



MUHAMMAD ABDUL HALEEM

**QUÍMICA DAS RECOMPENSAS FLORAIS DE
KRAMERIACEAE E MALPIGHIACEAE DO CERRADO**

**CAMPINAS
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MUHAMMAD ABDUL HALEEM

**QUÍMICA DAS RECOMPENSAS FLORAIS DE KRAMERIACEAE E
MALPIGHIACEAE DO CERRADO**

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

ORIENTADOR: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR MUHAMMAD ABDUL HALEEM, E ORIENTADA PELO PROFA.DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI**

Assinatura do Orientadora

CAMPINAS, 2012

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

H131q Haleem, Muhammad Abdul (1981-).
Química das recompensas florais de Krameriaceae
e Malpighiaceae do cerrado / Muhammad Abdul Haleem.
– Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

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

1. Ácidos graxos 3,9-diacetoxi. 2. Malpighiaceae.
3. Óleos florais. 4. Recompensas florais.
5. Krameriaceae. I. Marsaioli, Anita Jocelyne.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Floral rewards chemistry of Krameriaceae and Malpighiaceae of Brazilian Savannah

Palavras-chave em inglês:

Fatty acids
Malpighiaceae
Floral oil
Floral rewards
Krameriaceae

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Anita Jocelyne Marsaioli [Orientadora]
Massuo Jorge Kato
Helena Maura Torezan Silingardi
José Augusto Rosário Rodrigues
Carlos Henrique Inácio Ramos

Data de defesa: 19/12/2012

Programa de pós-graduação: Química

﴿ وَعِنْدَهُ مَفَاتِحُ الْغَيْبِ لَا يُعَلِّمُهَا إِلَّا هُوَ وَيَعْلَمُ مَا فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ وَمَا تَسْقُطُ
مِنْ وَرَقَةٍ إِلَّا يَعْلَمُهَا وَلَا حَبَّةٍ فِي ظُلْمَتِ الْأَرْضِ وَلَا رَطْبٍ وَلَا يَابِسٍ إِلَّا فِي كِتَابٍ

﴿ مَبِينٍ ﴾

*Dedicado ao meu falecido pai, **Muhammad Jamil Khan**,
que sempre orou por mim, me apoiava e sabia que eu
teria sucesso. Sinto saudade dele e irei amá-lo para
sempre. Que Allah guarde a sua alma em paz eterna.
Amém*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a *ALLAH* (ﷻ), por ter me concedido a oportunidade de vir ao Brasil realizar meu doutorado e por ter me mantido ao longo dessa existência próximo a muitas pessoas com as quais venho aprendendo muito sobre a vida.

Gostaria de agradecer a muitas pessoas que tornaram possível a realização dessa tese. Aos meus parentes, por seus infinitos afetos, apoio, incentivo, sem nada exigir em troca. Especialmente a minha família, pela orientação brilhante, apoio e amizade sempre presente. A professora Anita J Marsaioli, por ter sido uma excelente supervisora e orientadora, por todos os seus valorosos conselhos, paciência e infinita ajuda na redação dessa tese. É um prazer para mim, agradecer aos professores constituintes da banca do meu exame geral de doutorado: Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues, Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho e Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura. Aos professores que participaram de minha qualificação de área e banca de defesa; Prof. Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda, Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues e Prof. Dr. Carlos Henrique Inacio Ramos, Prof. Dr. Massuo J Kato e Profa. Dra. Helena Maura T Silingardi pelas suas preciosas contribuições nas discussões para a conclusão dessa tese. Gostaria de agradecer aos professores da IQ, Dr. Ronaldo Pilli, Dra. Heloise O. Pastore (Lolly) e Dra. Adriana V Rossi, pelo recepção no Instituto em 2009 e Dr. Pedro Luiz Onofrio Volpe por sua assistência e amizade durante a minha pós-graduação.

Ao Gabriel, por estar sempre disponível a ajudar de diversas maneira, inclusive por seu apóio interminável na redação dessa tese. Aos meus colegas de laboratório por proporcionar um ambiente estimulante e divertido para aprender e crescer. Estou especialmente grato a Adriana, Bruna, Carla, Carol, Célio, Dani, Dávila, Diana, Fabi, Felipe, Francine, Giédre, Gudryan, Lair, Lucas, Thiago, Simone e Rafa. Gostaria de agradecer meus amigos do Paquistão, Syed, Adnan, Hameed, Sabir, Sajjad, Ali, Alamgir, Khalid, Majeed, Fozia, Zulqarnain, Hamid, Rahim e Umar.

Gostaria de agradecer aos funcionários: Simone (secretária), Dona Maria; Anderson, Paula e Sônia (RMN); Bel e Gabriela (CPG) do Instituto de Química da UNICAMP e todos os outros que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do meu trabalho.

Eu devo a minha mais profunda gratidão a TWAS (The World Academy of Science), Trieste-Itália e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) - Brasil pelo apóio financeiro e acolhida.

CURRÍCULO RESUMIDO DO AUTOR

MUHAMMAD ABDUL HALEEM

Doutorando em Química.

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, SP, Brasil).

ANO DE INÍCIO: 2009.

Mestre em Química.

University of Malakand (UOM, KPK, Paquistão).

ANO DE CONCLUSÃO: 2005.

Graduação.

University of Peshawar (UOP, KPK, Paquistão).

ANO DE CONCLUSÃO: 2002.

Artigos Publicados

1. S.C. Cappellari, **M.A. Haleem**, A.J. Marsaioli, R. Tidon., B.B. Simpson. **2011**. *Pterandra pyroidea* – a case of pollination shift within Neotropical Malpighiaceae. *Ann. Bot.* **107**: 1323 – 1334.

Trabalhos apresentados em congressos científicos

- (1). **Haleem, M.A.**; Cappellari, S.C.; Marson, G.; Pianaro, A.; Marsaioli, A.J. Análise química de óleos florais de Malpighiaceae do Cerrado.

Em - 33. Reunião Anual da SBQ., em Águas de Lindóia – SP, Brasil;

Trabalho apresentado na forma de **painel** (ORG-049).

- (2). Marson, G.; Pianaro, A.; **Haleem, M.A.**; Marsaioli, A.J. Ácidos e diacilgliceróis em óleos florais de Oncidinae e Malpighiaceae.

Em- Congresso Interno, Unicamp, Campinas-SP, Brasil

Trabalho apresentado na forma de **painel**.

- (3). **Haleem, M.A.**; Cappellari, S.C.; Simpson, B.B.; Marsaioli, A. J. Isolation and chemical characterization of new Malpighiaceae floral fatty acids.

Em- The 11th International Chemistry conference and Exhibition in Africa; Luxor, Egito
Trabalho apresentado na forma de **painel** (P031-III).

Workshop

- (4). 2nd International Workshop on Organic Chemistry, Realizada no período de 14 a 16 de Fevereiro de 2010. Em IQ da Unicamp, Campinas – SP; Brasil.
- (5). 3rd International Workshop on Organic Chemistry, Realizada no período de 14 a 16 de Fevereiro de 2011. Em IQ da Unicamp, Campinas – SP; Brasil.

RESUMO

O papel dos óleos florais na atração dos polinizadores (abelhas solitárias) é recorrente em várias famílias de angiospermas. Neste estudo foram analisados (CG-EM/IE, ESI-EM, e RMN de 1D de 2D) óleos florais de Malpighiaceae de 33 espécies simpátricas do cerrado pertencentes aos gêneros *Banisteriopsis*, *Byrsonima*, *Camerea*, *Heteropterys*, *Peixotoa*, *Pterandra*, e *Tetrapterys* e de 48 Krameriaceae. As análises revelaram a presença de ácidos graxos substituídos com cadeias de 18 a 24 átomos de carbono e com dois substituintes, **3,7-diacetoxi**, ou **3-hidroxi-7-acetoxi**, ou **3,9-diacetoxi**, ou **5,7-diacetoxi** ou **5,9-diacetoxi**. Os ácidos graxos substituídos em **3** e **7** ocorrem predominantemente nos óleos florais de *Byrsonima*, *Heteropterys*, *Peixotoa reticulate*. Os ácidos graxos com dois grupos acetoxi nos carbonos **3** e **9** ocorrem nos óleos florais de *Banisteriopsis*. Os óleos florais de *Peixotoa goina* e *Tetrapterys jussieuniana* são compostos por uma mistura de acilglicerois. A composição química do óleo floral de *Pterandra pyroidea* é bastante simples e constituída de 4 ácidos graxos sendo que 2 destes apresentaram substituintes nas posições 5 e 7 distinguindo-se dos óleos florais das outras Malpighiaceae. O ácido *anti-5,7-diacetoxidocosanóico* é o constituinte majoritário deste óleo e sua estrutura foi confirmada por síntese, e caracterizado por espectrometria de massas, RMN de ^1H e ^{13}C , e finalmente denominado de ácido Pterandrico. Os óleos florais de Krameriaceae possuem também ácido de 18 a 24 átomos de carbono com somente um substituinte acetoxi (-OAc) ou hidroxil (-OH) na posição β .

O segundo capítulo da tese se propôs a desvendar a relação entre as recompensas florais (néctar e pólen) do manjeriço (*Ocimum basilicum*) e as provisões encontradas no ninho da abelha solitária *Tetrapedia diversipes*. Nossas análises revelaram a presença de carboidratos e proteínas nas provisões do ninho de *T. diversipes* e no pólen de manjeriço (*O. basilicum*). Identificação e caracterização dos constituintes do pólen de *Ocimum basilicum* e das provisões do ninho de *T. diversipes* confirmou a presença de glicose, galactose, manose e xilose em ambos. Análises por CG-EM revelaram que galactose e glicose são os constituintes majoritários enquanto que xilose e manose são carboidratos minoritários no pólen e nas provisões do ninho. As semelhanças dos perfis dos carboidratos do pólen de *O. basilicum* e das provisões dos ninhos de *T. diversipes* selam a correlação entre esta planta e seu polinizador.

ABSTRACT

The role of elaiophores secretion (floral oils) to pollinator attraction (solitary bees) has been established in several angiosperm families. The current study deals with chemical analyses (GC-MS/EI, ESI-MS, and 1D and 2D ^1H and ^{13}C NMR –(HSQC and HMBC) of Malpighiaceae floral oils in 33 sympatric species belonging to *Banisteriopsis*, *Byrsonima*, *Camerea*, *Heteropterys*, *Peixotoa*, *Pterandra*, and *Tetrapteryx* genera and 48 samples of Krameriaceae floral oils. The floral oils spectroscopic data revealed the presence of **substituted fatty acids** possessing 18 to 24 carbon atoms with two substituents either as **3,7-diacetoxy**, or **3-hydroxy-7-acetoxy**, or **3,9-diacetoxy**, or **5,7-diacetoxy** or **5,9-diacetoxy**. The **3,7-disubstituted** fatty acids are predominant in *Byrsonima*, *Heteropterys*, *Peixotoa reticulata* floral oils, **3,9-diacetoxy disubstituted fatty acids** in *Banisteriopsis* floral oils. While, *Peixotoa goina* and *Tetraptenys jussieuniana* elaiophores secretion contain a mixture of acylglycerols. The *Pterandra pyroidea* floral oil chemical composition is simple, with a few fatty acid constituents possessing acetoxy groups at positions 5 and 7 which is distinct from the rest of floral oil of sympatric Malpighiaceae species. The structure of the major floral oil constituent is a novel fatty acid, **anti-5,7-diacetoxydocosanoic acid** which was confirmed by synthesis, mass fragmentation, ^1H and ^{13}C NMR analyses, herein named Pterandric acid. Similarly, Krameriaceae floral oils also contains long chain fatty acids with only one substituent either acetoxy (-OAc) or hydroxy (-OH) at β position, with 18 to 24 carbon atoms.

The second part of thesis deals with the correlation between floral rewards (pollen, nectar) of sweet basil (*Ocimum basilicum*) and the *Tetrapedia diversipes* (solitary oil collecting bee) larval nest provisions. Our analyses reveal the presence of carbohydrates and protein in *T. diversipes* nest provision as well as in the *O. basilicum* pollen and nectar. Identification and characterization of carbohydrates constituents in the *O. basilicum* pollen and *T. diversipes* nest confirmed the presence of glucose, galactose, mannose and xylose in both. Furthermore, mass spectrometric analyses indicated that galactose and glucose are major constituents, while xylose and mannose are minor carbohydrates components present in the *O. basilicum* pollen and *T. diversipes* nest provision. The similarity of *O. basilicum* pollen and *T. diversipes* nest provision carbohydrate profiles suggest a plant pollinator correlation.

ÍNDICE

Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de Figuras.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1. Óleos florais como recompensas.....	5
1.2. Elaióforos	7
1.2.1. Elaióforos epiteliais	7
1.2.2. Elaióforos tricomas.....	8
1.3. Família Malpighiaceae.....	8
1.4. Família Krameriaceae	9
1.5. Química dos óleos florais	11
1.5.1. Acilgliceróis	12
1.5.2. Ácidos graxos.....	13
1.6. Néctar	15
1.7. Pólen	15
1.8. Abelhas.....	16
1.8.1. Abelhas brasileiras.....	17
1.8.2. Abelhas solitárias	18
1.8.3. <i>Tetrapedia diversipes</i>	20

2. OBJETIVOS	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. Análise química dos óleos florais de Malpighiaceae do Cerrado	29
3.1.1. Óleos florais do tipo A.....	31
3.1.2. Óleos florais do tipo B.....	37
3.1.3. Óleos florais do tipo C.....	44
3.1.4. Óleos florais do tipo D.....	48
3.1.5. Composição química dos óleos florais da família Malpighiaceae do Cerrado	50
3.1.6. Caracterizações de acilgliceróis	52
3.2. Especificidade química dos óleos florais de espécies da família Malpighiaceae	58
3.2.1. <i>Banisteriopsis</i>	58
3.2.2. <i>Byrsonima</i>	59
3.2.3. <i>Heteropterys</i>	60
3.2.4. <i>Camerea</i>	60
3.2.5. <i>Peixotoa</i>	61
3.2.6. <i>Tetrapteryx</i>	62
3.2.7. <i>Pterandra</i>	63
3.3. Análise química dos óleos florais de Krameriaceae	69

3.4.	Síntese do ácido pterândrico	82
3.4.1.	Estereoquímica relativa do ácido pterândrico	86
3.5.	Análise química dos ninhos das abelhas brasileiras solitárias e Néctar de Manjeriço	90
3.5.1.	Determinação do teor de carboidratos no Ninho de <i>Tetrapedia diversipes</i> , Antera e Néctar de <i>Ocimum basilicum</i> (Manjeriço)	91
3.5.2.	Determinação do teor de proteínas no ninho de <i>Tetrapedia diversipes</i> , antera e néctar de manjeriço.	94
3.5.3.	Identificação dos carboidratos no alimento larval dos ninhos	96
3.5.4.	Identificação dos carboidratos no alimento larval dos ninhos de <i>Tetrapedia diversipes</i>	105
3.5.5.	Componentes dos açúcares presente nas anteras do manjeriço	106
4.	Parte Experimental	111
4.1	Óleos florais	111
4.2	Identificação dos Ácidos graxos	114
4.3	Solventes	115
4.4	Equipamentos e Métodos	115
4.5	Isolamento dos padrões naturais	117
4.6	Sínteses dos padrões	121

4.7	Preparação dos padrões para a curva de calibração no espectrofotômetro de UV-VIS.....	125
4.8	Preparação das amostras dos ninhos de <i>Tetrapedia diversipes</i> , das anteras e néctar de manjeriço.	125
4.9	Preparação dos padrões para a curva de calibração no espectrofotômetro de UV-VIS.....	126
4.10	Preparação das amostras dos ninhos de <i>Tetrapedia diversipes</i> , de anteras e néctar de Manjeriço.	127
4.11	Preparação dos padrões de alditóis peracetilados	127
5.	CONCLUSÕES	132
6.	REFERÊNCIAS	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Uso das recompensas florais distintas de pólen e néctar (Simpson 1981).	5
Tabela 2. Óleos florais das espécies Malpighiaceae	29
Tabela 3. Atribuições dos deslocamentos químicos do éster metílico do 3,9-diacetóxidocosanóico (1) (ácido graxo do tipo-A).....	36
Tabela 4. Atribuições dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), para o éster metílico do ácido 3,7-diacetóxidocosanóico (12).	43
Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3), do éster metílico do ácido pterândrico (5).....	48
Tabela 6. Novos tipos de ácidos graxos florais identificados.....	51
Tabela 7. Identificação dos compostos como ésteres metílicos em óleos florais de Malpighiaceae.....	55
Tabela 8. Composição dos óleos florais de várias espécies de Malpighiaceae do Cerrado.	67
Tabela 9. Fragmentos característicos dos ácidos graxos florais contendo o grupo 3-acetóxiaacetóxi (modificados).	73

Tabela 10. Fragmentos característicos dos ésteres metílicos e etílicos dos 3-hidroxiacetoacetatos.....	75
Tabela 11. Dados de 1D e 2D de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (HSQC, HMBC) para o representante de ácidos graxos modificados dos óleos florais da Krameriaceae.....	77
Tabela 12. Componente do óleo floral da família Krameriaceae.	78
Tabela 13. Quantificação de carboidratos presentes nos ninhos de <i>Tetrapedia diversipes</i> , anteras e néctar de manjeriço.....	93
Tabela 14. Teor de proteína nos ninhos de <i>Tetrapedia diversipes</i> , anteras e néctar de manjeriço.....	95
Tabela 15. Deslocamentos químicos (δ) dos alditóis peracetilados (padrões sintético) em CDCl_3/TMS – RMN ^1H	103
Tabela 16. Deslocamentos químicos (δ) dos alditóis peracetilados (padrões sintético) em CDCl_3/TMS – RMN ^{13}C	104
Tabela 17. Tempo retenção dos alditóis peracetilados (padrões sintético)	105
Tabela 18. Óleos florais de espécies da família Malpighiaceae.	111
Tabela 19. Quantidade de óleo floral na família Krameriaceae *	113
Tabela 20. Parâmetros da técnica de CG/IE-EM para a análise do óleo floral.	116
Tabela 21. Rendimento obtido na síntese dos alditóis peracetilados.....	128

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Abelha da espécie *Epicharis flava* coletando óleo floral de *Byrsonima basiloba* (Foto: Simone)..... 6
- Figura 2. (A). Elaioforos no lado ventral da flor de *Banisteriopsis schizoptera*, (B). Elaioforos com óleo floral (*Peixotoa tomentosa*) (C). Abelha forrageando elaioforos (*Peixotoa tomentosa*) (Foto: Simone & Gudryn). 7
- Figura 3. (A). Secção longitudinal de elióforos tricomais de *Calceolaria pavonii* (B). Secção longitudinal de elaióforos epiteliais, mostrando a camada cuticular protetora (Vogel 1974, Reis 2005)..... 8
- Figura 4. Flores da espécie *Pterandra pyroidea* (foto do meio): glandular (à direita) e eglandular (à esquerda) (Fotos: Simone).10
- Figura 5. (A) *Pixotoa goiana* depende de polinizadores para produzir frutos (B) *Pixotoa reticulata* é autógama (Foto: Simone).10
- Figura 6. Diagrama esquemático da flor da espécie *Krameria grandiflora*, que apresenta três pétalas não glandulares e duas pétalas glandulares (Simpson 1982).....11
- Figura 7. Acilgliceróis do tipo (A). 1,2-di-(3'-acetóxi-E-11'-octadecenoil)-sn-glicerol e (B). 1-(3'-acetóxiexadecanoil)-2 acetilglicerol.12

Figura 8. Oncidinol (2S, 3'R, 7'R)-1-acetil-2-(3',7'-diacetóxieicosanoil)-glicerol (28).....	13
Figura 9. (A) Ácidos graxos β -substituído, (B) Ácido Birsônico, (C) Ácido Tetrapédico	14
Figura 10. A) Ninho do <i>Tetrapedia diversipes</i> com 6 células (B) Uma célula de ninho ilustrada para massa clara e escura e com ovo (Santos IA, <i>et al.</i> , 2002).	21
Figura 11. Espectro CG-IE/EM de 1 (Tabela 7), pertencente à classe dos 3,9- diacetóxialcaacetóxi predominante nos florais do tipo A	32
Figura 12. Espectro CG-IE/EM de 2 (Tabela 7), pertencente à classe dos 3,9- diacetóxialcaacetóxi predominante nos óleos florais do tipo A.	32
Figura 13. Rota de fragmentação proposta para ácidos 3,9-diacetóxialcaacetóxi...33	
Figure 14. Rota de fragmentação proposta para ácidos 3,9-diacetóxidocosanoico e 3,9-diacetóxitetracosanoico.....	34
Figura 15. Fórmula estrutural do éster metílico do ácido 3,9-diacetóxidocosanóico (1).....	35
Figura 16. Rota de fragmentação proposta para os espectros de massas dos ácidos 3,7- diacetóxialcanóicos (11, 12, 17 e 46; Tabela 7).....	37
Figura 17. Rota de fragmentação proposta para ácidos 3,7-diacetóxialcanóicos....	38

Figura 18. Espectros de massas dos ésteres metílicos dos ácidos (A) 3,7-diacetóxi esteárico (46), (B) 3,7-diacetoxeicosanóico (11), (C) 3,7-diacetóxitetracosanóico (17).	39
Figura 19. Rota de fragmentação proposta (GC-EM/IE) para os ésteres metílicos dos ácidos 7-acetóxi-3-hidroxicarbanóicos.....	40
Figura 20. Rota de fragmentação proposta (CG-EM) para os ésteres metílicos dos ácidos 7-acetóxi-3-hidroxicarbanóico (9) e 7-acetóxi-3-hidroxicarbanóico (10)	40
Figura 21. Espectros de massas dos ésteres metílicos dos ácidos (A) 7-acetóxi-3-hidroxicarbanóico (9) e (B) 7-acetóxi-3-hidroxicarbanóico (10).....	41
Figura 22. Fórmula estrutural 3,7-diacetóxicarbanóico (12).....	43
Figura 23. Espectro de massas dos ácidos Pterandricos A (5) e B (6).....	44
Figura 24. Rota de fragmentação do espectro de massas indicando a presença do resíduo acetóxi em C5.....	45
Figura 25. Rota de fragmentação do ácido graxo presente no tipo-C de óleo floral com padrão de substituição 5,7-diacetóxi.....	46
Figura 26. Rota de fragmentação dos compostos 5 e 6.....	46
Figura 27. Estrutura do éster metílico do ácido pterândrico (5) composto predominante em óleo do tipo C.	47

Figura 28. Espectros de massas e rota de fragmentação proposta para os ésteres metílicos dos ácidos (A). 5,9-diacetóxicosanoico (7) (B). 5,9-diacetóxitetracosanoico (8).	49
Figura 29. Fórmula estrutural da classe D de ácidos graxos florais.	50
Figura 30. Rota de fragmentação de ácidos graxos metilados, sugerindo padrões de diss substituição 3,7-, 5,7-, 3,9- ou 5,9-.	51
Figura 31. Espectro de massas e rota de fragmentação do Oncidinol (28) com base na literatura.	52
Figura 32. Espectro de massas do 1,3-diacetil-2-(3,7-diacetóxi octadecanoil) (27).	53
Figura 33. Espectro de massas e fragmentação do 1-acetil-2-(3-acetóxi hexadecanoil) glicerol (24).	53
Figura 34. Espectro de massas e fragmentação do 1-acetil-2-(3-acetóxi octadecanoil) glicerol (25).	54
Figura 35. Espectro de massas e fragmentação do 1-acetil-2-(3-acetóxi eicosanoil) glicerol (26).	54
Figura 36. Cromatograma de íons, representativo de <i>Banisteriopsis</i> [<i>Ban. anisandra</i> (preto) e <i>Ban. laevifolia</i> (azul) óleos florais brutos] mostrando abundância de ácidos 3,9-diacetóxi alcaacetóxi.	59

Figura 37. Cromatograma representativo de íons de óleos florais de <i>Byrsonima</i> (azul), <i>Heteropterys</i> (preto), e <i>Peixotoa</i> (vermelho).....	61
Figura 38. Cromatograma de íons de óleos florais de duas espécies de <i>Peixotoa</i> ..	62
Figura 39. Cromatograma de íons do óleo floral de <i>Pterandra pyroidea</i>	64
Figura 40. Padrão de TLC para os óleos florais do vegetal da família Krameriaceae (A) antes da adição do diazometano; (B) após a adição de diazometano.....	69
Figura 41. Rearranjos de McLafferty que representam a metilação ou a etilação (modificação) dos ácidos graxos florais presentes no óleo floral de indivíduos da família Krameriaceae.	70
Figura 42. Rota de fragmentação para o ácido graxo substituído com o grupo 3-acetóxido, associado com valores de m/z de diferentes picos (como M^+ , a, b, c, d, e, f, e g etc.) nos espectros de massas (vide Tabela 9).....	71
Figura 43. Rota de fragmentação de massas para o ácido graxo floral substituído com o grupo 3-acetóxido; para valores de R, R'; para o valor do pico h, consultar a Tabela 9.	71
Figura 44. Rota de fragmentação geral para os ácidos graxos 3-hidróxialcaacetóxi.	74

Figura 45. Rota de fragmentação de massas para os ácidos 3-hidroxiaceto, para valores de m/z de diferentes picos (M+, i e j, etc.); no espectro de massas, consultar a Tabela 10.	74
Figura 46. Fórmula estrutural do representante de ácidos graxos modificado dos óleos florais da Krameriaceae.	76
Figura 47. Cromatograma representativo do óleo floral bruto obtido por varredura de íons totais e Krameriaceae mostrando a prevalência da substituição β	81
Figura 48. Os espectros de massa de metil 5,7-dioxodocosanoate (134).....	85
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do metil 5,7-dioxodocosanoato.	85
Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) do metil 5,7-dioxodocosanoato.	86
Figura 51. Cromatograma obtido por varredura de íons totais para o padrão de ácido pterândrico natural (azul) e sintético (preto)	87
Figura 52. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C para as configurações <i>syn</i> e <i>anti</i> -acetônio do ácido pterândrico.	88
Figura 53. Estrutura Anti do ácido pterândrico.....	89
Figura 54. Parte de um ninho de <i>Tetrapedia diversipes</i> mostrando seis células com massa clara e escura.....	90

Figura 55. Desidratação de monossacarídeos formando derivados de furano.	91
Figura 56. Produto colorido da condensação de furfural e fenol.....	92
Figura 57. Célula de massa clara do ninho 5, 7 e 1 (Foto: Isabel AS).....	93
Figura 58. Cromatograma de íons do alditol peracetilado da glicose (138).	98
Figura 59. Espectro de massas 138 (Hexaacetato de D-glicitol ou Hexaacetato de sorbitol).	98
Figura 60. Cromatograma de íons do produto obtido na síntese do alditol peracetilado de galactose. Em destaque, a substância (139) – componente de interesse.	100
Figura 61. Espectro de massas (IE-EM) de 139 (Hexaacetato de galactitol ou Hexaacetato de dulcitol) e racionalização de alguns fragmentos característicos.	100
Figura 62. Cromatograma de íons do alditol peracetilado da manose (140).....	101
Figura 63. Espectro de massas (CG/IE-EM) de Hexaacetato de D-manitol (140) e racionalização de alguns fragmentos característicos.....	101
Figura 64. Cromatograma de íons do produto obtido na síntese do alditol peracetilado de xilose. Em destaque, a substância (141) componente de interesse.....	102
Figura 65. Espectro de massas da substância 141 (Pentaacetato de Xilitol).....	102

- Figura 66. Cromatograma de íons indicando os tempos de retenção dos alditóis acetilados de (A) Manose = 13.03 min (B) Galactose = 13.10 min (C) Glicose = 13.17 min) e Xilose no inserto.105
- Figura 67. Cromatograma de íons dos alditóis acetilados de Xilose = 10.99 min, Manose = 13.03 min, Galactose = 13.10 min e Glicose = 13.17 min. da massa clara do ninho de *Tetrapedia diversipes*.106
- Figura 68. Cromatograma de íons dos alditóis acetilados presentes nas (A) nas anteras de Manjeriçãõ e (B) na massa clara do ninho de *Tetrapedia diversipes*.....107

A decorative scroll frame with a thin black border and small circular flourishes at the corners. The word "INTRODUÇÃO" is centered within this frame.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO GERAL

Desde o início da vida no nosso planeta os organismos vivos interagem entre si de forma cooperativa, agressiva, parasítica ou simbiótica. As interações simbióticas beneficiam ambos os organismos, enquanto as parasíticas beneficiam um dos organismos sendo o outro prejudicado (Eisner *et al.*, 1966; Karlson *et al.*, 1959). O envolvimento de substâncias químicas para mediar informações intra e inter-espécies é bem difundido na natureza e foi denominado de comunicação química (Sbarbati *et al.*, 2006). Os compostos químicos envolvidos na interação dos animais são denominados de **semioquímicos** ou **infoquímicos** (Law *et al.*, 1971). Interações mediadas por **semioquímicos** existem entre vertebrados, invertebrados, plantas e micro-organismos (Dicke *et al.*, 1988). Quando a comunicação ocorre entre os indivíduos da mesma espécie as substâncias são denominadas de **ferormônios**, já as substâncias químicas utilizadas na comunicação entre indivíduos de espécies distintas são denominadas de **aleloquímicos** (Parkes *et al.*, 1961; Wilson *et al.*, 1963).

Um exemplo da interação simbiótica entre espécies é a polinização, por zoofilia, na qual vetores animais (polinizadores) transportam o pólen. O processo pode ser de autopolinização ou polinização cruzada. Na autopolinização o gameta masculino (pólen) é transferido para o estigma de flores do mesmo indivíduo (planta), enquanto na polinização cruzada o pólen de uma flor é transferido para flores de outras plantas da mesma espécie. Essa transferência pode ser feita por agentes externos como vetores animais ou agentes abióticos (água e vento etc). A polinização por animais é comum nas angiospermas, sem a qual estas plantas não se reproduziriam sexualmente, ocasionadas grandes prejuízos às lavouras. (Buchmann *et al.*, 1996; Carol *et al.*, 1998). Os polinizadores visitam as plantas

com o intuito de coletarem proteínas e carboidratos e neste processo efetuam a polinização. Além disso, na ausência de polinizadores muitas plantas não seriam capazes de se reproduzirem e provavelmente uma grande parte dos insetos não teriam proteínas, carboidratos, óleos, ceras e resinas florais para sobreviverem. Assim, as plantas oferecem vários tipos de recompensas garantindo a atração dos visitantes (polinizadores) (Buchmann *et al.* 1996).

Pólen e néctar são recompensas primárias oferecidas pelas flores aos polinizadores garantindo assim à visita destes agentes. Recompensas são constituintes florais ou de inflorescências coletados e utilizados por animais, incentivando o animal sempre retornar a flor e promover a polinização. O néctar é mais procurado que o pólen por uma vasta gama de animais. Por outro lado, o pólen é uma recompensa primária para abelhas, que constituem o grupo mais importante de polinizadores. Os lipídios florais são recompensas mais raras e presentes apenas em poucas famílias de plantas. (Simpson *et al.* 1977, 1981; Santos *et al.* 2006, Bezerra *et al.* 2009).

De acordo com o tipo de recompensa floral e sua forma de apresentação o sistema da polinização pode ser generalista (pólen e néctar) ou especialista (óleos florais). As recompensas florais podem ser nutritivas ou não nutritivas. Por exemplo, abelhas do gênero *Anthidium* visitam flores de *Krameria* e *Larrea* coletando tricomas (uma recompensa floral não nutritiva) para construção de ninhos, promovendo assim a polinização. Outros insetos promovem a polinização de flores ao utilizar as flores como abrigo (**Tabela 1**) (Simpson *et al.*, 1981; Linsley *et al.*, 1956; Hocking *et al.*, 1965; Kevan 1972; Smith 1975).

Tabela 1. Uso das recompensas florais distintas de pólen e néctar (Simpson 1981).

Recompensas não-nutritivas	Recompensas nutritivas
Produtos florais secundários acidentais	Provisões do ninho (nutrição larval)
Tricomas florais utilizados na construção de ninhos	Nutrição para adultos
Abrigos para dormir	Tecidos que atuam como alimento
Fonte de calor	Alimento de pólen não fertilizado
Locais de acasalamento	Secreções estigmáticas
Produtos secretados para recompensar os polinizadores	Ácidos graxos (lipídios)
Matérias primas para ninhos (resinas, ceras, ou misturas químicas).	
Atraentes sexuais	

1.1. Óleos florais como recompensas

S. Vogel descreveu pela primeira vez em 1969 a existência de óleos florais não voláteis como recompensas florais, descobrindo este fenômeno enquanto estudava uma espécie do gênero *Angelonia* (Scrophulariaceae) em 1964. Ele observou também glândulas secretoras de óleos em espécies das famílias Scrophulariaceae, Malpighiaceae e Orchidaceae, principalmente nos neotrópicos. Posteriormente, em 1971, Vogel reportou a existência de espécies secretoras de óleos na família Krameriaceae (neotropical), e na grande família cosmopolita Iridácea. Nesta última, os representantes com glândulas produtoras de óleo estavam confinados à região dos neotrópicos. Fazendo um rápido levantamento Vogel concluiu que a maioria das espécies de angiospermas produtoras de óleos florais (~500) cresce nas regiões neotropicais. Vogel foi além da observação de campo e elucidou as estruturas químicas dos constituintes dos óleos florais,

sugerindo que as abelhas coletoras destes óleos empregam os mesmos para provisionar os ninhos e as larvas. (Bezerra *et al.*, 2009; Buchmann *et al.*, 1981, 1987; Vogel *et al.*, 1969, 1974, 1976, 1981, 1991, 2009, Frankie *et al.*, 1976, 1989).

Durante a coleta de óleos florais as abelhas fêmeas do gênero *Centris* posicionam-se sobre os estames e estigmas das flores de *Krameria* e agarram-se à base destas pétalas e com suas mandíbulas raspam os elaioforos rompendo a camada de proteção. A seguir, coletam o óleo com os pentes basitarsais do primeiro par de pernas o qual é transferido para as escopas das pernas posteriores sem sair da flor ou do botão (**Figura 1**). (Simpson *et al.*, 1977)

Óleos florais já foram encontrados em espécies de 13 famílias diferentes de angiospermas Caesalpiniaceae, Calceolariaceae, Cucurbitaceae Gesneriaceae, Iridaceae, Krameriaceae, Malpighiaceae, Myrsinaceae, Orchidaceae, Plantaginaceae, Primulaceae, Scrophulariaceae, e Solanaceae (Bezerra *et al.*, 2009; Vogel 2009; Reis *et al.*, 2007).



Figura 1. Abelha da espécie *Epicharis flava* coletando óleo floral de *Byrsonima basiloba* (Foto: Simone C Cappellari).

1.2. Elaióforos

Os óleos florais são produzidos em glândulas especiais chamadas elaióforos (**Figura 2**). Existem dois tipos de elaióforos (Stpiczynska *et al.*, 2008; Simpson *et al.* 1982).



Figura 2. (A). Elaioforos no lado ventral da flor de *Banisteriopsis schizoptera*, (B). Elaioforos com óleo floral (*Peixotoa tomentosa*) (C). Abelha forrageando elaioforos (*Peixotoa tomentosa*) (Foto: Simone C Cappellari (A) e Gudryn J Barônio (B e C)).

1.2.1. Elaióforos epiteliais

Elaióforos epiteliais são compostos por algumas células epidérmicas secretoras. A secreção de óleos não é constante e varia de alguns micros a vários mililitros, sendo protegida por uma fina camada cuticular (**Figura 3A**). Esse tipo de elaióforo é encontrado nas famílias Krameriaceae, Malpighiaceae, e alguns gêneros da família Orchidaceae (Simpson *et al.*, 1981, 1982; Stpiczynska *et al.*, 2008, Vinson *et al.* 1997).

1.2.2. Elaióforos tricomais

Os elaióforos tricomais consistem de tricomas (algumas centenas até 50 mil) (**Figura 3B**). Não há camada protetora como em elaióforos epiteliais ([Simpson *et al.*, 1977, 1981, 1982](#); [Vinson *et al.* 1997](#)). A secreção de óleo é sempre menor que em elaióforos epiteliais (alguns microlitros somente). Os elaióforos tricomais são encontrados em espécimes das famílias: Cucurbitaceae, Iridaceae, Myrsinaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae e Orchidaceae ([Buchmann *et al.*, 1981, 1987](#)).

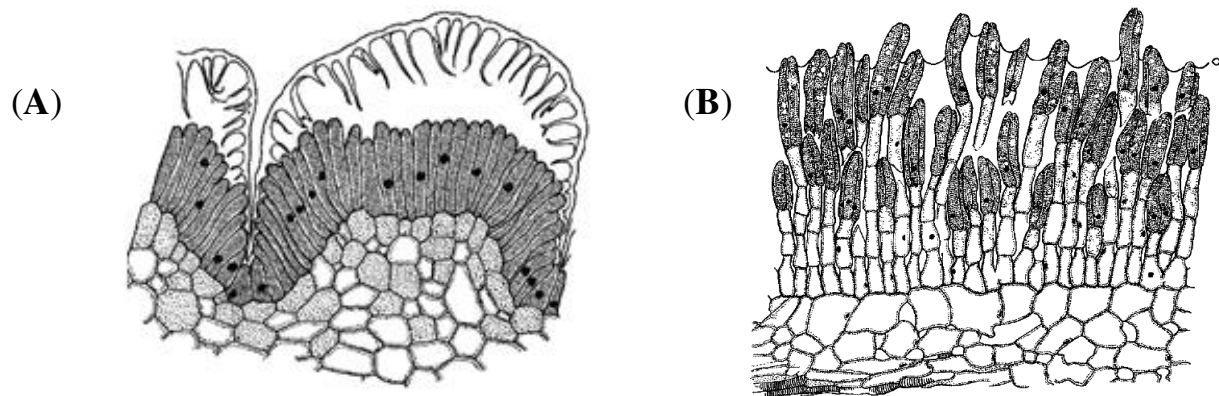


Figura 3. (A). Secção longitudinal de elaióforos epiteliais, mostrando a camada cuticular protetora (B). Secção longitudinal de elaióforos tricomais de *Calceolaria pavonii* ([Vogel 1974](#), [Reis 2005](#)).

1.3. Família Malpighiaceae

A família Malpighiaceae corresponde a uma família relativamente grande (>1200 espécies), incluindo ervas, arbustos, trepadeiras e árvores distribuídas principalmente na região neotropical (~1100 spp.) e algumas espécies (120 spp.)

nas regiões paleotropicais. Embora o néctar esteja ausente nas espécies da família Malpighiaceae (neotropical), ainda assim apresentam sistema de atração ao polinizador muito bem desenvolvido devido à produção de outro recurso na forma de óleo floral. O polinizador visita a flor de modo a coletar o óleo floral e também os grãos de pólen, os quais são empregados principalmente na construção de colmeias e/ou na alimentação de larvas (Anderson, 1979, 2006; Davis et al., 2001, 2002, 2010).

Além dos fatos discutidos acima, tal família inclui espécies autógamas como a *Peixotoa reticulata*, a qual não depende de visitantes embora seja visitada por abelhas coletoras de óleo e de espécies que necessitam vetores externos (abelhas coletoras de óleo) para sua polinização, como a *Peixotoa goiana*. (**Figura 5**). É interessante observar que essas espécies são simpátricas, florescem ao mesmo tempo, na mesma região e são morfologicamente idênticas. Além disso, essa família também inclui espécies como a *Pterandra pyroidea*, que trocam a recompensa floral de óleos florais para pólen já que produzem flores glandulares (com elaióforos) e eglandulares (sem elaióforos) (**Figura 4**) que não atraem muitas espécies de abelhas coletoras de óleo, e são visitadas por abelhas coletoras de pólen (Cappellari et al., 2011).

1.4. Família Krameriaceae

O gênero *Krameria* corresponde ao único gênero da família Krameriaceae com 17 espécies nativas da América. As flores desse gênero são visitadas principalmente pela abelha fêmea do gênero *Centris* (Gonçalves et al., 2012; Dórea et al., 2010; Simpson et al., 1979). Simpson et al. (1977) relataram a coleta de óleo e a modificação das patas dianteiras na abelha do gênero *Centris*. A morfologia da

flor foi descrita por Simpson *et al.* (1982) explicando a modificação abaxial das pétalas a elaióforos (**Figura 6**) e sua importância na biologia da polinização (Simpson *et al.*, 1977, 1982).



Figura 4. Flores da espécie *Pterandra pyroidea* (foto do meio): glandular (à direita) e eglandular (à esquerda) (Fotos: Simone C Cappellari).



Figura 5. (A) *Peixotoa goiana* depende de polinizadores para produzir frutos (B) *Peixotoa reticulata* é autógama (Foto: Simone C Cappellari).

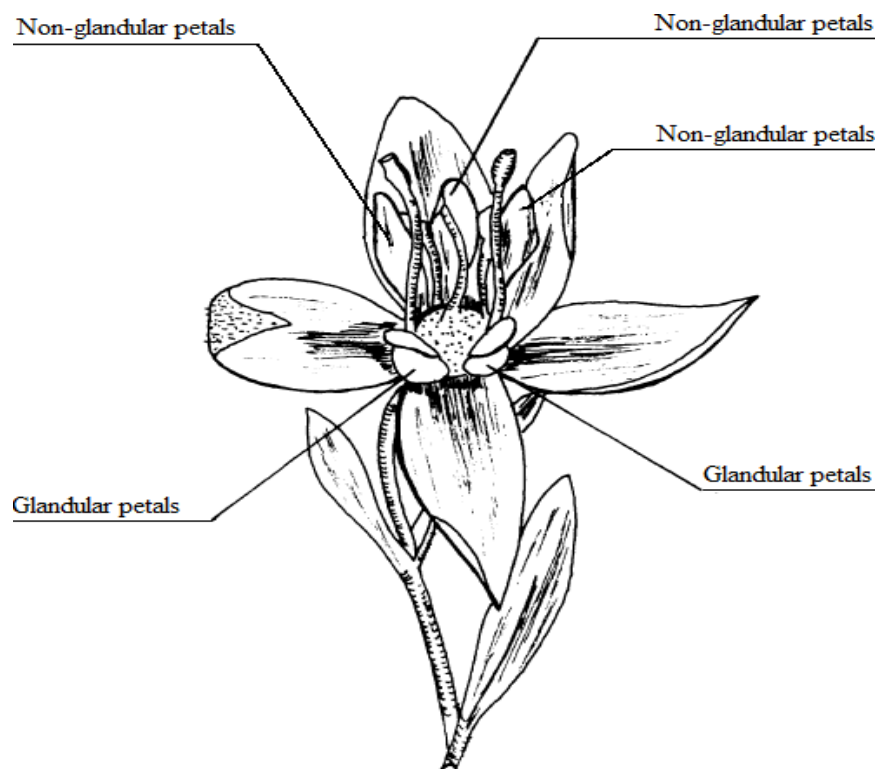


Figura 6. Diagrama esquemático da flor da espécie *Krameria grandiflora*, que apresenta três pétalas não glandulares e duas pétalas glandulares (Simpson 1982).

1.5. Química dos óleos florais

Os óleos florais são constituídos de lipídios como **ácidos graxos** livres com ou sem substituintes acetóxi na posição- β , e seus mono- e di- **glicerídeos** (Buchmann *et al.*, 1981, 1987; Durmi *et al.*, 2008; Cappellari *et al.*, 2011; Seigler *et al.*, 1978; Seipold *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 1979). Além destes compostos nos óleos florais são encontrados pequenas quantidades de compostos fenólicos, aminoácidos (prolina, alanina e glicina) e traços de glicose. A presença de pequenas quantidades de aminoácidos confere uma coloração amarela aos óleos florais enquanto os compostos fenólicos conferem aos óleos uma fluorescência esverdeada sob luz ultravioleta. (Buchmann *et al.*, 1987).

1.5.1. Acilgliceróis

Acilglicerídeos são constituintes importantes dos óleos florais e são conhecidos também como gorduras neutras. Vogel (1974) foi o primeiro pesquisador a relatar a presença de acilgliceróis do tipo **A** e **B** nos óleos florais de *Calceolaria* spp. (Scrophulariaceae) (**Figura 7**) (Buchmann *et al.*, 1987).

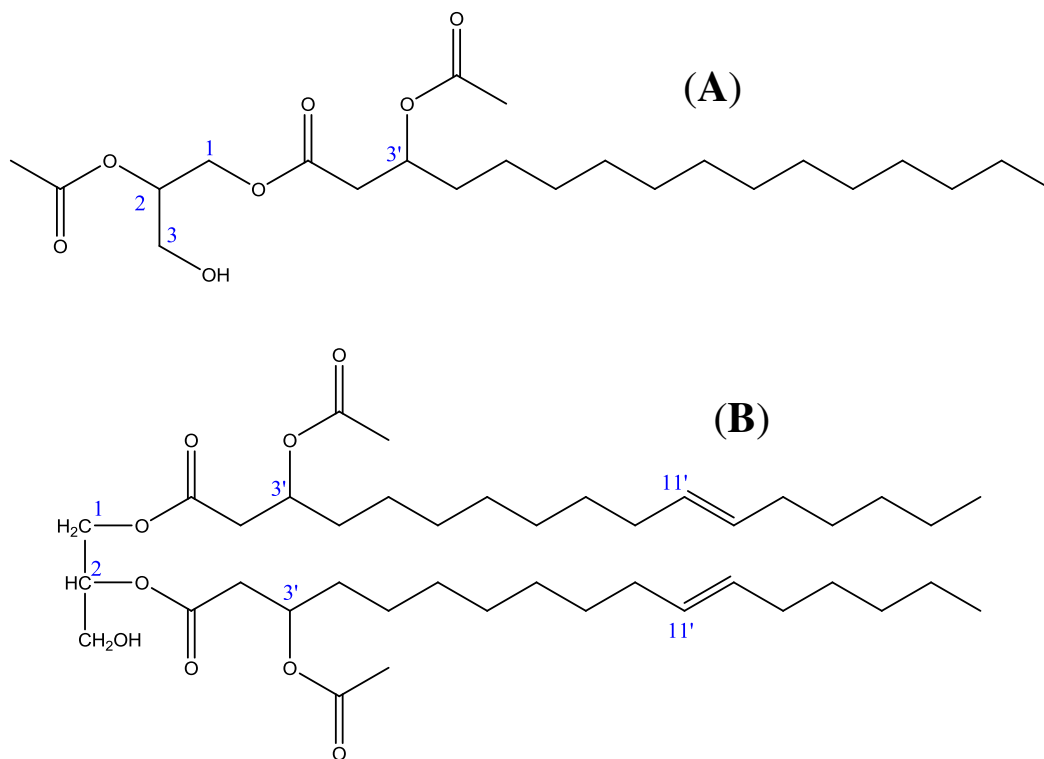


Figura 7. Acilgliceróis do tipo (A). 1-(3'-acetóxiexadecanoil)-2 acetilglicerol e (B). 1,2-di-(3'-acetóxi-*E*-11'-octadecenoil)-sn-glicerol.

Reis *et al.*, (2003) isolaram um **diacilglicerol** inédito do óleo floral da *Ornithophora radicans* (Orchidaceae) que foi denominado Oncidinol (**Figura 8**).

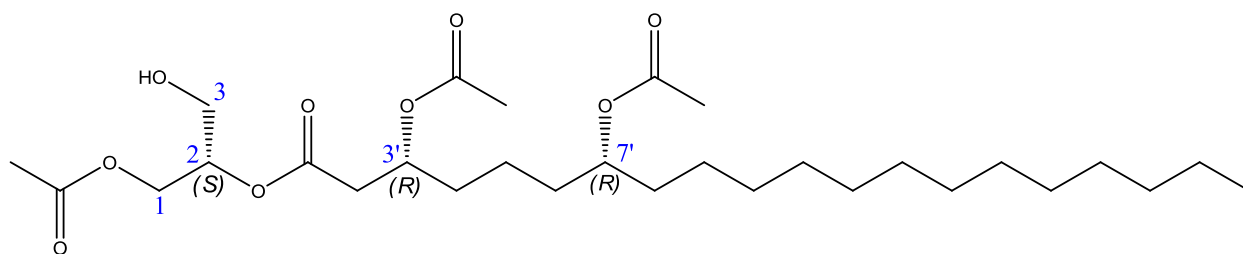


Figura 8. Oncidinol ($2S, 3'R, 7'R$)-1-acetil-2-(3',7'-diacetóxieicosanoil)-glicerol (**28**)

1.5.2. Ácidos graxos

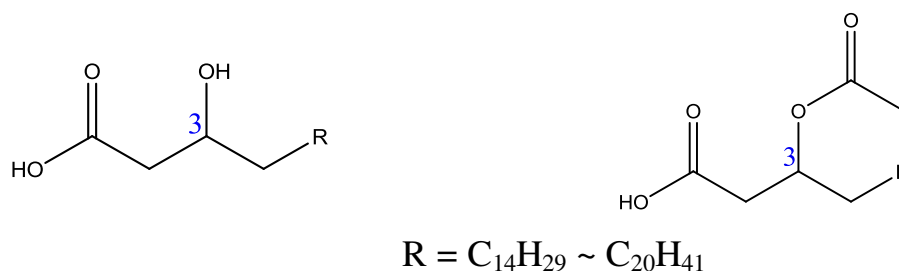
Ácidos graxos livres com e sem substituintes constituem o segundo maior grupo de constituintes florais. O comprimento da cadeia carbônica varia de 12 a 20 carbonos; por exemplo, ácido hexadecanóico (16C), ácido octadecanóico (18C), ácido eicosanóico (20C), ácido tetracosanóico (24C) entre outros (Vogel 2009; Buchmann 1987).

Os óleos florais de espécimes de Krameriaceae possuem ácidos graxos com substituintes na posição β de 16 a 24 carbonos (Seigler *et al.*, 1978). Os substituintes podem ser hidroxí (-OH) ou acetóxi (-OCOCH₃) (Figura 9 A).

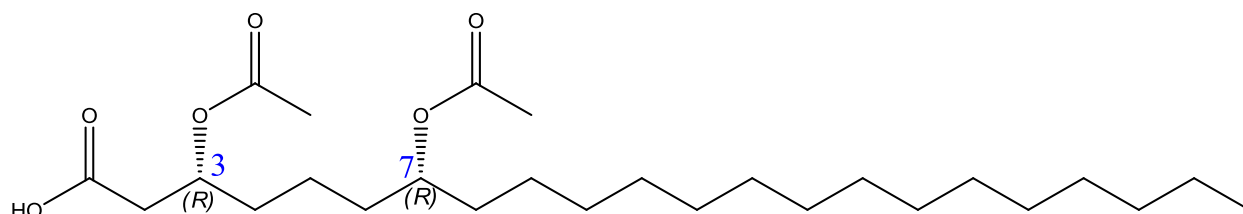
Adicionalmente óleos florais de outras famílias de angiospermas, possuem dois grupos cetoxilicos (-OCOCH₃) ou um grupo hidroxílico (-OH) e um grupo acetoxílico (-OCOCH₃) em carbonos diferentes. Por exemplo, ácido **Birsônico**, o principal componente do óleo floral de *Byrsonima intermedia* é o 3R, 7R-diacetóxidocosanico (Figura 9 B). Um ácido análogo ao ácido 3R, 7R-dihidroxidocosanóico, ácido Tetrapédico foi isolado do ninho de *Tetrapedia diversipes* (uma abelha solitária especializada na coleta de óleos florais) (Figura 9 C) (Reis *et al.*, 2007).

A análise dos óleos florais de *Malpighia coccigera* indicou a presença de ácidos graxos com diversos padrões de substituições incluindo **7-OAc-3-OH (20:0)**, **7-OAc-3-OH (22:0)**, **9-OAc-3-OH (22:0)**, **9-OAc-5-OH (22:0)**, **3,9-diOAc (22:0)**, **9-OAc-3-OH (24:0)**, e **11-OAc-5-OH (24:0)** (Seipold *et al.*, 2004). Estas estruturas foram propostas com base no padrão de fragmentação do espectro de massas sem confirmação por RMN.

(A)



(B)



(C)

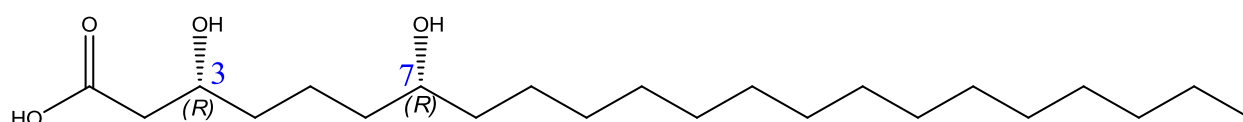


Figura 9. (A) Ácidos graxos β -substituído, (B) Ácido Birsônico, (C) Ácido Tetrapédico

1.6. Néctar

Néctar é provavelmente a recompensa floral mais comum e não tem nenhuma função nas angiospermas além de atrair polinizadores (Harborne JB. 1993, Baker et al., 1982, 1983, 1986).

Néctar é uma solução aquosa de mono- e dissacarídeos e aminoácidos. No entanto, outras classes de compostos, tais como proteínas, lipídios, fenóis, alcaloides e compostos orgânicos voláteis (COV), também têm sido relatadas em vários néctares (Rico et al., 2007; Nicholson et al., 2007). Alguns desses componentes são altamente tóxicos, e o próprio néctar tem sido responsável pela morte de abelhas europeias que produzem mel (Von Frisch 1972).

De acordo com a expressão sexual da planta e com o passar do tempo, os vários componentes do néctar floral se alteram. A composição de açúcar no néctar, principalmente a quantidade relativa de açúcares simples e sacarose está frequentemente associada ao tipo de polinizador - por exemplo, aves, abelhas, vespas, morcegos, borboletas ou mariposas. O néctar é secretado em vários momentos da noite ou do dia, geralmente pouco antes da abertura da flor. Esta característica é geralmente uniforme dentro das populações de flores, mas a secreção também varia de acordo com as condições meteorológicas, horário do dia, temperatura e visitação por animais coletores de néctar (Wackers et al 2007; Von Frisch 1972).

1.7. Pólen

Uma flor possui vários filetes que apresentam em suas partes superiores uma estrutura (antera) granular, geralmente com grãos amarelados, denominados de pólen. Cada grão de pólen, além de conter os cromossomos com a herança

genética masculina da futura planta, contém certa quantidade de substâncias de reserva (principalmente água, carboidratos e proteínas). Uma abelha transporta inúmeros desses grãos de pólen ajudando na fecundação de flores de várias plantas (Nicholson *et al.*, 2007; Dubois *et al.*, 1956). O pólen pode ser o único recurso coletado pelas abelhas a partir das flores no caso de plantas que não produzem nenhum outro material (Von Frisch 1972).

A composição do pólen, sua qualidade e facilidade de coleta variam acentuadamente entre as espécies de plantas. O mesmo pode conter de 20% até 50% de água em peso e menos de 15% até mais de 60% de proteína em peso seco. Além do teor de proteína bruta variando entre 7% e 65%, o pólen pode conter até 20 aminoácidos e vários lipídios, vitaminas, minerais, carboidratos, toxinas, e potenciais alimentos dissuasivos. O pólen contém também alguns compostos que podem agir como toxinas para as abelhas como rafinose, lactose, estaquiase, xilose, arabinose, galactose, ácido galacturônico, ácido glucônico, e pectina (Nicholson *et al.*, 2007; Baker *et al.*, 1982).

1.8. Abelhas

De acordo com a taxonomia, as abelhas se enquadram no Filo Artrópode, Ordem Hymenoptera, Subordem Apocrita, Superfamília Apoidea e são representadas por onze Famílias: Anthophoridae, Halictidae, Megachilidae, Apidae, Colletidae, Oxaeidae, Andrenidae, Mellitidae, Fidellidae, Ctenoplectridae e Stenotritidae. Existem indícios de que as abelhas surgiram há pelo menos 120 milhões de anos, originadas de vespas que sofreram alguma modificação adaptativa que possibilitou o uso do pólen como matéria alimentar (Michener 2007; Peruquetti 2006; Vinson *et al.*, 1996).

Cada vez mais as abelhas vêm sendo valorizadas pelo importante papel nas comunidades ecológicas. As abelhas são responsáveis pela polinização de aproximadamente 73% das lavouras cultivadas, sendo que as moscas são responsáveis por 19%, morcegos 6,5%, vespas 5%, besouros 5%, aves 4% e borboletas e mariposas 4%. Assim elas constituem os principais agentes polinizadores adaptados para polinizar as flores de angiospermas. Além de auxiliarem na diversidade do ecossistema, elas promovem o aumento da produção de frutos comestíveis para o homem e muitos animais silvestres ([Imperatriz et al., 2006](#); [Santos 2002](#); [Wcislo et al., 1996](#)).

1.8.1. Abelhas brasileiras

As abelhas são extraordinariamente diversificadas em sua biologia, principalmente no que diz respeito às técnicas de coleta de alimento, adaptações morfológicas para coleta, armazenamento de alimentos e as preferências alimentares. Estima-se que existam mais de quatro mil gêneros de abelhas e cerca de 30 a 40 mil espécies distribuídas nas diferentes regiões do mundo ([Buchmann 1987](#); [Santos 2002](#)). No Brasil, estão relacionados 1.573 nomes válidos para as espécies brasileiras, mas acredita-se que a fauna de abelhas do Brasil seja composta por, aproximadamente, 3.000 espécies. Estudos sobre a fauna, embora limitados, mostram que abelhas estão presentes na maioria dos “habitat” de todos os continentes, exceto na Antártica, sendo que a diversidade é maior na região Neotropical ([Michener 2007](#); [Peruquetti 2006](#); [Santos et al., 2002](#)). Em comparação aos demais países do mundo, o Brasil destaca-se, pois é responsável por abrigar cerca de ¼ destas espécies, uma vez que possui ótimas condições geográficas e uma diversidade de ecossistemas ([Wcislo et al., 1996](#)).

1.8.2. Abelhas solitárias

As abelhas possuem graus distintos de sociabilidade, existem espécies de hábitos solitários e espécies sociais (eussociais). Dentro dessas duas categorias existem outras como subsociais, parassociais, ou quasassociais, que se diferenciam pela presença e domínio de uma rainha (Santos *et al.*, 2002; Painaro 2007).

As abelhas solitárias caracterizam-se por não produzirem mel, pois a fêmea busca nas flores, o néctar (fonte de energia) que necessita para ela e para o provisionamento do ninho. Várias espécies são sazonais, isto é, ocorrem apenas em determinada época do ano, quando há suficiente disponibilidade de alimento e condições favoráveis à nidificação (McGinley *et al.*, 1981, 1989, 1987).

Das espécies de abelhas já descritas, 85% possuem hábitos solitários que se caracterizam por não haver nenhuma forma de cooperação entre os indivíduos. Dessa forma, cada fêmea constrói, provisiona, realiza postura e fecha as células que formam seu ninho, após isso, ela geralmente morre, não havendo sobreposição de gerações. As cleptoparasitas, que representam 10% da população de abelhas, possuem hábito solitário e utilizam células provisionadas por outras abelhas, normalmente solitárias, para realizarem postura. Nesse caso, as suas larvas se desenvolvem a custa dos alimentos do hospedeiro e, normalmente, a larva da espécie cleptoparasita nasce/eclode antes da larva da espécie hospedeira, que construiu o ninho, ela se alimenta e cresce, e quando a segunda larva da hospedeira eclode ela pode ser morta pela cleptoparasita. As espécies parasitas não transportam pólen e muitas vezes se parecem com vespas. Por fim, espécies 5% das abelhas apresentam algum grau de sociabilidade e formam colônias numerosas, perenes e com alto grau de organização interna (Michener 2007).

A fêmea da abelha solitária possui um comportamento independente e cuida do ninho sozinha. Não ocorre cooperação, ou divisão de trabalho, entre as fêmeas de uma mesma geração, ou entre mães e filhas e, na maioria das vezes, a mãe morre antes de sua prole emergir, sem haver relações entre gerações diferentes. Durante sua vida as abelhas possuem princípios básicos, que são: procurar o local para a construção do ninho, colocar os ovos, buscar alimento para a cria e defender o ninho quando necessário. Há uma grande diversificação de hábitos de nidificação entre as abelhas solitárias, sendo que o local escolhido pode ser um tronco de madeira, uma área exposta de solo ou barranco, fendas em muros, ou ainda orifícios pré-existentes em outro tipo de substrato, como um buraco de fechadura, canos, tijolos, etc. Mas, dificilmente constroem ninhos expostos; e muitas ainda escolhem regiões próximas a flores (Rozen 1994).

O material utilizado para construção pode ser barro ou areia misturada com óleo ou resina vegetal, folhas de plantas cuidadosamente cortadas e unidas com resina e/ou barro e resina pura. O ninho pode receber também uma camada impermeabilizante (de natureza glandular). Existem espécies que não revestem o local de nidificação, permanecendo as larvas em contato direto com as paredes do ninho (Gathmann *et al.*, 2002; Reis 2005; Santos *et al.*, 2002).

Ao levar tais materiais para dentro da cavidade, a fêmea constrói a célula, ou seja, o espaço (a unidade) onde sua prole se desenvolverá. Cada célula será revestida com o material de construção e preenchida com alimento. A fêmea coloca um ovo em cada célula e quando fechar esta célula, logo começará a construir a próxima. Em geral, uma abelha solitária constrói entre 6 e 15 células levando entre 3 e 6 semanas. Após este período a fêmea morre (Semida 2004; Santos *et al.*, 2002).

1.8.3. *Tetrapedia diversipes*

A família Anthophoridae é a maior dentro da superfamília Apoidea e apresenta uma diversidade de gêneros de abelhas coletoras de óleos organizadas em três tribos: *Centridini*, *Exomalopsini* e *Tetrapediini* (Michener 2007; Santos 2002).

Quase todas fêmeas dessas abelhas possuem estruturas altamente modificadas para coletar os óleos florais, sendo que algumas ainda utilizam uma região cheia de pelos em suas tíbias posteriores para carregar o pólen das flores ou outras substâncias para os seus ninhos (Santos 2002).

De acordo com a literatura, as abelhas do gênero *Tetrapedia* são conhecidas por coletarem pólen a partir de flores do gênero *Ludwigia* (Onagraceae), Asteraceae, Cactaceae e Euphorbiaceae, sendo que elas já foram observadas coletando pólen de flores de Lamiaceae também (Nogueira, 1997).

Os ninhos das *Tetrapedia diversipes* são construídos com areia, resinas, óleos e resinas florais, néctar e pólen. Ninhos de *Tetrapedia diversipes* são compostos por um número variável (normalmente 2-7) de pequenos espaços individualizados chamados de células do ninho. Cada célula tem uma massa clara e uma parte escura. A massa escura é basicamente composta de uma mistura de areia e óleo e resina floral, enquanto que a massa clara é uma mistura de pólen, néctar e óleo floral (Figura 10) (Santos *et al.*, 2002).

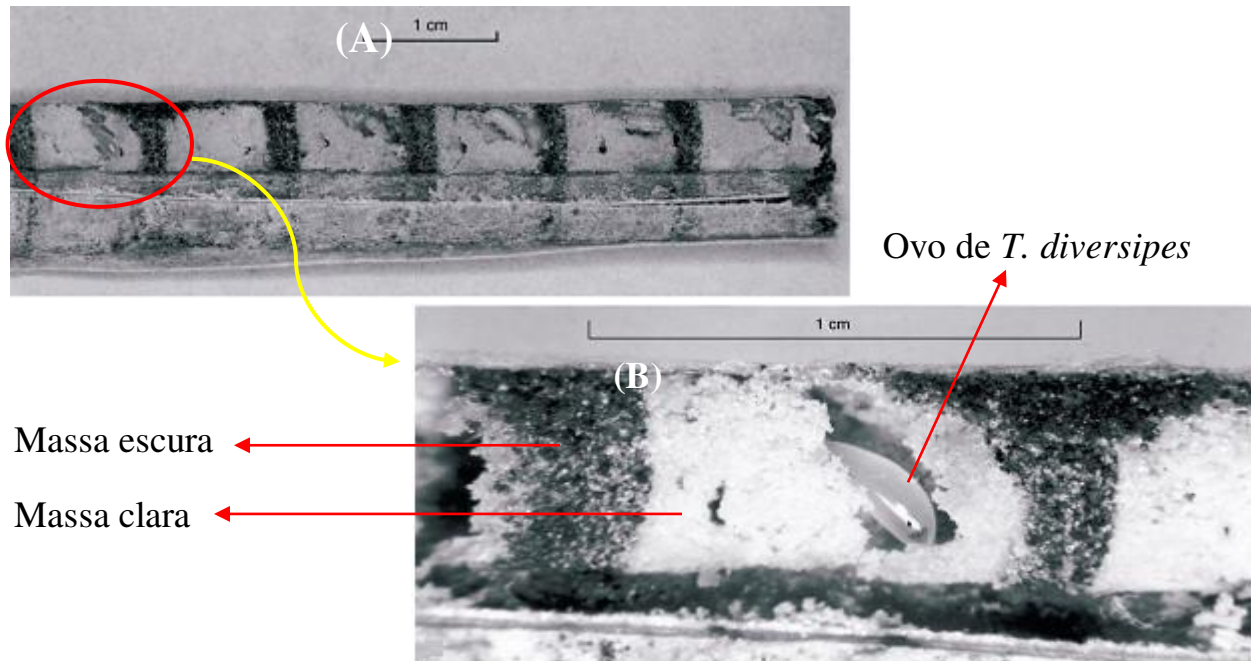


Figura 10. A) Ninho do *T. diversipes* com 6 células (B) Uma célula de ninho ilustrada para massa clara e escura e com ovo (Santos IA, *et al.*, 2002).

A decorative horizontal scroll graphic with a thin black border and rounded ends, containing the word "OBJETIVOS" in a bold, black, serif font.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos dessa tese são a química dos recursos florais utilizados por abelhas solitárias com ênfase particular na:

1. composição dos óleos florais de espécimes das famílias Krameriaceae e Malpighiaceae, presentes no cerrado, avaliando a variação de química dos óleos florais entre gêneros distintos e dentro de um mesmo gênero.
2. isolamento e síntese dos compostos majoritários dos óleos florais de *Pterandra pyroidea*.
3. Correlacionar a composição química dos ninhos de *T. diversipes* (abelha solitária) e os recursos florais (pólen e néctar).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise química dos óleos florais de Malpighiaceae do Cerrado

A maioria das espécies da família Malpighiaceae utilizam lipídios florais para atrair polinizadores (Santos *et al.*, 2007; Sazima e Sazima 1989; Carvalho *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006). Portanto, para se avaliar a química relacionada à ecologia de flores de espécies da família Malpighiaceae e seus polinizadores (abelhas solitárias em sua maioria), óleos florais de 33 espécies simpátricas pertencentes a sete gêneros diferentes (*Banisteriopsis*, *Byrsonima*, *Camerea*, *Heteropterys*, *Peixotoa*, *Pterandra* e *Tetraptenys*) foram analisados e suas características químicas foram avaliadas empregando diferentes técnicas espectroscópicas.

Os óleos florais foram extraídos com acetato de etila fornecendo em média de 0,1 a 1,0 mg por flor (**Tabela 2**). Como havia uma pequena quantidade de óleos florais, optou-se pela técnica de CG-EM para análise das amostras.

Tabela 2. Óleos florais das espécies Malpighiaceae

S/No	Espécies	# F	# E	S (ml)	Tempo (min)	Óleo (mg)	O/F (mg)	O/E (mg)
1	<i>Heteropterys campestris</i>	70	560	4	10	26,5	0,4	0,04
2	<i>Heteropterys pteropetala</i>	20	160	2	10	26,6	1,3	0,16
3	<i>Banisteriopsis laevifolia</i>	70	560	4	10	117,4	1,6	0,20
4	<i>Banisteriopsis campestris</i>	50	320	4	10	37,9	0,8	0,11
5	<i>Banisteriopsis anisandra</i>	29	320	3	20	29,2	1,0	0,09
6	<i>Byrsonima subterranea</i>	5	50	2	10	4,1	0,8	0,08

7	<i>Banisteriopsis stellaris</i>	80	640	4	10	166,4	2,1	0,37
8	<i>Byrsonima laxiflora</i>	90	450	4	10	43,4	0,5	0,09
9	<i>Byrsonima guilleminiana</i>	40	200	4	10	71,1	1,1	0,35
10	<i>Byrsonima verbascifolia</i>	20	100	4	10	41,6	2,1	0,41
11	<i>Byrsonima Coccolobifolia*</i>	5	50	8	10	50,5	10,1	1,01
12	<i>Byrsonima rigida</i>	50	500	4	10	42,6	0,8	0,08
13	<i>Byrsonima basiloba</i>	65	650	5	10	113,4	1,2	0,17
14	<i>Byrsonima vimnifolia</i>	8,0	40	3	10	15,6	1,9	0,39
15	<i>Byrsonima pachyhylla</i>	55	550	8	10	60	1,1	0,10
16	<i>Camarea affinis</i>	10	80	4	10	10,9	1,1	0,13
17	<i>Pterandra pyroidea</i>	27,4	137	3	10	3,0	0,1	0,02
18	<i>Peixotoa goiana</i>	55	340	8	10	60,0	1,1	0,17
19	<i>Peixotoa reclusa</i>	18	72	8	10	35,0	1,9	0,48
20	<i>Heteropterys tomentosa</i>	70	560	4	10	45,0	0,6	0,08
21	<i>Heteropterys nervosa</i>	40	341	4	10	20,0	0,5	0,05
22	<i>Banisteriopsis variabilis</i>	100	800	4	10	15,0	0,1	0,01
23	<i>Banisteriopsis latifolia</i>	20	160	4	10	30,0	1,5	0,18
24	<i>Banisteriopsis megaphylla</i>	30	240	4	10	15,0	0,5	0,06
25	<i>Banisteriopsis pubipetala</i>	33	254	8	10	3,0	0,1	0,01
26	<i>Tetrapterys jussieuniana</i>	80	640	8	10	50,0	0,6	0,07
27	<i>Byrsonima umbellata</i>	20	200	4	10	40,3	2,0	0,02
28	<i>Banisteriopsis argyrophylla</i>	12	96	4	10	25,0	2,1	0,26
29	<i>Banisteriopsis nummifera</i>	80	640	4	10	63,4	0,8	0,09
30	<i>Banisteriopsis schizoptera</i>	58,5	468	4	10	80,9	1,4	0,17
31	<i>Heteropterys escalloniaefolia</i>	10	80	4	10	26,0	2,6	0,32
32	<i>Banisteriopsis malifolia*</i>	36,5	292	4	10	332,0	9,1	1,13
33	<i>Tetrapterys ambigua*</i>	23,2	232	4	10	153,0	6,5	0,65

#F= N° de flores, #E= N° de elaióforos, S= solvente, O/F= óleo por flor, O/E= óleo por elaióforo. *não foi possível repetir

Os óleos foram metilados com diazometano antes de serem analisados por CG-EM devido à presença de ácidos carboxílicos, evidenciado por espectroscopia no infravermelho (**Anexo 4**) e pela presença de manchas alongadas nas cromatografias em camada delgada de sílica (Reis *et al.*, 2007). As análises cromatográficas realizadas com óleo floral metilado confirmaram a presença de vários ácidos graxos metilados que na discussão em curso serão citados apenas como ácidos graxos, em vez de éster metílico de ácido graxo, a fim de se concentrar no composto de origem.

Os cromatogramas de íons (“*total ion chromatogram*”) mostram que a maioria dos óleos florais brutos contém um ou dois ácidos graxos como componentes principais, e em alguns casos o óleo floral contém acilgliceróis (**Anexo 1**). Além disso, estes componentes se relacionam com picos base em m/z 43 e também diferentes combinações de picos intensos ou característicos em m/z 103, 131, 145, 173, 157 e 185 (pg. 43). Com base nos padrões de fragmentação dos principais componentes dos óleos florais das espécies da família Malpighiaceae do Cerrado os óleos foram classificados em quatro tipos, isto é, A, B, C e D.

3.1.1. Óleos florais do tipo A

Este tipo de recompensa floral tem predominância de um ou mais ácidos graxos de 20 a 24 átomos de carbono cujos espectros de massas apresentam pico base de m/z 43, e picos característicos de m/z 153, 185, 245 e 287 (**Figura 11 e 12**).

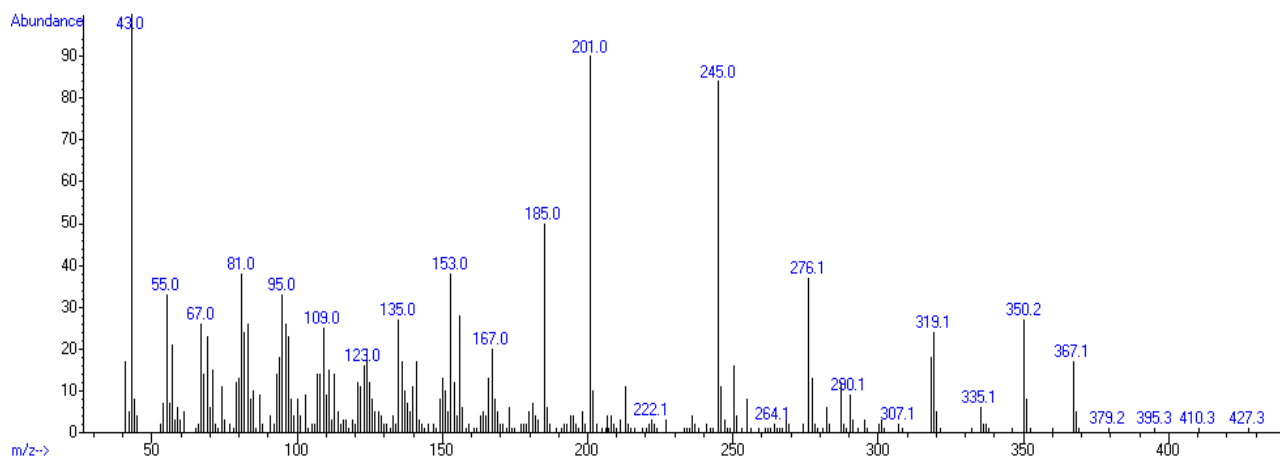


Figura 11. Espectro CG-IE/EM de **1** (Tabela 7-pg 47), pertencente à classe do éster metílico do ácido graxo 3,9-diacetóxi-docosanoico predominante nos florais do tipo A

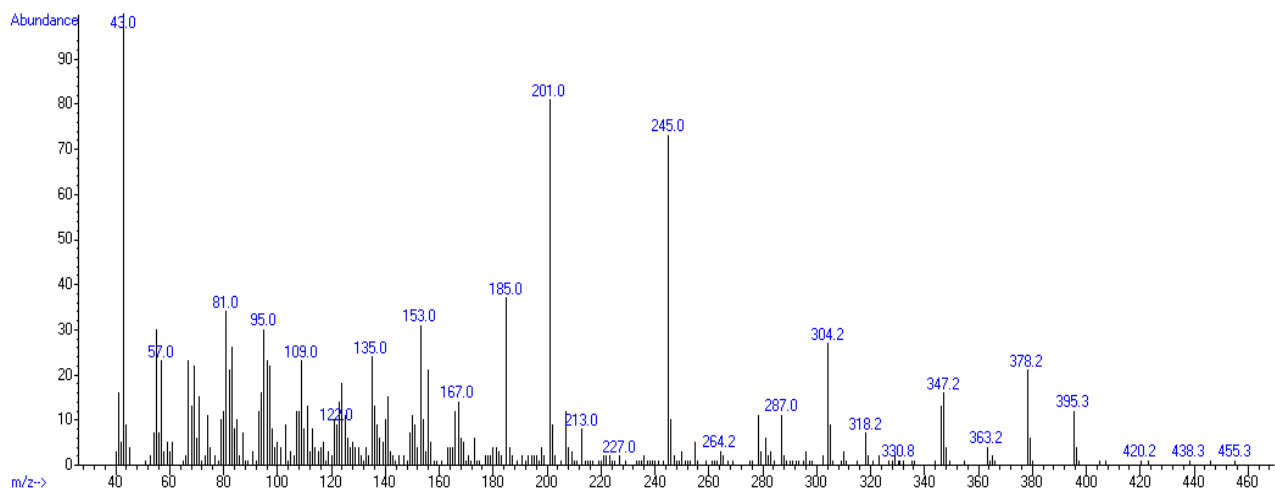


Figura 12. Espectro CG-IE/EM de **2** (Tabela 7-pg. 47), pertencente à classe do éster metílico do 3,9-diacetóxi-tetracosanoico predominante nos óleos florais do tipo A.

A presença de um pico base de m/z 43 indica a presença de um ou mais grupos acetilas, enquanto que um fragmento de m/z 287 indica que um dos grupos acetóxi se encontra na posição 9, o qual gera o fragmento de m/z 245 (287-

CH_2CO) pela perda de uma molécula neutra, o ceteno (McGoran *et al.*, 1996). A presença do fragmento de m/z 185 ($245 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) indica a presença de um segundo grupo acetóxi ($-\text{OCOCH}_3$), porém não é possível indicar a posição do mesmo (Figura 13).

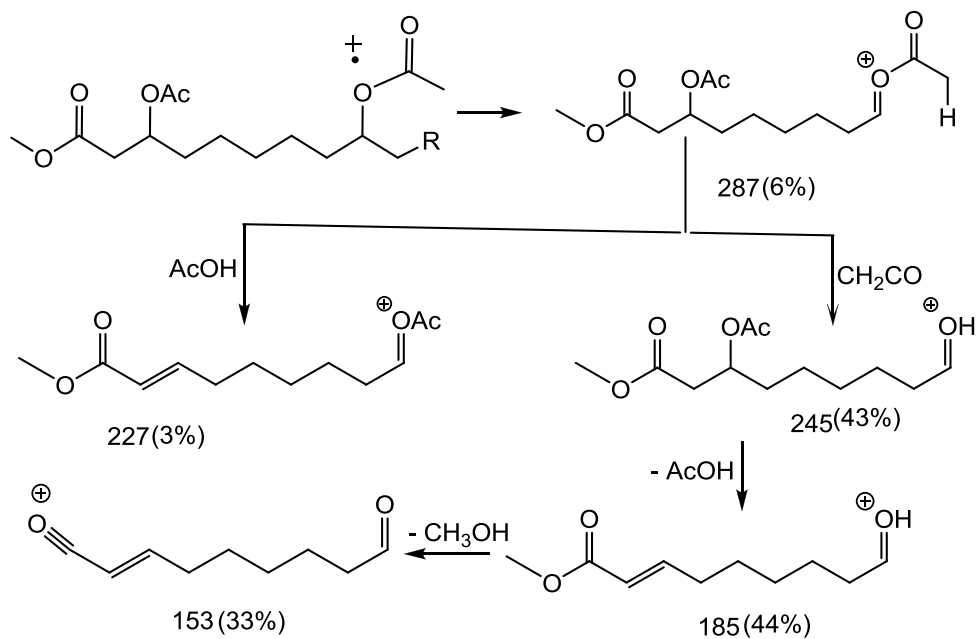


Figura 13. Rota de fragmentação proposta para ésteres metílicos do ácidos 3,9-diacetóxi-alcânicos

Os íons moleculares de m/z 470 e 498 não foram observados, porém a caracterização do composto que eluí em 34,21 e 37,71 min foi possível através dos seus fragmentos de m/z 427 e m/z 455 característicos da perda de radical acetila ($470 - 43$ e $498 - 43$) e fragmentos de m/z 410 e de m/z 438 e fragmentos de m/z 350 e de m/z 378 indicam a perda de uma ou duas moléculas de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ respectivamente (Figura 14). O rearranjo de McLafferty explica os fragmentos de m/z 276 e 304 formados a partir dos fragmentos de m/z 350 e 378 (Figura 11 e 12).

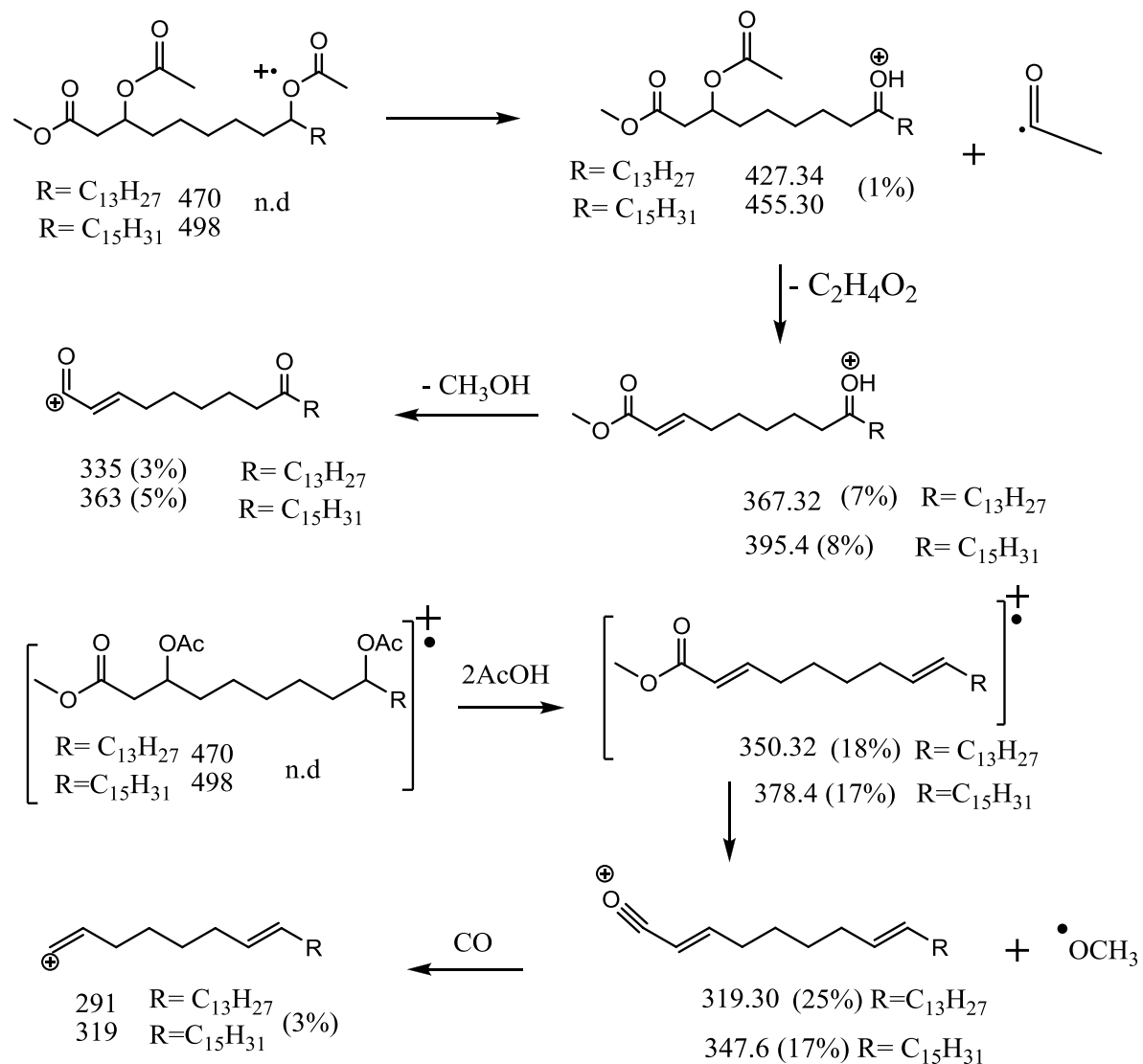


Figure 14. Rota de fragmentação proposta para ésteres metílicos dos ácidos 3,9-diacetóxi-docosanoico e 3,9-diacetóxi-tetracosanoico.

Todavia, por mais confiável e precisa que a identificação espectrométrica tenha sido, um representante (Composto **1**; **Tabela 7**-pg. 47) desta classe foi isolado do óleo floral bruto da espécie *Banisteriopsis anisandra*, por cromatografia em coluna de sílica para confirmar a identificação. O composto isolado foi caracterizado por meio das técnicas de RMN de 1H e ^{13}C 1D e 2D (HSQC e HMBC). Os dois sinais (2H; p; 4,98 e 5,20 ppm) no espectro de RMN de 1H do

composto puro foi atribuído aos hidrogênios carbinólicos do C3 e C9 e os dois sinais (dd, 2,53 e 2,58 ppm) foram atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos de C2, e os dois sinais simples em 2,01 e 2,04 ppm, correspondendo às 3H cada, foram atribuídos às metilas dos grupos acetoxílicos (**Anexo 2**).

Os sinais do espectro de RMN de ^{13}C foram também atribuídos à presença de três grupos carbonílicos que ficou evidenciada pelos sinais em 170,41, 170,94 e 170,86 ppm. Os sinais em 70,5 e 73,9 ppm correspondem a carbonos carbinólicos e atribuídos a C3 e C9 respectivamente. O sinal em 39,0 ppm foi atribuído ao C2 (**Anexo 2**). No mapa de contorno de correlação H, C a múltiplas ligações (gHMBC) um dos hidrogênios carbinólico (5,20 ppm) apresentou correlação com C2 (39,0 ppm) e C4 (33,7 ppm) enquanto que o segundo hidrogênio carbinólico mostrou correlação com o C8 (34,0 ppm) e C10 (34,2 ppm) confirmando o padrão de substituição **3,9-diacetóxi** para este ácido graxo de óleo floral sugerido anteriormente pela rota de fragmentação no espectro de massas (**Tabela 3 e Anexo 2**). É importante destacar que esse ácido graxo floral é um composto inédito em termos do padrão de substituição. A fórmula estrutural exata do representante desta classe está indicada na figura 15.

O espectro de massas-ESI (**Anexo 3**) no modo positivo forneceu o íon quase molecular em de 471,3861 u consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{O}_6$. O outro membro desta classe apresentou cadeia de carbono 24 (pg. 46).

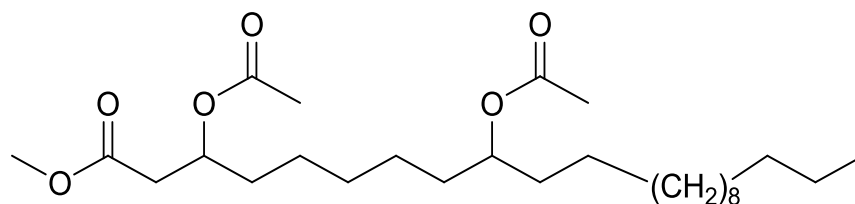


Figura 15. Fórmula estrutural do éster metílico do ácido 3,9-diacetóxi-docosanóico (**1**).

Tabela 3. Atribuições dos deslocamentos químicos do éster metílico do 3,9-diacetóxi-docosanóico (**1**) (ácido graxo do tipo-A).

C#	HSQC		HMBC
	δ_H (mult, J)	δ_C	
1'	3,67 (s, 3H)	51,8	C1
1		170,5	
2	2,53(dd, 2H, J=5 e 15 Hz); 2,58 (dd, 2H, J=10 e 15 Hz)	39,0	C1, C3 e C4
3	5,20 (m, 1H)	70,5	C4 e <u>COCH₃</u> -C3
4	1,60	33,7	
5	1,43	25,1	
6	1,29	20,9	
7	1,43	25,2	
8	1,50	34,0	
9	4,84 (m, 1H)	73,9	C7, C8, C10, C11 e <u>COCH₃</u> -C9
10	1,50	34,2	
11	1,25	25,3	
12-19	1,25	29,3-29,6	
20	1,25	31,9	
21	1,50	22,7	
22	0,88 (t, J= 5 Hz, 3H)	14,1	C21 e C20
<u>COCH₃</u> -C3		170,9	
<u>COCH₃</u> -C3	2,04 (s, 3H)	21,3	
<u>COCH₃</u> -C9		170,9	
<u>COCH₃</u> -C9	2,03 (s, 3H)	21,1	

Com base no padrão de fragmentação estabelecido foi possível encontrar quatro ácidos graxos com cadeias de diferentes comprimentos (C-22, C-24) em diversos óleos florais de espécies de Malpighiaceae. Dois membros apresentam o grupo hidróxi (-OH) na posição 3 e o grupo acetóxi no carbono 9, enquanto que os outros apresentaram o grupo acetóxi em ambas as posições (**Tabela 6**, pg 43). Os ácidos graxos **3-hidróxi-9-acetóxi** foram facilmente distinguidos dos homólogos diacetóxi, pelo fato do grupo **3-hidróxi** dar origem ao íon característico de m/z 103 (**Figura 19**, pg 31).

3.1.2. Óleos florais do tipo B

A recompensa floral do tipo-B caracteriza-se pela presença predominante de ácidos graxos com padrão de fragmentação por impacto de elétrons CG-EM que inclui um pico base de m/z 43, um pico menos intenso de m/z 259 e um pico característico de m/z 157 (**Figura 15**). A presença de um pico menos intenso de m/z 145 denota a presença de um grupo acetóxi em C3, enquanto que a presença de um pico de m/z 259 indica a presença de um segundo grupo acetóxi em C7, confirmado pela presença do fragmento de m/z 217 ($259-\text{CH}_2\text{CO}$). O fragmento de m/z 157 pode ser originado do fragmento de m/z 217 pela perda de uma molécula de ácido acético (CH_3COOH) (**Figura 16**). Com base nesse raciocínio pode-se concluir que há um padrão de dissubstituição do tipo 3,7-, para esta classe de ácidos graxos florais.

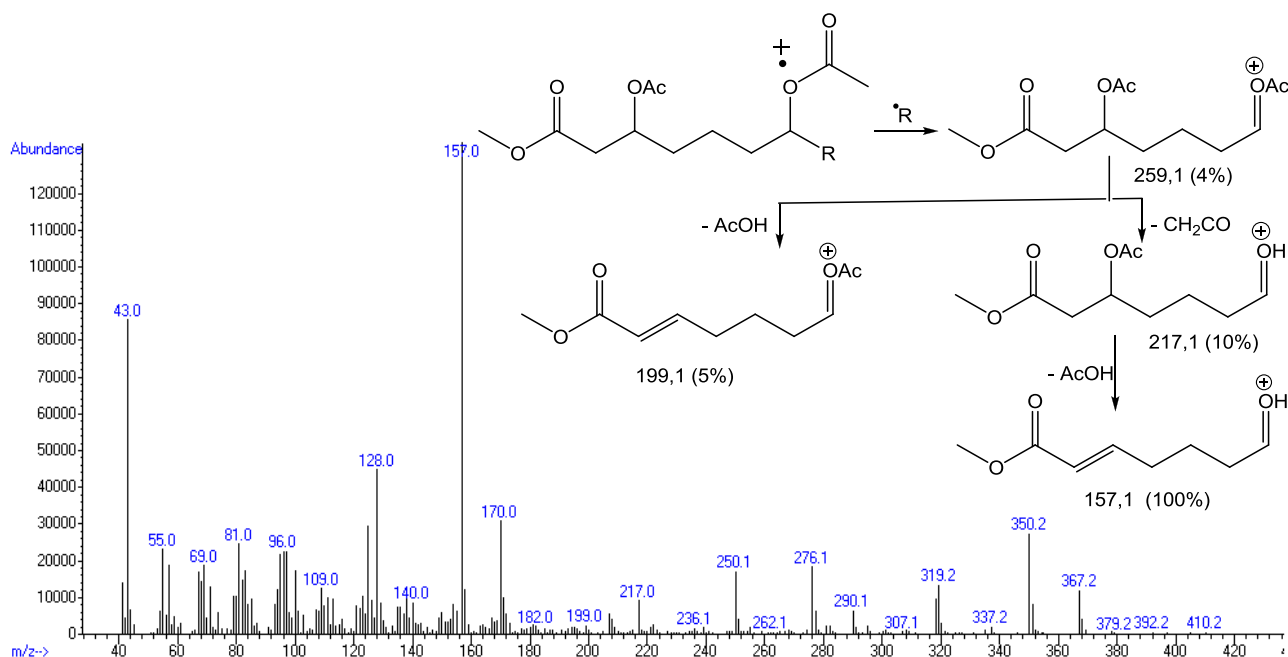


Figura 16. Rota de fragmentação proposta para os espectros de massas dos ésteres metílicos dos ácidos 3,7- diacetóxi-alcanóicos (**11**, **12**, **17** e **46**; **Tabela 7**).

Foram descobertos seis membros da mesma série em diferentes óleos florais. Entre esses compostos, dois membros apresentam um grupo hidróxi (-OH) na posição C3 e um grupo acetóxi (-OCOCH₃) na posição C7 (**7-acetóxi-3-hidróxi**) com 20 e 22 átomos de carbonos, e três membros com 18, 20, 22, e 24 átomos de carbonos e dois grupos acetóxi (-OCOCH₃) nas posições 3 e 7 (**Tabela 6**).

Os íons moleculares ($M^{\dagger} = 414, 442, 470$ e 498) dos ésteres metílicos dos ácidos 3,7-diacetóxi-alcânóicos (**11, 12, 17** e **46**) não puderam ser obtidos no espectro de massas (CG-EM) foram deduzidos a partir dos padrões de fragmentação (**Figura 17** e **18**).

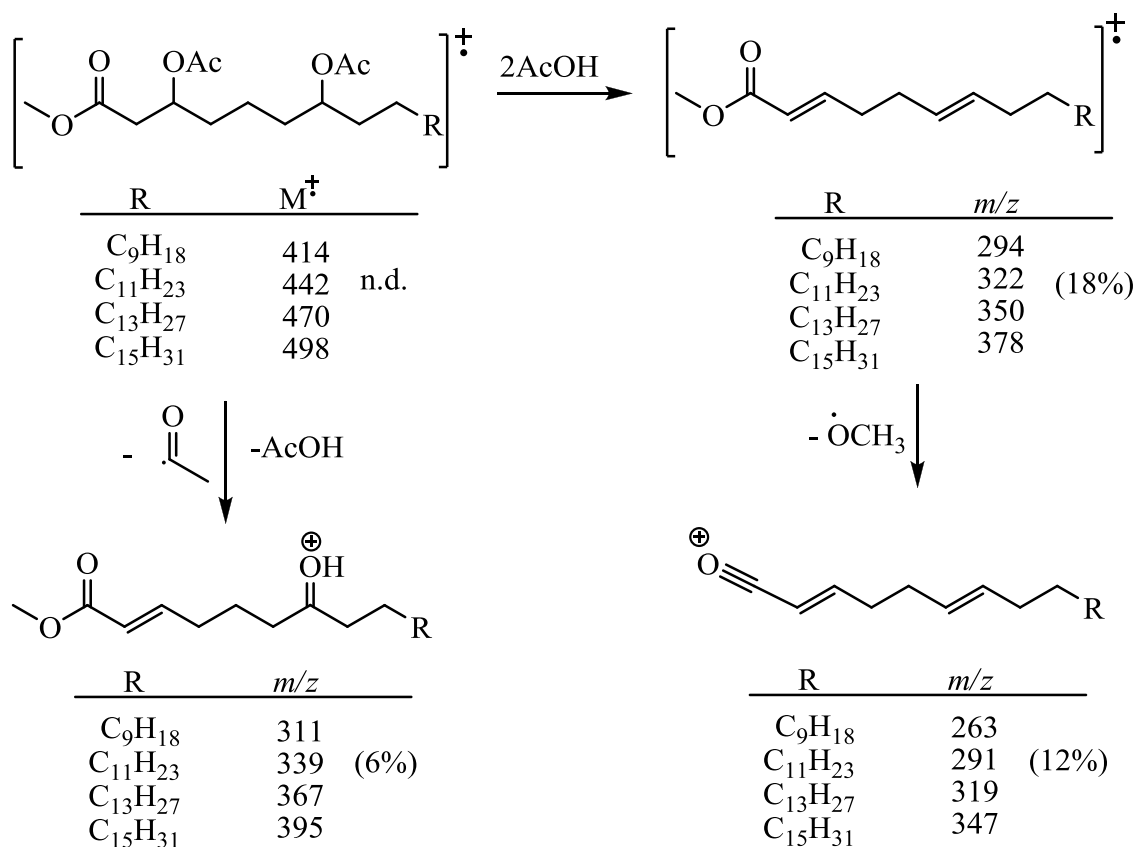


Figura 17. Rota de fragmentação proposta para ácidos 3,7-diacetóxi-alcânóicos.

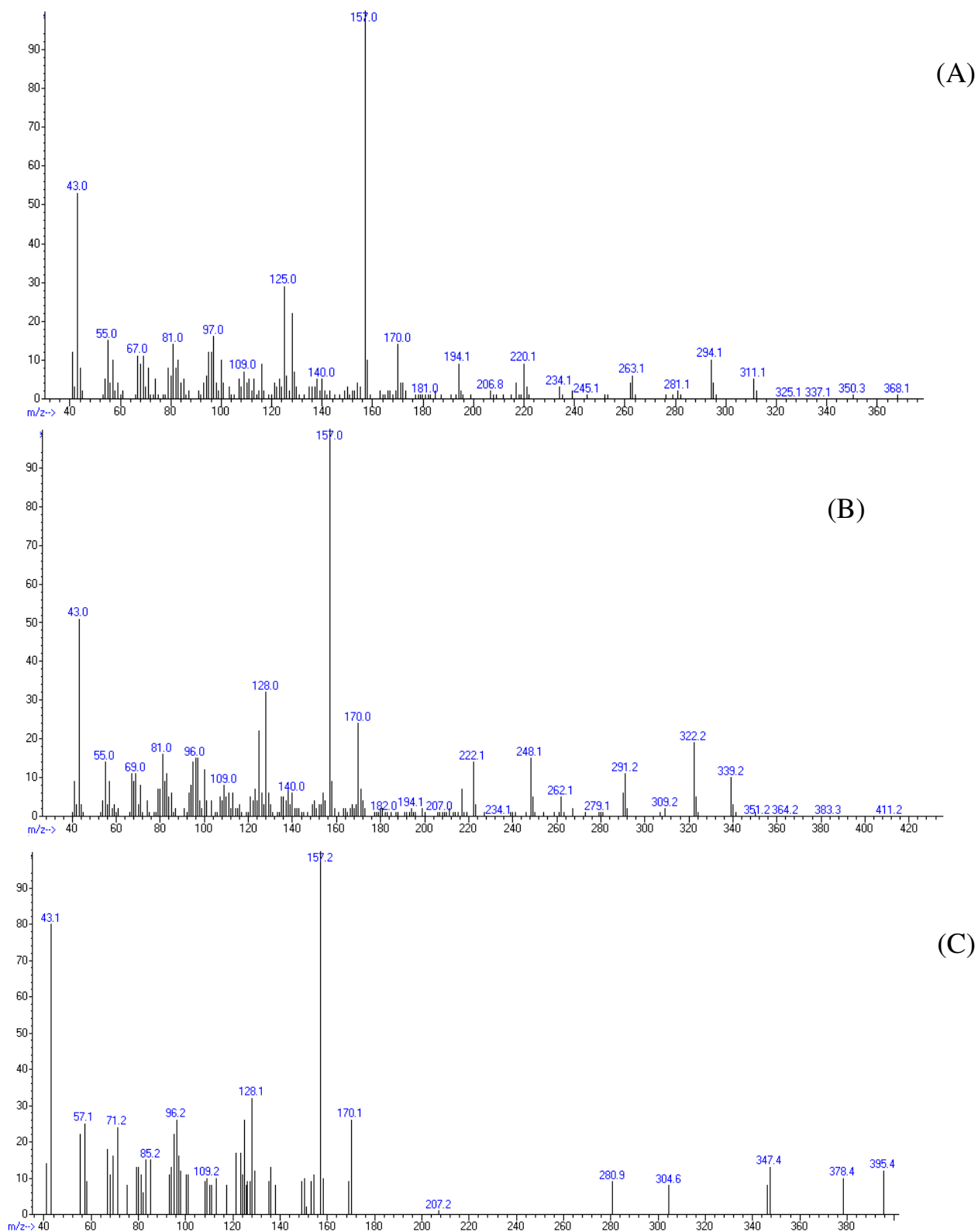


Figura 18. Espectros de massas dos ésteres metálicos dos ácidos (A) 3,7-diacetóxi-esteárico (**46**), (B) 3,7-diacetoxi-eicosanóico (**11**), (C) 3,7-diacetóxi-tetracosanóico (**17**).

Os espectros de massas dos ésteres metílicos dos ácidos **7-acetóxi-3-hidroxi-eicosanóico (9)** e **7-acetóxi-3-hidroxi-docosanóico (10)** apresentam um picos característicos de m/z 103 e m/z 157 (pico base) (**Figuras 19, 20 e 21**).

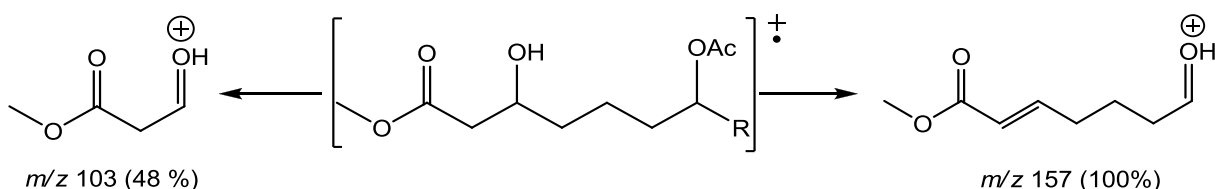


Figura 19. Rota de fragmentação proposta (GC-EM/IE) para os ésteres metílicos dos ácidos 7-acetóxi-3-hidroxi-alkanóicos.

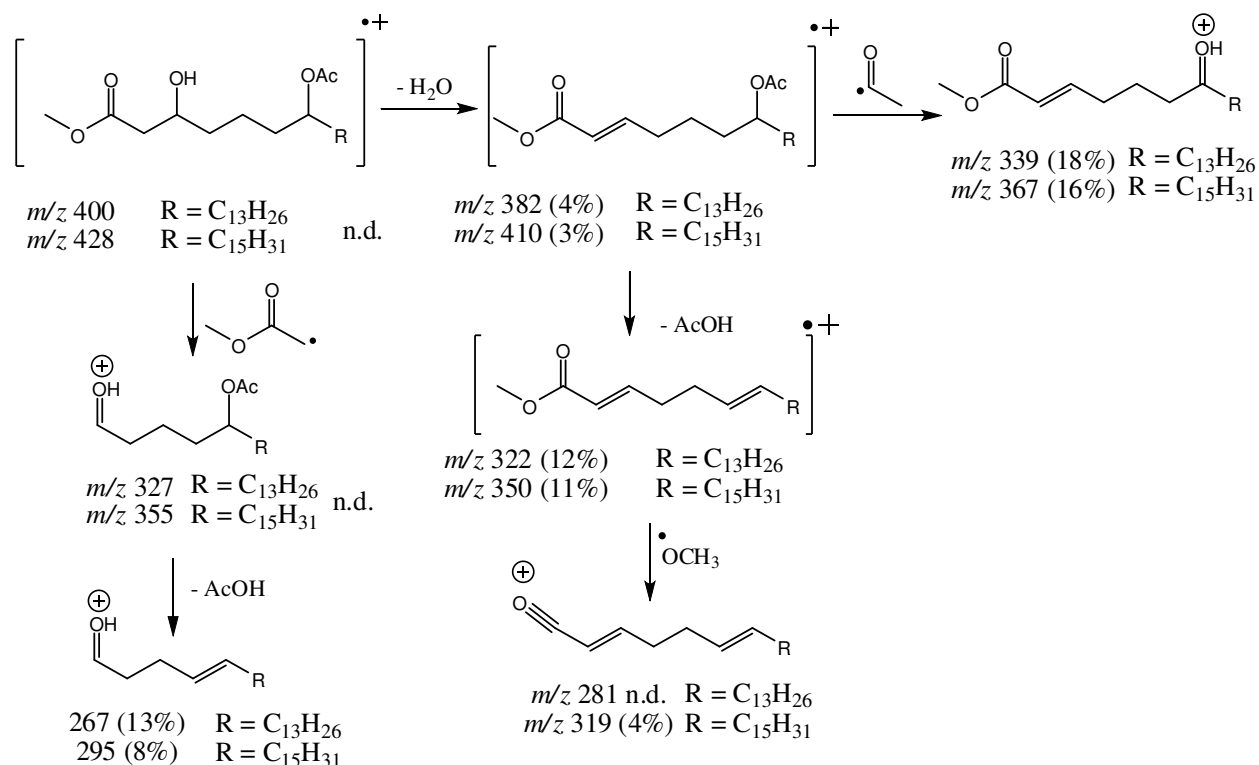


Figura 20. Rota de fragmentação proposta (CG-EM) para os ésteres metílicos dos ácidos 7-acetóxi-3-hidroxi-eicosanóico (**9**) e 7-acetóxi-3-hidroxi-docosanóico (**10**)

Os íons moleculares ($M^{\ddagger} = 400$ e 428) para os compostos **9** e **10** não foram determinados por CG-EM, mas simplesmente deduzidos inicialmente pelos seus respectivos padrões de fragmentação. Por exemplo, para **10** os fragmentos em m/z 410, 367 e 350 sugerem uma massa molecular de 428 u (**Figura 20 e 21**). Assim como os fragmentos de m/z 382, m/z 339, m/z 322 e m/z 267 no espectro de massas de **9**, têm uma diferença de 28 u (C_2H_4), com os fragmentos de m/z 410, m/z 367, m/z 350 e m/z 295 e **10**, sugerindo uma massa molecular de 400 u para **9** (**Figura 20 e 21**).

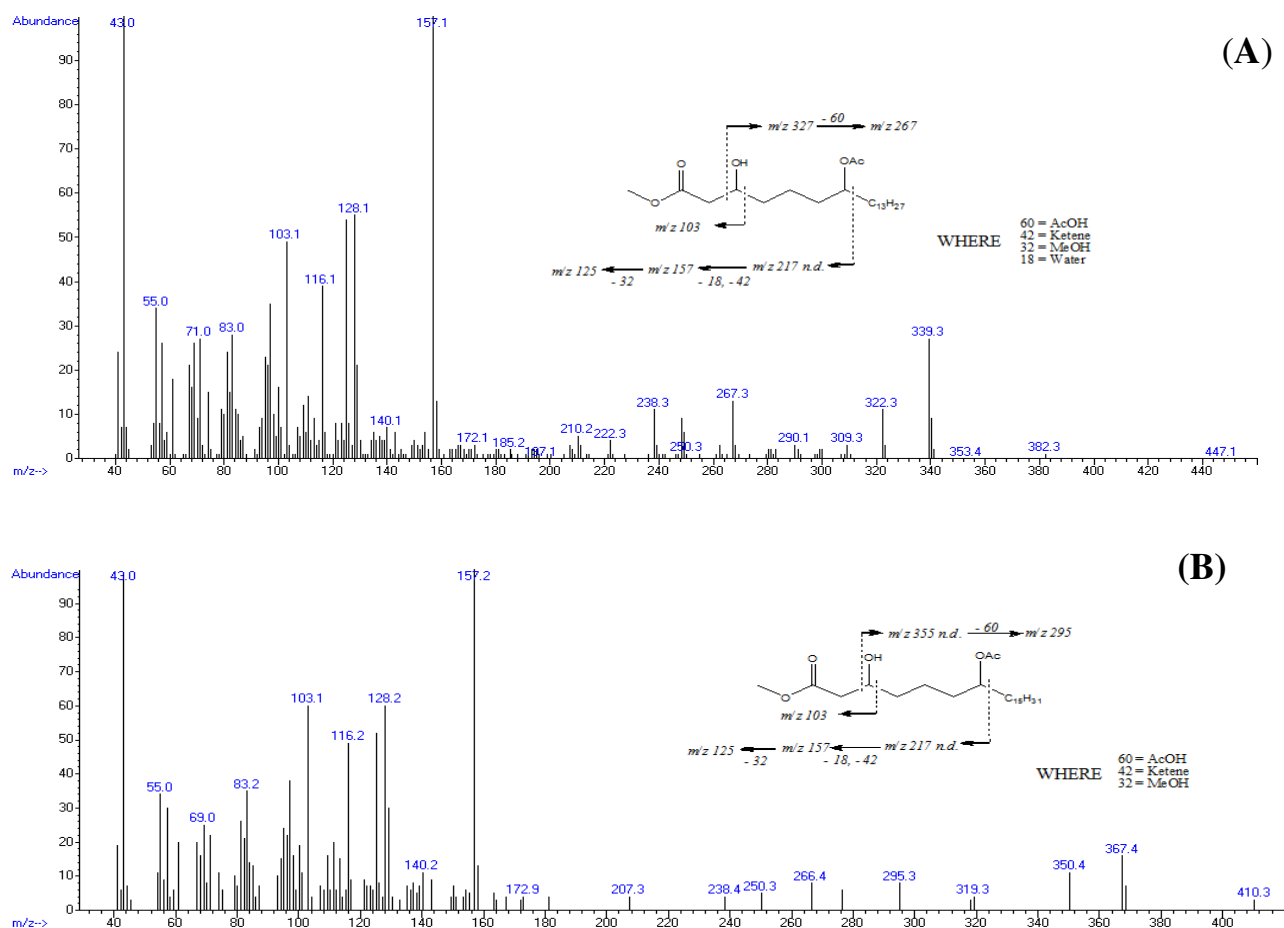


Figura 21. Espectros de massas dos ésteres metílicos dos ácidos (A) 7-acetóxi-3-hidroxi-eicosanóico (**9**) e (B) 7-acetóxi-3-hidroxi-docosanóico (**10**).

Com o intuito de não tornar o resultado ambíguo, um padrão (Composto **12**; **Tabela 7**) foi isolado a partir do óleo floral de *Byrsonima laxiflora* e o mesmo foi caracterizado espectroscopicamente (RMN de ^1H e ^{13}C em 1D) e RMN 2D (HMBC e HSQC). O espectro de RMN de ^1H de **12** apresentou dois sinais em 4,98 e 5,20 ppm atribuídos aos hidrogênios carbinólicos e dois dupletos duplos atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos do C2 (dd, 2,53 e 2,58 ppm) e também dois sinais simples em 2,01 e 2,04 ppm atribuídos aos grupos metílicos ligados à carboxila que confirmam a presença de dois resíduos acetóxi no ácido graxo (**Anexo 2**).

De forma análoga o espectro de RMN de ^{13}C de **12** apresentou sinais correspondentes a carbonos carbonílicos em 170,4; 170,8 e 170,9 ppm. Os sinais em 70,5 e 73,9 ppm foram atribuídos aos carbonos carbinólicos C3 e C7 respectivamente (**Anexo 3**). No mapa de contorno g HMBC de **12** o hidrogênio carbinólico em 5,20 ppm mostrou correlações com C2 (39,0 ppm) e C4 (33,7 ppm) enquanto que o segundo hidrogênio carbinólico mostrou correlações com C6 (34,0 ppm) e C8 (34,2 ppm) assim confirmando o padrão de substituição 3,7-diacetóxi para este tipo de ácido graxo floral. Estas correlações confirmaram a estrutura sugerida por espectrometria de massas. (**Figura 21 e Tabela 4**).

O espectro de IES-EM (**Anexo 3**) no modo positivo do composto **12** permitiu a obtenção do íon quasi molecular de m/z 471,3861 que é consistente com a massa molecular 470.3861 u e com a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{O}_6$. Os outros membros da classe apresentam cadeias com diferentes números de carbono (**Tabela 6**, pg 43).

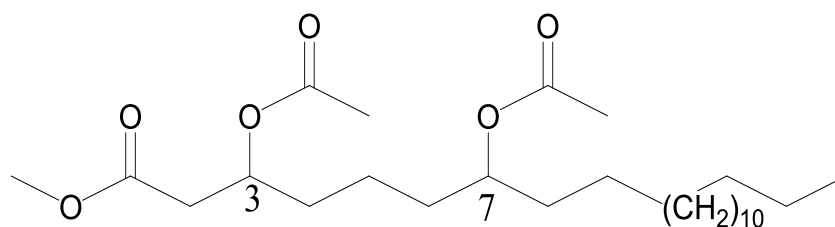


Figura 22. Fórmula estrutural éster metílico do ácido 3,7-diacetóxi-docosanóico (12)

Tabela 4. Atribuições dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), para o éster metílico do ácido 3,7-diacetóxi-docosanóico (12).

C#	HSQC		HMBC
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)	
1'	51,8	3,67 (s, 3H)	C1
1	170,0		
2	38,9	2,52 (dd, J= 4 e 16 Hz; 1H) e 2,57 (dd, J=8 e 16 Hz, 1H)	C1, C3 e C4
3	70,0	5,2 (m, 1H)	C2, C4, C5 e <u>COCH₃-C3</u>
4	34,0	1,6	
5	20,9	1,43	
6	34,0	1,53	
7	73,9	4,84 (m, 1H)	C5, C6, C8, C9 e <u>COCH₃-C9</u>
8	34,0	1,53	
9	25,0	1,25	
10-19	29,2 - 29,6	1,25	
20	31,9	1,25	
21	22,7	1,25	
22	14,1	0,85 (t, J=8Hz; 3H)	C20 e C21
<u>COCH₃-C3</u>	170,9		
<u>COCH₃-C3</u>	21,2	2,04 (s, 3H)	
<u>COCH₃-C7</u>	170,9		
<u>COCH₃-C7</u>	21,0	2,04 (s, 3H)	

3.1.3. Óleos florais do tipo C

A primeira vista os óleos florais do tipo C são exatamente iguais aos óleos florais do tipo B, pois os compostos predominantes (**5** e **6**; Tabela 7 pg. 47) apresentam espectros de massas com pico característico de m/z 157, assim como um pico base de m/z 43.

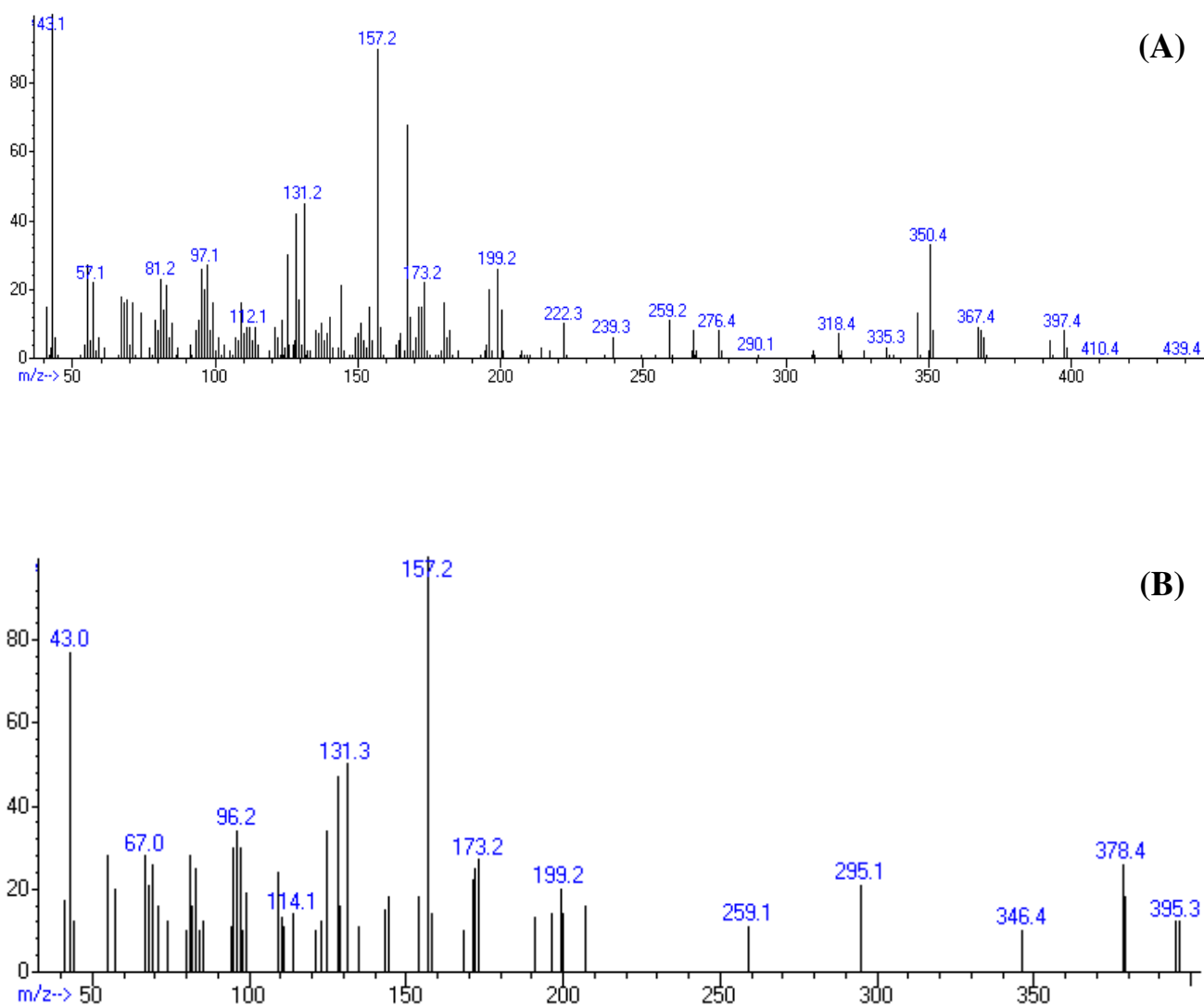


Figura 23. Espectro de massas dos ácidos Pterandricos A (**5**) e B (**6**).

Os picos intensos de m/z 131 e 173 (**Figura 24**) indicam que a posição dos substituintes é diferente comparado aos outros ácidos graxos até agora discutidos, e indicam a presença de um grupo acetóxi (-OCOCH₃) na posição cinco dos ácidos alcaacetóxi (**5** e **6**; **Tabela 7**).

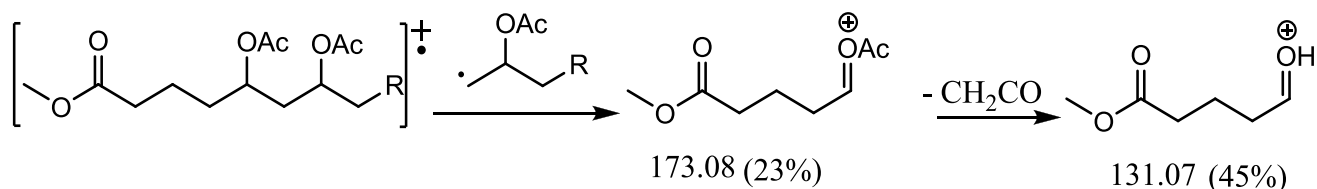


Figura 24. Rota de fragmentação do espectro de massas indicando a presença do resíduo acetóxi em C5.

O segundo grupo acetóxi (-OCOCH₃) pode estar presente na posição C7, pois o espectro de massas apresenta fragmentos de m/z 259. Um fragmento de m/z 157 pode surgir quando uma molécula de ácido acético (CH₃COOH) é removida da posição C5. Além do mais, fragmentos de m/z 369, 309 e 267 também sugerem um padrão de substituição 5,7 tendo em conta uma massa molar de 470 *u* para **5** (**Figura 25**).

As massas molares para **5** ($M^{\ddagger} = 470$) e **6** ($M^{\ddagger} = 498$) foram inicialmente deduzidas pelos seus fragmentos nos espectros de massas por EI-EM e posteriormente confirmados por IES-EM (**Anexo 3**) no modo positivo permitindo obter o íon quasimolecular ($M^+ \text{ Na}^+$) de m/z 493,3510 e 521,3821 para **5** e **6** respectivamente. Portanto, a fórmula molar de **5** é C₂₇H₅₀O₆ e **6** é C₂₉H₅₄O₆.

O fragmentos mais importantes para **5** e **6** no CG/IE-EM foram racionalizados nas figuras 25 e 26.

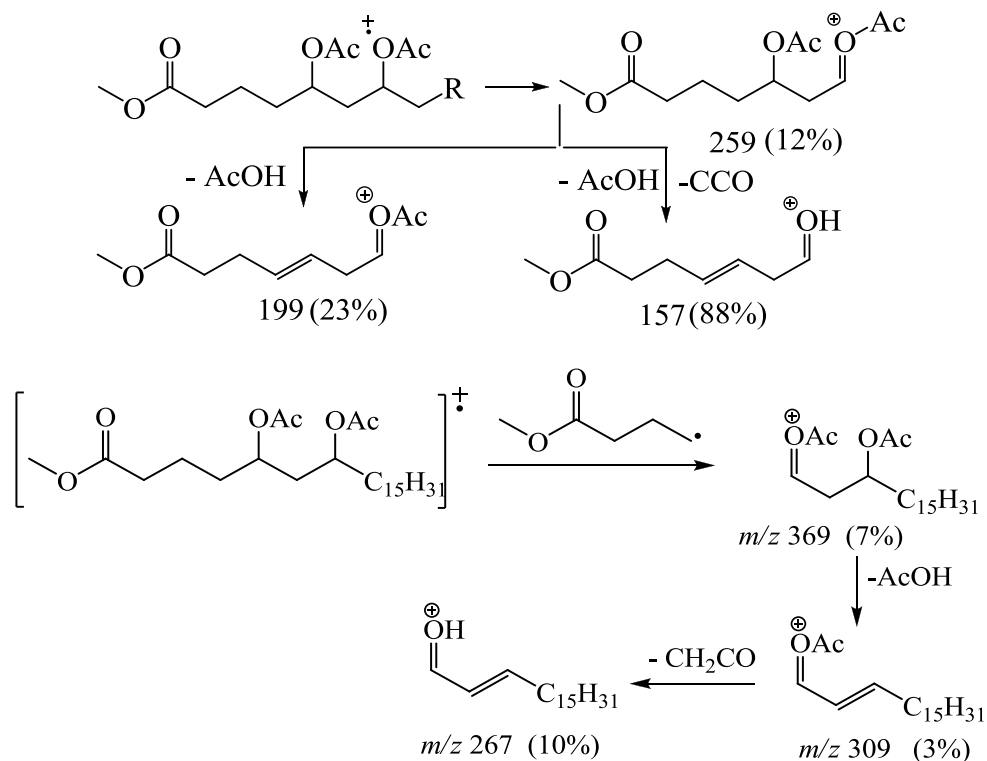


Figura 25. Rota de fragmentação do ácido graxo presente no tipo-C de óleo floral com padrão de substituição 5,7-diacetóxi.

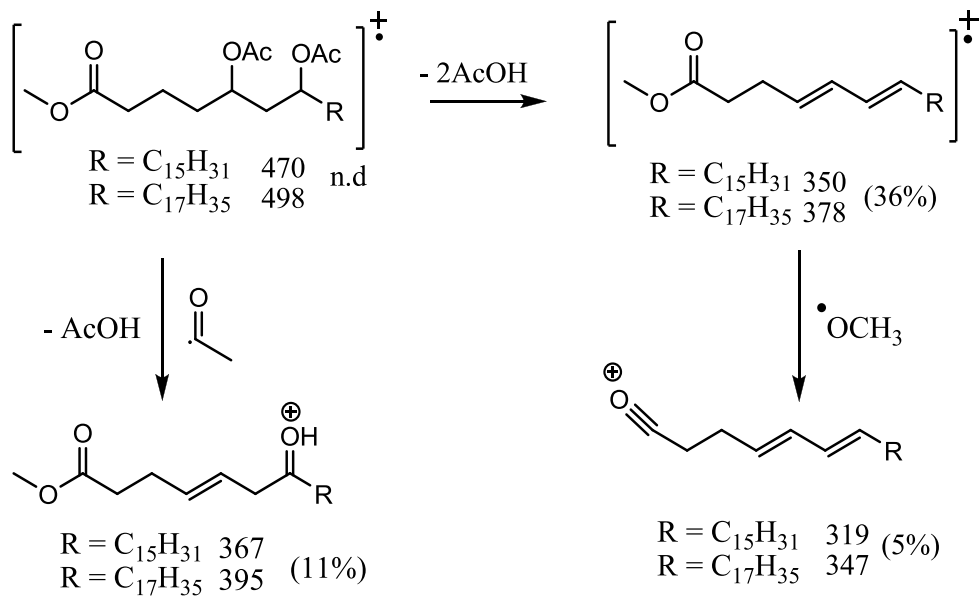


Figura 26. Rota de fragmentação dos compostos 5 e 6.

Uma pequena quantidade do composto 5 (2,3 mg) foi purificada do óleo floral de *Pterandra pyroidea* que é a única que o produz (0,002 mg/elaióforo). Esta espécie parece estar num processo de substituição da recompensa floral de óleo floral para pólen (Cappellari *et al.*, 2011).

O espectro de RMN de ^1H apresenta um multipeto em 4.92 ppm atribuído aos hidrogênios carbinólicos (2H) e outro multipeto atribuído aos dois hidrogênios α -carbonila em 2.35 ppm. Adicionalmente os dois duplo duplo dupletos (ddd, 1,70 e 1,88) foram atribuídos aos dois hidrogênios diastereotópicos do carbono 6. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta três sinais atribuídos aos grupos carbonílicos de carboxilas (173,7; 170,7 e 170,6 ppm) e dois sinais atribuídos a carbonos carbinólicos (70,8 e 17,2 ppm). Todas estas características levam a propor a estrutura de um novo ácido graxo floral, denominado de **ácido pterândrico** (Figura 27, Tabela 5 e Anexo 2).

Portanto, a etapa seguinte deste trabalho foi sintetizar este ácido graxo para confirmar o padrão de substituição e determinar a estereoquímica relativa dos substituintes em 5 e 7 (seção 2.2).

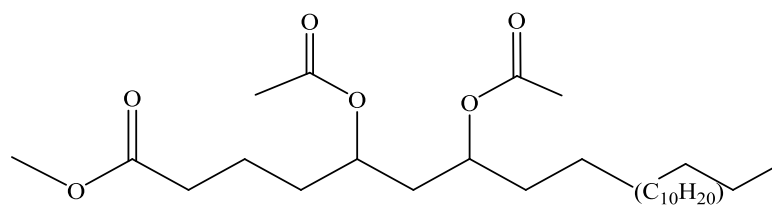


Figura 27. Estrutura do éster metílico do ácido pterândrico (5) composto predominante em óleo do tipo C.

Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3), do éster metílico do ácido pterândrico (**5**).

C#	δ_{H} ppm (mult, J)	δ_{C} ppm
1'	3,68 (s, 3H)	51,5
1		173,7
2	2,30 (m)	34,2
3	1,68 (m)	20,5
4	1,57 (m)	33,3
5	4,93 (m, 1H*)	70,8
6	1,70 (m) e 1,88(m)	38,3
7	4,93 (m, 1H*)	71,2
8	1,57 (m)	33,6
9	1,25	25,1
10 - 19	1,25	29,3 - 29,6
20	1,25	31,9
21	1,25	22,7
22	0,88 (t, J= 8 Hz, 3H)	14,1
<u>CO</u> CH ₃ -C5		170,6
CO <u>CH</u> ₃ -C5	2,04 (s, 3H)	21,2
<u>CO</u> CH ₃ -C7		170,7
CO <u>CH</u> ₃ -C7	2,04 (s, 3H)	21,2

*Ocorre superposição de sinais

3.1.4. Óleos florais do tipo D

Os ácidos graxos do quarto tipo são encontrados nos lipídios florais secretados por várias espécies e apresentam pico base de m/z 43, o que novamente indica a presença de um ou mais grupos acetila, assim como picos característicos de m/z 287, 245, 153 e 185, sugerindo que o grupo acetóxi ($-\text{OCOCH}_3$) está ligado ao C9 e que o segundo grupo acetóxi ($-\text{OCOCH}_3$) pode estar entre a posição 1 e 9,

como nos ácidos graxos das recompensas florais do tipo A (**Figura 13, 14**). Todavia, a estrutura exata desta classe de ácidos graxos florais não é igual à da classe dos ácidos graxos da primeira classe, pois estes ácidos graxos florais também apresentam picos de m/z 173 e 131, indicando que o segundo grupo acetóxi (-OCOCH₃) está ligado na posição C5, o que é uma característica dos óleos florais do tipo-C (**Figura 24 e 25**). Assim, pode-se concluir que ocorre um padrão de substituição do **5,9-diacetóxi** para este tipo de ácidos graxos (**Figura 28(A, B) e Figura 29**).

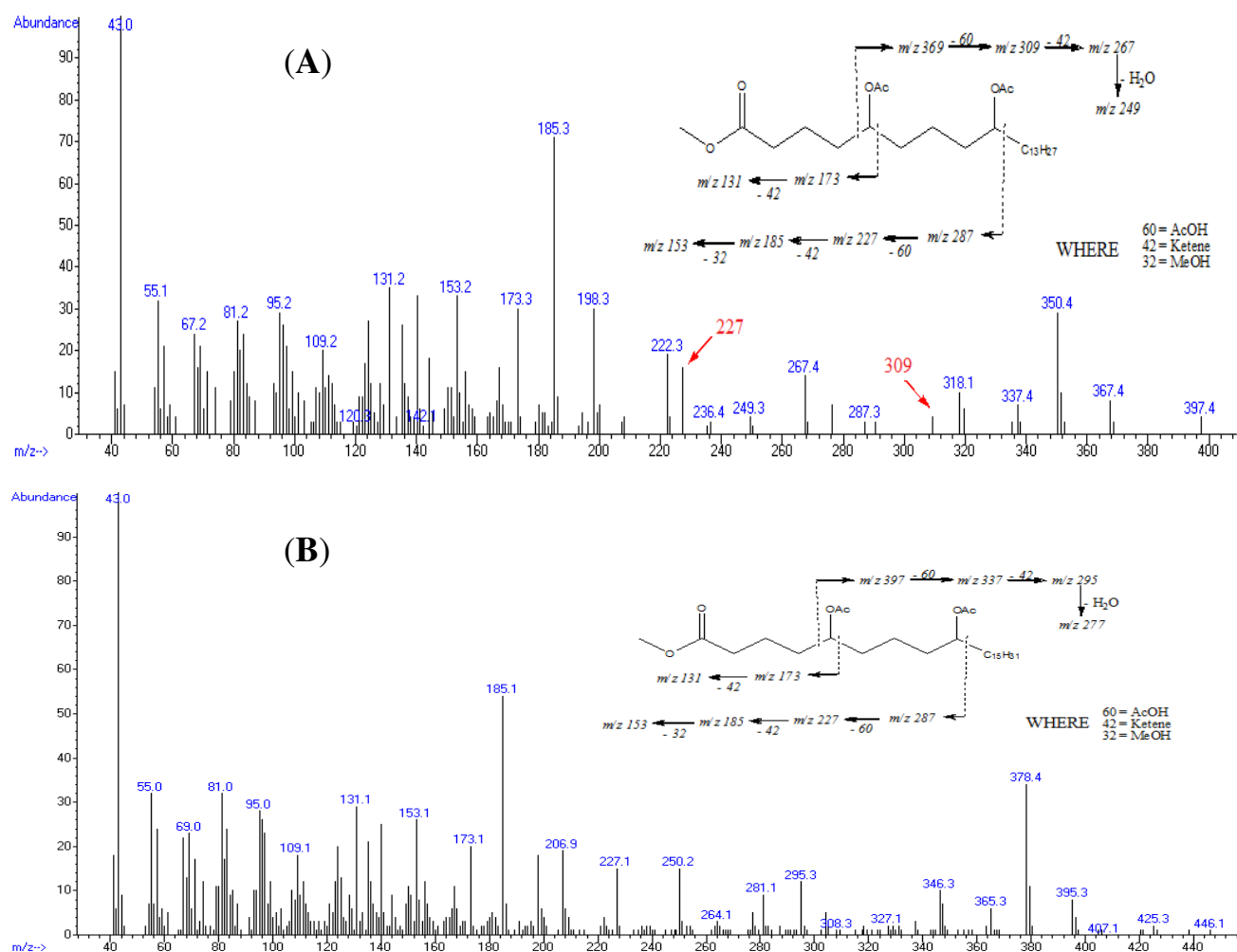


Figura 28. Espectros de massas e rota de fragmentação proposta para os ésteres metílicos dos ácidos (A). 5,9-diacetóxi-docosanoico (7) (B). 5,9-diacetóxi-tetracosanoico (8).

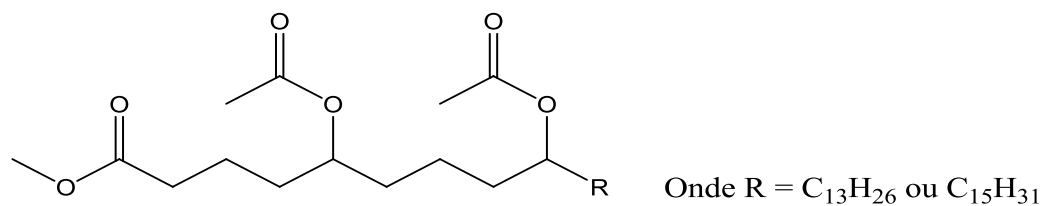


Figura 29. Fórmula estrutural da classe D de ácidos graxos florais.

Em razão do padrão mencionado anteriormente apresentar os picos de m/z 287 e 185, tem-se uma indicação de que ocorre substituição em C9 e, no caso dos fragmentos de m/z 173 e 131, indicam a presença de substituintes na posição 5 (**Figura 28 A e B**). Entretanto estes ácidos graxos ocorrem em pequena quantidade e as estruturas não puderam ser confirmadas por outros métodos espectroscópicos. A síntese não foi efetuada.

3.1.5. Composição química dos óleos florais da família Malpighiaceae do Cerrado

Os nossos resultados indicam a presença de ácidos graxos dissubstituídos com grupos hidróxi (-OH) e acetóxi (-OCOCH₃) em diferentes posições, tais como 3,7-, 5,7-, 3,9- e 5,9-, e com 18, 20, 22, e 24 átomos de carbono (**Figura 30 e Tabela 6**), sendo que tais ácidos graxos são os constituintes principais dos óleos florais. Alguns ácidos graxos de cadeia longa linear, que não apresentam substituição, foram encontrados nos óleos florais brutos que foram caracterizados pelos seus espectros de massas comparados aos dados de biblioteca Wiley 275, espectro de massas CG-EM (**Tabela 7**–pg 47). Adicionalmente pequenas quantidades de ácidos graxos 3-hidroxi/acetóxi de 16 a 22 átomos de carbono foram encontradas. A identificação dos ácidos substituídos no C-3 será discutida nos óleos florais de Krameriaceae (2.2).

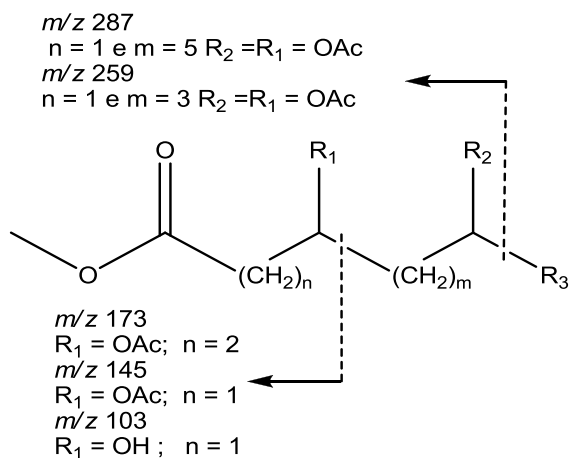


Figura 30. Rota de fragmentação de ácidos graxos metilados, sugerindo padrões de dissustituição 3,7-, 5,7-, 3,9- ou 5,9-.

Tabela 6. Novos tipos de ácidos graxos florais identificados.

C/N°	n	R_1	m	R_2	R_3
1	1	OAc	5	OAc	$C_{13}H_{27}$
2	1	OAc	5	OAc	$C_{15}H_{31}$
3	1	OH	5	OAc	$C_{15}H_{31}$
4	1	OH	5	OAc	$C_{17}H_{35}$
5	3	OAc	1	OAc	$C_{15}H_{31}$
6	3	OAc	1	OAc	$C_{17}H_{35}$
7	3	OAc	3	OAc	$C_{13}H_{27}$
8	3	OAc	3	OAc	$C_{15}H_{31}$
9	1	OH	3	OAc	$C_{13}H_{26}$
10	1	OH	3	OAc	$C_{15}H_{31}$
11	1	OAc	3	OAc	$C_{13}H_{27}$
12	1	OAc	3	OAc	$C_{15}H_{31}$

3.1.6. Caracterizações de acilgliceróis

Entre os óleos florais das 33 espécies de Malpighiaceae somente *Tetraptenys jussieuniana* e *Peixotoa reticulate* apresentaram acilgliceróis. As estruturas destes acilgliceróis foram atribuídas com base nos espectros de massas e comparação com dados da literatura. (Figuras 31 a 35) (Durmi *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2003 e 2005). Os acilgliceróis encontrados nestas duas espécies foram 1-acetil-2-(3-acetóxi-hexadecanoil) glicerol (**24**), 1-acetil-2-(3-acetóxi-eicosanoil) glicerol (**25**), 1-acetil-2-(3-acetóxi-docosanoil) glicerol (**26**), Oncidinol (**28**) e seu homólogo 1,3-diacetil-2-(3,7-diacetóxi-octadecanoil) (**27**) (Tabela 7-pg 47).

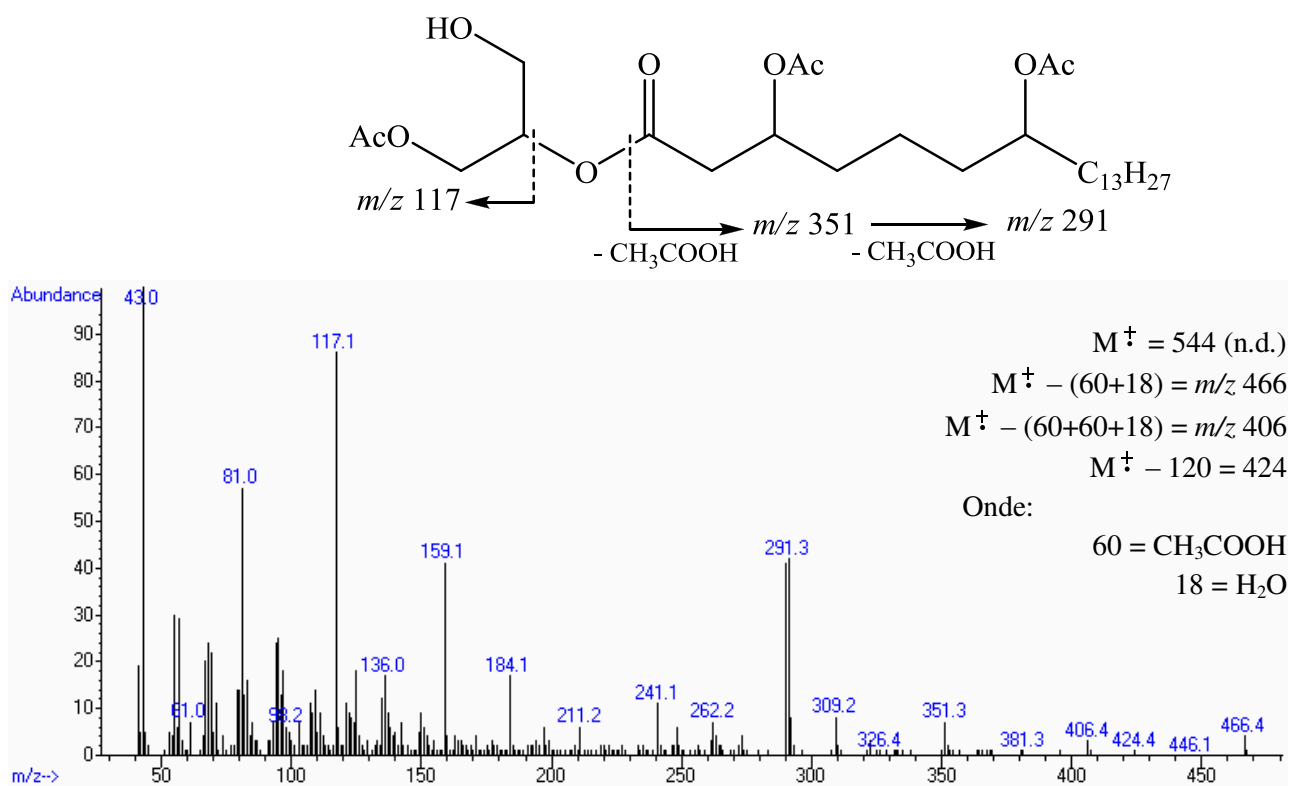


Figura 31. Espectro de massas e rota de fragmentação do Oncidinol (**28**) com base na literatura.

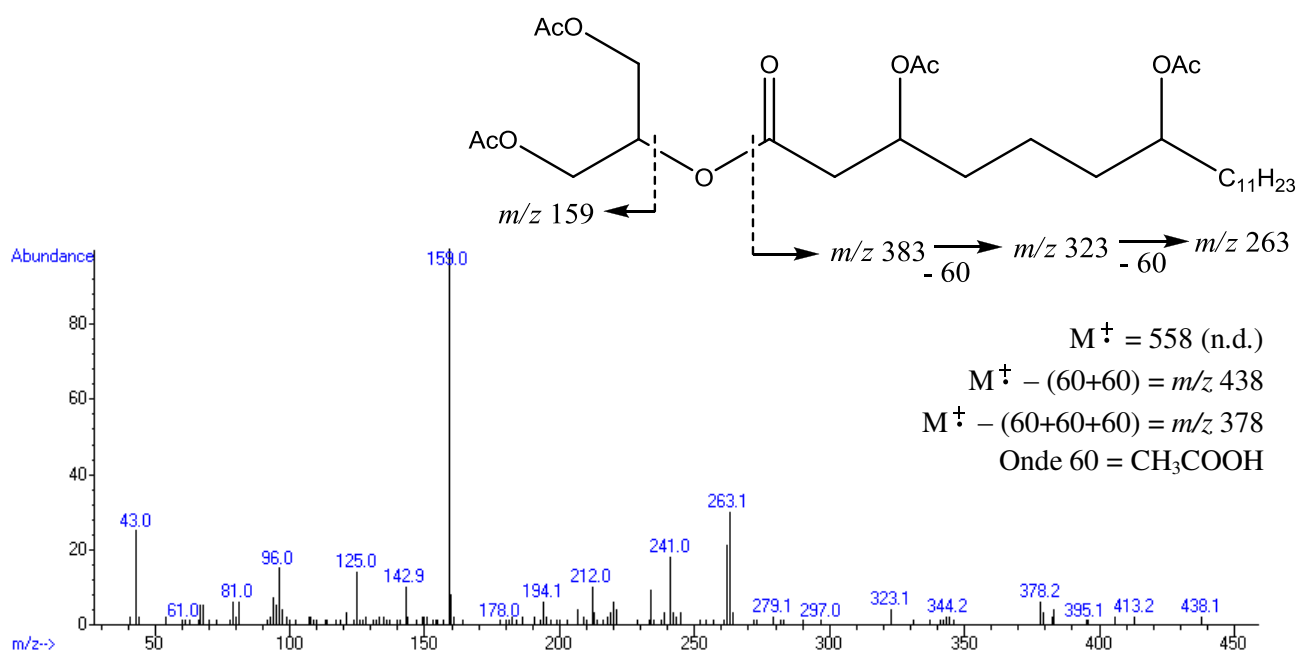


Figura 32. Espectro de massas do 1,3-diacetil-2-(3,7-diacetóxi-octadecanoil) (**27**).

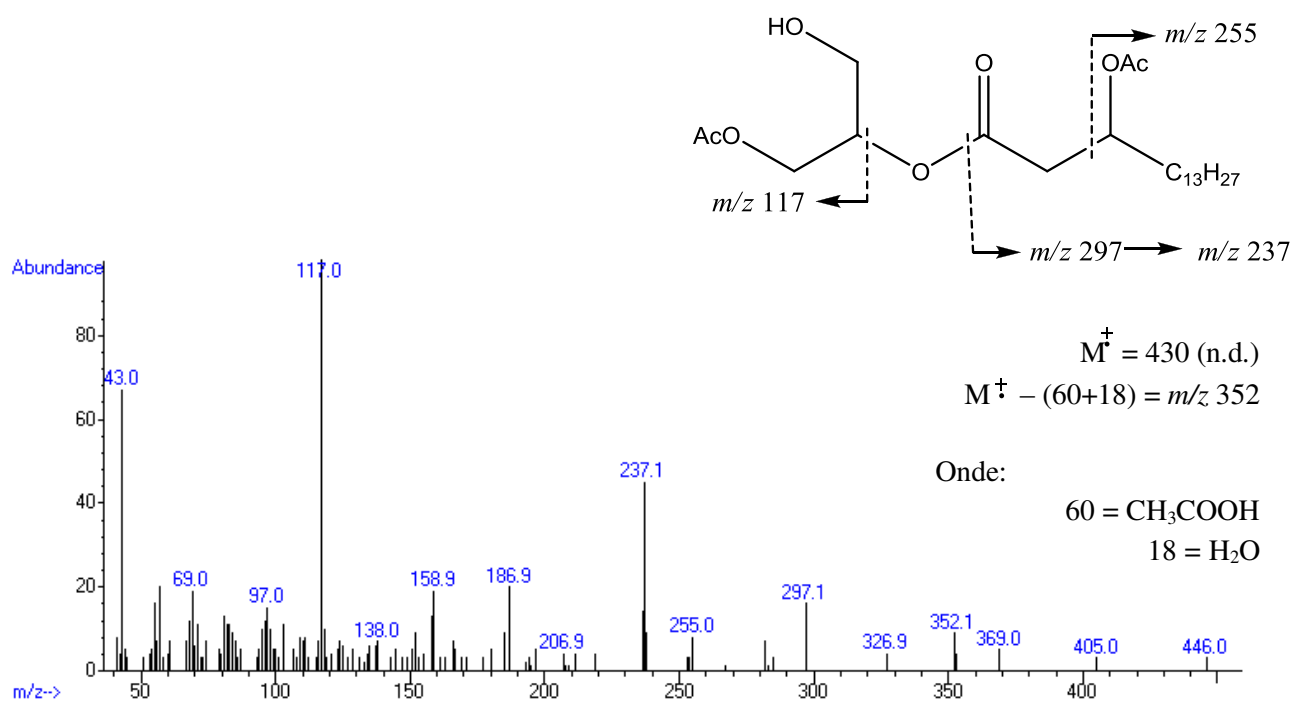


Figura 33. Espectro de massas e fragmentação do 1-acetil-2-(3-acetóxi-hexadecanoil) glicerol (**24**).

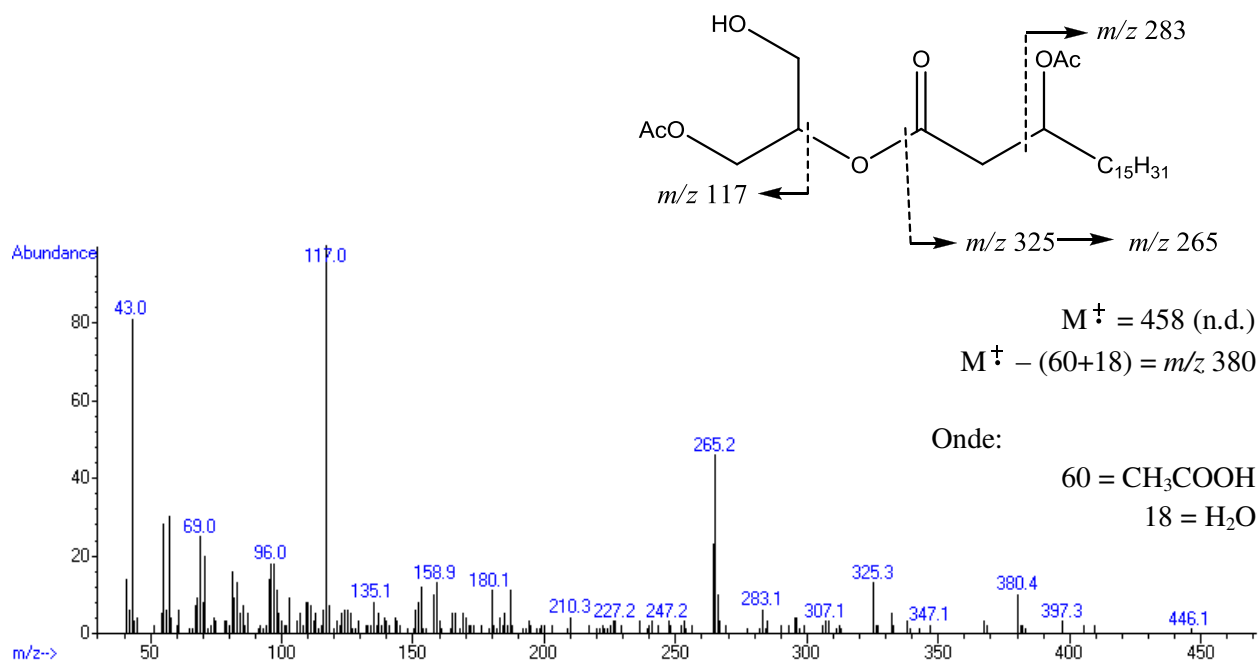


Figura 34. Espectro de massas e fragmentação do 1-acetil-2-(3-acetóxi-octadecanoil) glicerol (**25**).

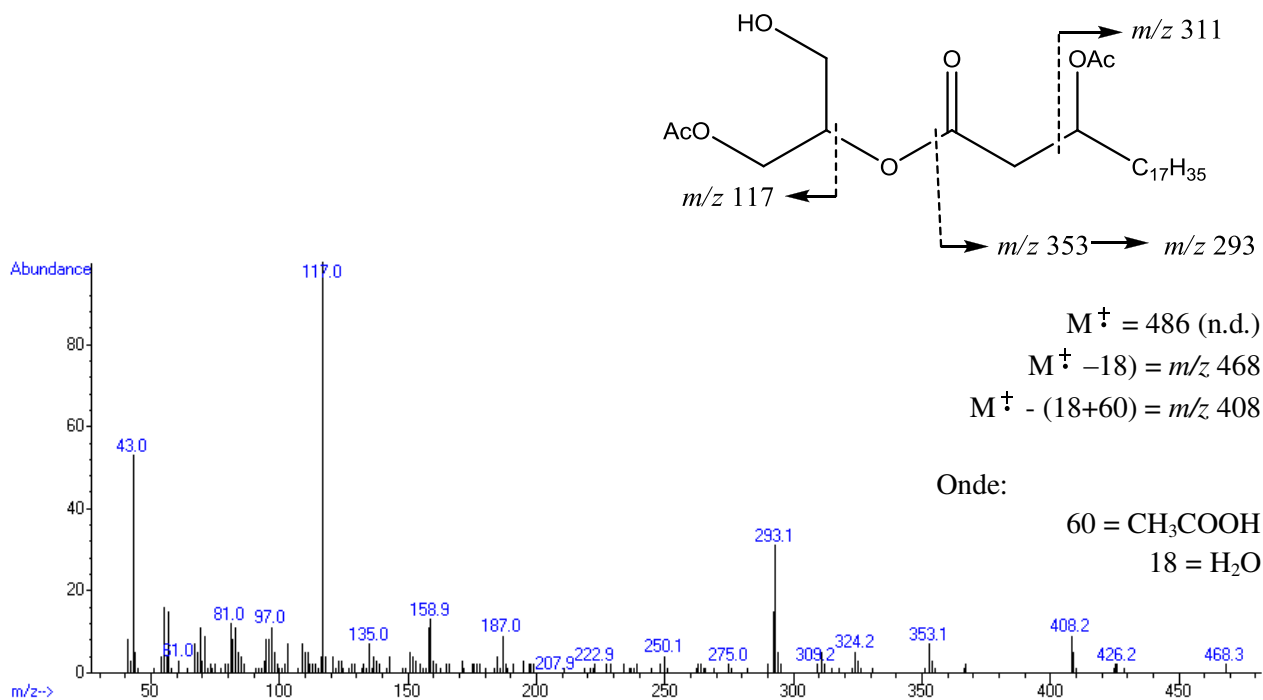
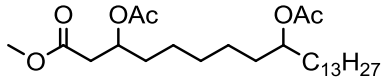
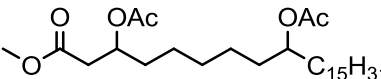
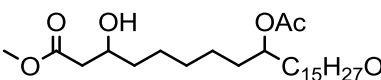
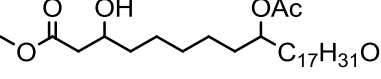
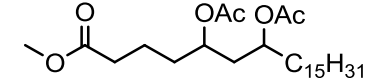
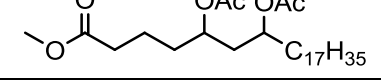
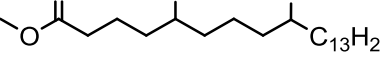
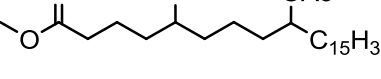
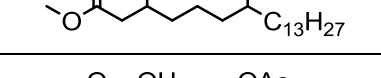
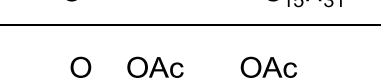
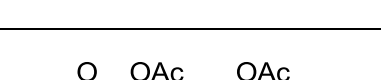
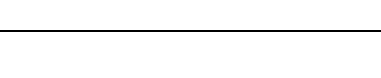
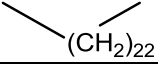
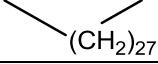
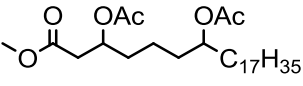
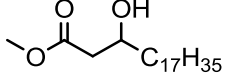
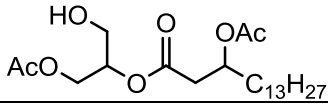
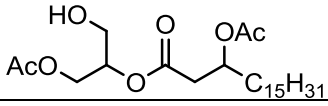
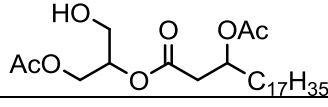
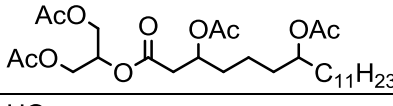
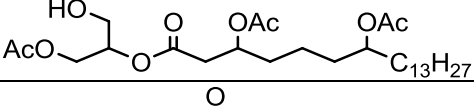
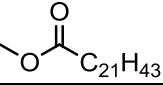
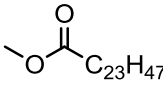
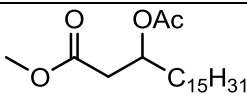
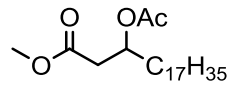
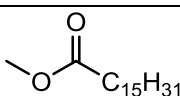
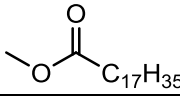
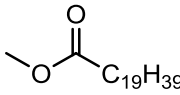
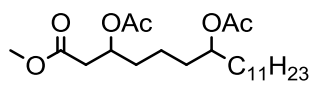
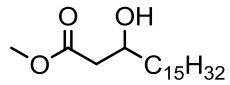


Figura 35. Espectro de massas e fragmentação do 1-acetil-2-(3-acetóxi-eicosanoil) glicerol (**26**).

Tabela 7. Identificação dos compostos como ésteres metílicos em óleos florais de *Malpighiaceae*.

C#	IR	Nome/Estrutura	Picos característicos
1	3006,63		471[M ⁺ +H, ESI], 427(1), 410(2), 350(15), 319(14), 287(10), 276(22), 245(43), 185(52), 153(37), 43(100)
2	3188,97		395(8), 378(16), 347(16), 304(20), 287(7), 245(43), 201(60), 185(45), 153(34), 43(100)
3	3118,26		507[[M ⁺ +K, ESI], 468(M ⁺ , 4), 467(4), 409(4), 360(25), 290(15), 185(41), 153(33), 135(36), 81(55), 43(100).
4	3407,17		409(4), 360(25), 290(15), 185(41), 153(33), 135(36), 95(50), 81(55), 43(100).
5	2974,81		439(1), 410(1), 397(9), 367(7), 350(38), 335(4), 267(15), 259(15), 199(25), 173(27), 157(88), 131(51), 43(100).
6	3146,04		425(3), 395(7), 378(26), 259(6), 199(21), 173(27), 157(87), 131(45), 43(100).
7	3010,67		397(2), 367(8), 350(36), 287(2), 267(15), 227(18), 185(63), 173(25), 153(34), 131(33), 43(100)
8	3186,95		425(4), 395(7), 378(38), 295(14), 250(13), 227(19), 198(29), 185(71), 173(24), 153(33), 131(33), 43(100)
9	2766,71		382(4%), 340(7), 339(19), 267(9), 248(7), 157(100), 125(52), 103(38), 43(75)
10	2947,03		339(8), 322(11), 291(11), 248(16), 170(23), 157(100), 128(44), 125(23), 43(79)
11	2829,85		443[[M ⁺ +H, ESI], 339(9), 322(21), 291(10), 248(11), 170(23), 157(100), 125(25), 100(25), 43(69).
12	3005,12		471[[M ⁺ +H, ESI], 367(8), 350(19), 335(1), 259(1), 217(6), 157(100), 128(33), 125(23), 43(65).

13	2400,0		-
14	2896,64	DESCONHECIDO	352(7), 320(42), 278(4), 201(15), 159(100), 127(37), 43(76)
15	2794,45	4,5-Diidroxi-7-metoxiflavona	286 (M ⁺ ; 88), 120 (37), 167 (100), 180 (33), 193 (32)
16	2900		408 (M ⁺ ; 1), 57 (100), 71 (70), 85 (51)
17	3188,16		381(11), 339(16), 332(19), 255(8), 157(100), 128(58), 125(58), 95(58), 43(94)
18	2860,15	DESCONHECIDO	316(80), 280(64), 193(25), 180(64), 167(100), 137(62).
19	2925,81	DESCONHECIDO	316(100), 193(32), 167(81), 137(86),
20	3703,95	DESCONHECIDO	426(13), 357(10), 109(100)
21	2887,93	DESCONHECIDO	330(60), 193(27), 164(57), 151(100).
22	2523,29		324(4), 292(8), 250(5), 103(100), 74(12), 71(12).
23	3520,32	DESCONHECIDO	374(23), 367(24), 317(13), 269(50), 135(25), 43(100).
24	2847,13		369(4), 352(8), 297(17), 237(53), 159(16), 117(100), 43(84)
25	3021,92		440(2), 325(12), 265(43), 159(16), 117(100), 43(60)
26	3207,34		468(2), 425(5), 353(10), 293(40), 159(16), 117(100), 43(64)
27	3224,01		438(2), 323(9), 263(23), 262(22), 241(15), 159(100), 43(70)
28	3320,80		291(52), 290(39), 159(87), 117(97), 43(100).
29	2569,72		354(31), 311(19), 143(23), 129(18), 87(68), 74(100).
30	2959,66	DESCONHECIDO	143(91), 125(71), 114(100).
31	2856,62	DESCONHECIDO	350(26), 157(59), 125(59), 113(77), 100(78), 43(100).
32	3213,72	DESCONHECIDO	211(74), 179(90), 150(36), 133(61), 100(100), 43(58).
33	3238,98	DESCONHECIDO	376(27), 271(24), 211(44), 179(32), 100(79), 43(100).

34	2622,25	DESCONHECIDO	324(9), 292(19), 250(11), 159(100), 127(53), 43(79).
35	2760,65		382(M ⁺ , 48), 159(46), 127(77), 87(95) 55(100), 43(83).
36	2984,91	DESCONHECIDO	348(70), 159(77), 43(100).
37	3086,44	DESCONHECIDO	348(47), 323(27), 291(18), 269(55), 159(48), 43(100).
38	2720,24	5-hidróxi-4,7-dimetoxiflavanona	300(85), 283(6), 193(20), 166(18), 134(100), 121(58).
39	2403,04		313(15), 296(14), 265(24), 207(21), 43(100)
40	2603,56		341(17), 324(14), 292(34), 281(12), 267(7), 250(14), 43(100)
41	2933,90	Tetrametil éter de catequina	346(M ⁺ ; 27), 195(4), 180(25), 167(100), 151(17), 137(9)
42	1916,12		270(M ⁺ ; 16), 239(12), 227(20), 143(19), 87(66), 74(100)
43	2137,86		298(M ⁺ ; 27), 267(9), 255(28), 241(5), 143(31), 87(76), 74(100)
44	2353,03		326(M ⁺ ; 37), 295(8), 283(23), 143(30), 87(80), 74(74)
45	3045,52	DESCONHECIDO	332(43), 180(75), 165(18), 153(100)
46	2635,89		311(8), 294(21), 263(8), 220(9), 170(23), 157(100), 128(35), 125(24), 43(79)
47	3123,81	Retusine	358(M ⁺ 100), 343(51), 329(8), 315(50), 165(24), 117(33), 43(48)
48	2103,47	9,12-Octadecadienoato de metila	294(M ⁺ , 35), 262(14), 178(14), 109(40), 95(70), 81(72), 67(100)
49	3582,70	DESCONHECIDO	319(16), 269(47), 153(33), 117(100), 43(45).
50	3625,64	DESCONHECIDO	319(25), 318(32), 269(47), 135(20), 117(100), 43(23).
51	2312,12		313(1), 296(4), 264(10), 222(8) 103 (100), 74(25), 71(25)

C# = composto, IR = índice retenção.

3.2. Especificidade química dos óleos florais de espécies da família Malpighiaceae

Curiosamente, os cromatogramas de íons (“*total ion chromatogram*”) das 33 espécies simpátricas da família Malpighiaceae demonstraram que os gêneros utilizam diferentes tipos de recompensas florais para atrair os polinizadores, ou seja, ácidos graxos distintos, que poderiam levar a uma diferença química entre as espécies simpátricas, levando a uma polinização preferencial de algumas das espécies (**Tabela 8**—pg 58 e 59, e **Anexo 1**). Portanto, no presente trabalho foram investigados sete gêneros da família Malpighiaceae do cerrado (*Banisteriopsis*, *Byrsonima*, *Camerea*, *Heteropterys*, *Peixotoa*, *Pterandra* e *Tetrapterys*), que produzem diferentes tipos de ácidos graxos florais, de forma a selecionar os polinizadores que garantam a sobrevivência das mesmas.

3.2.1. *Banisteriopsis*

As avaliações dos compostos químicos envolvidos na atração de polinizadores, presentes nos óleos florais de doze espécies representativas do gênero *Banisteriopsis* (*Banisteriopsis anisandra*, *Banisteriopsis argyrophylla*, *Banisteriopsis campestris*, *Banisteriopsis laevifolia*, *Banisteriopsis latifolia*, *Banisteriopsis malifolia*, *Banisteriopsis megaphylla*, *Banisteriopsis nummifera*, *Banisteriopsis pubipetala*, *Banisteriopsis schizoptera*, *Banisteriopsis stellaris* e *Banisteriopsis variabilis*) indicaram que os componentes principais oferecidos aos visitantes das plantas são ácidos graxos florais do tipo A, que contêm ácidos **3,9-diacetóxi-alcanóicos** e alguns compostos minoritários, (**Figura 36**, **Tabela 8**—pg 58 e 59, e **Anexo 1**). Algumas espécies apresentaram composição química

diferente das outras espécies do mesmo gênero (*Banisteriopsis pubipetala*, *Banisteriopsis megaphylla* e *Banisteriopsis argyrophylla*) e a classificação das mesmas serão revistas pois não apresentam ácidos graxos com padrão de substituição 3,9-diacetoxi-alcanóicos.

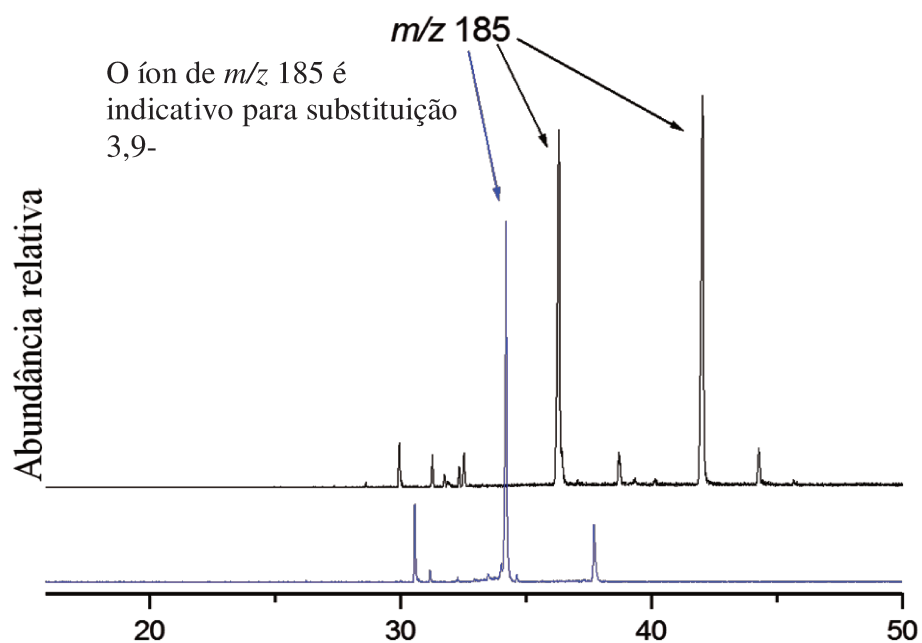


Figura 36. Cromatograma de íons, representativo de *Banisteriopsis* [*Banisteriopsis anisandra* (preto) e *Banisteriopsis laevifolia* (azul) óleos florais brutos] mostrando abundância de ácidos 3,9-diacetóxi-alcanóicos.

3.2.2. *Byrsonima*

Os constituintes químicos dos óleos florais do gênero *Byrsonima* (*Byrsonima basiloba*, *Byrsonima coccolobifolia*, *Byrsonima guilleminiana*, *Byrsonima laxiflora*, *Byrsonima pachyphylla*, *Byrsonima rigida*, *Byrsonima*

subterrânea, *Byrsonima umbellate*, *Byrsonima verbascifolia*, *Byrsonima vimnifolia*), são ácidos graxos do tipo B, ou seja, **ácidos 3,7-diacetóxi-alcanóicos**. (**Figura 37**, **Tabela 8**–pg 58 e 59, e **Anexo 1**). Além disso, as espécies *Byrsonima coccolobifolia*, *Byrsonima laxiflora*, *Byrsonima pachyphylla*, *Byrsonima rigida* e *Byrsonima verbascifolia*, também produzem quantidades consideráveis de ácidos graxos que não apresentam a substituição no carbono β , ou seja, recompensas florais do tipo D (**Tabela 8**–pg 58 e 59). A classificação *Byrsonima umbellate* deverá ser revista pois a composição química do seu óleo floral é incompatível com os outros membros do mesmo gênero.

3.2.3. *Heteropterys*

As análises por espectrometria de massas indicam que os principais ácidos graxos presentes nas recompensas florais de cinco espécies do gênero *Heteropterys* (*Heteropterys escalloniaefolia*, *Heteropterys campestris*, *Heteropterys nervosa*, *Heteropterys pteropetala*, *Heteropterys tomentosa*) são similares aos do gênero *Byrsonima*, ou seja, ácidos **3,7-dicetóxi-alcanóicos**. A única espécie que contém quantidades consideráveis do **ácido pterândrico** é a *Heteropterys tomentosa* (**Tabela 8**–pg 58 e 59, e **Anexo 1**).

3.2.4. *Camerea*

O óleo floral da espécie *Camerea affinis* foi analisado três vezes com o emprego da técnica CG/IE-EM, e em nenhuma destas análises foi detectado a presença de ácidos graxos de qualquer natureza.

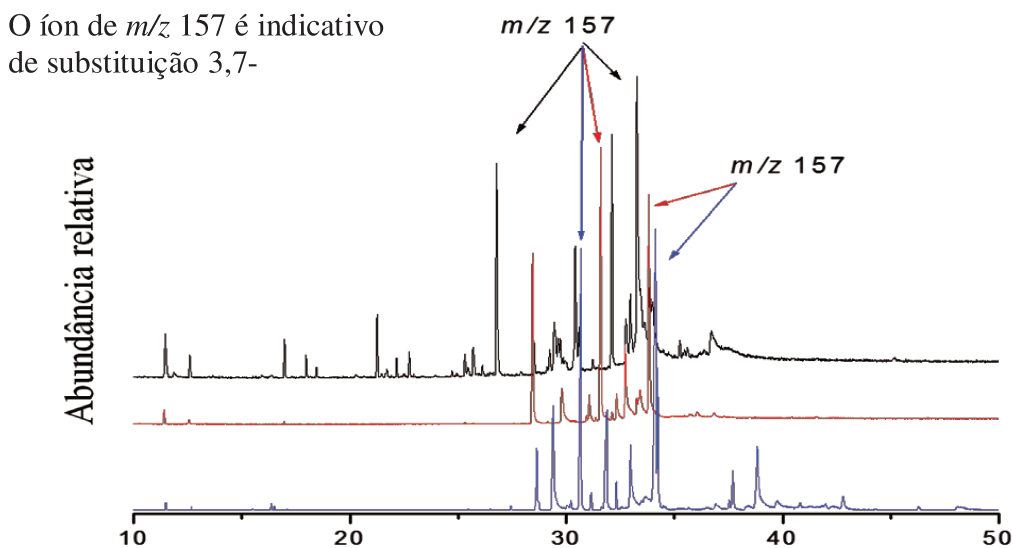


Figura 37. Cromatograma representativo de íons de óleos florais de *Byrsonima* (azul), *Heteropterys* (preto), e *Peixotoa* (vermelho).

3.2.5. *Peixotoa*

Os cromatogramas de íons (*TIC*) dos óleos florais de duas espécies do gênero *Peixotoa* (*Peixotoa goiana* e *Peixotoa reticulata*) são diferentes e apresentam um mecanismo de polinização distinto.

Peixotoa goiana depende de um vetor externo (abelha coletora de óleos florais) para sua polinização e sua composição de óleos florais apresentou os ácidos graxos **3,7-diacetóxidos** como componentes majoritários, semelhante aos óleos florais dos gêneros *Byrsonima* e *Heteropterys*. Enquanto que a espécie autógama *Peixotoa reticulata* secreta o **acil-glicerol** com resíduos de ácidos graxos (**Figura 38** e **Tabela 8**—pg 58 e 59) semelhantes aos óleos florais das Orchidaceae e Scrophulariaceae (Durmi *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2003). Uma questão que pode surgir, é se os **ácidos graxos** livres são potencialmente mais importantes para as abelhas coletoras de óleo do que os derivados de **acil-glicerol**. Acharmos que este

não é o caso, pois o gênero *Tetrapteryx* da família Malpighiaceae e espécies da família Orchidaceae e Scrophulariaceae empregam o mesmo recurso, ou seja, o **acilglicerol** com porções de ácido graxo, de forma a atrair abelhas coletoras de óleos. Aparentemente é o sistema enzimático vegetal o responsável por essa diferença, pois o gênero *Tetrapteryx* e a família Orchidaceae não produzem néctar, de forma que a única recompensa para os visitantes dessas plantas são os óleos florais.

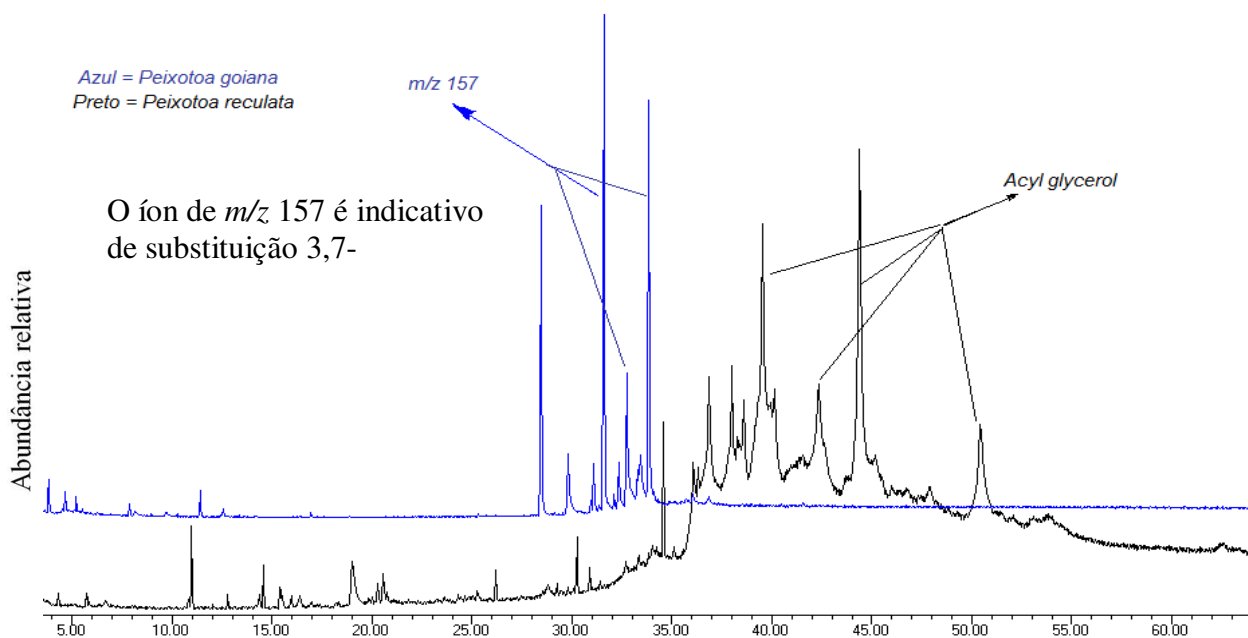


Figura 38. Cromatograma de íons de óleos florais de duas espécies de *Peixotoa*

3.2.6. *Tetrapteryx*

Os óleos florais que foram extraídos de espécies do gênero *Tetrapteryx* são constituídos por uma mistura de **acilgliceróis**, juntamente com uma pequena quantidade de **ácidos graxos** livres (Tabela 8–pg 58 e 59, e Anexo 1). Em tal condição há pequena tendência de que ocorra um padrão de substituição do tipo

3,7-, pois o óleo floral bruto apresenta o composto **1-acetil-2-(3,7-diacetóxi-octadecanoil)-glicerol**. O principal constituinte apresenta uma substituição na posição β , assim como os óleos florais das famílias Orchidaceae e Scrophulariaceae (Durmi *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2003; Vogel *et al.*, 1987).

3.2.7. *Pterandra*

A única espécie pertencente a este gênero é a *Pterandra pyroidea*, a qual ocorre no Cerrado brasileiro. Os indivíduos desta espécie apresentam flores glandulares (produtoras de óleos), aglandulares (sem óleos) ou apresentam elaióforos reduzidos. Capellari *et al.* (2011) demonstrou a partir de várias análises que tal espécie apresenta um sistema de polinização alterado para polinizadores generalistas, em que a principal recompensa é o pólen e não os óleos (Capellari *et al.*, 2011). Essa modificação no sistema de polinização especializada para generalizada aparentemente coincide com a ideia de J. Memmott, segundo o qual “a generalização prevalece no campo, em que a maioria das plantas é polinizada por um conjunto de polinizadores, sendo que muitos destes visitam um conjunto definido de plantas” e, assim, interações planta-polinizador originam uma cadeia alimentar complexa (Memmet *et al.*, 1997).

Para se avaliar a química relacionada com a ecologia e também para se descobrir se há alguma relação entre a composição química do óleo (qualitativamente e quantitativamente) com o processo biológico, ou seja, a modificação do sistema polinizador, nós realizamos as análises no óleo floral da espécie *Pterandra pyroidea*. O extrato bruto dos elaióforos em acetato de etila indica que a espécie *Pterandra pyroidea* produz em média 0,021 mg/flor, podendo ser afirmado que a quantidade de óleo floral é muito menor que em outras espécies

vegetais produtoras de óleo, como nos casos de espécies das famílias Orchidaceae e Krameriaceae, cuja produção varia de 1,0 a 3,0 mg/flor (Buchmann *et al.*, 1987).

A composição dos óleos florais fornece noções da variação quantitativa e qualitativa dos componentes que podem ser relacionados à modificação do padrão de polinização para uma espécie em particular. Por exemplo, a composição química da espécie *Pterandra pyroidea* é diferente, não só com relação às outras espécies da família Malpighiaceae, mas também diferente com relação às outras famílias produtoras de óleo. Nessa espécie, a composição química é muito simples, sendo constituída quase exclusivamente por um único ácido graxo (**Figura 39** e **Tabela 8**). Em segundo lugar, esta é a única espécie que contém o ácido graxo ou óleo floral do tipo C, sendo mais especificamente, o **ácido pterândrico**.

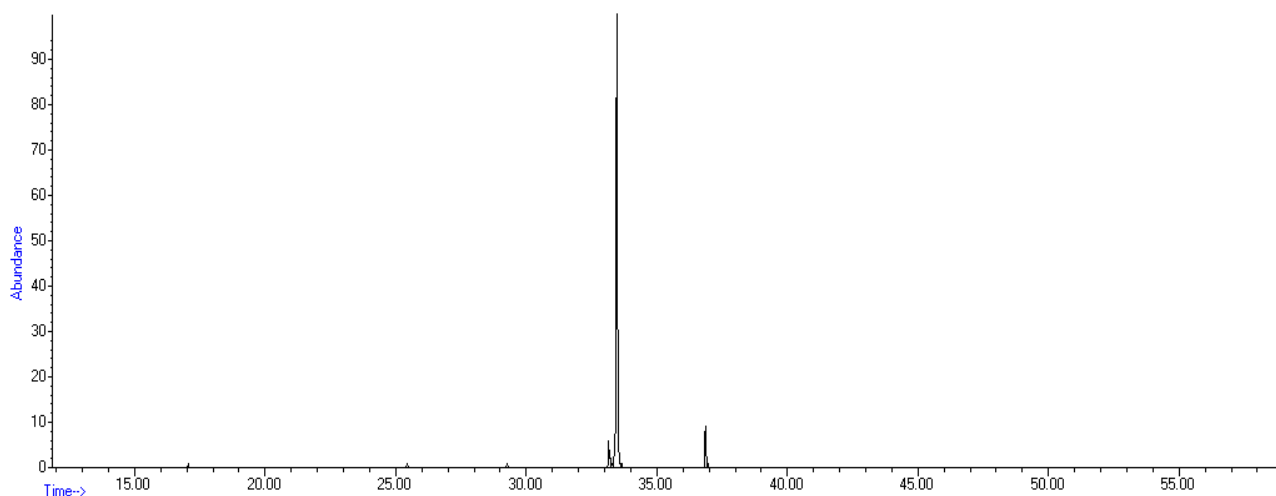


Figura 39. Cromatograma de íons do óleo floral de *Pterandra pyroidea*.

O **ácido pterândrico** apresenta um padrão de substituição do **5,7-diacetóxi**, sem substituintes na posição β . Enquanto que as secreções dos elaióforos das espécies restantes da família Malpighiaceae e dos óleos produzidos por outras

famílias, tais como Krameriaceae, Orchidaceae, etc., apresentam ácidos graxos livres ou derivados de **acilglicerol** com porções de ácidos graxos que estão particularmente substituídos na posição β (Buchmann *et al.*, 1987; Durmi *et al.*, 2008; Seigler *et al.*, 1978; Simpson *et al.*, 1977; Seipold *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2003, 2007). Sabendo-se que esta espécie se encontra num estado de transição no seu mecanismo de polinização, a grande questão é se a substituição na posição β é importante ou não para os polinizadores.

As famílias Malpighiaceae, Orchidaceae e Krameriaceae oferecem diferentes óleos florais para os polinizadores, compartilhando a característica relacionada à presença de substituinte na posição β , independentemente de se tratar de **ácidos graxos** livres ou do **acilglicerol** com porções de ácidos graxos. Com base nesta propriedade comum, a espécie *Pterandra pyroidea* se tornou um exemplo interessante, pois esta espécie secreta apenas ácidos graxos com dissustituição 5,7-, nos elaióforos, em que as recompensas florais são do tipo C, o que significa que não há substituinte na posição β . Assim, a falta de substituição na posição β é uma característica química que pode ter levado a uma alteração no padrão de visita dos polinizadores com consequente alteração do mecanismo de polinização desta espécie. Este argumento tem respaldo no trabalho de Genini *et al.*, (2010) onde foi demonstrado que a evolução das espécies na família Malpighiaceae é bem adaptadas aos polinizadores. Portanto, a falta do substituinte β no ácido graxo é favorável a menor frequência de visitas por abelhas coletoras de óleos florais e o aumento de visitas de abelhas coletoras de pólen. Capellari *et al.*, (2011) mostraram que o principal polinizador da espécie *Pterandra pyroidea* é a abelha “*Bumble*”, a qual se alimenta de néctar e pólen, ao invés dos óleos florais. No trabalho relatado foi mostrado que a frequência de visitas de abelhas coletoras de

óleos para a espécie relatada anteriormente é pequena em comparação com outras espécies simpátricas.

Com base nos fatos mencionados e em nossa hipótese quanto à importância do substituinte na posição β , ainda não é certo de que a presença exclusiva do **ácido pterândrico** no óleo floral bruto representa a condição final para que haja modificação do mecanismo de polinização, pois a composição total dos óleos florais (**Tabela 8**) das espécies *Byrsonima coclobifolia*, *Byrsonima laxiflora*, *Byrsonima pachyphylla*, *Byrsonima rígida* e *Byrsonima verbascifolia*, também produzem quantidades comparáveis de **ácidos graxos sem substituição β -** em recompensas florais do tipo D ou em **ácidos graxos com padrão 5,9-diacetóxi**. Do mesmo modo, nos óleos florais das espécies *Banisteriopsis anisandra*, *Banisteriopsis campestris* e *Heteropterys tormentosa*, há também quantidade diminuta de **ácidos pterândricos**. É importante ressaltar a presença de ácidos graxos livres sem qualquer substituição em óleos florais, como naqueles presentes nas famílias Malpighiaceae, Krameriaceae, Orchidaceae, etc., o que sugere que a presença dos **ácidos pterândricos** não corresponde ao único fator responsável pela mudança do sistema de polinização, sendo que serão considerados os óleos florais como um todo em termos da quantidade e da qualidade destes.

Tabela 8. Composição dos óleos florais de várias espécies de Malpighiaceae do Cerrado.

Compostos #	Abundância relativa em cada espécie (%)																																
	BANISTERIOPSIS											BYRSONIMA										HETEROPTERYS											
	<i>B. anisandra</i>	<i>B. laevifolia</i>	<i>B. verticillata</i>	<i>B. latifolia</i>	<i>B. megaphylla</i>	<i>B. Pubipetala</i>	<i>B. campestris</i>	<i>B. malifolia</i>	<i>B. stellaris</i>	<i>B. argyrophylla</i>	<i>B. nummifera</i>	<i>B. schizoptera</i>	<i>By. laxiflora</i>	<i>By. guillemintana</i>	<i>By. verbascifolia</i>	<i>By. rigida</i>	<i>By. basiloba</i>	<i>By. cocculabifolia</i>	<i>By. viminifolia</i>	<i>By. pachyphylla</i>	<i>By. umbellata</i>	<i>H. campstris</i>	<i>H. tomentosa</i>	<i>H. pteropetala</i>	<i>H. nervosa</i>	<i>H. escallonifolia</i>	<i>Peixotoa reculata</i>	<i>Peixotoa goitana</i>	<i>T. jussieumiana</i>	<i>Tetrapterys ambigua</i>	<i>Pterandra pyroidea</i>		
1	69,1	-	70,0	34,0	-	-	38,8	3,4	-	-	-	41,7	-	6,0	-	-	-	-	10,1	-	-	-	-	-	-	-	8,2	-	-	-	-	-	
2	12,3	-	8,0	8,70	-	8,1	2,25	-	-	-	-	23,6	-	1,0	-	1,9	-	-	4,53	-	-	-	-	-	-	-	6,3	-	-	-	-	-	
3	-	45,0	-	-	-	-	-	2,9	65,9	-	8,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	41,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	0,43	-	-	-	-	-	10,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85,8
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,25	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,5	-	2,91	15,7	-	19,5	-	4,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	2,25	-	-	-	-	5,7	-	7,88	-	-	10,8	-	3,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	1,5	1,92	-	-	11,1	-	-	-	6,6	-	9,90	11,0	-	2,11	0,85	5,87	-	-	-	-	2,5	-	-	12,3	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,6	5,1	7,26	10,0	-	16,8	9,06	13,1	-	-	-	-	-	-	-	30,0	-	-	-	-	-	
11	10,1	-	4,0	13,1	15,2	-	-	16,5	-	-	-	18,6	5,6	-	21,3	8,9	49,6	0,75	0,87	-	-	9,78	-	-	68,4	31,0	3,1	25,3	4,7	10,8	-	-	
12	3,87	-	-	-	6,38	-	-	7,9	0,55	-	-	14,5	39,4	29,6	7,88	31,2	6,8	20,9	49,8	31,4	-	37,4	6,8	-	22,1	33,9	-	-	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	2,21	-	-	-	7,68	-	-	-	-	-	0,77	-	-	-	-	0,46	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9	-	-	-	-	-	-	-
15	-	2,55	-	-	-	-	-	1,35	12,8	23,7	-	-	-	-	-	-	0,72	-	-	45,2	-	-	-	-	-	-	6,4	-	-	-	-	-	
16	0,42	-	1,8	1,5	-	-	4,55	-	4,9	1,63	9,8	-	2,25	10,8	1,57	14,0	2,2	0,90	18,7	-	2,05	8,02	-	-	1,6	8,3	-	-	7,7	10,9	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	18,1	12,9	-	-	-	-	-	-	-	11,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	1,78	-	-	-	-	-	-	1,37	5,63	6,98	-	-	-	-	-	0,74	-	-	8,24	-	-	-	-	-	-	-	3,4	-	-	-	-	-
19	-	2,07	-	-	-	-	-	-	1,44	5,86	7,96	-	-	-	-	-	0,87	-	-	7,38	-	-	-	-	-	-	-	3,8	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,9	-	2,4	22,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	0,59	-	-	-	27,7	-	-	0,62	31,6	13,1	-	-	-	9,27	-	-	0,21	-	12,1	7,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,91	-	-	-	-	-	-
23	-	3,23	-	-	-	-	-	-	8,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-

Continuação da Tabela 8

Compostos #	Abundância relativa em cada espécie (%)																															
	BANISTERIOPSIS											BYRSONIMA							HETEROPTERYS													
	<i>B. anisandra</i>	<i>B. laevifolia</i>	<i>B. variabilis</i>	<i>B. latifolia</i>	<i>B. megaphylla</i>	<i>B. pubipetala</i>	<i>B. campestris</i>	<i>B. malifolia</i>	<i>B. stellaris</i>	<i>B. argyrophylla</i>	<i>B. nummifera</i>	<i>B. schizoptera</i>	<i>By. laxiflora</i>	<i>By. guilleminiana</i>	<i>By. verbascifolia</i>	<i>By. rigida</i>	<i>By. basiloba</i>	<i>By. cocculabifolia</i>	<i>By. viminifolia</i>	<i>By. pachyphylla</i>	<i>By. umbellata</i>	<i>H. campstris</i>	<i>H. tomentosa</i>	<i>H. pteropetala</i>	<i>H. nervosa</i>	<i>H. escallonifolia</i>	<i>Peixotoa reculata</i>	<i>Peixotoa goiana</i>	<i>T. jussieuniana</i>	<i>Tetrapterys ambigua</i>	<i>Pterandra pyroidea</i>	
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,7	-	30,3	9,2	-	
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,8	-	7,7	14,1	-	
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	14,1	-	
28	-	-	-	-	-	-	12,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,1	-	9,9	4,2	-	
29	-	-	-	-	-	7,66	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60	-	-	-	-	-	0,9	-	-	2,4	-	-	-	-	0,85	
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
35	-	-	-	-	-	1,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,89	
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
38	-	-	-	-	-	6,52	-	26,0	-	17,6	15,5	-	-	-	-	-	-	-	-	5,51	16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
39	-	-	-	0,9	0,4	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	
40	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-	-	
41	-	-	-	39,0	46,4	-	-	-	-	-	-	-	-	27,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,6	-	-	-	-	
42	-	-	-	-	1,4	0,1	-	3,1	-	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	3,4	1,9	83,2	-	2,3	-	-	-	-	10,5	-	
43	-	-	-	0,8	1,35	0,8	-	1,6	-	0,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,1	2,6	2,0	-	1,8	-	-	-	-	6,8	-	
44	-	-	-	-	-	6,9	-	0,9	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	1,2	-	-	-	-	1,8	-
45	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
46	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,9	-	-	-	-	18,8	-	-	2,4	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9	-	-	
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,8	-
49	-	-	-	-	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6	-	-

3.3. Análise química dos óleos florais de Krameriaceae

Para se estudar a química relacionada com a ecologia da família Krameriaceae e de seus polinizadores, 47 amostras pertencentes a esta família coletadas no Brasil foram analisadas por CG/IE-EM (**Tabela 19**). Estes óleos fazem parte da coleção de amostras da Prof^a. Simpson B.B. e já haviam sido estudados anteriormente, entretanto havia dúvidas sobre as identificações dos compostos. Assim, os óleos conservados em clorofórmio e metanol durante 30 anos foram então enviados dos Estados Unidos para uma nova análise. Os óleos florais se encontravam parcialmente metilados/etilados (**Figura 40**), devido ao grande período de armazenamento numa solução de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (6:1) (Seigler *et al.*, 1978; Pianaro 2007).

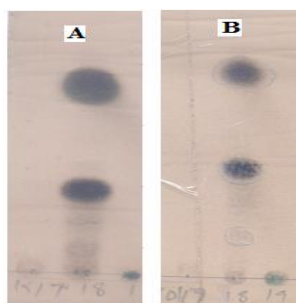


Figura 40. Padrão de TLC para os óleos florais do vegetal da família Krameriaceae (A) antes da adição do diazometano; (B) após a adição de diazometano.

A rota de fragmentação das massas associadas aos óleos florais de plantas da família Krameriaceae sugere que estes óleos florais são compostos principalmente por ácidos graxos livres (provado anteriormente através da análise dos óleos armazenados somente em clorofórmio) com somente um resíduo acetóxila ou hidróxido na posição β (**Figura 41**). Os ácidos graxos florais metilados apresentam

um pico intenso de m/z 74, enquanto que os ácidos graxos florais etilados apresentam um pico de m/z 88. Além disso, os ácidos graxos florais metilados foram também reconhecidos por meio da perda do grupo metóxido ou de metanol a partir do íon molecular, enquanto que os ácidos graxos etilados perdem de moléculas de etóxido ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (**Figura 42; Tabelas 9 e 10**).

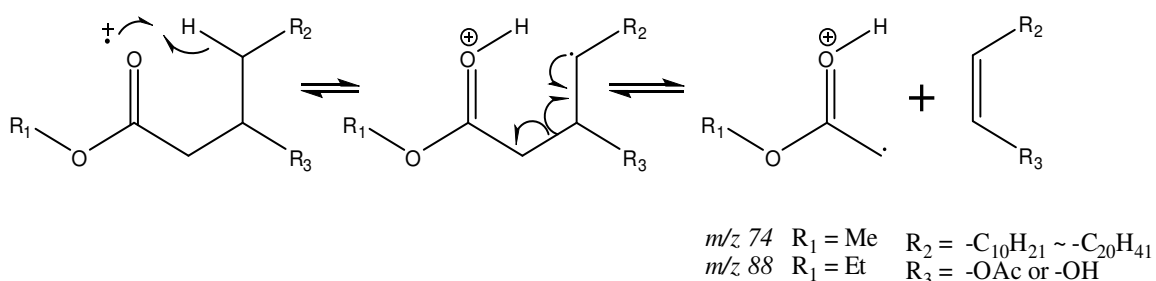


Figura 41. Rearranjos de McLafferty que representam a metilação ou a etilação (modificação) dos ácidos graxos florais presentes no óleo floral de indivíduos da família Krameriaceae.

A natureza do grupo ligado aos ácidos florais modificados (metilados/etilados) para espécies da família Krameriaceae também pode ser prevista com base na rota de fragmentação (**Figuras 42 a 45**). Todos ácidos graxos modificados que apresentam o substituinte acetóxido possuem um pico base de m/z 43 no espectro de massas. Enquanto o espectro de massas do ácido graxo hidroxilado não contém um pico de m/z 43, mas apresenta um pico base de m/z 103 para o caso do óleo metilado, e m/z 117 para o caso do óleo etilado (**Figura 44**). Juntamente com isso, os ácidos graxos florais acetoxilados são facilmente reconhecidos por meio da perda do radical acetila a partir do íon molecular, ou molécula de ácido acético a partir da espécie M^+ (**Figura 42; Tabela 9**), enquanto que os ácidos graxos florais hidroxilados estão associados simplesmente com a perda de molécula de água a partir do íon parental (**Tabela 10**).

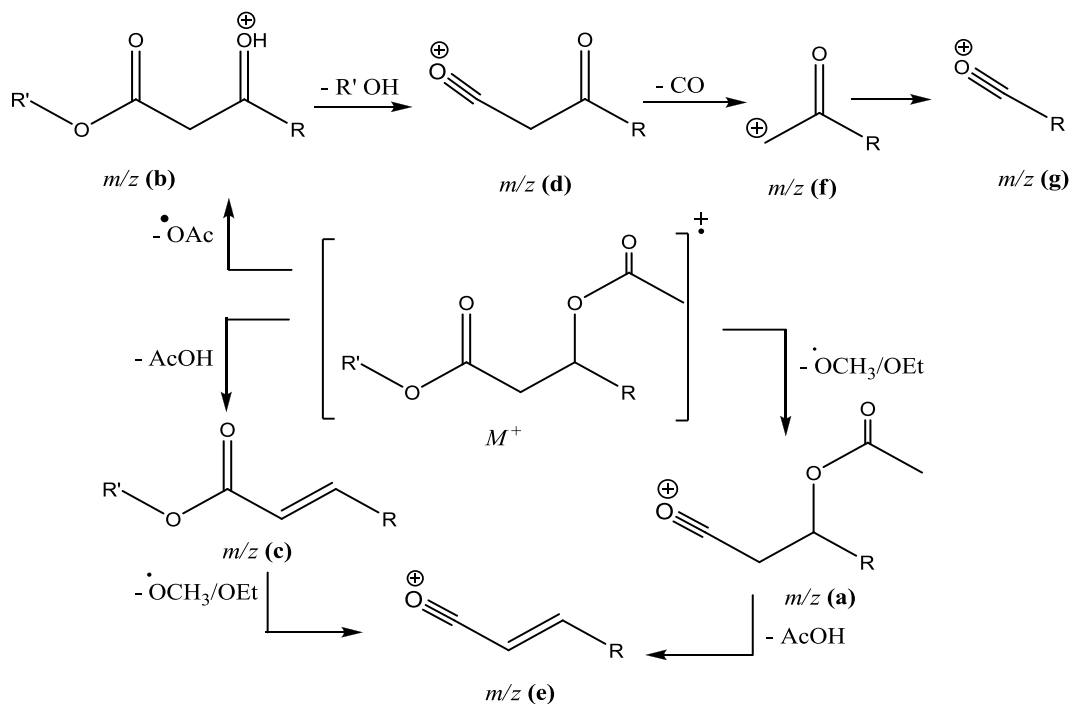


Figura 42. Rota de fragmentação para ésteres metílicos e etílicos dos ácidos graxos substituído com o grupo 3-acetóxila, associado com valores de m/z de diferentes picos (como M^+ , a, b, c, d, e, f, e g etc.) nos espectros de massas (vide Tabela 9).

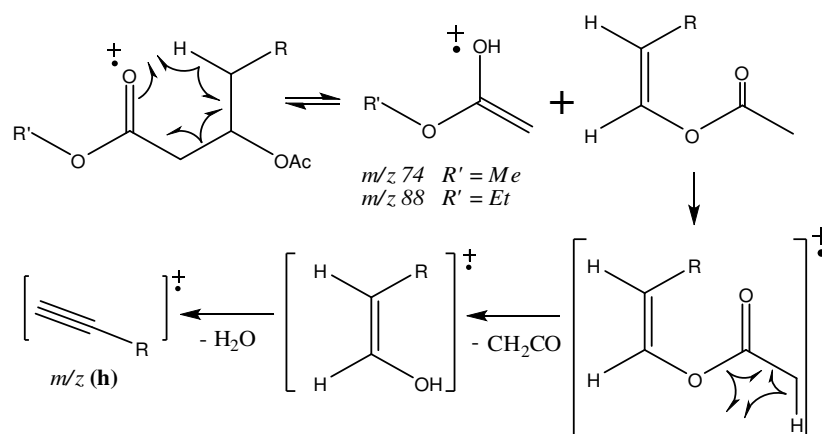


Figura 43. Rota de fragmentação de massas para ésteres metílicos e etílicos dos ácidos graxos substituído com o grupo 3-acetóxila; para valores de R, R'; para o valor do pico h, consultar a Tabela 9.

O íon molecular não foi determinado para a maioria dos ácidos graxos florais, como é evidente a partir da **Tabela 9**, mas o tamanho da cadeia de carbonos desses ácidos graxos 3-acetilados foi previsto com base na rota de fragmentação (**Figuras: 42, 43 e Tabela 9**). Além disso, todos esses compostos são conhecidos e seus espectros de massas coincidem exatamente com os disponíveis na literatura ([Seigler *et al.*, 1978](#); [Pianaro 2007](#)).

Tabela 9. Fragmentos característicos dos ésteres metílicos e etílicos dos ácidos graxos contendo o grupo 3-acetóxi

C#	R'	R	M ⁺	m/z a	m/z b	m/z c	m/z d	m/z e	m/z f	m/z g	m/z h
1	Me	C ₁₀ H ₂₁	300 n.d.	269 (0,1)	257 (21)	240 (8)	225 (1)	209 (20)	197 (2)	183 (17)	166 (20)
2	Me	C ₁₁ H ₂₃	314 n.d.	283 (0,1)	271(14)	254 (6)	239 (1)	223 (14)	211 (1)	197 (11)	180 (14)
3	Me	C ₁₂ H ₂₅	328 n.d.	297 (1)	285 (36)	268 (20)	253 (1)	237 (37)	225 (3)	211 (25)	194 (32)
4	Me	C ₁₃ H ₂₇	342 n.d.	311 (0,1)	299 (21)	282 (13)	267 (1)	251 (22)	239 (2)	225 (14)	208 (20)
5	Me	C ₁₄ H ₂₉	356 n.d.	325 (1)	313 (39)	296 (33)	281 (12)	265 (46)	253 (4)	239 (24)	222 (36)
6	Me	C ₁₅ H ₃₁	370 n.d.	339 (0,1)	327 (15)	310 (16)	295(0.1)	279 (20)	267 (2)	253 (8)	236 (17)
7	Me	C ₁₆ H ₃₃	384 n.d.	353 (0,1)	341 (14)	324 (17)	309(0.1)	293 (20)	281(2)	267 (7)	250 (16)
8	Me	C ₁₇ H ₃₅	398 n.d.	367 n.d.	355 (13)	338 (21)	323 n.d.	307 (21)	295 (2)	281 (7)	264 (16)
9	Me	C ₁₈ H ₃₇	412 n.d.	381 n.d.	369 (14)	352 (24)	337 (1)	321 (20)	309 (2)	295 (5)	278 (17)
10	Et	C ₁₀ H ₂₁	314 n.d.	269 n.d.	271 (23)	254 (9)	225 (4)	209 (33)	197 (1)	183 (18)	166 (26)
11	Et	C ₁₁ H ₂₃	328 n.d.	283 (2)	285 (25)	268 (10)	239 (4)	223 (32)	211n.d.	197 (16)	180 (21)
12	Et	C ₁₂ H ₂₅	342 n.d.	297 (2)	299 (27)	282 (15)	253 (4)	237 (43)	225 (1)	211 (17)	194 (25)
13	Et	C ₁₃ H ₂₇	356 n.d.	311(1)	313 (20)	296 (15)	267 (3)	251 (35)	239 (1)	225 (13)	208 (22)
14	Et	C ₁₄ H ₂₉	370 n.d.	325 (1)	327 (19)	310 (16)	281 (3)	265 (32)	253 (1)	239 (10)	222 (20)
15	Et	C ₁₅ H ₃₁	384 n.d.	339 (1)	341 (18)	324 (17)	295 (4)	279 (32)	267n.d.	253 (9)	236 (19)
16	Et	C ₁₆ H ₃₃	398 n.d.	353 (1)	355 (17)	338 (19)	309 (3)	293 (34)	281 (4)	267 (8)	250 (19)
17	Et	C ₁₇ H ₃₅	412 n.d.	367 (2)	369 (16)	352 (23)	323 (7)	307 (14)	295 (2)	281 (9)	264 (21)

Observações: C# número do composto; os números de dígitos em parênteses representam às intensidades dos picos correspondentes, enquanto que n.d. significa: “pico não detectado”

De forma análoga, a posição do grupo -OH e o comprimento da cadeia de carbonos dos ácidos graxos florais hidroxilados também foram previstos com base na rota de fragmentação. As presenças de picos base cujos valores de m/z são iguais 103 ou 117 indicam que um padrão de substituição com o grupo 3-hidróxido (**Figura 44**), enquanto que os picos (i) e (j) demonstram o comprimento da cadeia de carbonos dos ácidos graxos (**Figura 45**).

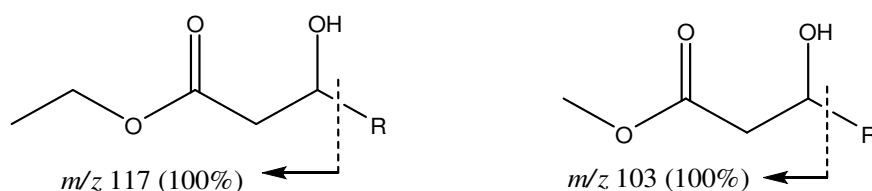


Figura 44. Rota de fragmentação geral para ésteres metílicos e etílicos dos ácidos graxos 3-hidróxi-alcanóicos.

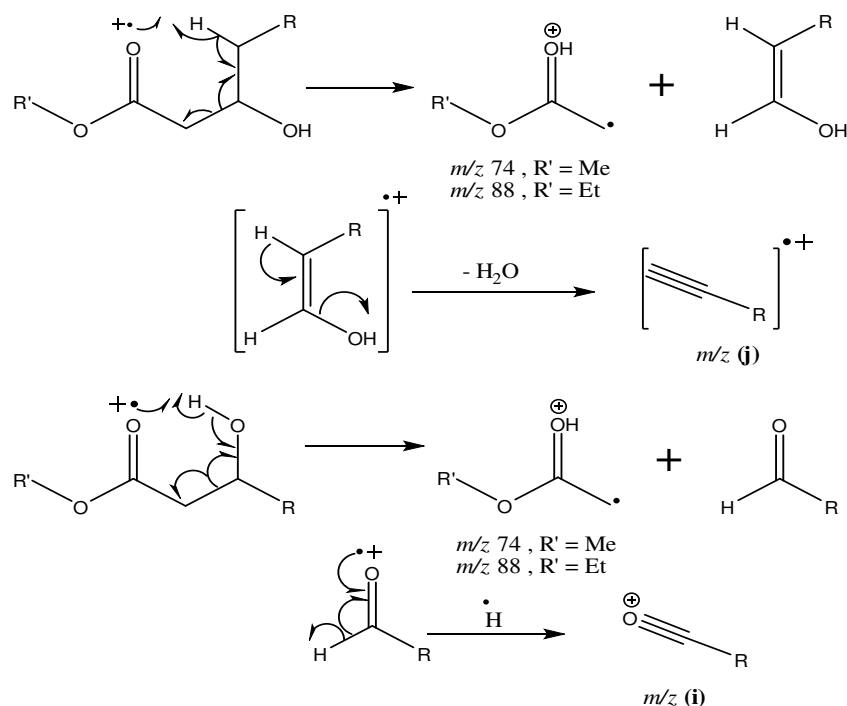


Figura 45. Rota de fragmentação de massas para ésteres metílicos e etílicos dos ácidos 3-hidroxi-alcanóicos, para valores de m/z de diferentes picos (M+, i e j, etc.); no espectro de massas, consultar a Tabela 10.

Tabela 10. Fragmentos característicos dos ésteres metílicos e etílicos dos ácidos graxos 3-hidroxi-alcanóicos.

C#	R'	R	M^+	M^+-1	M^+-H_2O	M^+-OMe/OEt	$M^+-MeOH/EtOH$	$M^+-MeOH/EtOH+H_2O$	m/z (i)	m/z (j)
1	Me	C ₁₀ H ₂₁	258 n.d.	257 (0,1)	240 (1)	227 (0,1)	226 (0,1)	208 (2)	169 (0.1)	166 (4)
2	Me	C ₁₁ H ₂₃	272 (0,1)	271 (0,1)	254 (1)	241 (0,1)	240 (1)	222 (3)	183 (3)	180 (4)
3	Me	C ₁₂ H ₂₅	286 (0,1)	285 (0,1)	268 (1)	255 (0,1)	254 (0,1)	236 (4)	197 (0,1)	194 (4)
4	Me	C ₁₃ H ₂₇	300 (0,1)	299 (0,1)	282 (1)	269 (0,1)	268 n.d.	250 (4)	211(0,1)	208 (4)
5	Me	C ₁₄ H ₂₉	314 (0,1)	313 (0,1)	296 (1)	283 (0,1)	282 (0,1)	264 (5)	225 (0,1)	222 (4)
6	Me	C ₁₅ H ₃₁	328 n.d.	327 (0,1)	310 (2)	297 (0,1)	296 n.d.	278 (5)	239 (4)	236 (3)
7	Me	C ₁₆ H ₃₃	342 n.d.	341 (0,1)	324 (2)	311 n.d	310 n.d.	292 (8)	253 n.d.	250 (3)
8	Me	C ₁₇ H ₃₅	356 n.d.	355 n.d.	338 (3)	325 n.d	324 (1)	306 (8)	267 (2)	264 (6)
9	Me	C ₁₈ H ₃₇	370 n.d.	369 n.d.	352 (2)	339 (1)	338 n.d.	320 (7)	281 (2)	278 (3)
10	Et	C ₉ H ₁₉	258 n.d.	257 (0,1)	240 (4)	213 (3)	212 (2)	194 (10)	169 (1)	152 (4)
11	Et	C ₁₀ H ₂₁	272 (0,1)	271 (0,1)	254 (1)	227 (2)	226 (0,1)	208 (3)	183 (4)	166 (4)
23	Et	C ₁₁ H ₂₃	286 (1)	285 (2)	268 (1)	241 (0,1)	240 n.d.	222 (3)	197 (3)	180 (3)
13	Et	C ₁₂ H ₂₅	300 (1)	299 (2)	282 (0,1)	255 (0,1)	254 n.d.	236 (4)	211 (4)	194 (3)
14	Et	C ₁₃ H ₂₇	314 (0,1)	313 (0,2)	296 (1)	269 (0,1)	268 (0,1)	250 (4)	225 (2)	208 (3)
15	Et	C ₁₄ H ₂₉	328 (0,1)	327 (0,1)	310 (1,5)	283 (0,1)	282 n.d.	264 (5)	239 (2)	222 (6)
16	Et	C ₁₅ H ₃₁	342 n.d.	341 (0,1)	324 (2)	297 (1)	296 (1)	278 (6)	253 (1)	236 (6)
17	Et	C ₁₆ H ₃₃	356 n.d.	355 (0,1)	338 (1)	311 (0,1)	310 n.d.	292 (4)	267 (2)	250 (4)
18	Et	C ₁₇ H ₃₅	370 (0,1)	369 (1)	352 (1)	325 (0,1)	324 n.d.	306 (7)	281 (0.1)	264 (4)
19	Et	C ₁₈ H ₃₇	384 n.d.	383 (1)	366 (4)	339 (1)	338 (2)	320 (10)	295 (7)	278 (8)

Observações: C# número do composto; os números de dígitos em parênteses representam às intensidades dos picos correspondentes, enquanto que n.d. significa: “pico não detectado”

Para que a identificação espectrométrica fosse mais precisa e confiável, o composto principal (**77**, **Tabela 12**) foi purificado por cromatografia em sílica gel e denominado de padrão isolado, cuja massa molecular exata foi determinada por ESI-EM. Também foram empregadas as técnicas de RMN de ^1H , 1D e 2D e RMN de ^{13}C (HSQC e HMBC), para determinação estrutural completa (**Figura 46**, **Tabela 11** e **Anexo 3**). Além disso, o espectro de massas obtido com ESI-LTQ Orbitrap sugere um valor de massa molecular igual a 301,2699 para o composto isolado, calculado para um íon quase molecular $[\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{O}_3]^+$. Além disso, os dados espectrais do ácido graxo com o substituinte 3-hidróxido também foram comparados com os disponíveis na literatura ([Seigler et al., 1978](#)).

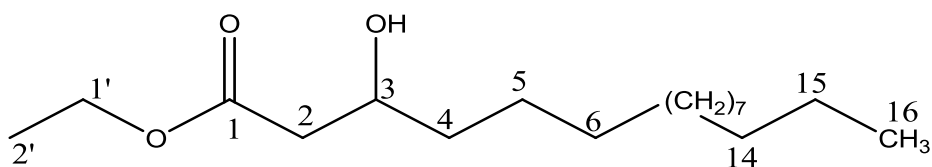


Figura 46. Fórmula estrutural do representante de ácidos graxos modificados dos óleos florais da Krameriaceae.

Além dos ácidos graxos β -substituídos, também estavam presentes outros compostos secundários nos óleos florais da família Krameriaceae, sendo que seus espectros de massas coincidem quase completamente (81 a 99%) com os compostos correspondentes, presentes na base de dados espectrais “*Wiley Spectral 275L*”. Foram identificados em óleos florais de espécies da família Krameriaceae, um total de 76 compostos.

Tabela 11. Dados de 1D e 2D de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (HSQC, HMBC) para o representante de ácidos graxos modificado dos óleos florais da Krameriaceae.

C#	HSQC		HMBC
	δ_{C}	δ_{H} (mult)	
1'	14,0	1,29 (t, 3H)	C1 e C2'
2'	61,0	4,20 (q, 2H)	
1	173,0	-	
2	42,0	2,40 (dd, 1H)	C1 e C3
		2,52 (dd, 1H)	
3	68,0	4,01 (m, 1H)	OH
4	37,4	1,45 (m, 1H)	C5, C6 e OH
		1,55 (m, 1H)	
5	25,7	1,25 (m)	
6 ~ 13	29,3 ~ 29,7	1,25 (m)	
14	32,0	1,25 (m)	
15	22,6	1,25 (m)	
16	14,0	0,88 (t, 3H)	C15 e C14

Além dos compostos que foram mencionados acima (**Tabelas 9 e 10**), foram detectados compostos minoritários (**Tabela 12**), cujos espectros de massas apresentaram uma semelhança entre 81 e 99% em relação aos espectros de referência disponíveis na biblioteca espectral Wiley 275.L. Independentemente da metilação ou etilação. Portanto, foram detectados 76 compostos nos óleos de vegetais da família Krameriaceae.

Tabela 12. Componente do óleo floral da família Krameriaceae.

C#	T _R	% Coincidência no MSL*	Nome dos compostos	MMS**
52.	8,098	99	Tetradecanoato de metila	-
53.	8,284	99	Hexaclorobenzeno	-
54.	9,412	99	Ácido tetradecanóico	-
55.	10,043	96	Pentadecanoato de metila	-
56.	10,340	-	3-hidroxi-tridecanoate de etila	258
57.	10,429	86	3-Metoxi-tetradecanoato de metila	-
58.	11,030	-	3-Hidroxi-tetradecanoato de metila	258
59.	11,601	96	<i>n</i> -Nonadecano	-
60.	12,136	98	Metilexadecanoato	-
61.	12,484	-	3-Hidroxi-tetradecanoato de etila	272
62.	13,182	-	3-Hidroxi-pentadecanoato de metila	272
63.	13,185	-	3-Acetóxi-tetradecanoato de metila	300
64.	13,612	98	Hexadecanoato de etila	-
65.	13,743	94	14-Etilexadecanoato de metila	-
66.	14,310	98	15-metilexadecanoato de metila	-
67.	14,351	96	Heptadecanoato de metila	-
68.	14,584	-	3-Acetóxi-tetradecanoato de etila	314
69.	14,681	-	3-Hidróxi-pentadecanoato de etila	286
70.	15,338	-	3-Acetóxi-pentadecanoato de metila	314
71.	15,468	-	Hexadecanoato de metila	286
72.	15,824	99	8,11-Octadecadienoato de metila	-
73.	15,965	99	9,12,15- linolenato de metila	-
74.	16,499	99	Octadecanoato de metila	-
75.	16,540	99	16-Metileptadecanoato de metila	-

76.	16,724	-	3-Acetóxi-pentadecanoato de etila	328
77.	16,915	-	3-Hidróxi-hexadecanoato de etila	300
78.	17,011	-	3-Hidróxi-heptadecanoato de metila	300
79.	17,271	99	Linoleato de etila	-
80.	17,560	-	3-Acetóxi-hexadecanoato de metila	328
81.	17,672	-	3-Hidróxi-heptadecanoato de metila	300
82.	18,458	-	3-Hidróxi-heptadecanoato de etila	314
83.	18,674	94	Nanododecanoato de metil	-
84.	18,874	-	3-Acetóxi-hexadecanoato de etila	342
85.	19,067	-	3-Hidróxi-heptadecanoato de etila	314
86.	19,646	-	3-Acetóxi-heptadecanoato de metila	342
87.	19,816	-	3-Hidroxi-octadecanoato de metila	314
88.	20,202	97	<i>n</i> -Tricosano	-
89.	20,796	99	Eicosanoato de metila	-
90.	20,944	-	3-Acetóxi-heptadecanoato de etila	356
91.	21,197	-	3-Hidróxi-octadecanoato de etila	328
92.	21,731	-	3-Acetóxi-octadecanoato de metila	356
93.	21,924	-	3-Hidroxi-nonadecanoato de metila	328
94.	22,169	81	Eicosanoato de etila	-
95.	22,273	97	<i>n</i> -tetracosano	-
96.	22,473	-	DESCONHECIDO	-
97.	22,711	-	3-Hidroxi-nonadecanoato de metila	342
98.	22,852	99	Heneicosanoato de metila	-
99.	22,978	-	3-Acetóxi-octadecanoato de etila	370
100.	23,720	-	3-Acetóxi-nonadecanoato de metila	370
101.	23,965	-	3-hidróxi-eicosanoato de metila	342
102.	24,269	97	<i>n</i> -pentacosano	-

103.	24,744	-	DESCONHECIDO	-
104.	24,855	99	Docosanoato de metila	-
105.	24,944	-	3-Acetóxi-nonadecanoato de etila	384
106.	25,263	-	3-Hidroxi-eicosanoato de metila	356
107.	25,679	-	3-Acetóxi-eicosanoato de metila	384
108.	25,961	-	DESCONHECIDO	-
109.	26,132	-	DESCONHECIDO	-
110.	26,213	-	DESCONHECIDO	-
111.	26,314	96	Tricosanoato de metila	-
112.	26,429	-	DESCONHECIDO	-
113.	26,696	-	3-Hidroxi-henicosanoato de etila	370
114.	26,859	-	3-Acetóxi-eicosanoatode etila	398
115.	27,571	-	3-Acetóxi-henicosanoato de metila	398
116.	28,089	98	n-Heptacosano	-
117.	28,217	-	3-acetóxi-henicosanoato de etila	412
118.	28,685	95	Tetracosanoato de metila	-
119.	29,100	-	3-Hidroxi-tricosanoato de etila	398
120.	29,412	-	3-acetóxi-tricosanoato de metila	412
121.	29,879	-	DESCONHECIDO	-
122.	30,132	94	Pentacosanoato de metila	-
123.	30,495	-	3-Acetóxi-docosanoato de etila	426
124.	31,193	-	3-Acetóxi-tricosanato de metila	426
125.	32,239	98	Hexacosanoato de metila	-
126.	32,929	-	3-Acetóxi-tetracosanoato de metila	440
127.	33,936	-	DESCONHECIDO	-

C# = Número do composto; T_R = tempo de retenção, * Base de espectrais Wiley 275.L, . ** Massa molecular suposta;

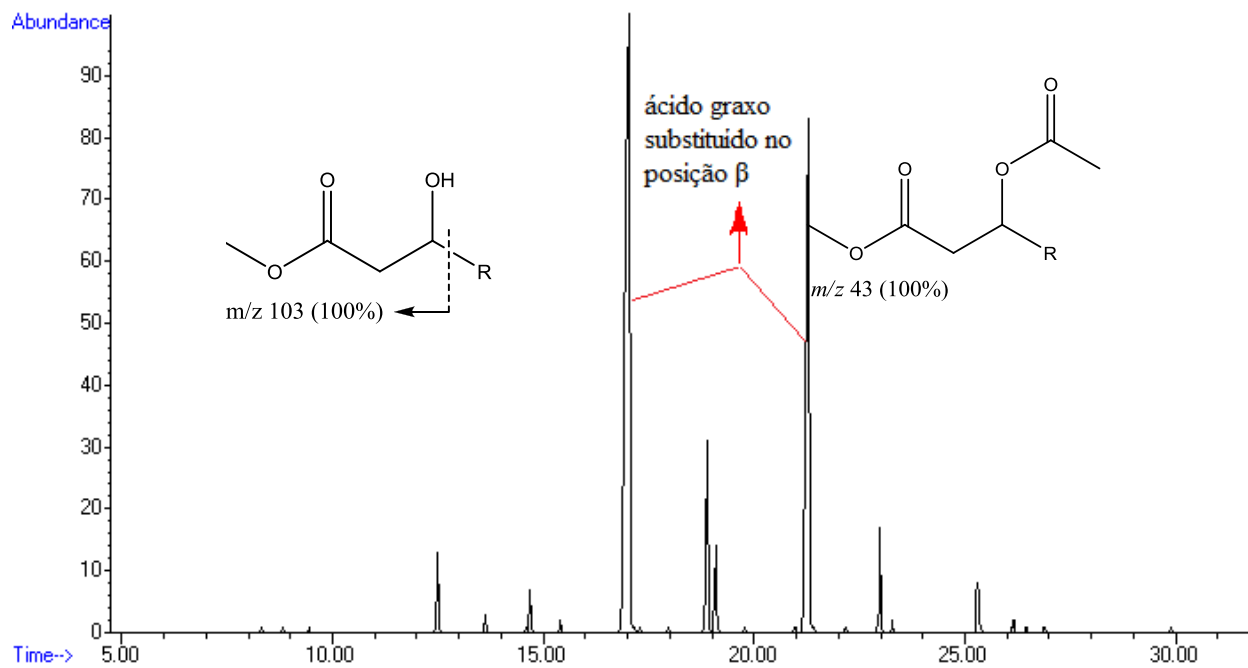
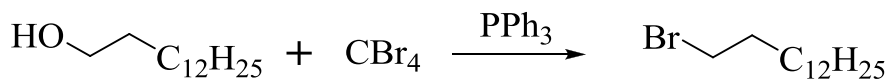


Figura 47. Cromatograma representativo do óleo floral bruto obtido por varredura de íons totais e Krameriaceae mostrando a prevalência da substituição β .

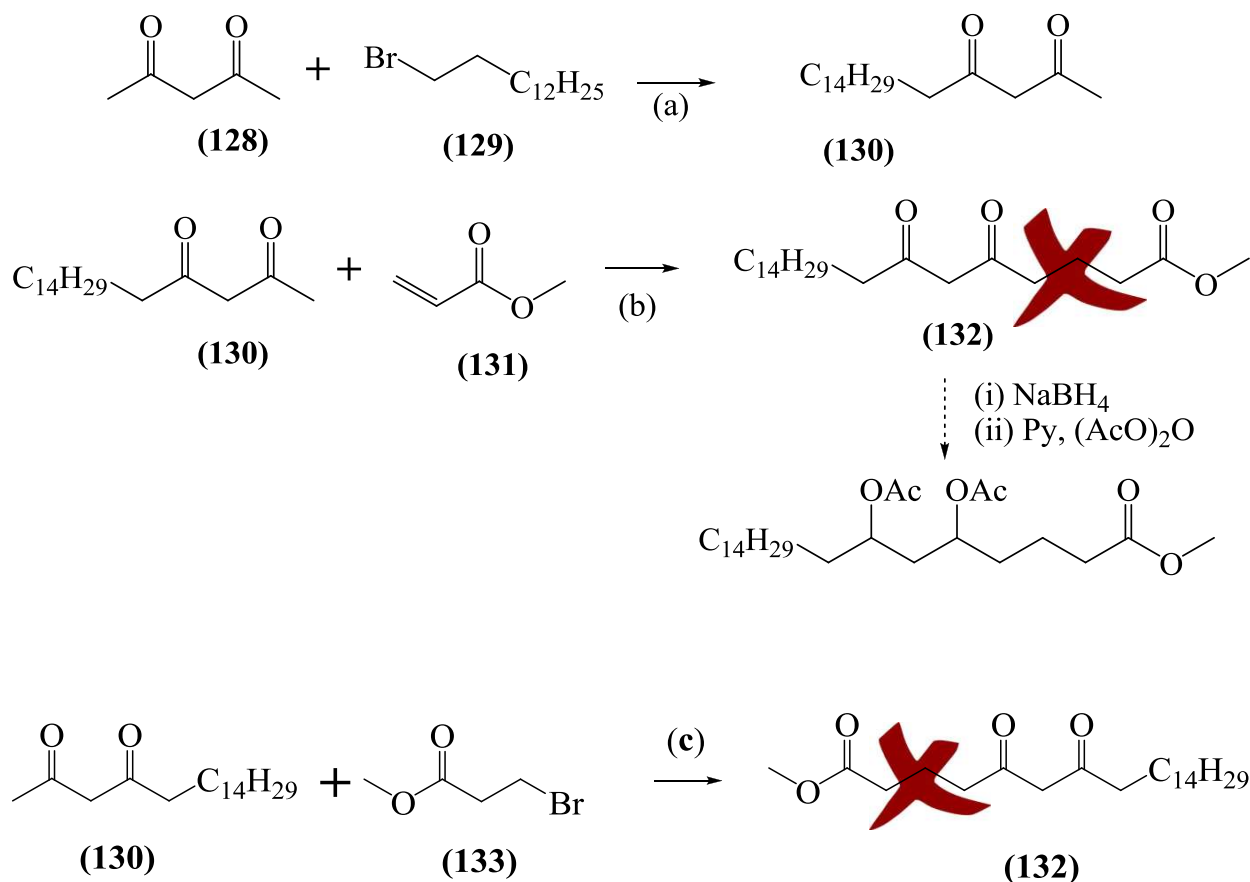
3.4. Síntese do ácido pterândrico

As análises espectroscópicas dos óleos florais de *Pt. pyroidea* revelaram, a presença de um ácido graxo majoritário, o **ácido pterândrico**. Para determinar a estereoquímica relativa do **ácido pterândrico** foi realizada a síntese deste novo ácido graxo através da rota sintética representada no **Esquema 1**. O composto (**128**) é comercial e composto (**129**) foi preparado pela reação de **1-tetradecanol** ($C_{14}H_{30}O$) com **tetrabrometo de carbono** (CBr_4) na presença de **trifenilfosfina** (PPh_3) (Hayashi *et al.*, 1973). Em seguida, a **acetilacetona** (**128**) foi tratada com **bromotetradecano** (**129**) na presença da **hidreto de sódio** (NaH) e ***n*-butil lítio** ($BuLi$) para se obter o composto (**130**) com 67% de rendimento (Chen *et al.*, 2010, MacConnell *et al.*, 1971).



Esquema 1. Síntese do **bromotetradecano** (**129**)

Para obter o composto (**132**) o composto (**130**) foi primeiramente tratado com **acrilato de metila** (**131**) na presença de NaH e dois equivalentes de $BuLi$. Porém, a reação não funcionou. Em seguida, o composto (**130**) foi tratado com **acrilato de metila** (**131**) na presença de *tert*-butóxido de potássio (Me_3COK), mas novamente o produto (**132**) não foi obtido. Portanto, composto (**130**) foi tratado com **3-metil-bromopropanoato** (**133**) e a reação foi testada na presença de diferentes bases (como NaH , $BuLi$ e Me_3COK), mas infelizmente a cada etapa os apenas reagentes foram encontrados nas análises (**Esquema 2**) (Pearson *et al.*, 1974). Portanto, este esquema de síntese foi abandonado.

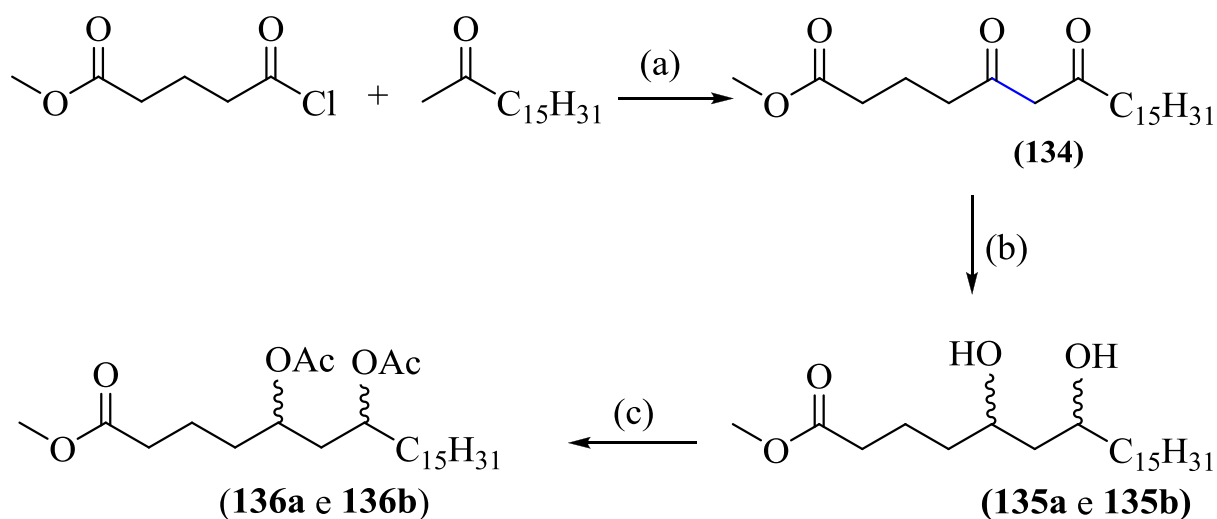


Esquema 2. Rota sintética para o ácido pterândrico (a). 1-NaH, 2-BuLi em THF, -78°C , 2h (67% após a purificação), (b) 1- NaH, 2-BuLi em THF, -78°C , (c). BuLi, NaH, THF, -78°C

No primeiro **Esquema 2** a segunda etapa não funcionou. No entanto, outro esquema foi sugerido (**Esquema 3**). Durante esta síntese, o acoplamento do enolato com o cloreto de acila foi crucial, correspondendo ao primeiro passo. Esta etapa envolve uma reação de tipo da condensação de Claisen, em que há tratamento da metil-acetona (**2-heptadecanona**, comercial) com cloreto de acila (**5-cloro-5-oxovalerato**, comercial) na presença de **di-isopropilamideto de lítio (LDA)**.

Primeiramente, o **LDA** foi preparado *in situ*, utilizando-se **di-isopropilamina (DIPA)** e **BuLi**, sob atmosfera inerte, em seguida, no mesmo

balão, o enolato cinético foi preparado por meio da injeção lenta de **2-heptadecanona**, a -78°C , gota a gota, sob agitação lenta. Após a adição completa da **2-heptadecanona**, a agitação continuou por mais 40 minutos, sendo que a temperatura foi aumentada para -15°C . Nesta etapa, o cloreto de acila (**5-cloro-5-oxovalerato**) foi adicionado abruptamente. Uma vez que este primeiro passo foi mais importante, o produto (**134**) desta etapa foi purificado através de coluna cromatográfica de sílica gel e completamente caracterizado usando CG/EI-EM e técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C .



Esquema 3. Rota sintética para o ácido pterândrico. (a) LDA, THF, -78°C , 2h (37%, após a purificação), (b) NaBH_4 , CH_3OH , agitação por 20 min, 78% (c) piridina, anidrido acético, agitação por 24h, 90%.

O espectro de massa de 134 mostrou um pico de íon molecular (M^{\dagger}) para m/z 382, juntamente com outras características de picos m/z 351; 281; 239; 186; 171; 154; 139; 129; 113 e 101, etc. (**Figura 48**).

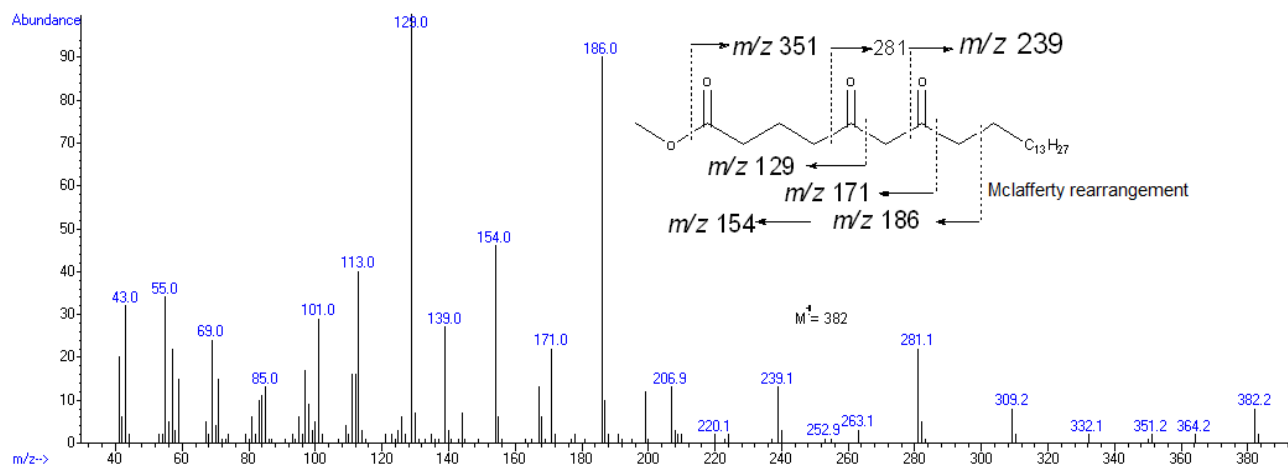


Figura 48. Os espectros de massa de metil 5,7-dioxodocosanoate (**134**).

Do mesmo modo, o espectro de RMN de ^1H mostrou um singlete enólico característica em 5,48 ppm, juntamente com um singlete menos intenso em 3,55 ppm, para prótons metilênicos entre dois átomos de carbono cetônicos, 2H ligado a C-6 do **134** (**Figura 49**). O mesmo átomo de carbono (C-6) foi proeminente no espectro de RMN de ^{13}C em 99,20 ppm em conjunto com um sinal menos intenso em 57,03 ppm para as formas enol e ceto, respectivamente (**Figura 50**). Além disso, a diferença de intensidade nos espectros (RMN de ^1H e ^{13}C) mostra que mais de 80% do composto está na forma enólica.

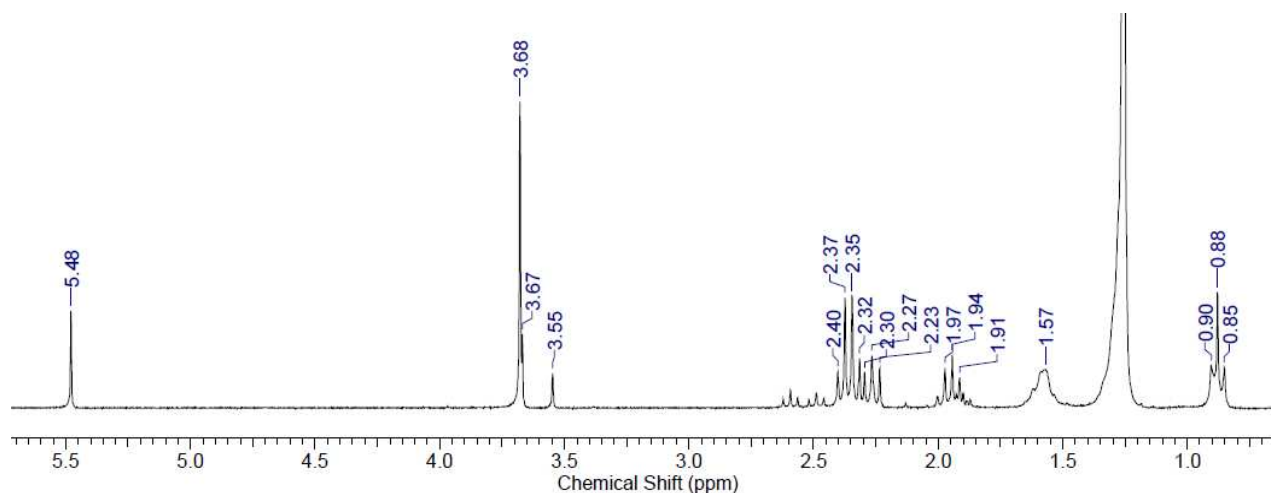


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do metil 5,7-dioxodocosanoato.

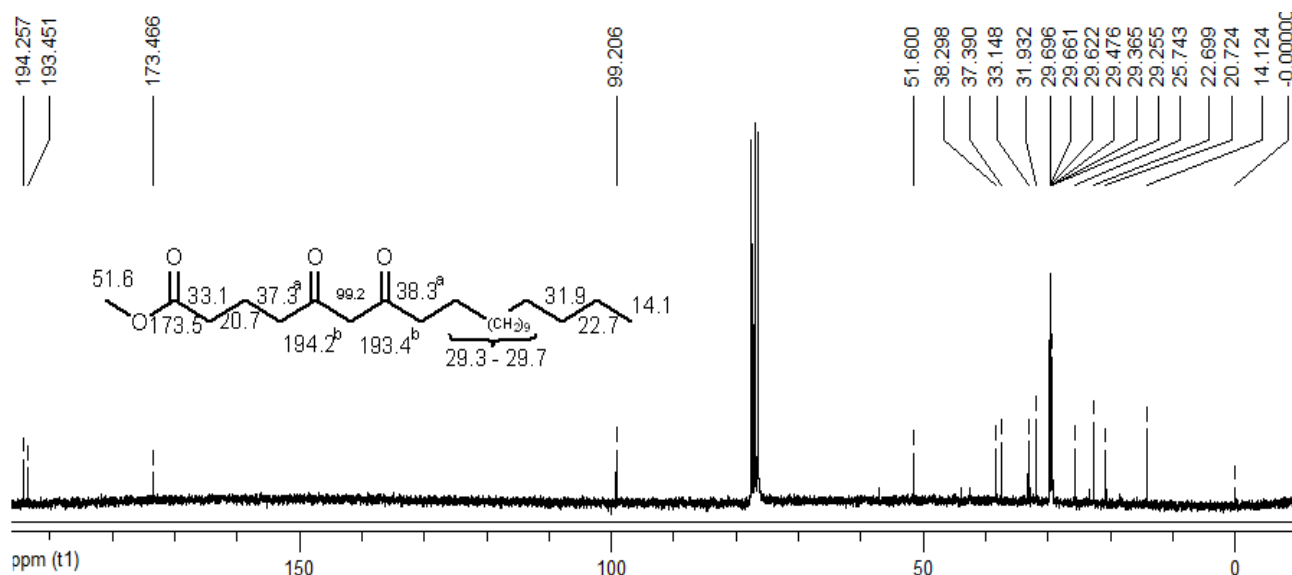


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) do metil 5,7-dioxodocosanoato.

Na segunda etapa, o grupo funcional de 1,3-dicetônico, presente no produto (**134**), foi reduzido ao álcool numa reação não estereosseletiva, empregando-se o NaBH_4 como agente redutor. Em seguida, os dióis (**135a** e **135b**) foram peracetilados, originando o éster metílico do **ácido pterândrico** (**136**).

3.4.1. Estereoquímica relativa do ácido pterândrico

Como a redução do composto (**134**) para o álcool (**135**) não foi estereosseletiva, observou-se no CG-EM os dois diastereoisômeros, os quais apresentaram tempos de retenção de 37,44 min e 37,53 min. O diastereoisômero que eluí primeiro da coluna capilar (DB-5) apresentou tempo de retenção e espectro de massas igual ao do **ácido pterândrico** natural, enquanto que o outro isômero apresenta padrão de fragmentação semelhante, porém possui um tempo de retenção diferente (**Figura 51**). Portanto, foi proposto que os elaióforos secretam

apenas um diastereoisômero do **ácido pterândrico**, isto é, ou o **ácido *syn*** ou o **ácido *anti*-pterândrico**.

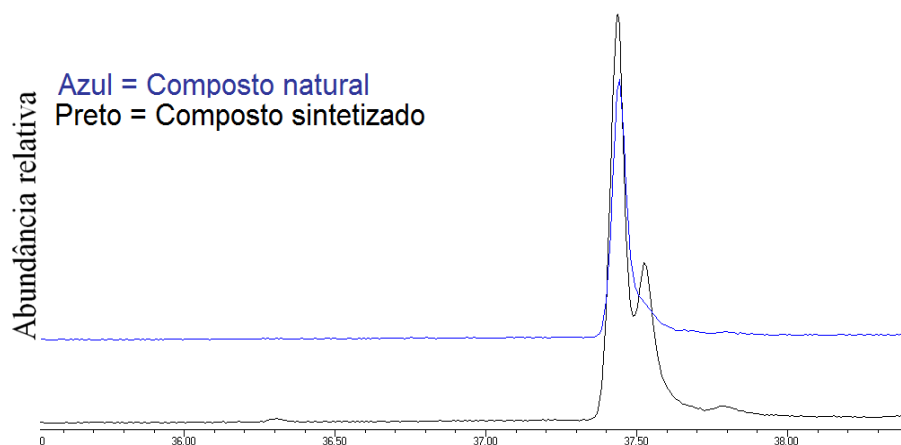


Figura 51. Cromatograma obtido por varredura de íons totais para o padrão de ácido pterândrico natural (azul) e sintético (preto)

Zhao *et al.*, (1995) trabalhou com diversos dióis e observou que os 1,3 dióis apresentavam um comportamento cromatográfico consistente em colunas de sílicas eluídas com hexano acetato de etila 50% ou seja o diastereoisomero *syn* sempre eluia primeiro seguido do *anti*. Portanto, para se determinar a configuração relativa do produto natural, a mistura diastereoisomérica dos dióis (*syn* e *anti*) foi separada por coluna de sílica em fração-**A** ($R_f = 0,28$, AcEt/Hex 50%) e fração-**S** ($R_f = 0,33$, AcEt/Hex 50%). A fração-**A**, de menor fator de retenção, foi acetilada e ao ser analisada por CG-EM coincidiu exatamente com o produto natural. Portanto, a configuração *anti* foi proposta com base nas observações de Zhao.

Para confirmar a proposta acima foi seguido o procedimento de Rychnovsky e colaboradores (1993). Neste método **1,3-dióis** são convertidos a acetonídeos, os

quais são então caracterizados por RMN de ^{13}C . A fração-A ($R_f = 0,28$) foi tratada com **2,2-dimetoxipropano**, e a análise de RMN de ^{13}C apresentou duas metilas (em 24,6 e 24,6 ppm) e um carbono não ligado a hidrogênio (em 100,0 ppm) característicos de derivados de dióis *anti*. Enquanto a análise do produto de reação da fração-S ($R_f = 0,33$) com **2,2-dimetoxipropano** por RMN de ^{13}C apresentou duas metilas (em 30,3 e 19,8 ppm) e um carbono não ligado a hidrogênio (em 98,4 ppm) característicos de derivados de dióis *syn* (**Figura 52; Anexo 2**). Desta forma, comparando-se com os dados da literatura confirmou-se que a configuração do produto natural é *anti* (Rychnovsky *et al.*, 1993; Tormena *et al.*, 2005).

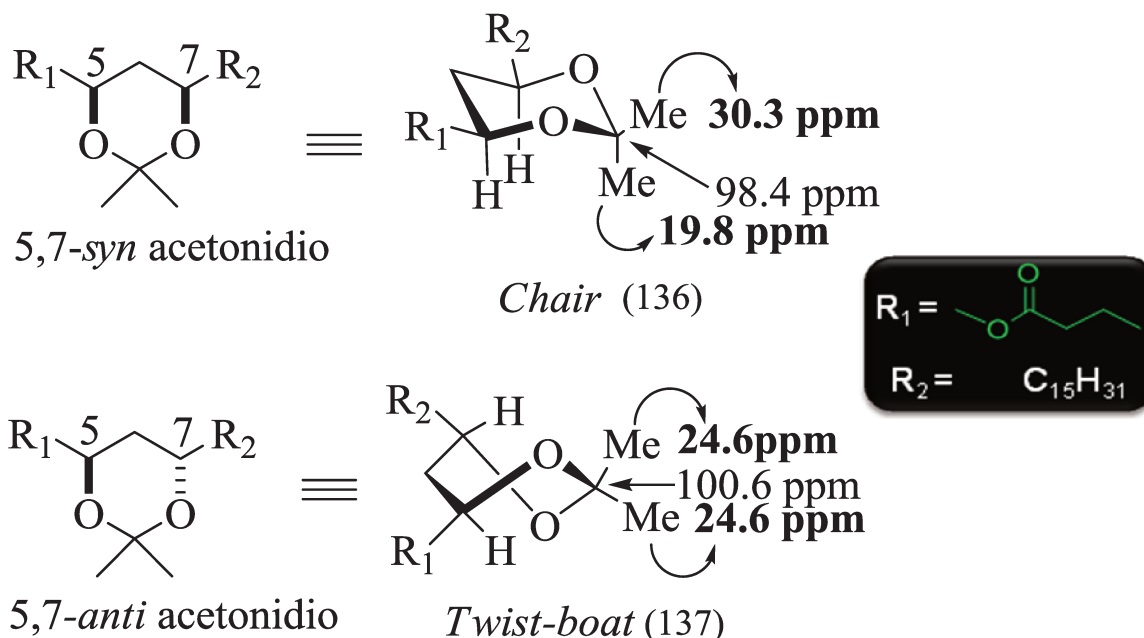


Figura 52. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C para as configurações *syn* e *anti*-acetonidio do ácido pterândrico.

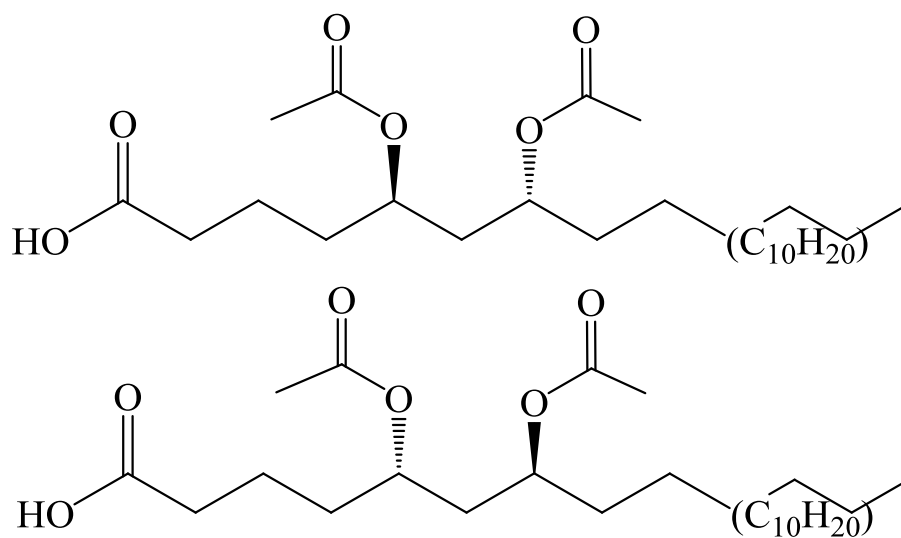


Figura 53. Estrutura Anti do ácido pterândrico

3.5. Análise química dos ninhos das abelhas brasileiras solitárias e Néctar de Manjeriço

Como comentado na introdução os ninhos das *Tetrapedia diversipes* são construídos com areia, óleos, resinas florais, néctar e pólen. Ninhos de *Tetrapedia diversipes* são compostos por um número variável (normalmente 2-7) de pequenas unidades chamados de células do ninho. Cada célula tem uma massa clara e uma parte escura (**Figura 54**).



Figura 54. Parte de um ninho de *Tetrapedia diversipes* mostrando seis células com massa clara e escura

A massa escura é basicamente composta de uma mistura de areia e óleo e resina floral, enquanto que a massa clara é uma mistura de pólen, néctar e óleo floral (**Figura 54**). Por essa razão, a quantidade de carboidratos e proteínas encontradas na massa escura pode ser inferior em comparação com a massa clara, pois o pólen e o néctar são responsáveis pelos teores de proteínas e carboidratos respectivamente.

Há uma relação entre os ninhos e os óleos florais de Malpighiaceae a qual foi estabelecida há alguns anos (Reis *et al.*, 2007, 2005). Entretanto não encontramos correlacionamento da provisão dos ninhos com algum néctar floral específico. Portanto, esta parte do trabalho teve como objetivo relacionar néctares florais aos açúcares da massa clara encontrado nos ninhos de *Tetrapedia diversipes*.

3.5.1. Determinação do teor de carboidratos no Ninho de *Tetrapedia diversipes*, Antera e Néctar de *Ocimum basilicum* (Manjericão)

Os carboidratos são ingredientes importantes para todos os organismos vivos, portanto foi proposto determinar o teor de carboidratos nas massas claras e escuras dos ninhos e por outro lado correlacionar estes dados com o teor de carboidratos e proteínas nas anteras e no néctar de *Ocimum basilicum*, vulgo manjericão, crescendo próximo ao ninho de *Tetrapedia diversipes* em estudo. Para a análise dos carboidratos selecionamos a metodologia de Dubois *et al.* (1956).

De acordo com esta metodologia, na presença de ácidos fortes e calor, os carboidratos sofrem uma série de reações que levam à formação de derivados de furano, tais como furfuraldeído e hidroximetil furfuraldeído (**Figura 55**). A reação de desidratação inicial é seguida pela formação de derivados de furano, os quais se condensam com compostos fenólicos produzindo compostos coloridos (**Figura 56**). A absorvância é diretamente proporcional à concentração de açúcar (Pomeranz *et al.*, 1994; Susan *et al.*, 2004).

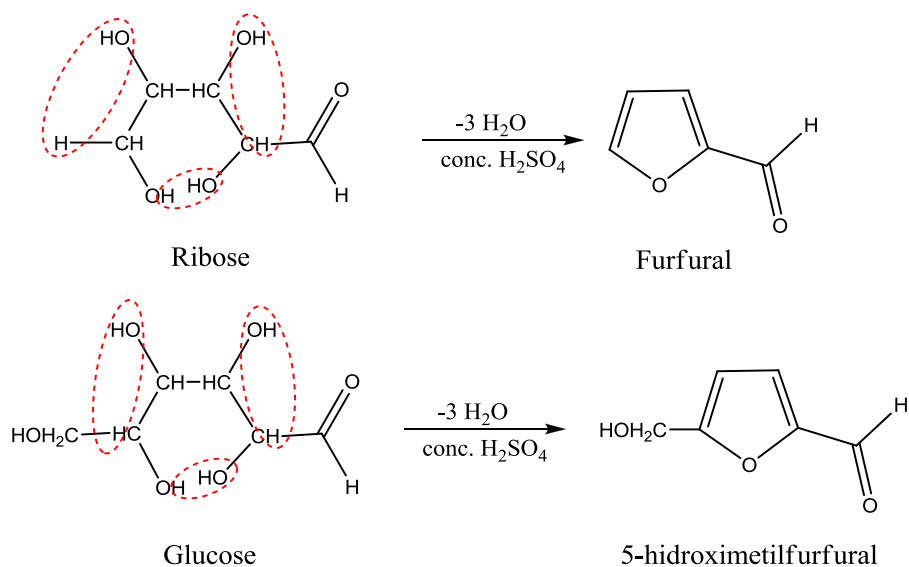


Figura 55. Desidratação de monossacarídeos formando derivados de furano.

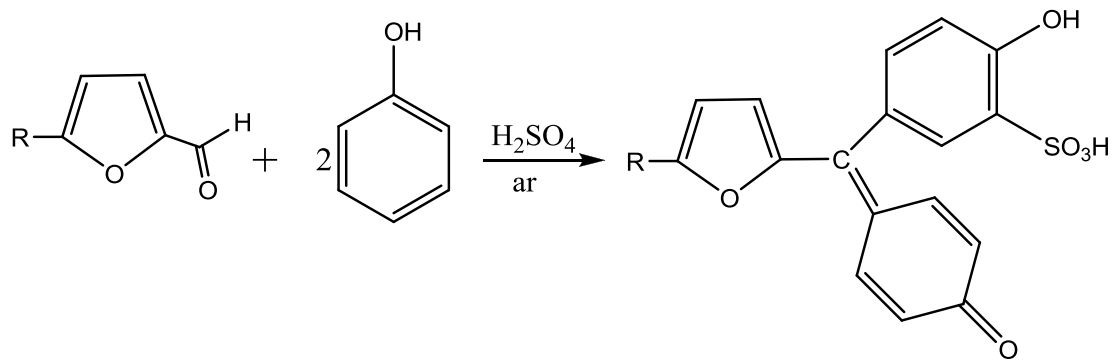


Figura 56. Produto colorido da condensação de furfural e fenol

Os resultados obtidos na análise por espectrofotometria de UV-VIS das amostras de ninhos de *Tetrapedia diversipes*, de anteras e de néctar de manjerição encontram-se na **Tabela 13**.

Para os ninhos 1, 2 e 5 foram consideradas as massas escuras e claras totais, já para os ninhos 3 e 4 cada célula foi separada e avaliada individualmente. A análise dos ninhos de *Tetrapedia diversipes* mostrou que a massa clara possui maior quantidade de carboidratos que a massa escura, sendo que a média de carboidratos encontrados na massa clara é de 4,7% (para os ninhos 1 e 2) e de 20,8% (para os ninhos 3, 4, 5, 6 e 7) e na massa escura é de 0,96% (para os ninhos 1 e 2) e de 2,18% (para os ninhos 3,4 e 5), já na antera de manjerição é de 22,5%. Os resultados diferentes das entradas 4, 6 e 8 (**Tabela 13**) foram atribuídos a eventuais contaminações durante a separação das massas.

A massa clara dos ninhos um e dois (**entradas 11 e 12; Tabela 13**) apresentaram valores diferentes em relação aos ninhos 3, 4, 6 e sete (**entradas 13 a 20; Tabela 13**), provavelmente, por serem células coletadas em diferente estágio larval (**Figura 57**). Por essa razão, as conclusões e comparações serão feitas com base nos ninhos 3, 4, 5, 6 e 7.

Tabela 13. Quantificação de carboidratos presentes nos ninhos de *Tetrapedia diversipes*, anteras e néctar de manjeriço.

S/Nº	Amostras	Massa Pesada (mg)	Quantidade de carboidratos (mg)	% em massa de carboidratos
1	Ninho 1 – M.E. Total	33,0	0,47	1,40
2	Ninho 2 – M.E. Total	102,9	0,53	0,52
3	Ninho 3 – M.E. Célula 1	10,0	0,058	0,58
4	Ninho 3 – M.E. Célula 2	1,3	0,045	3,45
5	Ninho 3 – M.E. Célula 3	10,3	0,042	0,40
6	Ninho 3 – M.E. Célula 4	2,5	0,099	3,98
7	Ninho 4 – M.E. Célula 1	10,2	0,04	0,40
8	Ninho 4 – M.E. Célula 2	3,5	0,18	5,19
9	Ninho 4 – M.E. Célula 3	10,1	0,17	1,74
10	Ninho 5 – M.E. Total	10,2	0,17	1,71
11	Ninho 1 – M.C. Total	36,8	2,59	7,03
12	Ninho 2 – M.C. Total	114,1	2,7	2,37
13	Ninho 3 – M.C. Célula 1	10,0	2,04	20,40
14	Ninho 3 – M.C. Célula 2	10,0	2,13	21,30
15	Ninho 3 – M.C. Célula 3	10,5	1,86	17,70
16	Ninho 4 – M.C. Célula 1	10,2	1,93	18,90
17	Ninho 4 – M.C. Célula 2	10,0	1,68	16,80
18	Ninho 5 – M.C. Total	10,2	1,86	18,20
19	Ninho 6 – M.C. Célula 1	1,4	0,19	19,50
20	Ninho 7 – M.C. Célula 1	1,3	0,36	24,10
21	Antera de Manjeriço 1	1,5	0,33	22,00
22	Antera de Manjeriço 2	1,0	0,23	23,00
23	Néctar de Manjeriço^b	16,3	0,2 ^c	6,12

^a M.E. = Massa Escura, M.C. = Massa Clara. ^b O néctar de manjeriço foi analisado para cinco flores (sem antera). ^c A quantidade de açúcares foi medida em mg/flor

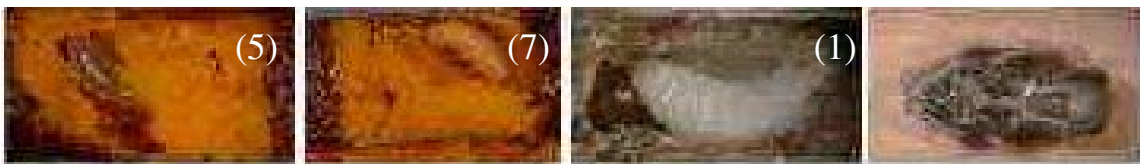


Figura 57. Célula de massa clara do ninho 5, 7 e 1 (Foto: [Isabel AS](#)).

Os teores de carboidratos do néctar de manjeriço foram de 6,12% enquanto que em geral o pólen mostrou teores de carboidratos mais altos do que o néctar, 22,5% (**Tabela 13**). Estes dados indicam que o pólen contribui mais significativamente para o teor de carboidratos da massa alimentar do que o néctar. Entretanto no ninho de *Tet. diversipes* a massa alimentar sofre processamento da massa pelas abelhas e estas desidratam o néctar aumentando o teor de carboidratos de 10-14% para 20-30%. Assim, é difícil concluir se há mais pólen ou néctar na massa alimentar no ninho de *Tet. diversipes* (Wittmann *et al.*, 1989)

Comparando-se com estudos já realizados com abelhas solitárias do gênero *Centris* spp. encontradas na Costa Rica, os ninhos de *Tetrapedia diversipes* apresentam uma concentração média de carboidratos 20,8 menor, uma vez que os ninhos de *Centris* spp. possuem uma média de 47,2% de carboidratos (Vinson *et al.*, 2006), o que pode indicar um mecanismo mais eficiente de desidratação dessa forma. Assim, é possível observar que existem formas específicas de nidificação para cada uma das espécies de abelhas solitárias que habitam o globo.

3.5.2. Determinação do teor de proteínas no ninho de *Tetrapedia diversipes*, antera e néctar de manjeriço.

Para determinar o teor de proteínas do ninho de *Tetrapedia diversipes*, das anteras e do néctar de manjeriço utilizou-se a metodologia de Bradford (1976). Primeiramente foi feita um curva de calibração com BSA e solução de “*Brilliant Blue Coomassie*” (parte experimental). Após esta etapa amostras de ninhos e anteras foram pesadas e maceradas até se obter um pó e então a solução de “*Brilliant Blue Coomassie*” foi adicionada (Bradford *et al.*, 1976). O teor de proteínas foi medido em triplicata no espectrofotômetro de ultravioleta-visível UV-VIS, no comprimento de onda de 595 nm.

A análise dos ninhos de *Tetrapedia diversipes* revelou que a massa clara possui maior quantidade de proteínas em relação à massa escura, sendo que a média de proteínas encontradas na massa clara é de 18,6% e na massa escura é de 1,81%, já na antera de manjeriço é de 21,7% (**Tabela 14**). Os resultados diferentes das entradas 1 e 12 (**Tabela 14**) foram atribuídos à deposição dos compostos nessas massas. Não foi realizados estudos da forma homogênea desses ninhos.

Tabela 14. Teor de proteína nos ninhos de *Tetrapedia diversipes*, anteras e néctar de manjeriço.

S/N ^o	Amostras ^a	Massa Pesada (mg)	Quantidade de proteínas (mg)	% em massa de proteínas
1	Ninho 3 – M.E. Célula 1	8,1	0,08	1,04
2	Ninho 3 – M.E. Célula 2	0,1	0	0
3	Ninho 3 – M.E. Célula 3	2,8	0	0
4	Ninho 3 – M.E. Célula 4	1,4	0	0
5	Ninho 4 – M.E. Célula 1	4,7	0,1	2,03
6	Ninho 4 – M.E. Célula 2	1,4	0,01	0,64
7	Ninho 4 – M.E. Célula 3	4,6	0,05	1,19
8	Ninho 5 – M.E. Total	4,5	0,19	4,17
9	Ninho 3 – M.C. Célula 1	3,4	0,12	3,59
10	Ninho 3 – M.C. Célula 2	2,6	0,06	2,26
11	Ninho 3 – M.C. Célula 3	2,4	0,04	1,62
12	Ninho 4 – M.C. Célula 1	3,1	0	0
13	Ninho 4 – M.C. Célula 2	2,6	0,04	1,4
14	Ninho 5 – M.C. Total	3,4	0,37	10,8
15	Ninho 6 – M.C Célula 1	2,3	0,8	34,9
16	Ninho 7 – M.C Célula 1	1	0,17	16,9
17	Antera de Manjeriço 1	0,7	0,12	17,14
18	Antera de Manjeriço 2	0,8	0,21	26,25
19	Néctar de Manjeriço^b	19,2	0,04775 ^c	1,22

^a M.E. = Massa Escura, M.C. = Massa Clara. ^b O néctar de manjeriço foi analisado para cinco flores (sem antera). ^c A quantidade de açúcares foi medida em mg/flor.

A grande diferença nos teores de proteína da massa clara (2%) dos ninhos 3 e 4 (entrada 9, 10, 11 e 13 no **Tabela 14**) relativos aos ninhos 5, 6 e 7 (19%; entrada 14, 15 e 16, **Tabela 14**) foi atribuído aos diferentes estados de desenvolvimento larval nestes ninhos de *Tetrapedia diversipes*. Portanto os teores proteicos da massa clara no caso dos ninhos três e quatro podem estar relacionados à modificação da massa clara pelo consumo pela larva e também contaminação da massa clara pela secreção da larval, enquanto que as maiores quantidades de proteína dos ninhos 5, 6 e 7 se deve as anteras florais que não foram ainda consumidas pelas larvas que se encontravam nos seus estágios iniciais de seu desenvolvimento. Portanto, as proteínas dos ninhos 5, 6 e 7 eram ainda as que haviam sido trazidas pela abelha mãe.

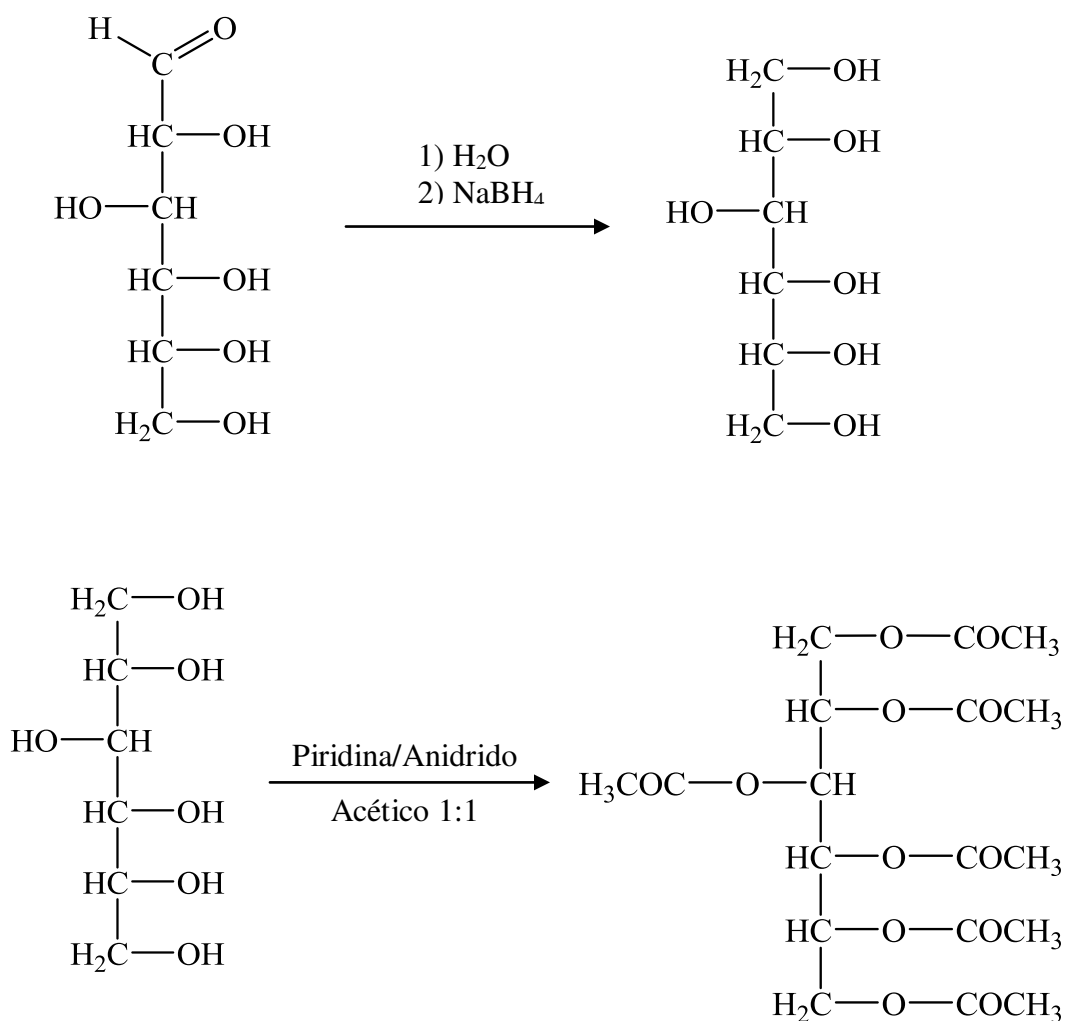
O teor de proteína no pólen é 21,69% e é maior que no néctar (1,25%; **Tabela 14**). Portanto pode-se afirmar que as maiores partes da proteína no ninho de *Tetrapedia diversipes* provêm do pólen.

3.5.3. Identificação dos carboidratos no alimento larval dos ninhos

Como mencionado acima (Seção 3.1), os ninhos de *Tetrapedia diversipes* possuem aproximadamente 20% de carboidratos em suas massas claras, por isso o nosso segundo objetivo foi identificar os carboidratos. De acordo com a literatura as massas claras dos ninhos são compostas de pólen, óleo e néctar das flores e é constituído principalmente por glicose, galactose e sacarose ([Baker & Baker 1983](#); [Percival 1961](#); [Van Handel et al. 1972](#); [Gottsberger et al. 1984](#); [Freeman et al. 1985, 1991](#)).

Para confirmar as observações acima selecionamos um dentre as várias metodologias para analisar açúcares por CG-EM ([Brummer et al., 2005](#) [Susan et al., 2004](#); [Higgins et al., 1994](#); [Pomeranz et al., 1994](#)) a metodologia selecionada

envolve a derivatização dos carboidratos (glicose, galactose, manose e xilose) em alditóis peracetilados. Esta metodologia evita o problema dos diastereoisômeros formados pelos carbonos anoméricos (Higgins *et al.*, 1994). Portanto, para estabelecer a metodologia amostras comerciais de açúcares (glicose, galactose, manose e xilose) foram reduzidas com NaBH₄ e peracetiladas como indicado no **Esquema 4**. As caracterizações dos padrões sintéticos por CG-EM e RMN encontram-se nas **Figuras 58-65**.



Esquema 4a. Rota de derivatização dos açúcares para obtenção do alditóis peracetilados tomando como modelo a glicose

Obtenção do alditol peracetilado da glicose:

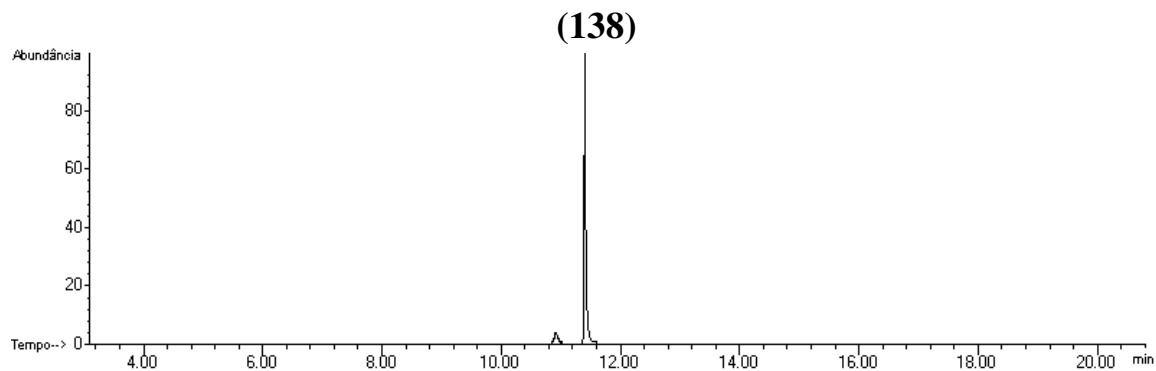


Figura 58. Cromatograma de íons do alditol peracetilado da glicose (138).

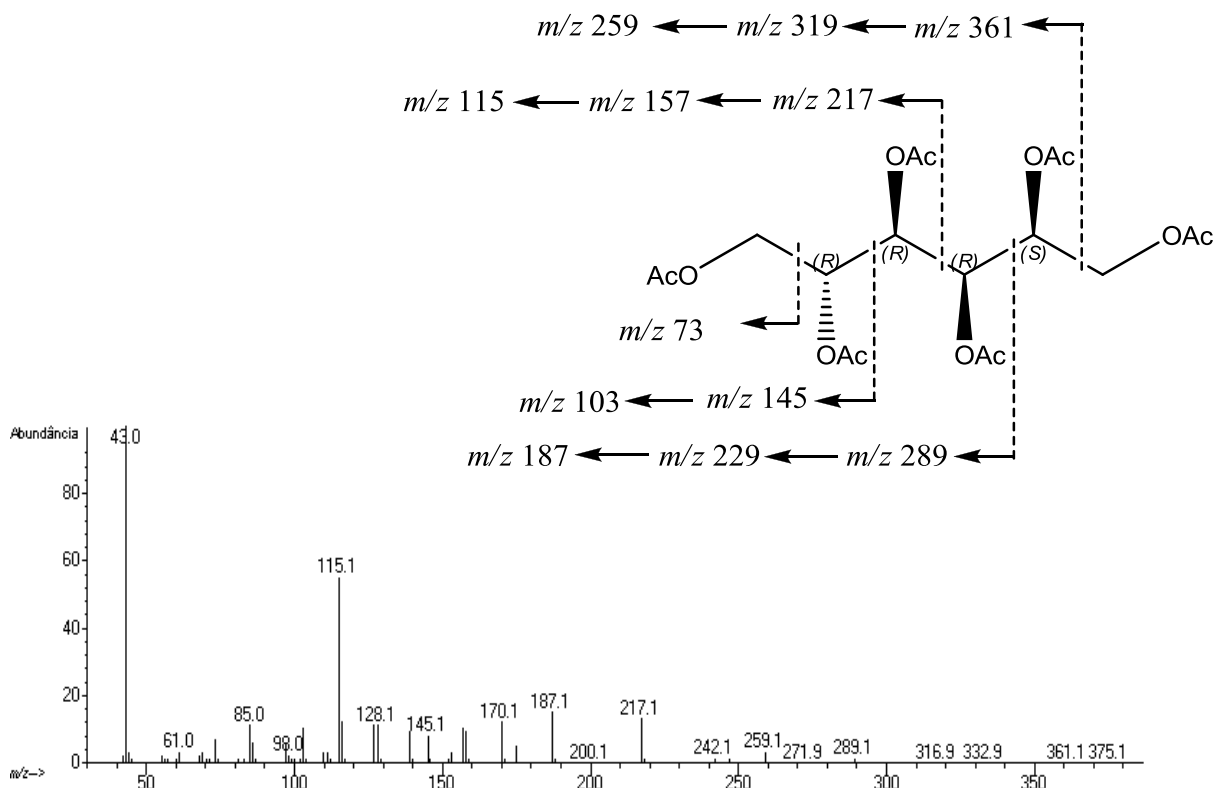
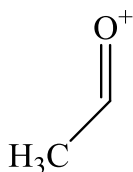
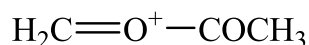


Figura 59. Espectro de massas 138 (Hexaacetato de D-glicitol ou Hexaacetato de sorbitol).

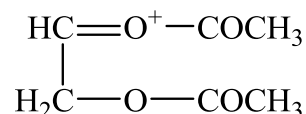
O espectro de massas da substância (138) apresenta como pico base o íon de m/z 43 representado pelo íon acílio. Fragmentos primários são produzidos pela eliminação do grupo acetóxi (m/z 59), ácido acético (m/z 60), ceteno (m/z 42) ou pela clivagem da cadeia do alditol peracetilado. Outros fragmentos importantes são m/z 73, 145, 217, 289, 361 e 375 (Biermann *et al.*, 1989).



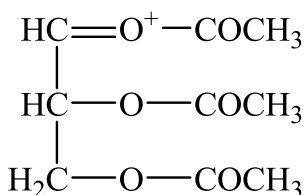
m/z 43



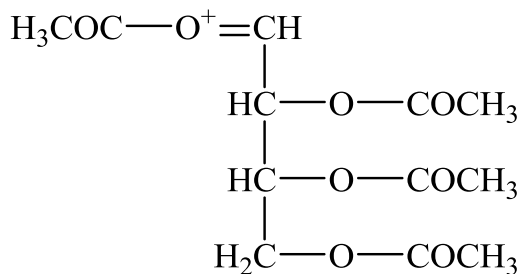
m/z 73



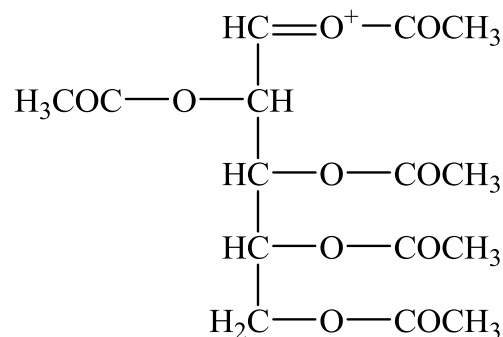
m/z 145



m/z 217



m/z 289



m/z 361

Esquema 4. Fragmentos característicos do Hexaacetato de D-glicitol ou Hexaacetato de sorbitol por CG-EM

Os espectros de massas dos padrões de carboidratos são relativamente similares, por essa razão a racionalização dos fragmentos característicos dos demais padrões será ilustrada na própria estrutura molecular do alditol peracetilado.

Obtenção do alditol peracetilado de galactose:

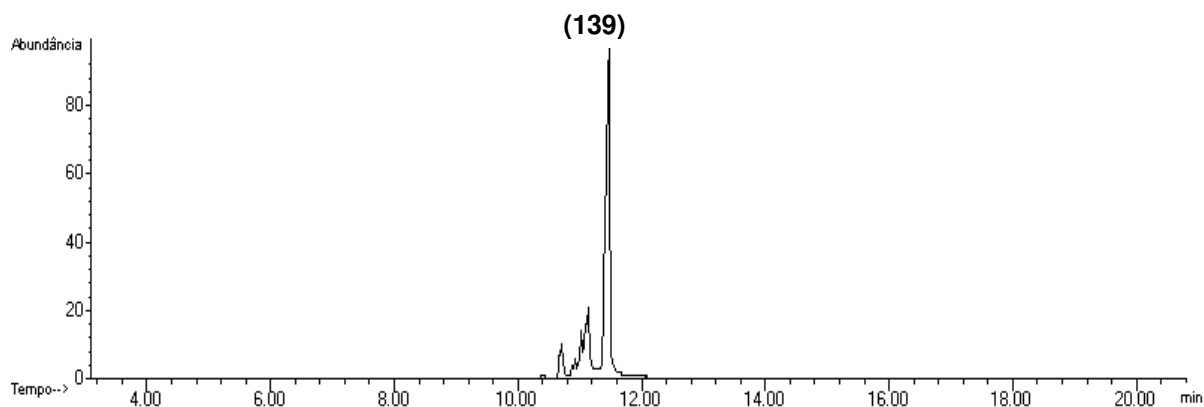


Figura 60. Cromatograma de íons do produto obtido na síntese do alditol peracetilado de galactose. Em destaque, a substância (139) – componente de interesse.

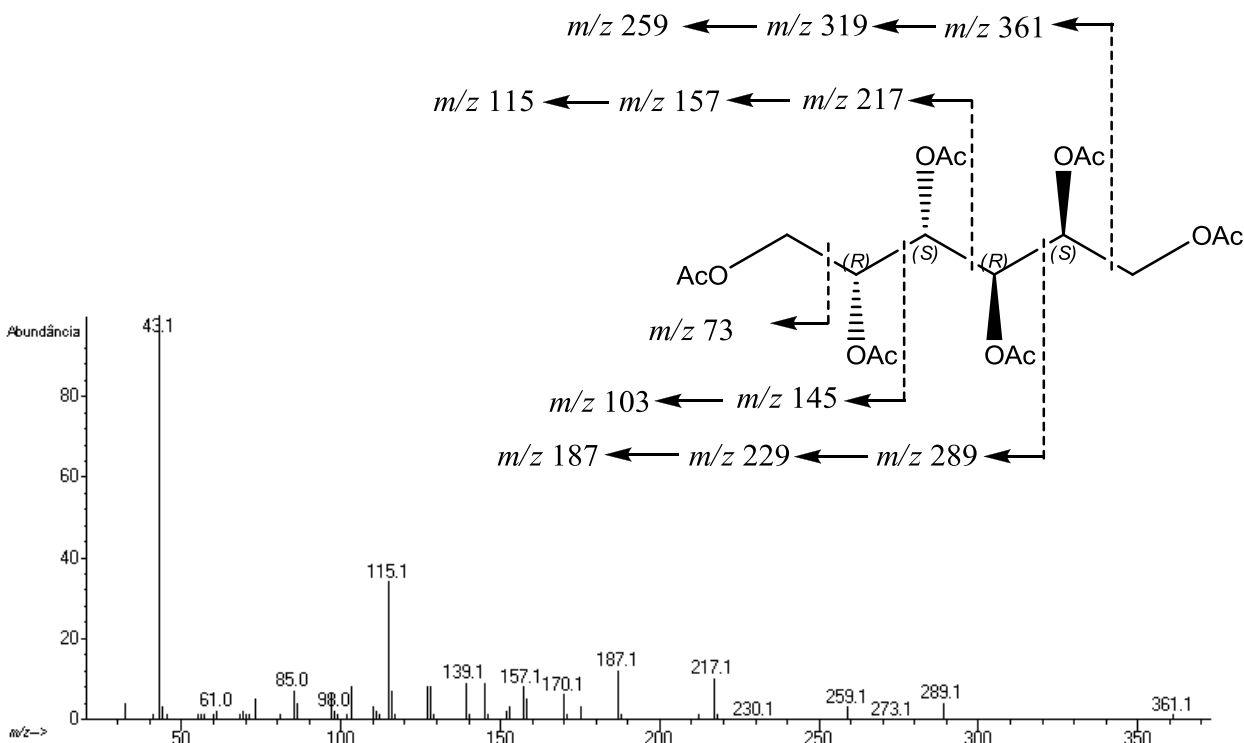


Figura 61. Espectro de massas (IE-EM) de 139 (Hexaacetato de galactitol ou Hexaacetato de dulcitol) e racionalização de alguns fragmentos característicos.

Obtenção do alditol peracetilado de manose:

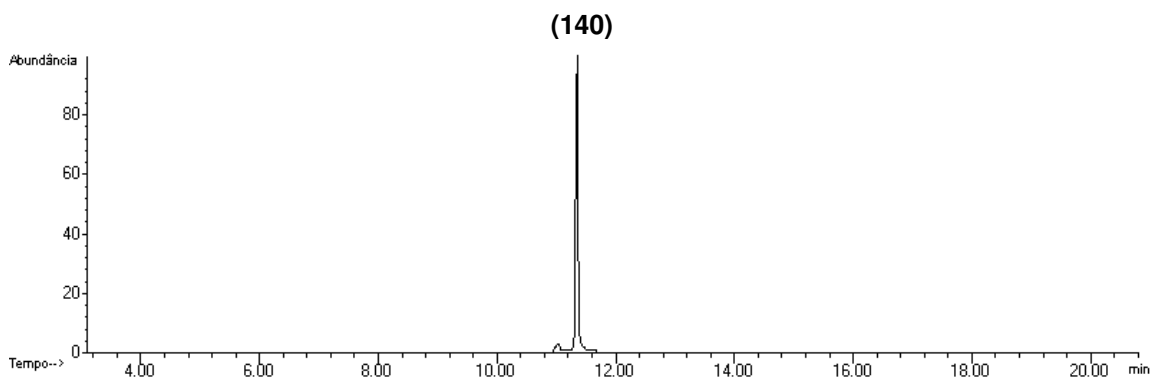


Figura 62. Cromatograma de íons do alditol peracetilado da manose (140).

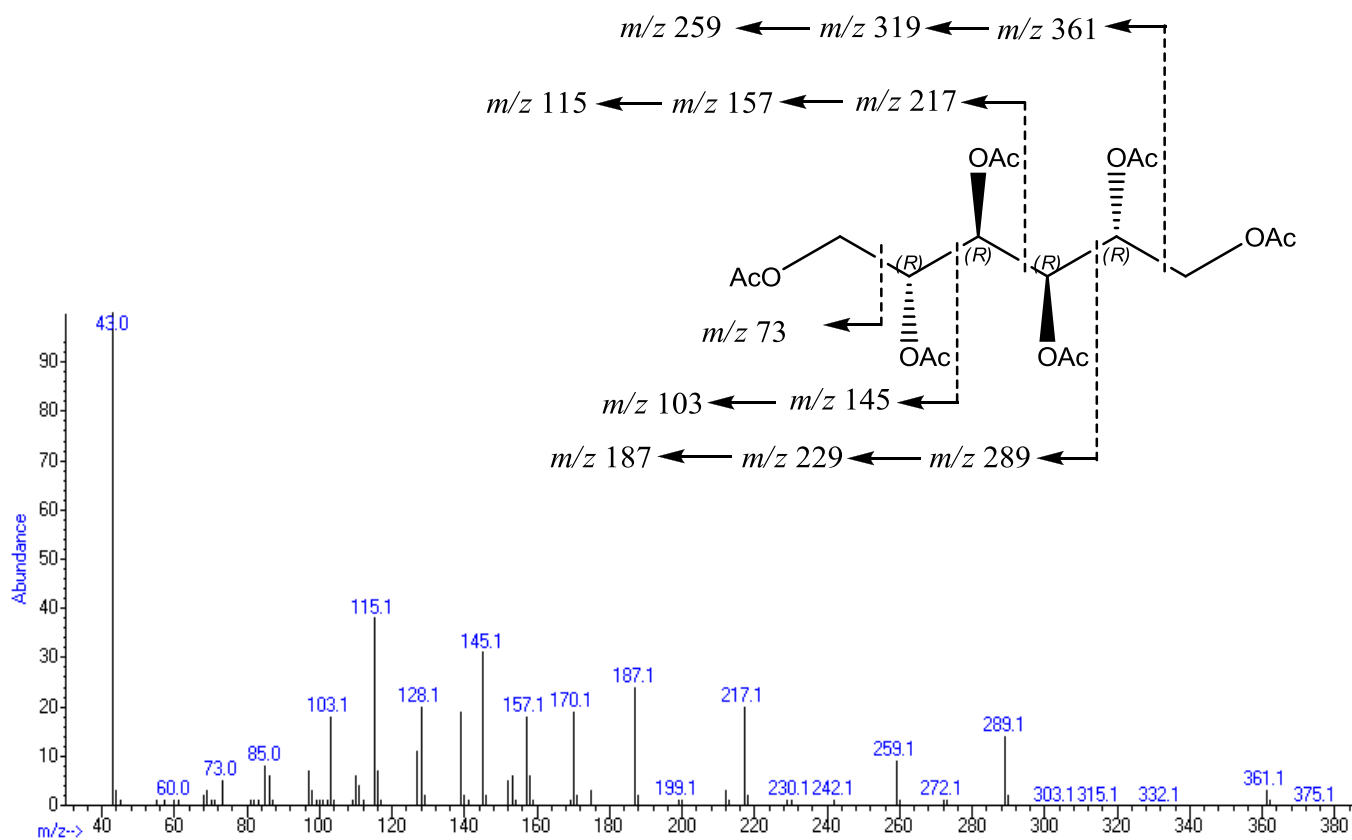


Figura 63. Espectro de massas (CG/IE-EM) de Hexaacetato de D-manitol (140) e racionalização de alguns fragmentos característicos.

Obtenção do alditol peracetilado de xilose:

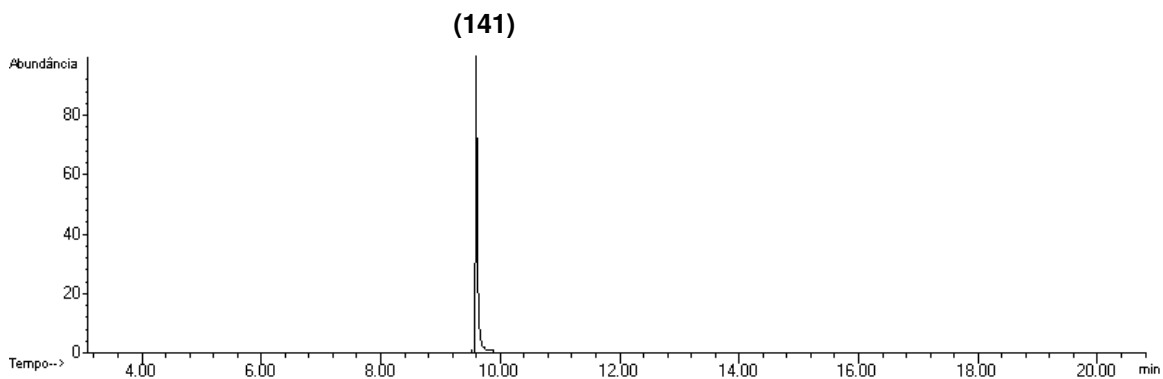


Figura 64. Cromatograma de íons do produto obtido na síntese do alditol peracetilado de xilose. Em destaque, a substância **(141)** componente de interesse.

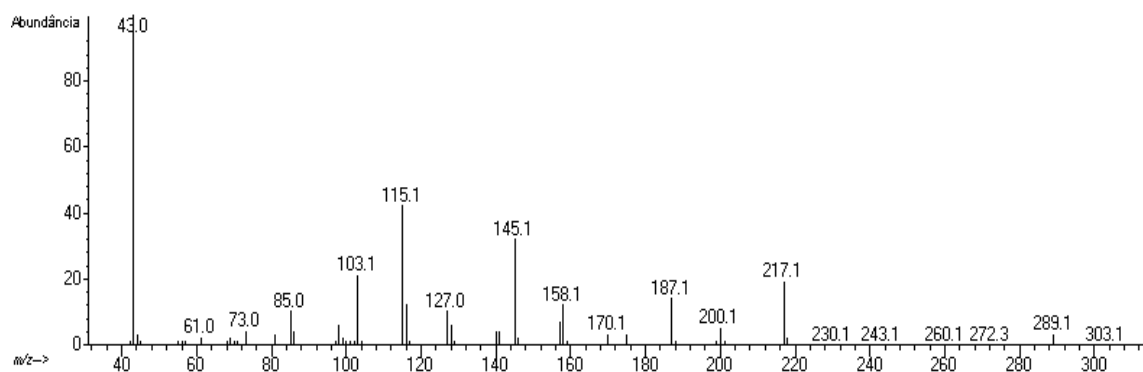
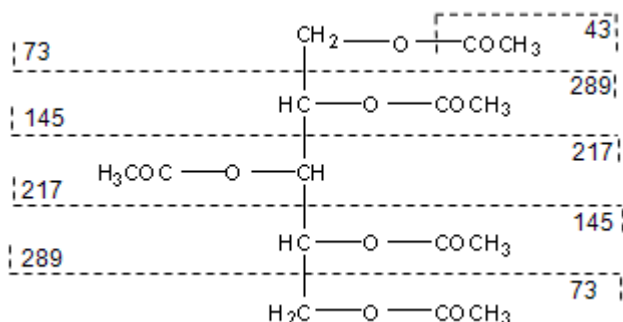
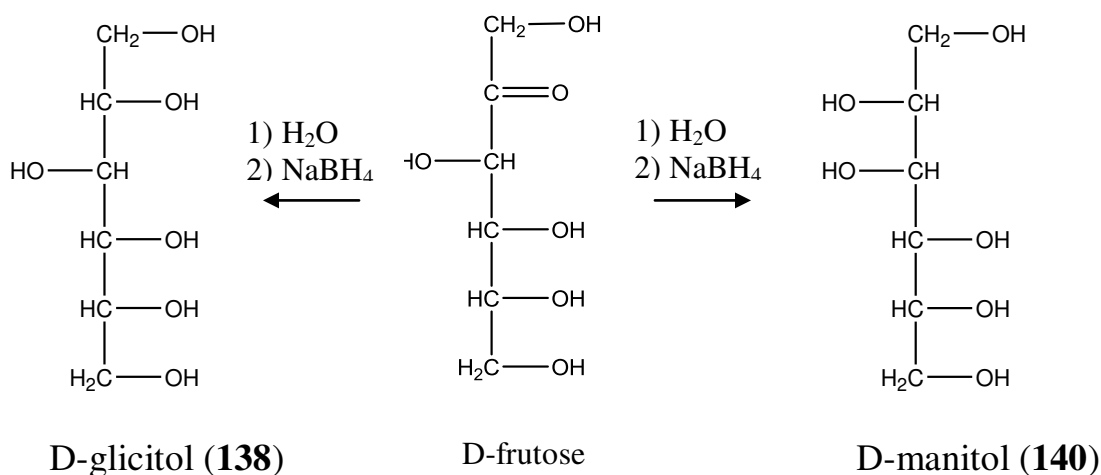


Figura 65. Espectro de massas da substância **141** (Pentaacetato de Xilitol).



Esquema 5. Proposta de racionalização de alguns fragmentos característicos Pentaacetato de Xilitol por CG/IE-EM.

A redução de cetoses, ao contrário da redução de aldoses, leva à formação de um novo centro assimétrico que gera conseqüentemente dois alditóis, deste modo, a derivatização da D-frutose leva à produção do hexaacetato de D-glicitol e do hexaacetato de D-manitol (Jaroslav *et al.*, 1963) (substâncias **138** e **140**, respectivamente).



Esquema 6. Reação de redução da D-frutose.

Os resultados obtidos a partir da análise dos padrões sintéticos por RMN estão ilustrados na **Tabela 15 e 16** (Espectros no **Anexo 2**).

Tabela 15. Deslocamentos químicos (δ) dos alditóis peracetilados (padrões sintético) em CDCl_3/TMS – RMN ^1H .

C#	Alditol Peracetilado	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
138	Hexa-acetato de D-glicitol	4,22	5,10	5,28	5,26	4,90	4,12
139	Hexa-acetato de D-galactitol	4,27	5,29	5,35	5,35	5,29	4,27
140	Hexa-acetato de D-manitol	4,08	4,92	5,30	5,30	4,92	4,08
141	Hexa-acetato de D-xilitol	4,44	5,34	5,45	5,34	4,44	-

Tabela 16. Deslocamentos químicos (δ) dos alditóis peracetilados (padrões sintético) em CDCl_3/TMS – RMN ^{13}C .

C#	Alditol Peracetilado	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
138	Hexa-acetato de D-glicitol	62,0	69,6	68,7	69,0	68,9	61,6
139	Hexa-acetato de D-galactitol	62,3	67,8	67,7	67,7	67,8	62,3
140	Hexa-acetato de D-manitol	62,0	68,1	67,7	67,7	68,1	62,0
141	Hexa-acetato de D-xilitol	62,0	69,4	69,3	69,4	62,0	-

Os sinais de RMN de ^1H podem ser separados em três grupos os hidrogênios mais protegidos em $\delta \approx 2,1$ ppm atribuídos às metilas dos grupos acetilas, em $\delta \approx 4,0 - 4,4$ ppm ressonam os metilenos terminais (CH_2OAc) e mais desprotegidos, em $\delta \approx 5,2 - 5,4$ ppm, encontram-se os metinos H-2,3,4 do pentaacetato de xilitol e os H-2,3,4,5 dos hexa-acetatos (**Tabela 15**).

Já os sinais de ^{13}C aparecem em quatro regiões: os mais desprotegidos são os carbonos carbonílicos em $\delta \approx 170$ ppm, a seguir os sinais em $\delta \approx 68$ ppm são atribuídos aos C-2,3,4 do pentaacetato de xilitol e os C-2,3,4,5 dos hexaacetatos, os sinais em $\delta \approx 64$ ppm são atribuídos aos carbonos terminais (CH_2OAc) e os grupos metilas dos grupos acetilas aparecem na região $\delta \approx 20$ ppm (**Tabela 16**).

Dessa forma, a análise por RMN permitiu confirmar a formação dos produtos de interesse, uma vez que os resultados obtidos estão de acordo com os dados da literatura (Angyal *et al.*, 1972, 1974 e 1980).

3.5.4. Identificação dos carboidratos no alimento larval dos ninhos de *Tetrapedia diversipes*

Para a análise dos carboidratos no alimento larval foi otimizado condições cromatográficas para uma mistura de alditóis acetilados (**138**, **139**, **140** e **141**) onde cada açúcar eluía num tempo específico (**Tabela 17**, **Figura 66**).

Tabela 17. Tempo retenção dos alditóis peracetilados (padrões sintético)

C/N°	Alditol Peracetilado	Tempo de retenção (min)
138	Hexa-acetato de D-glicitol	13,17
139	Hexa-acetato de D-galactitol	13,10
140	Hexa-acetato de D-manitol	13,03
141	Hexa-acetato de D-xilitol	10,99

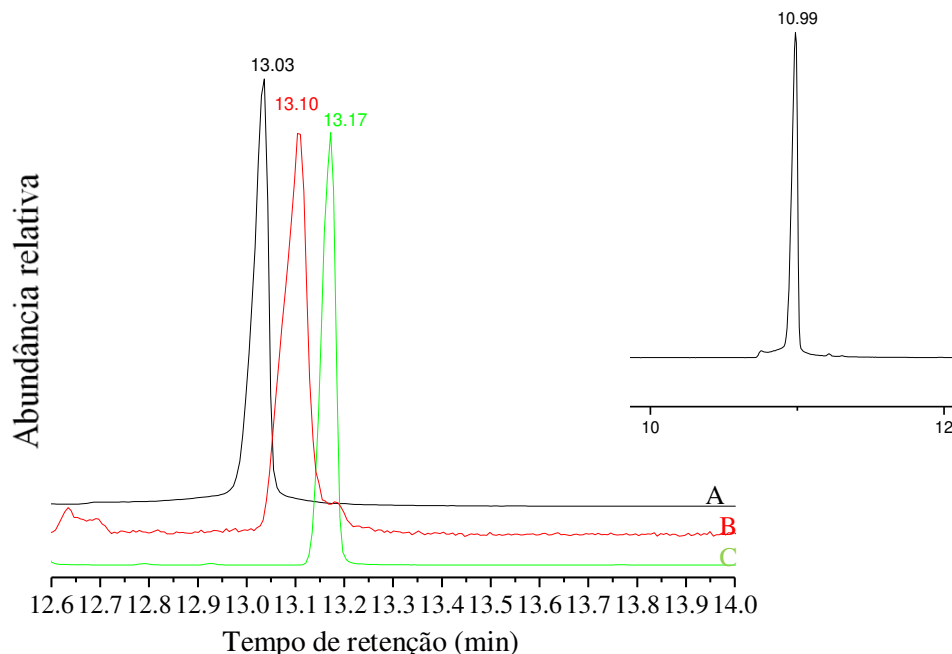


Figura 66. Cromatograma de íons indicando os tempos de retenção dos alditóis acetilados de (A) Manose = 13,03 min (B) Galactose = 13,10 min (C) Glicose = 13,17 min) e Xilose no inserto.

A massa clara de uma célula de ninho de *Tetrapedia diversipes* foi tratada com NaBH₄/água, peracetilada e analisada por GC/EI -MS. Os espectros e os tempos de retenção dos constituintes foram comparados com os padrões sintéticos (**Figura 67**). Esta análise permitiu confirmar a presença de xilose, manose, galactose e glicose. É possível também observar que a galactose e glicose predominam em relação à xilose e manose. Entretanto não é possível detalhar mais esta abundância relativa, pois parte da glicose e da manose podem ter sido originadas da frutose durante a redução.

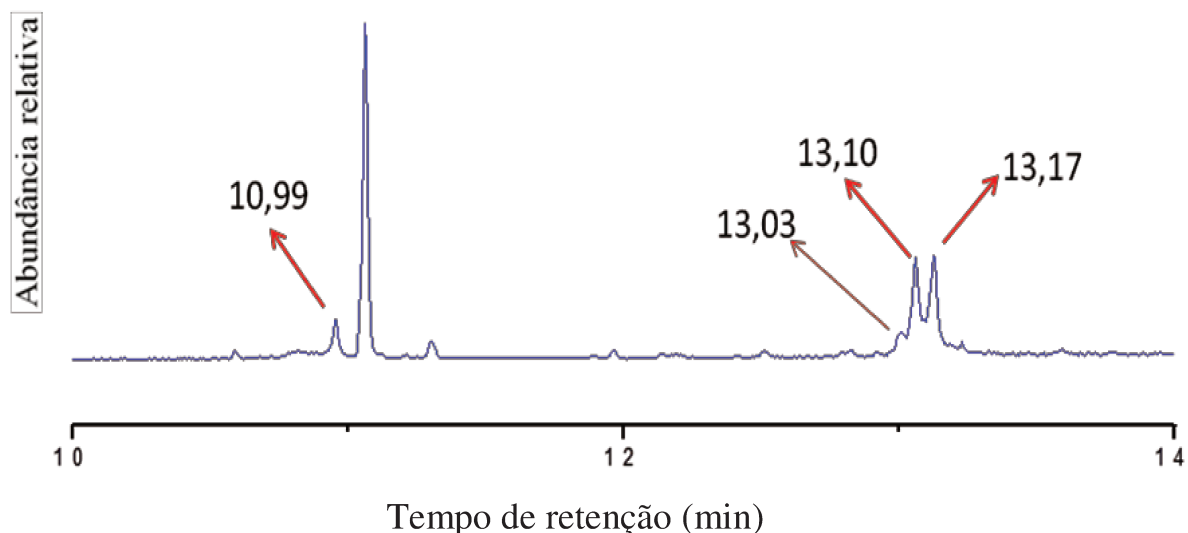


Figura 67. Cromatograma de íons dos alditois acetilados de Xilose = 10,99 min, Manose = 13,03 min, Galactose = 13,10 min e Glicose = 13,17 min. da massa clara do ninho de *Tetrapedia diversipes*.

3.5.5. Componentes dos açúcares presente nas anteras do manjericão

O ninho das abelhas *Tetrapedia diversipes* em estudo encontrava-se nas proximidades de plantas de Manjericão assim os açúcares presentes no pólen do

Manjeriço foram analisados (cromatograma A) utilizando a mesma metodologia aplicada na análise do ninho (cromatograma B) (**Figura 68**).

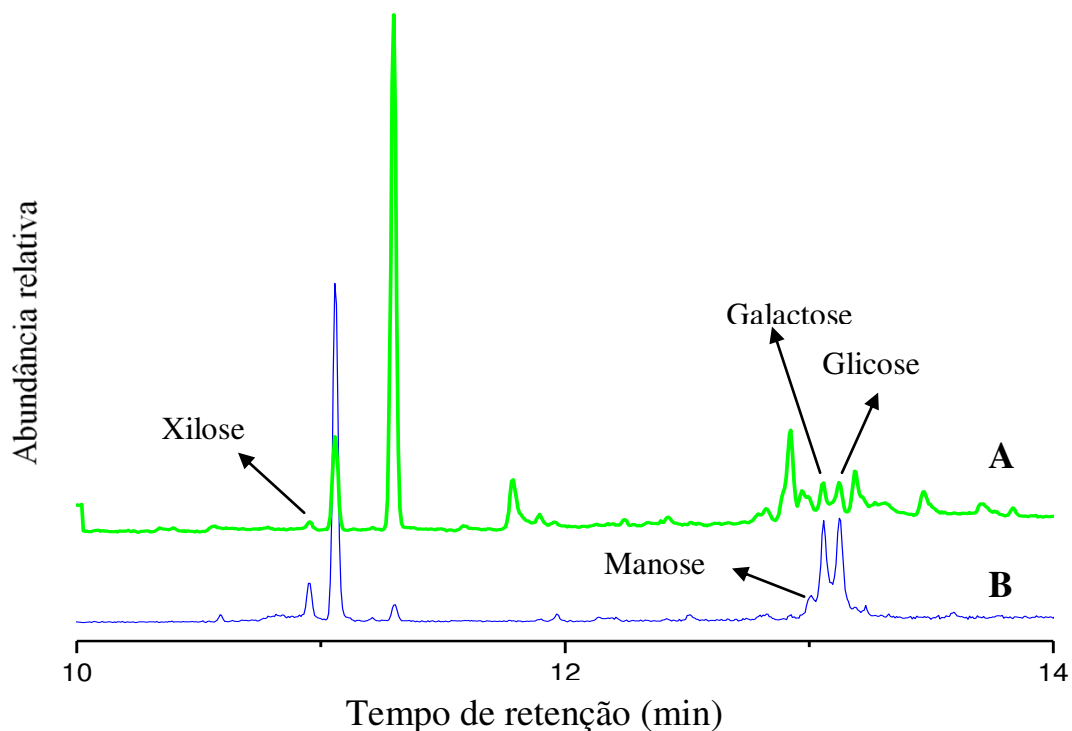


Figura 68. Cromatograma de íons dos alditois acetilados presentes nas (A) nas anteras de Manjeriço e (B) na massa clara do ninho de *Tetrapedia diversipes*.

A análise das anteras do Manjeriço revelou a presença de glicose, xilose, manose e galactose na mesma proporção que os açúcares presentes na massa clara do ninho de *Tetrapedia diversipes*. Isto poderia ser um indicativo da coleta de pólen do Manjeriço, entretanto esta pode não ser a única fonte de matéria prima de massa clara, pois os açúcares encontrados são comuns e estão presentes em muitas plantas (Baker & Baker 1983; Percival 1961; Van Handel *et al.* 1972; Gottsberger *et al.* 1984; Freeman *et al.* 1985, 1991).

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and a white fill. The scroll is slightly curved at the ends, with a small circular detail at the top right corner. The text "Parte Experimental" is centered within the scroll in a black serif font.

Parte Experimental

4. Parte Experimental

4.1 Óleos florais

Os óleos florais foram coletados de flores de Malpighiaceae na Reserva Ecológica do IBGE (RECOR), a 35 km ao sul de Brasília, no Distrito Federal (15,9436° S, 47,8767° O; altitude de 1087 m), durante as estações úmida (Outubro-Abril) e seca (Maio-Setembro) ao longo do período de 2007-2010 por Simone C. Cappellari. Documentos de identificação para todas as espécies estudadas foram depositados no herbário do IBGE, no Distrito Federal. Todos os espécimes foram identificados ao nível de espécies pelo Dr. M. C. Mamede (Instituto Botânico, São Paulo) e foram identificados (**Tabela 18**). Os óleos florais de 33 espécies (7 gêneros) da família Malpighiaceae foram obtidos por meio da extração dos elaióforos com acetato de etila.

Tabela 18. Óleos florais de espécies da família Malpighiaceae.

S/Nº	Espécies vegetais	Nº de Identificação
1	<i>Banisteriopsis argyrophylla</i> (Adr. Juss.) B. Gates	(scc1765/IBGE 66319)
2	<i>Banisteriopsis malifolia</i> (Nees & Mart.) B. Gates	(scc47/IBGE 64800)
3	<i>Banisteriopsis gardneriana</i> (Adr. Juss.) W. R. Anderson & B. Gates	(scc1047/IBGE 70569)
4	<i>Diplopterys pubipetala</i> (Adr. Juss.) W. R. Anderson & C. Davis	(scc2222/IBGE 710020)
5	<i>Banisteriopsis schizoptera</i> (Adr. Juss.) B. Gates	(scc2549/IBGE 70527)
6	<i>Banisteriopsis anisandra</i> (Adr. Juss.) B. Gates	(scc1035/IBGE 66313)
7	<i>Banisteriopsis laevifolia</i> (Adr. Juss.) B. Gates	(scc1751/IBGE 66317)
8	<i>Banisteriopsis latifolia</i> (Adr. Juss.) B. Gates	(scc1301/IBGE 70521)
9	<i>Banisteriopsis megaphylla</i> (Adr. Juss.) B. Gates	(scc1333/IBGE 66341)

10	<i>Banisteriopsis stellaris</i> (Griseb.) B. Gates	(scc2489/ IBGE 70540)
11	<i>Banisteriopsis variabilis</i> B. Gates	(scc41/IBGE 64833)
12	<i>Banisteriopsis campestris</i> (Adr. Juss.) Little	(scc2463/IBGE 70539)
13	<i>Byrsonima umbellata</i> Adr. Juss.	(scc2285/IBGE 663350)
14	<i>Byrsonima pachyphylla</i> Adr. Juss. in A. St.-Hil.	(scc9/IBGE 64803)
15	<i>Byrsonima vimnifolia</i> Adr. Juss. in A. St.-Hil.	(scc2506/IBGE 70576)
16	<i>Byrsonima laxiflora</i> Griseb.	(scc174/IBGE 64871)
17	<i>Byrsonima subterranea</i> Brade & Markgr.	(scc2354/ IBGE 70575)
18	<i>Byrsonima basiloba</i> Adr. Juss.	(scc2437/IBGE 70564)
19	<i>Byrsonima coccolobifolia</i> H.B.K.	(scc214/IBGE 70574)
20	<i>Byrsonima guilleminiana</i> Adr. Juss.	(scc2268/IBGE 66312)
21	<i>Byrsonima rigida</i> Adr. Juss.	(scc2464/IBGE 70538)
22	<i>Byrsonima verbascifolia</i> (L.) DC	(scc2268/IBGE 66312)
23	<i>Camarea affinis</i> A. St.-Hil.	(scc2528/IBGE 70493)
24	<i>Heteropterys escalloniifolia</i> Adr. Juss.	(scc2312/IBGE 66332)
25	<i>Heteropterys coriacea</i> Adr. Juss.	(scc1147/IBGE 70572)
26	<i>Heteropterys campestris</i> Adr. Juss. in A. St.-Hil.	(scc2577, IBGE 70535)
27	<i>Heteropterys pteropetala</i> Adr. Juss. in A. St.-Hil.	(scc2539/IBGE 70504)
28	<i>Heteropterys tomentosa</i> Adr. Juss. in A. St.-Hil.	(scc2301/ IBGE 66333)
29	<i>Peixotoa goiana</i> C. Anderson	(scc56/IBGE 64853)
30	<i>Peixotoa reticulata</i> Griseb.	(scc1240/IBGE 66326)
31	<i>Pterandra pyroidea</i> C. Anderson	(scc794/IBGE 66325)
32	<i>Tetrapterys ambigua</i> (A. Juss.) Nied.	(scc2280/IBGE 66318)

Os óleos florais de 48 amostras da família Krameriaceae foram obtidos por meio da extração dos elaióforos com $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (6:1). Os dados relacionados com o óleo floral bruto obtido de cada amostra estão indicados na **Tabela 19**.

Tabela 19. Quantidade de óleo floral na família Krameriaceae *

S/N°	Código da Amostra (Austin)	Código de análise (Unicamp)	Nome da espécie/ Identificação N°
1	8576	FOKO1	<i>Krameria iluca</i>
2	7113	FOKO2	-
3	7057	FOKO3	<i>Krameria cytisoidea</i>
4	8512	FOKO4	<i>Krameria ixine</i>
5	7125	FOKO5	<i>Krameria cytisoidea</i>
6	8524	FOKO6	<i>Krameria ixine</i>
7	831023-1	FOKO7	<i>Krameria iluca</i>
8	8579	FOKO8	-
9	7098	FOKO9	-
10	8622	FOKO10	-
11	8576	FOKO11	-
12	831021-2	FOKO12	-
13	031780-1	FOKO13	-
14	8587	FOKO14	-
15	8541	FOKO15	-
16	7113	FOKO16	-
17	7060	FOKO17	-
18	8570	FOKO18	-
19	7102	FOKO19	-
20	031580-5	FOKO20	-
21	8541	FOKO21	-
22	7034	FOKO22	-
23	-	FOKO23	<i>Malpighia glabra</i>
24	-	FOKO24	<i>Malpighia glabra</i>
26	831021-2	FOKO25	-
27	831011-1 (a)	FOKO26	-

28	83109-3	FOKO27	-
29	831011-1 (b)	FOKO28	-
30	8588	FOKO29	-
31	831012-6	FOKO30	-
32	KC	FOKO31	<i>Krameria canceolata</i>
33	7093	FOKO32	-
34	8310-7-9	FOKO33	-
35	7030	FOKO34	-
36	76414	FOKO35	-
37	7098	FOKO36	-
38	7068	FOKO37	-
39	8599	FOKO38	-
40	831014-5	FOKO39	-
41	8622	FOKO40	-
42	8622	FOKO 41	-
43	7030	FOKO42	-
44	8508	FOKO43	-
45	831013-1	FOKO44	-
46	83108-4	FOKO45	-
47	831032-2	FOKO46	-
48	831020-3	FOKO47	-

*Os nomes das espécies serão enviados posteriormente pela colaboradora S. C. Cappellari.

4.2 Identificação dos Ácidos graxos

O solvente foi evaporado e o resíduo foi avaliado por cromatografia em camada delgada eluída com hexano e acetato de etila 20%. A presença de ácidos graxos foi facilmente observada pela mancha alongada na origem dos

cromatogramas após pulverização com solução de ácido acético e anisaldeído 10% e aquecimento a 110°C. Os óleos foram submetidos à metilação com diazometano antes da análise por CG-EM ou purificados por cromatografia em coluna de sílica eluída com hexano e quantidades crescentes de acetato de etila.

4.3 Solventes

Todos os solventes empregados apresentavam grau analítico de pureza, da marca SYNTH, os quais foram destilados ou bidestilados antes do emprego.

As cromatografias de adsorção em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas prontas Merck. A determinação da posição de um composto sobre as placas de CCD foram obtidas pulverizando a superfície do adsorvente com uma mistura de *p*-anisaldeído (0,5 mL); ácido acético glacial (50 mL); ou visualizadas com lâmpada ultravioleta.

4.4 Equipamentos e Métodos

As análises de RMN foram obtidas com os equipamentos Varian Inova-500, Bruker Gemini-300, Avance-Bruker 400 e 600, empregando CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno.

A técnica de ESI-MS (*“Electrospray Ionization Mass Spectrometry”*) foi realizada num espectrômetro de massas híbrido “LTQ-Orbitrap” (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha). O nitrogênio gasoso foi empregado para a nebulização, dessolvatação e dissociação induzida por colisão (Collision Induced Dissociation – CID). A amostra foi diluída em metanol e submetida a um processo de infusão com um fluxo de 10,0 µL/min, sendo detectada em modo positivo.

“Sheath gas”= 8, voltagem do spray = 3,5 kV, voltagem do capilar = 43 V, temperatura do capilar = 275°C. Experimentos de varredura completa [faixa de $m/z = 100-1.300$] foram realizados em um detector de armadilha de íons (“*linear trap*”), assim como em um “*Orbitrap*”. As massas foram adquiridas com uma resolução igual a 30.000, para uma razão m/z 400. Os dados obtidos foram analisadas por meio do programa Xcalibur (Thermo Finnigan).

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas num equipamento Agilent 6890/Hewlett-Packard 5973 GC-EI/MS, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (HP-5; 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m), empregando-se He como gás de arraste e um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do forno variou de 150 a 290°C, com uma taxa de aquecimento de 4°C/min e com um tempo de final de espera de 30 minutos (Tabela 20).

Tabela 20. Parâmetros da técnica de CG/IE-EM para a análise do óleo floral.

Ionização	Ionização eletrônica (IE)
Voltagem	70 eV
Temperatura da fonte iônica	200°C
Temperatura da interface do CG	290°C
Módulo de injeção	Split (10:1)
Volume de injeção	1 μ L
Faixa de massa	40–700

Os índices de retenção para cada composto foram obtidos pela equação de regressão linear (eq. 1) para X (em que X = tempo de retenção do composto de interesse). Os valores de α e de β da equação foram obtidos ao se injetar uma amostra de óleo floral impuro juntamente com uma mistura de hidrocarbonetos normais de (C17, C19, C25 e C32 como padrões internos), nas mesmas condições

citadas anteriormente para CG/IE-EM. Os tempos de retenção 8,01 min para o C17; 12,06 min para o C19; 24,84 min para o C25 e 37,50 para o C32 em função dos números de carbonos multiplicados por 100 forneceram os valores α e β da reta com um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,999.

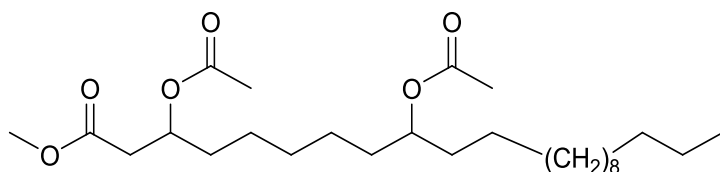
$$IR = \alpha + \beta X \quad \text{(Equação 1)}$$

em que,

$$\alpha = 1284,04 \text{ e } \beta = 50,52$$

X = tempo de retenção do composto desconhecido.

4.5 Isolamento dos padrões naturais



3,9-diacetóxicosanoico de metila (**1**)

320 elaióforos (29 flores) de *Banteriopsis anisandra* foram maceradas com acetato de etila e logo em seguida o extrato de acetato de etila obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo produzindo 29,2 mg de extrato. O extrato foi metilado com diazometano e purificado em coluna de sílica eluída com hexano/acetato de etila (5:9,5). Desta coluna foram obtidas 9,0 mg de um

composto (**1**) puro cujos dados espectroscópicos de 1D e 2D de RMN de ^1H e de ^{13}C e de cromatografia gasosa e foi caracterizada por dados espectroscópicos (**Tabela 3**).

Ester metílico do ácido 3,9-diacetóxicosanoico (**1**)

Propriedades físicas: óleo incolor.

Ponto de fusão = 123°C

IV (filme) ν_{max} : 2920; 2850; 1732; 1636; 1248; 1155; 740 cm^{-1}

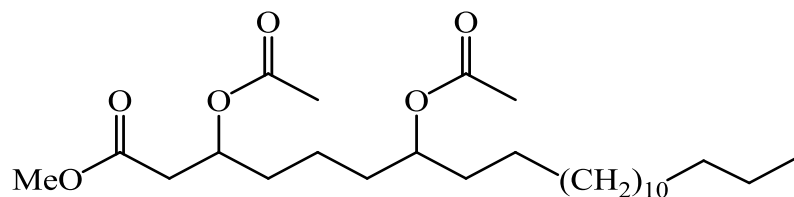
Tempo de retenção CG-EM (min): 34,21 (DB-5)

CG/IE-EM: m/z : (M^+ = 470 n.d.) 427(1), 367(7), 350(18), 335(3), 319(25), 287(6), 245(43), 185(44), 153(33), 43(100).

ESI-EM: m/z 471,3861 (M^+ + H).

RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ_{H} : 3,67 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2,53 (dd, $J=5,0$ e $15,0$ Hz, 1H, H-2), 2,58 (dd, $J=10,0$ e $15,0$ Hz, 1H, H-2), 5,20 (m, 1H, H-3), 1,60 (m, H-4), 1,43 (m, 2H, H-5), 1,29 (m, 2H, H-6), 1,43 (m, 2H, H-7), 1,50 (m, 2H, H-8), 4,84 (m, 1H, H-9), 1,50 (m, 2H, H-10) 1,25 (m, H-9 a H-21), 0,88 (t, $J=5\text{Hz}$, 3H, H-22), 2,04 e 2,03 (COCH_3 – C3 e C9).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 51,8 (OCH_3 , C-1), 170,5 (CO, C-1), 39,0 (CH_2 , C-2), 70,5 (CH, C-3), 33,7 (CH_2 , C-4), 25,1 (CH_2 , C-5), 20,9 (CH_2 , C-6), 25,2 (CH_2 , C-7), 34,0 (CH_2 , C-8), 73,9 (CH, C-9), 34,2 (CH_2 , C-10), 25,3 (CH_2 , C-11), 29,64 (2CH_2 , C-12 e C13), 29,62 (2CH_2 , C-14 e C-15), 29,61 (2CH_2 , C-16 e C-17), 29,53 (CH_2 , C-18), 29,48 (CH_2 , C-19), 31,9 (CH_2 , C-20), 22,7 (CH_2 , C-21), 14,1 (CH_3 , C-22), 170,9 (COCH_3 – C3 e C9), 21,3 e 21,1 (COCH_3 – C3 e C9)



3,7-diacetóxi-docosanoato de metila **12** – éster metílico do **Ácido Birsônico**

450 elaióforos (90 flores) de *Byrsonima laxiflora* foram maceradas com acetato de etila e logo em seguida o extrato de acetato de etila obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo produzindo 43 mg de extrato. O extrato foi metilado com diazometano e purificado em coluna de sílica eluída com hexano/acetato de etila (5:9,5). Desta coluna foram obtidas 12,0 mg de uma mistura de compostos cujos dados espectroscópicos de 1D e 2D de RMN de ^1H e de ^{13}C (**Tabela 4**), e de cromatografia gasosa revelaram que a mistura era composta majoritariamente (aproximadamente 90%) de um único éster metílico. Esta mistura foi caracterizada por dados espectroscópicos.

Éster metílico do ácido 3,7-diacetóxi-docosanóico (**12**)

Propriedades físicas: óleo incolor.

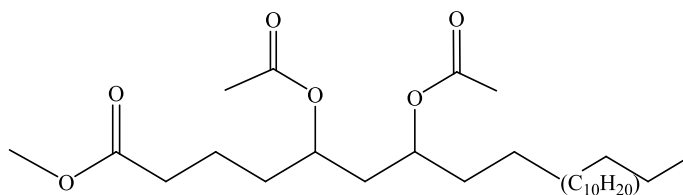
Ponto de fusão = 122,4°C

IV (filme) ν_{max} : 2922; 2850; 1735; 1374; 1239 cm^{-1}

Tempo de retenção (min): 34,07(coluna capilar HP-5); CG-EM/IE: m/z : (M^+ = 470 n.d.) 427(1), 367(7), 350(18), 335(3), 319(25), 259(4), 217(10), 199(5), 170(22), 157(100), 128(30), 43(45). ESI-EM: m/z 471,3861 (M^+ + H).

RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) δ_{H} : 3,67 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 2,52 (dd, $J= 4,0$ e 16,0 Hz, 1H, H-2); 2,57 (dd, $J=8,0$ e 16,0 Hz, 1H, H-2); 5,20 (m, 1H, H-3); 4,85 (m, 1H, H-7), 1,25 (m, 26H); 0,85(t, $j=8\text{Hz}$, 3H, H-22).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 51,8 (OCH_3 , C-1'); 170,38 (CO , C-1); 38,9 (CH_2 , C-2); 70,0 (CH , C-3); 34,0 (CH_2 , C-4); 20,9 (CH_2 , C-5); 34,0 (CH_2 , C-6); 73,9 (CH , C-7); 34,0 (CH_2 , C-8); 25,0 (CH_2 , C-9); 29,32 (CH_2 , C-10); 29,42 (CH_2 , C-11); 29,64 (2CH_2 , C-12 e C13); 29,62 (2CH_2 , C-14 e C-15); 29,61 (2CH_2 , C-16 e C-17); 29,53 (CH_2 , C-18); 29,48 (CH_2 , C-19); 31,9 (CH_2 , C-20); 22,7 (CH_2 , C-21); 14,1 (CH_3 , C-22); 170,190 e 170,78 ($-\underline{\text{CO}}\text{CH}_3-$ C3 e C7); 21,25 e 21,07($\text{CO}\underline{\text{CH}}_3$ – C3 e C7).



5,7-diacetóxi docosanoato de metila (**5**) – Éster metílico do **Ácido Pterândrico**

137 elaióforos (27 flores) de *Pterandra pyroidea* foram maceradas com acetato de etila e logo em seguida o extrato de acetato de etila obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo produzindo 3,0 mg de extrato bruto. O extrato foi metilado com diazometano e purificado em coluna de sílica eluída com hexano/acetato de etila (5:9,5). Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C se encontram na **Tabela 5**.

Ester metílico do ácido 5,7-diacetóxi-docosanoico (**5**)

Propriedades físicas: óleo incolor.

Ponto de fusão = 129°C

IV (filme) ν_{max} : 2922; 2850; 1735; 1374; 1239 cm^{-1}

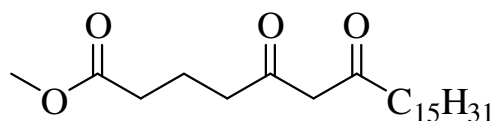
Tempo de retenção (min): 33,47; CG-EM/IE: m/z : (M^+ = 470 n.d.) 439(1); 410(1); 397(15); 369(7); 367(11); 350(36); 335(3); 319(5); 309(3); 267(10); 276(10); 259(12); 239(8); 199(23); 173(23); 157(88); 144(20); 131(45); 128(30); 43(100).

ESI-EM: m/z 493.3510 (M^+ + Na).

RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ_{H} : 3,68 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 2,30 (m, 2H, H-2); 1,68 (m, 2H, H-3); 1,57(m, 2H, H-4); 4,93 (m, 2H, H-5 e H-7); 1,70 e 1,88 (ddd, $J= 5,0$ e 15,0 Hz, 2H, H-6) 1,25 (m, 26H); 0,88(s, 3H, H-22).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 51,5 (OCH_3); 173,7 (CO, C-1); 34,2 (CH_2 , C-2); 20,5 (CH_2 , C-3); 33,3 (CH_2 , C-4); 70,8 (CH , C-5); 38,3 (CH_2 , C-6); 71,2 (CH , C-7); 33,6 (CH_2 , C-8); 25,1 (CH_2 , C-9); 29,3 ~ 29,6 (10CH_2 , C-10 ~ 19); 31,9 (CH_2 , C-20); 22,7 (CH_2 , C-21); 14,1 (CH_3 , C-22); 170,6 e 170,7 ($-\underline{\text{C}}\text{OCH}_3-$ C5 e C7); 21,2 (2 $-\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ – C5 e C7).

4.6 Sínteses dos padrões



5,7-dioxodocosanoato de metila(134)

2-heptadecanona (0,207ml, 1,5 mmol) foi gotejada sobre uma solução de LDA (2,0 mmol) em THF anidro (15 ml) a -78°C , a solução foi mantida sob agitação até completa adição da **heptadecanona**. A agitação foi mantida por 40 minutos adicionais e deixou-se a temperatura elevar a -15°C . Neste estágio adicionou-se **5-cloro-5-oxovalerate** de metila (0,210 ml, 1,5 mmol) de uma única vez e a solução foi mantida sob agitação por 2 horas a 0°C e 1 h a temperatura

ambiente sendo então interrompida pela adição de solução aquosa de cloreto de amônia. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução salina e secas sobre Na₂SO₄ anidro. O solvente foi evaporado a vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica eluída com hexano e percentagens crescentes de acetato de etila fornecendo um sólido incolor identificado como **134** (rendimento de 37%).

5,7-dioxodocosanoato de metila (134):

Propriedades físicas: sólido branco; Ponto de fusão = 46°C

R_f = 0,6 (Hex:Acetato de etila; 10%).

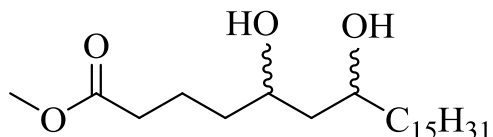
IV (filme) ν_{\max} . cm⁻¹: 2958; 2933; 2872; 1725; 1703; 1457; 1367; 1249; 1150 cm⁻¹

Tempo de retenção CG/IE -EM (min): 18,28.

CG/IE-EM; 382(18), 351(3), 309(16), 281(37), 239(30), 186(88), 171(36), 154(45), 129(100), 113(40), 55(42).

RMN de ¹H (CDCl₃, 250,13 MHz, TMS) δ : 5,48 (s, 1H, H-6_{enol}); 3,68(s, 3H, OCH₃(enol)); 3,67(s, 1H, OCH₃(cetona)); 3,55 (s, 0,5H, H-6(cetona)); 2,59(t, J= 7,5; 0,75H, H-4 ou H-8); 2,49(t, J= 7,5 Hz, 0,75H, H-4 ou H-8); 2,31 (m, 10H, H-2, H-4_{enol} e H-8_{enol}); 1,94 (m, 4H, H-3 e H-9); 1,25(m, 48H); 0,88(t, J=7,5Hz; 6H, H-22(enolic e ketonic))

RMN de ¹³C (CDCl₃, 62,89 MHz, TMS) δ : 194,24 (C-5 ou C-7); 193,43 (C-5 ou C-7); 173,45 (C-1); 99,18 (C-6(enol)); 57,03(C-6(cetona)); 51,57 (OCH₃); 38,26 (C-8); 37,35(C-4); 33,11(C-2); 31,9 (C-20); 29,66 ~ 29,3 (C-10 ~ C-19); 25,71 (C-9); 22,66 (C-21); 20,69 (C-3); 14,09 (C-22).



Ésteres metílicos dos ácidos *sin* e *anti* 5,7-dihidroxidocosanóico (**135a** e **b**)

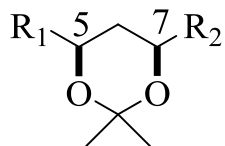
Ao NaBH₄ (11,02 mg; 0,3 mmol) em metanol foi adicionado lentamente uma solução de **134** (48,0 mg, 0,12 mmol) em metanol com agitação mantendo a temperatura da reação 0°C. Após completa adição de **134**, a mistura reacional foi agitada por 15 min adicionais à temperatura ambiente. O metanol foi evaporado a vácuo e a mistura de diastereoisômeros **135a** e **135b** foi extraída com acetato de etila fornecendo após a evaporação do solvente 46,0 mg da mistura de **135a** e **135b** (95% rendimento). Os isômeros foram separados por cromatografia em coluna de sílica eluída com hexano e percentagens crescentes de acetato de etila (20% a 50%).

Ésteres metílicos dos ácidos *sin* e *anti* 5,7-di-hidroxidocosanóico (**135a** e **b**)

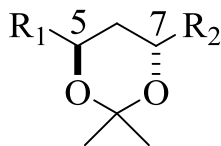
Propriedades físicas: sólido branco. R_f = 0,28 para *anti* (Hex:Acetato de etila; 50%). R_f = 0,33 para *sin* (Hex:Acetato de etila; 50%).

IV (filme) ν_{max}. cm⁻¹: 3404; 2940; 2859; 1740; 1448; 1375; 1240; 1071; 1023cm⁻¹

RMN de ¹H (CDCl₃, 250,13 MHz, TMS) δ_H: 3,85(m, 2H, H-5 e H-7), 3,67 (s, 3H, OCH₃), 3,20 (s, 1H, OH-5 ou OH-7), 2,70 (s, 1H, OH-5 ou OH-7), 2,36 (t, J=7,5 Hz, 2H, H-2) 1,79 (m, 2H, H-6); 1,60 (m, 4H, H-4, e H-8) 1,47 (m, 6H), 1,25 (m, 26H), 0,88 (t, J =7,5 Hz, 3H, H-22).RMN de ¹³C (CDCl₃, 125,69 MHz, TMS) δ_C: 174,31 (C-1); 73,29 (C-5 ou C-7); 72,39 (C-5 ou C-7); 42,88 (C-6); 51,61 (OCH₃); 38,36 (C-8); 37,45(C-4); 33,77(C-2); 31,9 (C-20); 29,71 ~ 29,31 (C-10 ~ C-19); 25,35 (C-9); 22,71 (C-21); 20,53 (C-3); 14,14 (C-22).



5,7-*syn* acetone (136)



5,7-*anti* acetone (137)

Os acetone acetonides dos dióis *sin* e *anti* racêmicos (**135a** e **135b**) (5mg, 13 mmol) foram obtidos tratando-os com 2,2-dimetoxipropano (2,0 mL) e p-toluenossulfonato de piridínio (PPTS; 10 mol%) como catalisador em CH₂Cl₂ anidro (5,0 mL) à temperatura ambiente por 15 min (Oku *et al.*, 2010). O *sin* - diol (**135b**) foi purificado em coluna de sílica eluída com hexano e porcentagens crescentes de acetato de etila (5 a 15%), e convertido em acetone acetonide (**136**). O acetone acetonide-*sin* puro foi analisado CG/EI -EM e RMN de ¹³C.

Mistura racêmica dos acetone acetonides (**136** e **137**)

Propriedades físicas: sólido branco.

R_f = 0,61 e R_f = 0,58 (Hex:Acetato de etila; 10%).

Tempo de retenção (min): 18,04 e 18,23 (espectros de massas iguais).

CG/IE -EM; 411(30), 319(31), 301(25), 157(67), 125(45), 97(60), 43(100).

RMN de ¹³C (CD₃OD, 125,69 MHz) δ_C: 174,4(C-1_{sin}); 174,0 (C-1_{anti}); 100,03 (qC_{anti}); 98,37 (qC_{sin}); 68,95(C-5 ou C-7)_{sin}; 68.67(C-5 ou C-7)_{sin}; 66.60(C-5 ou C-7)_{anti} ; 66,34(C-5 ou C-7)_{anti} ; 30,3 e 19,8(CH_{3eq} e CH_{3ax})_{sin}; 24,69 (2CH₃)_{anti};

Acetone acetonide *sin* (**136**)

Propriedades físicas: sólido branco.

R_f = 0,61 (Hex:Acetato de etila; 10%).

Tempo de retenção (min) CG-EM/IE: 18,23 (Coluna DB-5).

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125,69 MHz) δ_{C} : 174,1(C-1); 98,34 (qC); 69,0(C-5 ou C-7); 68,67(C-5 ou C-7); 51,5(OCH_3); 30,30 e 19,82($\text{CH}_{3\text{eq}}$ e $\text{CH}_{3\text{ax}}$).

4.7 Preparação dos padrões para a curva de calibração no espectrofotômetro de UV-VIS

Para determinar a concentração de carboidratos fez-se uma curva de calibração de acordo com a metodologia de *Dubois et al.* (1956) utilizando soluções aquosas de glicose a 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,00625 mg/mL, 0,003125 mg/mL, 0,0015625 mg/mL e 0,00078125 mg/mL.

As amostras foram preparadas dissolvendo a glicose em água milli-Q (5 mL), seguido de agitação e da adição de uma solução de fenol 5% (2,5 mL) e ácido conc. sulfúrico (12,5 mL).

O controle negativo foi preparado com água milli-Q (5 mL), solução de fenol 5% (2,5 mL) e ácido sulfúrico (12,5 mL).

Os teores de carboidratos foram medidos em triplicata no espectrofotômetro de UV-VIS no comprimento de onda de 490 nm.

4.8 Preparação das amostras dos ninhos de *Tetrapedia diversipes*, das anteras e néctar de manjerição.

As massas claras e escuras dos ninhos de *Tetrapedia diversipes* foram inicialmente separadas umas das outras com o auxílio de uma espátula. As amostras dos ninhos e as anteras de manjerição foram previamente pesadas e maceradas até se obter um pó homogêneo (**Tabela 1**). Para obtenção do néctar utilizou-se flores de manjerição sem antera (n = 5). As amostras de ninhos, anteras

e néctar foram agitadas em água milli-Q (5,0 mL) e filtradas em um funil de vidro contendo um pedaço de algodão tratado. Transferiu-se para um frasco de vidro e adicionou-se solução de fenol 5% (2,5 mL) e ácido sulfúrico (12,5 mL). Os teores de carboidratos das amostras dos ninhos, das anteras e dos néctares de manjeriço foram analisados em triplicatas no espectrofotômetro de UV-VIS no comprimento de onda de 490 nm.

4.9 Preparação dos padrões para a curva de calibração no espectrofotômetro de UV-VIS.

Para determinar a concentração de proteínas fez-se uma curva de calibração de acordo com a metodologia de *Bradford* (1976) utilizando soluções de albumina de soro bovino (BSA) a 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,00625 mg/mL, 0,003125 mg/mL, 0,0015625 mg/mL e 0,00078125 mg/mL.

As amostras foram preparadas dissolvendo BSA (albumina de soro bovino) em uma solução aquosa de NaCl 0,15 mol/L (1,5 mL), seguida da adição da solução de “*Brilliant Blue Coomassie*” (15,0 mL). Para preparar a solução de “*Brilliant Blue Coomassie*”, diluiu-se o corante azul de Coomassie (0,1 g) em etanol 95% (50 mL) e ácido fosfórico (10 mL), ao final completou-se o volume para 1000 mL com água milli-Q.

O controle negativo foi preparado com solução aquosa de NaCl 0,15 mol/L (1,5 mL) e solução de “*Brilliant Blue Coomassie*” (15 mL). O teor de proteínas foi medido em triplicata no espectrofotômetro de ultravioleta-visível UV-VIS, no comprimento de onda de 595 nm.

4.10 Preparação das amostras dos ninhos de *Tetrapedia diversipes*, de anteras e néctar de Manjeriço.

As amostras de ninhos e anteras foram pesadas e maceradas até pó (**Tabela 2**). As amostras de ninhos, de anteras e de néctar foi adicionado à solução aquosa de NaCl (1,5 mL). Em seguida as amostras foram filtradas em um funil de vidro contendo um pedaço de algodão tratado. Transferiu-se para um frasco de vidro e adicionou-se a solução de “*Brilliant Blue Coomassie*” (15 mL). As medidas do teor de proteínas foram feitas em triplicata no espectrofotômetro de UV- VIS a 595 nm.

4.11 Preparação dos padrões de alditóis peracetilados

Inicialmente prepararam-se os padrões de carboidratos utilizando para tanto, padrões de glicose, galactose, manose, e xilose. A preparação dos padrões consistiu na dissolução do carboidrato (200 mg) em água destilada (2,0 mL). Em seguida, adicionou-se boroidreto de sódio (~ 60 mg), à 40°C e a temperatura foi mantida por 90 minutos e depois uma noite a 4°C, protegido da luz.

Posteriormente adicionou-se ácido acético glacial (10 mL), uma solução 1:1 de piridina e anidrido acético (16 mL), e deixou-se a reação por 48 horas à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, realizou-se a extração utilizando uma solução de sulfato de cobre (II) 30% (25 mL) e diclorometano destilado (3x50 mL). O sulfato de cobre residual, que ficou presente na fase orgânica, foi retirado pela extração com água destilada.

Por fim, a solução reacional foi seca sobre sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. Para confirmar a presença do produto de interesse realizou-se a cromatografia em camada delgada (CCD)

utilizando como eluente diclorometano:acetato de etila bidestilado 40% e como revelador metanol:ácido sulfúrico 30%. Os rendimentos obtidos nas sínteses dos padrões estão mencionados na **Tabela 21**.

Os padrões foram então, injetados no CG-EM para comprovação dos compostos de interesse.

Tabela 21. Rendimento obtido na síntese dos alditóis peracetilados

Alditol Peracetilado	Rendimento da reação (%)
Hexa-acetato de D-glicitol	18
Hexa-acetato de galactitol	5
Hexa-acetato de D-manitol	6
Penta-acetato de xilitol	2

Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia flash de sílica gel (~ 6g) eluída com hexano:acetato de etila bidestilado 20% e hexano:acetato de etila bidestilado 50%. Com exceção do padrão de galactose, onde a segunda fração do eluente consistiu em uma solução de hexano:acetato de etila bidestilado 35% e a terceira de hexano:acetato de etila bidestilado 50%.

Para confirmar a separação do produto de interesse realizou-se a cromatografia em camada delgada (CCD) de cada fração recolhida, utilizando como eluente diclorometano:acetato de etila bidestilado 40% e como revelador metanol:ácido sulfúrico 30%.

Por fim, as frações que continham o produto de interesse foram caracterizadas espectroscopicamente (**Tabelas 22 a 24**).

Tabela 22. Deslocamentos químicos (δ) dos alditóis peracetilados
RMN de ^1H

Alditol Peracetilado	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
Hexa-acetato de D-glicitol	4,22	5,10	5,28	5,26	4,90	4,12
Hexa-acetato de galactitol	4,27	5,29	5,35	5,35	5,29	4,27
Hexa-acetato de D-manitol	4,08	4,92	5,30	5,30	4,92	4,08
Penta-acetato de xilitol	4,44	5,34	5,45	5,34	4,44	-

Tabela 23. Constantes de acoplamento (em Hz) dos alditóis peracetilados

Alditol Peracetilado	J_{1,2}	J_{2,3}	J_{3,4}	J_{4,5}	J_{5,6}
Hexa-acetato de D-glicitol	4,0	6,4	4,3	6,8	3,6
Hexa-acetato de galactitol	4,6	1,8	10,0	1,8	4,6
Hexa-acetato de D-manitol	2,6	9,0	2,2	9,0	2,6
Penta-acetato de xilitol	4,2	5,2	5,2	4,2	-

Tabela 24. Deslocamentos químicos (δ) dos alditóis peracetilados
RMN de ^{13}C

Alditol Peracetilado	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Hexa-acetato de D-glicitol	62,0	69,6	68,7	69,0	68,9	61,6
Hexa-acetato de galactitol	62,3	67,8	67,7	67,7	67,8	62,3
Hexa-acetato de D-manitol	62,0	68,1	67,7	67,7	68,1	62,0
Penta-acetato de xilitol	62,0	69,4	69,3	69,4	62,0	-

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and rounded ends. The word "CONCLUSÕES" is centered within the scroll in a black, serif, all-caps font.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A composição química dos óleos florais de 31 espécies simpátricas de Malpighiaceae se altera quali e quantitativamente de acordo com os gêneros. Assim os ácidos graxos presentes nos elaióforos de *Byrsonima*, *Heteropterys* e *Peixotoa* são **3,7-dissubstituídos**, enquanto o óleo floral de *Peixotoa reticulata*, é composto de **acil-glicerois e ácidos graxos não substituídos**. Tal anomalia foi em parte explicada pelo fato desta ser esta uma espécie autógama. Espécies do gênero *Banisteriopsis* secretam ácidos graxos florais **3,9-dissubstituídos**. A secreção dos elaióforos da espécie *Pterandra pyroidea* apresenta composição química simples com ácidos graxos contendo substituintes (acetoxi) nas posições 5 e 7, e a ausência de substituintes na posição β - dos ácidos graxos florais poderia levar a uma seleção dos polinizadores.

Finalmente este estudo indica claramente que as estruturas dos ácidos graxos, muitos dos quais são inéditos (ácidos 3,9-diacetoxi-alcanoico, ácidos 3-hidroxi-9-acetoxi-alcanoico; e ácidos 5,9-diacetoxi-alcanoico; Tabela 6 pg. 43), estão claramente relacionados à classificação botânica exceto pelas espécies de *Banisteriopsis campestris*, *B. megaphylla*, *B. argyrophylla*, *Heteropterys tomentosa*.

A estereoquímica relativa do **ácido pterândrico** (ácido 5,7-diacetoxi-docosanóico), um produto natural inédito foi demonstrada ser *anti* através de síntese.

Foram analisadas 47 amostras de óleos florais de espécies da família Krameriaceae revelando a presença de ácidos graxos livres com 16 a 22 átomos de carbono e substituintes na posição β (-OAc, ou -OH).

Finalizando nosso estudo as análises dos recursos florais coletados por *Tetrapedia diversipes*, uma abelha solitária, para construir seus ninhos revelaram que os teores de carboidratos e proteínas presentes nas massas claras dos ninhos e nas anteras de Manjeriço são semelhantes concluindo-se que o pólen é o maior responsável pelo teor de carboidratos e proteínas da massa alimentar.

Esta análise permitiu também confirmar a presença de xilose, manose, galactose e glicose nos ninhos de *Tetrapedia diversipes* e no pólen de Manjeriço (*Ocimum basilicum*) onde há predominância da galactose e glicose em relação à xilose e manose.

6. REFERÊNCIAS

- Anderson WR, Anderson C, Davis CC. 2006. Malpighiaceae. <http://herbarium.lsa.umich.edu/malpigh>. Acessado em 1 November 2010.
- Angyal SJ, Fur RL, Gagnaire D. 1972. Conformations of acyclic sugar derivatives. *Carbohyd. Res.* **23**: 121-134.
- Angyal SJ, Fur RL. 1980. The ¹³C-N.M.R. spectra of alditols. *Carbohyd. Res.* **84**: 201-209.
- Angyal SJ, Greeves D, Mills JA. 1974. Complexes of Carbohydrates with Metal Cations. *Aust. J. Chem.* **27**: 1447-1456.
- Anthony SJ, Zuchowski W, Setze WN. 2009. Composition of the Floral Essential Oil of *Brugmansia suaveolens*. *Rec. Nat. Prod.* **3**: 76-81.
- Baker HG, Baker I. 1982. *Chemical constituents of néctar in relation to pollination mechanisms e phylogeny*. In: Nitecki M, ed. *Biochemical aspects of evolutionary biology*: University of Chicago Press, Chicago; 131-71.
- Baker HG, Baker I. 1983. A brief historical review of the chemistry of floral néctar. *In The Biology of Néctaries*, Ed. B Bentley, T Elias, pp. 126–152. New York: Columbia Univ. Press
- Baker HG, Baker I. 1986. The ecology and significance of amino acids in floral néctar. *Plant Syst Evol*; **151**:175-86.
- Bezerra ELS, Machado IC, Mello MAR. 2009. Pollination networks of oil-flowers: a tiny world within the smallest of all worlds. *J. Anim. Ecol.* **78**: 1096-1101.
- Biermann CJ, McGinnis GD. 1989. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. Florida. p.99.
- Biermann CJ, McGinnis GD. 1989. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. Florida. p.99.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochem.* **72**: 248 – 254
- Brummer Y, Cui SW. 2005. *Food Carbohydrates - Chemistry, Physical Properties, and Applications*. Edited by Steve W. Cui. CRC Press 2005
- Buchmann SL, Buchmann MD. 1981. Anthecology of Mouriri myrtilloides (Melastomataceae: Memecyleae), an Oil Flower in Panama. *Reproductive Botany* **13**: 7-14.

- Buchmann SL, Nabhan GP. 1996.** *The Forgotten Pollinators*. Washington, DC: Island. 292 pp
- Buchmann SL. 1987.** The ecology of oil flowers and their bees. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 343-369
- Cappellari SC, Haleem MA, Marsaioli AJ, Tidon R, Simpson B B. 2011.** *Pterandra pyroidea*: a case of pollination shift within Neotropical Malpighiaceae. *Ann. Bot.-London.* **107**: 1323-1334
- Carol AK, David WI, Nickolas MW. 1998.** Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**:83–112.
- Carvalho PD, Borba EL, Lucchese A M. 2005.** Variação no número de glândulas e produção de óleo em flores de *Stigmaphyllonh paralias* A. Juss. (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 19: 209 – 214.
- Chen L, Ding J, Cheng Y, Wang L, Jing X, Wang F. 2010.** Twofold terminal post-functionalization of acetylacetone with hole- and electron-transporting fragments. *Tet. lett.* **51**: 4612 – 4616.
- Costa CBN, Costa JAS, Ramalho M. 2006.** Biologia reprodutiva de espécies simpátricas de malpighiaceae em dunas costeiras da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 103 – 114.
- Davis CC, Anderson WR, Donoghue MJ. 2001.** Phylogeny of Malpighiaceae: evidence from chloroplast NDHF and TRNL-F nucleotide sequences. *Am. J.Bot.* **88**: 1830–1846.
- Davis CC, Anderson WR. 2010.** A complete generic phylogeny of Malpighiaceae Inferred from nucleotide sequence data and morphology. *Am. J. Bot.* **12**: 2031-2048.
- Davis CC, Bell CD, Mathews S, Donoghue MJ. 2002.** Laurasian migration explains Gondwanan disjunctions: evidence from Malpighiaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**: 6833–6837.
- Dicke M, Sabelis MW. 1988.** Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. *Functional Ecology* **2**: 131-139.
- Dórea MC, Aguiar CML, Figueroa LER, Lima LCLE, Santos FAR. 2010.** Pollen residues in nests of *Centris tarsata* Smith (Hymenoptera, Apidae, Centridini) in a tropical semiarid area in NE Brazil. *Apidologie* **41**: 557–567.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956.** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.* 28: 350 – 356.

- Durmi K, Seipold L, Schmidt J, Gerlach G, Dotterl S, Ellis AG, Wessjohan LA. 2008.** Non-volatile floral oils of *Diascia* spp. (Scrophulariaceae). *Phytochemistry* **69**: 1372-1383.
- Eisner T, Meinwald J. 1966.** Defensive Secretions of Arthropods. *Sciences* **153**: 1341-1350.
- Frankie GW, Opler PA, Bawa KS. 1976.** Foraging behavior of solitary bees. Implications for outcrossing of a neotropical forest tree species. *J. Ecol.* **64**: 1049-1057.
- Frankie GW, Vinson SB, Williams H. 1989.** Ecological and evolutionary sorting of 12 sympatric species of *Centris* bees in Costa Rican dry forest. In *J. H. Bock and Y. B. Linhart (Eds.). The Evolutionary Ecology of Plants*, pp. 535-549. Westview Press, Boulder, Colorado.
- Freeman CE, Reid WH, Becvar JE, Scogin R. 1984.** Similarity and apparent convergence in the nectar-sugar composition of some hummingbird-pollinated flowers. *Bot. Gaz.* **145**: 132-135.
- Freeman CE, Worthington RD. 1985.** Some floral nectar-sugar compositions of species from Southeastern Arizona and Southwestern New Mexico. *Madroño* **32**: 78-86.
- Gathmann A, Tscharrntke T. 2002.** Foraging ranges of solitary bees. *J. Anim. Ecol.* **71**:757–764.
- Genini J, Morellato LPC, Guimarães PR, Olesen JM. 2010.** Cheaters in mutualism networks. *Biology Lett.* **6**: 494-497.
- Gonçalves L, Silva CI, Buschini MLT. 2012.** Collection of Pollen Grains by *Centris* (*Hemisiella*) *tarsata* Smith (Apidae: Centridini): Is *C. tarsata* an Oligolectic or Polylectic Species? *Zoological Studies* **51**: 195-203
- GOTTSBERGER G, SCHRAWEN J, LINSKENS HF. 1984.** Amino acids and sugars in nectar, and their putative evolutionary significance. *Plant Syst. Evol.* **145**: 55-77.
- Harborne JB. 1993.** Introduction to Ecological Biochemistry. 4th Ed. Elsevier Academic Press (2007) UK.
- Hayashi H, Nakanishi K, Brandon C, Marmur J. 1973.** Structure and Synthesis of Dihydroxypentyluracil from Bacteriophage SP-15 Deoxyribonucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **95**:8749-8757
- Higgins MK, Bly RS, Morgan SL. 1994.** Differentiation of isomeric alditol hexaacetates and identification of aldohexoses by Electron impact mass. *Anal. Chem.* **66**: 2656-2668.
- Hocking B, Sharplin CD. 1965.** Flower basking by Arctic insects. *Nature* **206**: 215.

- Imperatriz-Fonseca VL, Santos IA. 2006.** As Abelhas do Brasil, Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/>>, Acesso em: 31 de outubro de 2008.
- Jaroslav S, Cerny M, Kocourek J, Pacak J. 1963.** The monosaccharides. *Publishing House of The Czechoslovak Academy of Sciences, Prague*, p. 622.
- Karlson P, Butenandt A. 1959.** Pheromones (*Ectohormones*) in insects. *Ann. Rev. J. Entomol.* **4**: 39-58.
- Kevan PG. 1972.** Sun-tracking solar furnaces in high Arctic flowers: significance for pollen and insects. *Science* **189**: 723-726.
- Law JH, Regnier FE. 1971.** Pheromones. *Ann. Rev. Biochem.* **40**: 533-548.
- Linsley EG, MacSwain JW, Smith RF. 1956.** Biological observations on *Xenoglossa fulva* Smith with some generalizations on biological characters of other eucerine bees (*Hymenoptera: Anthophoridae*). *Bull. S. Calif. Acad. Sci.* **54**: 128-141.
- MacConnell JG, Blum MS. 1971.** The chemistry of fire ant venom. *Tetrahedron* **27**:1129 – 1139.
- McGinley RJ, Rozen Jr JG. 1987.** Nesting biology, immature stages, and phylogenetic placement of the Palaearctic bee *Pararhophites* (Hymenoptera: Apoidea). *Am. Mus. Novitates* **2903**: 1–21.
- McGinley RJ. 1981.** Systematics of the Colletidae based on mature larvae with phenetic analysis of apoid larvae (Hymenoptera: Apoidea). *University of California Publications in Entomology* **91**: 1–307.
- McGinley RJ. 1989.** A catalog and review of immature Apoidea (Hymenoptera). *Smithson. Contrib. Zool.* **494**: 1–24.
- McGoran EC, Melton C, Taich D. 1996.** GC/MS of unknown esters for teaching MS fragmentation patterns. *J. Chem. Educ.* **73**: 88-92
- Memmett J. 1999.** The structure of a plant-pollinator food web. *Ecol. Lett.* **2**: 276-280.
- Michener CD. 2007.** *The bees of the world*. Second Ed. The Johns Hopkins University Press Baltimore.
- Nicholson SW, Thornburg R. 2007.** Néctar chemistry. In: Nicholson SW, Nepi M, Pacini E, eds. Néctaries and néctar: Springer, Berlin 215-265.
- Nogueira NP. 1997.** Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão. Ed. Nogueirapis, São Paulo

- Oku N, Takada K, Fuller RW, Wilson JA, Peach ML, Pannell LK, McMahon JB, Gustafson KR. 2010.** Isolation, structural elucidation and absolute stereochemistry of enigmazole A, a cytotoxic phosphomacrolide from Papua New Guinea marine sponge *Cinachyrella enigmatica*. *JACS***132**: 10278 – 10285.
- Pansarin LM, Castro MM, Sazima M. 2009.** Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Bot. J. Linn. Soc.* 59: 408-415.
- Parkes AS, Bruce HM. 1961.** Olfactory stimuli in mammalian reproduction. *Science* **134**: 1049-1054.
- Pearson DE, Buehler CA. 1974.** Potassium tert-butoxide in synthesis. *Chem. Rev.* **74**: 45–86
- PERCIVAL MS. 1961.** Types of nectar in Angiosperms. *New Phytol.* **60**: 235-281.
- Peruquetti RC. 2006.** *A Origem das Abelhas*, Disponível em: <<ftp://ftp.ufv.br/dbg/apiario/origemdasabelhas.pdf>>, Acesso em: 31 de outubro de 2008.
- Pianaro A., 2007.** Ecologia Química de Abelhas Brasileiras, *Dissertação de Mestrado*, Unicamp.
- Pomeranz Y, Meloan CE. 1994.** Carbohydrates. Eds. *Food Analysis: Theory and Practice*. 625. New York, Chapman & Hall. 1994
- Reis MG, 2005.** Caracteres químicos em estudos de filogenia e biologia de polinização de espécies de *oncidinae (orchidaceae)* *Tese de Doutorado*, Unicamp.
- Reis MG, de Faria AD, Amaral MCE, Marsaioli AJ. 2003.** Oncidinol—a novel diacylglycerol from *Ornithophora radicans* Barb. Rodr. (Orchidaceae) floral oil *Tetrahedron Letters* **44**: 8519-8523.
- Reis MG, de Faria AD, dos Santos IA, Amaral MCE, Marsaioli AJ. 2007.** Byrsonic Acid—the Clue to Floral Mimicry Involving Oil-Producing Flowers and Oil-Collecting Bees. *J. Chem. Ecol.* **33**: 1421-1429.
- Rico-Gray V, Oliveira PS. 2007.** *The ecology and evolution of ant-plant interactions*. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Rozen Jr JG. 1994.** Biology and immature stages of some cuckoo bees belonging to Brachynomadini, with descriptions of two new species (Hymenoptera: Apidae: Nomadinae). *Am. Mus. Novitates* **3089**: 1–23.

- Rychnovsky SD, Rogers BN, Yang G. 1993.** Analysis of two ^{13}C nmr correlations for determining the stereochemistry of 1,3-diol acetones. *J. Org.Chem.* **58**: 3511-3515.
- Santos AI, Machado IC, Gaglianoni MC. 2007.** História natural das abelhas coletoras de óleo. *Oecologia Brasilienses*, **11**: 544 – 557.
- Santos IA, 2002.** A Vida de uma Abelha Solitária, Disponível em: <<http://eco.ib.usp.br/beelab/>>. Acesso em: 31 de outubro de 2008.
- Santos IA, Melo GAR, Rozen JG. 2002.** Biology and Immature Stages of the Bee Tribe Tetrapediini (Hymenoptera:Apidae), *Am. Mus. Novitates* 3337:1–45.
- Santos IA, Naxara SRC, Patricio EFL. 2006.** Notes on the morphology of *tetrapedia diversipes* klug 1810 (tetrapediini, apidae), an oil-collecting bee. *Braz.J. morphol. Sci.* **23**: 425-430.
- Sazima M, Sazima I. 1989.** Oil-gathering bees visit flowers of eglandular morphs of the oilproducing Malpighiaceae. *Botanica Acta* **102**: 106-111.
- Sbarbati A, Osculati F. 2006.** Allelochemical communication in vertebrates: Kairomones, Allomones and Synomones. *Cells Tissues Organs* **183**: 206-219.
- Seigler DS, Simpson BB, Martin C, Neff JL. 1978.** Free 3-Acetoxyfatty acids in floral glands of *Krameria* species. *Phytochemistry* **17**: 995-.
- Seibold L, Gerlach G, Wessjohann L. 2004.** A New Type of Floral Oil from *Malpighia coccigera* (Malpighiaceae) and Chemical Considerations on the Evolution of Oil Flowers *Chemistry & Biodiversity* **1**: 1519-1528.
- Semida FMM. 2000.** Nesting [behaviour of Anthophora pauperata \(Hymenoptera: Anthophoridae\) in the St. Katherine](#) ecosystem, Sinai. *Egyp. J. Biol.* **2**:118 - 124
- Simpson B. B., Neff. J. L., 1981,** Floral rewards: alternatives to pollen and néctar. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **68**: 301-322.
- Simpson B.B., Seigler D. S., Neff J.L. 1979.** Lipids from the Floral Glands of *Krameria*. *Biochem. Sys. Ecol.* **7**: 193-194.
- Simpson BB, Neff JL, Seigler DS. 1977.** *Krameria*, free fatty acids and oil-collecting bees *Nature*, **267**: 150-151.
- Simpson BB. 1982.** *Krameria* (krameriaceae) flowers: orientation and elaiophore morphology. *Taxon*, **31**: 517-528.
- SIMPSON, B. B. 1989.** Pollination biology and taxonomy of *Dinemandra* and *Dinemagonum* (Malpighiaceae). *Syst. Bot.* **14**: 408-426.

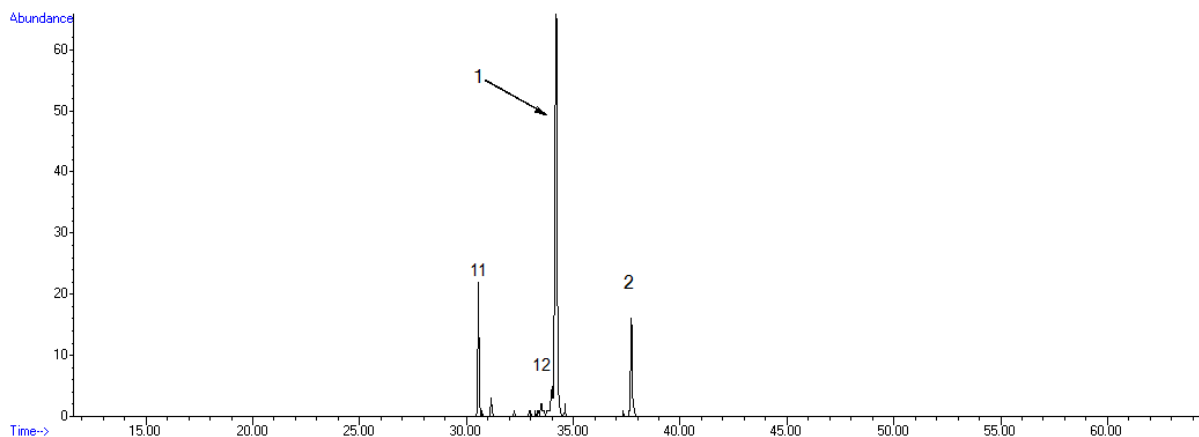
- Smith AP. 1975.** Insect pollination and heliotropism in *Oritrophium lemnophilum* (Compositae), of the Andean paramos. *Biotropica* **7**: 284-286.
- Stpiczynska MS, Davies KL. 2008.** Elaiophore structure and oil secretion in flowers of *oncidium trulliferum* lindl. and *ornithophora radicans* (rchb.f.) Garay & pabst (onciidiinae: orchidaceae). *Ann. Bot.-London* **101**: 375-384.
- Susan RM, Cortón E. 2004.** *Bioanalytical Chemistry*. Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Tormena CF, Dias CL, Rittner R. 2005.** Orbital interactions and their effects on ¹³C nmr chemical shifts for 4,6-disubstituted-2,2-dimethyl-1,3-dioxanes. A theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **109**: 6077–6082.
- Van Handel E, Haeger JS, Hansel CW. 1972.** The sugars of some Florida nectars. *Am. J. Bot.* **59**: 1030-1032.
- Vinson SB, Frankie GW, Williams HJ. 1996,** Chemical Ecology of Bees of the Genus *Centris* (Hymenoptera:Apidae), *Florida Entomologist*, **79**:109 – 129.
- Vinson SB, Frankie GW, Williams HJ. 2006.** Nest Liquid Resources of Several Cavity Nesting Bees in the Genus *Centris* and the Identification of a Preservative, Levulinic Acid, *J. Chem. Ecol.* **32**: 2013 –2021.
- Vinson SB, Williams HJ, Williams HJ, Shrum G. 1997.** Floral Lipid Chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpigheaceae) and a Use of Floral Lipids by *Centris* Bees (Hymenoptera: Apidae). *Biotropica*, **29**: 76-86.
- Vogel S. 1969.** Flowers offering oil instead of néctar. *XI Bot. Congr. Abstr.* Seattle, Washington.
- Vogel S. 1974.** Ölblumen und ölsammelnde Bienen. Akademie der Wissenschaften und der Litertur, Mainz.
- Vogel S. 1976.** Oil-collecting bees of the Old World and their flowers. August 1976. Abst. 15th *Int. Entomol. Congr.*, Washington, DC.
- Vogel S. 19781.** Abdominal oil-mopping-a new type of foraging in bees. *Naturwissenschaften* **67**: 5627
- Vogel S. 2009.** The non-African oil-flowers and their bees: A brief survey. In: *Proceeding of 35th Annual Conference of the South African Association of Botanists (SAAB)*. Stellenbosch University, South Africa.
- Vogel S., Machado IC. 1991.** Pollination of four sympatric species of *Angelonia* (Scrophulariaceae) by oil-collecting bee in NE. Brazil. *Plant syst. Evol.* **178**: 153-178.

- Von Frisch K.** 1972. *Bees - Their Vision, Chemical, Senses, and Language*. Cornell University Press.
- Wackers FL, Romeis J, Van Rijn P.** 2007. Nectar and Pollen Feeding by Insect Herbivores and Implications for Multitrophic Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* **52**: 301–23
- Wcislo WT, Cane JH.** 1996. Floral Resource Utilization by Solitary Bees (Hymenoptera:Apoidea) and Exploitation of their Stored Foods by Natural Enemies, *Annual Review of Entomology*, **41**: 257 – 286.
- Wilson EO, Bossert WH.** 1963. Chemical communication among animals. *Recent Progr.Hormone Res.* **19**: 673-716.
- Wittmann D, Scholz E.** 1989. Nectar dehydration by male carpenter bees as preparation for mating flights. *Behav. Ecol Sociobiol.* **25**: 387-391
- Zhao N, Zhou P., Berova N., Nakanishi K.** 1995. Combined synthetic/CD strategy for the preparation and conFigurational assignments of model acyclic 1,3-polyols with a 1,2-diol terminal. *Chirality*, **7**: 636-651.

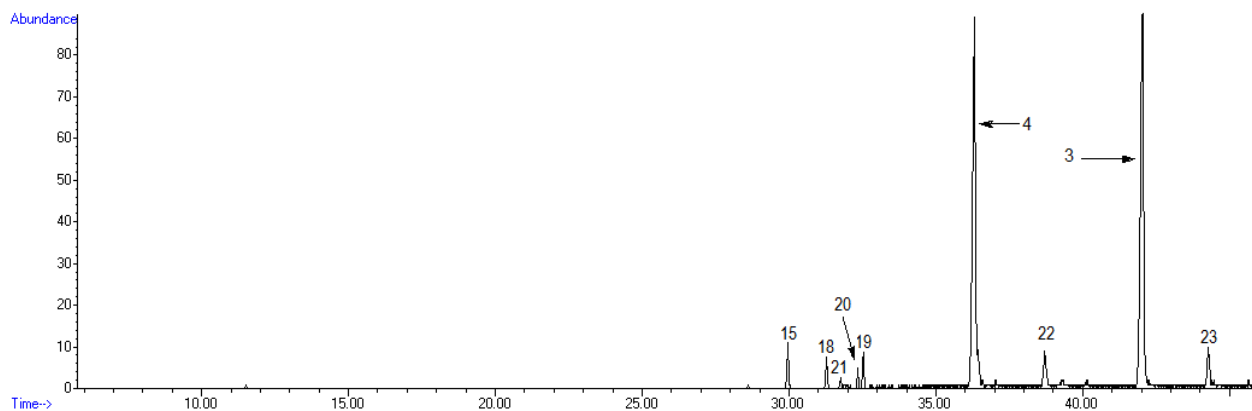
Anexo 1

Cromatogramas do extrato bruto de acetato de etila de elaióforos (óleos florais), N° escrito sobre cada pico é o número composto na **Tabela 7 e Tabela 8**.

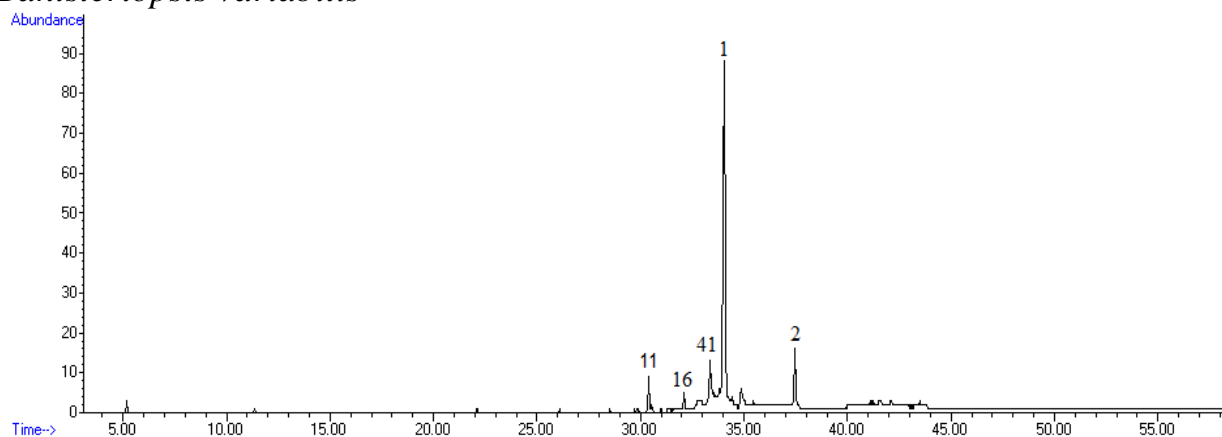
Banisteriopsis anisandra



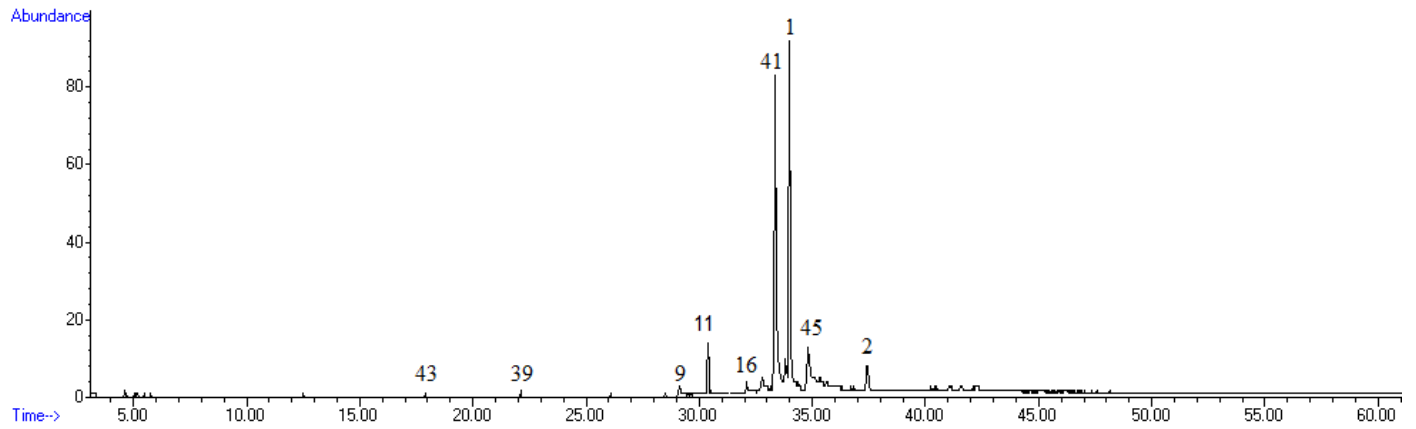
Banisteriopsis laevifolia



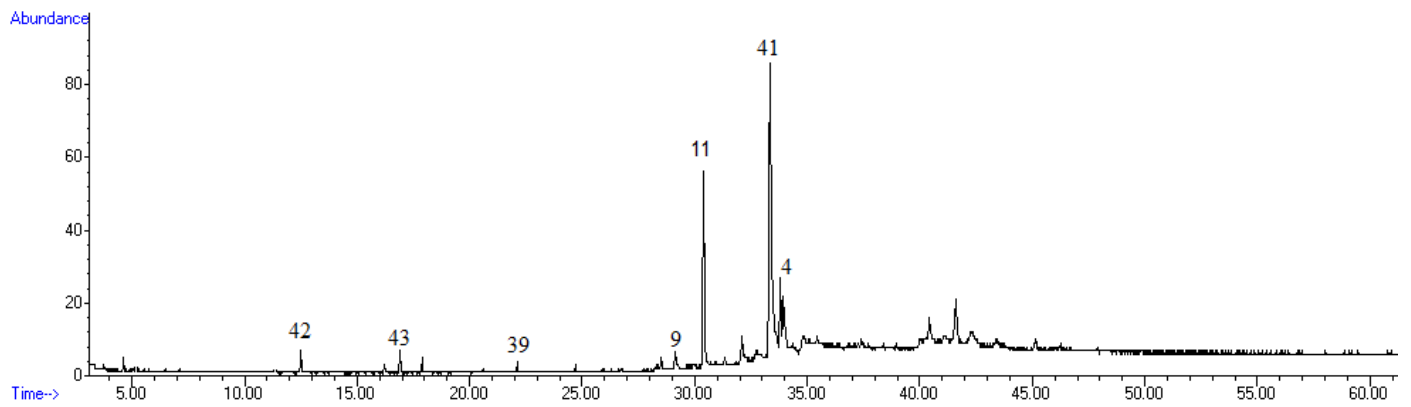
Banisteriopsis variabilis



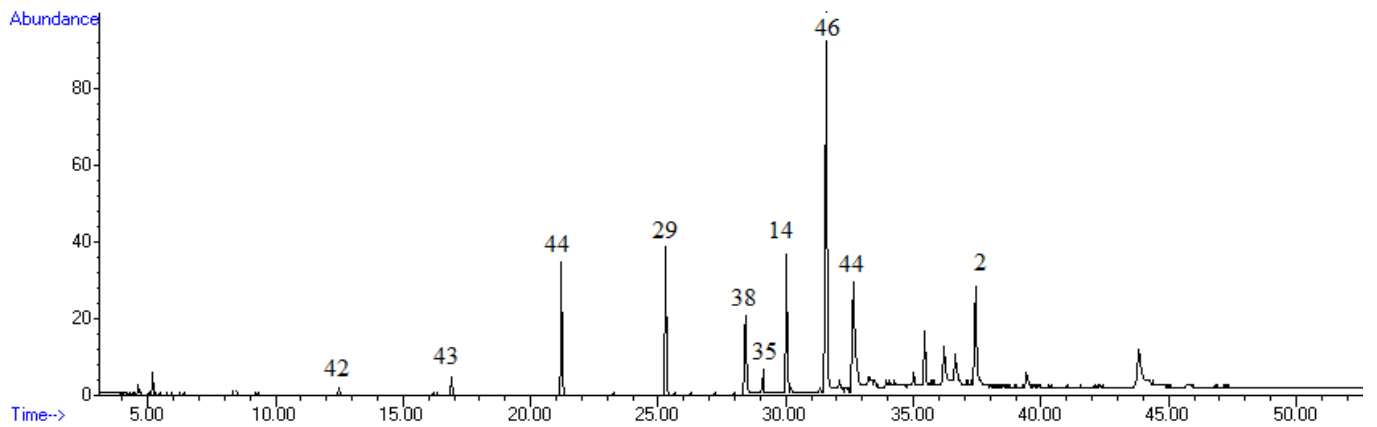
Banisteriopsis latifolia



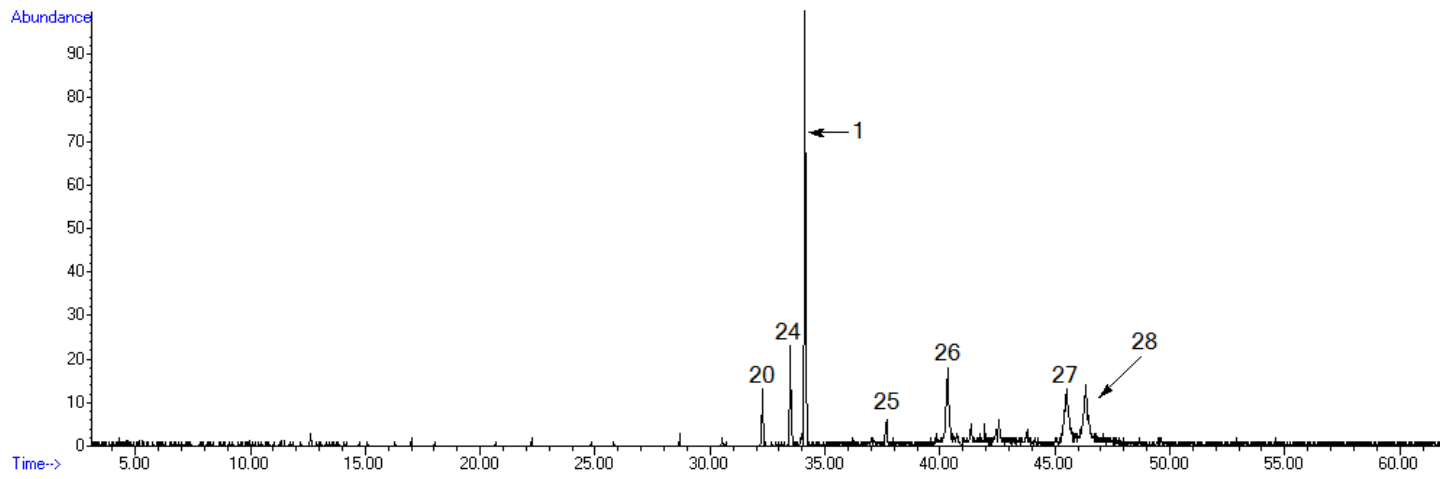
Banisteriopsis megaphylla



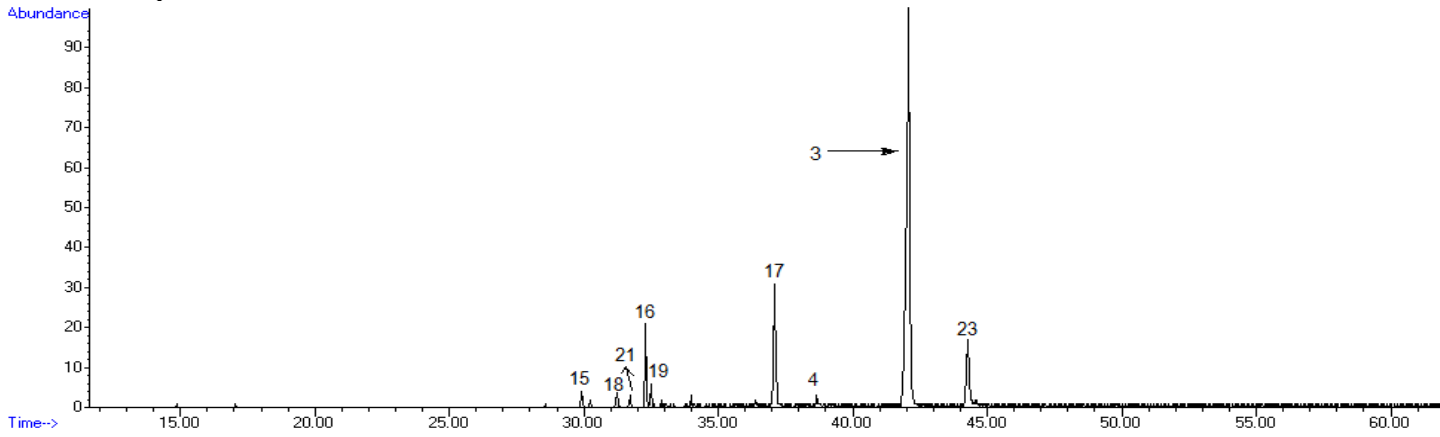
Banisteriopsis publipetala



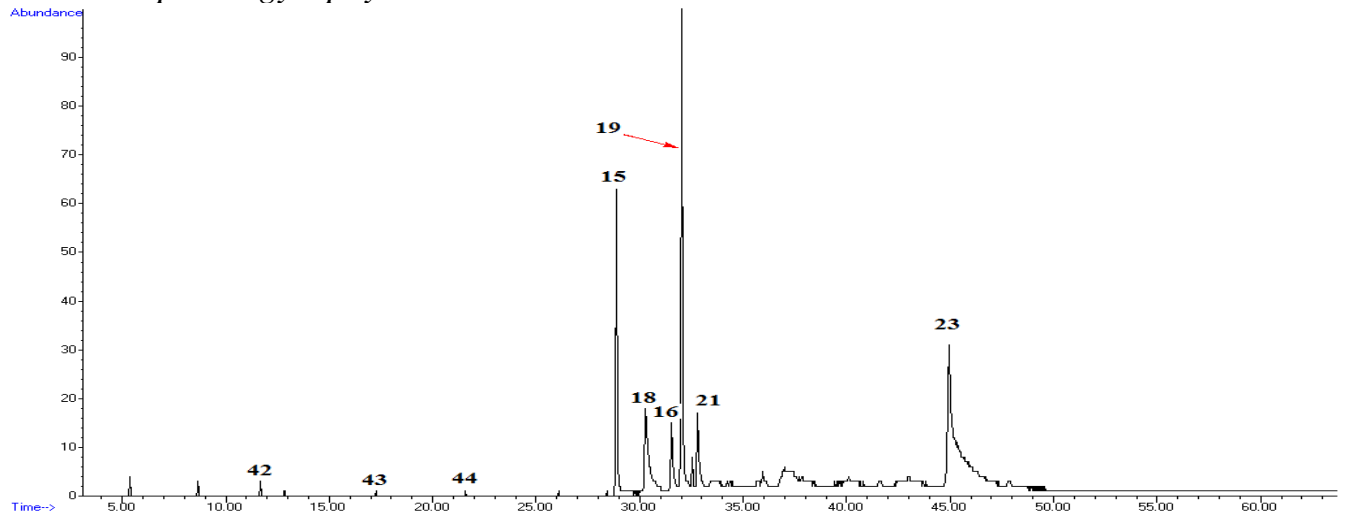
Banisteriopsis campestris



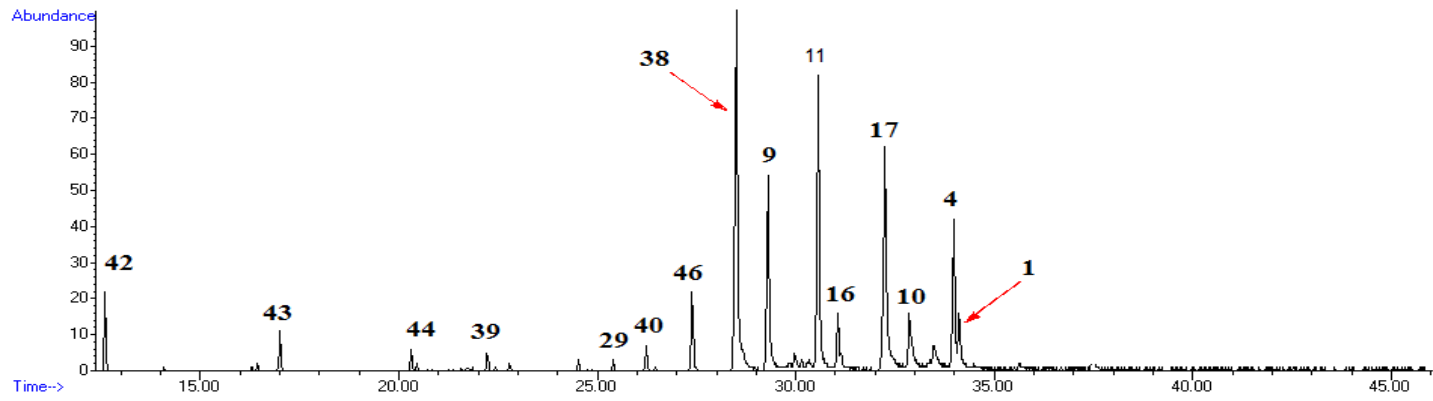
Banisteriopsis stellaris



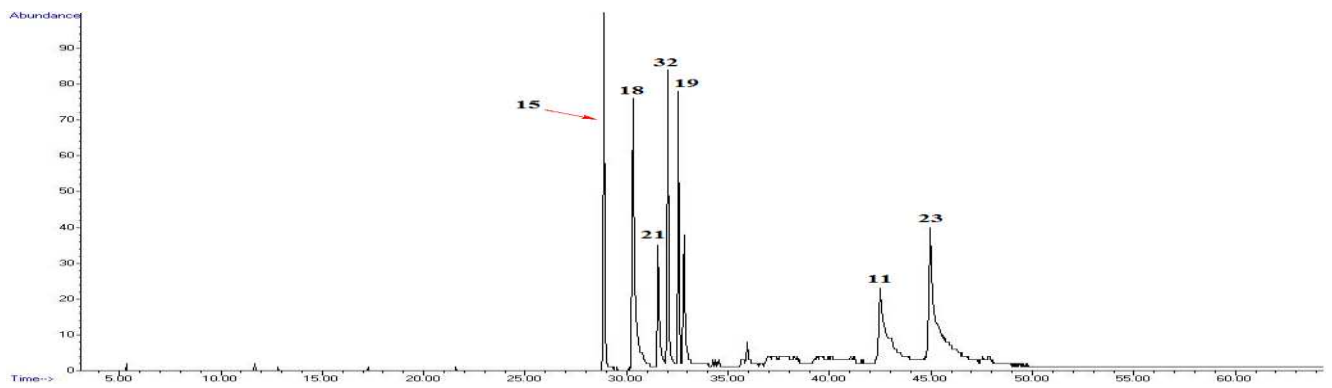
Banisteriopsis argrophylla



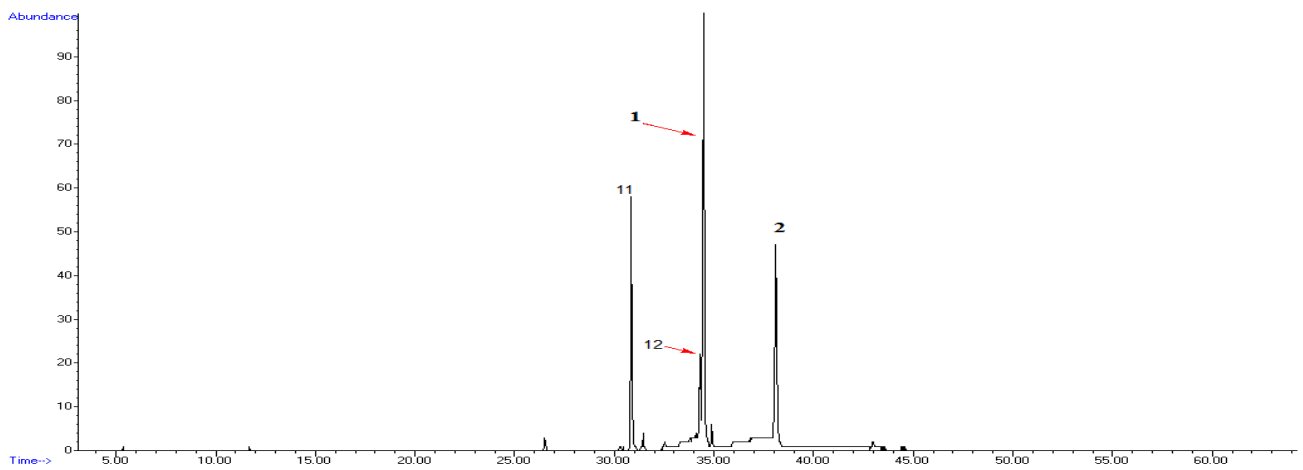
Banisteriopsis malifolia



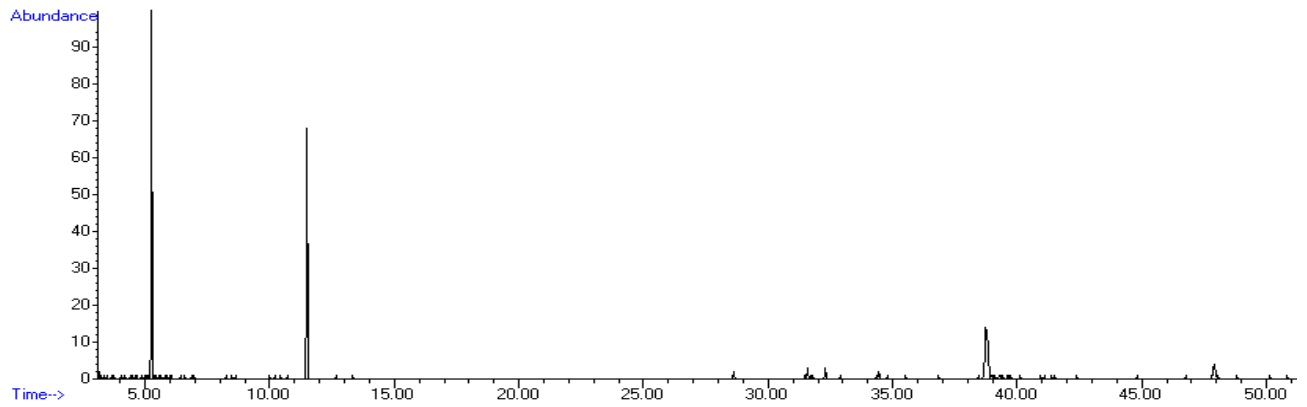
Ban nummifera



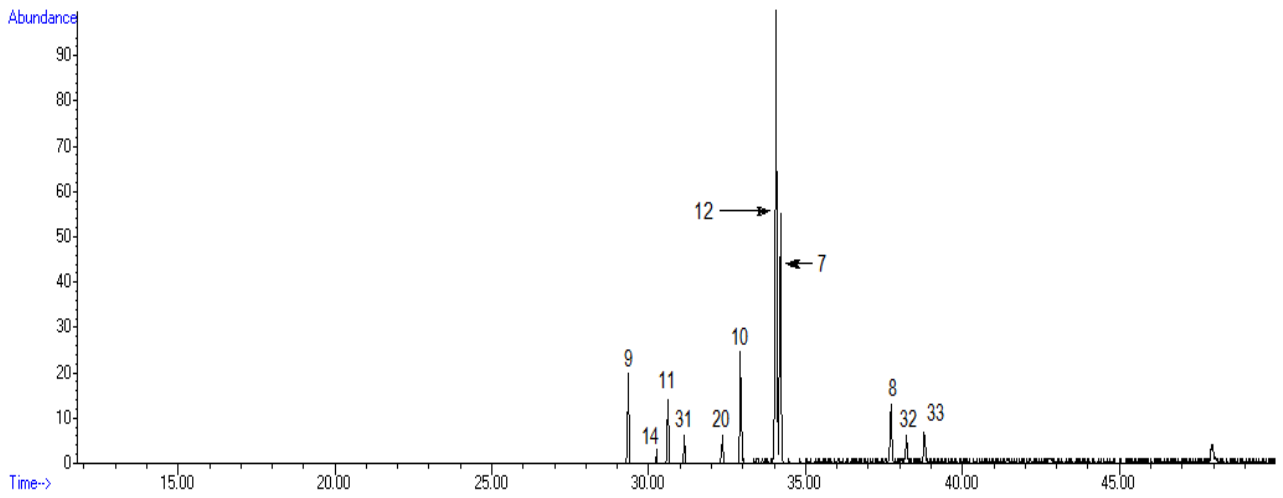
Ban schizoptera



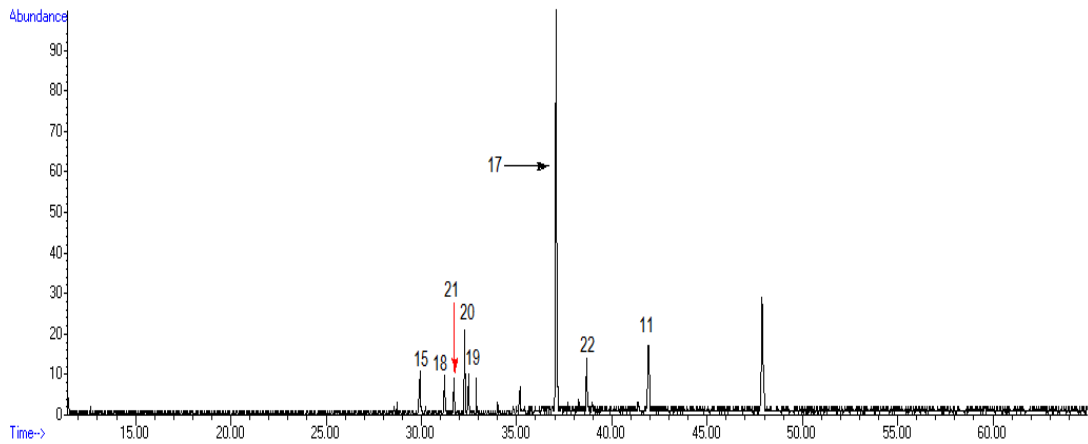
Byrsonima subterranea



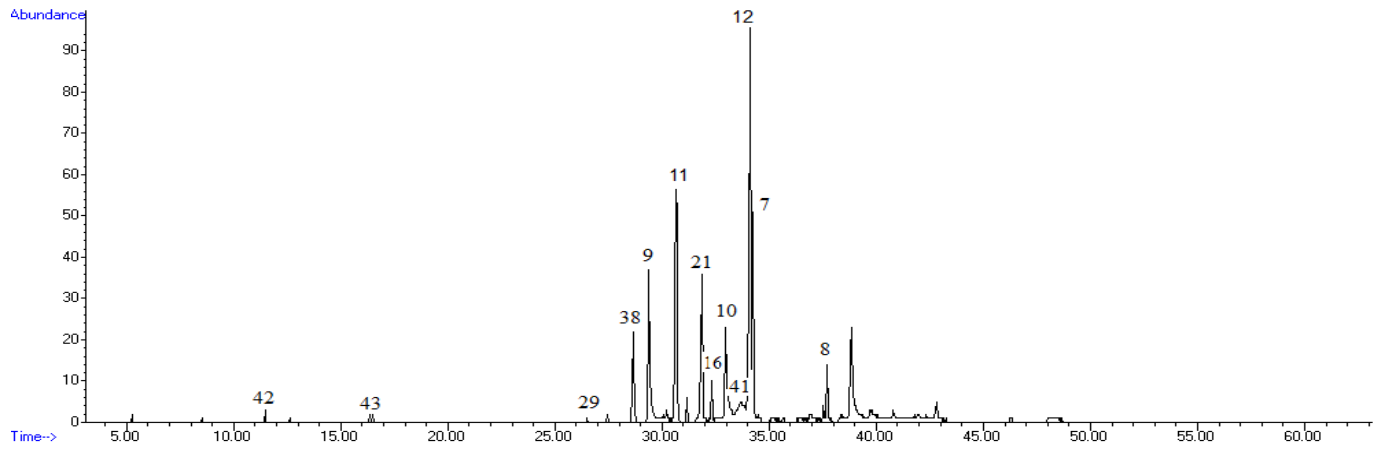
Byrsonima laxiflora



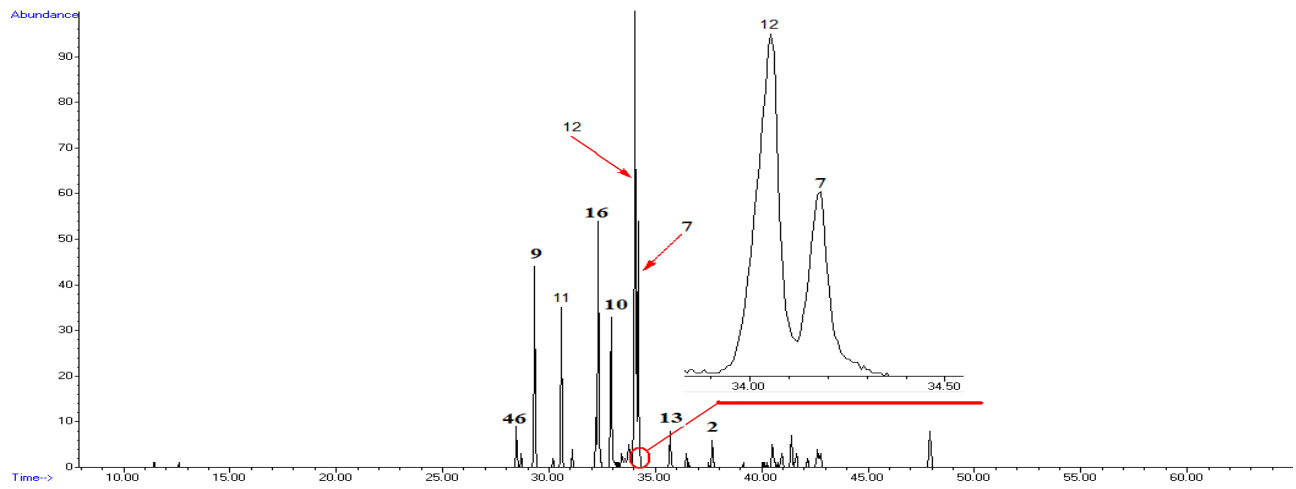
Byrsonima guilleminiana



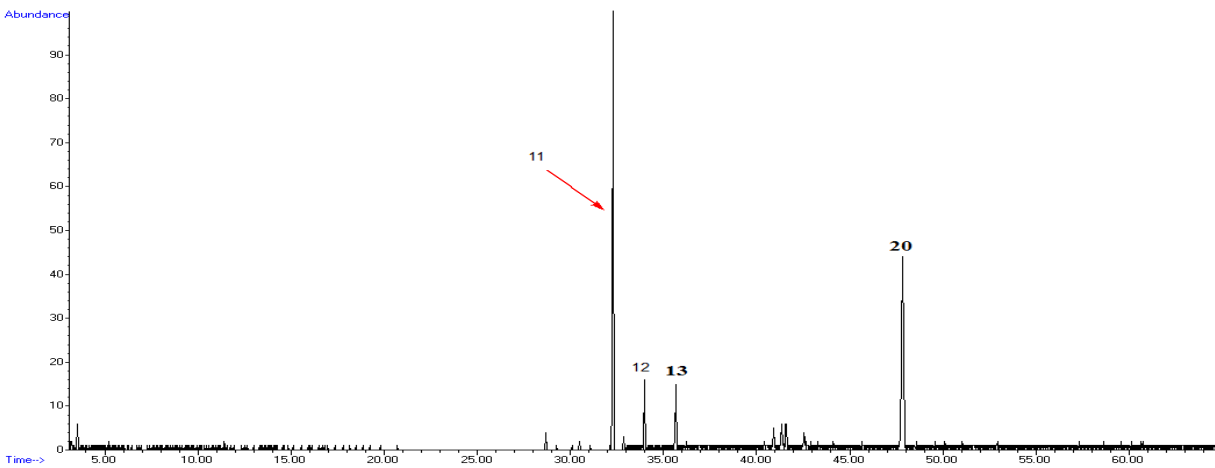
Byrsonima verbascifolia



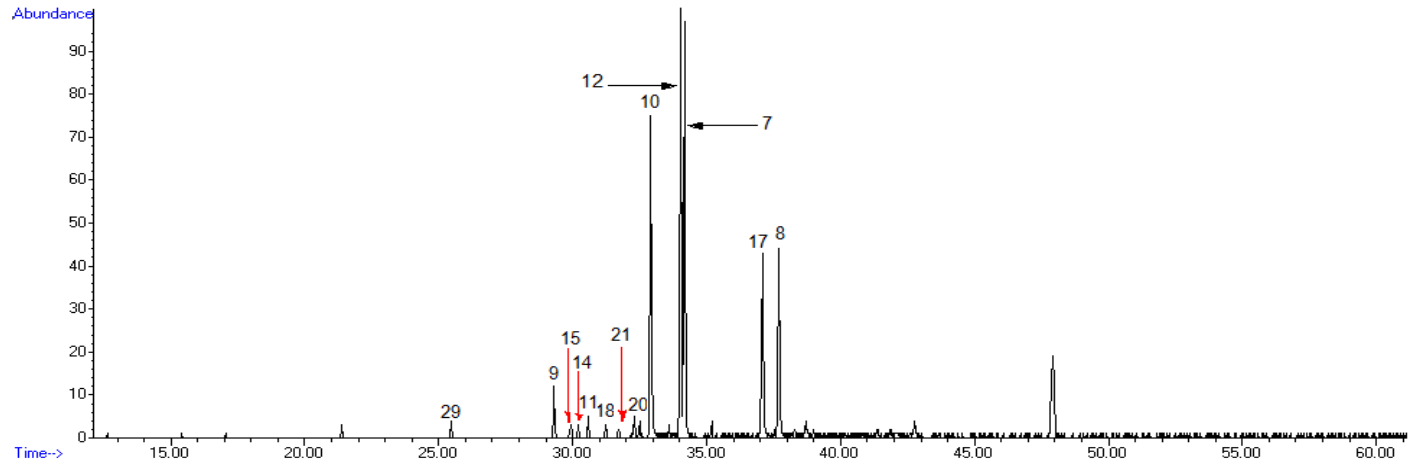
Byrsonima rigida



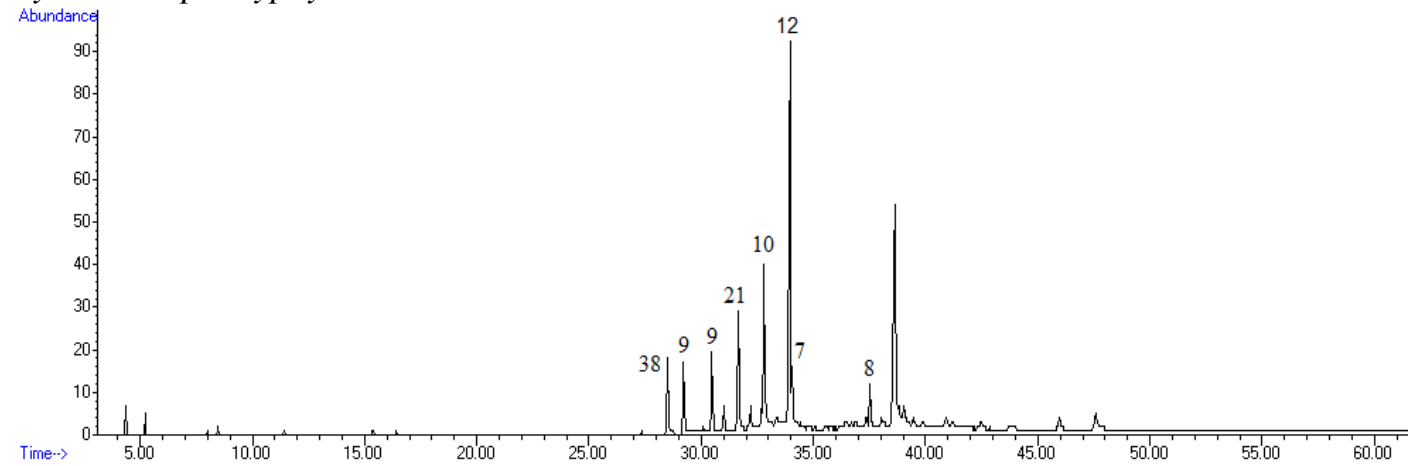
Byrsonima basiloba



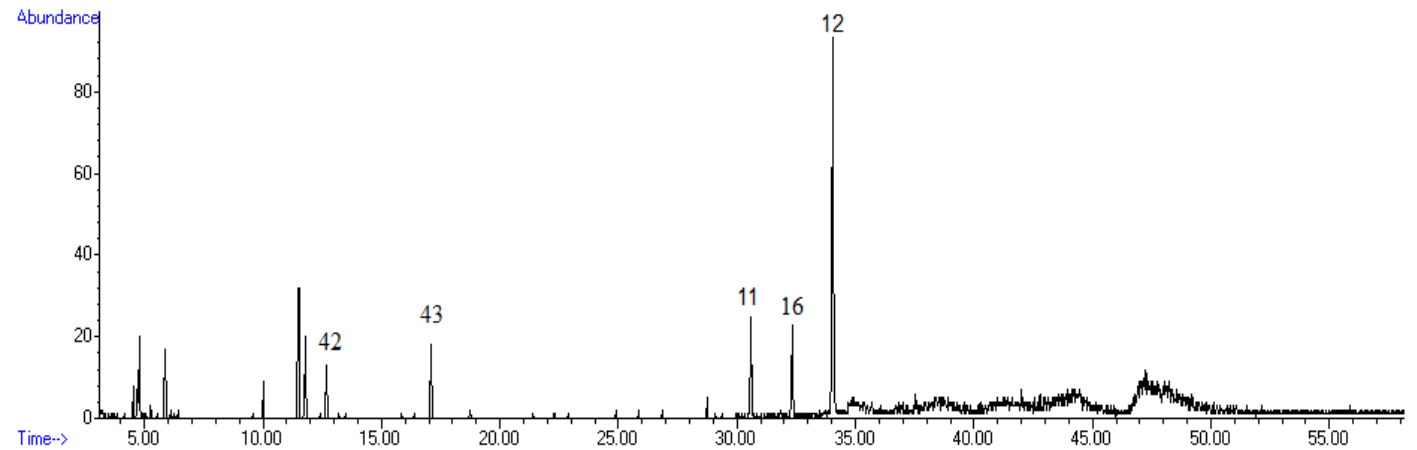
Byrsonima coccolobifolia



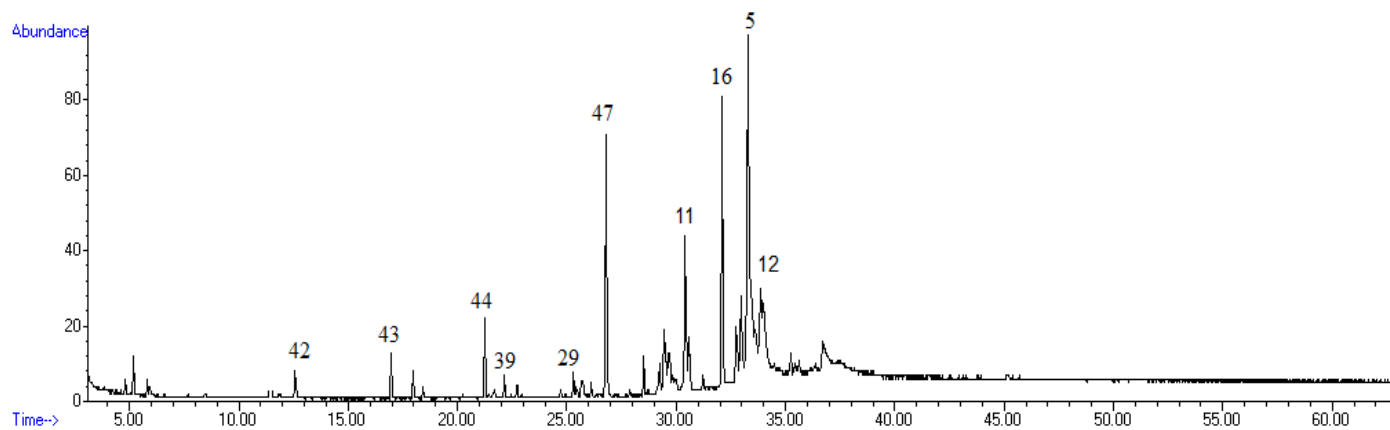
Byrsonima pachyphylla



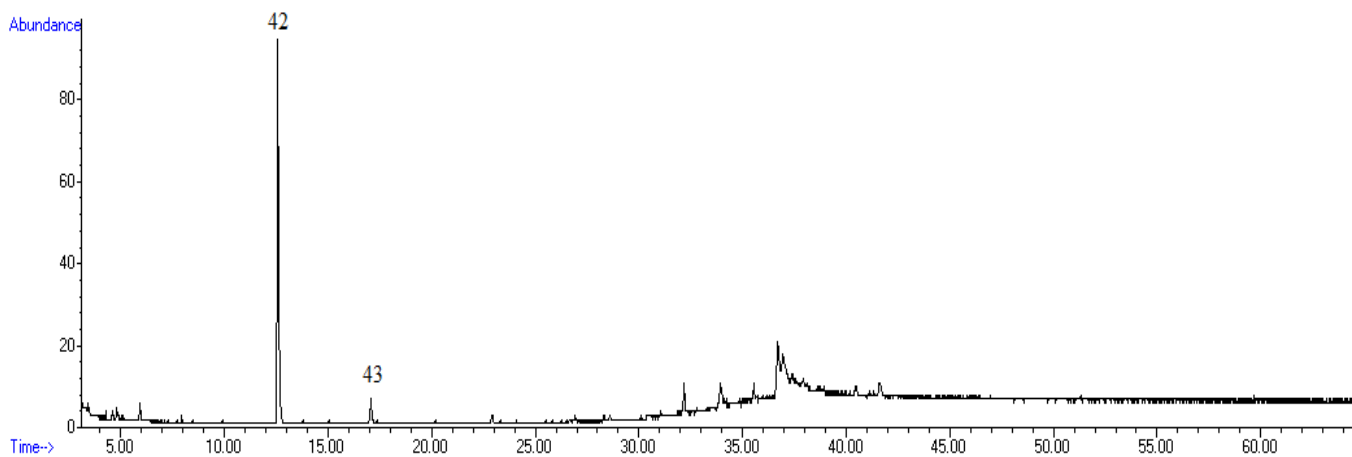
H. campestris



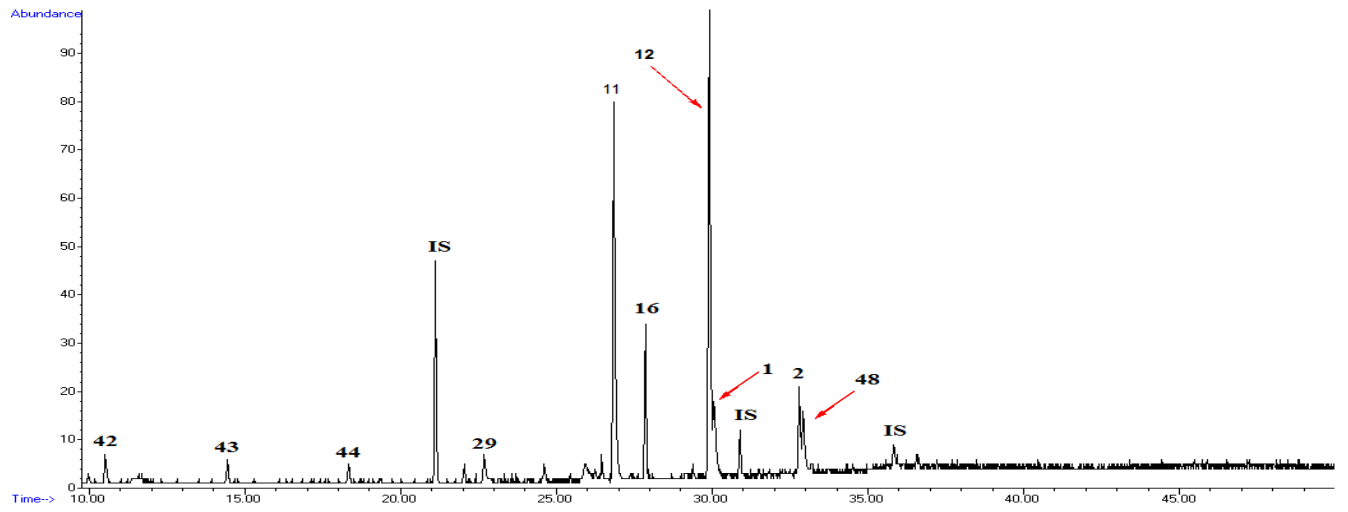
H. tomentosa



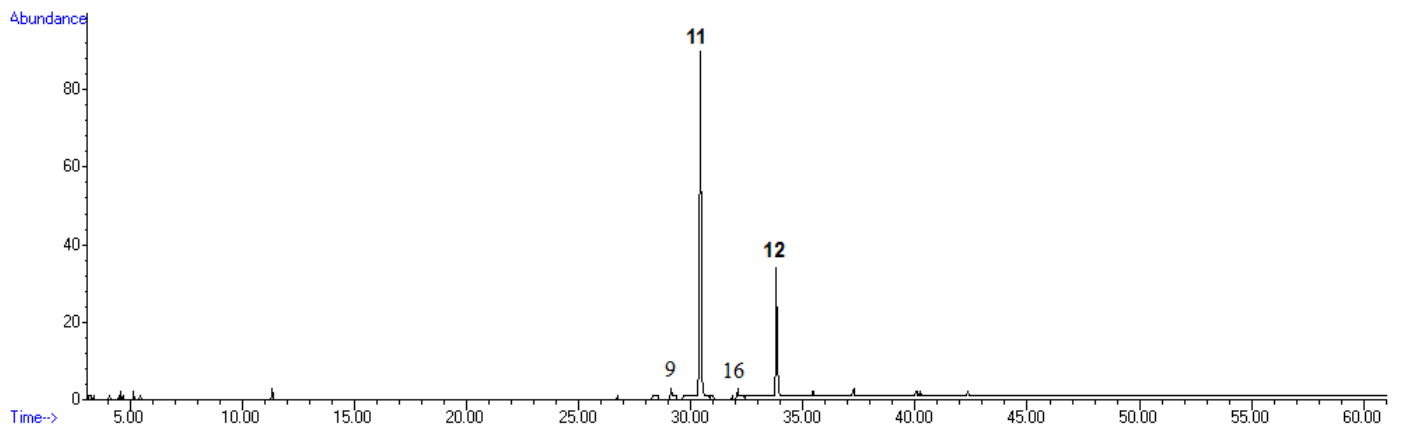
H. pteropetala



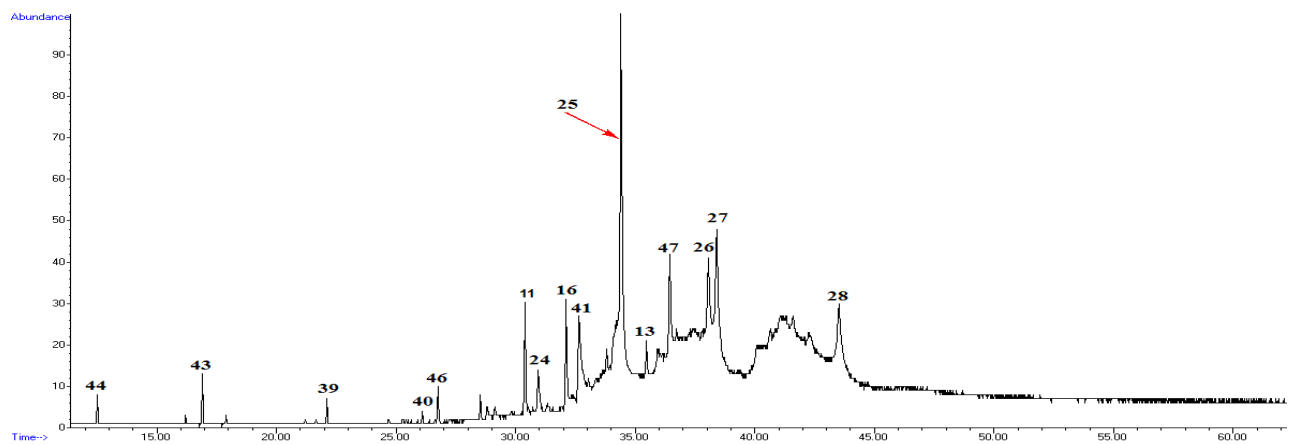
Het escalloniaefolia



H. nervosa



T.jussieuniana



**Espectros de RMN dos ácidos graxos presentes em óleos florais de
Malpigiaceae, Krameriaceae**

❖ Espectro de RMN do éster metílico do ácido 3,9-diacetóxicosanoico (recompensa floral do tipo-A)

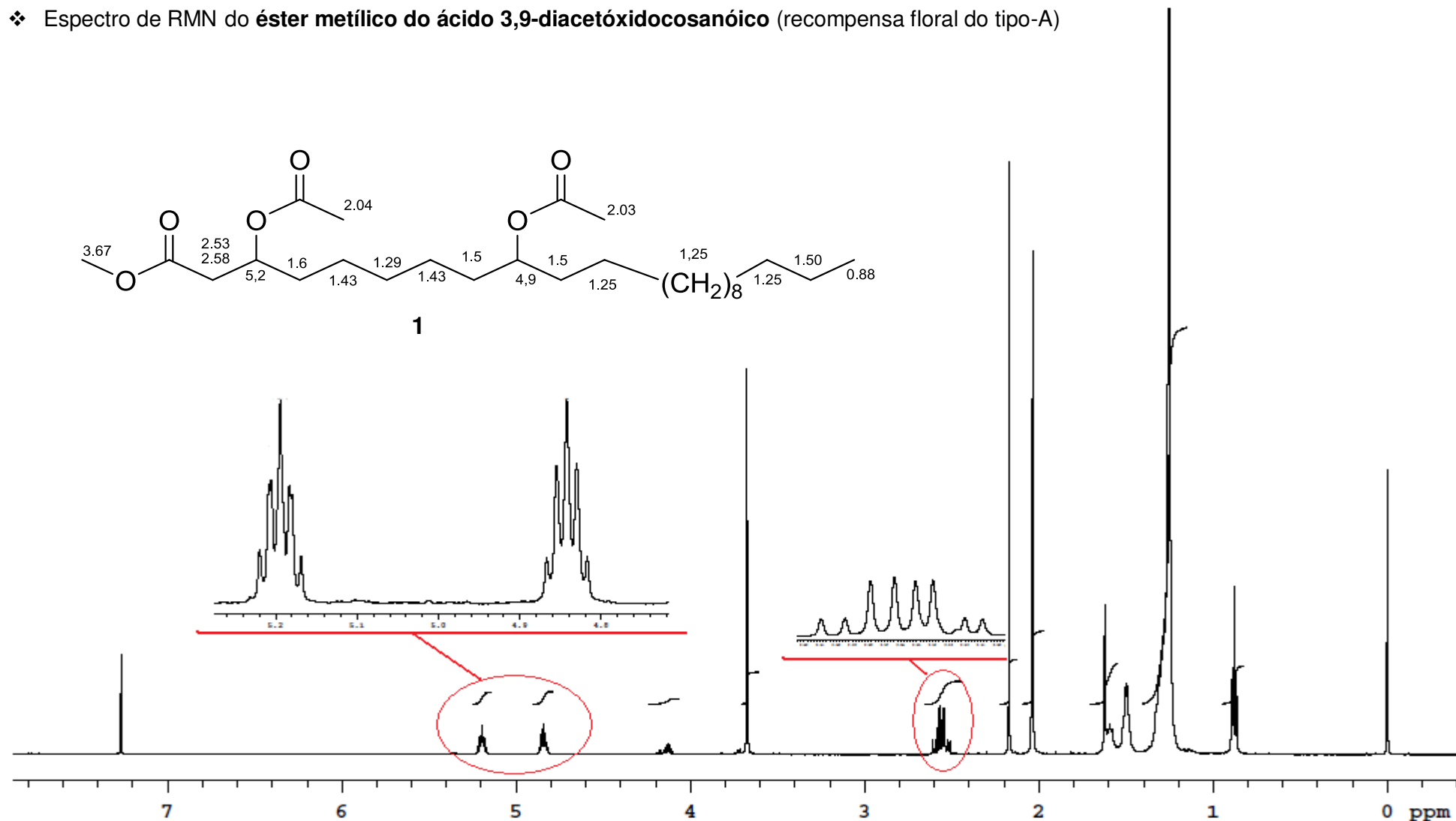


Figura 65. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 3,9-diacetóxicosanoico (representativo de recompensa floral do tipo-A).

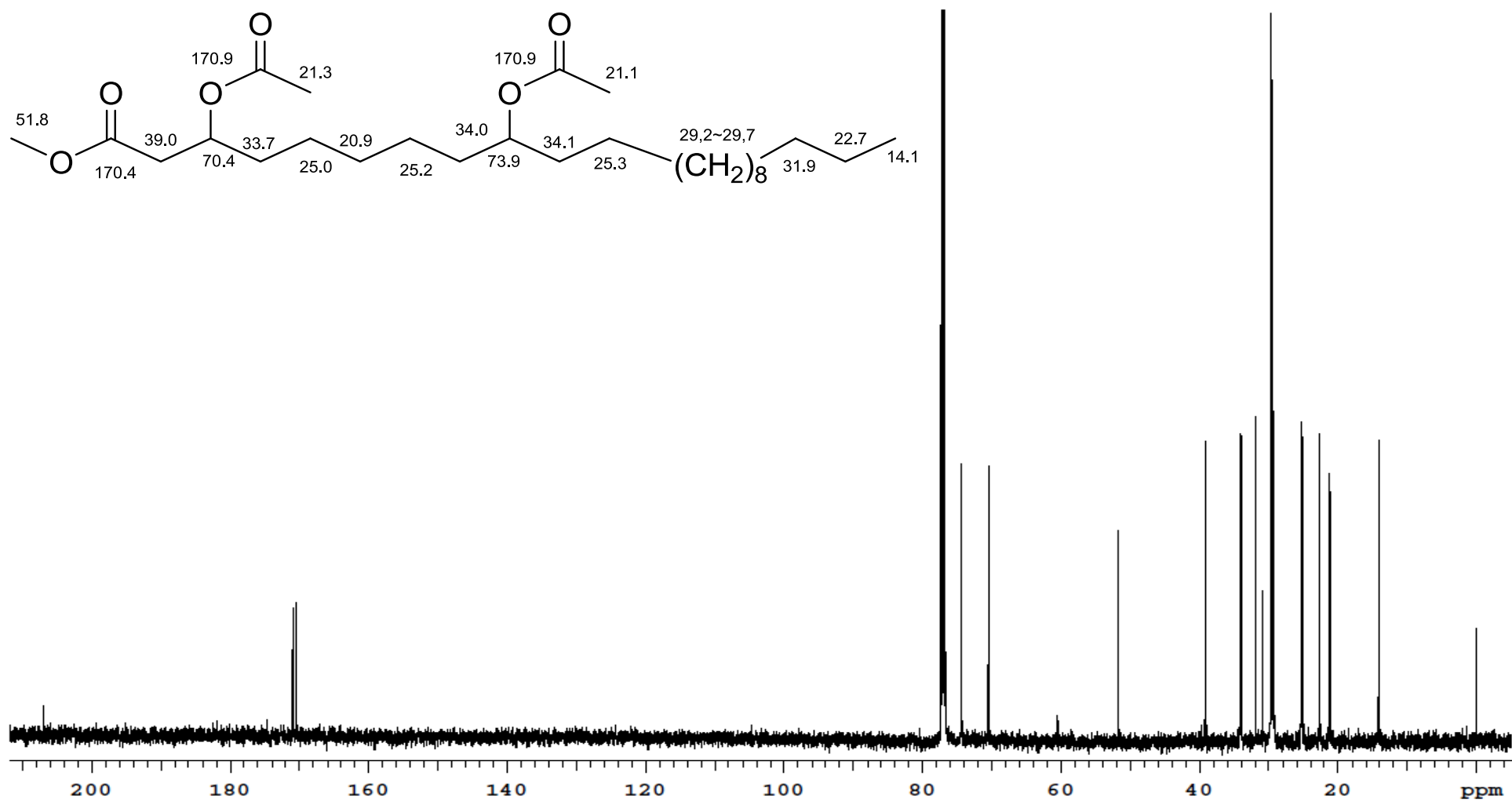


Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido **3,9-diacetóxidosanoico** (representativo de recompensa floral do tipo-A).

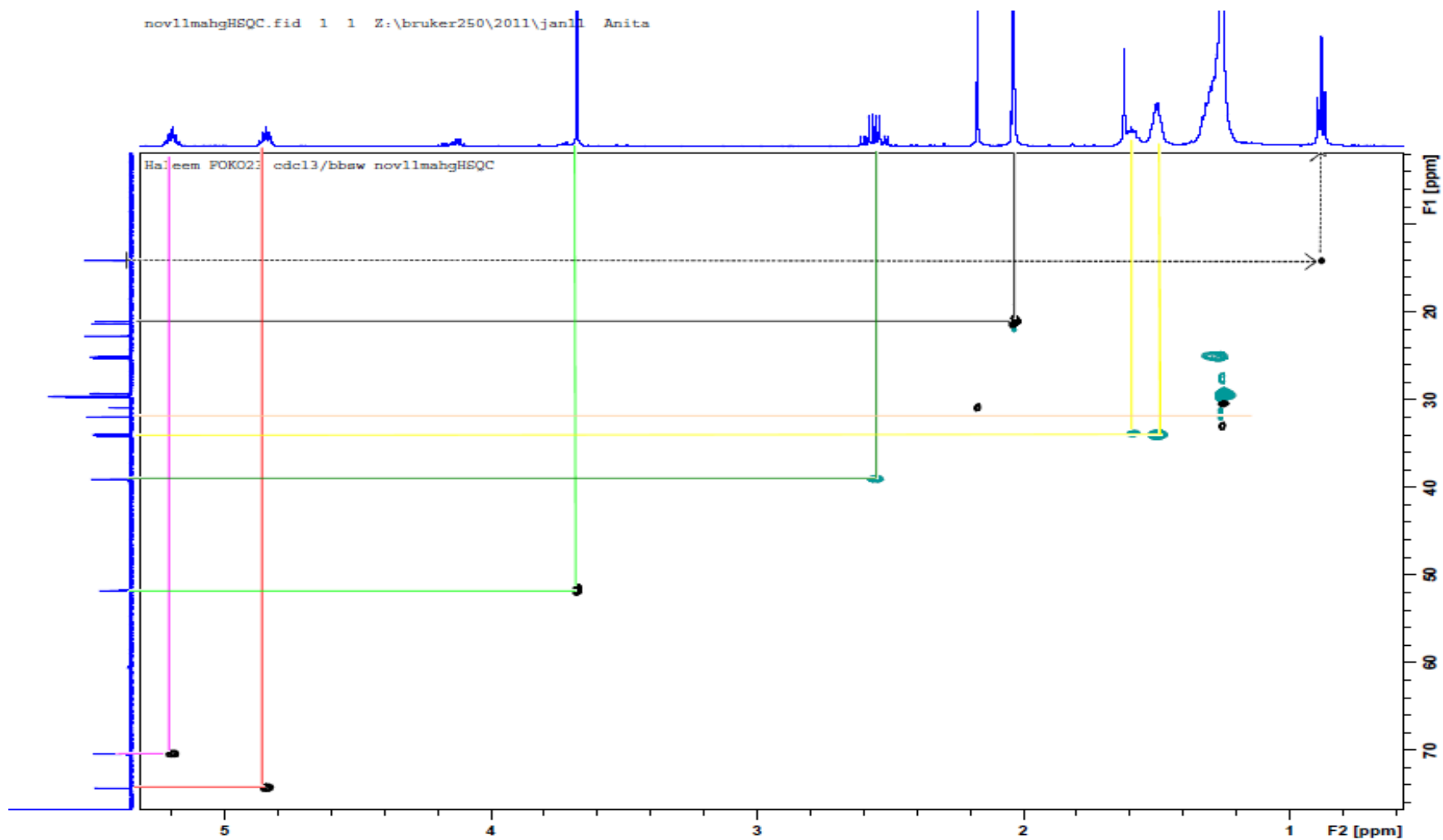


Figura 67. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C –HSQC (500 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3,9-diacetóxicosanoico

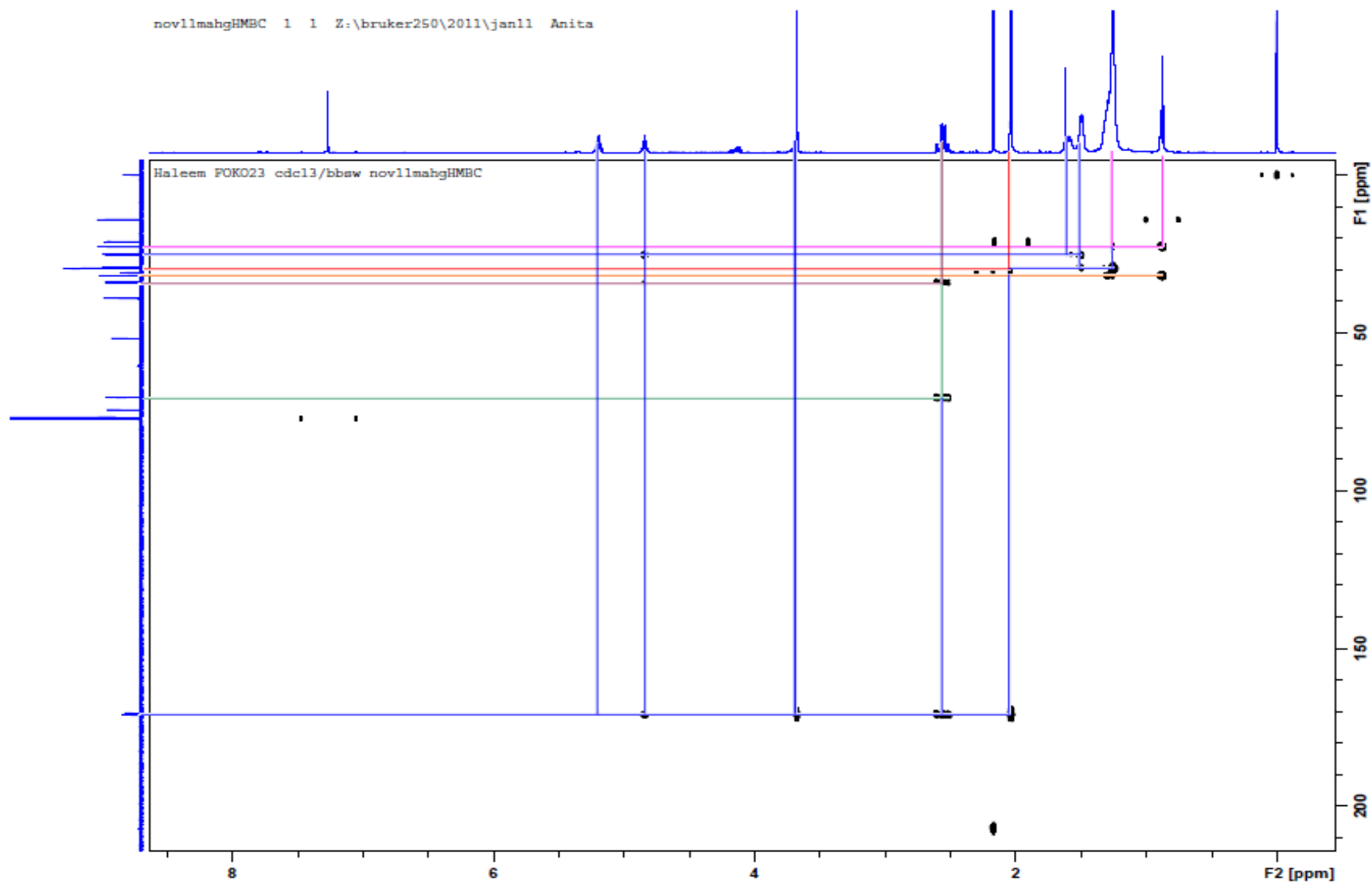


Figura 68. Mapa de contornos de RMN de 2D de $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3,9-diacetóxicosanoico

❖ Espectros de RMN do **éster metílico do ácido 3,7-diacetóxicosanoico** (representativo de recompensa floral do tipo-B)

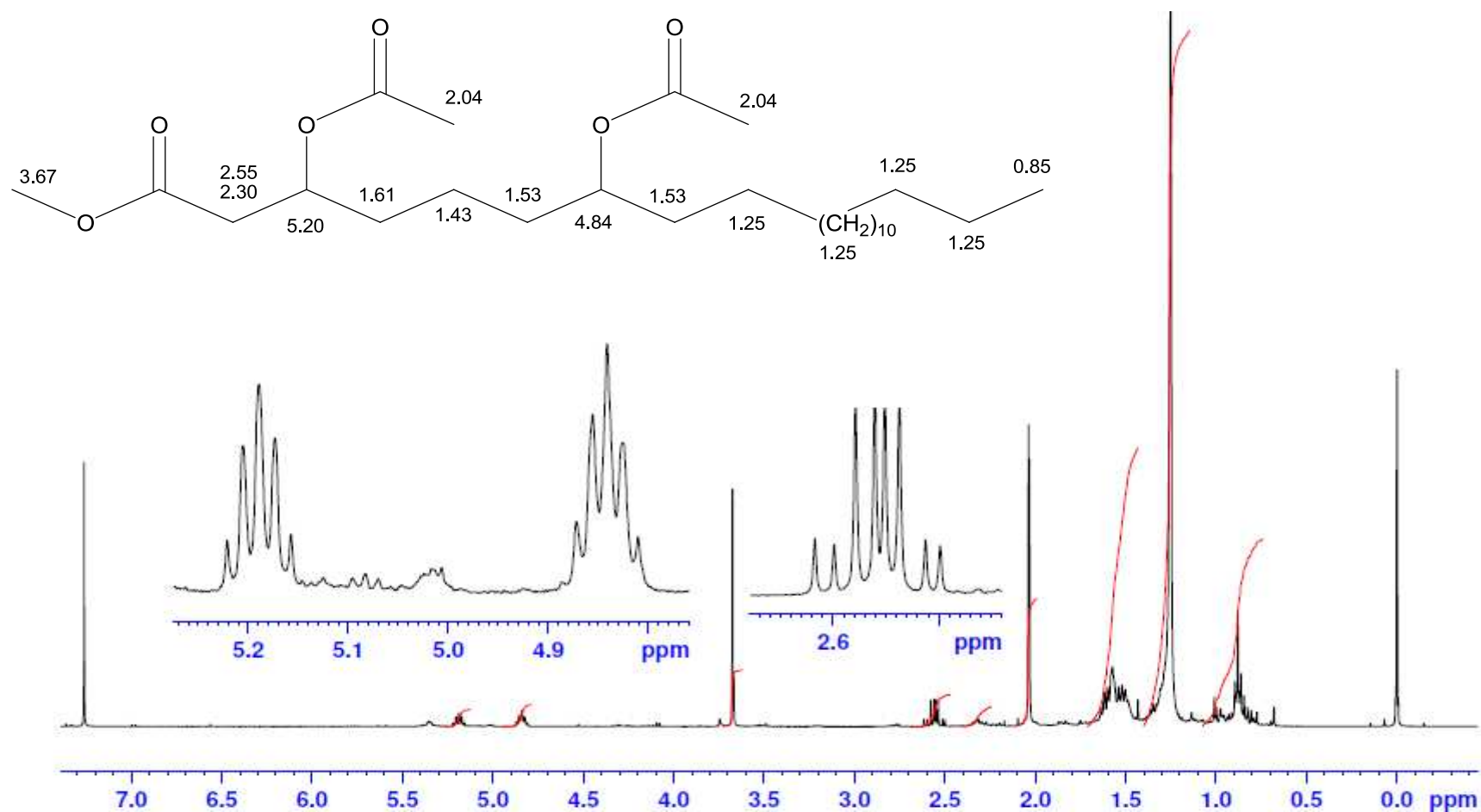


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do **éster metílico do ácido 3,7-diacetóxicosanoico** (representativo de recompensa floral do tipo-B)

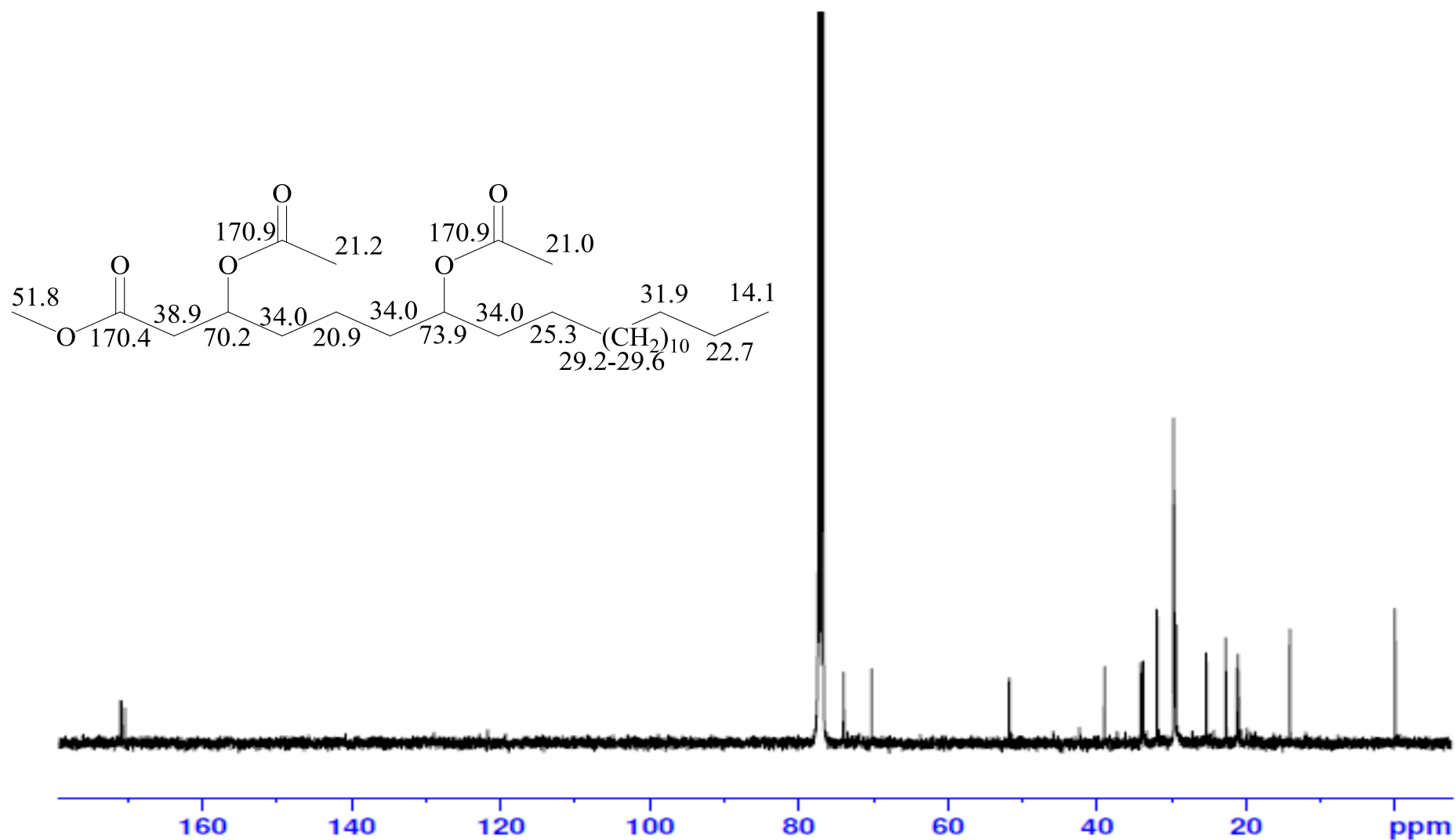


Figura 70. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 3,7-diacetóxidocosanóico (representativo de recompensa floral do tipo-B)

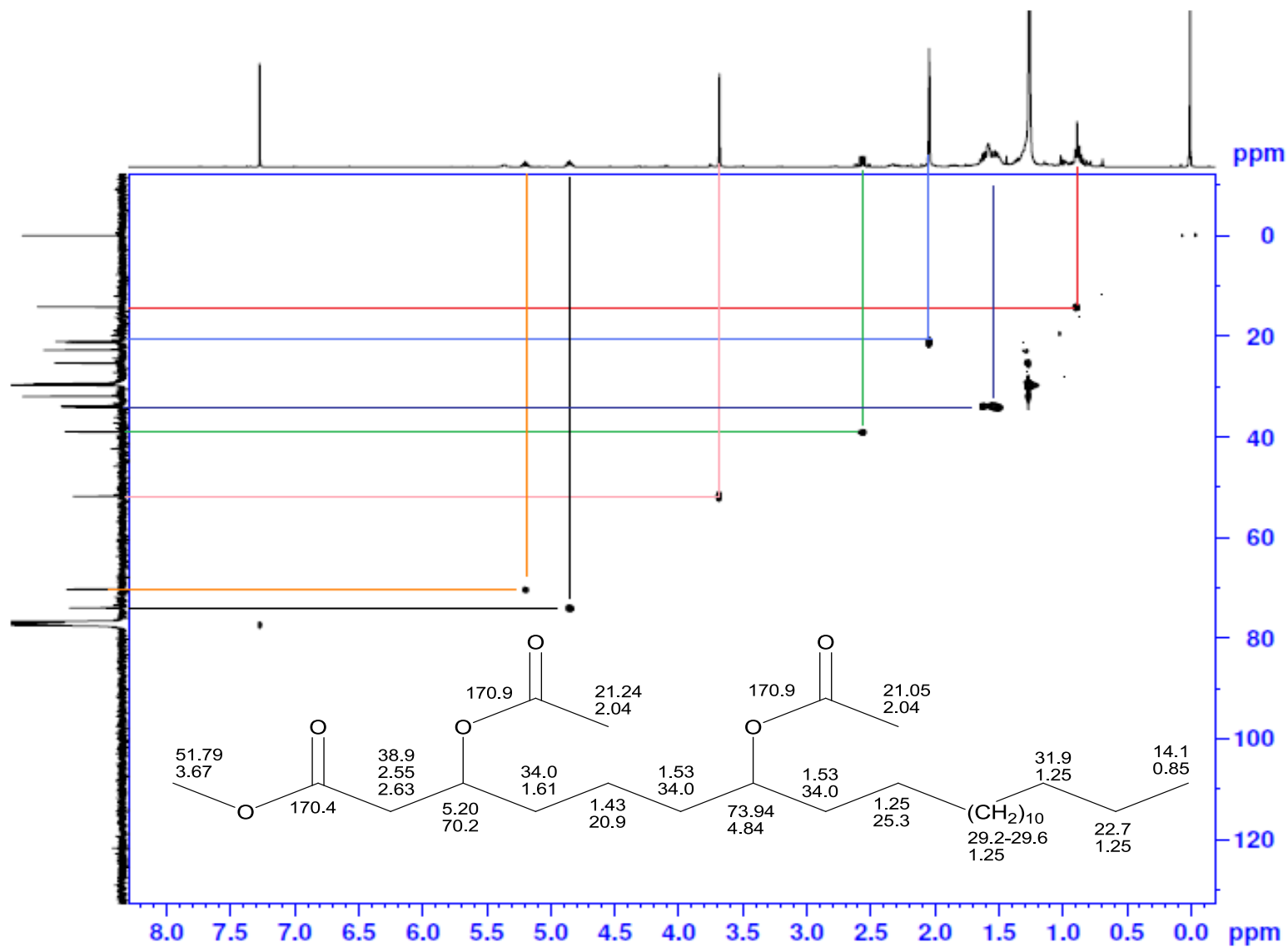


Figura 71. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C -HSQC (500 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3,7-diacetóxidosanóico

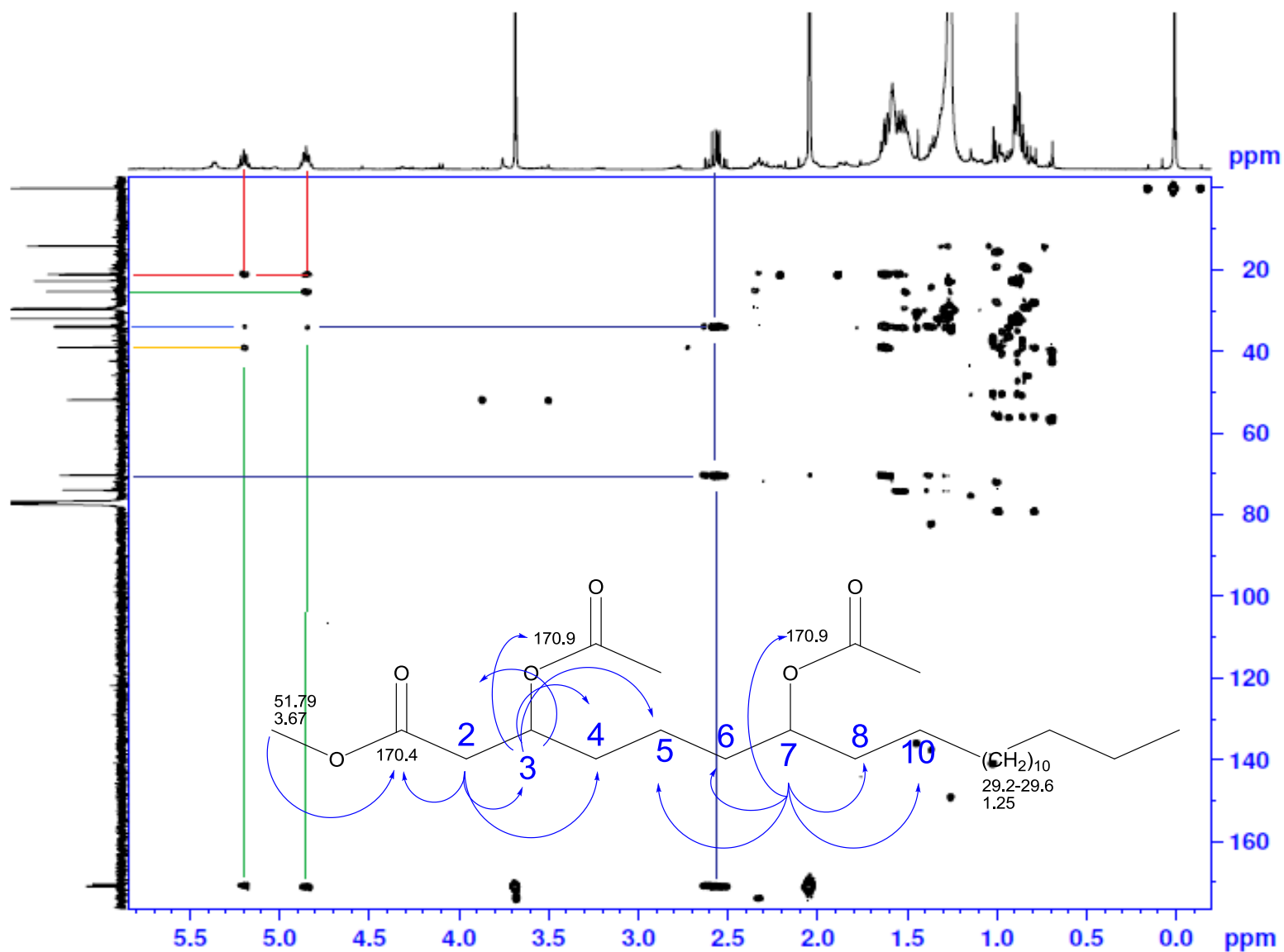


Figura 72 Mapa de contornos de RMN de 2D de $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3,7-diacetóxidosanóico

❖ Espectros de RMN do ácido pterândrico (representativo de recompensa floral do tipo-C)

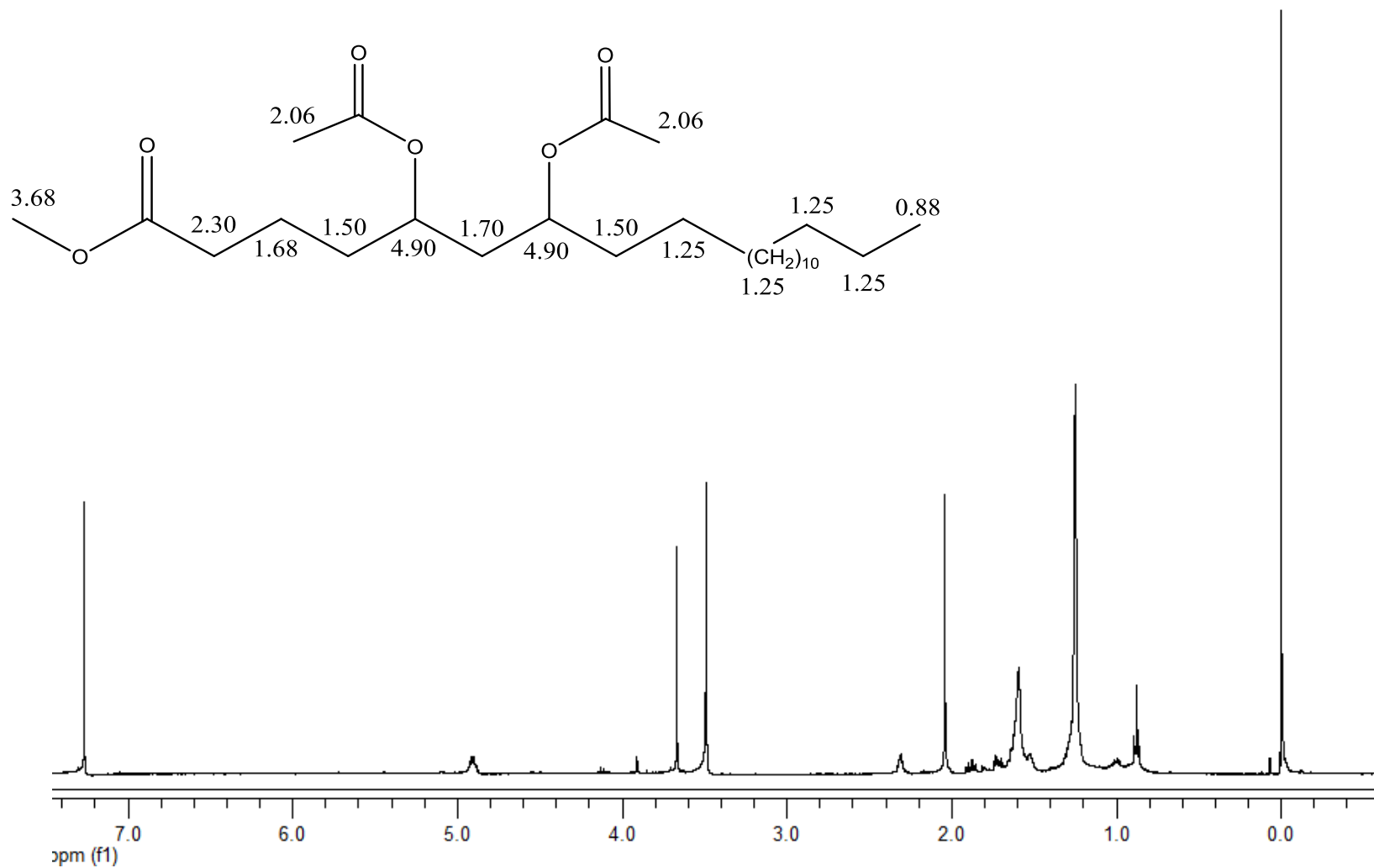


Figura 73 Espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) **Ácido pterândrico** (representativo de recompensa floral do tipo-C)

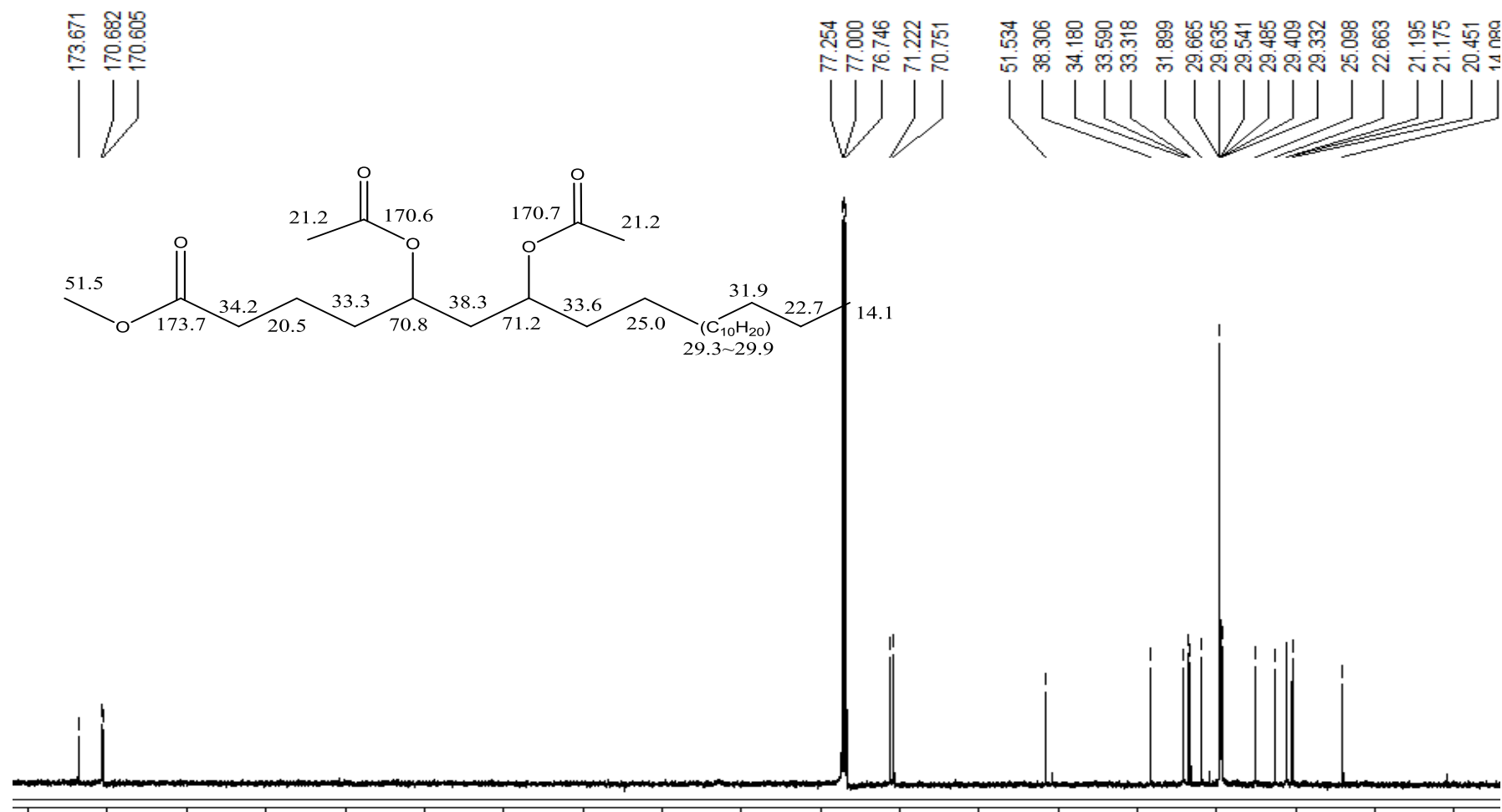


Figura 74. Espectro de RMN de ¹³C (125MHz, CDCl₃) **Ácido pterândrico** (representativo do recompensa floral do tipo-C)

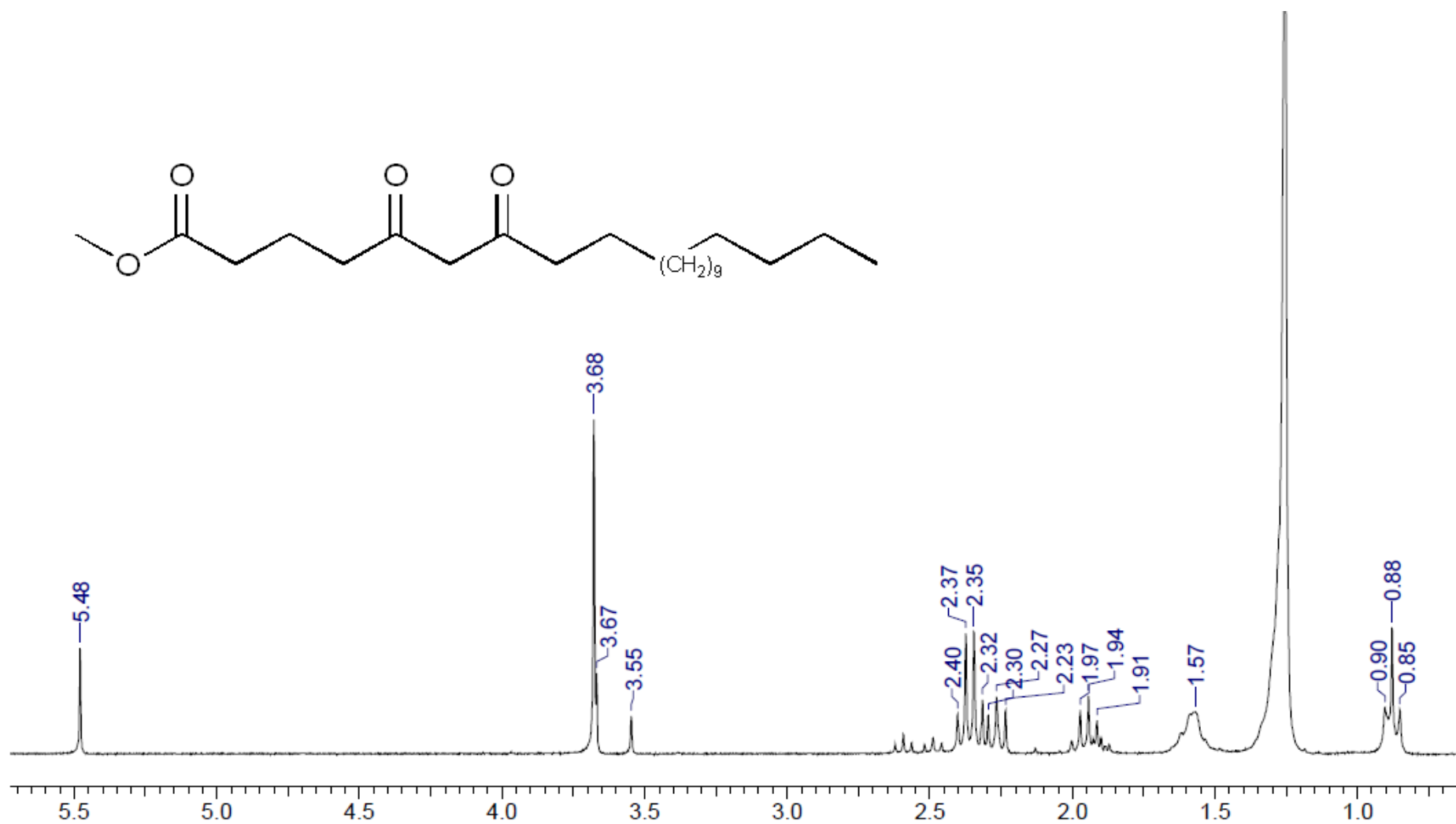


Figura 75. Espectro de RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 5,7-dioxodocosanoato

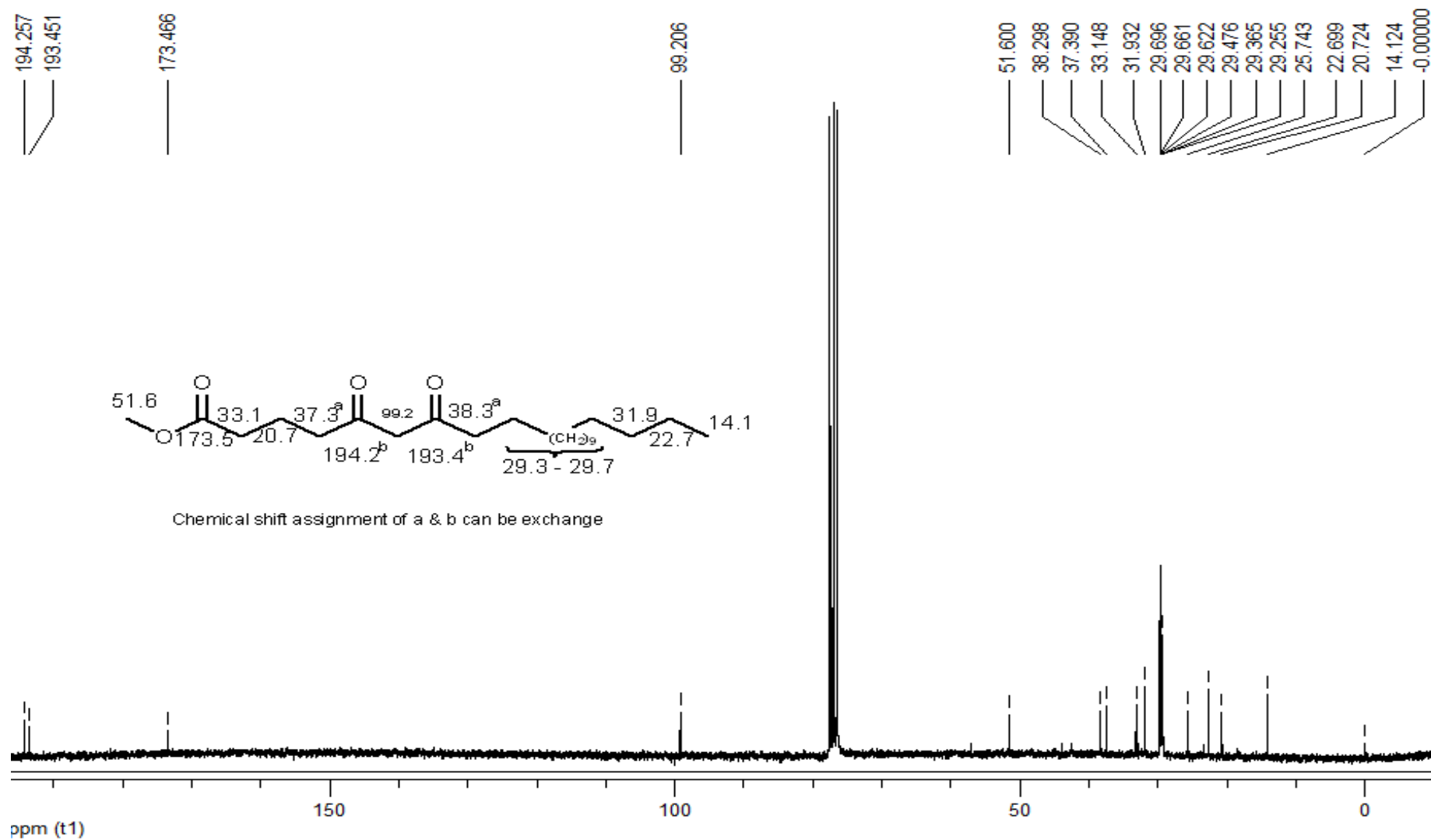


Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C (63 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 5,7-dioxodocosanóico

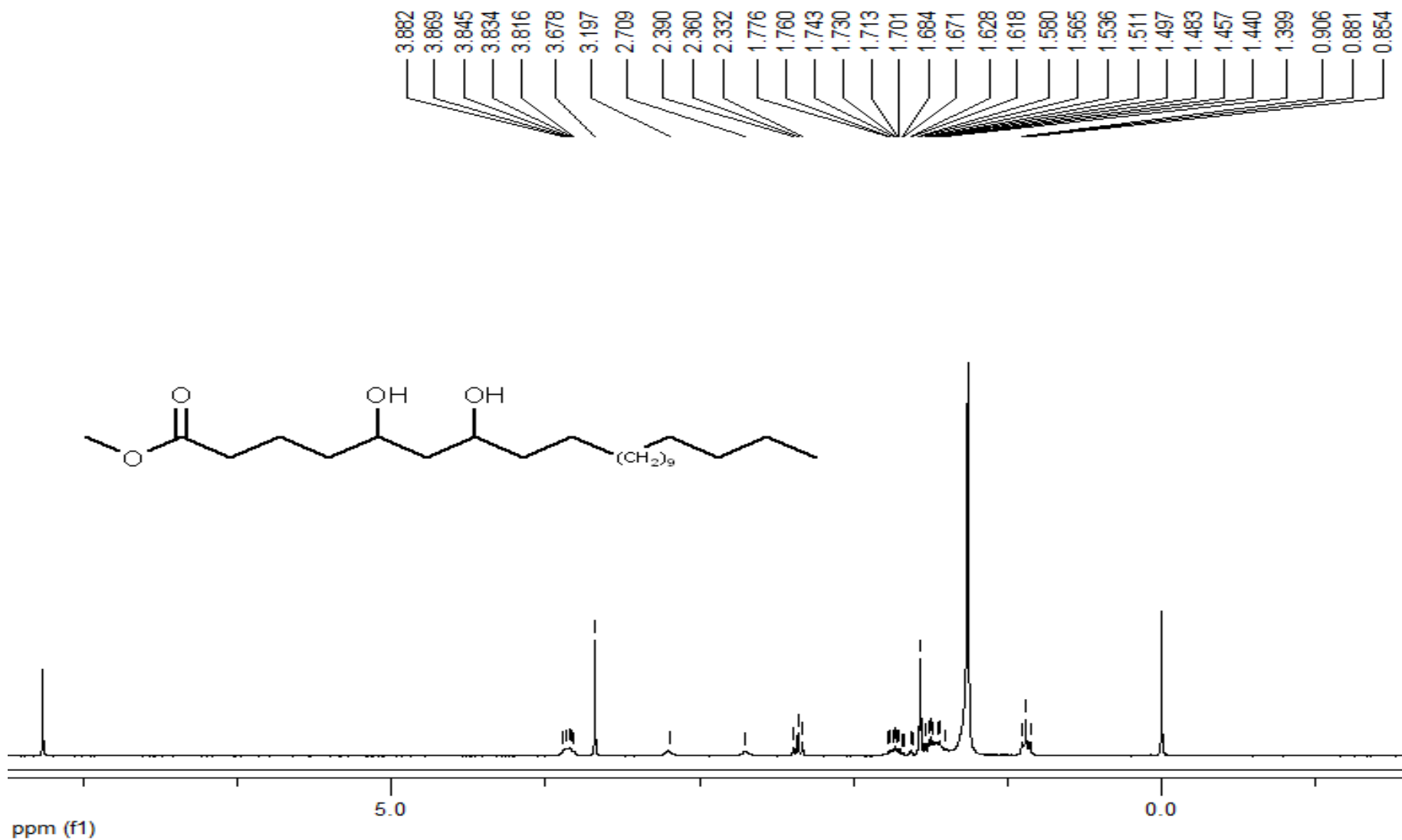


Figura 77. Espectro de RMN ^1H (250MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 5,7-dihidroxicosanoico

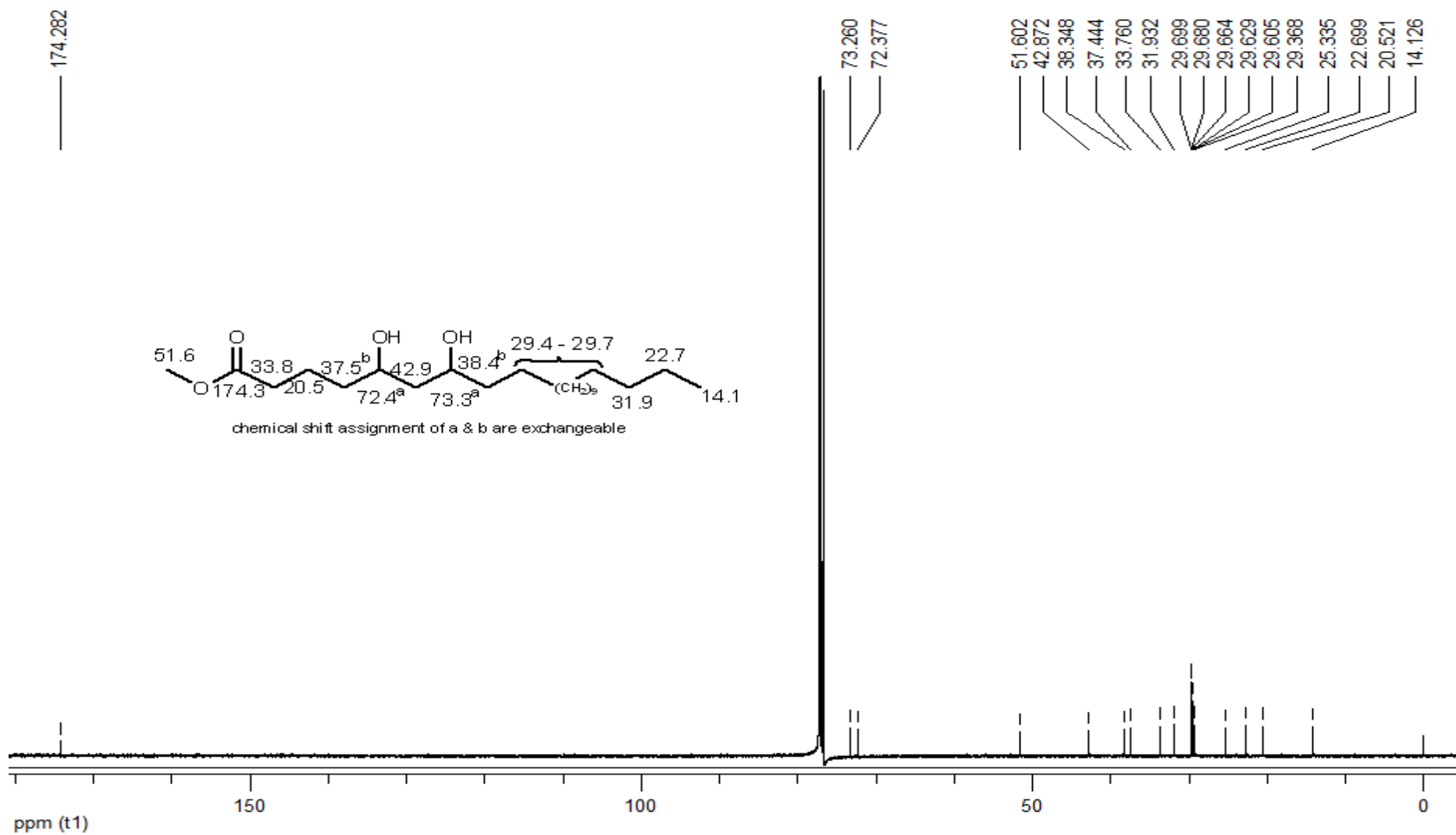


Figura 78. Espectro de ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 5,7-dihidroxicosanoico

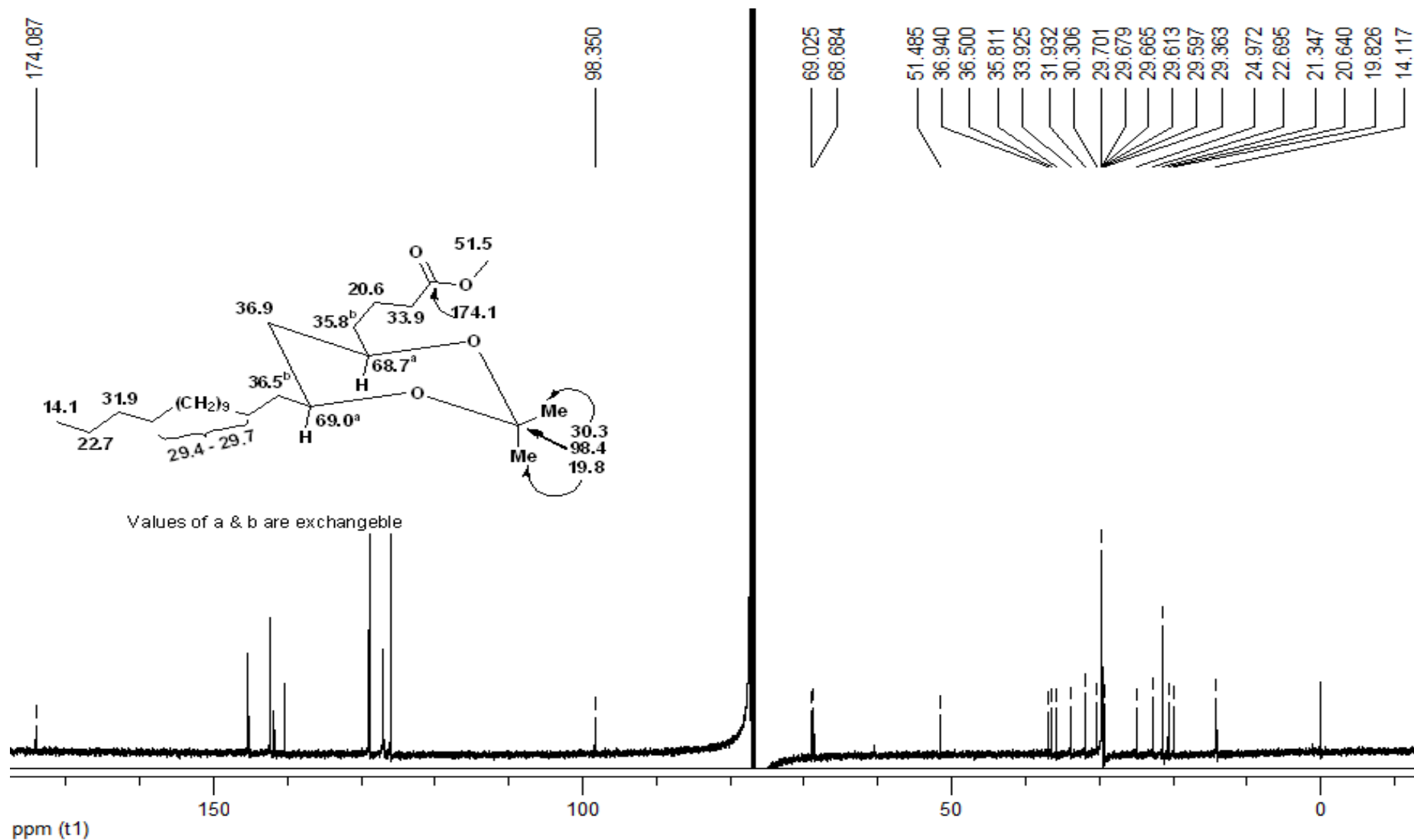


Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de forma *do syn*-acetonide éster metílico do ácido 5,7-dihidroxidocosanóico

❖ Espectros de RMN do representativo de recompensa floral de Krameriaceae

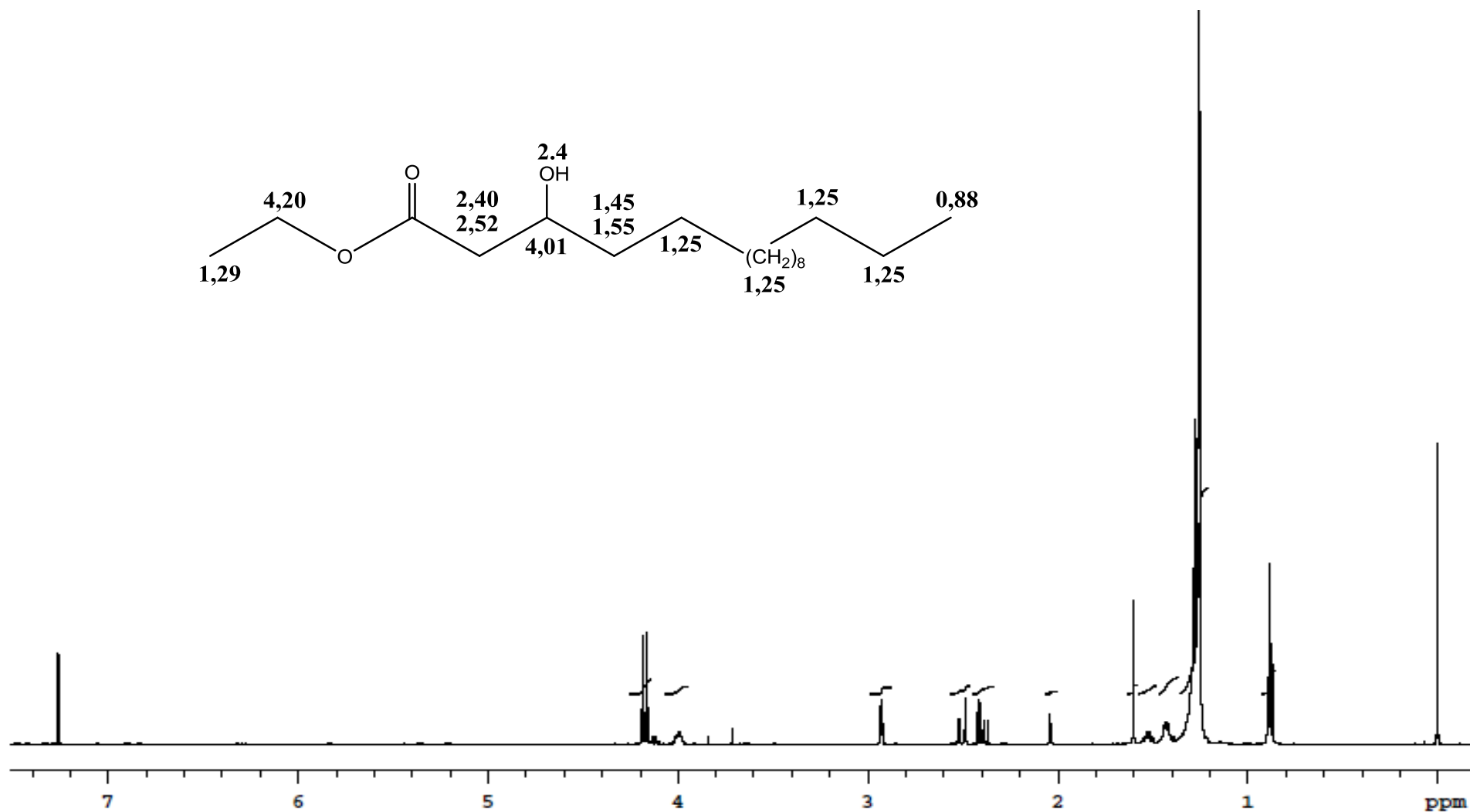


Figura 80. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) **éster etílico do ácido 3-hidroxidecanoico** (recompensa floral de Krameriaceae)

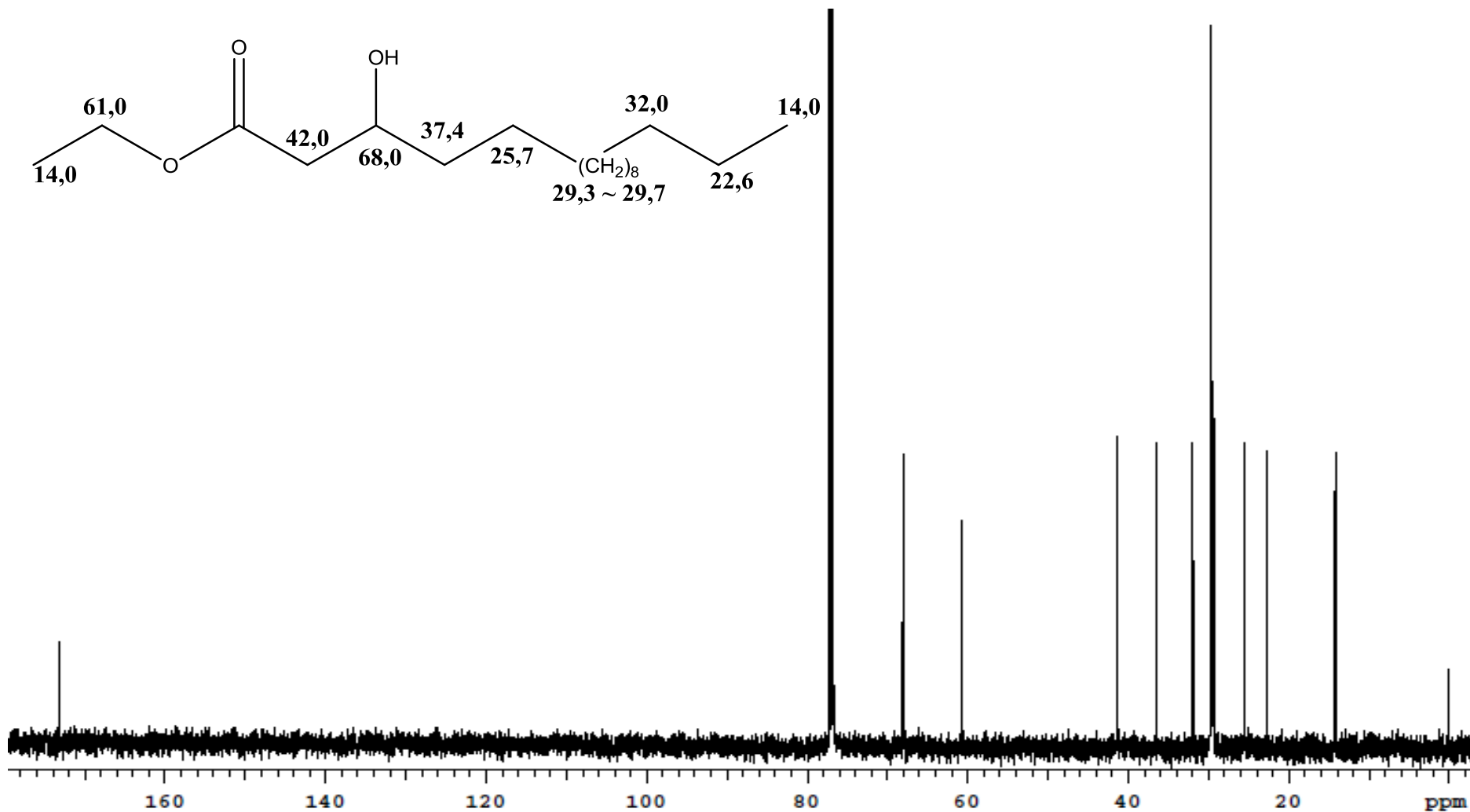


Figura 81. Espectro de RMN de ¹³C (125MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 3-hidroxihexadecanóico (recompensa floral de Krameriaceae).

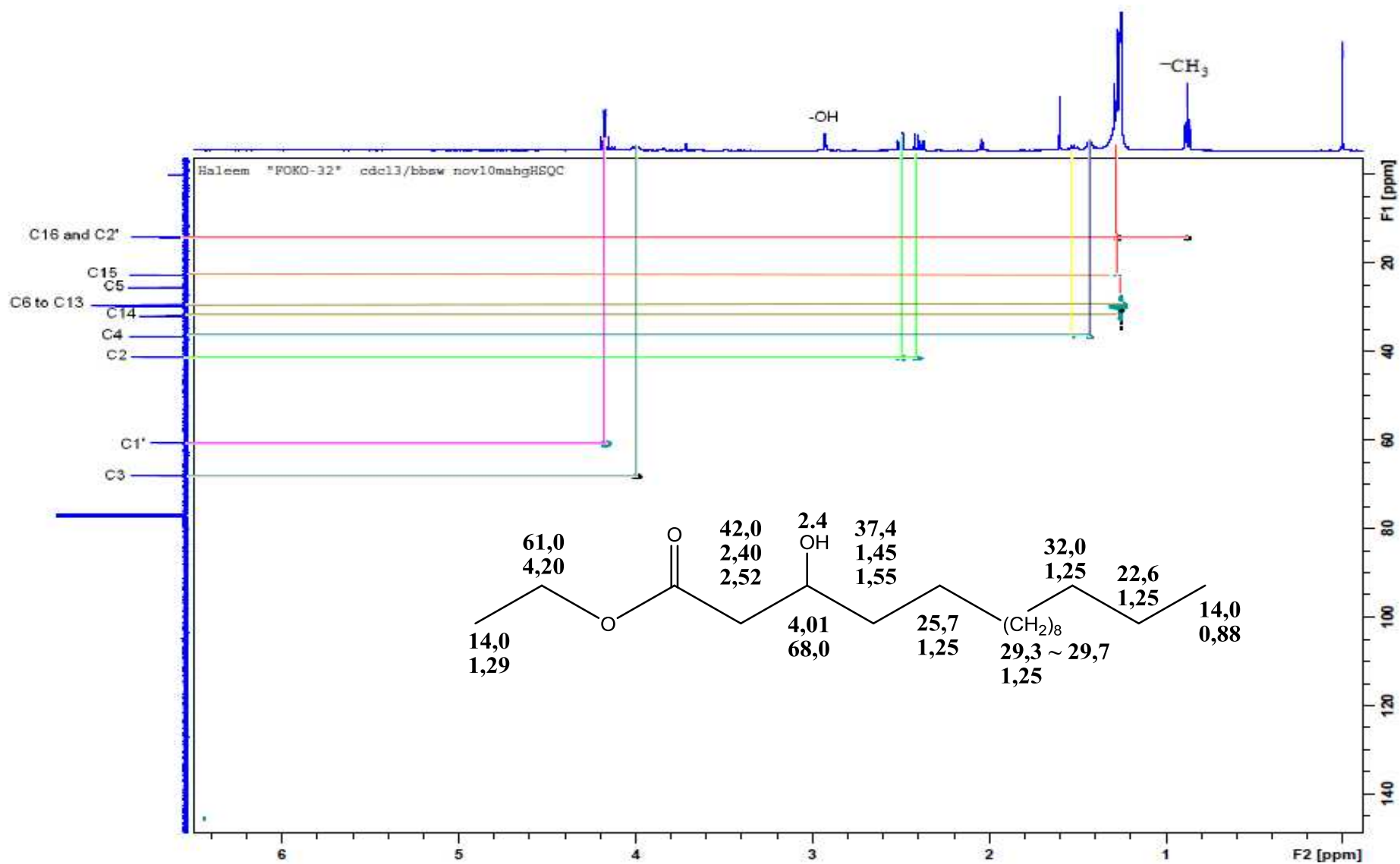


Figura 82. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C –HSQC (500 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-hidroxihexadecanóico

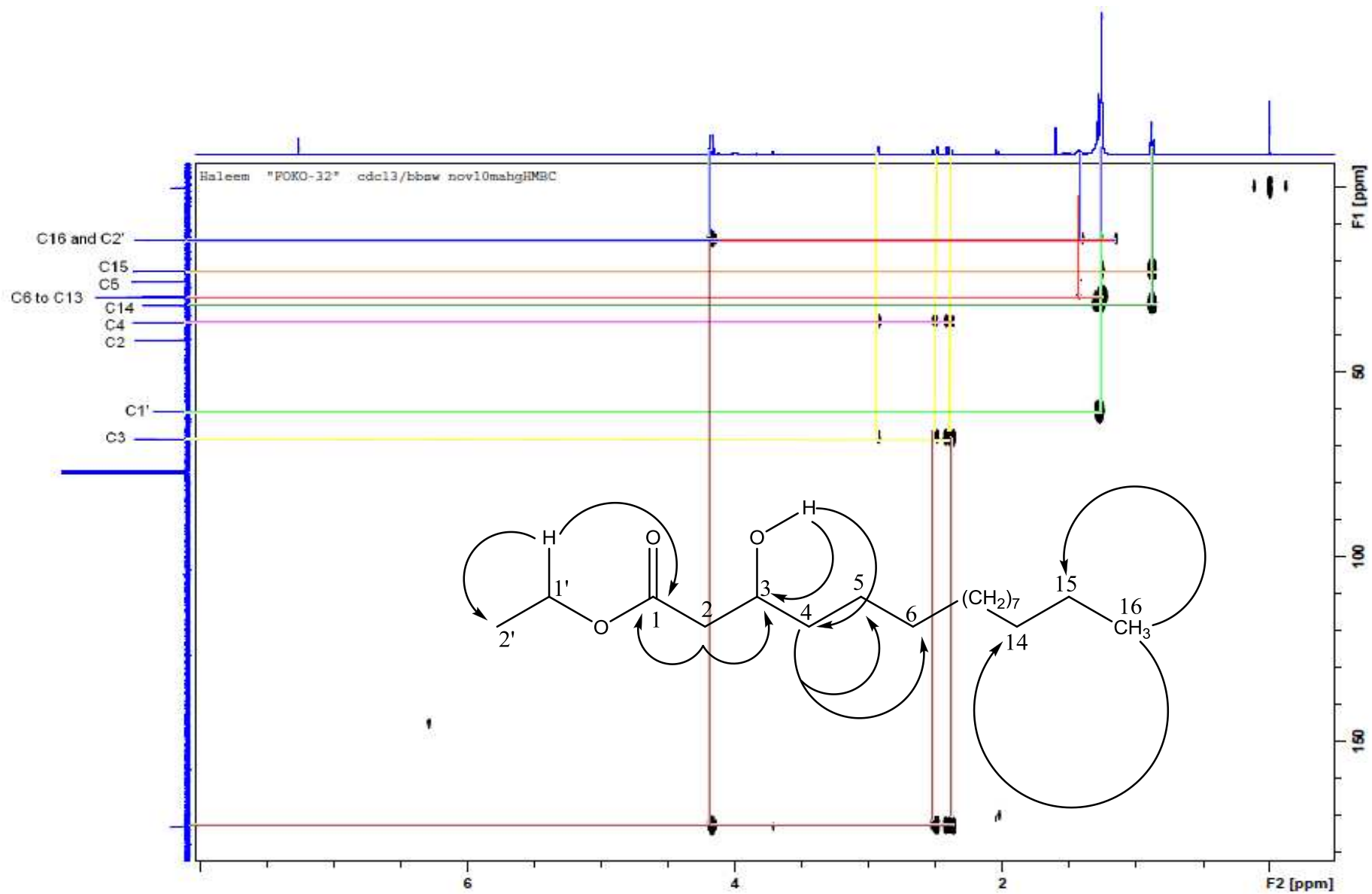


Figura 83. Mapa de contornos de RMN de 2D de ^1H - ^{13}C –HMBC (500 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-hidroxi-hexadecanóico

Os espectros obtidos a partir da análise dos padrões de alditóis peracetilados por RMN estão ilustrados abaixo:

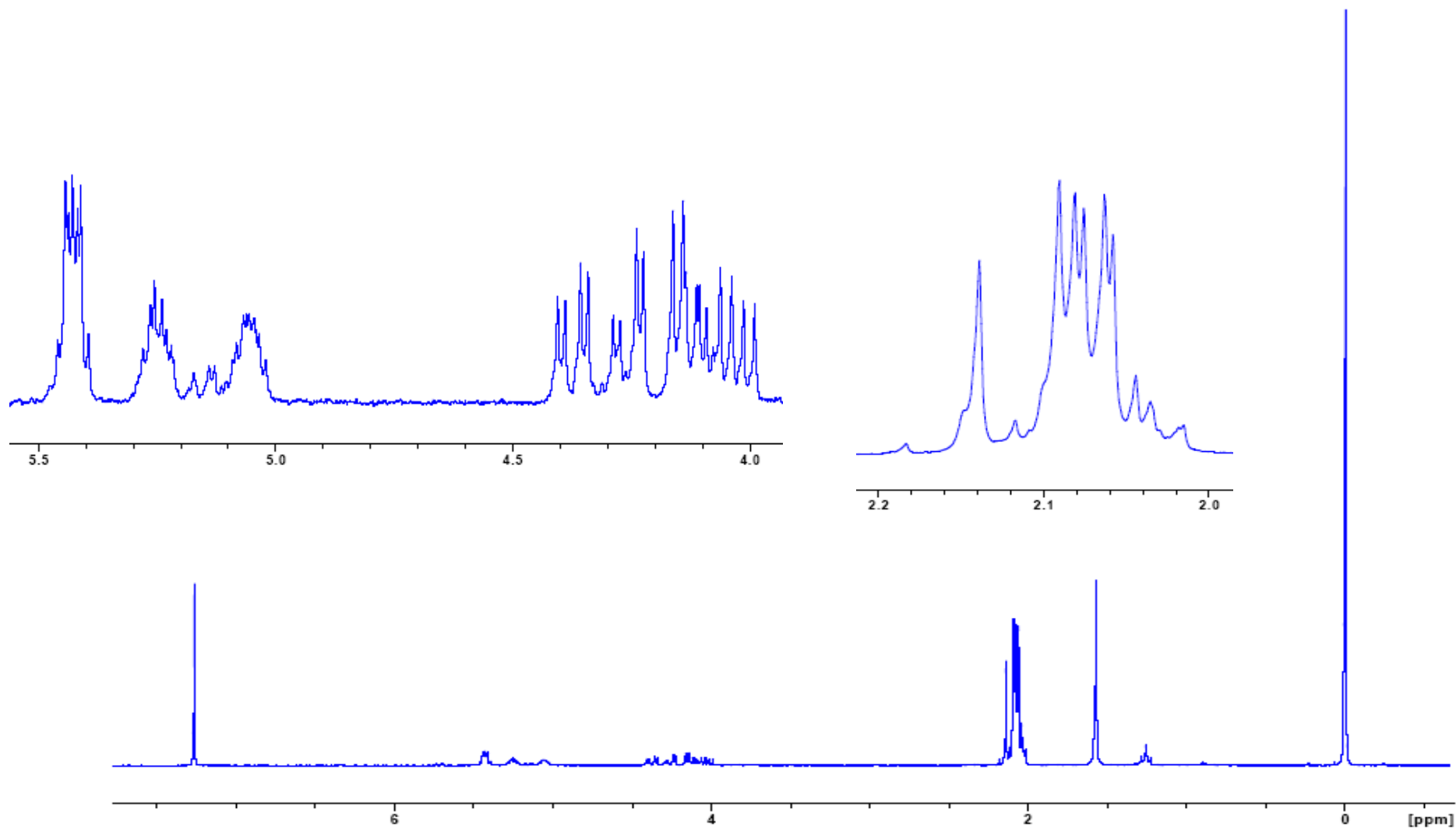


Figura 84. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3/TMS) da Hexaacetato de D-glicitol (**138**).

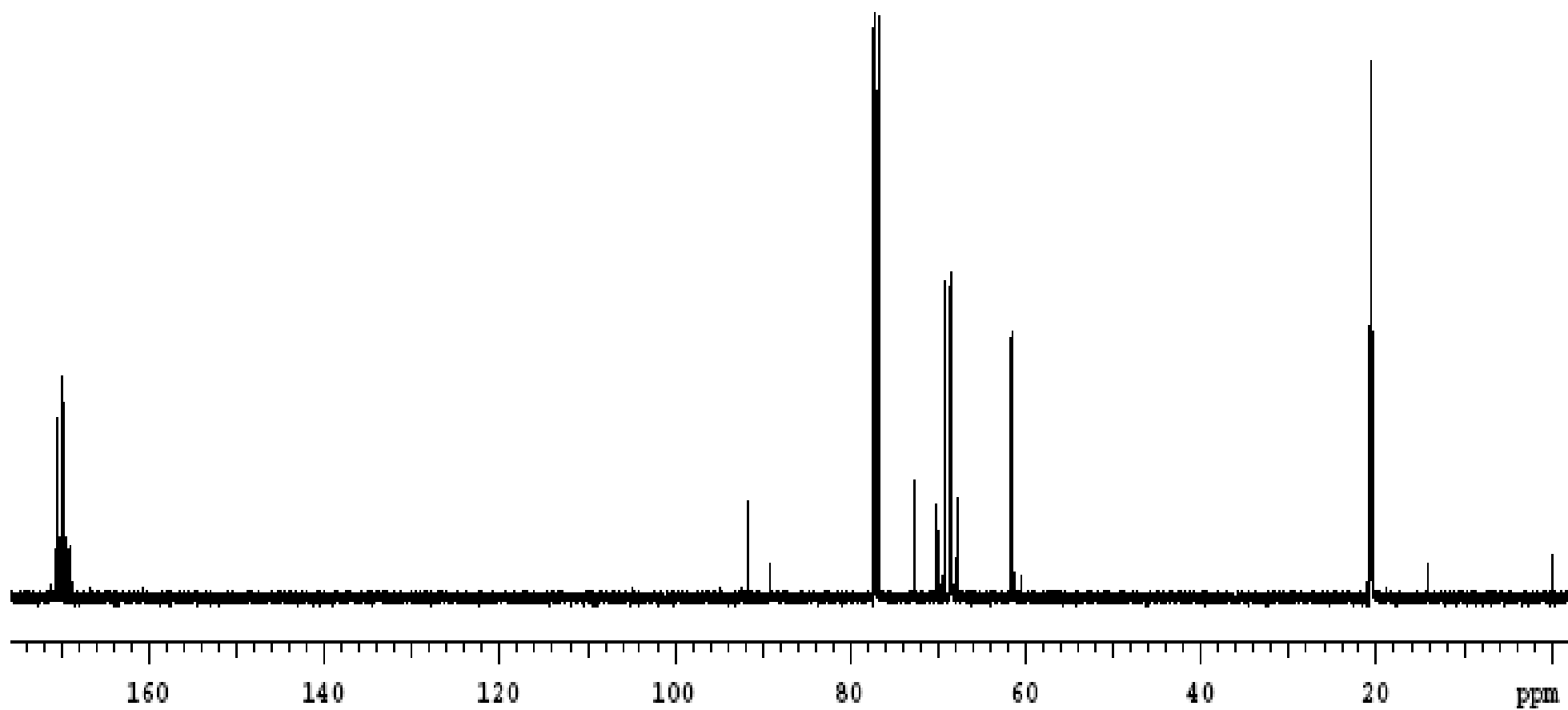


Figura 85. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3/TMS) da Hexaacetato de D-glicitol (**138**).

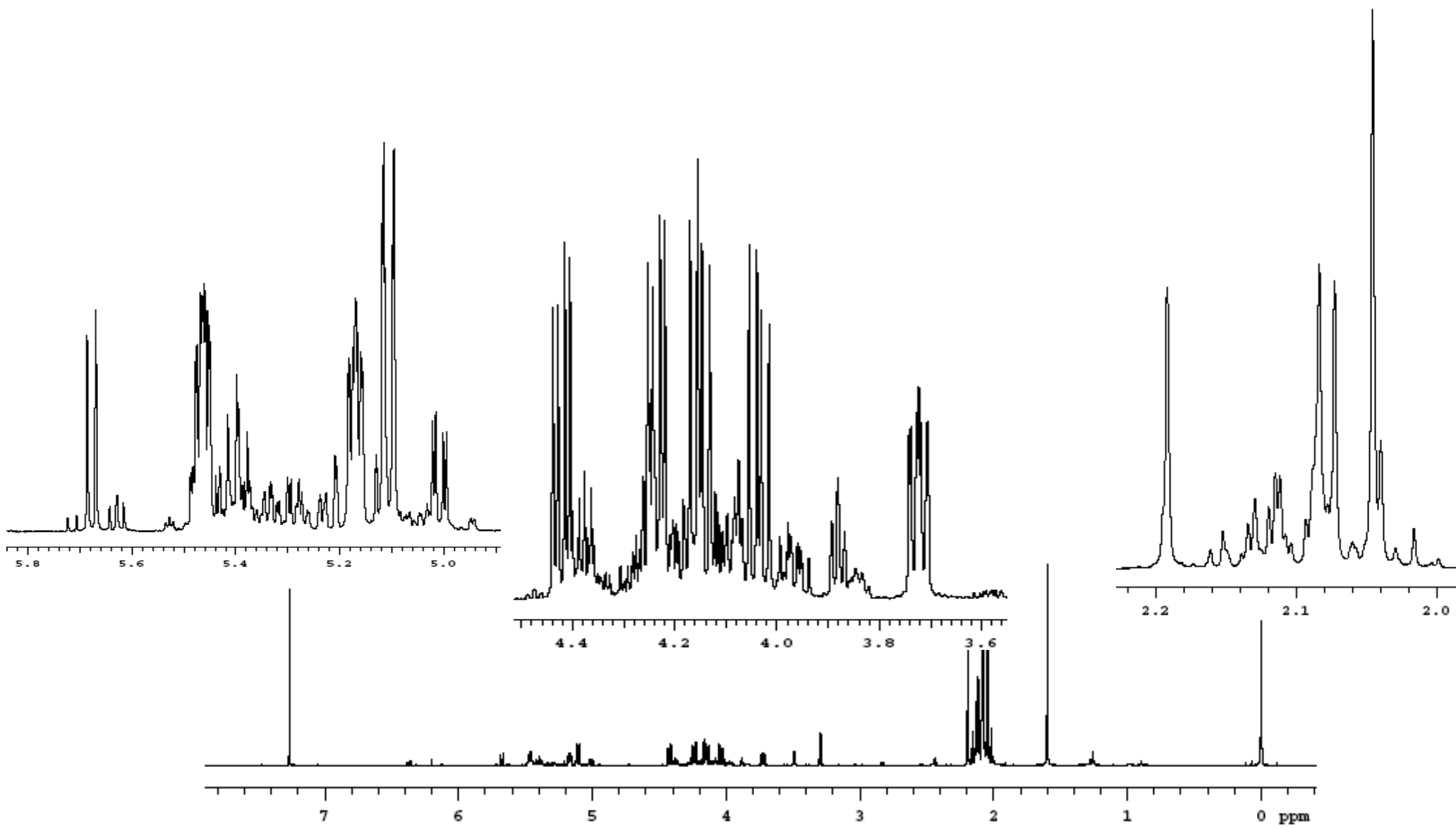


Figura 86. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3/TMS) da Hexaacetato de D-galactose substância (139).

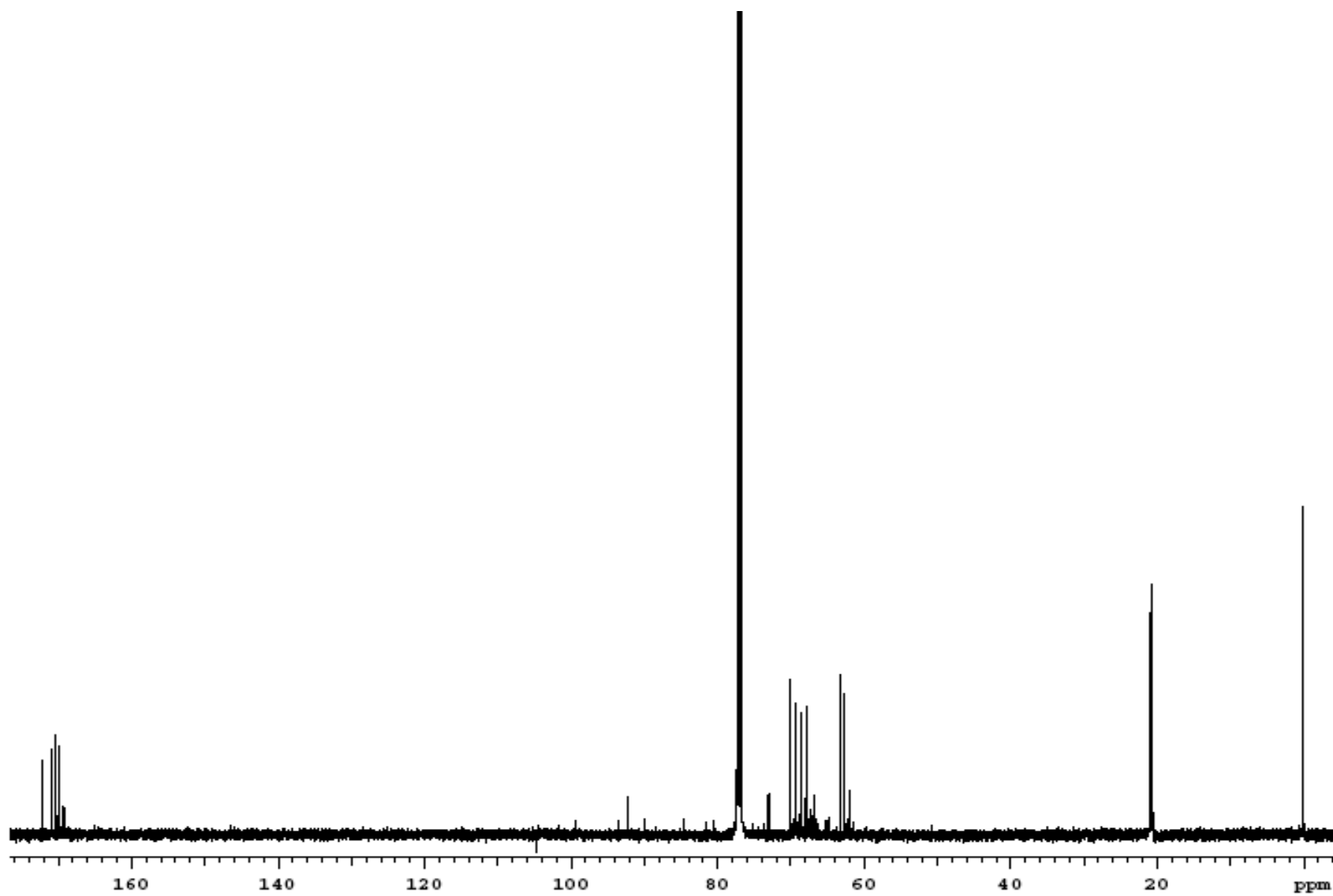


Figura 87. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl₃/TMS) da Hexaacetato de D- galactitol (**139**).

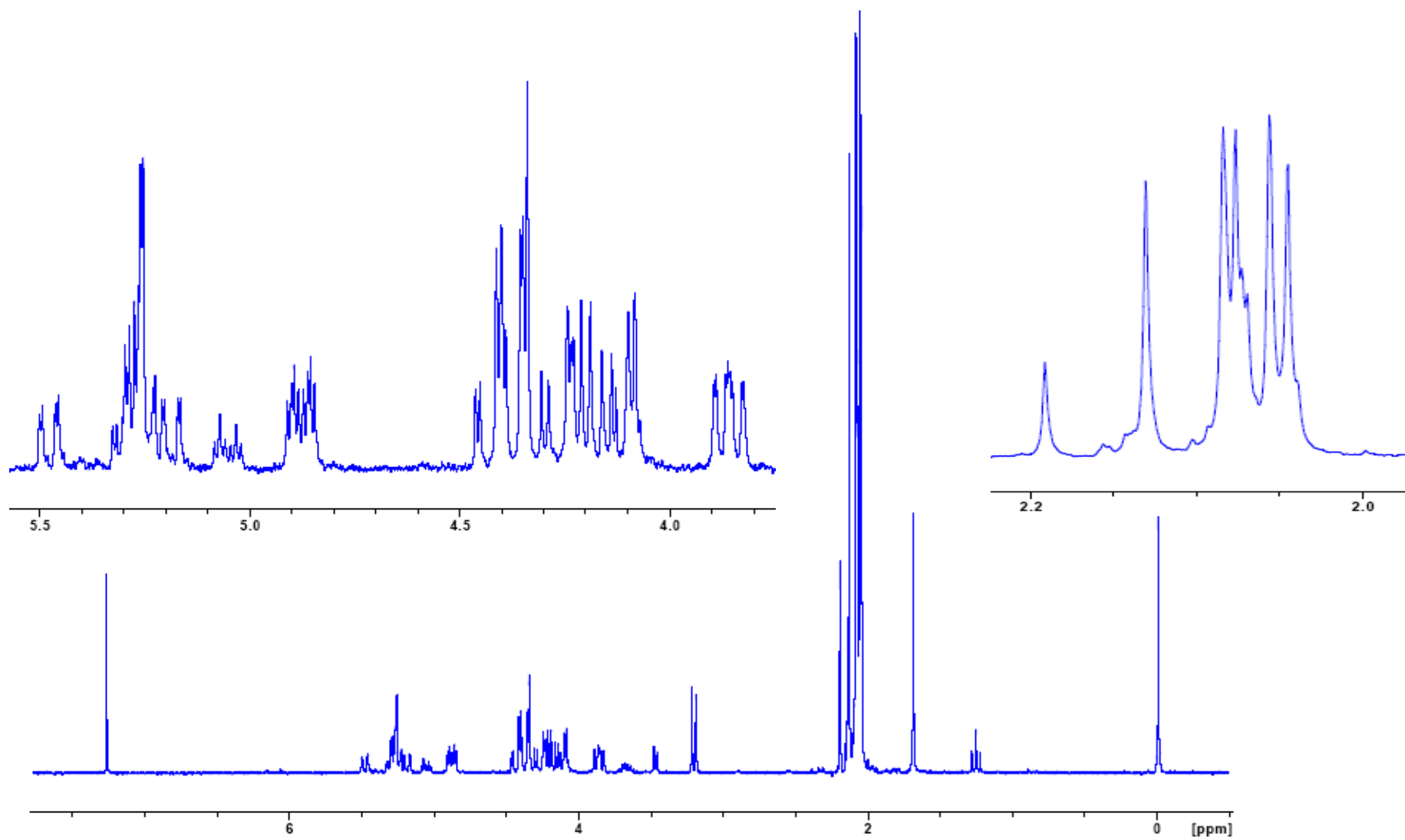


Figura 88. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3/TMS) da peracetilado de manose (**140**).

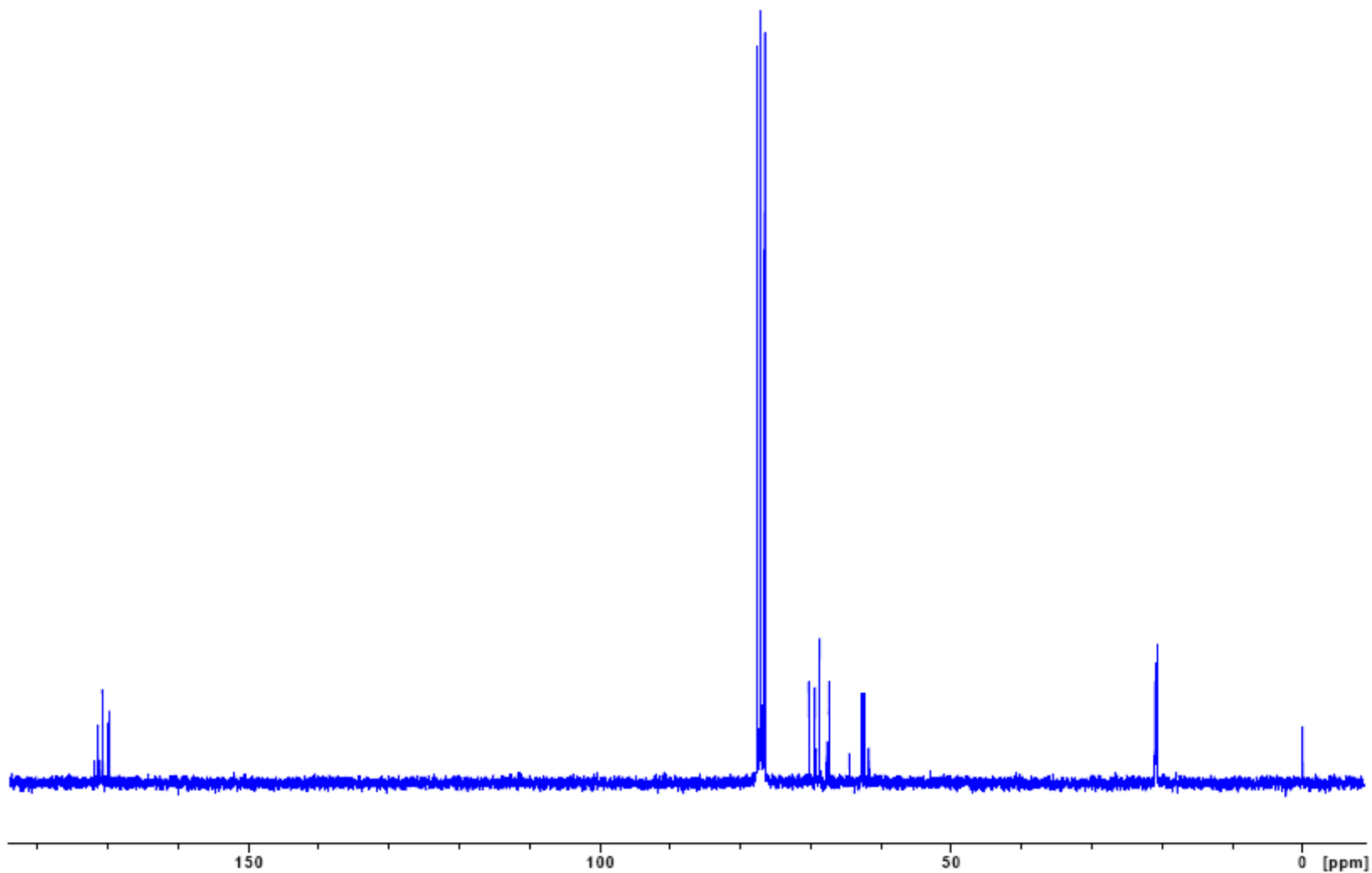


Figura 89. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3/TMS) da peracetilado de manose (**140**).

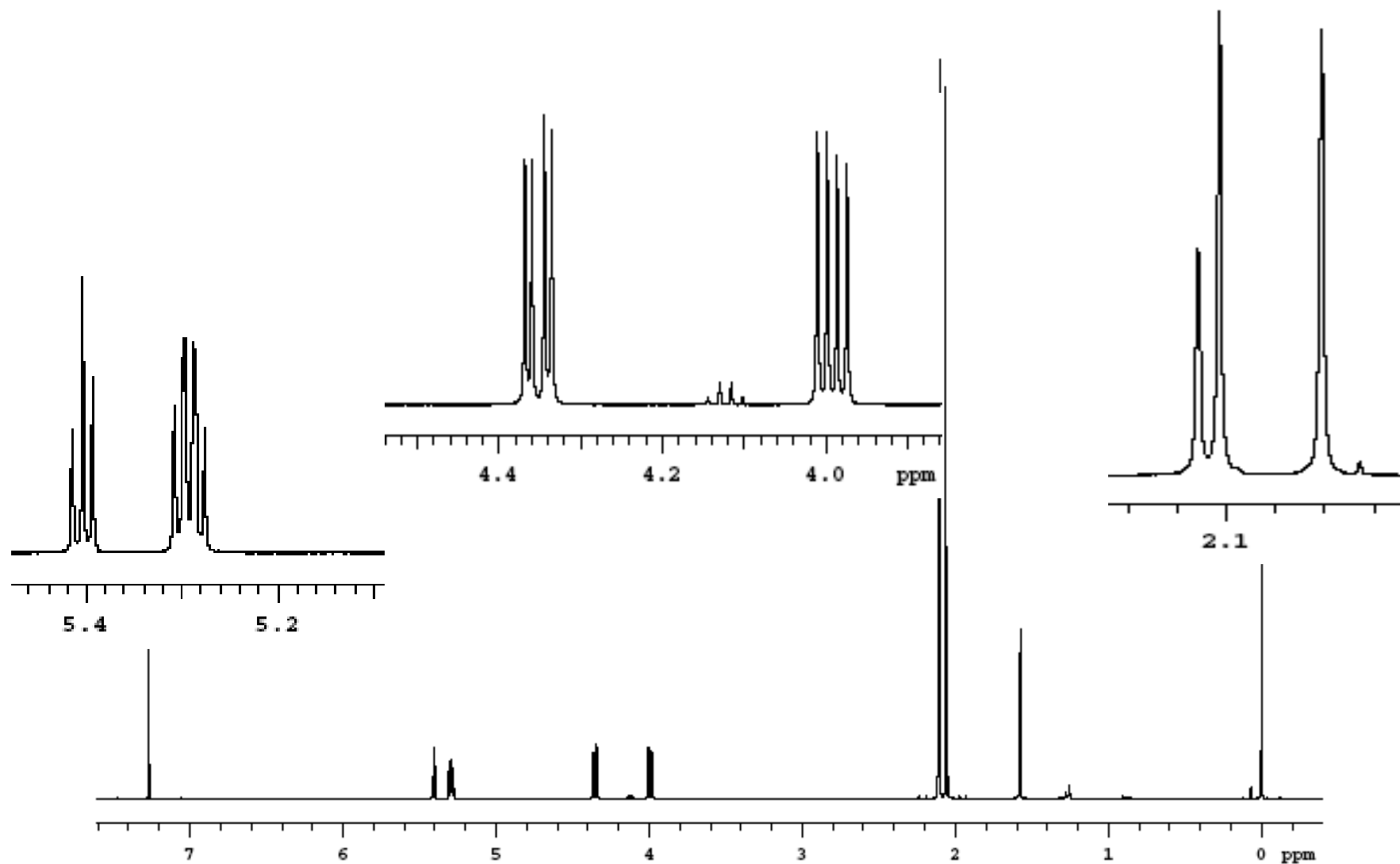


Figura 90. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3/TMS) da Pentaacetato de Xilitol (**141**).

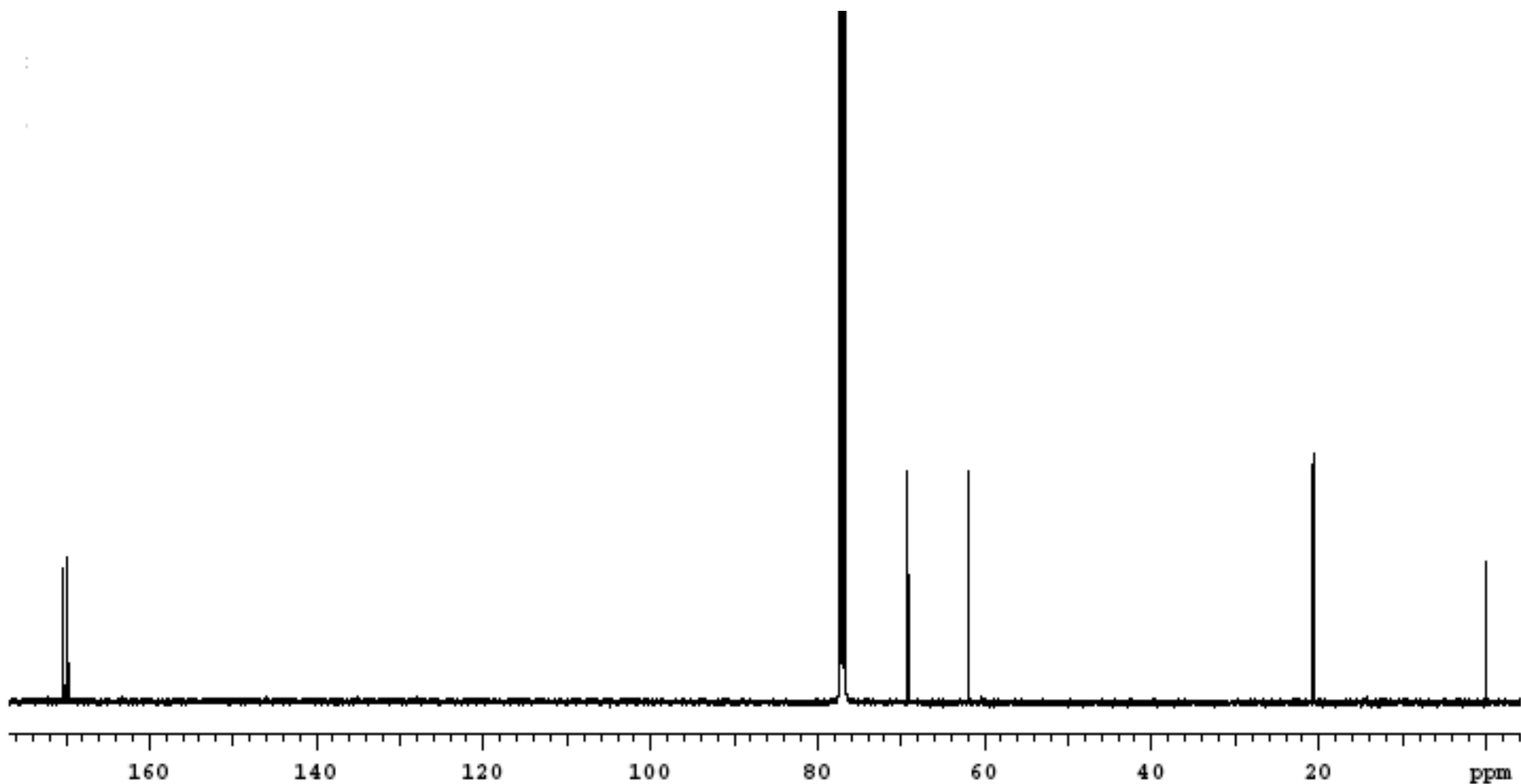


Figura 91. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl₃/TMS) da Pentaacetato de Xilitol (**141**).

**Espectros de IV e ESI-EM dos ácidos graxos presentes em óleos florais
de Malpighiaceae, Krameriaceae**

FO#5 MeOH_pos_CID #50 RT: 0.60 AV: 1 NL: 1.61E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 471.00@cid25.00 [125.00-1200.00]

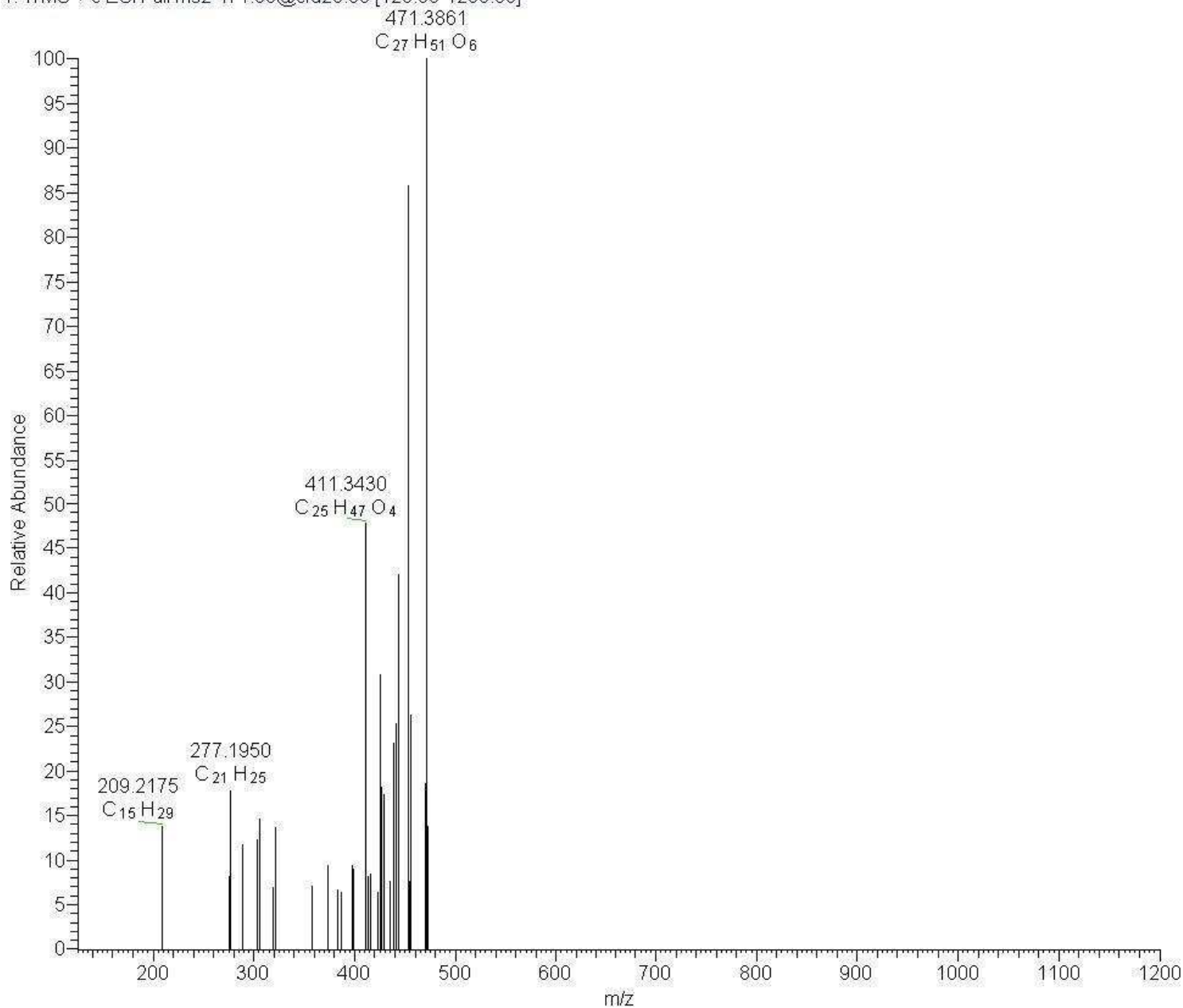


Figura 92. Espectro de ESI-EM do éster metílico do ácido 3,9-diacetóxicosanoico (recompensa floral do tipo-A)

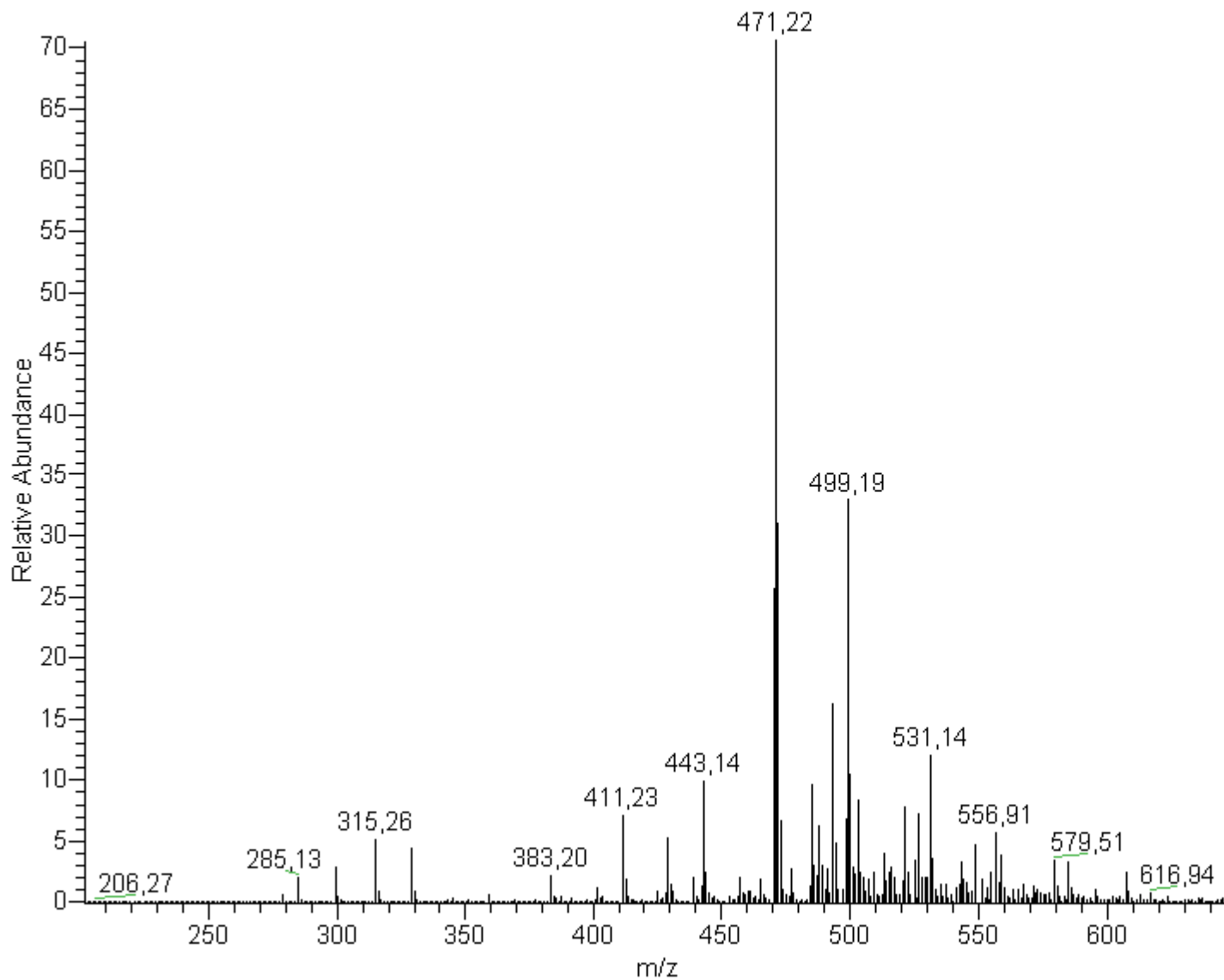


Figura 93. Espectro de ESI-EM do éster metílico do ácido 3,7-diacetóxidocosanoico (recompensa floral do tipo-B).

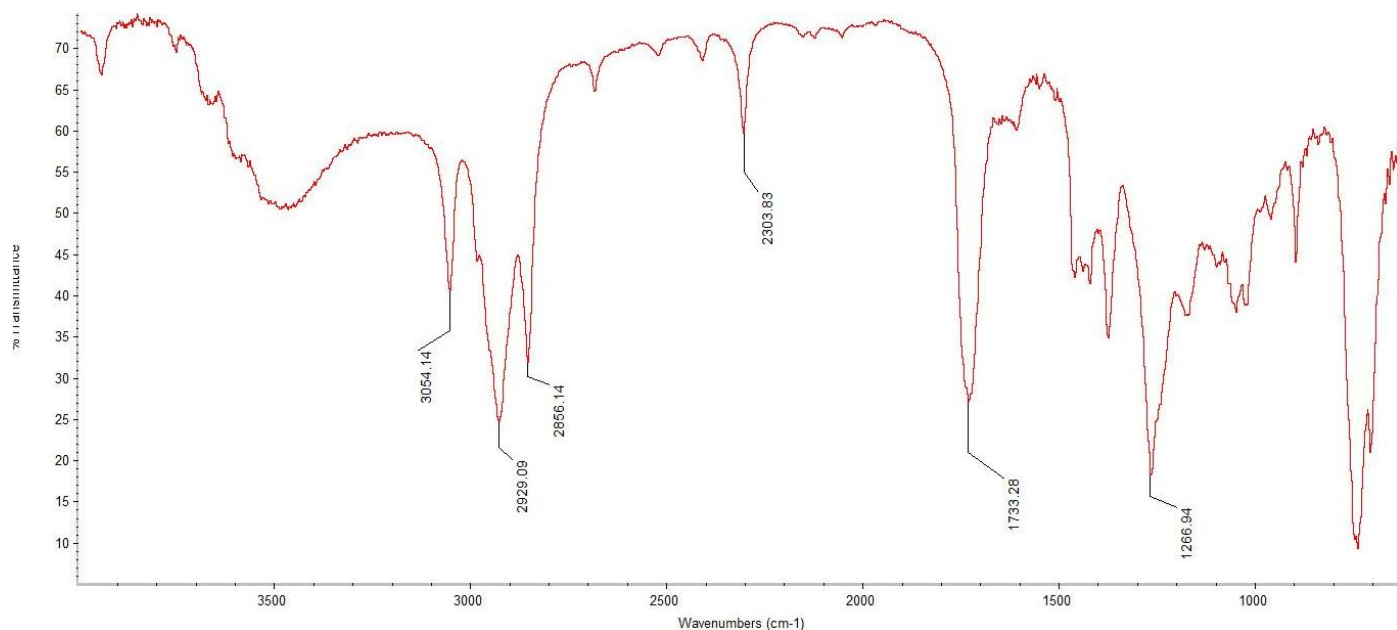


Figura 94. Espectros infravermelho da amostra não metiladas (Natural)

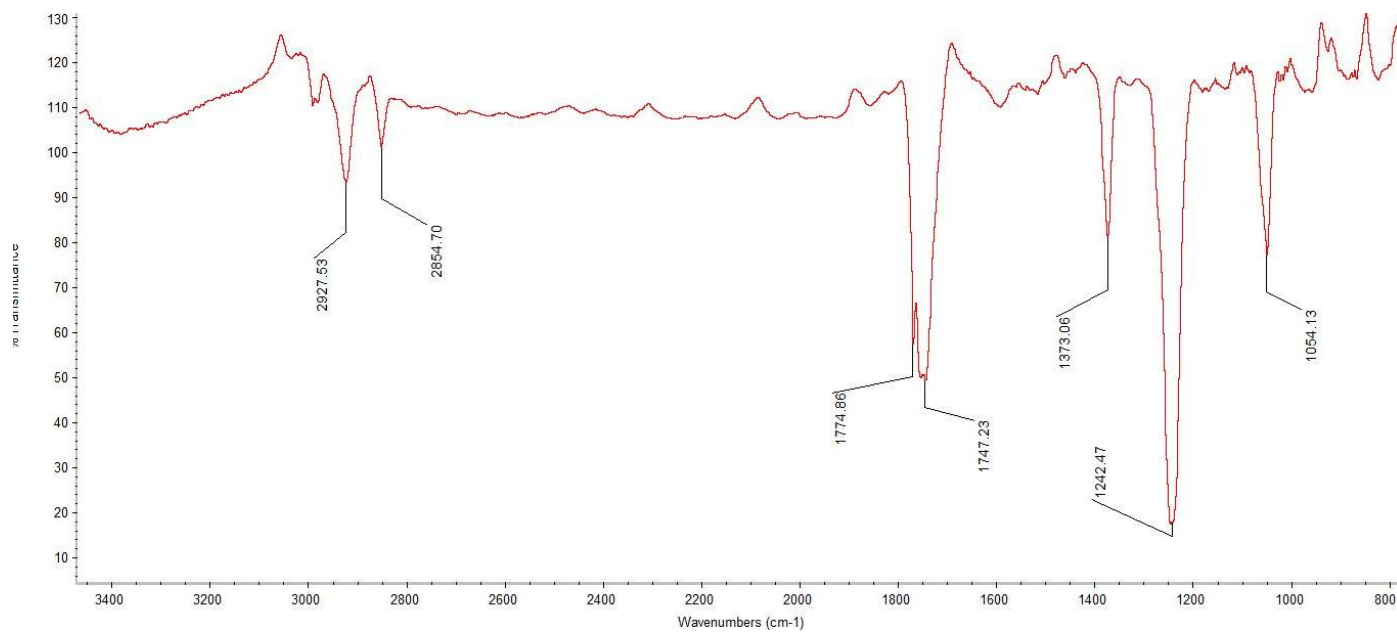


Figura 95. Espectros infravermelho da amostra metiladas (óleo floral + diazometano)