.; Nyasse, B.; Tsamo, E.; Sopndengam, B.L.; Connoly, J.D.; *Phytochemistry* **1990**, 29, 3959.

¹¹⁶ Nguela, S.; Nyasse, B.; Tsamo, E.; Sopndengam, B.L.; *Planta Medica*, **1998**, 5, 476.

¹¹⁷ Makinde, J.M., Amusan, O.O.G., Adesogan, E.K., *Planta Medica*, **1988**, 122.

¹¹⁸ Amusan, O.O.G., *Phytotherapy Research*, **1996**, 10, 692.

ácido 3 β -hidroxi urs-12-en-28-óico (ácido ursólico) (**SC10**) e dois de seus derivados: ácido 3 β -hidroxi urs-12,19-dien-28-óico (ácido tomentosólico) (**SC11**) e o ácido 3 β , 20 β -dihidroxi urs-12-en-28-óico (**SC12**).



Extratos aquosos e butanólicos da casca do caule também apresentaram atividade hipoglicêmica em ratos, mas não tiveram influência no nível de insulina em ratos diabéticos^{119,120}.

¹¹⁹ Niyonzima, G., Scharpe, S., Vanbeeck, L., Vlietinck, A. J., Laekeman, G. M., Mets, T., *Phytoterapy Research* **1993**, 7, 64.

¹²⁰ Niyonzima, G., Vanbeeck, L., Vlietinck, A. J., Laekeman, G. M., Withvrouw, M., Van Poel, B., Pieters, L., Paper D., De Clerq, E., *Phytomedicine* **1999**, 6, 45.

Quanto ao estudo do néctar desta planta, Trigo e Santos¹²¹ sugeriram que a mucilagem contida nos botões e nas flores jovens pode estar dissolvida no néctar podendo ser responsável pela morte destes insetos. O pesquisador fez uma observação no campo e encontrou maior mortalidade no dia em que as flores abriram (96,8%), no segundo dia a mortalidade já diminui muito (2,3%) e entre o terceiro e o quinto dia cai para 0,3%. Entre os insetos mortos encontram-se as abelhas *Scaptotrigona postica*, que foram encontradas com pólen da planta em suas patas. Bioensaios utilizando esta abelha mostraram que o consumo de solução de sacarose e mucilagem (25%) foi menor em relação à solução de sacarose e da mucilagem pura, indicando que a mucilagem estaria dissolvida nela. No entanto é mais um estudo, entre tantos outros que não detecta a presença de compostos, mas sugere através de testes com substâncias encontradas em outras partes da planta.

3.2 Objetivos deste capítulo

Sabe-se que o néctar é uma das recompensas florais mais importantes sendo uma das principais fontes alimentares dos insetos, borboletas, beija-flores e que são consumidos também por outros seres vivos. O mesmo apresenta elevada concentração de carboidratos, enquanto os demais constituintes apesar de terem sido extensivamente citados na literatura não foram ainda estudados de forma direta. Este capítulo tem por objetivo estudar os constituintes do néctar de *Spathodea campanulata* com ênfase na detecção e identificação de compostos secundários.

¹²¹ Trigo, J. R., Santos, W. F., *Ver. Brasil. Biol.* **2000**, 60, 537.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Estudo de Metodologia para análise do néctar

Com o objetivo de encontrar a melhor metodologia para estudo dos compostos secundários foram realizados vários experimentos.

Inicialmente, o néctar foi coletado de botões e flores jovens com o auxílio de uma seringa e o volume coletado variou de 30 μL à 400 μL , sendo então liofilizado e mantido sob refrigeração.

a) Utilização de Microcoluna com Octadecilsilano como Fase Estacionária

A fase estacionária para cromatografia octadecilsilano (ODS) ou C-18 é obtida da reação da sílica com organosilanos, levando à formação de ligações siloxano. Esta fase estacionária é apolar e muito utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência no modo reverso.

Nesta otimização foram utilizadas microcolunas Sep-pak[®] da Waters. A microcoluna foi condicionada com água, metanol e acetonitrila bidestilados. Uma alíquota de acetonitrila foi concentrada sob corrente de nitrogênio e analisada por cromatografia gasosa, sendo considerada o “branco” da análise.

Teste utilizando o néctar sintético

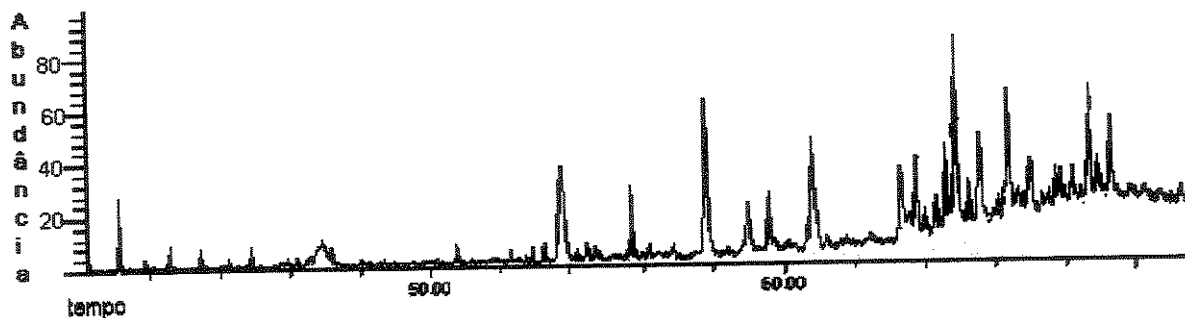
Preparou-se uma solução contendo 50% de sacarose, 1% de linalool, 1% de β -pineno e 1% de nerolidol. Um volume de 0,5 mL desta solução foi eluída utilizando a microcoluna de C-18, posteriormente foi lavada com 2,5 mL de água bidestilada e 2,5 mL de acetonitrila. A fração orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 e analisada por CG-EM. A massa de compostos orgânicos apolares foi de 0,8 mg correspondendo a 53% da massa inserida na coluna.

Análise do néctar de *Spathodea campanulatta*

Uma parte do néctar liofilizado (50 mg) foi dissolvido em água (0,5 mL). Esta solução foi eluída na microcoluna, depois lavada com 2,5 mL de água bidestilada. Eluiu-se então com 2,5 mL de acetonitrila bidestilada. A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, concentrada sob corrente de nitrogênio e analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Esta análise revelou a inexistência de outros compostos além daqueles detectados no controle.

b) Cromatografia em Coluna Preparativa Utilizando como Fase Estacionária Sílica Gel 230-400 Mesh

Buscando outra metodologia para análise do néctar de *Spathodea campanulatta*, optou-se por empregar uma coluna cromatográfica contendo sílica gel. Esta fase é polar e retém os carboidratos, que são moléculas polares. Procedeu-se o empacotamento da coluna com acetato de etila bidestilado. Separadamente 300 mg de néctar liofilizado foram dissolvidos em metanol e adsorvidos em sílica gel. A sílica contendo o néctar adsorvido foi colocada na coluna e a mesma foi eluída com acetato de etila, metanol e finalmente com metanol/água (1:1) para recuperar os compostos polares. A segunda fração acetoetílica coletada foi concentrada e submetida a análise em CG-EM, revelando uma mistura complexa de compostos, conforme o C 24.



C 24. Cromatograma de íons totais do néctar de *Spathodea campanulata*, obtido em coluna HP5(30m, 0,25 mm, 0,25 µm), com temperatura do forno de 35°C(5min) elevada a 290°C(15 min) a uma razão de 4°C/min, com fluxo de gás hélio de 1 mL/min e temperatura de injetor de 260°C.

Dentre estes compostos destacam-se a presença de triterpenos (30 carbonos).

c) Microextração em Fase Sólida

Buscando uma metodologia mais rápida que pudesse simplificar a coleta dos compostos contidos no néctar investigamos o uso da micro-extração em fase sólida, um método desenvolvido recentemente e muito utilizado na análise de traços.

A Micro Extração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*)¹²² é uma técnica de extração e pré-concentração rápida, simples e que dispensa o uso de solventes extratores e manipulação excessiva da amostra, descrita por Arthur e colaboradores no início da década de 90 e que tem sido extensivamente estudada e aplicada a diversas matrizes como alternativa às metodologias tradicionais. O seu princípio básico é simples: uma fibra de sílica é recoberta com um filme de material sorvente (polímeros ou adsorventes sólidos), é exposta à amostra ou ao seu espaço confinante (*headspace*). Os analitos contidos na amostra ou no *headspace* são sorvidos na camada de recobrimento da fibra; os materiais extraídos podem ser então transferidos para um instrumento analítico adequado para a sua separação, identificação e quantificação. Frequentemente, a cromatografia gasosa é a técnica instrumental empregada para as etapas de identificação e quantificação que se seguem à extração: a fibra é introduzida diretamente no injetor aquecido do cromatógrafo, sendo os analitos coletados dessorvidos termicamente e arrastados pelo fluxo de gás de arraste para a coluna cromatográfica. Pode-se fazer extrações seletivas por escolha adequada do tipo de material de recobrimento da fibra.

As fibras para SPME para uso com este dispositivo são fornecidas montadas em uma agulha, sendo que este conjunto é rosqueado no aplicador. Desta forma o aplicador é reutilizável, bastando trocar o conjunto (fibra+agulha)

¹²² Pawliszyn, J.; *Solid phase microextraction: theory and practice*, Wiley –VCH, Inc., 1997.

quando necessário. Os fundamentos no desenvolvimento de metodologias de SPME – envolvendo otimização de parâmetros como posição da fibra no injetor do CG, temperatura e tempo de dessorção, condições de foco dos analitos na ponta da coluna cromatográfica, tempo e temperatura de extração, velocidade de agitação da amostra líquida durante a extração; pH e força iônica da amostra, dentre outros, já foram abordados na literatura.

Em comparação com outras técnicas de preparo de amostra, a SPME apresenta uma série de características interessantes. Ela é mais rápida e operacionalmente mais simples que muitas das técnicas tradicionais; além disso, não exige equipamento analítico especialmente modificado e dedicado a esta finalidade. O manuseio reduzido das amostras em comparação às técnicas convencionais minimiza a possibilidade de artefatos. Os analitos podem ser extraídos e transferidos diretamente ao cromatógrafo gasoso, sem intervenção de solventes extratores cujo uso, pode ser uma fonte de contaminantes.

Análise do néctar

Resolvemos utilizar esta técnica na análise de componentes do néctar de *Spathodea campanulata*. Para isto escolhemos uma fibra contendo polidimetilsiloxano (PDMS) como adsorvente, com espessura de recobrimento de 30 μm . Este recobrimento é utilizado para adsorção de analitos não polares e é estável em água e solventes orgânicos miscíveis em água. A fibra foi estabilizada (uma hora a 250°C) conforme sua especificação em um cromatógrafo gasoso e inserida no néctar durante uma hora, a 30°C (Figura 20). Para manter a homogeneidade do néctar utilizou-se agitação magnética. Após este tempo a fibra foi levemente lavada com água e seca com papel absorvente e introduzida no injetor de um CG-EM para análise dos compostos adsorvidos.

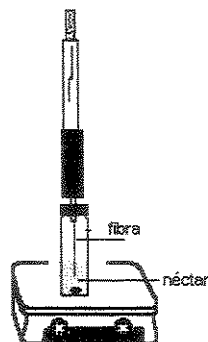
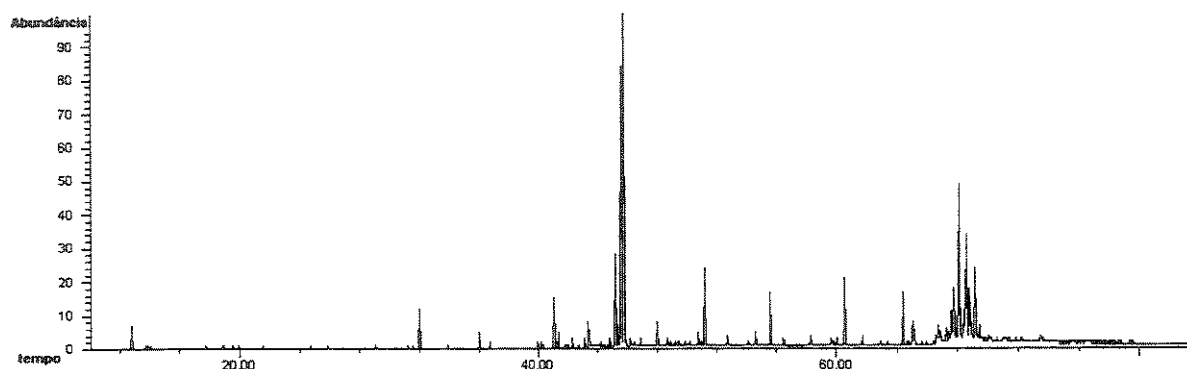


Figura 20. Análise por SPME utilizando néctar de *S. campanulata*.

Foi obtido um cromatograma no qual não foram detectados compostos orgânicos.

d) Extração com Solvente Orgânico

Como as técnicas usadas até o momento envolviam uma grande quantidade de solvente orgânico em relação à quantidade de compostos secundários no néctar, decidiu-se fazer uma extração simples com solvente orgânico. Para isso foi utilizado 2 mL de néctar e 1 mL de acetato de etila. A dificuldade experimental foi a formação de emulsão e a necessidade de uma grande quantidade de sulfato de sódio para eliminação da água. A fração foi concentrada em fluxo de nitrogênio e analisada por CG-EM (C 25).



C 25. Cromatograma de íons totais dos compostos (AFN2B) obtidos do néctar de *Spathodea campanulata*, através de extração com acetato de etila.

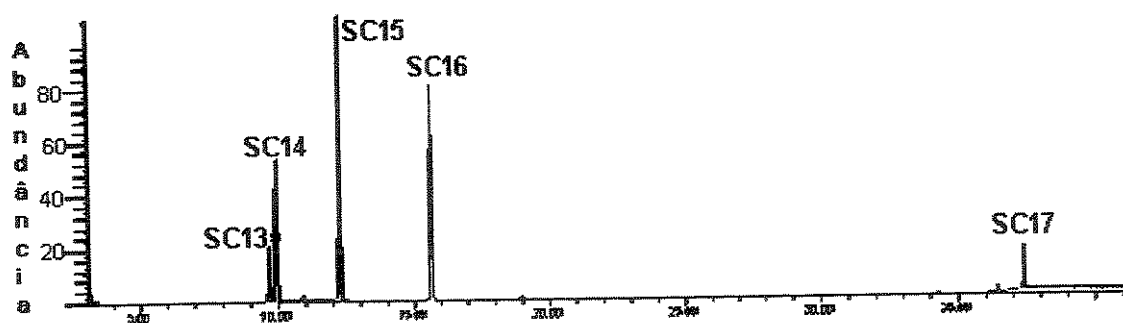
Como podemos observar, neste espectro apareceram dois sinais principais, além dos triterpenos encontrados no método onde empregamos a coluna de sílica gel.

3.3.2 Identificação direta dos compostos presentes no néctar

a) Análise de carboidratos

A maior parte do néctar é constituída de carboidratos e a composição química destes compostos também varia entre as plantas. Um dos métodos para esta determinação de carboidratos é a utilização de CG-EM através da sililação da mistura encontrada no néctar e de padrões também derivarizados.

A fração aquosa obtida da coluna de sílica foi liofilizada e seca em dessecador sob vácuo e pentóxido de fósforo. Posteriormente procedeu-se a derivatização por sililação e analisou-se a mistura por CG-EM (C 26).



C 26. Cromatograma de íons totais do néctar de *S. campanulata* sililado, obtido em coluna HP5, 30m, 150°C-290°C(15 min), $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$, $f = 1,3 \text{ mL}/\text{min}$.

Objetivando determinar a constituição química desses carboidratos procedeu-se a sililação de padrões. Os padrões após sililação foram injetados com a mistura de carboidratos. Desta forma confirmou-se a composição dos carboidratos do néctar de *Spathodea campanulata* (Tabela 22).

Tabela 22 Composição dos carboidratos encontrados na fração aquosa do néctar das flores de *S. campanulata*

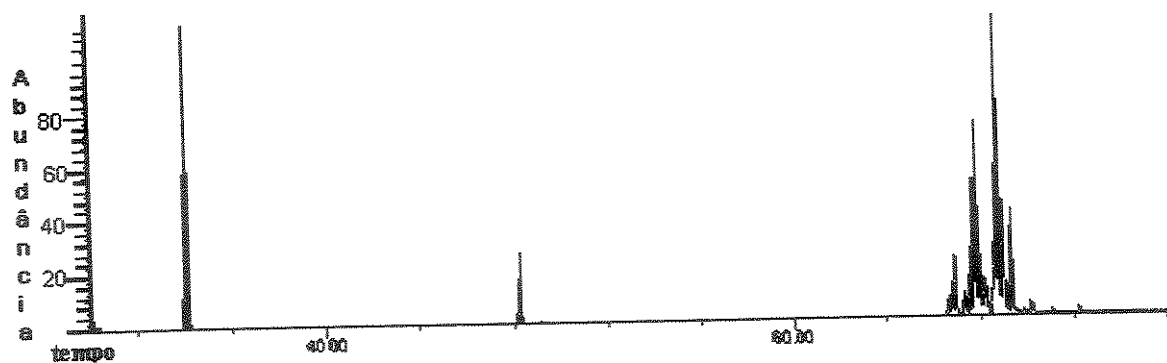
Nº do pico	Composto	% no néctar sililado/mº no C 26
1	sorbose	6,0/SC13
2	frutose	22,0/SC14
3	glicose	40,0/SC15
4	manose	29,9/SC16
5	sacarose	2,1/SC17
TOTAL		100,0

b) Análise dos compostos secundários presentes no néctar

Através dos espectros de massas de alguns compostos e da resposta da biblioteca Wiley275 procedemos a injeção de padrões disponíveis no laboratório: colesterol, estigmasterol, cicloartenol, ergosterol, ácido palmítico e eicosanol. Destes confirmamos a presença de estigmasterol e colesterol no néctar de *S. campanulatta* (E 52, pg.174). A biblioteca Wiley 275 do EM sugeriu também a presença do pentaacetato de α e β -D-glucopirranose. Injeção do néctar com reforço destes dois padrões foram realizadas e confirmou-se a presença destes compostos.

3.3.3 Análise indireta dos constituintes do néctar

Durante a coleta do néctar das flores observou-se que a sépala, antes da abertura da flor, continha um líquido. Resolvemos fazer uma análise desse líquido por cromatografia em camada delgada onde se observou uma mistura de compostos, sendo então submetidos a derivatização com BSTFA e analisados por CG-EM (C 27).



C 27. Cromatograma de íons totais do líquido da sépala de *Spathodea campanulata*. Obtido em coluna HP5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), com temperatura do forno de 35°C(5min) elevada a 290°C(15 min) a uma razão de 4°C/min, com fluxo de gás hélio de 1 mL/min e temperatura de injetor de 260°C.

Os espectros de massas revelaram que esta mistura é composta por triterpenos e alguns esteróides, alguns destes encontrados no néctar. Como o isolamento de compostos do néctar não é possível devido a sua baixa concentração, decidimos realizar uma extração e fracionamento desses compostos e para caracteriza-los e utilizá-los como padrões.

a) Extração dos constituintes do líquido da sépala e fracionamento

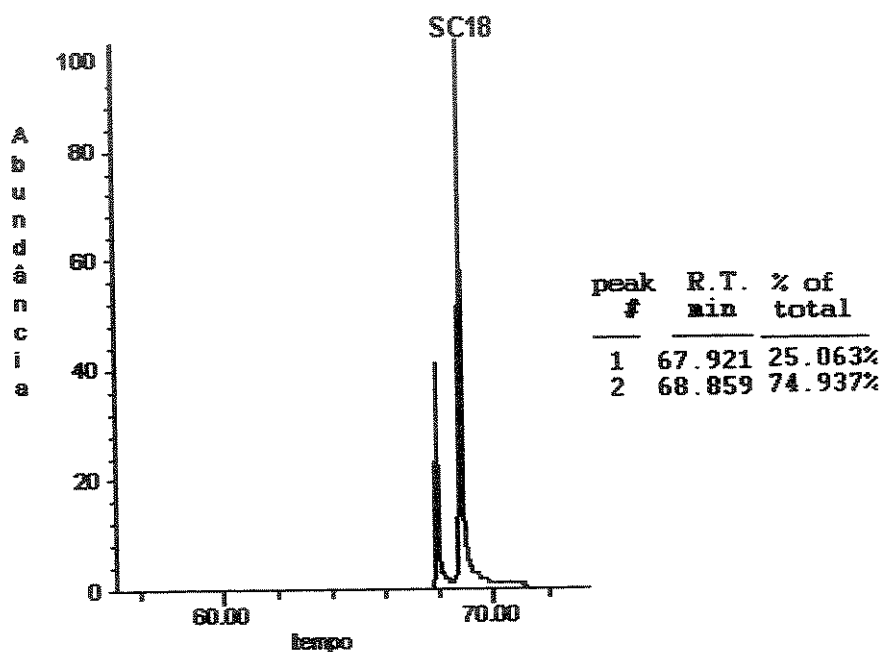
Alguns destes compostos estão presentes no néctar e buscando isolá-los extraiu-se 200 mL deste líquido com acetato de etila e obteve-se desta forma 120 mg de um óleo amarelo viscoso e uma massa esbranquiçada. Como se tratava de uma mistura de triterpenos e derivados destes optou-se por proceder sua separação cromatográfica. Este extrato foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária sílica gel 230-400 Mesh impregnada com nitrato de prata (10%) e como fase móvel gradientes de hexano/acetato de etila como eluente. As frações foram coletadas em frascos com 10 mL de volume e submetidas a CCD utilizando como eluente hexano/acetato de etila nas

proporções 4:1 nas frações mais apolares e 1:1 nas mais polares. Foram obtidas várias frações das quais foram analisadas por métodos físicos: AFLV4 e SC19.

b) Análise da fração SC18

Uma das frações analisadas SC18 foi submetida à CG-EM (C 28), apesar de não estar pura foi submetida à análise por RMN uni e bidimensional.

O espectro de massas (E 53, pg. 175) do composto principal de SC18 foi comparado com os dados da biblioteca Wiley275 que indicou, com 98% de similaridade, cicloeucalenol.



C 28. Cromatograma de íons totais do líquido da fração SC18. Obtido em coluna HP5 (30m, 0,25mm, 0,25 μ m) utilizando um programa de temperaturas de 35°C(5 min)-290°C(15 min), a uma razão de 4°C/min e fluxo de hélio constante de 1 mL/min e temperatura do injetor de 240°C.

No espectro de massas deste composto observou-se o íon molecular com m/z 426, correspondendo à fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. O íon com m/z 408 corresponde à perda de 18 u.m.a. correspondendo a uma molécula de água. A saída subsequente de uma metila fornece o íon com m/z 393. Na Figura 21

encontra-se uma sugestão da literatura¹²³ para a fragmentação do cicloeucalenol, que coincide com o que é visto no espectro de massas.

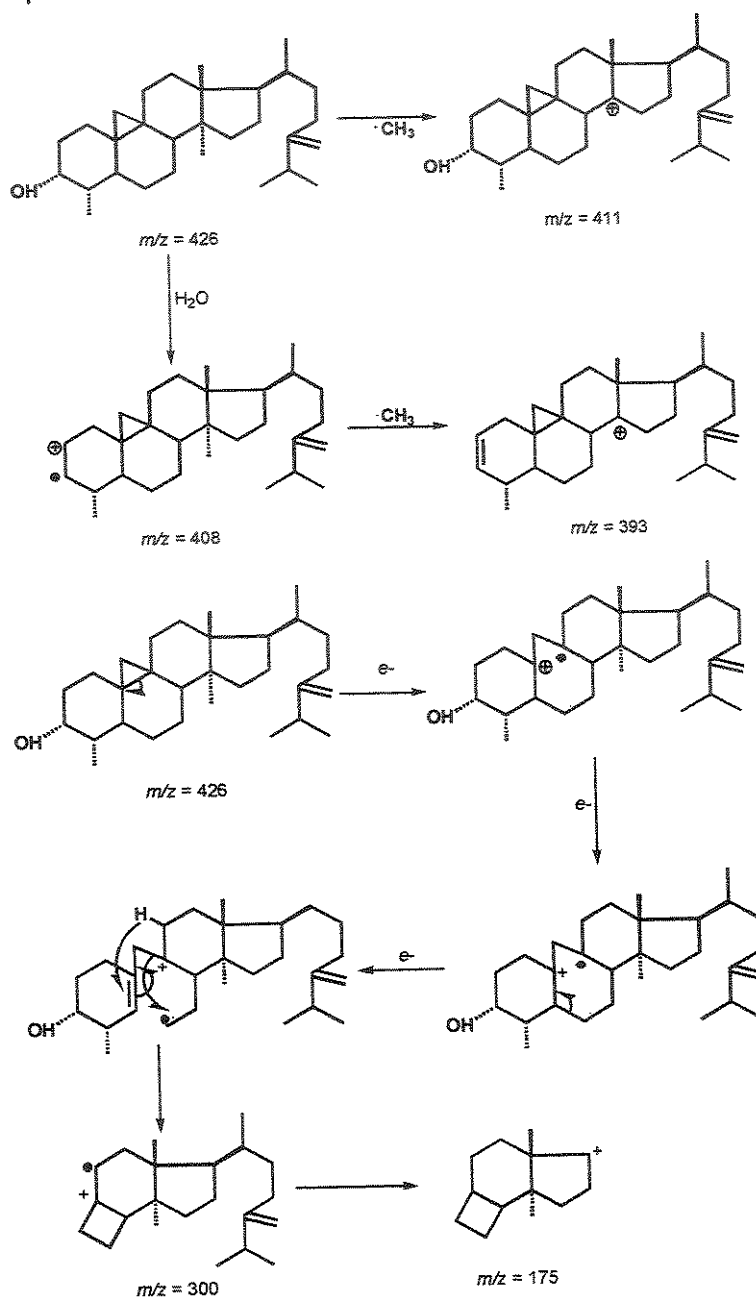


Figura 21. Fragmentação proposta para o cicloeucalenol¹²³.

O ponto de fusão e a rotação específica foram medidos e comparados com o da literatura¹²⁴. Quanto ao ponto de fusão não coincidiu com o encontrado na

¹²³ Waller, G.R., *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, Library of Congress Catalog Card Number, 251-290 e 351-286, 1972.

literatura, mesmo quando o composto foi submetido às mesmas condições para eliminar água (100°C, sob vácuo por 3 horas). Obtivemos um valor de 110°C enquanto que o descrito na literatura foi de 140°C. Esta incompatibilidade de valores pode ser explicada pela impureza da nossa amostra. Quanto à medida da rotação óptica obtivemos um valor de $[\alpha]_{20}^D + 44,6^\circ$ (CHCl_3 , c 4), enquanto a literatura descreve um valor de $[\alpha]_{20}^D + 45^\circ$ para o mesmo solvente.

Foram realizados também experimentos de ressonância magnética nuclear através de técnicas uni e bidimensionais.

No espectro de RMN de ^1H (E 54, pg. 175) encontramos dois dubletos em δ 0,14 e 0,35 ($J = 4,0$ Hz) correspondendo a um hidrogênio cada, estes sinais são característicos de hidrogênios diastereotópicos de triterpenos que possuem um ciclopropano ligado nos carbonos 9 e 10. Além destes sinais uma série complexa de sinais entre 0,50 e 2,40 ppm correspondendo a hidrogênios metilênicos e metínicos dos anéis do triterpeno e das metilas angulares ligadas a eles. Em δ 3,10 encontra-se um sinal complexo que corresponde a um hidrogênio carbinólico. Foram observados dois sinais com integração para um hidrogênio cada um, em δ 4,60 (d , $J = 1\text{Hz}$) e δ 4,71, esta região corresponde à região de duplas ligações, que sugerem uma dupla terminal.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado de ^1H (E 55, pg. 176) apresenta 30 sinais, correspondendo a 30 carbonos. Análise deste espectro juntamente com o espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135 e 90) (E 56, pg. 176) mostraram um carbono sem hidrogênio em δ 156,65, correspondendo a um dos carbonos de uma dupla ligação e em δ 105,75, observa-se um metileno, que foi atribuído a uma dupla ligação terminal. Em δ 76,44 encontramos um metino que pela região em que é encontrado deve ser de um carbono ligado à oxigênio, o que é confirmado pela fórmula molecular ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$) e o espectro de infravermelho (banda de hidroxila). No espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135 e 90) pode-se observar a presença de 12 metilenos, 6 metilas e 7 metinos.

¹²⁴ (a) Cox, J.S.G.; King, T.J.; King, F.E.; *J.Chem. Soc.* **1955**, 1384. (b) Cox, J.S.G.; King, T.J.; King, F.E.; *J.Chem. Soc.* **1959**, 514. (c) Ourisson, G.; Crabbé; Rodig, O. R.; *Tetracyclic Triterpenes*, Éditions Scientifiques Hermann, **1964**.

Comparando os dados obtidos através destes espectros com os dados da literatura^{125,126} para o cicloeucalenol (SC18), verificamos que são coincidentes. Na Tabela 23, encontramos os deslocamentos químicos do composto.

Através de experimentos de RMN de ¹H (NOESY 1D) realizamos o estudo da configuração relativa de alguns grupos desta molécula. Incidimos um pulso sobre o hidrogênio “endo” diastereotópico na posição 19 (E 57, pg. 177) e observamos o incremento dos sinais dos hidrogênios ligados ao carbono 4, na metila 30, no hidrogênio da posição 19 (*endo*) e em um dos hidrogênios da posição 6, sinais estes que estão todos na posição β . O incremento no hidrogênio da fusão dos anéis B e C (H-8) permite afirmar que esta fusão é *cis*.

Seguindo nossos estudos incidimos um pulso sobre o sinal no hidrogênio carbinólico (H-3) e observamos incrementos (E 58, pg. 177) em um dos hidrogênios das posições 1 e 2 e na metila H-30 (α). No entanto o incremento mais importante na determinação da conformação foi o observado para o hidrogênio da posição 5, através do qual podemos atribuir a fusão entre os anéis A e B como sendo *trans*. Estes experimentos permitiram também atribuir a posição β para a hidroxila.

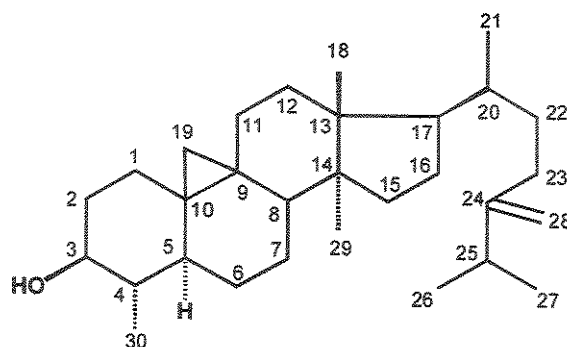
A confirmação da posição do grupo ligado ao carbono C-17 foi obtida pela irradiação da metila na posição H-29 (α), onde obteve-se incrementos nos hidrogênio H-17 fixando esta posição como sendo α , conseqüentemente o outro grupo ligado a este carbono (R) pode ser atribuído como estando em posição β . Outros incrementos foram observados em H-11, H-16, H-15, H-12 e H-7 permitindo inferir a posição α para estes sinais (E 59, pg. 178).

Desta forma, foi possível atribuir todos os sinais de RMN do cicloeucalenol, que estão de acordo com a atribuição de Kikuchi e colaboradores¹²⁵(Tabela 23).

¹²⁵ Kikuchi, T.; Kadota, S.; Tsubono, K.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 2475.

¹²⁶ Chari, V.M.; Khuong-Huu, F.; Sangare, M.; Bekarert, A.; Devys, M.; Barbier, M.; Lucas, G.; *Tetrahedron Lett.* **1975**, 22, 1787.

Tabela 23. Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos para o cicloeucaenol (CDCl₃, 300, 067 MHz).



Posição	literatura ¹²⁴		SC18	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$
1	1,55 e 1,28	30,88	1,53 (α , <i>m</i>) e 1,27 (β , <i>m</i>)	30,74
2	1,98 e 1,42	34,90	1,97 (α , <i>m</i>) e 1,40 (β , <i>m</i>)	34,75
3	3,21	76,64	3,22(α , <i>ddd</i> , <i>J</i> = 11,0; 8,7 e 4,5 Hz)	76,44
4	1,16	44,69	1,13 (β , <i>m</i>)	44,51
5	1,20	43,43	1,18 (α , <i>m</i>)	43,25
6	1,67 e 0,58	24,73	1,65 (α , <i>m</i>) e 0,55 (β , <i>dq</i> , <i>J</i> = 12,2; 12,5; 12,5 e 2,5 Hz)	24,63
7	1,05 e 1,30	25,22	1,00 (<i>m</i>) e 1,28 (<i>m</i>)	25,13
8	1,58	46,90	1,56 (β , <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,5 4,0 z)	46,80
9	-	23,65	-	23,51
10	-	29,65	-	29,46
11	1,20 e 1,97	27,08	1,19 (<i>m</i>) e 1,99 (<i>m</i>)	26,92
12	1,62	32,99	1,60 (<i>m</i>)	32,81
13	-	45,45	-	45,27
14	-	49,00	-	48,81
15	1,30	35,42	1,27 (<i>m</i>)	35,29
16	1,30 e 1,92	28,18	1,30 (<i>m</i>) e 1,90 (<i>m</i>)	28,06
17	1,62	52,31	1,63 (<i>m</i>)	52,11
18	0,97	17,84	0,97 (β , <i>s</i>)	17,77
19	0,14 e 0,38	27,28	0,14 (' <i>exo</i> ', <i>d</i> , <i>J</i> = 4,5Hz) e 0,38 (' <i>endo</i> ', <i>d</i> , <i>J</i> = 4,0 Hz)	27,20
20	1,40	36,21	1,41 (<i>m</i>)	36,06
21	0,89	18,42	0,90 (<i>d</i> , <i>J</i> =6,5 Hz)	18,30
22	1,14 e 1,57	35,13	1,12 (<i>m</i>) e 1,58 (<i>m</i>)	34,93
23	1,89 e 2,12	31,41	1,90 (<i>m</i>) e 2,10 (<i>m</i>)	31,26
24	-	156,89	-	156,65
25	2,23	33,90	2,20 (<i>sept</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz)	33,75
26	1,02	22,06	1,02 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	21,96
27	1,03	21,94	1,0 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	21,83
28	4,66	106,05	4,66 (<i>d</i> , <i>J</i> =1,0 Hz) e 4,71(1H)	105,75
29	0,89	19,21	0,90 (<i>s</i>)	19,10
30	0,98	14,46	0,98 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	14,37

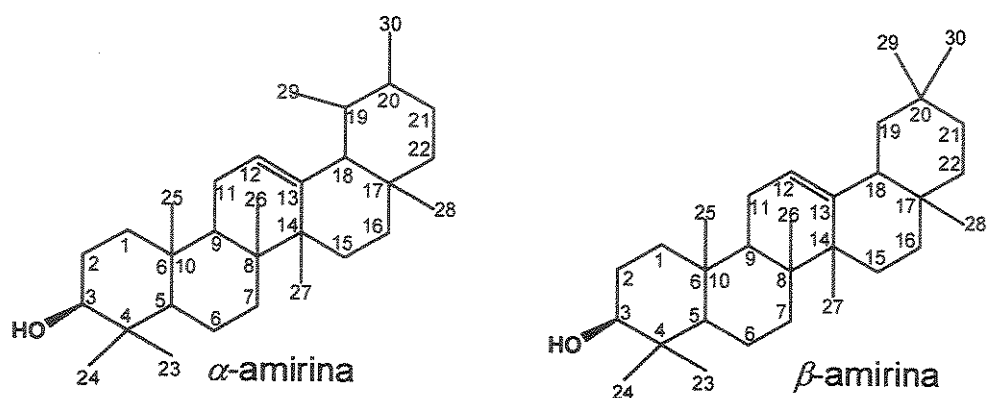
d) Análise da fração SC19

Outra fração da primeira coluna cromatográfica foi submetida à purificação. Após várias tentativas utilizando coluna cromatográfica com sílica gel e sílica gel impregnada com 10%, 20% e 30% de nitrato de prata eluída com vários sistemas de eluentes, placas preparativas com estes sistemas não foi possível a separação.

Quando comparamos estes espectros com os da biblioteca Wiley 275 o verificamos alta similaridade com a α -amirina e β -amirina (E 60, pg. 178) . Para avaliar se na composição da mistura estes compostos estavam presentes foram realizados espectros de RMN de ^{13}C desacoplado (E 61, pg. 179). Comparando com a literatura¹²⁷, encontramos sinais que comprovam a presença destes compostos na mistura (Tabela 24).

¹²⁷ Mahato, S.B.; Kundu, A.; *Phytochemistry* **1994**, 37, 1517.

Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C das α e β -amirinas da literatura e da mistura SC19.

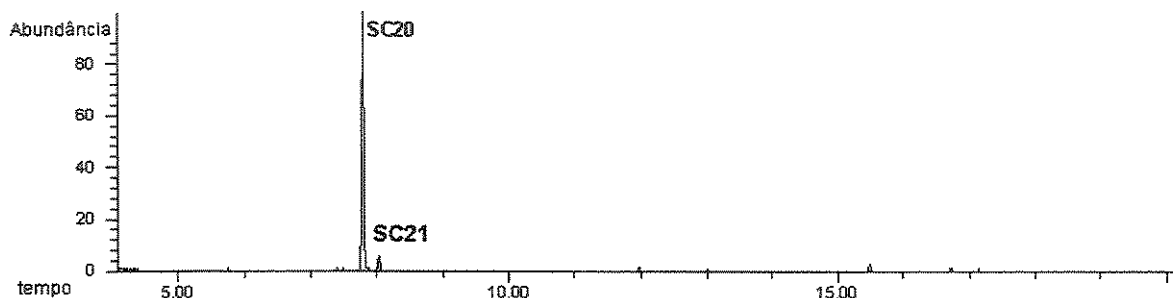


Nº do C	α -amirina		β -amirina	
	literatura	SC19	literatura	SC19
1	38,7	38,68	38,7	38,76
2	27,2	27,26	27,3	27,39
3	78,3	78,82	79,0	79,01
4	38,7	38,56	38,8	38,76
5	55,2	55,18	47,7	47,73
6	18,3	18,30	37,6	37,17
7	32,9	32,90	32,8	32,80
8	40,0	39,99	38,8	38,56
9	47,7	47,69	47,7	47,62
10	36,9	36,93	37,6	38,03
11	23,3	23,34	23,6	23,51
12	124,3	124,40	121,8	121,78
13	139,3	139,57	145,1	145,18
14	42,0	42,06	41,8	41,69
15	28,7	28,60	26,2	26,13
16	26,6	26,63	27,0	27,20
17	33,7	33,73	32,5	32,50
18	58,9	58,04	47,4	47,20
19	39,6	39,59	46,9	46,80
20	39,6	39,64	31,1	31,08
21	31,2	31,24	34,8	34,72
22	41,5	41,51	37,2	37,15
23	28,1	28,21	28,2	28,11
24	15,6	15,61	15,5	15,49
25	15,6	15,67	15,6	15,57
26	16,8	16,78	16,9	16,85
27	23,2	23,25	26,0	26,05
28	28,1	28,08	28,4	28,40
29	17,4	17,46	33,3	33,33
30	21,3	21,39	23,7	23,68

3.3.4 Análise dos componentes voláteis do néctar

Com o objetivo de realizar um estudo completo realizamos a coleta dos compostos voláteis do néctar, que apresenta um aroma acentuado. Para este estudo utilizamos o método de coleta dinâmica que já foi extensivamente utilizado neste trabalho e no nosso grupo de pesquisa.

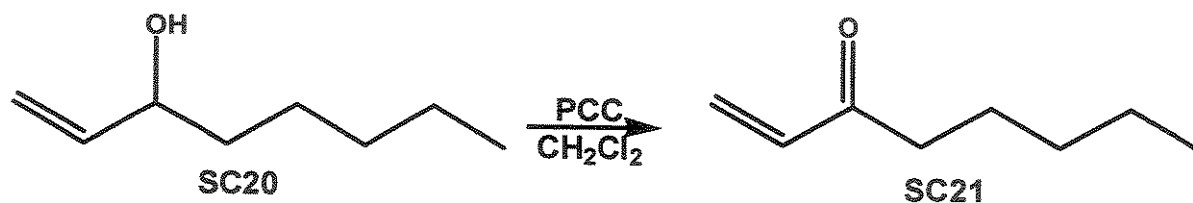
Néctar fresco foi coletado e colocado em um balão de fundo redondo e mantido a 30°C, um sistema adequado para coleta de voláteis utilizando como adsorvente Porapak-Q®, após 3 horas os voláteis foram dessorvidos com diclorometano e submetidos à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Assim obtivemos o cromatograma C 29 onde podemos observar a presença de dois compostos, um deles majoritário.



C 29. Cromatograma de íons totais dos compostos voláteis do néctar de *Spathodea campanulata*.

Obtivemos os índices de retenção para os dois compostos e comparamos com o espectro de massas e realizamos injeção como reforço de padrão que permitiu a identificação do pico 2 como o 1-octen-3-ol. A fragmentação do espectro de massas para o composto 1 foi coerente com a 1-octen-3-ona (E 62, pg. 178).

Para confirmar a presença deste composto realizamos a oxidação do 1-octen-3-ol para a cetona correspondente (Esquema 3), realizamos a injeção com reforço deste padrão o que confirmou a presença do composto 1.



Esquema 3. Reação de oxidação do 1-octen-3-ol.

3.3.5 Investigação da toxicidade do néctar e AFLVT, SC18 e SC19 para abelhas e borboletas

Como já foi comentado anteriormente, a maioria dos constituintes do líquido da sépala são encontrados também no néctar e nas flores de *S. campanulatta* são encontrados muitos insetos mortos (abelhas, vespas, formigas, etc.). Buscando investigar a causa dessa morte o Dr. Volker Bithrich (IB/Unicamp) juntamente com seus alunos realizou um experimento em que abelhas e borboletas foram colocadas na presença de solução de sacarose, solução de sacarose contendo 4% de AFLVT(extrato bruto da vesícula) e outras duas contendo 1% dos seguintes frações: SC18 e SC19. No entanto como foram usados borboletas e insetos coletados no campo eles não aceitam a dieta e acabam morrendo de inanição e lutando para sair do cativeiro.

Outro experimento foi realizado utilizando agora o extrato total da sépala (AFLVT) em sacarose e o néctar em um bebedouro para pássaros. Estas soluções foram trocadas todos os dias e colocadas próximo de ninhos de abelhas. Também foram realizados experimentos com formigas, onde as mesmas foram alimentadas com estas soluções durante vários dias. Em nenhum destes experimentos foi observada morte das abelhas e formigas utilizadas no experimento.

Um terceiro experimento utilizando néctar da planta em um bebedouro atraiu insetos e beija-flores, no entanto os mesmos consumiram o néctar normalmente sem apresentar nenhum comportamento anômalo.

3.4 Conclusão parcial II

O estudo do néctar de *Spathodea campanulata* envolveu a determinação dos constituintes voláteis, carboidratos e permitiu a detecção direta de constituintes secundários, além da identificação de alguns dos mesmos.

Este é o primeiro trabalho da literatura onde foram detectados compostos secundários (exceto carboidratos) no néctar. A metodologia que utilizamos permitiu identificar no néctar de *Spathodea campanulata*: α -amirina, β -amirina, cicloeucalenol, colesterol e estigmasterol. Outros triterpenos estão presentes, no entanto os métodos que empregamos para sua purificação foram ineficientes. O estudo dos voláteis revelou a presença de dois constituintes que são feromônios de insetos e poderiam desta forma estar atuando na atração destes. No entanto não foram realizados testes de campo.

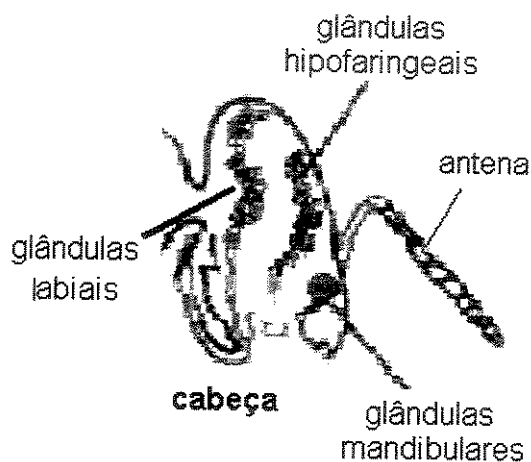
Todas as soluções testadas não se revelaram tóxicas para uma série de insetos testados. O Dr. Volker Bithrich sugere que os insetos morrem afogados na tentativa de “roubar” o néctar, pois as paredes da flor são escorregadias, o que pode ser uma estratégia da flor contra os ladrões, pois a mesma é polinizada por pássaros.

4. ESTUDO DAS RELAÇÕES ECOLÓGICAS ENTRE DUAS ESPÉCIES DE ABELHAS MELIPONIINAE

4.1 Introdução

Já falamos um pouco sobre as abelhas sem ferrão que participam do fenômeno de pseudocópula. As abelhas possuem vários mecanismos de comunicação e utilizam os feromônios que são produzidos por várias glândulas encontradas principalmente na cabeça e no abdômen. A função destes ainda é pouco conhecida e o interesse do estudo dos compostos químicos envolvidos nesta relação tem aumentado.

Como as glândulas da cabeça (mandibular, labial, hipofaríngea) são muito pequenas e apenas alguns especialistas conseguem dissecar as mesmas, normalmente o que é estudado é o extrato cefálico da cabeça. Estudos de extratos cefálicos de várias espécies de abelhas permitiram a identificação de uma série de componentes: entre eles: alcanos, alcenos, ácidos, cetonas, heterociclos, compostos aromáticos, ésteres, álcoois, terpenos, etc^{128,129}, enzimas como as esterases também fazem parte destes extratos.



Outra glândula importante é a glândula de Dufour, encontrada no abdômen de todas as fêmeas dos himenópteros. Nas abelhas está localizada próximo ao canal vaginal e sua secreção é liberada por este. Em abelhas solitárias produz substâncias hidrofóbicas que são usadas no ninho e na proteção dos ovos das

¹²⁸ Francke, W.; Lübke, G.; Schröder, W.; Reckziegel, A.; Imperatriz-Fonseca, V.; Engels, E.; Hartfelder, K.; Radtke, R.; Engels, W. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 562.

¹²⁹ Schmitt, T.; Strohm, E.; Herzner, G.; Bicchi, C.; Krammer, G.; Heckel, F.; Schreier, P.; *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 2469.

flutuações de humidade e contra infestações por microrganismos¹³⁰, nas abelhas sociais ainda não foi determinada sua função. O estudo dos constituintes destas glândulas revelou a presença de lactonas macrocíclicas saturadas de 18-26 carbonos e ésteres isopentenílicos¹³¹, alcanos, álcoois, aldeídos, cetonas e acetatos de cadeia longa, ésteres derivados do geraniol¹³², alcenos e acetatos de cadeia longa¹³³.

Outras glândulas importantes localizadas no abdômen das abelhas são as glândulas de cera que produzem ceras utilizadas na construção dos ninhos, além de ser um importante semioquímico no reconhecimento entre as castas (nas abelhas sociais), interespecífico e para a reprodução. Sua constituição básica é de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres de cadeia longa¹³⁴. Já citamos anteriormente no Capítulo 2 a importância destes compostos para a atração e pseudocópula.

Durante nossos estudos tivemos contato com grupos de pesquisa que trabalham com abelhas e nos foi proposto o estudo de uma relação ecológica temporária entre as espécies de abelhas Meliponinae: *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 e *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836. Uma colônia de *Melipona scutellaris* foi invadida por uma colônia de *Melipona rufiventris*, este tipo de invasão ocorreu na Fazenda Aretuzina de propriedade do Dr. Paulo Nogueira e já tinha sido relatada em seu livro: *Vida e criação de abelhas sem ferrão*¹³⁵. Uma colaboradora deste pesquisador, a Dra. Eda Flavia Lotufo verificou o fenômeno novamente na mesma fazenda e propôs o estudo das ceras encontradas sobre o corpo das abelhas da colônia comum e das colônias independentes, todas da Fazenda Aretuzina. O autor cita que isso já havia ocorrido e que após um tempo a colônia invasora saiu da colônia invadida.

¹³⁰ Michener, C.D.; *The bees of the world*, The Johns Hopkins University Press, Massachusetts, p. 913, **2000**.

¹³¹ Duffield, R.M.; LaBerge, W.E.; Cane, J.H.; Wheeler, J.W.; *J. Chem. Ecol.* **1982**, *8*, 535.

¹³² Patrício, E.F.; López, L.C.; Maile, R.; Morgan, E.D.; *Apidologie* **2003**, *34*, 359.

¹³³ Abdalla, F.C.; Jones, G.R.; Morgan, D.; Cruz-Landim, C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 621.

¹³⁴ Simmons, L.G.; Alcock, J.; Reeder, A.; *Animal Behaviour* **2003**, *66*, 677.

¹³⁵ Nogueira, P.; *Vida e criação de abelhas sem ferrão*, Ed. Nogueirapis, **2000**.

Realizamos uma vasta procura na literatura buscando encontrar outras citações sobre o fenômeno e sobre os compostos químicos envolvidos na relação, no entanto nada foi encontrado, mesmo quando buscamos por outros insetos.

Decidimos então realizar o estudo da constituição química das ceras secretadas pelas glândulas que se encontram no abdômen de operárias de 4 colônias:

- 2 colônias de *Melipona rufiventris*, sendo uma delas a colônia pura (só com indivíduos de *M. rufiventris*) e da colônia invasora (mista).
- 2 colônias de *Melipona scutellaris*, sendo uma delas a colônia pura (só com indivíduos de *M. scutellaris*) e da colônia invadida (mista).

4.2 Objetivos do capítulo:

Esta parte do trabalho teve como objetivos o estudo da constituição química das ceras de operárias de 4 colônias acima citadas e a comparação destes constituintes buscando verificar se a convivência entre as espécies provocou alguma alteração química.

4.3 Discussão dos resultados

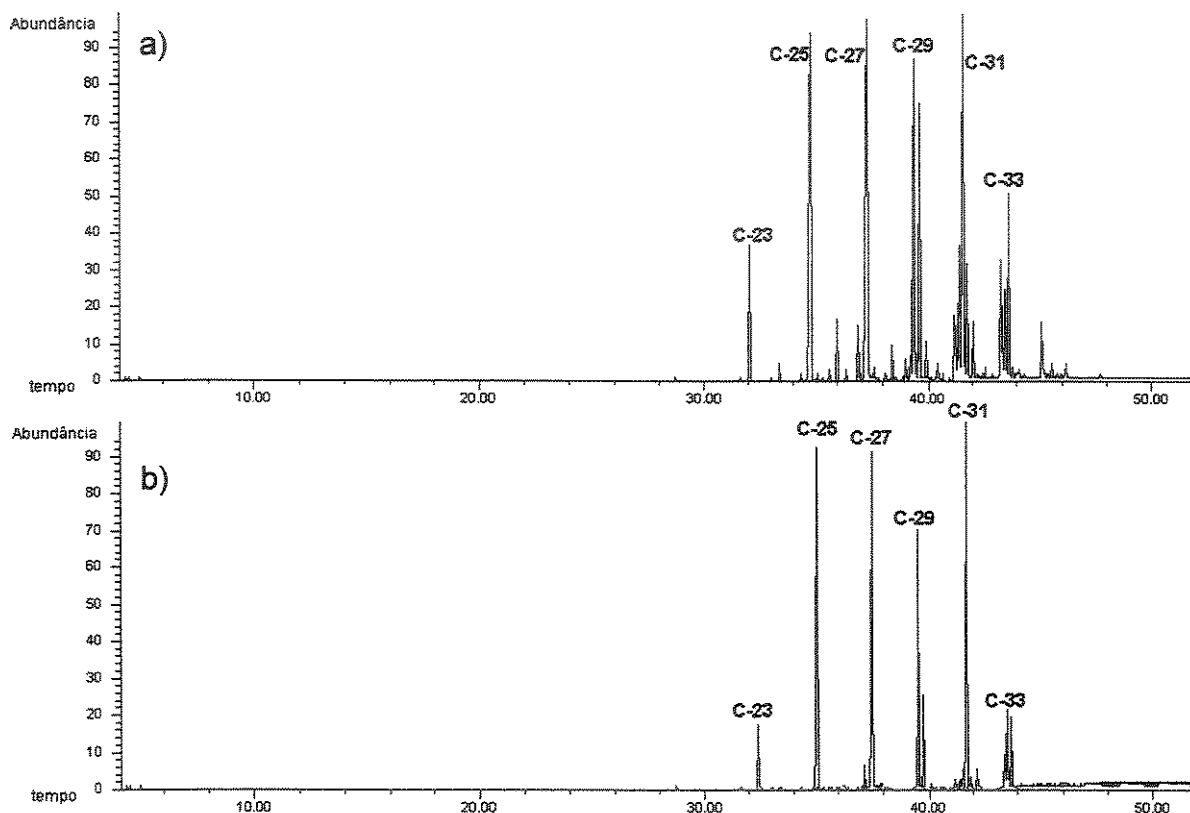
4.3.1 Coleta das abelhas e obtenção dos extratos

As abelhas (3-5 unidades de cada colônia) foram coletadas na Fazenda Aretuzina (São Simão - SP) sendo imediatamente congeladas e transportadas para o Instituto de Química – Unicamp.

Para a obtenção do extrato da glândula lavamos o abdômen das operárias com hexano bidestilado, evaporamos com auxílio de fluxo de nitrogênio e obtivemos de 0,3 a 0,5 mg de um material na forma de cera branca.

4.3.2 Análise dos extratos das colônias de *Melipona rufiventris* por CG-EM

Os extratos das ceras das abelhas das colônias puras e mista (invasora) de *Melipona rufiventris* foram submetidas a análise por CG-EM (C 30). Neste podemos verificar que a diferença principal entre os cromatogramas é a proporção entre os constituintes.



C 30. Cromatogramas de íons totais da cera do abdômen de operárias de *M. rufiventris*: a) de colônia pura e b) de colônia mista (invasora). Obtido em coluna HP-5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), com temperatura do forno de 50°C elevada a 310°C(15 min) a uma razão de 6°C/min, com fluxo de gás hélio de 1 mL/min e temperatura de injetor de 240°C.

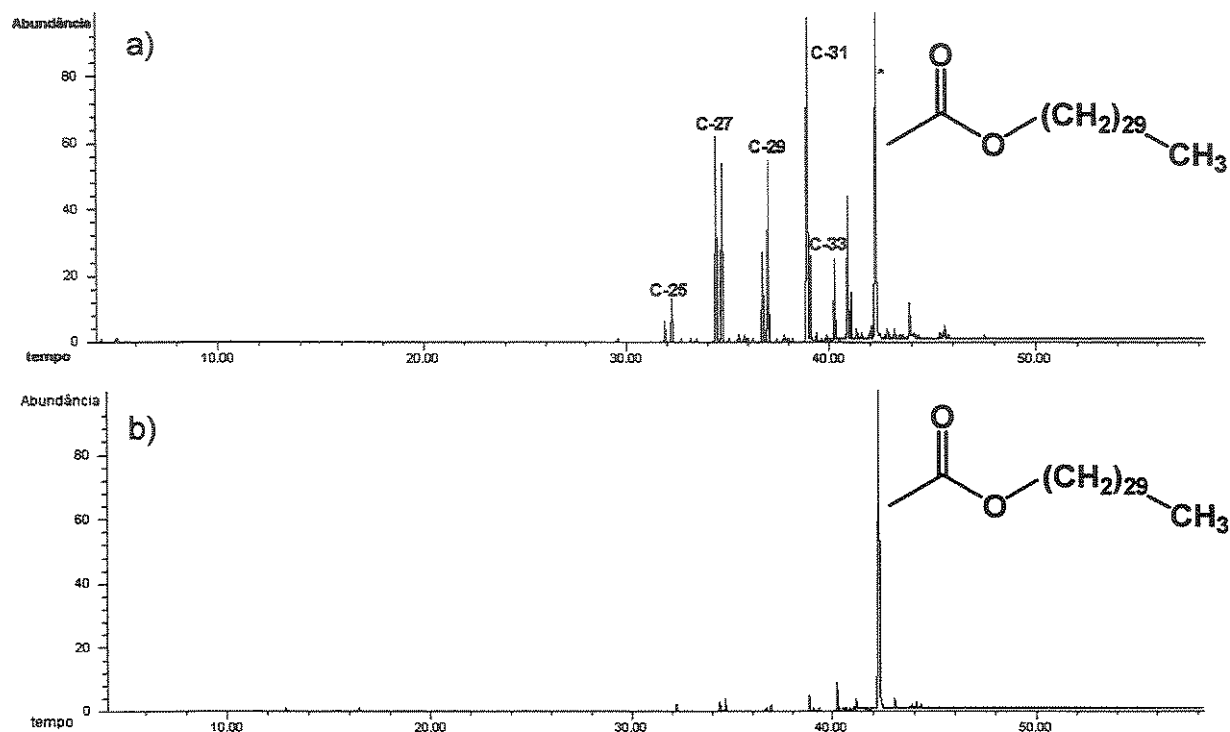
A análise dos espectros de massas destes compostos permitiu sugerir a presença de alcanos e alcenos de cadeia normal. Realizamos a identificação pelos mesmos métodos empregados na análise das ceras das rainhas de

Scaptotrigona postica. Assim, nos extratos das ceras das abelhas da colônia pura foram identificados alcanos (contendo número ímpar de carbonos: C-17 a C-33 e com número par de carbonos: C-24 a C-30). Foram identificados também alcenos, contendo número ímpar de carbonos (C-23 a C-33) e número par de carbonos (C-30 e C-32). Nestes extratos foram identificados também alcadienos com 29 (2 isômeros), 31 (3 isômeros), 32 (2 isômeros), 33 (2 isômeros) átomos de carbono, respectivamente.

No extrato da colônia de *M. rufiventris* de colônia mista (invasora) foram identificados alguns alcanos e alcenos, no entanto foram observadas algumas modificações na constituição. Os alcanos tiveram redução no número de compostos detectados, pela ausência de C-17, C-19, e C-30. Outra diferença foi a ausência dos alcadienos e dos alcenos contendo 32 átomos de carbono (ditriacontadieno e dos dois isômeros do ditriaconteno).

4.3.3 Análise dos extratos das colônias de *Melipona scutellaris* por CG-EM

As ceras de *M. scutellaris* de colônia pura e mista (invadida) foi analisado por CG-EM (C 31). Os extratos da colônia de *M. scutellaris* pura apresentaram vários componentes, enquanto que a da colônia mista apresentou um componente majoritário.



C 31. Cromatogramas de íons totais da cera do abdômen de operárias de *M. scutellaris*: a) de colônia pura e b) de colônia invadida (mista). Obtido em coluna HP-5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), com temperatura do forno de 50°C elevada a 310°C(15 min) a uma razão de 6°C/min, com fluxo de gás hélio de 1 mL/min e temperatura de injetor de 240°C.

Identificamos os compostos pelas mesmas técnicas já discutidas anteriormente. As ceras das abelhas da colônia puras apresentaram em sua composição alcanos de cadeia normal (ímpares: C-23 a C-33 e pares: C-26 e C-28). Identificamos a presença de dois isômeros do pentacoseno e nonacoseno,

enquanto que o tricoseno, heptacoseno, untrianconteno e ditriaconteno apresentaram apenas um isômero. Não foram encontrados alcadienos nesta amostra.

Realizamos então a análise dos constituintes da colônia de *M. scutellaris* mista. Iniciamos pela identificação do constituinte principal (88%) que apresentou íon molecular m/z 480 (E 63, pg. 179). Neste espectro foi observada a eliminação de m/z 60 que corresponde à perda de uma molécula de ácido acético, sugerindo que o mesmo poderia ser um acetato. A análise deste espectro permitiu inferir a fórmula molecular como $C_{32}H_{64}O_2$.

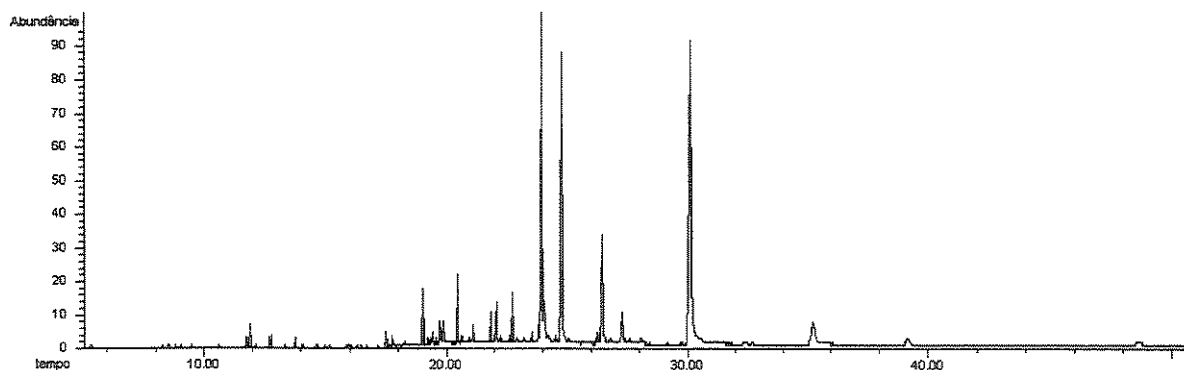
Como se tratava de uma amostra contendo um composto majoritário resolvemos analisá-lo por RMN de 1H (E 64, pg.180) e DEPT 135 e 90 (E 65, pg.180) a fim de confirmar se o acetato estava ligado a um metileno, metino ou a um carbono sem hidrogênio.

Quando analisamos o espectro de RMN de 1H podemos identificar a presença da metila do grupo acetato na forma de um singlete em 2,05 ppm e de um sinal característico de hidrogênio(s) carbinólico(s) em 4,06 ppm. Integramos o sinal da metila para 3 hidrogênios e obtivemos integração relativa de 2 hidrogênios para o sinal do carbinólico. Para confirmar realizamos um espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135 e 90, E 65, pg. 180), onde confirmamos que o acetil está ligado a um metileno. Através destes dados confirmamos a presença do acetato de triacontanila como constituinte principal das ceras das operárias da colônia invadida de *Melipona scutellaris*.

4.3.4 Determinação da posição das duplas ligações

Nos extratos das ceras das abelhas foram identificados dois isômeros de alguns alcenos. Para estes isômeros temos duas possibilidades: podem ser isômeros geométricos (*E* e *Z*) contendo a dupla na mesma posição, ou ainda, podem ser dois isômeros contendo a dupla em posições diferentes. Submetemos todos os extratos à derivatização com DMDS (C 32). Analisando os cromatogramas dos derivados DMDS observamos a presença de apenas um

derivado dimetildisulfeto para cada par de alcenos. A análise dos espectros de massas destes derivados permitiram inferir a dupla ligação na posição 9 para os derivados detectados. Mesmo quando os isômeros estão em maior proporção como no extrato de *M. rufiventris* de colônia pura em que os dois isômeros nonacoseno estão em proporções de 0,58 e 9,67% encontramos apenas um derivado DMDS o que poderia sugerir que se tratam de isômeros geométricos, no entanto isto não pode ser afirmado necessitando de padrões de algum destes isômeros para que se pudesse confirmar este fato. Levando em conta este fato a Tabela 25 que contém as composições dos extratos das ceras nós denominamos os alcenos apenas por * e ** a fim de não realizarmos afirmações errôneas. No entanto podemos afirmar que a posição dos constituintes predominantes é 9. Em relação aos alcadienos não foram detectados derivados DMDS portanto não foi possível determinar a posição das duplas ligações, um dos fatores limitantes para estes compostos são a formação de vários derivados diferentes dependendo da posição das insaturações.



C 32. Cromatograma de íons totais do extrato cuticular de operárias da colônia pura de *M. scutellaris* derivatizado com DMDS. Obtido em coluna HP-5 (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), com temperatura do forno de 100°C elevada a 310°C(20 min) a uma razão de 4°C/min, com fluxo de gás hélio de 1 mL/min e temperatura de injetor de 240°C.

Tabela 25. Constituintes químicos das glândulas de ceras de operárias de *M. rufiventris* e *M. scutellaris* em colônias puras e mistas.

Compostos identificados	<i>M. rufiventris</i> colônia pura	<i>M. rufiventris</i> colônia mista	<i>M. scutellaris</i> colônia pura	<i>M. scutellaris</i> colônia mista
9-heptadeceno	0,04	-	-	-
heptadecano	0,01	-	-	-
nonadecano	0,01	-	-	-
heneicosano	0,03	-	-	-
*-tricoseno	0,04	-	0,04	-
**-tricoseno	0,01	-		-
tricosano	2,37	2,87	0,13	-
tetracosano	0,30	0,16	-	-
*-pentacoseno	0,14	0,06	0,76	0,1
**-pentacoseno	0,03		0,04	
pentacosano	17,52	19,93	1,83	0,72
hexacosano	1,03	0,49	0,31	-
*-heptacoseno	1,00	1,05	10,96	1,40
**-heptacoseno	0,12	0,06		
heptacosano	20,07	19,23	9,40	1,70
*-octacoseno	0,13	0,11	-	0,22
*-octacoseno	0,16		-	
octacosano	0,60	0,23	0,32	1,03
nonacosadieno (isômero 1)	0,43	0,10	-	-
nonacosadieno (isômero 2)	0,03		-	-
*-nonacoseno	0,58	12,92	4,06	-
**nonacoseno	9,67	0,29	0,21	-
nonacosano	7,41	4,48	9,26	-
*-triaconteno (isômero 1)	0,03	0,17	-	-
*-triaconteno (isômero 2)	0,34		-	-
triacontano	0,13	-	-	-
hentriacontadieno (isômero 1)	1,57	0,15	-	-
hentriacontadieno (isômero 2)	0,94	0,33	-	-
hentriacontadieno (isômero 3)	0,43	0,07	-	-
*-hentriaconteno	3,35	1,10	22,28	2,51
**-hentriaconteno	14,95	20,79		

Continuação da Tabela 25				
hentriacontano	2,38	0,70	4,23	-
ditriacontadieno	0,19	-	-	-
*-ditriaconteno	0,08	-	0,14	-
**-ditriaconteno	0,27	-		-
tritriacontadieno (isômero 1)	2,81	2,07	-	-
tritriacontadieno (isômero 2)	0,81	5,51	-	-
*-tritriaconteno	1,85	1,59	7,16	0,06
**-tritriaconteno	3,64	3,70		
tritriacontano	0,17	0,01	2,21	-
acetato de triacontanila	1,32	0,15	20,90	87,99
octadecenoato de octadecenila	-	-	0,84	-
não identificados	4,69	1,68	4,92	4,27
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0

4.4 Conclusão parcial III

Através da análise dos resultados obtidos verificamos que as quatro colônias são constituídas por compostos hidrofóbicos: hidrocarbonetos e dois ésteres.

A maior variação na constituição entre as colônias de *M. rufiventris* e *M. scutellaris* puras e mistas foi detectada em *M. scutellaris*, justamente a colônia que foi invadida. Esta diminuiu a produção de hidrocarbonetos e concentrou seus esforços em produzir o éster que não é produzido por nenhuma colônia de *M. rufiventris*. Podemos interpretar este fato como uma proteção da colônia contra a espécie invasora.

Os constituintes dos ninhos das 4 colônias estão sendo estudados no nosso grupo pela mestrandia Adriana Pianaro e com este trabalho poderemos verificar qual o tipo de compostos coletados por cada colônia.

5. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho permitiu o treinamento em diversas técnicas, entre elas a coleta e identificação de compostos voláteis e fixos. Foram identificados uma série de componentes envolvidos na química da polinização de orquídeas da subtribo Maxillariinae. O estudo das espécies com polinização por atração sexual demonstraram modificações entre a química de flores não polinizadas e polinizadas. O estudo dos extratos hexânicos de *Mormolyca ringens* demonstraram o mimetismo químico da flor com a rainha virgem. Este é o primeiro estudo de orquídeas desta subtribo.

O estudo do néctar de *Spathodea campanulata* permitiu a detecção de compostos secundários do néctar e a identificação de alguns dos seus constituintes. Sendo este estudo pioneiro. Na investigação da composição das ceras de *M. rufiventris* e *M. scutellaris*, ocorreu uma grande modificação na composição química das ceras da espécie invadida.

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Materiais e métodos gerais empregados em todo o estudo

6.1.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos nos espectrômetros Varian Gemini 300 operando com um campo magnético B_0 7 T (300,067 MHz) e Varian INOVA-500 operando com campo magnético B_0 11 T (499,883 MHz).

Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$) e referência CHCl_3 ($\delta = 7,27$).

As constantes de acoplamento (J), foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: dubleto (d), duplo dubleto (dd), duplo duplo dubleto (ddd), duplo quarteto (dq), multipletto (m), quarteto (q), singletto (s), tripletto (t), septeto ($sept$).

Medidas de incremento de nOe ("Nuclear Overhauser Effect") foram realizadas em amostras não desgaseificadas utilizando-se pulsos seletivos para excitar os hidrogênios selecionados.

6.1.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN ^{13}C foram registrados nos espectrômetros Varian Gemini 300 (76,452 MHz) e Varian INOVA-500 (125,696 MHz).

Os sinais de deslocamentos químicos de carbonos foram registrados em ppm, sendo δ 0,00 para o TMS, δ 77,0 para CHCl_3 .

As interpretações dos espectros de RMN ^{13}C foram realizadas com auxílio da técnica DEPT 135 e 90 ("Distortionless Enrichment by Polarization

Transfer”), onde: CH_3/CH = sinal positivo (+), CH_2 = sinal negativo (-) e C_0 = carbono quaternário ausente (intensidade nula).

Foram utilizadas nas interpretações dos compostos as técnicas de RMN 2D: HSQC – *Homonuclear Single Quantic Correlation* (correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, para uma ligação - $^1J_{\text{CH}}$) e HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$, para várias ligações – $^nJ_{\text{HC}}$).

6.1.3 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas – CG/EM

Os experimentos utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizados em um cromatógrafo a gás da firma Hewlett Packard (modelo HP-MSD 6870-série II) acoplado a um detetor de massas do mesmo fabricante (modelo HP-MSD 5970), operado à 70 eV. O cromatógrafo era equipado com colunas capilares de sílica fundida dos tipos: HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Como gás de arraste, foi empregado o hélio. As injeções das amostras foram da ordem de 1 μL de uma solução de 20 ppm do óleo floral em acetato de etila.

6.1.4 Espectrometria no Infravermelho - (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro modelo 1600-FTIR da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, em filmes sobre cela de NaCl (6000 cm^{-1} a 600 cm^{-1}) ou em cela de KBr (6000 a 400 cm^{-1}). Utilizou-se como padrão de referência um filme de poliestireno, (Part. n^o 186-2082) com absorção em 1601 cm^{-1} .

6.1.5 Rotação Óptica – $[\alpha]_D^{20}$

Os valores de rotação óptica foram determinados em um polarímetro LEP A-2 Carl Zeiss com lâmpada de sódio (λ 589 nm, precisão de 0,005°) e no equipamento POLAMAT A, com lâmpada de filamento de mercúrio (λ 546 nm), onde foi necessária fazer a conversão para a lâmpada de sódio seguindo as equações:

Conversão da lâmpada de mercúrio para a lâmpada de sódio:

$$\alpha_{Na}^T = \alpha_{Hg} / 1,17543$$

Conversão da temperatura (T) para 20°C

$$\alpha_{Na}^{20} = \alpha_{Na}^T / [1 + 0,000143 (T-20)]$$

Rotação óptica específica:

$$[\alpha_{Na}^{20}] = \alpha_{Na}^{20} \text{ (rotação observada)} / \text{comprimento da cela (dm)} \times \text{concentração (g / mL)}.$$

6.1.6 Métodos Cromatográficos

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas com sílica gel 60, 0,063 - 0,200 mm, 70-230 mesh ASTM da marca Merck. O diâmetro interno e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material de partida. A proporção de sílica utilizada foi de aproximadamente 30 vezes o peso da amostra a ser purificada. As eluições dos compostos foram obtidas empregando-se solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade.

As purificações realizadas em coluna cromatográfica foram acompanhadas em placa de CCD (20 x 20 cm) da marca Merck sobre suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄.

A detecção dos compostos com grupos cromóforos nas placas foi feita utilizando-se a irradiação ultravioleta no equipamento Spectroline Model CM 10 sobre o comprimento de onda de λ 254 nm e/ou λ 365 nm.

As revelações dos compostos foram feitas utilizando-se o revelador anisaldeído preparado na proporção de *p*-anisaldeído:ácido sulfúrico:ácido acético - 0,5:1,0:50 mL (Allinger *et al.*). As placas cromatográficas foram pulverizadas com o revelador e aquecidas com o aquecedor COMALA-Steinel ou queimadas em chapas aquecidas da marca Thermolyne Cimarec 3.

6.1.7 Tratamento dos solventes

Os solventes utilizados para as extrações, colunas cromatográficas foram sempre tratados e destilados conforme descrito na literatura¹³⁶ e analisados por CG-EM para verificar a presença de impurezas. Todos os solventes utilizados em experimentos de extração de voláteis foram realizadas com solventes bidestilados.

¹³⁶ Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F.; Perrin, D. R.; *Purification of Laboratory Chemicals*, Copyright Pergamon Press, 2nd ed., 1980.

6.2 Experimentos envolvendo o estudo da química da polinização em Maxillariinae (Orchidaceae)

6.2.1 Localização das plantas e datas das coletas:

A coleta dos voláteis foi realizada segundo os locais, números de identificações e datas colocadas na Tabela 26. As coletas sempre foram realizadas em dias de sol e com temperatura ambiente de 25-32°C.

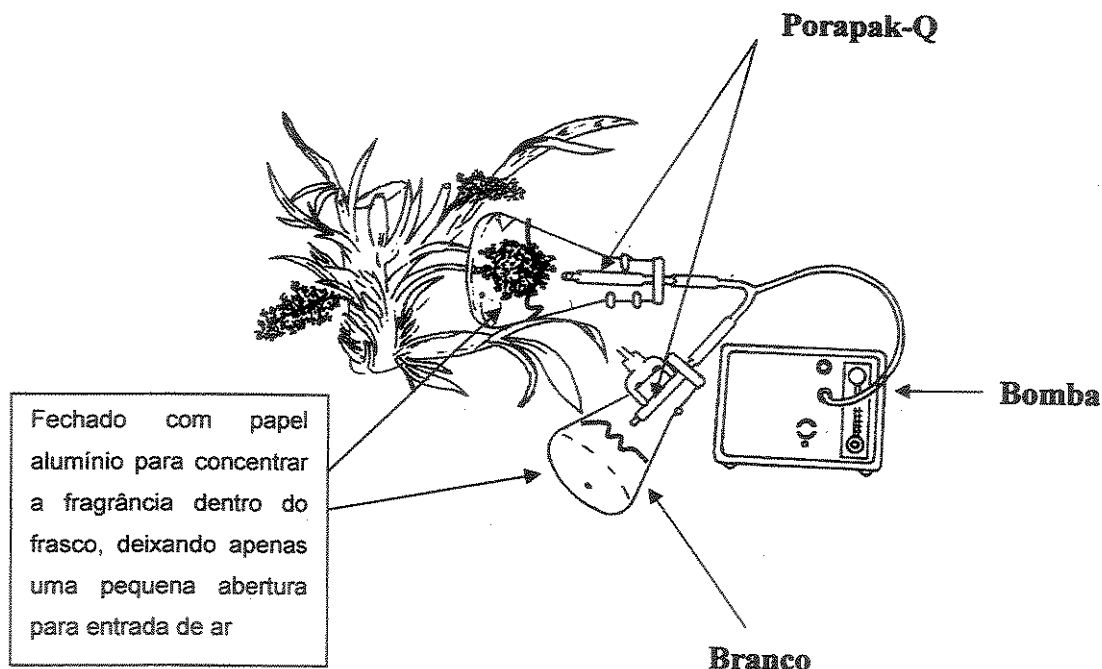
Tabela 26. Dados das coletas de fragrâncias.

espécie	Identificação	data	local	horário	observações
<i>E. odoratissima</i>	-	30/05/02	IB- Unicamp	11-13:00 h	-
<i>M. marginata</i>	247	07/02/03	IBt-SP	11-15:30h	-
<i>M. gracilis</i>	5416	20/02/03	IBt-SP	11:15-15:00 h	-
<i>M. rufescens</i>	Kohler 204		IB- Unicamp	11:00 – 14:00 H	duas coletas
<i>M. picta</i>	IV/00	14/06/03 20/06/03	IB- Unicamp	9:30-13:00 h 10:30-15:00 h	três coletas
<i>M. ubatubana</i>	216	09/07/03 21/07/03	IB- Unicamp	10:50-14:30 h 10:30-14:30 h	duas coletas
<i>M. oroleuca</i>	33422 20430	12/02/03 20/08/03	ESALQ	11-13:30 h 10:50-13:30 h	duas coletas
<i>M. rufescens</i>	204	17/07/03 21/07/03	IB- Unicamp	10:30-14:00 h	duas coletas
<i>M. chrysantha</i>	28379-D 19518	20/08/03 25/09/03	ESALQ	14-16:00 h 11-15:00 h	duas coletas
<i>M. leucaimata</i>	29196	16/06/03 20/08/03	ESALQ	10:50-13:30 h	duas coletas
<i>Mormolyca ringens</i>	7247	12/08/03 19/08/03	ESALQ	11-15:00 h	duas coletas
<i>T. egertonianum</i>	30188	20/08/03	ESALQ	14:00-16:00 h	duas coletas

Continuação da Tabela 26					
<i>T. obtusum</i>	VIII/1988	03/03/03	IB- Unicamp	11-15:00 h	várias análises
<i>T. turbinatum</i>	8239	12/02/03	ESALQ	11-14:30h	-
<i>M. alba</i>	-	20/03/04	IB- Unicamp	10:00 –15:00h	-
<i>M. barbosa</i>	-	20/03/04	IB- Unicamp	10:00 –15:00h	-

6.2.2 Obtenção dos voláteis por coleta dinâmica

Um tubo de vidro de 7 cm com diâmetro interno de 4 cm foi construído para conter as flores que foi conectado a uma mangueira e a uma bomba de vácuo LaMotte (500mL/min) por 50 mg de Porapak-Q, para reter os voláteis. Na entrada do tubo foi instalado outro tubo contendo o adsorvente a fim de se realizar um controle de voláteis encontrados no ambiente. Após um período de 2-4 horas os voláteis adsorvidos foram extraídos com 1 mL de diclorometano bidestilado e concentrados com fluxo de nitrogênio até um volume de 50 μ L. Deste volume 1 μ L foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A massa obtida em cada coleta não foi determinada devido à alta volatilidade e baixa concentração das amostras obtidas.



Foram sempre realizados experimentos de coleta dinâmica drenando o ar e as mangueiras utilizadas durante a coleta dos voláteis buscando detectar contaminantes. Quando foram detectados foram imediatamente descartados das análises.

6.2.3 Obtenção dos índices de retenção de Kovat's

Os extratos contendo os voláteis coletados dinamicamente foram analisados por CG-EM juntamente com uma amostra de padrões de hidrocarbonetos de cadeia normal (C-9 a C-35) obtidos de purificação de petróleo. Desta forma obtivemos um cromatograma contendo o tempo de retenção dos hidrocarbonetos e dos compostos provenientes dos voláteis da planta. Através destes dados aplicamos a fórmula¹³⁷:

$$I_{r_x} = 100n + 100\Delta n \frac{tr_x - tr_n}{tr_n - tr_m}$$

¹³⁷ Van den Dool, H.; Kratz, P.D.J; *Journal of Chromatography* 1963, 11, 463.

Onde:

I_{r_x} = valor de índice de retenção de x (valor a ser calculado);

n = número de carbonos do alcano que elui antes de x;

Δn = número de carbonos do hidrocarboneto que elui depois de x menos o número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes de x.

tr_x = tempo de retenção de x.

tr_n = tempo de retenção de n

tr_m = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois de x

Através desta fórmula obtivemos a maioria dos nossos índices de retenção. No entanto alguns foram obtidos através da equação da reta obtida através dos tempos de retenção dos hidrocarbonetos e seus índices de retenção padrão.

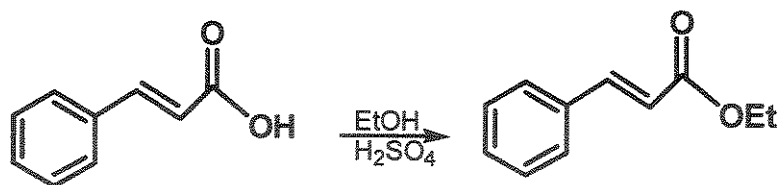
6.2.4 Obtenção de extratos de flores de *Mormolyca ringens* não polinizada

Quantidade variada de flores de *M. ringens* não polinizadas foram coletadas no Jardim Botânico da ESALQ e transportadas até o IQ-Unicamp, onde foram colocadas intactas em um frasco de capacidade de 10 mL contendo hexano bidestilado. Após 4 a 6 horas as flores foram retiradas do solvente e este removido com ajuda de uma corrente de nitrogênio até um volume de 50 μ L, dos quais 1 μ L foi analisado por CG-EM. O rendimento obtido na extração não foi determinado devido à volatilidade de alguns compostos contidos na amostra que poderiam ser eliminados da mesma se houvesse completa remoção do solvente. Não estamos especificando quantas flores foram coletadas, pois foram elaborados vários extratos de quantidades diferentes de flores que foram agrupados após análise por CG-EM devido à baixa concentração das amostras.

6.2.5 Obtenção de extratos de flores de *Mormolyca ringens* polinizada

Idem ao extrato da flor não polinizada.

6.2.6 Obtenção do padrão de cinamato de etila para comparação com constituintes do extrato das flores de *Mormolyca ringens*

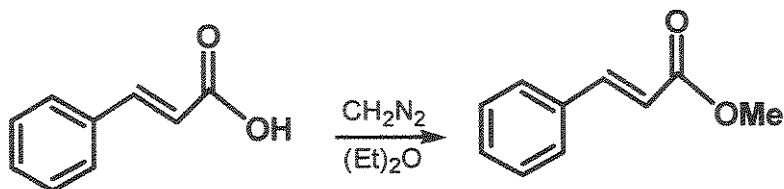


Em um balão de fundo redondo foram adicionados ácido cinâmico (5 mg), 1 mL de etanol e 200 μ L de ácido sulfúrico concentrado. O sistema foi mantido sob refluxo por uma noite. Após este tempo o aquecimento foi suspenso e realizada uma CCD utilizando como eluente hexano/acetato de etila (8/2) onde verificou-se completa transformação do ácido cinâmico. A mistura reacional foi resfriada com banho de gelo onde foram adicionados 2 mL de água e a solução resultante foi extraída com duas alíquotas de 2 mL de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio, seca sob sulfato de sódio, filtrada e o solvente removido em rotaevaporador. O resíduo foi analisado por EM e RMN de ^1H .

EM, m/z (%): 176 (M^+ , 25), 147 (27), 131 (100), 103 (42), 77 (28), 44 (2).

RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3), δ 1,25 (t, 3H, $J=7,0$ Hz); 4,30 (q, 2H, $J=7,0$ Hz), 6,45 (d, 1H, $J=16,2$ Hz), 7,32 (m, 3H), 7,51 (m, 2H), 7,70 (d, 1H, $J=16,2$ Hz).

6.2.7 Obtenção do padrão de cinamato de metila para comparação com constituintes do extrato das flores de *Mormolyca ringens*



Em um frasco com volume de 2 mL foram adicionados ácido cinâmico (1 mg) e 1 mL de uma solução etérea contendo diazometano. Após 10 min realizou-se uma CCD utilizando como eluente hexano/acetato de etila (4/1) onde verificou-se completa transformação do ácido cinâmico. O solvente foi evaporado com auxílio de corrente de nitrogênio e o resíduo foi submetido à análise por EM e RMN de ^1H .

- EM, m/z (%): 162 (M^+ , 50), 131 (100), 103 (72), 77 (40), 51 (10).

- RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3), δ : 3,81 (s, 3H), 6,45 (d, 1H, $J=15,9$ Hz), 7,38 (m, 3H), 7,53 (m, 2H), 7,72 (d, 1H, $J=15,9$ Hz).

6.2.8 Obtenção dos extratos cefálicos de rainhas virgens de *Scaptotrigona postica*

Dez rainhas virgens cultivadas “in vitro” foram fornecidas pelo Dr. W.E. Kerr da Universidade Federal de Uberlândia. Como o tempo de eclosão das mesmas foi diferente realizamos a confecção de dois extratos cada um dos quais com 5 abelhas. Decapitamos as mesmas com ajuda de um estilete e colocamos as cabeças em um frasco limpo contendo 200 μL de acetato de etila bidestilado. Com auxílio de um bastão de vidro maceramos as cabeças para que o conteúdo das glândulas internas fosse exposto ao solvente. Após 2 horas o conteúdo foi filtrado, o solvente evaporado em corrente de nitrogênio até um volume de 20 μL do qual 1 μL foi analisado por CG-EM. O mesmo procedimento foi realizado para as duas amostras.

6.2.9 Coleta de machos de *Nannotrigona testaceicornis* para realização de experimentos de eletroantenografia

Machos (20 unidades) de *Nannotrigona testaceicornis* foram coletados no orquidário da ESALQ (Piracicaba – SP) no período de 9:30 – 15 horas, quando estavam pousados sobre as flores não polinizadas de *M. ringens*. A coleta foi realizada com cuidado e com as mãos, os mesmos foram mantidos em um pote plástico escuro contendo vários orifícios para ventilação e algumas flores não polinizadas de *M. ringens*. Ao fim da coleta foram transportados até Campinas onde foram mantidos a 28°C e alimentados a cada duas horas com um auxílio de um bastão umedecido com uma solução a 10% de sacarose em água que era aproximado da cabeça do macho. No dia seguinte foram transportados até a Universidade Federal de São Carlos (São Carlos – SP) para as análises por eletroantenografia. O transporte de Piracicaba-Campinas-São Carlos e o cativeiro deixaram os machos agitados e dez deles acabaram morrendo.

6.1.10 Teste de atividade das antenas de machos de *N. testaceicornis* frente aos voláteis e extratos hexânicos de flores não polinizadas de *M. ringens*

Foram utilizados cinco machos de *N. testaceicornis* que tiveram suas antenas amputadas com auxílio de um bisturi. Duas antenas foram fixadas entre dois eletrodos de aço inoxidável com auxílio de um gel condutor (Spectra 360® electrode gel - Parker, Orange, New Jersey) que foi aplicado em cada parte do eletrodo.

O eletroantenograma foi realizando em um sistema EAG Syntech (Hilversum, The Netherlands). As antenas foram estimuladas por 0,3 segundos pelo ar purificado (1,2 mL/min) contendo um papel de filtro (0,8 cm) impregnado com 5 µL das soluções teste contido em uma pipeta de Pasteur. Estas soluções foram os voláteis de flores de *M. ringens* não polinizadas em diclorometano e o

extrato hexânico das flores não polinizadas em hexano (1 mg/mL). Os solventes (hexano e diclorometano) foram utilizados como controle das análises.

As soluções teste foram passadas sobre as antenas em intervalos de 90 segundos. O programa Syntech EAG normalizou os valores obtidos automaticamente. As respostas medidas dos diferentes extratos foram submetidos a análise estatística.

6.2.11 Obtenção dos extratos das glândulas de cera de rainhas virgens de *Scaptotrigona postica*

Os abdomens intactos das dez rainhas virgens anteriormente decapitadas também foram divididas em duas amostras contendo 5 unidades cada uma. O abdômen de cada rainha foi mergulhado rapidamente em hexano (1 minuto) para dissolução das ceras excretadas pelas glândulas. O solvente foi evaporado com auxílio de corrente de nitrogênio e uma alíquota foi analisada por CG-EM. Isto foi repetido para o outro grupo de abelhas.

6.2.12 Determinação da posição da dupla ligação dos compostos insaturados



Cada amostra (extrato hexânico de *M. ringens* polinizada e não polinizada e do extrato hexânico das rainhas virgens de *S. postica*) foi submetida à seguinte reação.

Cada extrato obtido foi colocado em um balão cônico onde foram adicionados 300 µL de dimetildissulfeto (DMDS) e 200 µL de uma solução de iodo em éter etílico (20 mg/mL). O sistema foi mantido sob agitação magnética a 50°C por uma noite. 500 µL de hexano bidestilado foram adicionados a mistura reacional juntamente com uma solução de tiosulfato de sódio (1 g/10mL) até que

a solução tornar-se incolor. A fase orgânica foi removida com auxílio de uma pipeta e mais 500 µL de hexano foram adicionados a solução para uma nova extração. As fases orgânicas foram reunidas, secas com Na₂SO₄, filtradas e evaporadas até um volume de 20 µL dos quais 1 µL foi submetido à análise por CG-EM.

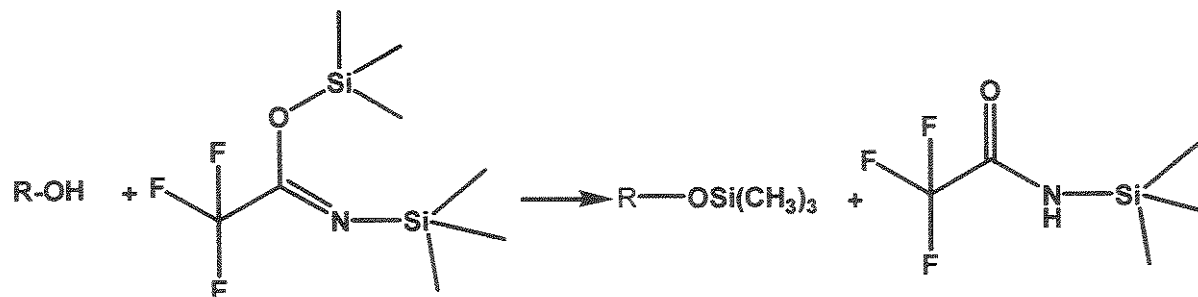
6.2.13 Coleta de flores para obtenção de extrato para estudo das recompensas florais

Flores de *Maxillaria cerifera*, *M. valenzuelana*, *M. violaceo punctata* e *M. brasiliensis* foram coletadas no Instituto de Botânica de São Paulo, enquanto *M. friedrichsthali*, *M. villosa*, *M. discolor* foram coletadas no orquidário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba. Estas coletas se estenderam durante todo o período de floração destas plantas e de vários vasos contidos nestes orquidários. As flores apresentam labelos medindo de 2 – 4 cm.

6.1.14 Extração das recompensas

Os labelos das flores foram colocados em um frasco de vidro de 10 mL, acetato de etila bidestilado foi adicionado sobre o mesmo e submetido a ultra-som por 5 minutos no caso de *M. cerifera* e *M. friedrichsthali*. Para *Maxillaria discolor*, *M. brasiliensis* e *M. violaceo-punctata* o material foi raspado com ajuda de uma espátula e dissolvido em acetato de etila. Já em *M. rufescens* e *M. villosa* cujas recompensas se apresentam na forma de tricomas os labelos foram extraídos por dois dias no mesmo solvente. Após a extração o material foi filtrado e o solvente evaporado em corrente de nitrogênio e guardado sob refrigeração.

6.1.15 Sililação das recompensas



Uma porção do extrato da flor (2 mg) foi submetida à sililação utilizando para isto 10 μL de *bis*(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) em piridina anidra (100 μL) por uma hora.

6.1.16 Purificação do extrato obtido de *Maxillaria cerifera*

35 mg do extrato obtido na extração do labelo foram submetidos à cromatografia em coluna (diâmetro de 5 cm) utilizando 30 g de sílica gel 230-400 mesh. A eluição e as frações obtidas foi em hexano e hexano/acetato de etila (1-100%). As frações foram recolhidas em frascos de 8 mL. A eluição foi acompanhada por cromatografia em camada delgada utilizando hexano/acetato de etila (8:2) como eluente e foram obtidas 7 frações:

Fração 1-60: 6 mg

Fração 61-70: 2 mg

Fração 71-80: 8 mg

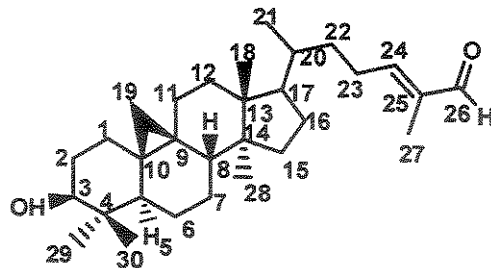
Fração 81-99: 0,3 mg

Fração 96-100: 3 mg

Fração 101-150: 15 mg (eluída com acetato de etila)

A fração 96-100 foi analisada por CG-EM e por RMN 1D e 2D sob o código MC1 e identificada por estes métodos como a cicloartenal.

- Dados espectroscópicos e espectrométricos de cicloartenal:



- **Aspecto físico:** cera branca.

- $[\alpha]_D^{20} + 24,0^\circ$ (CHCl_3 , c 1,7).

- **EM, m/z (%):** 440 (M^+ , 4), 422 (55), 407 (100), 379 (70), 373 (28), 300 (50), 285 (8), 203 (32), 175(44), 135 (58), 95 (90), 55 (96), 43 (60).

- **IV (KBr), ν_{\max} (cm^{-1}):** 3408, 2855, 1683.

- **RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3/TMS), δ** 1,26 e 1,58 (*m*, 2H, H-1), 1,58 (*m*, 1H, H-2 β), e 1,76 (*m*, 1H, H-2 α), 3,28 (*dd*, 1H, $J = 11,5$ e 4,0 Hz, H-3 α), 1,30 (*dd*, 1H, $J = 12,0$ e 4,0 Hz, H-5 α), 0,80 (*dq*, 1H, $J = 12,5$; 12,5; 12,5 e 2,5 Hz, H-6 β), 1,60 (*m*, 1H, H-6 α), 1,08 e 1,32 (*m*, 2H, H-7), 1,52 (*dd*, 1H, $J = 12,0$ e 4,0 Hz, H-8 β), 1,10 e 1,98 (*m*, 2H, H-11), 1,63 (*m*, 2H, H-12), 1,42 (*m*, 2H, H-15), 1,32 e 1,94 (*m*, 2H, H-16), 1,61 (*m*, 1H, H-17), 0,98 (*s*, 3H, H-18 β), 0,34 (*d*, 1H, $J = 4,5$ Hz, H-19 *exo*), 0,55 (*d*, 1H, $J = 4,5$ Hz, H-19 *endo*), 1,45 (*m*, 1H, H-20), 0,93 (*d*, 3H, $J = 6,0$ Hz, H-21), 1,24 e 1,62 (*m*, 2H, H-22), 2,0 e 2,3 (*m*, 2H, H-23), 6,48 (*td*, $J = 6,5$ e 1,5 Hz, H-24), 9,39 (*s*, 1H, H-26), 1,76 (*s*, 3H, H-27), 0,90 (*s*, 3H, H-28 α), 0,97 (*s*, 3H, H-29 α), 0,81 (*s*, 3H, H-30 β).

- **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ :** 31,96 (C-1), 30,48 (C-2), 78,82 (C-3), 40,42 (C-4), 47,08 (C-5), 21,10 (C-6), 26,01 (C-7), 47,98 (C-8), 19,94 (C-9), 26,06 (C-10), 26,42 (C-11), 32,88 (C-12), 45,37 (C-13), 48,83 (C-14), 35,52 (C-15), 28,20 (C-16), 52,18 (C-17), 18,08 (C-18), 29,71 (C-19), 35,99 (C-20), 18,10 (C-21), 34,77 (C-22), 26,06 (C-23), 155,65 (C-24), 139,08 (C-25), 195,46 (C-26), 9,17 (C-27), 19,32 (C-28), 25,44 (C-29), 14,00 (C-30).

6.2.17 Purificação da recompensa de *Maxillaria friedrichsthalii*

100 mg de extrato obtido da extração do labelo foram submetidos à purificação por cromatografia em coluna (diâmetro 5 cm) utilizando 35 g de sílica gel 230-400 mesh. Os eluentes foram hexano, gradientes de hexano e acetato de etila (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 20, 50 e 100% de acetato de etila) e metanol. As frações foram comparadas por CCD com hexano/ acetato de etila (8:2) e reunidas de forma que no final obtivemos as seguintes frações:

Fração 1-34: 2 mg

Fração 35-54: 4 mg

Fração 55-67: 2 mg

Fração 68-86: 2 mg

Fração 87-140: 12 mg

Fração 141-150: 7 mg

Fração 151-155: 12 mg

Fração 156: 34 mg (eluída com acetato de etila)

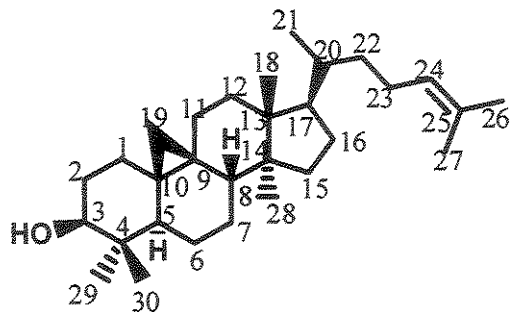
Fração 157: 40 mg (eluída com metanol)

A fração 87-140, denominada MFC1F87 foi novamente submetida à purificação.

Purificação da fração MFC1F87

A fração foi submetida à cromatografia em coluna (diâmetro 6 cm) utilizando 10 g de sílica gel 230-400 mesh e como eluente hexano e gradientes de hexano/acetato de etila (1,2,3 e 100%). A eluição foi acompanhada por CCD utilizando como eluente hexano/acetato de etila (8,5:1,5). As frações foram recolhidas em frascos de 8 mL. As frações 11-13 (6 mg) apresentaram-se homogêneas em CCD e foram denominadas MFC2F11 e submetidas à ressonância magnética nuclear (RMN 1D e 2D) que após análise permitiram identificar o composto como sendo o cicloartenol.

- Dados espectroscópicos e espectrométricos de cicloartenol:



- Aspecto físico: cera branca.

- $[\alpha]_D^{20}$ + 25,0° (CHCl₃, c 0,8).

- EM, m/z (%): 426 (M⁺, 18), 408 (35), 393 (60), 365 (29), 339 (16), 286 (42), 203 (24), 175 (37), 95 (69), 69 (100), 55 (55), 43 (42).

- IV (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹): 3408, 2855, 1683.

- RMN de ¹H (499,89 MHz, CDCl₃/TMS), δ : 1,25 (*m*, 1H, H-1 β), 1,56 (*m*, 1H, H-1 α), 1,58 (*m*, 1H, H-2 β), e 1,76 (*m*, 1H, H-2 α), 3,23 (*dd*, 1H, *J*= 12,0 e 4,0 Hz, H-3 α), 1,28 (*dd*, 1H, *J*= 12,0 e 4,0 Hz, H-5 α), 0,78 (*dq*, 1H, *J*= 12,5 e 4,0 Hz, H-6 β), 1,58 (*m*, 1H, H-6 α), 1,10 (*m*, 1H, H-7 α) e 1,90 (*m*, 1H, H-7 β), 1,54 (*dd*, 1H, *J*= 12,0 e 4,0 Hz, H-8 β), 1,10 e 1,98 (*m*, 2H, H-11), 1,63 (*m*, 2H, H-12), 1,37 (*m*, 2H, H-15), 1,30 (*m*, 1H, H-16 β), e 1,91 (*m*, 1H, H-16 α), 1,58 (*m*, 1H, H-17), 0,98 (*s*, 3H, H-18 β), 0,34 (*d*, 1H, *J*= 4,5 Hz, H-19 *exo*), 0,55 (*d*, 1H, *J*=4,5 Hz, H-19 *endo*), 1,40 (*m*, 1H, H-20), 0,89 (*d*, 3H, *J*=6,5 Hz, H-21), 1,10 e 1,45 (*m*, 2H, H-22), 1,86 e 2,10 (*m*, 2H, H-23), 5,10 (*td*, *J*= 6,5 e 1,5 Hz, H-24), 1,62 (*s*, 1H, H-26), 1,68 (*s*, 3H, H-27), 0,90 (*s*, 3H, H-28 α), 0,97 (*s*, 3H, H-29 α), 0,81 (*s*, 3H, H-30 β).

- RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃), δ : 31,93 (C-1), 30,33 (C-2), 78,79 (C-3), 40,43 (C-4), 47,07 (C-5), 21,09 (C-6), 25,98 (C-7), 47,95 (C-8), 19,95 (C-9), 26,01 (C-10), 26,43 (C-11), 32,84 (C-12), 45,23 (C-13), 48,75 (C-14), 35,54 (C-15), 28,11 (C-16), 52,24 (C-17), 18,00 (C-18), 29,88 (C-19), 35,85 (C-20), 18,20 (C-21), 36,30 (C-22), 24,90 (C-23), 125,22 (C-24), 130,85 (C-25), 17,61 (C-26), 25,70 (C-27), 19,27 (C-28), 25,40 (C-29), 13,97 (C-30).

6.3 Estudo do néctar de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae)

6.3.1 Coleta do néctar

O néctar foi coletado de flores frescas com o auxílio de uma seringa e obteve-se de 50 a 400 μL de néctar de coloração clara. Sobre o mesmo foi adicionado metanol e armazenado em freezer.

6.3.2 Extração do néctar

O metanol foi removido de 5 mL de néctar em rotaevaporador rotativo e então submetido à extração com 1 mL de acetato de etila bidestilado. A fração orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 e o solvente evaporado sob fluxo de nitrogênio.

6.3.3 Obtenção da fração contendo os carboidratos

Néctar fresco foi inicialmente submetido a tratamento com metanol. Após 15 minutos o metanol foi evaporado e o néctar (0,5 mL) foi liofilizado. Do material liofilizado foram coletados 5 mg que foram secos em dessecador contendo pentóxido de fósforo e submetido a baixa pressão com auxílio de uma bomba de vácuo.

6.3.4 Sililação das amostras

As amostras obtidas da extração por acetato de etila e 1 mg da fração anidra contendo carboidratos, além, dos padrões de glicose, sacarose e frutose foram submetidos a sililação com 10 μL de bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) em piridina anidra (100 μL) por uma hora e analisadas por CG-EM.

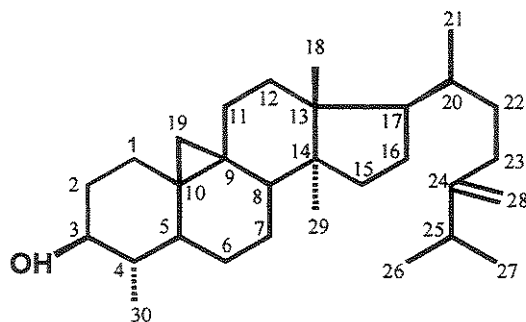
6.3.5 Extração do líquido contido na sépala da flor de *Spathodea campanulata*

Foram coletados em um erlenmeyer 200 mL do líquido contido na sépala e extraídos com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e o solvente foi removido em rotaevaporador rotativo obtendo-se 120 mg de um óleo amarelado e uma massa esbranquiçada, aqui denominado de AFLVT.

6.3.6 Separação cromatográfica de AFLVT

100 g de sílica gel 230–400 mesh foram impregnadas com 10% de nitrato de prata (10g). Procedeu-se uma separação cromatográfica em coluna utilizando como eluentes hexano e gradientes de hexano e acetato de etila. A eluição foi acompanhada por CCD utilizando hexano/acetato de etila (4/1). Desta foram obtidas 4 frações principais: SC18, AFLV2, AFLV4 E SC19. Estas foram analisadas por CG-EM e a fração SC18 (30 mg) foi submetida a RMN 1D e 2D e identificada como sendo o cicloeucalenol.

- Dados espectroscópicos e espectrométricos do cicloeucalenol:



- **Aspecto físico:** sólido branco

- **Pf:** 110°C.

- $[\alpha]_D^{20} + 44,5^\circ$ (CHCl₃, c 4,0).

- **EM, *m/z* (%):** 426 (M⁺, 20), 408 (70), 393 (88), 365 (7), 300 (26), 286 (12), 175 (40), 95 (86), 69 (84), 55 (100).

- **IV (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹):** 3423,3, 2870,7, 2962, 1042,9.

RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3/TMS), δ : 1,27 (*m*, 1H, H-1 β), 1,53 (*m*, 1H, H-1 α), 1,40 (*m*, 1H, H-2 β), e 1,97 (*m*, 1H, H-2 α), 3,22 (*ddd*, 1H, $J=11,0; 8,7$ e $4,5$ Hz, H-3 α), 1,13 (*m*, 1H, H-4 β), 1,18 (*m*, H-5 α), 0,55 (*dq*, 1H, $J=12,2; 12,5; 12,5$ e $2,5$ Hz, H-6 β), 1,65 (*m*, 1H, H-6 α), 1,00 (*m*, 1H, H-7) e 1,28 (*m*, 1H, H-7), 1,56 (*dd*, 1H, $J=12,5$ e $4,0$ Hz, H-8 β), 1,19 e 1,99 (*m*, 2H, H-11), 1,60 (*m*, 2H, H-12), 1,27 (*m*, 2H, H-15), 1,30 e 1,91 (*m*, 2H, H-16), 1,63 (*m*, 1H, H-17), 0,97 (*s*, 3H, H-18 β), 0,14 (*d*, 1H, $J=4,5$ Hz, H-19 *exo*), 0,38 (*d*, 1H, $J=4,0$ Hz, H-19 *exo*), 1,41 (*m*, 1H, H-20), 0,90 (*d*, 3H, $J=6,5$ Hz, H-21), 1,12 e 1,58 (*m*, 2H, H-22), 1,90 e 2,10 (*m*, 2H, H-23), 2,20 (*sept*, 1H, $J=6,5$ Hz, H-25), 1,02 (*d*, 3H, $J=6,5$ Hz, H-26), 1,00 (*s*, 3H, H-27), 4,66 (*d*, 1H, H-28), 4,71 (*s*, 1H, H-28), 0,90 (*s*, 3H, H-29 α), 0,98 (*d*, 3H, $J=6,5$ Hz, H-30 α).

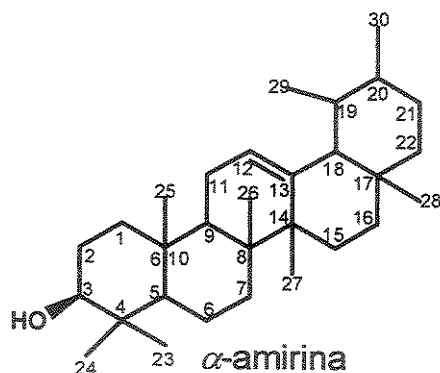
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 30,74 (C-1), 34,75 (C-2), 76,44 (C-3), 44,51 (C-4), 43,25 (C-5), 24,63 (C-6), 25,13 (C-7), 46,80 (C-8), 23,51 (C-9), 29,46 (C-10), 26,92 (C-11), 32,81 (C-12), 45,27 (C-13), 48,81 (C-14), 35,29 (C-15), 28,06 (C-16), 52,11 (C-17), 17,77 (C-18), 27,20 (C-19), 36,06 (C-20), 18,30 (C-21), 34,93 (C-22), 31,26 (C-23), 156,65 (C-24), 33,75 (C-25), 21,96 (C-26), 21,83 (C-27), 105,75 (C-28), 19,10 (C-29), 14,37 (C-30).

6.3.7 Separação cromatográfica da fração SC19

30 mg da fração SC19 foram submetidas à cromatografia preparativa em coluna (CCP) utilizando sílica gel 230-400 mesh (20g) foram impregnadas com 20% de nitrato de prata. Os eluentes foram hexano e gradientes de hexano e acetato de etila. O acompanhamento foi realizado com CCD utilizando hexano/acetato de etila (8/2), desta forma as frações homogêneas foram reunidas e analisadas por CG-EM onde foram demonstradas as impurezas da amostra e a falha no acompanhamento por CCD. Nova coluna cromatográfica preparativa foi realizada utilizando benzeno como eluente e acompanhamento da separação foi realizado por CG. No entanto não houve separação satisfatória. Realizamos ainda uma tentativa de separação utilizando cromatografia em camada delgada

preparativa utilizando sílica gel impregnada com 20% de nitrato de prata e eluída por 24 horas com benzeno. Mais uma vez não houve separação e a amostra foi analisada pelas técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C .

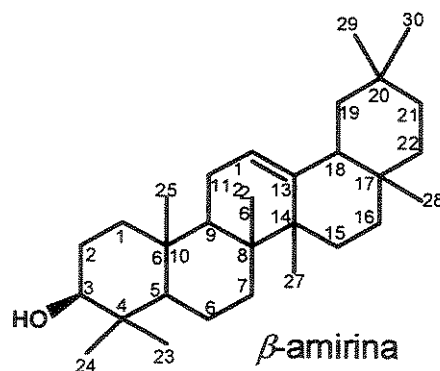
- Dados espectroscópicos e espectrométricos da α -amirina:



- EM, m/z (%): 426 (M^+ , 8), 411 (4), 393 (2), 218 (100), 203 (47), 189 (12), 119 (10), 95 (12), 69 (10).

- RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3/TMS), δ (ppm): 38,68 (C-1), 27,26 (C-2), 78,82 (C-3), 38,56 (C-4), 55,18 (C-5), 18,30 (C-6), 32,90 (C-7), 39,99 (C-8), 47,69 (C-9), 36,93 (C-10), 23,34 (C-11), 124,40 (C-12), 139,57 (C-13), 42,06 (C-14), 28,60 (C-15), 26,63 (C-16), 33,73 (C-17), 58,04 (C-18), 39,59 (C-19), 39,64 (C-20), 31,24 (C-21), 41,51 (C-22), 28,21 (C-23), 15,61 (C-24), 15,67 (C-25), 16,78 (C-26), 23,25 (C-27), 28,08 (C-28), 17,46 (C-29), 21,39 (C-30).

- Dados espectroscópicos e espectrométricos da β -amirina:



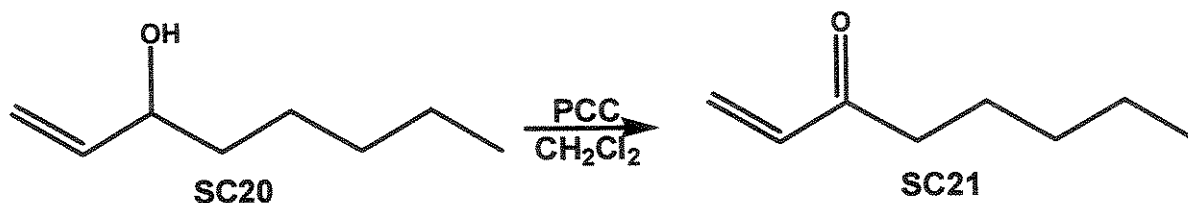
- EM, m/z (%): 426 (M^+ , 11), 411 (5), 393 (2), 218 (100), 203 (20), 189 (18), 135 (14), 95 (12), 69 (9).

- RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3/TMS), δ (ppm): 38,76 (C-1), 27,39 (C-2), 79,01 (C-3), 38,76 (C-4), 47,73 (C-5), 37,17 (C-6), 32,80 (C-7), 38,56 (C-8), 47,62 (C-9), 38,03 (C-10), 23,51 (C-11), 121,78 (C-12), 145,18 (C-13), 41,69 (C-14), 26,13 (C-15), 27,20 (C-16), 32,50 (C-17), 47,20 (C-18), 46,80 (C-19), 31,08 (C-20), 34,72 (C-21), 37,15 (C-22), 28,11 (C-23), 15,49 (C-24), 15,57 (C-25), 16,85 (C-26), 26,05 (C-27), 28,40 (C-28), 33,33 (C-29), 23,68 (C-30).

6.3.8 Coleta de voláteis do néctar de *Spathodea campanulata*

Néctar fresco (5 mL) foi coletado às 10 horas da manhã e mantido em um balão de fundo redondo e mantido a 30°C com auxílio de banho Maria. O sistema de coleta dinâmica já descrito anteriormente foi acoplado ao mesmo e a drenagem do ar foi mantida por 3 horas. Após este período os adsorventes foram lavados com diclorometano bidestilado (500 μL). A amostra foi concentrada com auxílio de corrente de nitrogênio e submetida a análise por CG-EM. Foram obtidos os índices de retenção pela injeção desta solução com uma outra solução contendo os hidrocarbonetos de cadeia normal (C9-C35).

6.3.9 Obtenção da 1-octen-3-ona



Em um balão de fundo redondo foram adicionados 5 mg de 1-octen-3-ol em diclorometano (1 mL) e cloro cromato de piridínio (10 mg). O sistema foi mantido sob refluxo por uma noite. Após este período o aquecimento foi desligado e a mistura reacional analisada por CCD utilizando como eluente hexano/acetato de etila (8/2) onde se verificou consumo total do álcool e formação de um produto com menor polaridade. A mistura reacional foi filtrada em sílica gel e o solvente evaporado. O resíduo resultante foi analisado por EM.

6.4 Estudo da relação ecológica entre *Melipona scutellaris* e *Melipona rufiventris*

6.4.1 Coleta de operárias de *M. scutellaris* e *M. rufiventris*

Operárias de colônias pura e mista (3-5 unidades) de *M. scutellaris* e de colônia mista de *M. rufiventris* foram coletadas em março de 2003 e da colônia pura de *M. scutellaris* (5 unidades) em março de 2004. O local de coleta foi a Fazenda Aretuzina (São Simão -SP). As operárias foram resfriadas, colocadas em frascos e transportadas até Campinas em gelo.






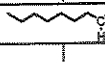

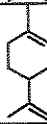




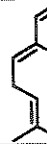



6.4.2 Extração das ceras do abdômen das operárias

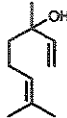

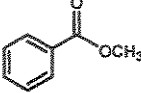

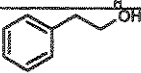

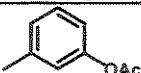
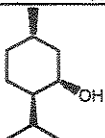

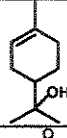
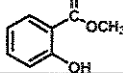
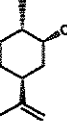

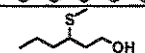
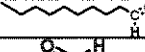
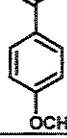
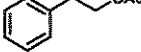
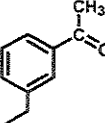
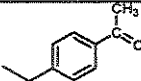
As operárias foram lavadas com hexano bidestilado e o solvente removido com auxílio de corrente de nitrogênio obtendo-se de 0,3 a 0,5 mg de extrato que foi analisado por CG-EM.



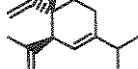
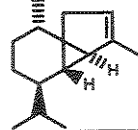
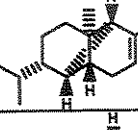
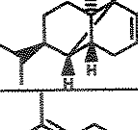
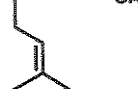
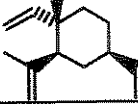


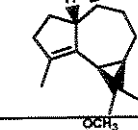
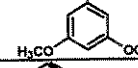
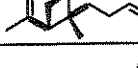
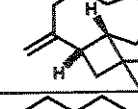
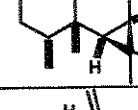

6.4.3 Determinação da posição das duplas ligações dos extratos obtidos

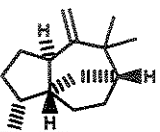
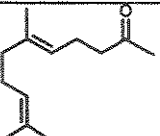

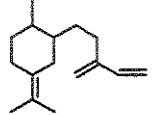
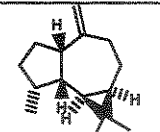
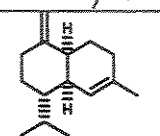
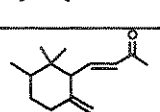
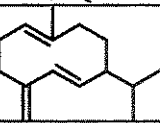
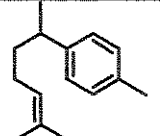
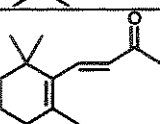
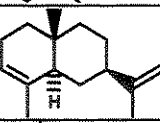
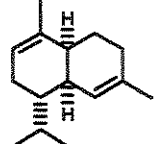
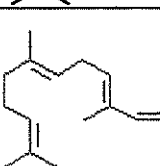
Foi utilizada a mesma metodologia já descrita para outros extratos.

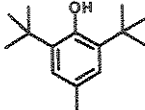
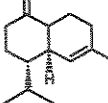
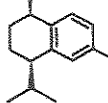
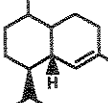
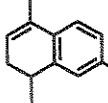
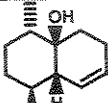

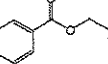
7. ANEXO

A01. Compostos identificados em voláteis.	
Composto	Estrutura
α -pineno	
β -pineno	
benzaldeído	
6-metil-5-hepten-2-ona	
mesitileno	
n-octanal	
p-cimeno	
limoneno	
1,8-cineol	
álcool benzílico	
fenil acetaldeído	
cis- β -ocimeno	
trans- β -ocimeno	
acetofenona	
óxido de cis-linalol	
óxido de trans-linalol	

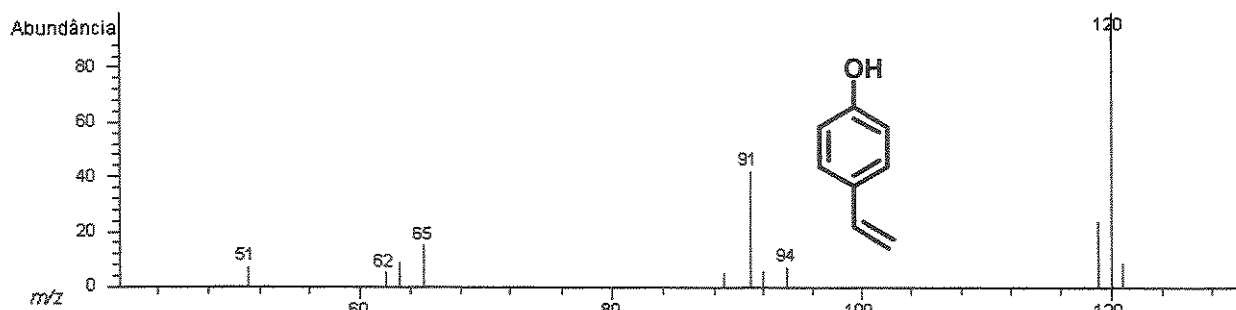
linalol	
<i>n</i> -undecano	
benzoato de metila	
<i>n</i> -nonanal	
álcool fenil etílico	
epoxilimoneno	
acetato de <i>m</i> -cresol	
mentol	
naftaleno	
α -terpineol	
salicilato de metila	
diidro-carveol	
dodecano	
3-metiltio-1-hexanol	
<i>n</i> -decanal	
<i>p</i> -anisaldeído	
acetato de 2-fenil etila	
3-etil acetofenona	
4-etil-acetofenona	

acetato de óxido de <i>trans</i> -linalol	
<i>n</i> -tridecano	
<i>n</i> -undecanal	
δ -elemeno	
α -cubebeno	
α -ialangeno	
α -copaeno	
acetato de geranila	
β -elemeno	
<i>n</i> -tetradecano	
dodecanal	
α -gurjuneno	
1,3,5-trimetoxi benzeno	
<i>cis</i> - α -bergamoteno	
<i>trans</i> -cariofileno	
β -gurjuneno	
aromadendreno	

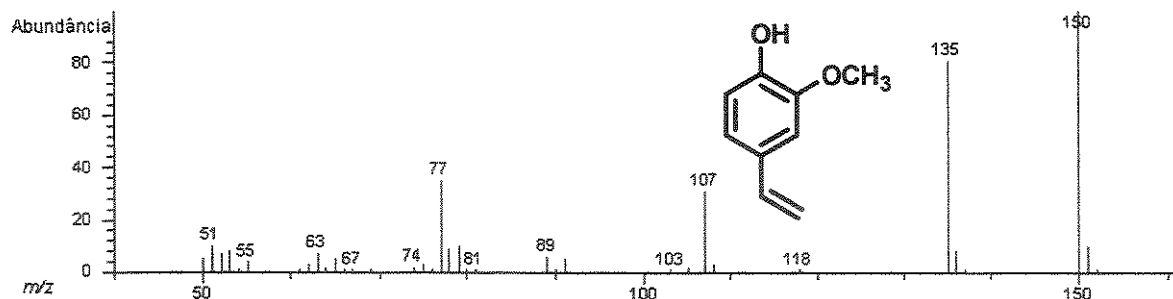
cusimeno	
acetona de geranila	
α -humuleno	
<i>trans</i> - β -farneseno	
alloaromadendreno	
γ -muroleno	
6-metil- γ -(<i>E</i>)-ionona	
germacreno D	
<i>ar</i> -curcumeno	
<i>trans</i> - β -ionona	
α -selineno	
α -muroleno	
(<i>E,E</i>) - α - farneseno	

2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol	
γ -cadineno	
<i>cis</i> -calameneno	
δ -cadineno	
α -calacoreno	
1-epi-cubenol	
heptadecano	
benzoato de benzila	

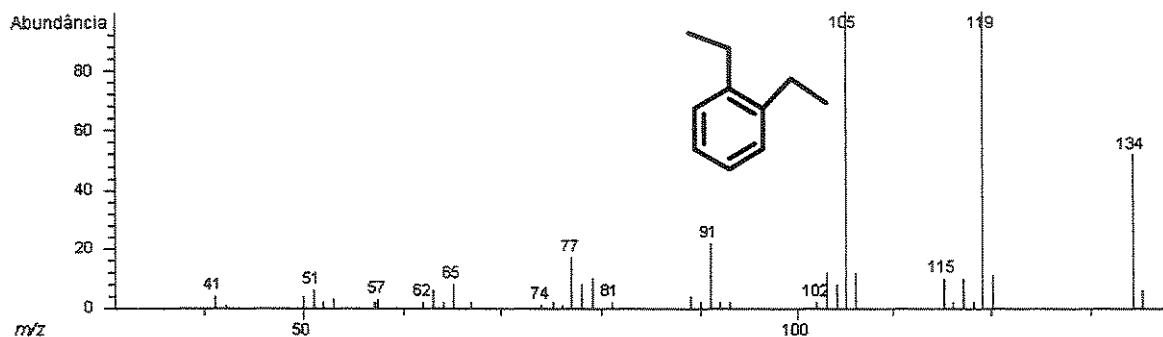
8. ESPECTROS



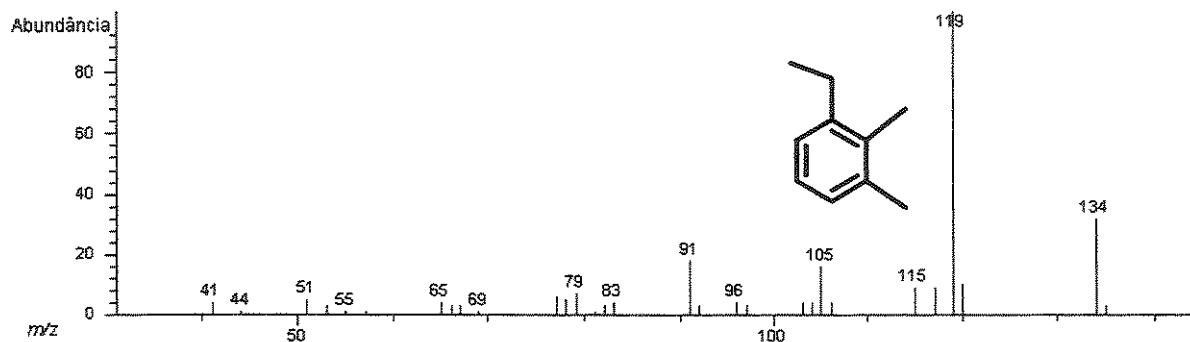
E 1. Espectro de massas do *p*-vinil fenol a 70 eV.



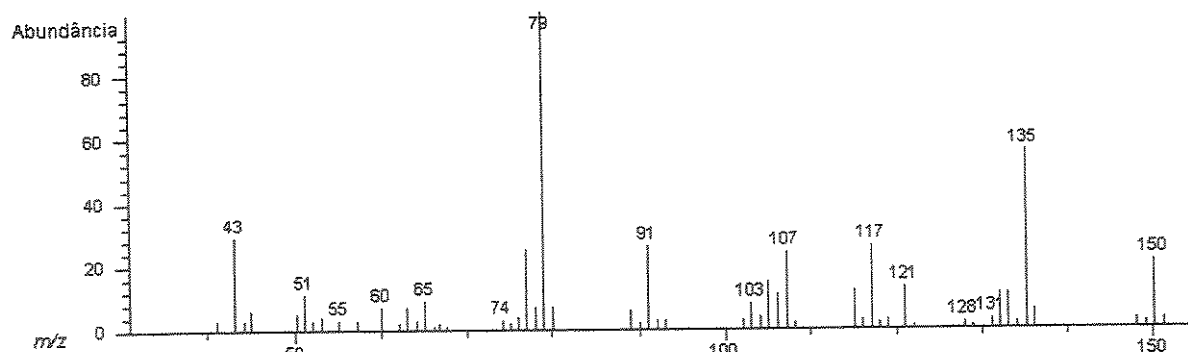
E 2. Espectro de massas do 2-metoxi-4-vinil fenol a 70 eV.



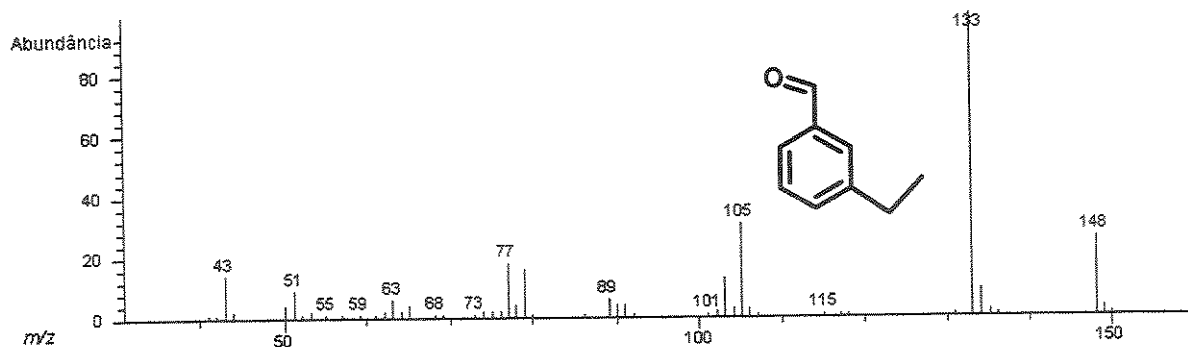
E 3. Espectro de massas do 1,2-dietil-benzeno a 70 eV.



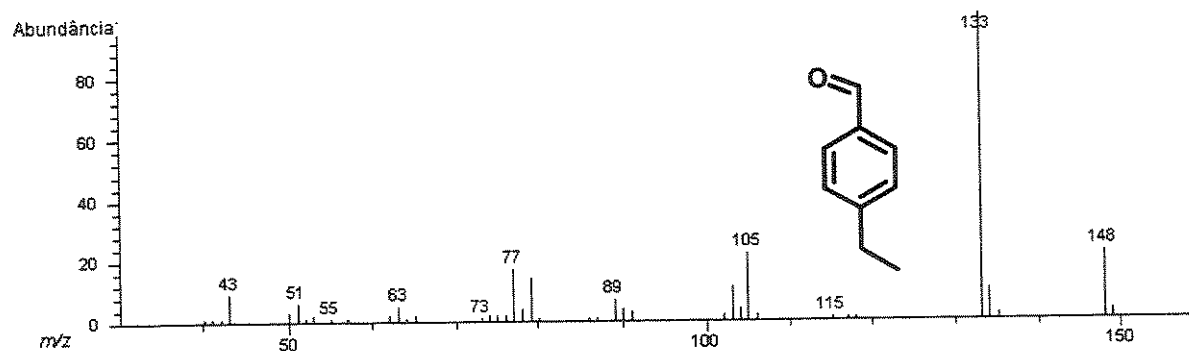
E 4. Espectro de massas do 1-etil-2,3-dimetil benzeno a 70 eV.



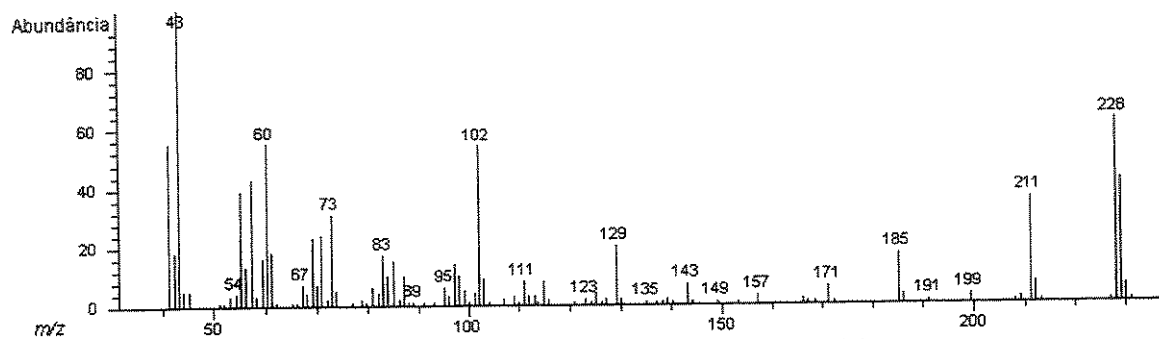
E 5. Espectro de massas de um dos isômeros do álcool fenil-butílico, a 70 eV.



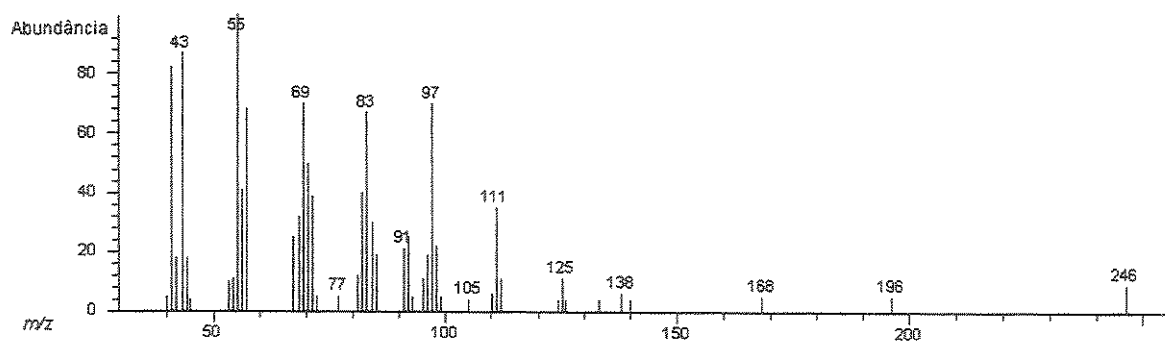
E 6. Espectro de massas do 3-etil acetofenona, a 70 eV.



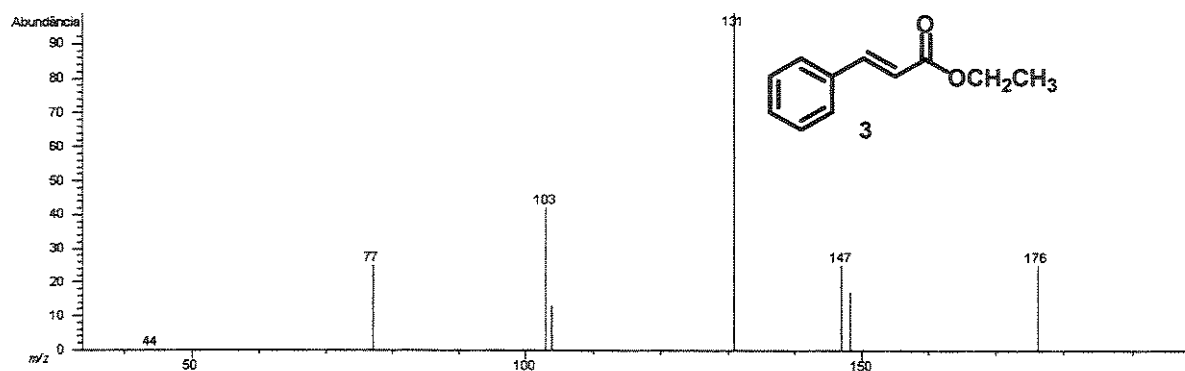
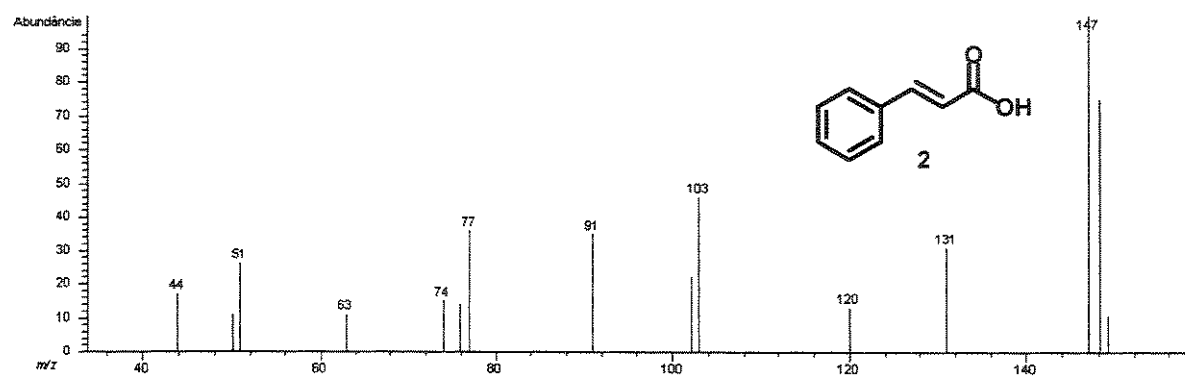
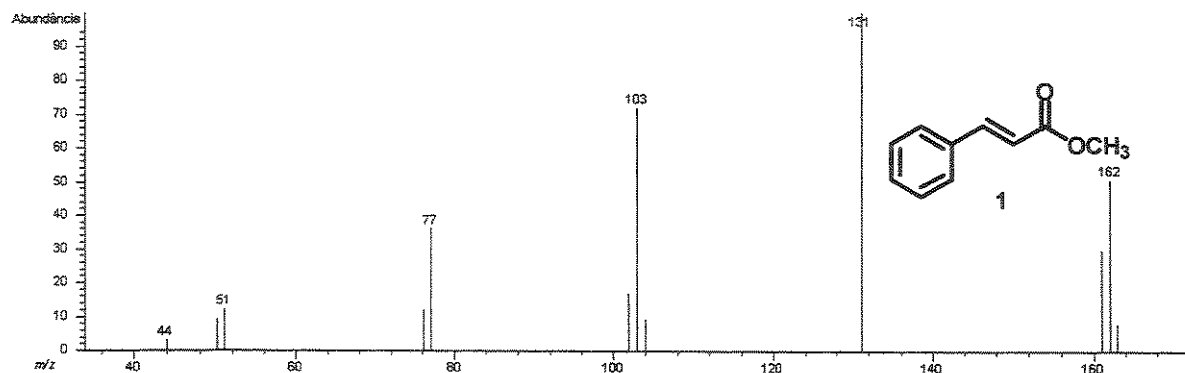
E 7. Espectro de massas do 4-etil acetofenona, a 70 eV.



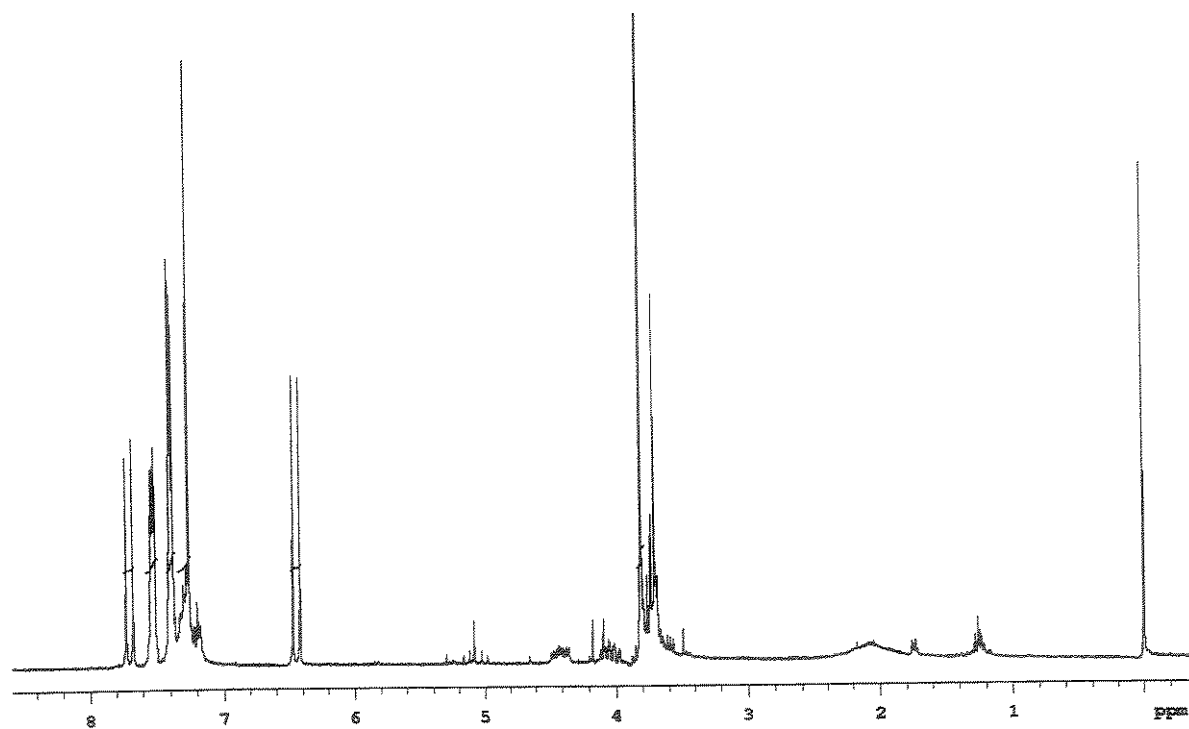
E 8. Espectro de massas do miristato de isopropila, a 70 eV.



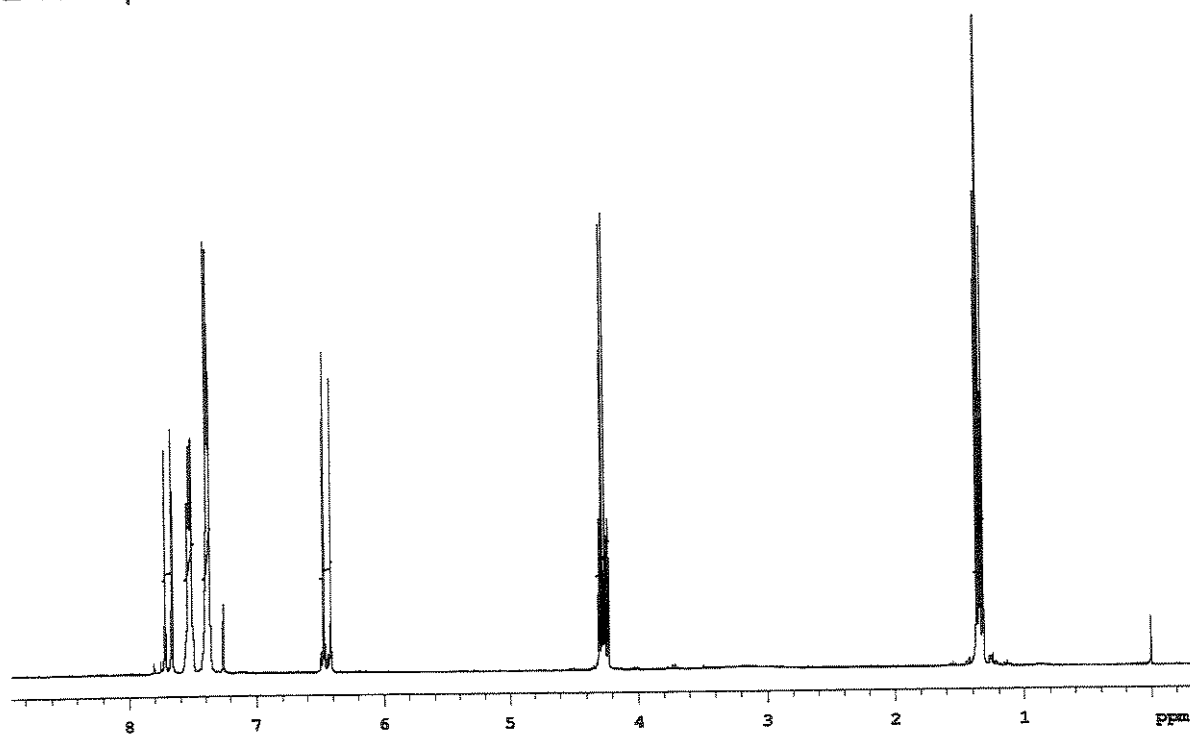
E 9. Espectro de massas do 1-tetradecanol, a 70 eV.



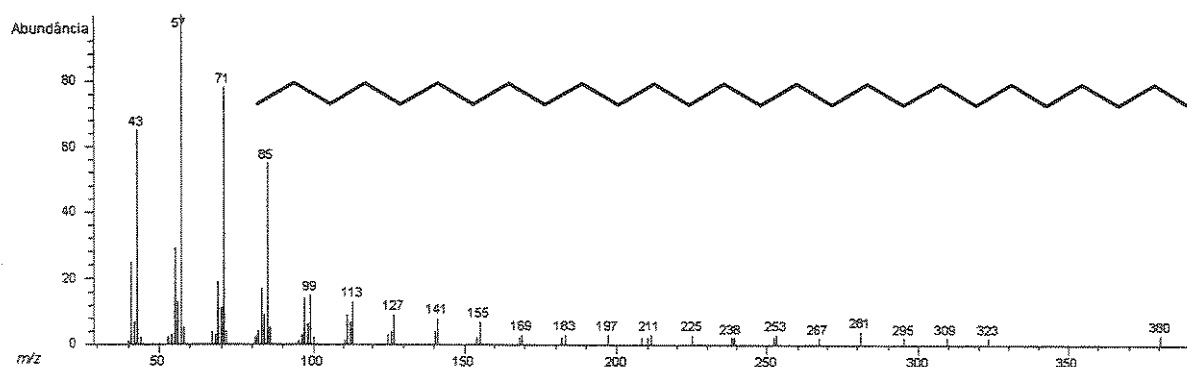
E 10. Espectro de massas do cinamato de metila, ácido cinâmico e cinamato de etila a 70 eV.



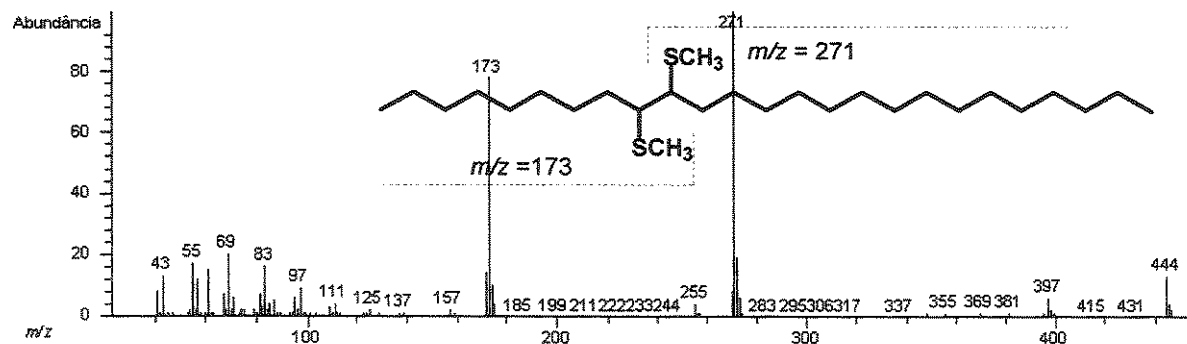
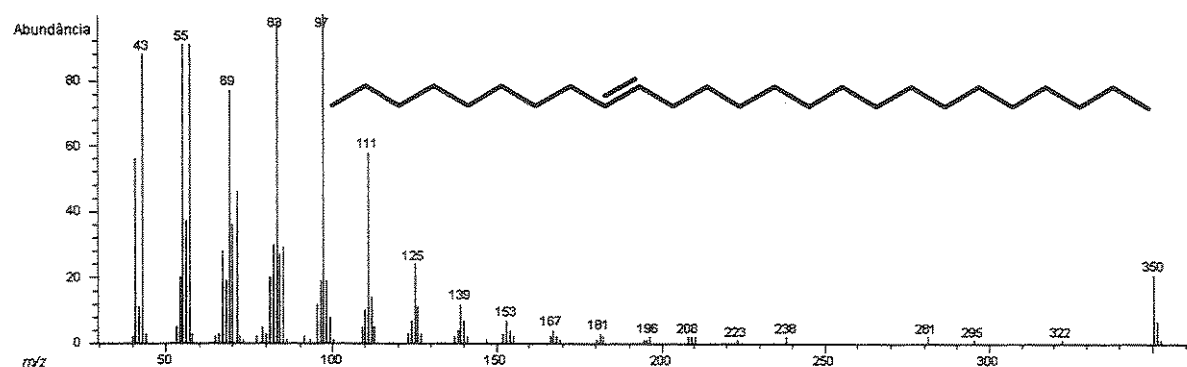
E 11. Espectro de RMN de ^1H do cinamato de metila, a 300, 07 MHz em CDCl_3 .



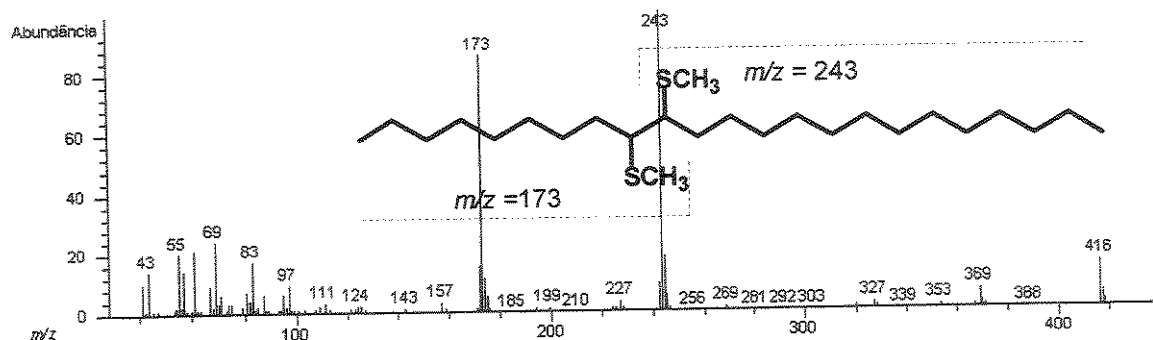
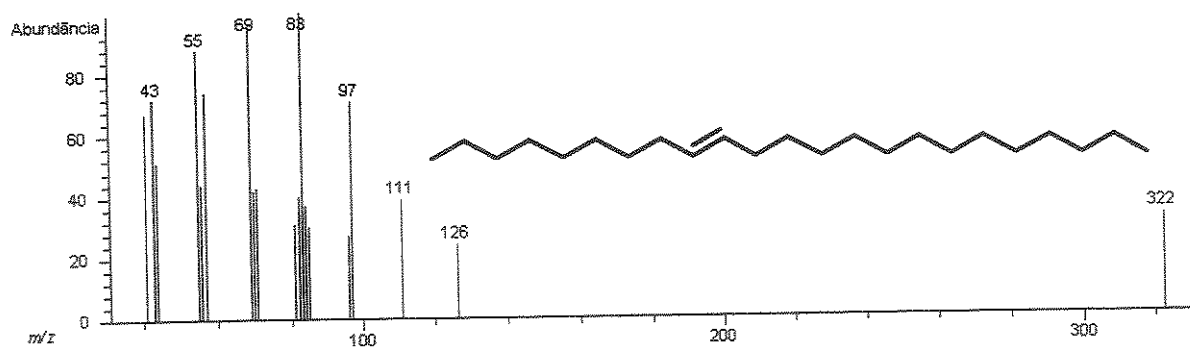
E 12. Espectro de RMN de ^1H do cinamato de etila (300, 07 MHz, CDCl_3).



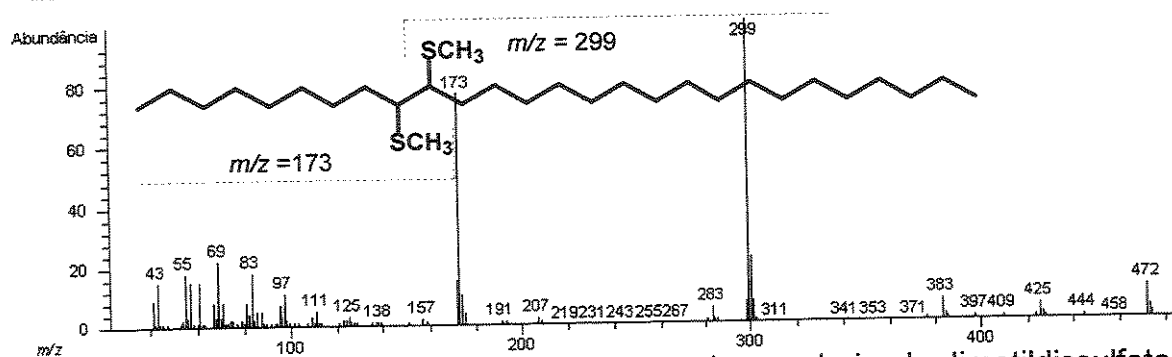
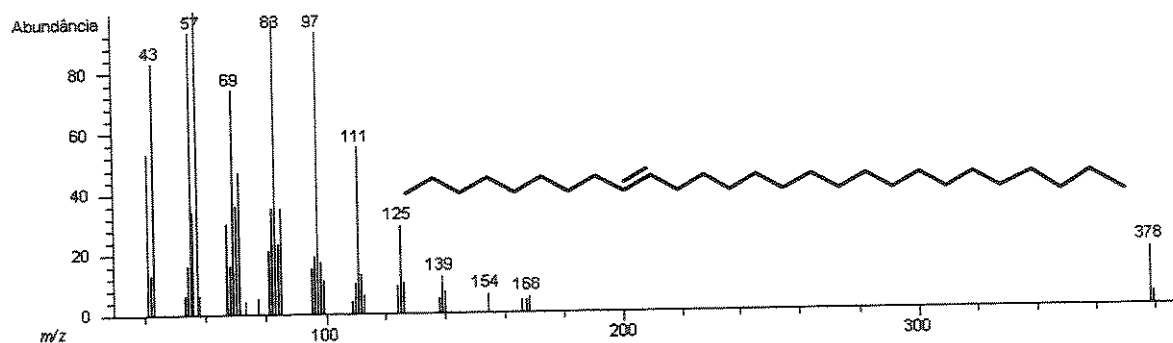
E 13. Espectro de massas de um *n*-alcano (*n*-heptacosano) a 70 eV.



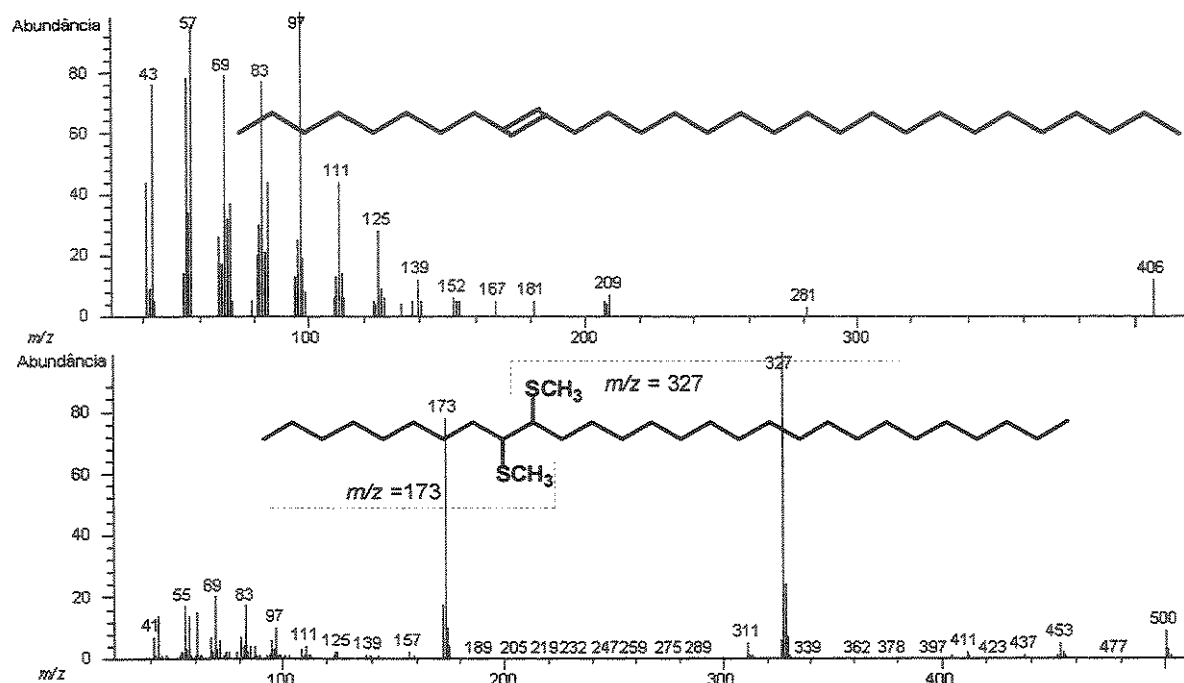
E 14. Espectro de massas do 9-pentacoseno e de seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.



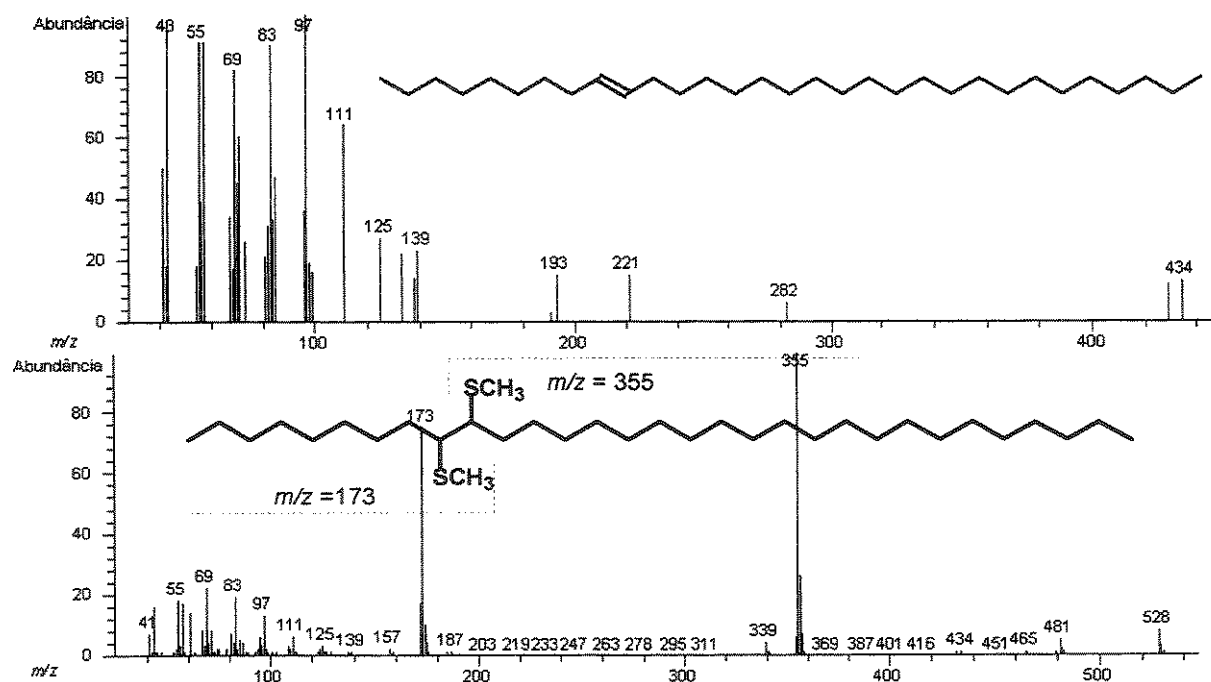
E 15. Espectro de massas do 9-tricoseno e seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.



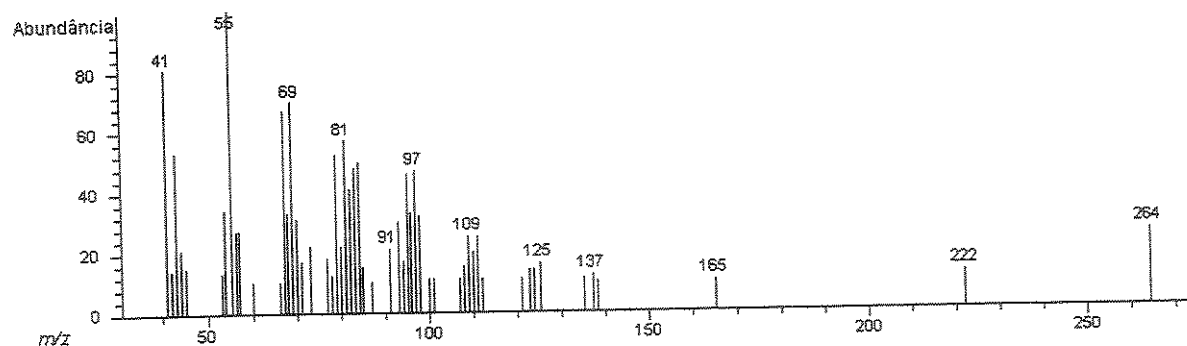
E 16. Espectro de massas do 9-heptacoseno e do seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.



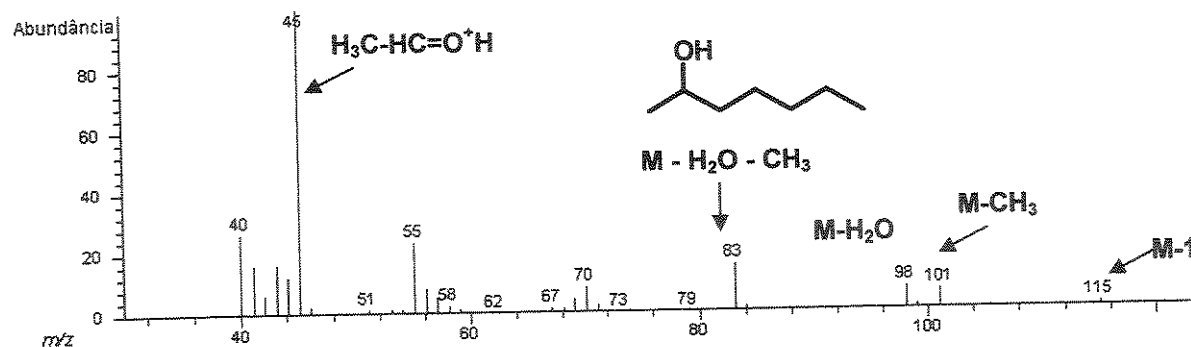
E 17. Espectro de massas do 9-nonacoseno e do seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.



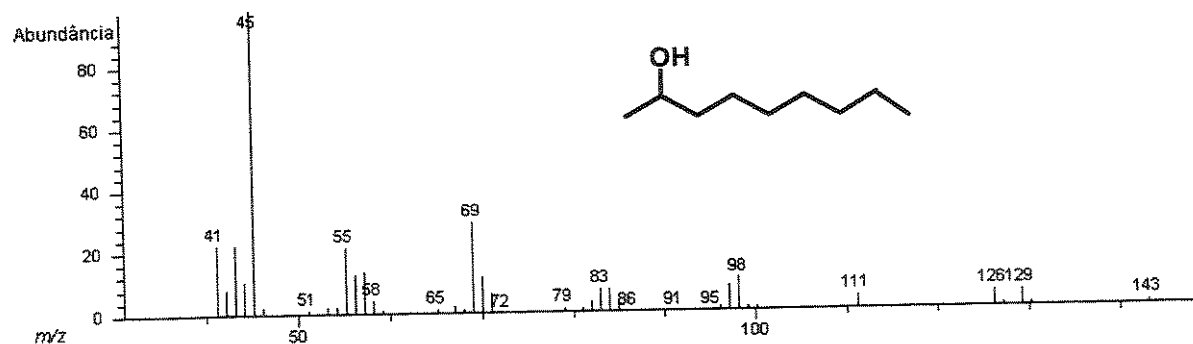
E 18. Espectro de massas do 9-hentriaconteno e seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.



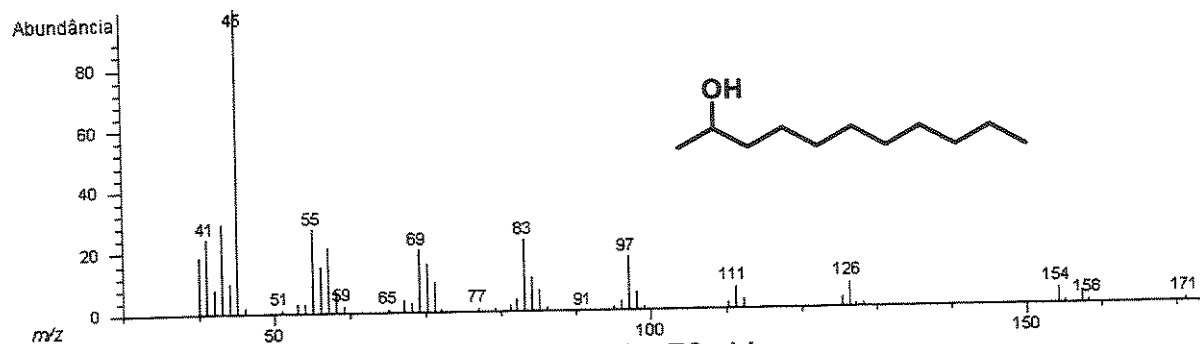
E 19. Espectro de massas do octadecadienal a 70 eV.



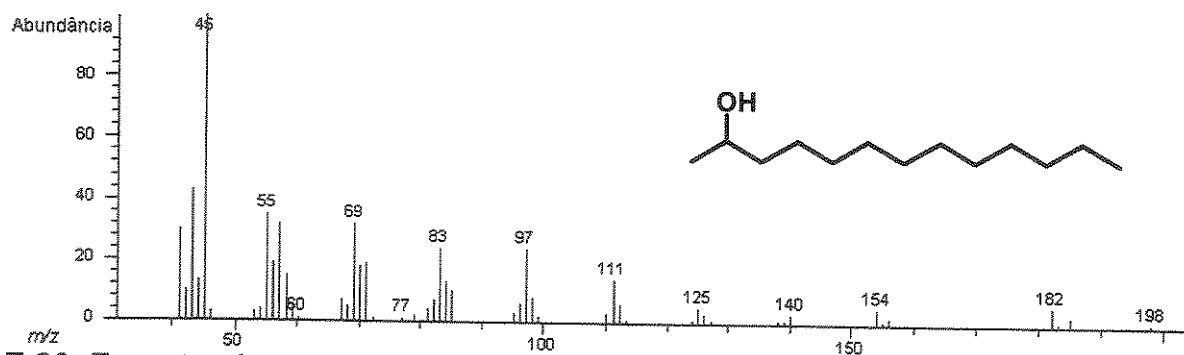
E 20. Espectro de massas do 2-heptanol a 70 eV.



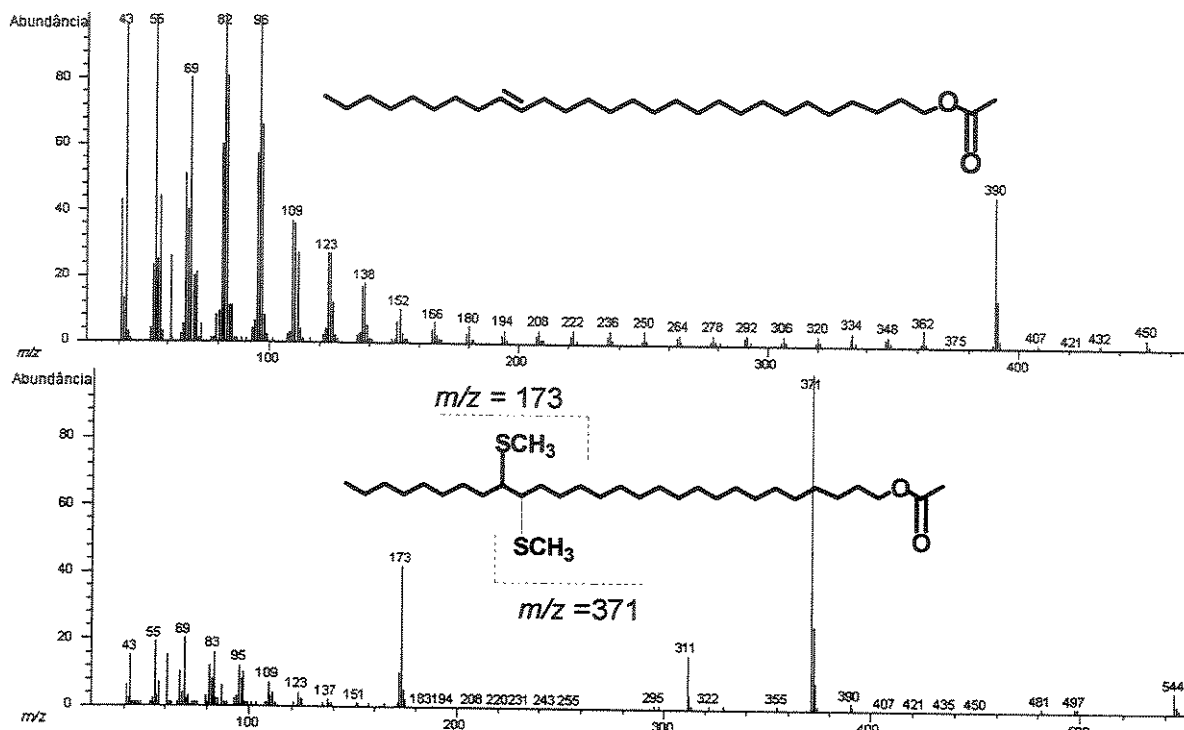
E 21. Espectro de massas do 2-nonanol a 70 eV.



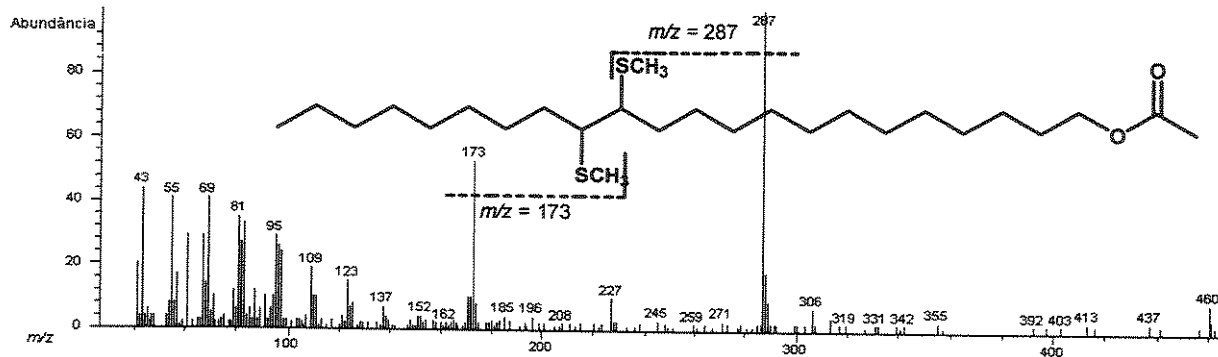
E 22. Espectro de massas do 2-undecanol a 70 eV.

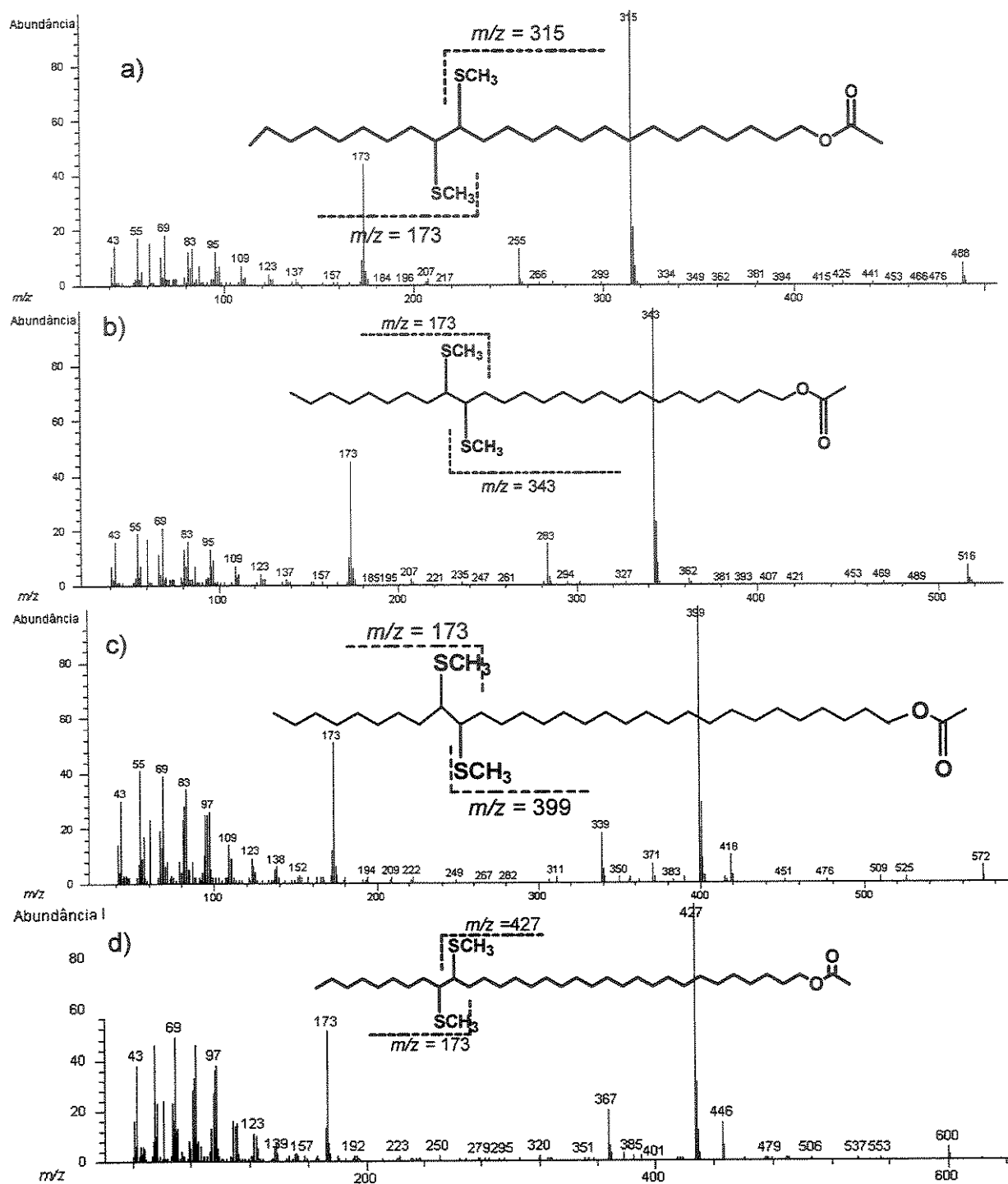


E 23. Espectro de massas do 2-tridecanol a 70 eV.

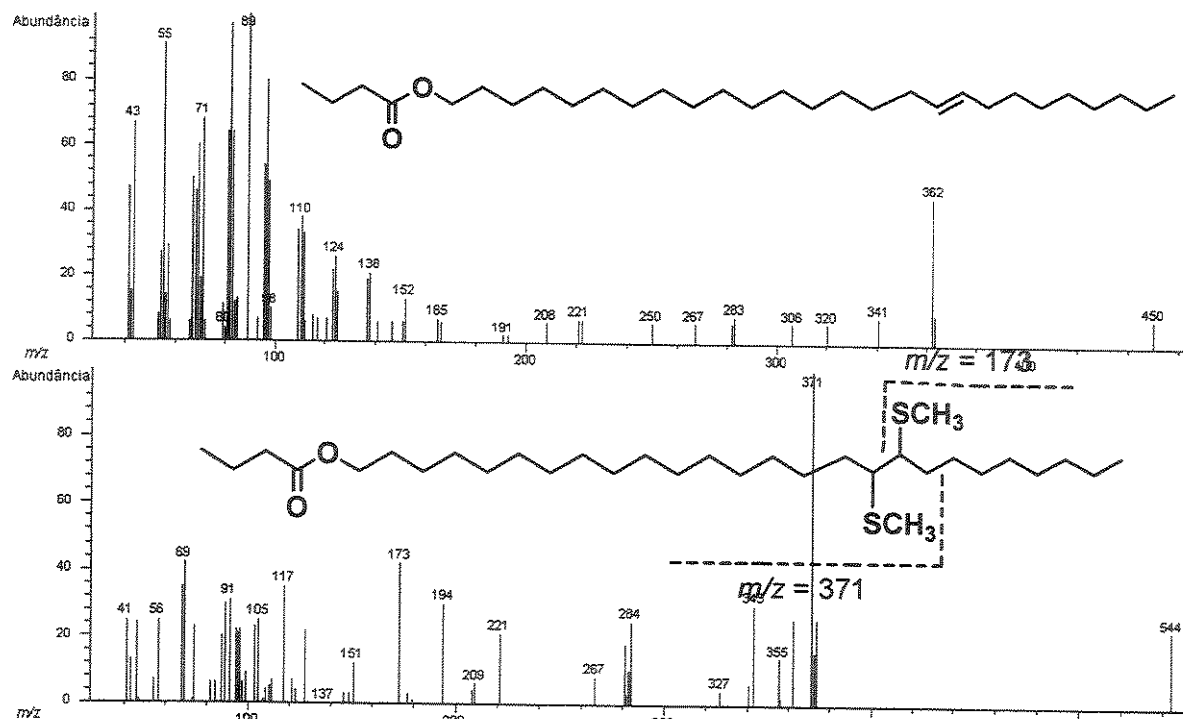


E 24. Espectro de massas a 70 eV do acetato de 19-tetracosenila e de seu derivado DMDS.

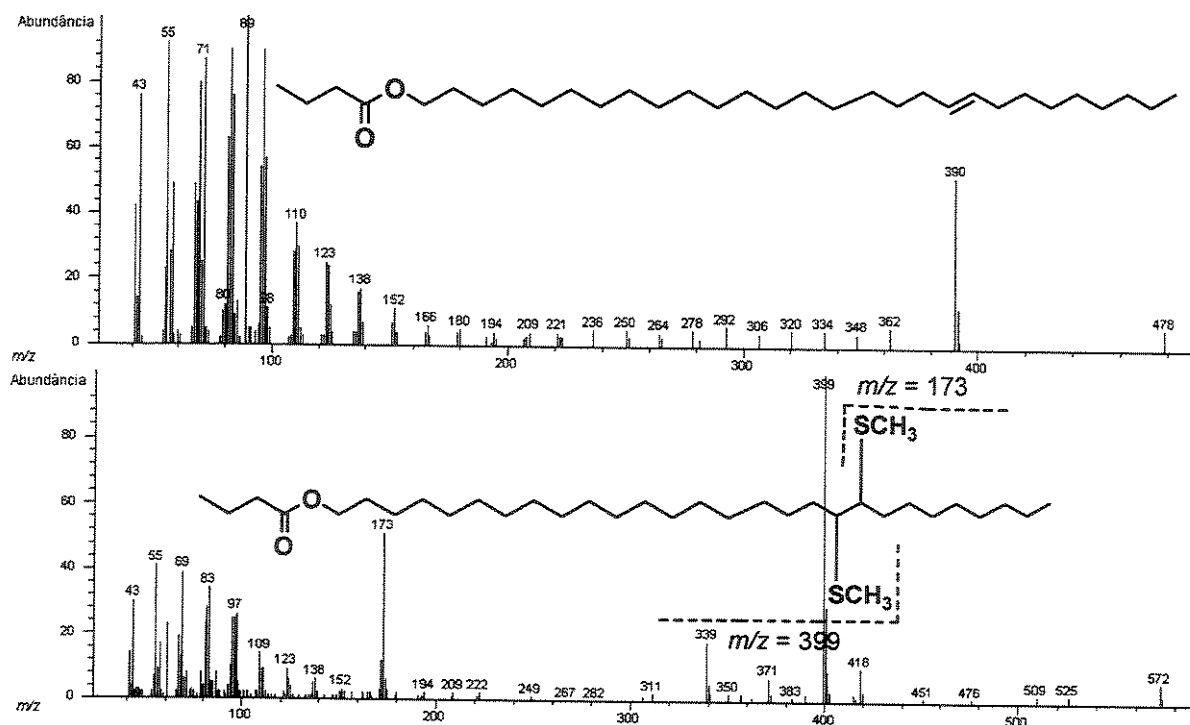




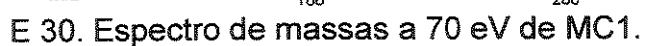
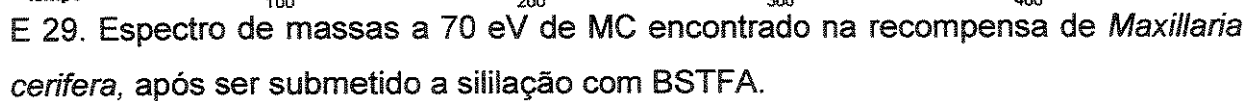
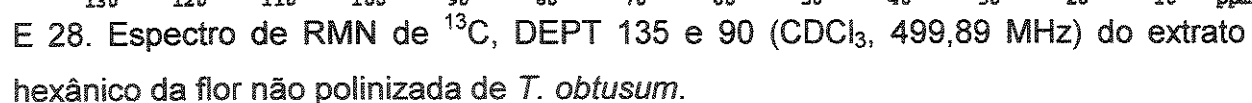
E 25. Espectros de massa a 70 eV dos derivados dimetildissulfetos dos acetatos de 13-docosenila (a), acetato de 17-hexacosenila (b), acetato de 19-octacosenila(c), acetato de 21-triacontenila (d), acetato de 23-dotriacontenila.

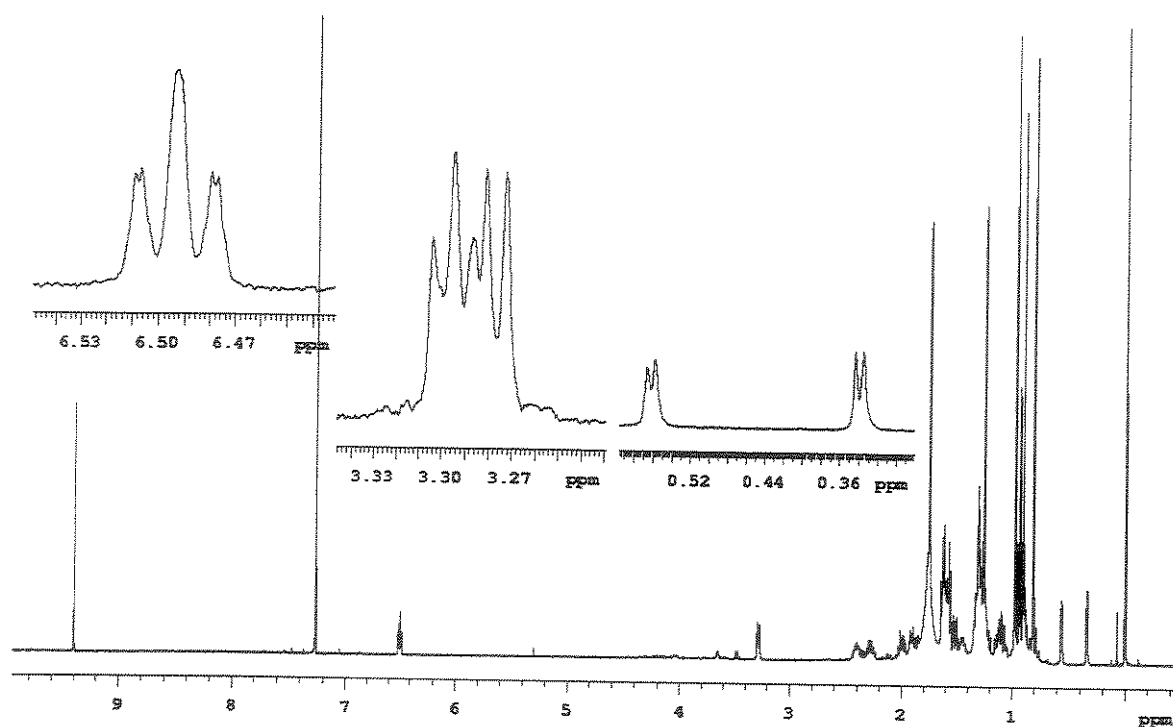


E 26. Espectros de massa do butirato de 17-hexacosenila e de seu derivado dimetildissulfeto a 70 eV.

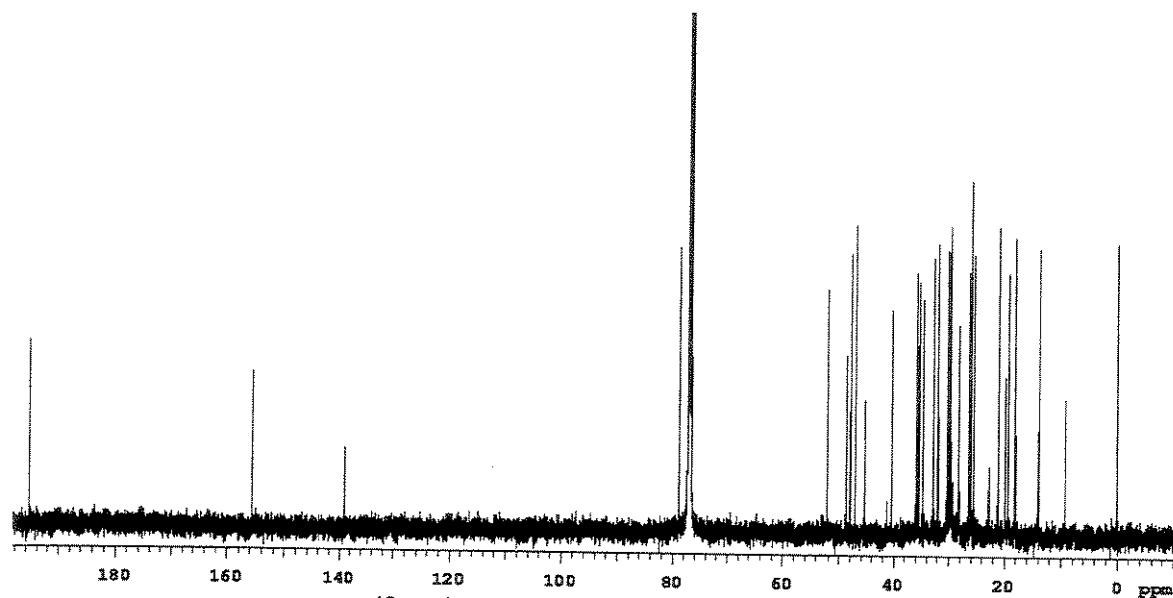


E 27. Espectro de massa a 70 eV do butirato de 19-octacosenila e de seu derivado dimetildissulfeto.

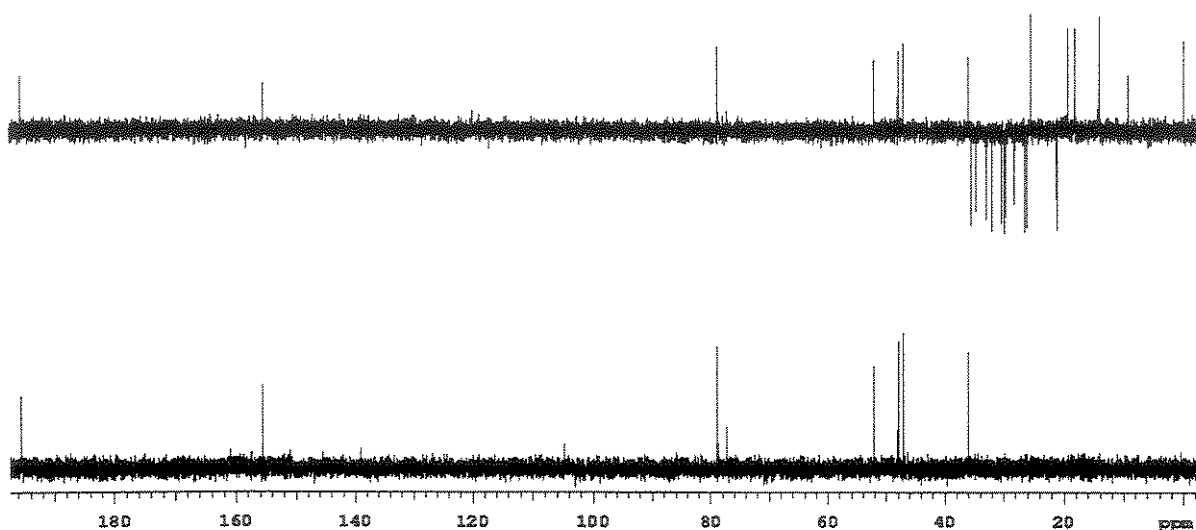




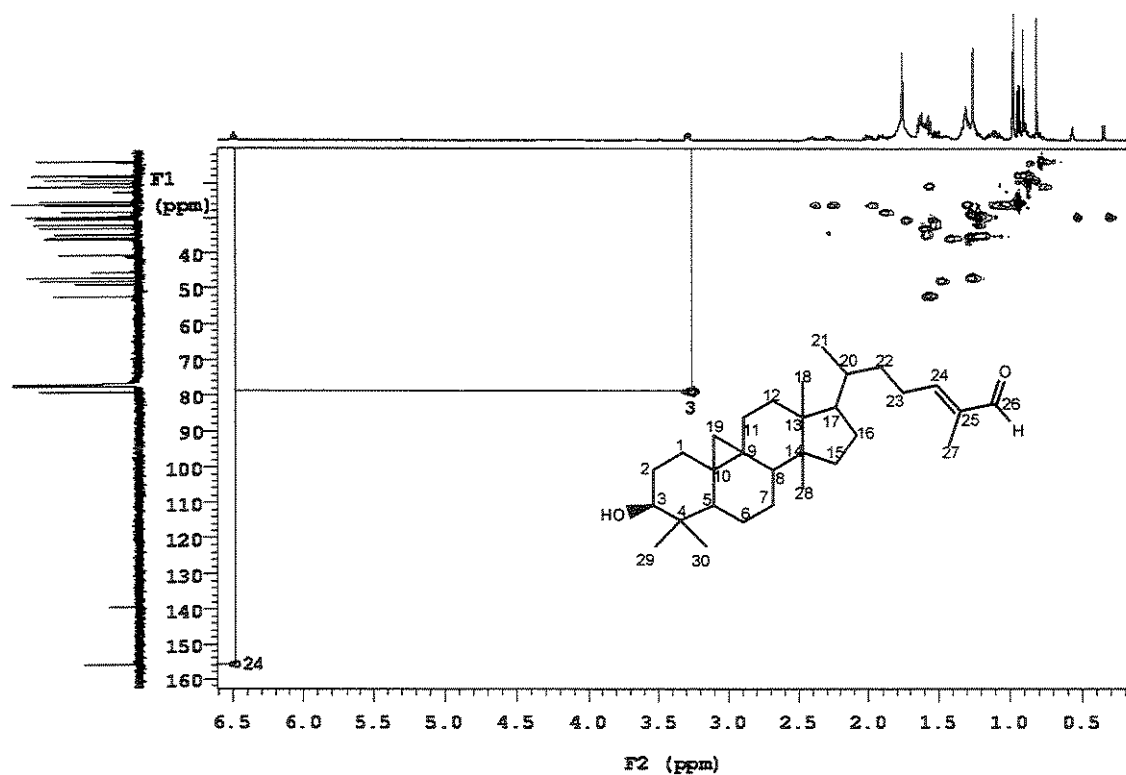
E 31. Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.



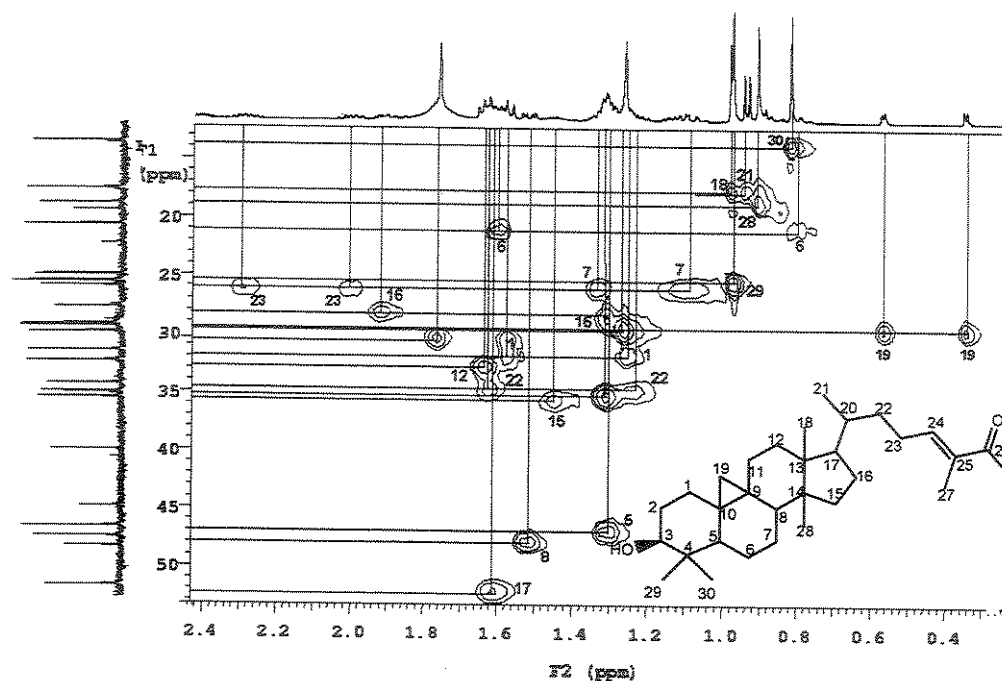
E 32. Espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (125,69 MHz, CDCl_3) de MC1.



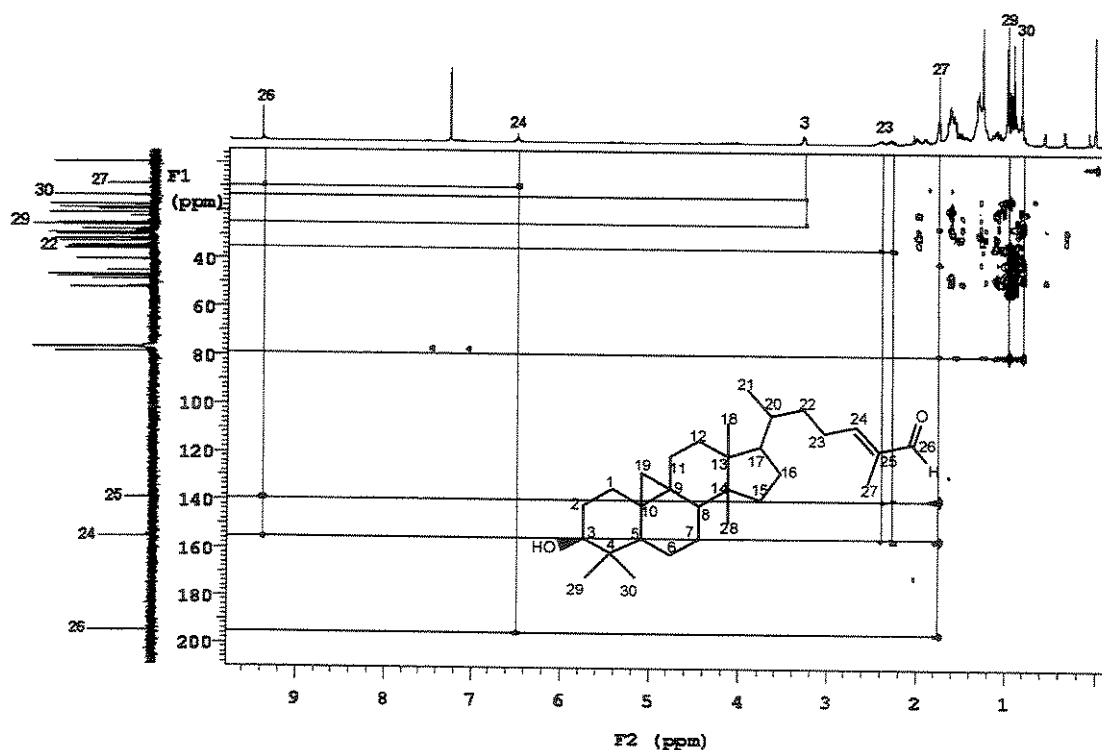
E 33. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90 e DEPT 135) a 125, 69 MHz em CDCl_3 para MC1.



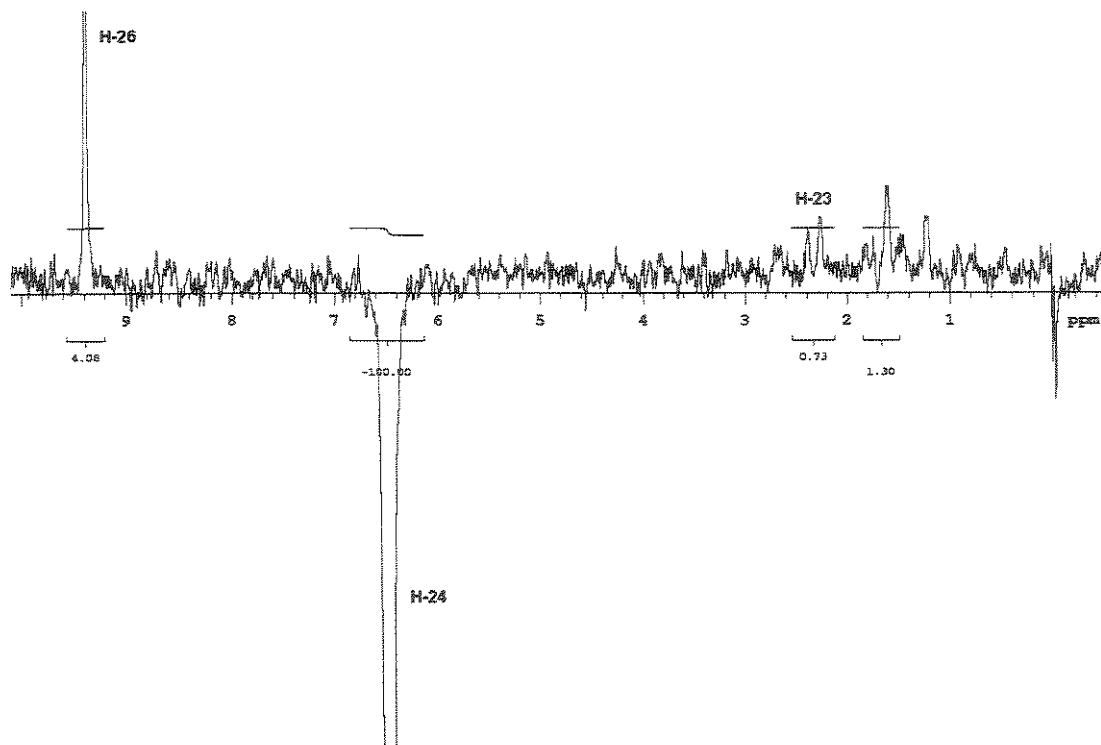
E 34. Expansão do mapa de contorno do espectro de RMN de 2D de correlações ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC) a 499,89 MHz para o ^1H e 125,69 MHz para o ^{13}C .



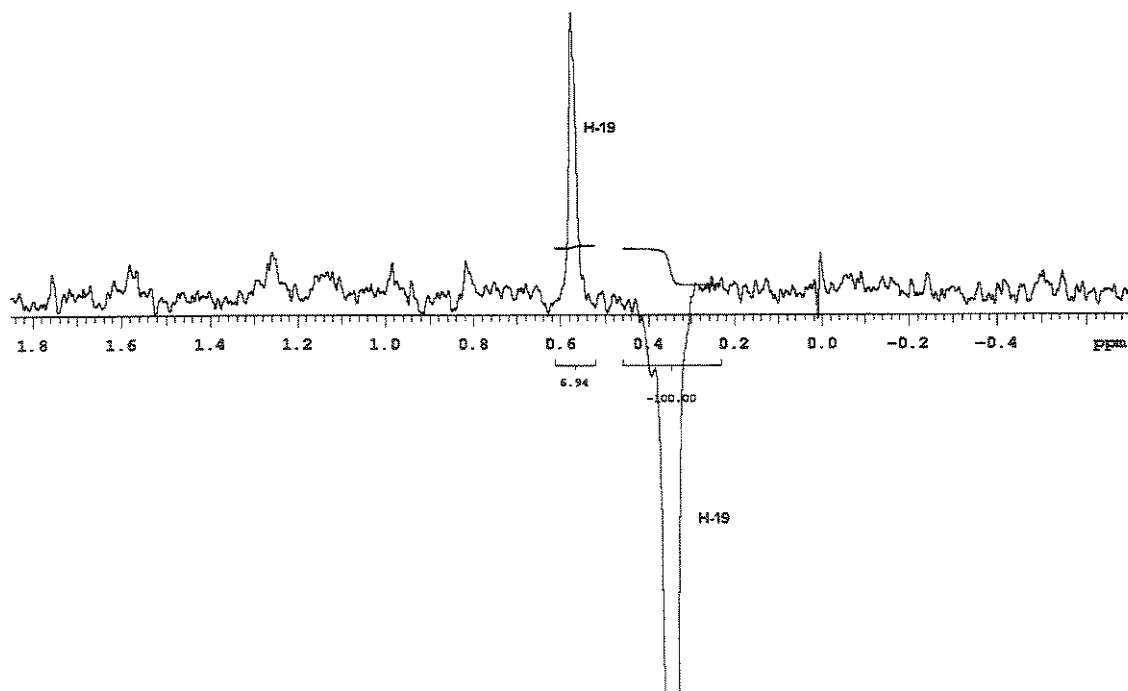
E 35. Expansão do espectro do E 34.



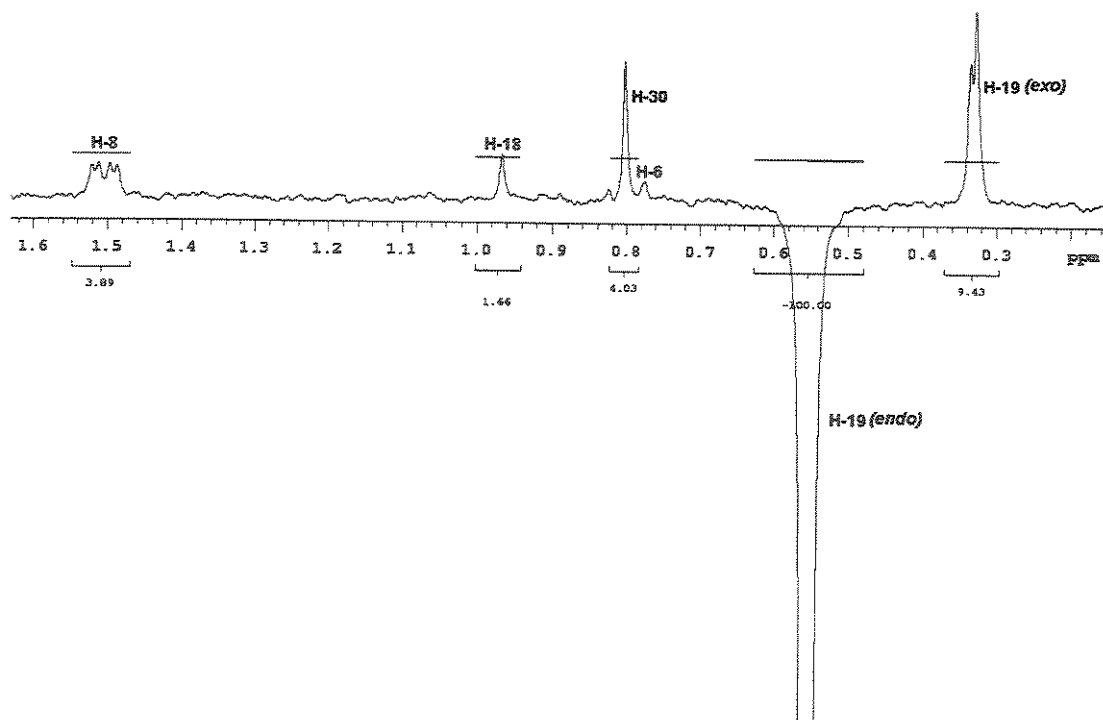
E 36. Mapas de contorno de RMN de 2D das correlações ^1H - ^{13}C a longa distância (*g*-HMBC) a 499,89 MHz para o ^1H e 125,69 MHz para o ^{13}C em CDCl_3 para o composto MC1.



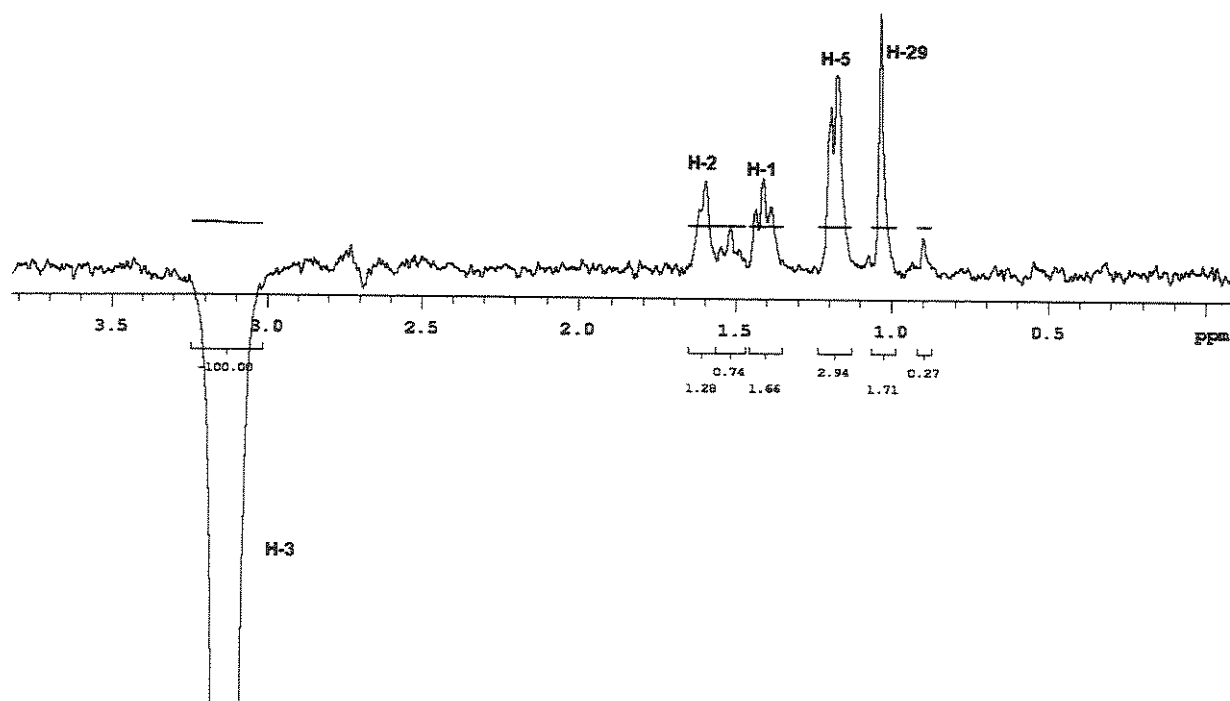
E 37. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo em δ 6,48 NOESY1D (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.



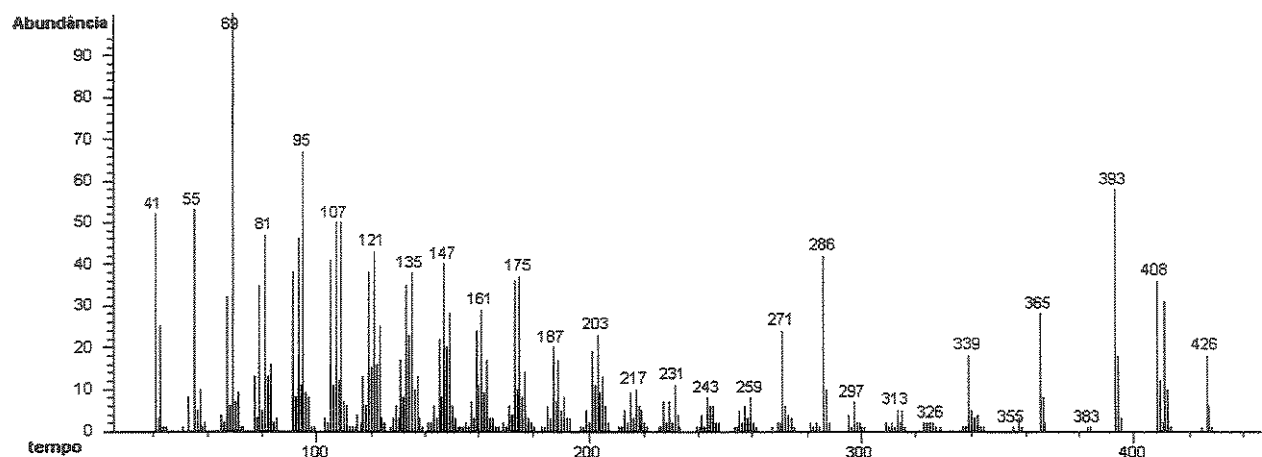
E 38. Espectro de RMN NOESY1D com pulso sobre δ 0,34 (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.



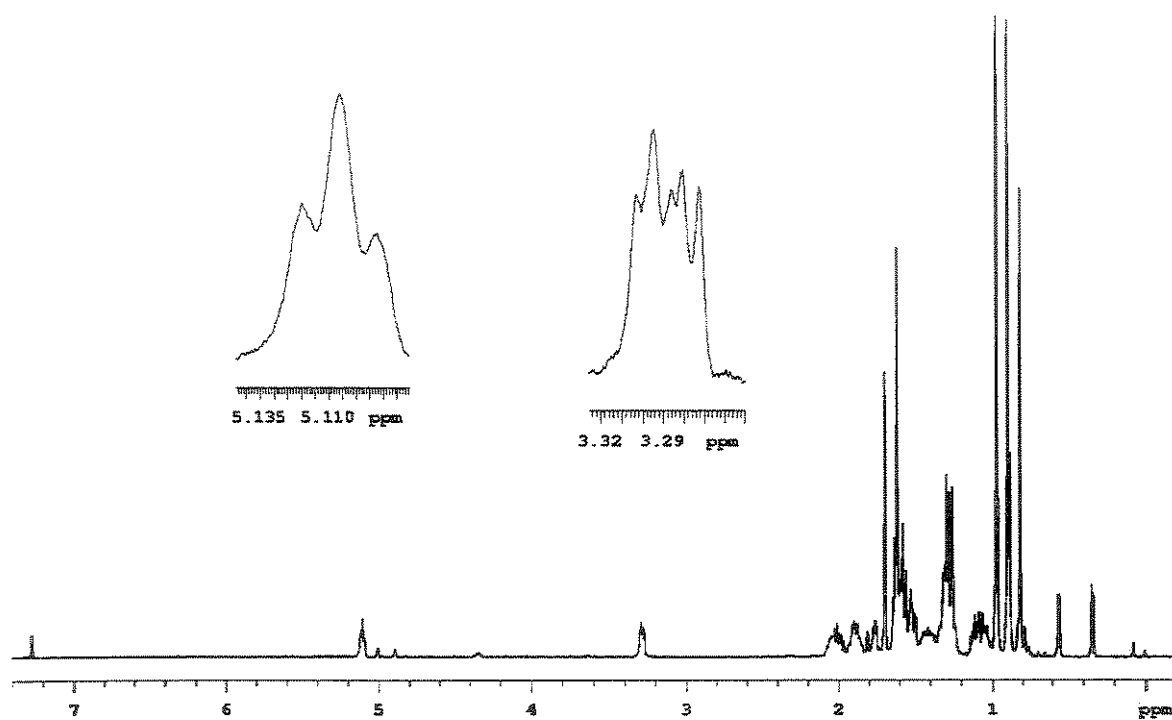
E 39. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo sobre δ 0,55 (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.



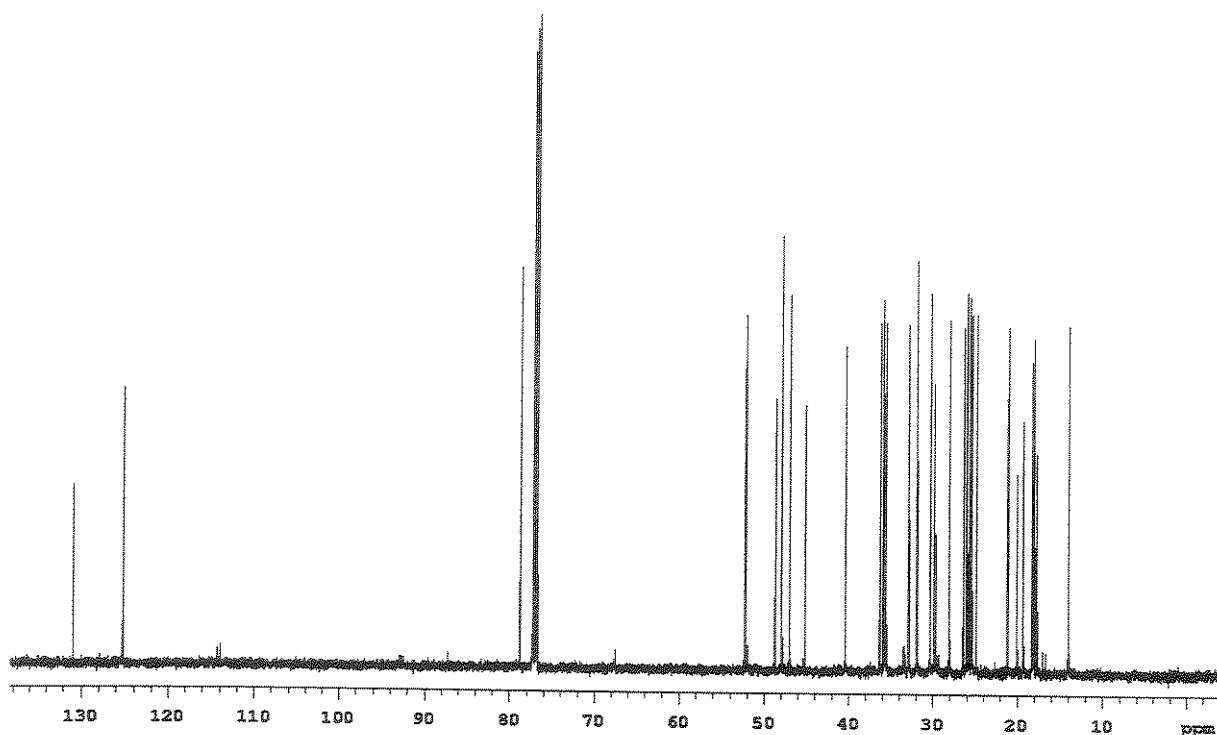
E 40. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo sobre δ 3,28 (499,89 MHz, CDCl_3) de MC1.



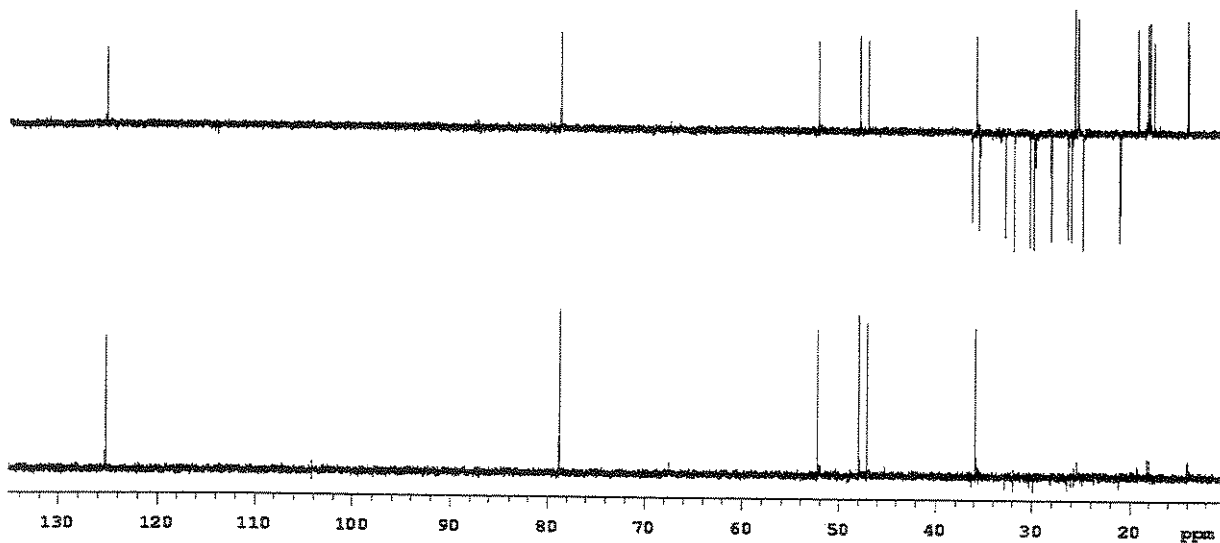
E 41. Espectro de massas a 70 eV de MFC2F11.



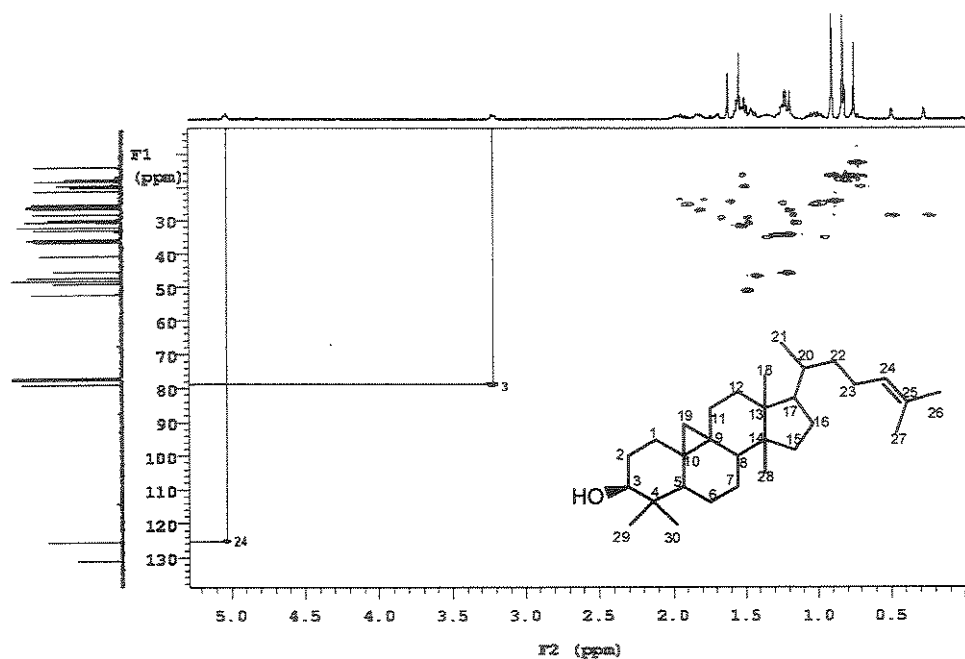
E 42: Espectro de RMN de ^1H (499,89 MHz, CDCl_3) de MFC2F11.



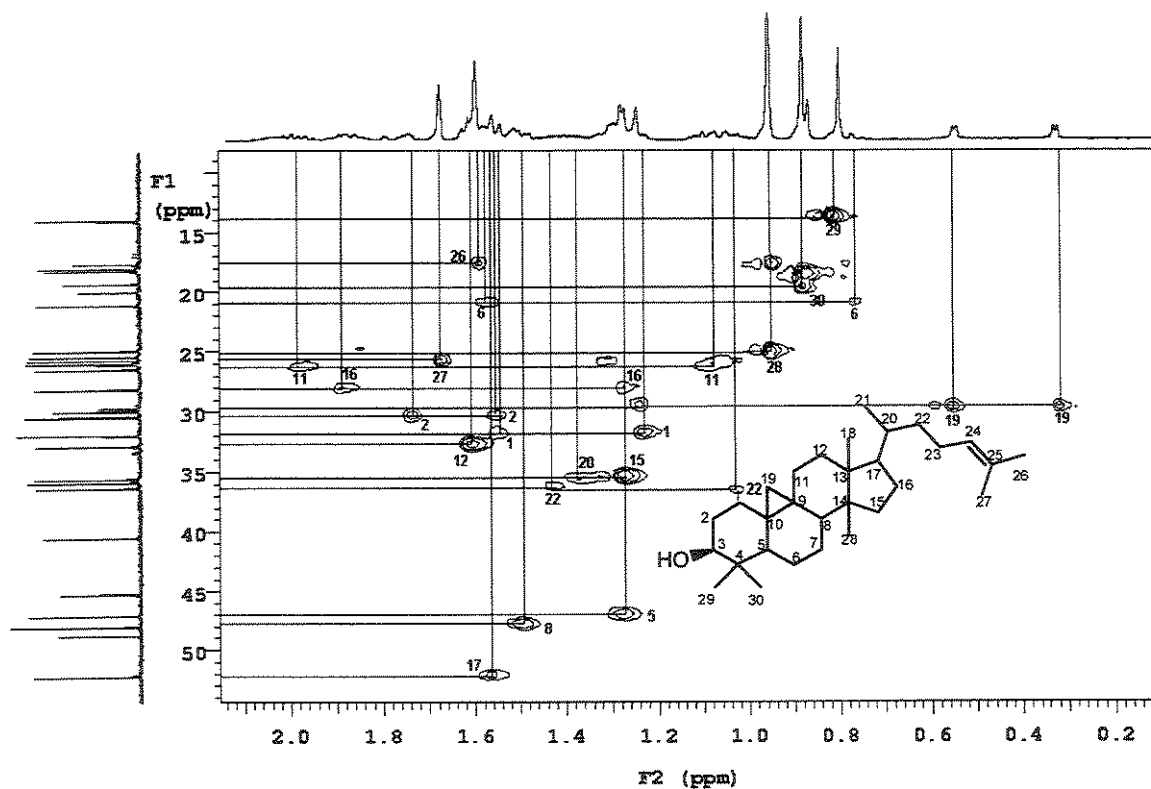
E 43. Espectro de RMN de ^{13}C de RMN de $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ (125,69 MHz, CDCl_3) de MFC2F11.



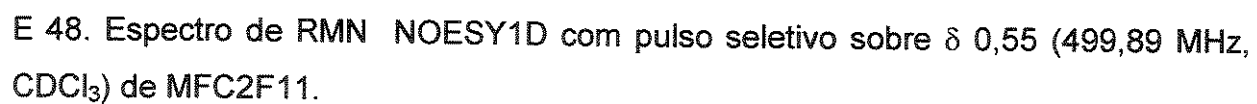
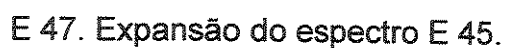
E 44. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135 e DEPT 90) a 125,69 MHz, em CDCl_3 de MFC2F11.

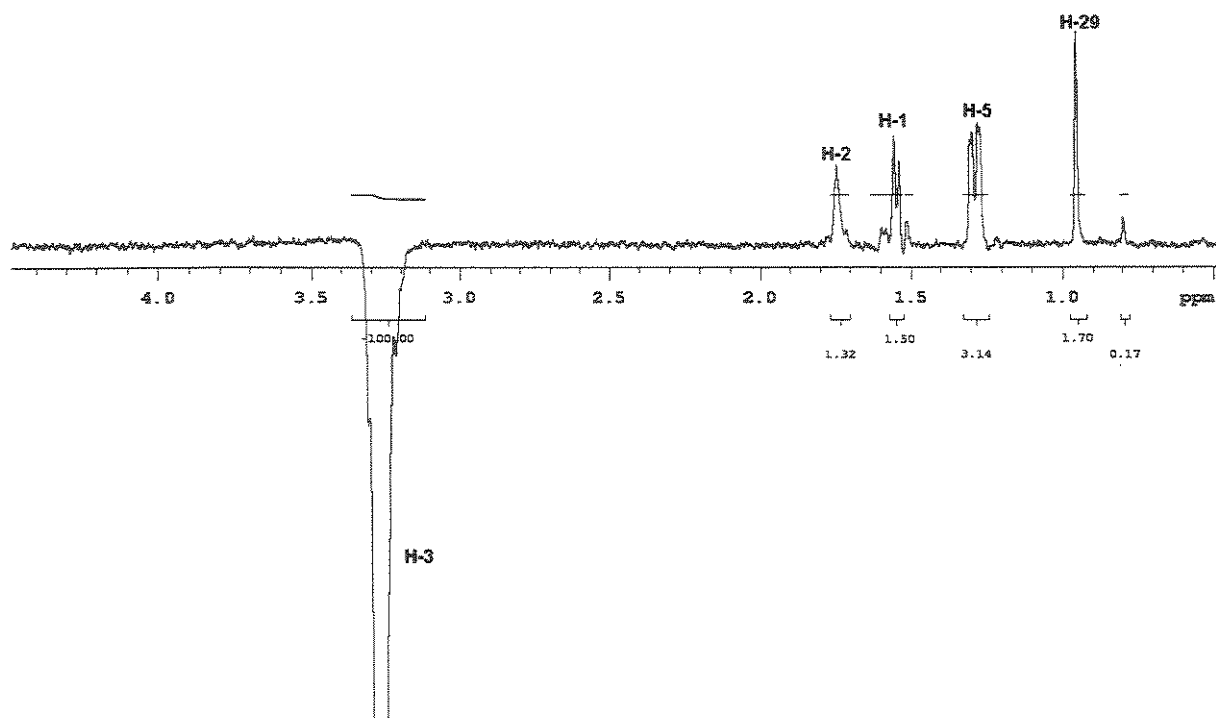


E 45. Mapa de contornos do espectro de RMN 2D das correlações ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC) a 499,89 MHz, em CDCl_3 de MFC2F11.

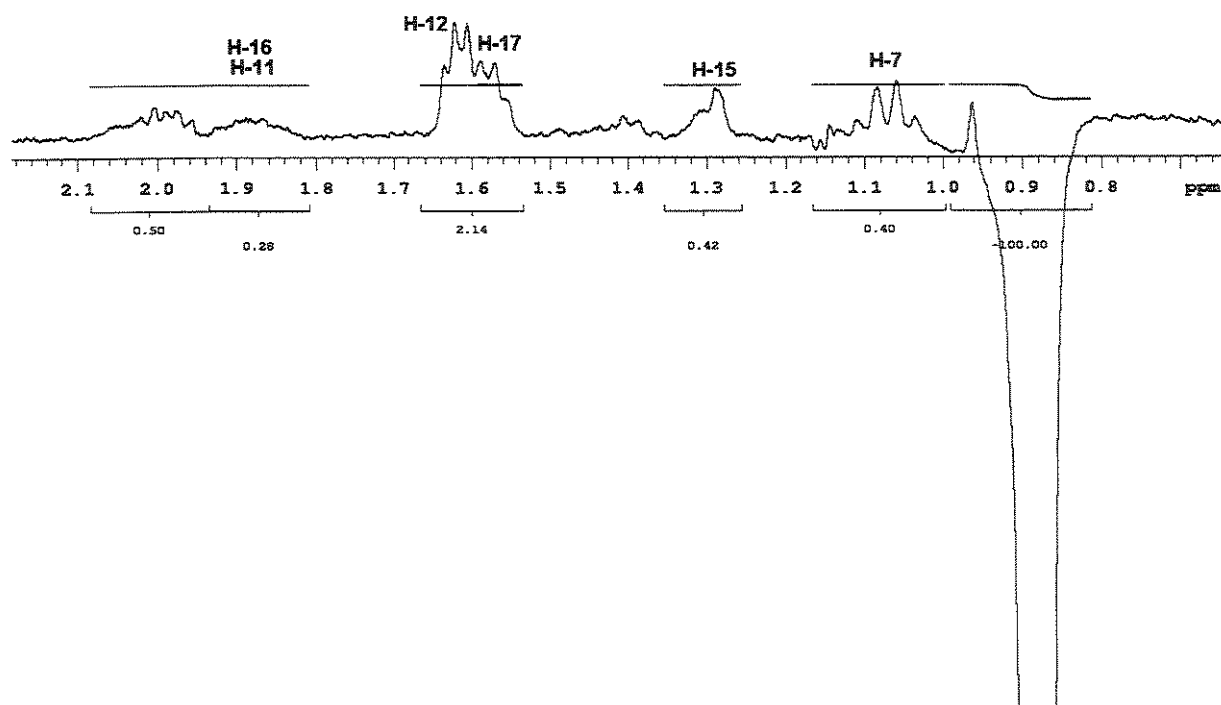


E 46. Expansão do espectro E 45.

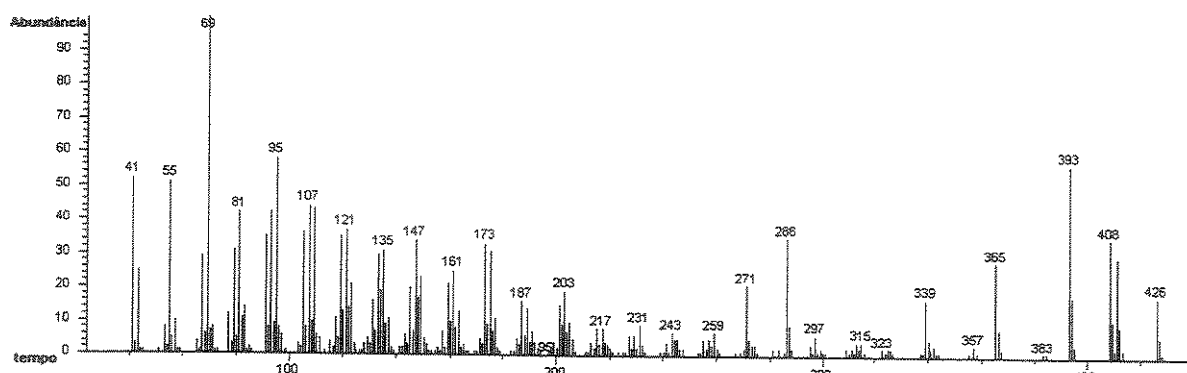




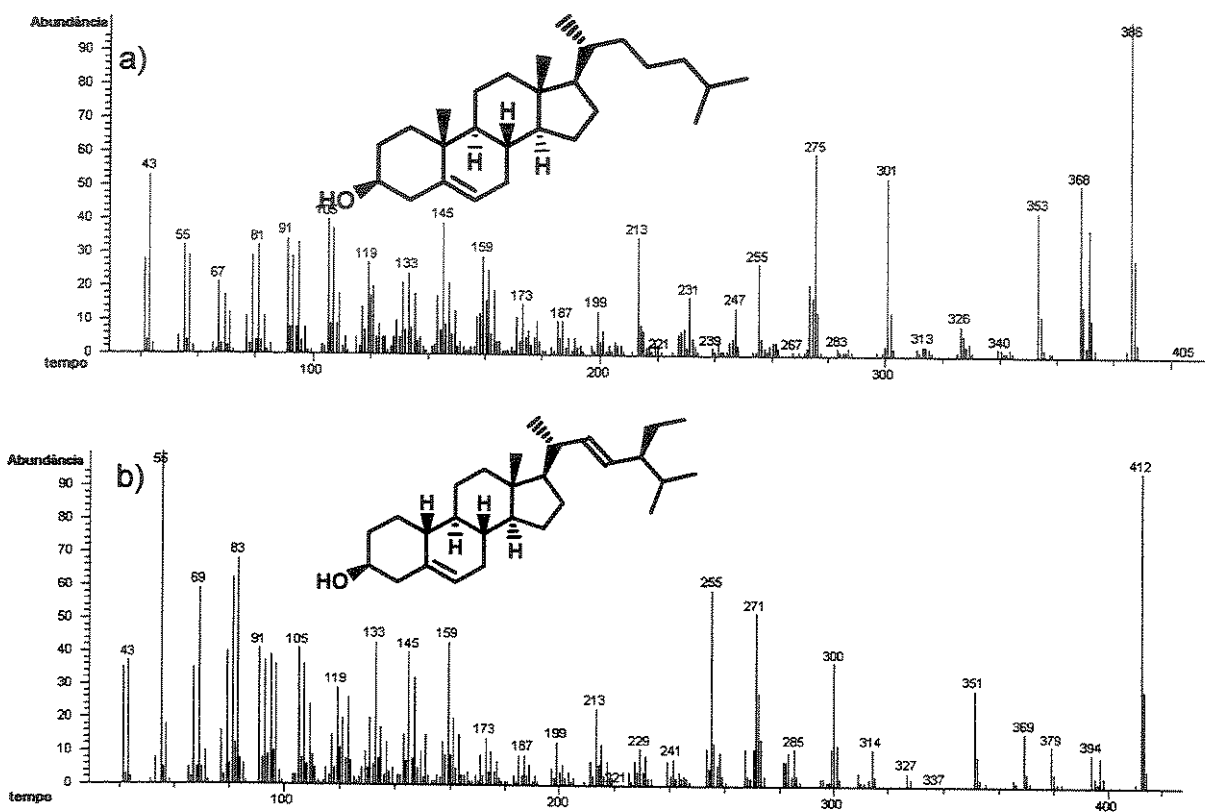
E 49. Espectro de RMN de NOESY1D com pulso seletivo sobre δ 3,23 (499,89 MHz, CDCl_3) de MFC2F11.



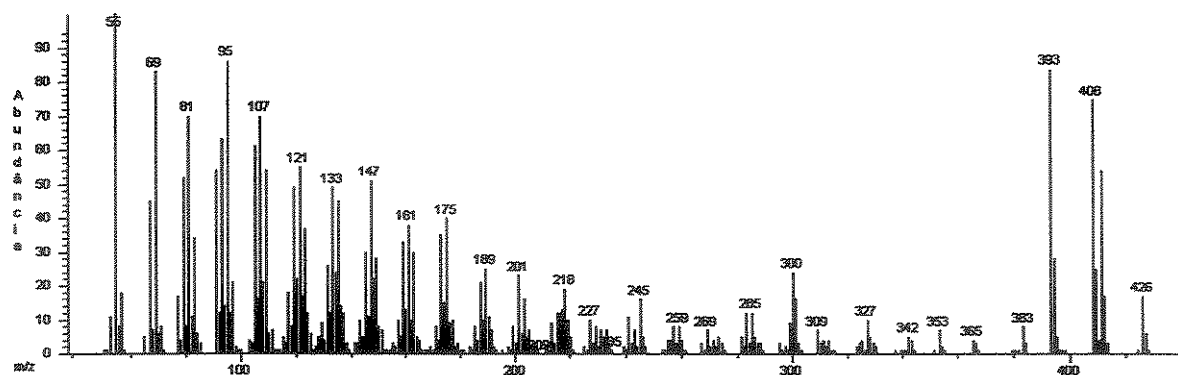
E 50. Espectro de RMN de NOESY1D com pulso seletivo sobre δ 0,90 (499,89 MHz, CDCl_3) de MFC2F11.



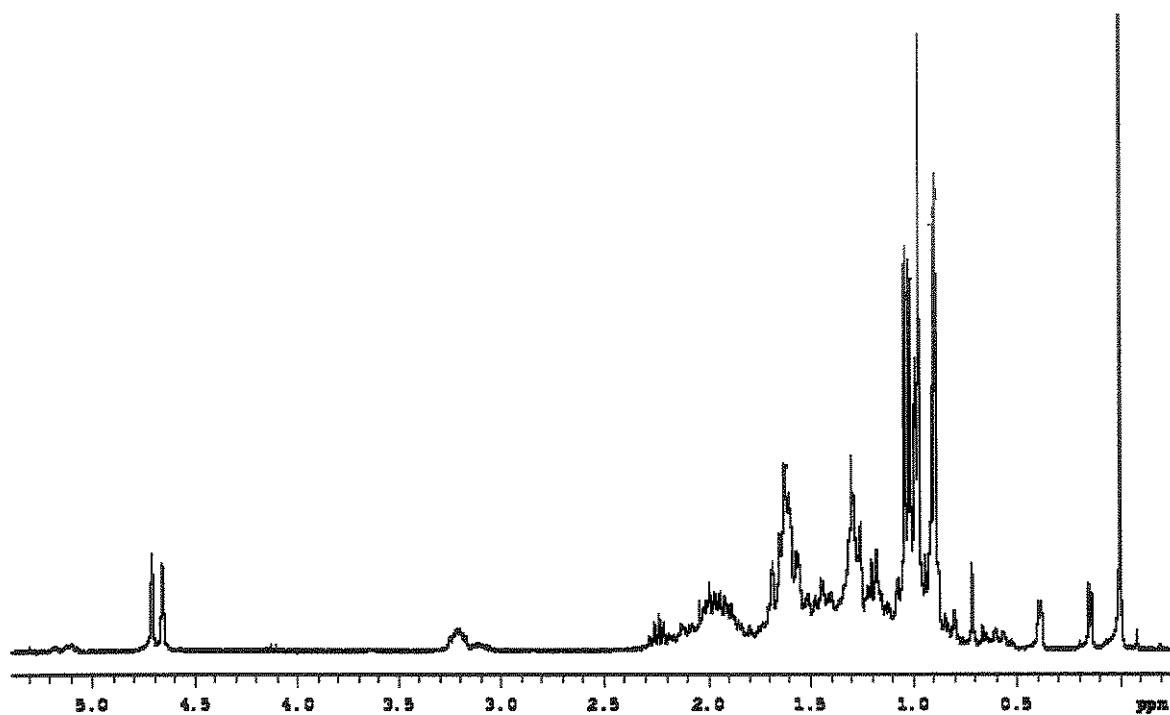
E 51. Espectro de massas obtido para MB1 a 70 eV.



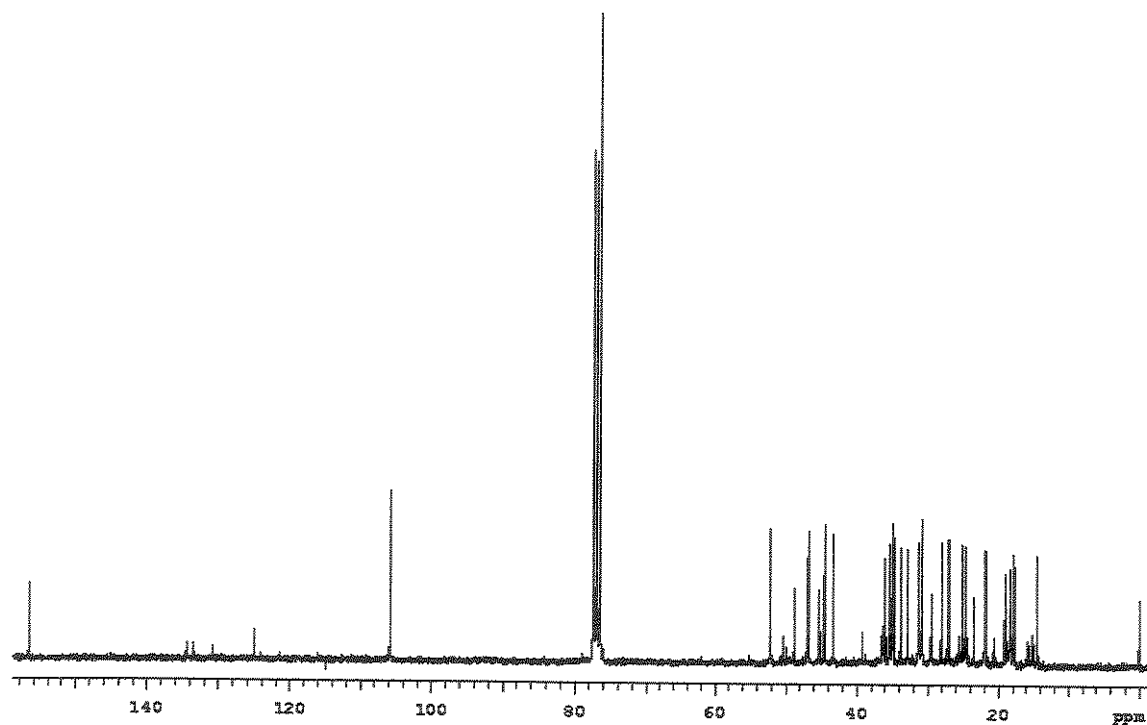
E 52. Espectros de massas do colesterol (a) e estigmasterol (b) identificados no néctar de *Spathodea campanulatta*, obtidos a 70 eV.



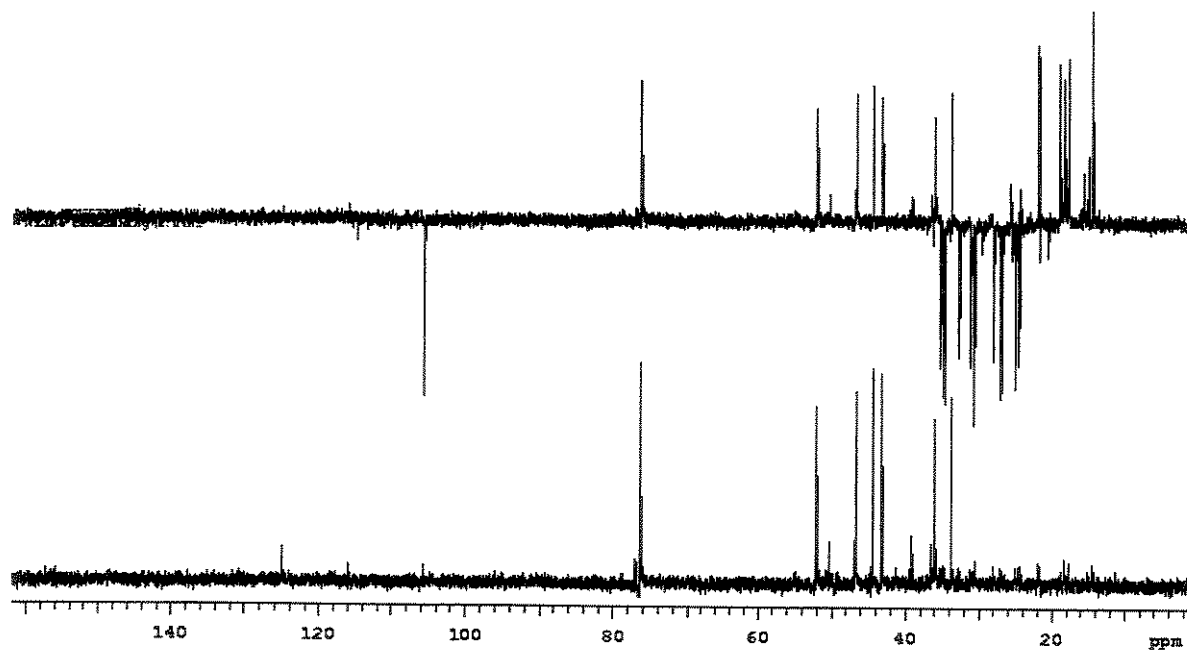
E 53. Espectro de massas do composto principal da fração SC18.



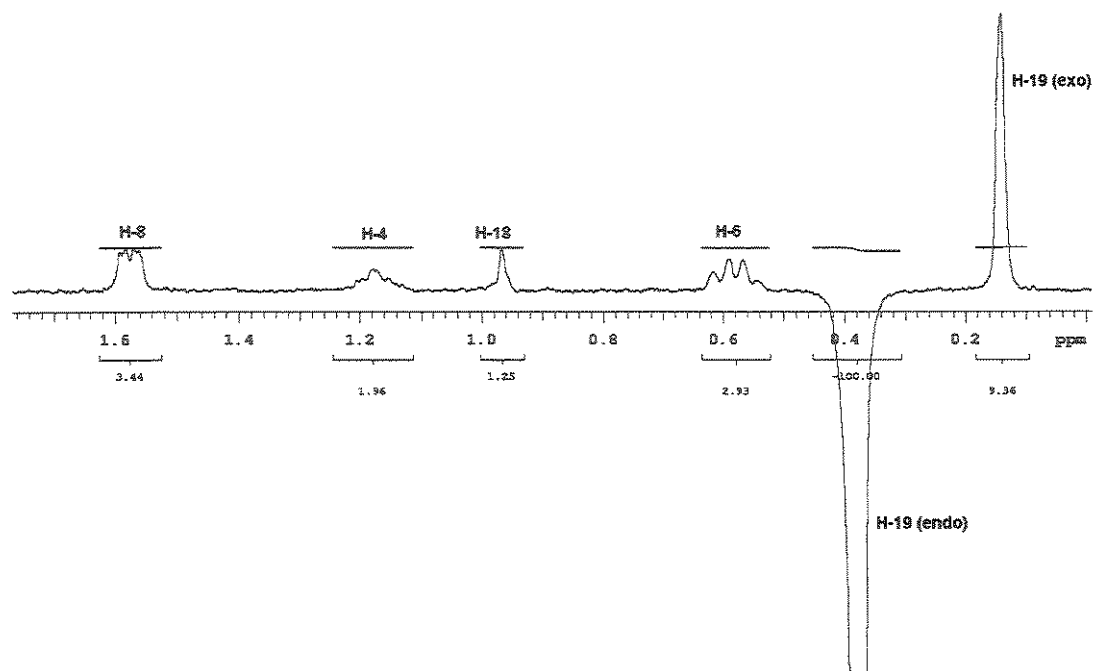
E 54. Espectro RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) de SC18.



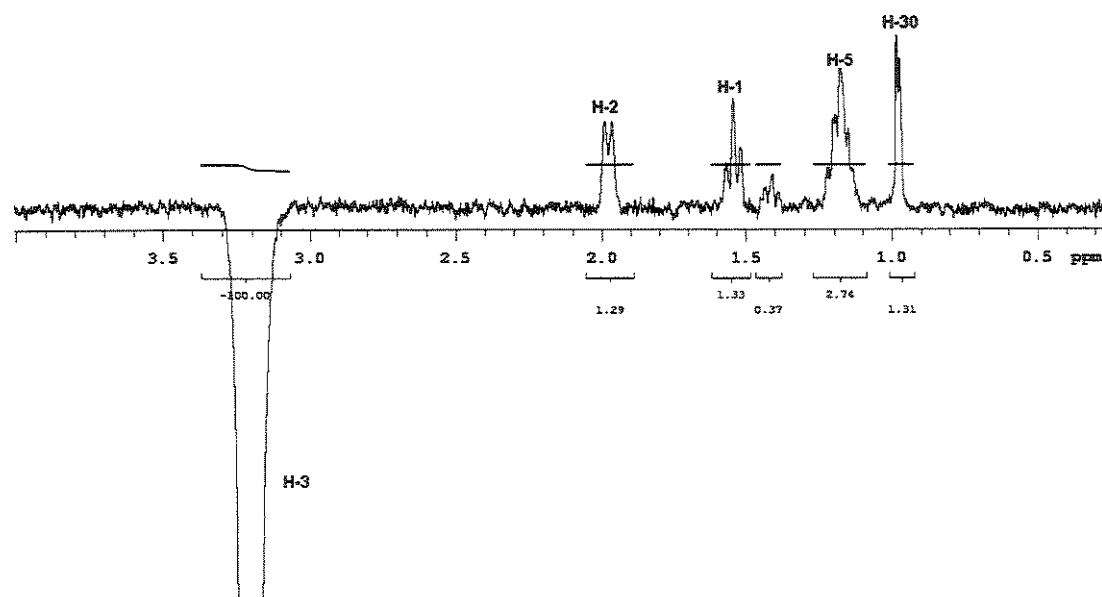
E 55. Espectro de RMN de ^{13}C de RMN de $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ (75,45 MHz, CDCl_3) de SC18.



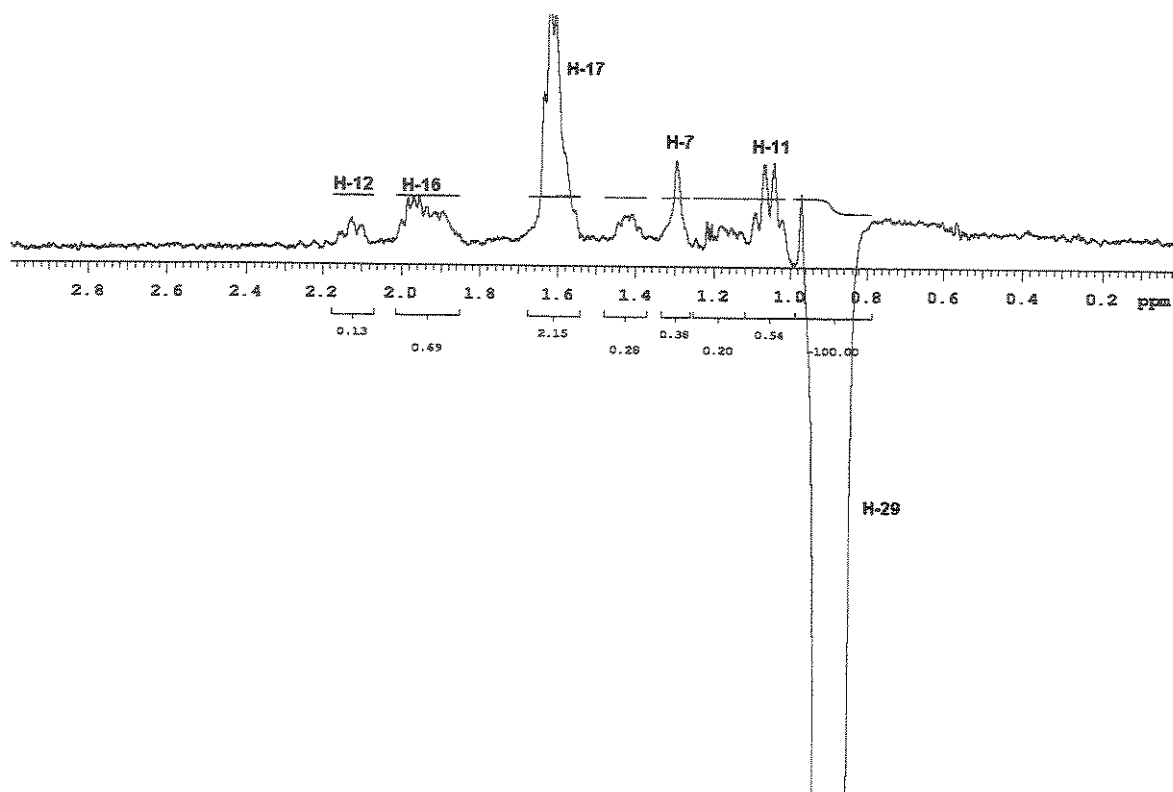
E 56. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90 e DEPT 135) a 75,45 MHz, em CDCl_3 , de SC18.



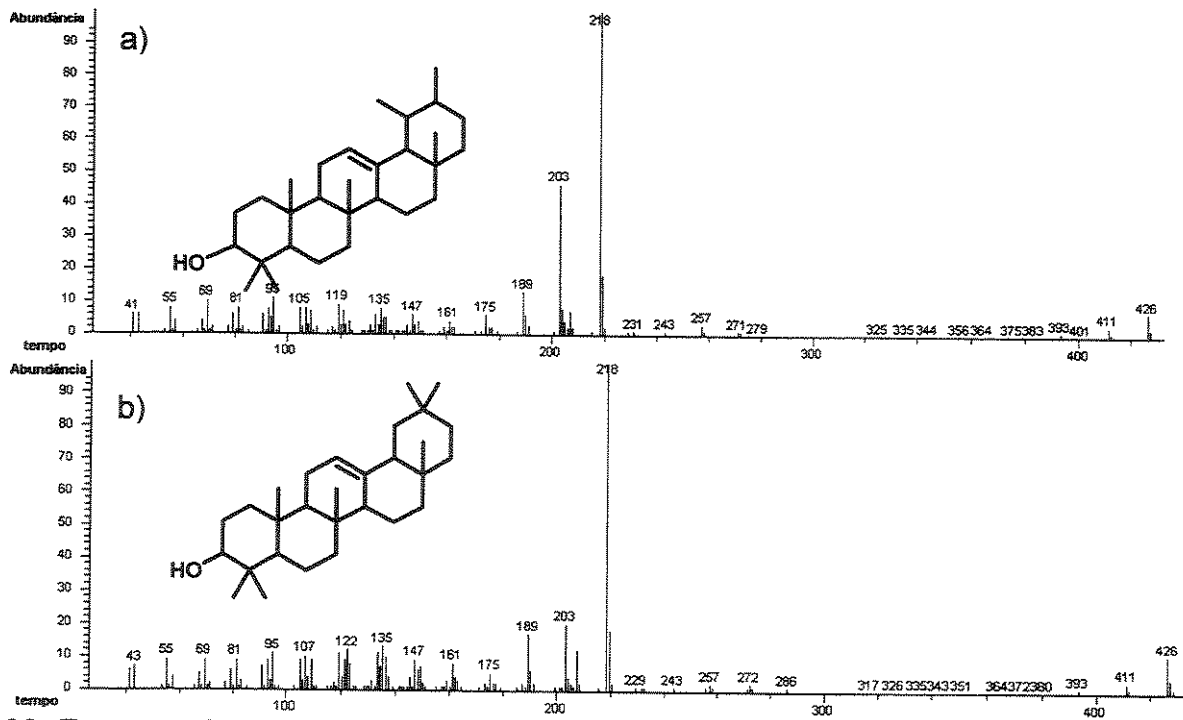
E 57. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo sobre o sinal de H-19 endo (499,89 MHz, CDCl_3) de SC18.



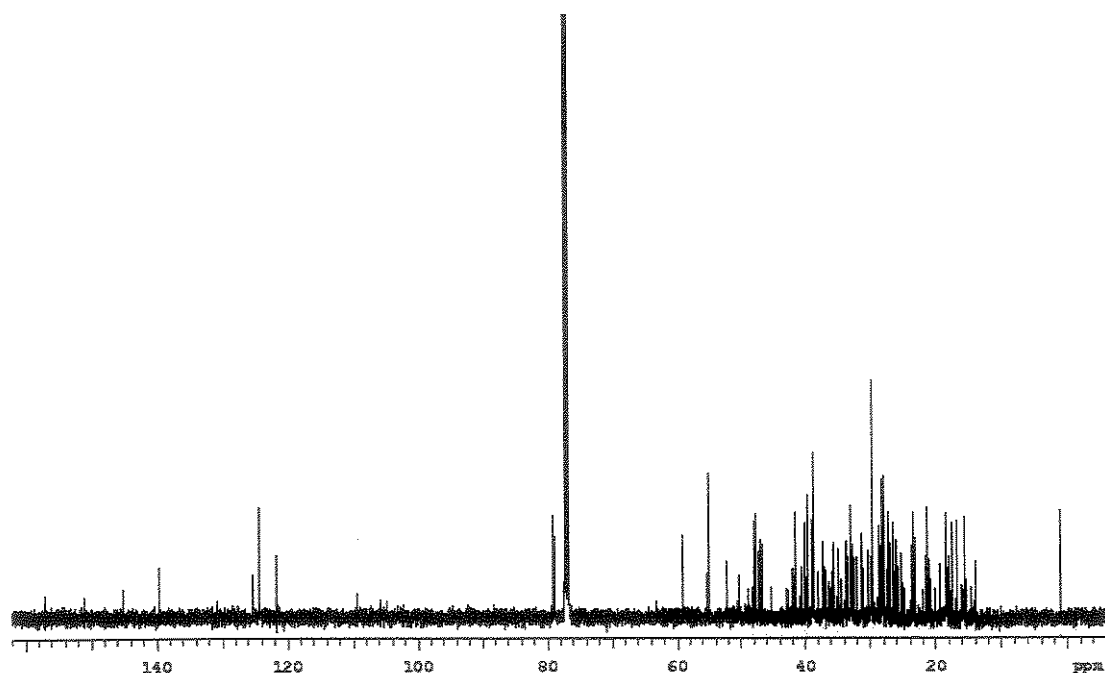
E 58. Espectro de RMN NOESY1D (499,89 MHz, CDCl_3) de SC18.



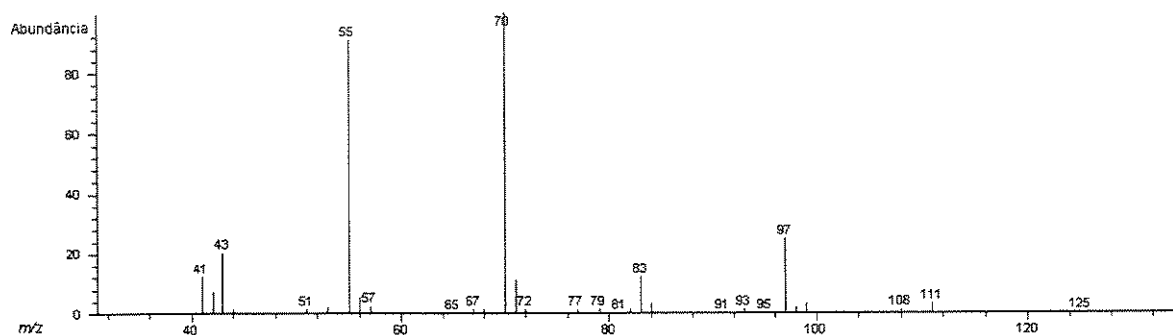
E 59. Espectro de RMN NOESY1D com pulso seletivo sobre o sinal de H-29 (499,89 MHz, CDCl_3) de SC18.



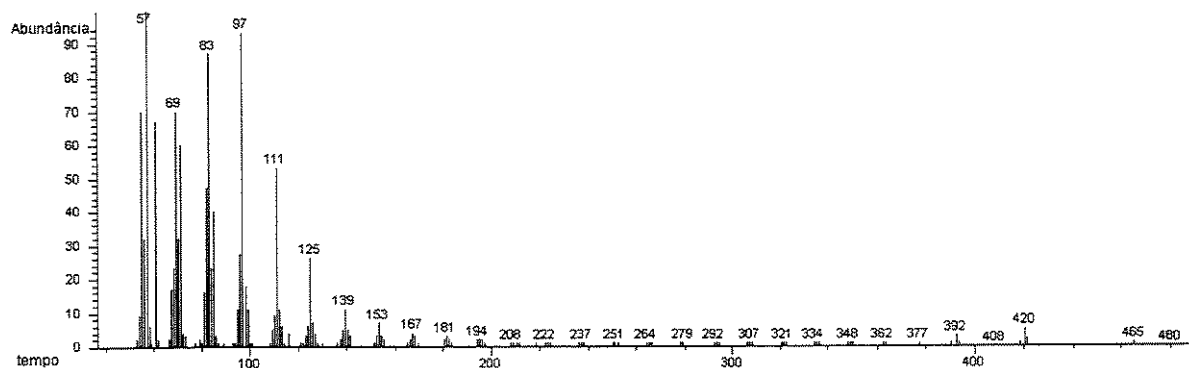
E 60. Espectro de massas da α e β -amirinas (a e b, respectivamente) a 70 eV.



E 61. Espectro de RMN de ^{13}C de RMN de $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ (125,69 MHz, CDCl_3) de SC19.



E 62. Espectro de massas da 1-octen-3-ona presente nos voláteis do néctar de *S. campanulata* a 70 eV.



E 63. Espectro de massas do componente principal das ceras de *M. scutellaris* de colônia invadida a 70 eV.

