

SIDDHARTHA OM KUMAR GIESE

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS FLORAIS DE
Byrsonima brachybotrya (Malpighiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Luísa L. Lordello

CURITIBA

2005

AGRADECIMENTOS

A professora Ana Luísa L. Lordello pela orientação, motivação, amizade e auxílio nas dificuldades durante todo o trabalho.

Aos professores do departamento que participaram durante minha formação acadêmica e profissional.

Aos amigos do LAPNEQ.

Aos professores Francisco de Assis Marques e Brás H. de Oliveira, pelas importantes observações e correções durante o Exame de Qualificação.

A professora Anita J. Marsaioli e Adriana Piannaro pelo auxílio e compreensão nas análises de GC-EM.

À minha família e namorada pelo apoio e compreensão.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução.....	01
1.3 Objetivos.....	11
1.3.1 Objetivos Específicos.....	11

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais utilizados	12
--------------------------------	----

3. Experimental

3.1 Coleta do material vegetal e as observações de campo.....	13
3.2 Extração do Óleo Floral	13
3.3 Reação de Metilação	14
3.4. Preparação do Padrão de N-alcanos.....	14
3.5 Análise de CG/EM e Cálculo do Índice de Retenção.....	14
3.6 Fracionamento do óleo floral	15

4. Resultados e Discussão

4.1. Coleta e observação de campo	16
4.2 Obtenção dos Óleos Florais	17
4.3 Massas de óleo floral extraído	18
4.4 Análises por Cromatografia de Camada Fina	19
4.5 Análises por Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas	19
4.6 Estruturas dos compostos encontrados nas análises de CG/EM do óleo floral extraído dos botões e flores	25
4.7 Classe de compostos encontrados no óleo floral	27
4.7.1 Ácidos carboxílicos	27
4.7.1.1 Ésteres de ácido graxo	27
4.7.2 Cetonas	33
4.7.3 Terpenóides e Esteróides	33
4.7.3.1 Esteróides.....	33
4.7.4 Flavonóides	36

4.7.5 Compostos não identificados pelas bibliotecas WILEY e NIST	37
4.7.5.1 Triterpeno: Ester 22 β -hidroxi-3,21-dioxo-D:A-Friedo-30-nor-olean-24-oato de metila	38
4.8 Análise Comparativa dos óleos florais de <i>Byrsonima brachybotria</i>	40
Conclusão	43
ANEXOS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ESQUEMAS

Esquema 1 – Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses	6
Esquema 2 - Formação do íon acílio (1) e do pico base pelo rearranjo de McLafferty(2).....	28
Esquema 3 - Estado intermediário postulado por SPITELLER	29
Esquema 4 - Formação do fragmento m/z 143.....	29
Esquema 5 - Formação dos fragmentos m/z 199 e m/z 255.....	29
Esquema 6 - Formação do fragmento m/z 87	29
Esquema 7 - Formação do pico [M – 43] do ácido graxo saturado	30
Esquema 8 - Reação de derivatização por DMDS.....	30
Esquema 9 - Fragmentação do butanodioato de metila.	31
Esquema 10 – Fragmentação do dibutilftalato	32
Esquema 11 - Esquema da formação do pico base do espectro de massas da 2-pentadecanona.....	33
Esquema 12 - Proposta de fragmentação da β -amirina.....	35
Esquema 13 - Proposta de fragmentação do α -amirina	36
Esquema 14 – Fragmentos do composto 4',5-diidroxi-7-metoxiflavona.....	37
Esquema 15 – Fragmentos do composto 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona...37	
Esquema 16 - Proposta de fragmentação de massas para o triterpeno	39

TABELAS

TABELA 1 – Preferência de cor de diferentes polinizadores	3
TABELA 2 – Massas dos Óleos Extraídos na Primeira Coleta	18
TABELA 3 - Massas dos Óleos Extraídos na Segunda Coleta	18
TABELA 4 - Massas dos Óleos Extraídos na Terceira Coleta	18
TABELA 5 - Substâncias identificadas no extrato em acetato de etila das flores de <i>B. brachybotria</i> nas três coletas realizadas (FC1/FC2/FC3).....	21
TABELA 6 - Substâncias identificadas no extrato em acetato de etila dos botões de <i>B. brachybotria</i> nas três coletas realizadas (BC1/BC2/BC3)	23

FIGURAS

Figura 1 – Principais abelhas coletoras de óleo floral.....	8
Figura 2 – Fotos das espécies cuja a composição química dos óleos florais já foram estudados	9
Figura 3 – Foto da fêmea da abelha <i>Centris flavifrons</i> cavando o solo para construir seu ninho	10
Figura 4 – Foto dos elaióforos da <i>B. brachybotria</i>	13
Figura 5 – Fotos da região do cerrado e região da mata	17
Figura 6 - Foto mostrando as flores maduras e os botões de <i>Byrsonima Brachybotrya</i>	17
Figura 7 - Estrutura molecular dos compostos encontrados nos óleos florais de <i>Byrsonima brachybotrya</i>	26
Figura 8 - Estrutura geradora do pico em <i>m/z</i> 114 do diéster do ácido succínico	31
Figura 9 - Gráfico da análise comparativa entre Flor e Botão dos óleos extraídos de <i>B. brachybotrya</i>	41
Figura 10 - Gráfico da análise comparativa entre FlorXFlor e BotãoXBotão dos óleos extraídos de <i>B. brachybotrya</i>	42

ANEXOS

Figura 11 - Espectro de massas do Tetradecanoato de metila.....	44
Figura 12 - Espectro de massas do Hexadecanoato de metila.....	45
Figura 13 - Espectro de massas do Octadecanoato de metila.....	46
Figura 14 - Espectro de massas do Tetracosanoato de metila.....	47
Figura 15 - Espectro de massas do 8,11-octadecadienoato de metila.....	48
Figura 16 - Espectro de massas do 9,12-octadecadienoato de metila (Z,Z).....	49
Figura 17 - Espectro de massas do 9,12,15-octadecatrienoato de metila.....	50
Figura 18 - Espectro de massas do Butanodioato de dimetila.....	51
Figura 19 - Espectro de massas do 2-nitro, propanoato de metila.....	52
Figura 20 . Espectro de massas do 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila.....	53
Figura 21 - Espectro de massas do p-metoxicinamato de metila.....	54
Figura 22 - Espectro de massas do Dibutilftalato.....	55
Figura 23 - Espectro de massas da 2-pentadecanona.....	56
Figura 24 - Espectro de Massas do Beta Sitosterol.....	57
Figura 25 - Espectro de massas do Olean-12-en-3-ol (β -amirim).....	58
Figura 26 - Espectro de massas do Urs-12-en-3-ol (α -amirim).....	59
Figura 27 - Espectro de massas do 4',5-dihidroxi-7-metoxiflavona.....	60
Figura 28 - Espectro de massas do 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona.....	61
Figura 29 - Espectro de massas do éster 22 β -hidroxi-3,21-dioxo-D:A-Friedo-30-nor-olean-24-ato de metila.....	62
Figura 30 - Cromatograma dos óleos florais obtidos dos botões de <i>Byrsonima brachybotria</i>	63
Figura 31 - Cromatograma dos óleos florais obtidos das flores de <i>Byrsonima brachybotria</i>	64
Figura 32 - Cromatograma do Padrão de Hidrocarbonetos.....	65
Figura 33 - Cromatograma da co-injeção do padrão com extrato do óleo floral obtido dos botões de <i>B. brachybotria</i> na primeira coleta.....	66
Figura 34 - Espectro de RMN ^1H do óleo floral bruto da flor de <i>Byrsonima brachybotrya</i>	67
Figura 35 - Espectro de RMN ^1H do óleo floral bruto do botão de <i>Byrsonima bachybotrya</i>	67

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido o protocolo de extração e análise da composição química dos óleos florais de botões e flores de *Byrsonima brachybotrya*.

Para a determinação da composição química do óleo floral envolveu análises de cromatografia gasosa, índice de retenção e espectrometria de massas. Foram identificados nos óleos florais dos botões os compostos tetradecanoato de metila, hexadecanoato de metila, octadecanoato de metila, tetracosanoato de metila, 8,11-octadecadienoato de metila, (9z,12z,15z)-octadecatrienoato de metila, butanodioato de dimetila, 2-nitro-propanoato de metila, 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila, p-metoxicinamato de metila, 2-pentadecanona, β -sitosterol, olean-12-en-3-ol, urs-12-en-3-ol, 4',5-diidroxi-7-metoxiflavona, 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona.

Nos óleos obtidos a partir das flores foram identificados os compostos tetradecanoato de metila, hexadecanoato de metila, octadecanoato de metila, tetracosanoato de metila, (9z,12z) -octadecadienoato de metila, (9z,12z,15z)-octadecatrienoato de metila, butanodioato de dimetila, 2-nitro-propanoato de metila, 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila, p-metoxicinamato de metila, 2-pentadecanona, β -sitosterol, olean-12-en-3-ol, urs-12-en-3-ol, 4',5-diidroxi-7-metoxiflavona, 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona.

Neste trabalho propomos ainda a identificação do triterpeno 22 β -hidroxi-3,21-dioxo-D:A-Friedo-29-nor-olean-24-ato de metila, o diacilglicerídeo 1(acetoxi-docosanoil)-2-acetilglicerol, e os ésteres octílicos 3'-hidroxi, 9-acetoxitricosanoato de octila e 3-hidroxi, 9-acetoxidocosanoato de octila somente por espectrometria de massas.

Outras análises para estes compostos ainda estão sendo efetuadas.

ABSTRACT

In this work it was developed the protocol of extraction and analysis of the chemical composition of floral oils of buttons and flowers of *Byrsonima brachybotrya*. For the determination of the chemical composition of the floral oil it involved analyses of gaseous chromatography, index of retention and mass spectrometry. The compounds had been identified in floral oils of the buttons methyl tetradecanoate, methylhexadecanoate, methyl octadecanoate, methyl tetracosanoate, methyl 8,11-octadecadienoate, methyl (9z, 12z, 15z) - octadecatrienoate, dimethylbutanodioato , methyl 2-nitro-propanoate, methyl 3,4,5-trimetoxibenzoate, methyl p-metoxicinamato, 2-pentadecanone, β - sitosterol, olean-12-en-3-ol, urs-12-en-3-ol, 4',5-diidroxi-7-metoxiflavone, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavone. In oils gotten from the flowers they had been identified to the compounds methyl tetradecanoate, methylhexadecanoate, methyl octadecanoate, methyl tetracosanoate, methyl 8,11-octadecadienoate, methyl (9z, 12z, 15z) - octadecatrienoate, dimethylbutanodioato, methyl 2-nitro-propanoate, 3 methyl 3,4,5-trimetoxibenzoate, methyl p-metoxicinamato, 2-pentadecanone, β - sitosterol, olean-12-en-3-ol, urs-12-en-3-ol, 4', 5-diidroxi-7-metoxiflavona, 4',5-diidroxi-7-metoxiflavone, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavone. In this work we still consider the identification of triterpeno methyl 22 β - hidroxi-3,21-dioxo-D: The-Friedo-29-nor-olean-24-oate , diacilgliceride 1 (acetoxi-docosanoil) - 2-acetylglicerol, and octílics esters octil 3-hidroxi-9-acetoxitricosanoate and octil 3-hidroxi-9-acetoxidocosanoato only for mass spectrometry.

Other analyses for these compounds still are being effected.

1. Introdução

Nesta introdução serão abordados os temas sobre o papel que o óleo floral exerce na relação interespecífica entre plantas e seus polinizadores, as abelhas, bem como aspectos relevantes sobre a importância da investigação da estrutura química deste óleo, além de aplicação de métodos físicos de análise de estruturas orgânicas.

1.1 Considerações Gerais

As flores oferecem uma enorme diversidade de recompensas aos seus polinizadores tais como néctar, pólen, resinas, etc. cuja função está muito bem estudada.

Uma nova área de pesquisa em ecologia de polinização surgiu em 1969, quando VOGEL relatou pela primeira vez a presença óleos florais em algumas espécies vegetais, que se encontram em organelas altamente especializadas denominadas de “elaióforos”, como outra forma de recompensa oferecida aos polinizadores, em especial as abelhas.

Existem hipóteses que evidenciam a utilizam estes óleos na construção e vedação dos ninhos; aumento da aderência do pólen ao seu corpo etc, mas a sua verdadeira função ainda permanece desconhecida.

1.2 Ecologia Química

Quando os insetos, de maneira geral, visitam as flores para se alimentar ou coletar o néctar e o pólen para consumo, estes usualmente polinizam as flores neste processo, sendo que ambas as partes (flor e inseto) são beneficiados a partir de uma associação mutualística. Existem três fatores bioquímicos associados nesta inter-relação (HARBONE, 1993):

- 1 – odor;
- 2 – coloração das pétalas da flor;
- 3 – e o valor nutricional do néctar e do pólen.

Como a polinização depende da aproximação do animal sobre a flor, o primeiro sinal que o inseto recebe é sentido pelo olfato.

Os animais vivem em um mundo de comunicação química (feromônios) e são sem dúvida algumas capazes de detectar compostos voláteis exalados pelas flores de uma

longa distância. Quando o polinizador está próximo à flor, este recebe um sinal visual, em contraste entre a coloração das pétalas e das folhas existentes no caule. Após o inseto ter pousado na flor, este é guiado até o néctar por uma guia visual existente na pétala, derivado de uma distribuição diferencial dos pigmentos existentes na pétala da flor. Finalmente, há a transferência do pólen da antera para o estigma, onde o inseto é recompensado pelo ganho nutricional de açúcares e outros constituintes do néctar e do pólen (HARBONE, 1993).

Se for observado com atenção, a polinização nas flores acontece geralmente durante as primeiras horas do dia, onde há muita atividade de insetos, tais como os besouros, abelhas, vespas e alguns outros pequenos insetos. Algumas plantas são somente polinizadas à noite por morcegos e mariposas. Existe ainda um outro tipo de polinização ocasional realizada por pequenos grupos de roedores, macacos e moscas (HARBONE, 1993).

O problema em se determinar o polinizador ou polinizadores ativos em uma determinada espécie de planta é difícil, pois exige muito tempo de observação em campo (HARBONE, 1993).

Alguns animais podem visitar as flores por outra razão que não seja a polinização, porque estes podem “roubar” o néctar da flor sem carregar o pólen necessário para a polinização. Um exemplo deste tipo de animal são as formigas, porém esta pode atuar como um genuíno polinizador em alguns casos (HARBONE, 1993).

A necessidade da planta em atrair animais com o propósito de polinização depende de quão natural é o seu sistema sexual e a sua estrutura floral. Existem alguns tipos de capim que são polinizados pelo vento. Entretanto existem algumas poucas classes de angiospermas que necessitam claramente de um animal para que ocorra a polinização. Isto é obvio para plantas que possuem apenas flores de um sexo, como é o caso das plantas dióicas, onde as flores macho e fêmea se encontram em plantas diferentes. Até mesmo em plantas hermafroditas a autopolinização é incompatível pois há a necessidade de variabilidade genética na população da espécie (HARBONE, 1993).

Há o fenômeno de constância da flor, que é um fator de grande significância na co-evolução de angiosperma e seus parceiros animais. Isto representa uma fidelidade do polinizador, para que haja uma regularidade de visitas somente a um limitado número de espécies de planta, e num caso extremo, somente uma. Esta fidelidade é orientada pela morfologia floral, odor e coloração das pétalas. De fato muitas plantas através da evolução de suas partes florais tiveram uma restrita polinização a um tipo de vetor que foi chamado de “bee-flower” (pequena e com corolas grandes), “butterfly-flowers” (tamanho

médio e corolas estreitas) e “humming bird-flowers” (cumpridas e com corolas grandes) (HARBONE, 1993).

1.2.1 Papel da coloração da flor

As abelhas preferem as tonalidades de azul e amarelo, podendo discernir as diferentes absorções do espectro eletromagnético, e são sensíveis à intensa absorção na região do UV de compostos como as flavonas e flavonóis, que estão presentes em praticamente todas as flores brancas e podem ocorrer como co-pigmento em flores cianicas (azuis) (HARBONE, 1993).

Apesar das abelhas não serem sensíveis a cor vermelha, estas ainda visitam algumas espécies vermelhas guiadas pela presença de absorção do UV pelas flavonas presentes na flor (HARBONE, 1993)..

A preferência de cor de alguns polinizadores estão relatadas na tabela 1 abaixo.

Tabela 1- Preferência de cor de diferentes polinizadores (HARBONE, 1993).

Animal	Preferência de Cor	Comentários
Morcegos	Branco, verde ou púrpura pálido	Maioria não enxerga cores
Abelhas	Amarelo, azul intenso e branco	Podem ver no UV, mas não são sensíveis ao vermelho
Besouros	Creme	Pobre em enxergar cor
Pássaros	Escarlate, vermelho-amarelo	Sensíveis ao vermelho
Borboletas	Cores vivas, vermelho e púrpura	
Mariposas	Vermelho e púrpura, branco e rosa pálido	Maioria poliniza a noite
Moscas	Marrom, roxo ou verde	
Ratos	Vermelho escuro	Polinizam pela noite
Vespas	Marrom	

1.2.2 Papel da Fragrância das Flores

O odor ou o cheiro das flores, freqüentemente são os que mais atraem os insetos polinizadores até as angiospermas. A fragrância tem especial importância para insetos noturnos, onde o estímulo visual é praticamente ausente. As abelhas são especialmente atraídas pela fragrância das flores (HARBONE, 1993).

Como os insetos são sensíveis a baixas concentrações de compostos químicos voláteis, as fragrâncias são normalmente efetivas em baixas concentrações nas flores. Muitas espécies de plantas não apresentam ao sentido humano, possuir grande concentração de fragrância, mas estas produzem fragrância suficiente para atrair abelhas ou borboletas (HARBONE, 1993).

Em muitas espécies, o odor máximo produzido está coordenado com tempo de amadurecimento do pólen e é uma clara demonstração de que a flor está pronta para ser polinizada. A produção de odores florais pode variar, até com relação ao horário do dia, a chamada *variação circadiana*.

O odor floral pode atrair os polinizadores até a flor com outros propósitos além de comida, como acontece no caso da primitiva angiosperma *Zugogynum e Exospermum*, que são polinizadas por mariposas do gênero *Sabatinca* (HARBONE, 1993).

A fragrância é uma mistura de compostos voláteis em sua maioria, terpenos e compostos alifáticos de baixo peso molecular. (GEISMANN, 1969).

Muitas plantas apresentam glândulas especiais de odor na superfície das plantas, as quais estão repletas de óleos voláteis. Não está claro em alguns casos que o odor presente nas folhas contribui ao processo de polinização (HARBONE, 1993).

Odores são exalados pelas flores, na forma de uma mistura complexa de compostos químicos denominado de óleo essencial. Podem ser extraídos por destilação por arraste a vapor. Nos óleos essenciais existe uma variedade de compostos orgânicos presentes, como por exemplo, monoterpenos e sesquiterpenos (majoritários), álcoois alifáticos, cetonas e ésteres (HARBONE, 1993).

Em alguns casos o constituinte majoritário pode ser responsável pelo odor característico da flor, mas usualmente a mistura de componentes é que provê o cheiro de uma planta. O fator mais importante na produção de uma essência, é que um componente pode influenciar diretamente a efetividade de outro para produzir um odor característico (HARBONE, 1993).

Odores desagradáveis ou aminóides tem sido muito pouco estudado. Os componentes principais desta classe são monoaminas, que possuem cheiro parecido com o cheiro de peixe. Em alguns casos, odores mais intensos podem indicar a presença de dois grupamentos amina (HARBONE, 1993).

1.2.3 Papel do Néctar e Pólen

Uma das principais razões pela qual os animais visitam as flores é para obter o néctar e suas propriedades nutricionais que são muito importantes para a maioria dos polinizadores, especialmente para aqueles que não possuem outras formas de nutrição (HARBONE, 1993).

O néctar não possui nenhuma outra função além de atrair os polinizadores. A maioria dos néctares tem sido examinados, e consistem numa simples solução de açúcares. A maioria tem gosto adocicado, sendo que a concentração de açúcar no néctar varia de 15 a 75% por peso. São três os compostos presentes no metabolismo das plantas: glucose, frutose, e sacarose. Oligosacarídeos também ocorrem, mas usualmente em traços. A distribuição destes três açúcares comuns foi relatada em mais de 900 espécies e em diferentes quantidades (HARBONE, 1993).

Uma propriedade desta variação quantitativa dos açúcares presentes no néctar é que a concentração permanece constante e não está sujeita a variação diurna ou sazonal na espécie. Apesar da sacarose poder ser convertida em glucose e frutose via reação enzimática com invertase; e estas terem sido encontrada no néctar, acredita-se que não é encontrada em quantidades suficientes (HARBONE, 1993).

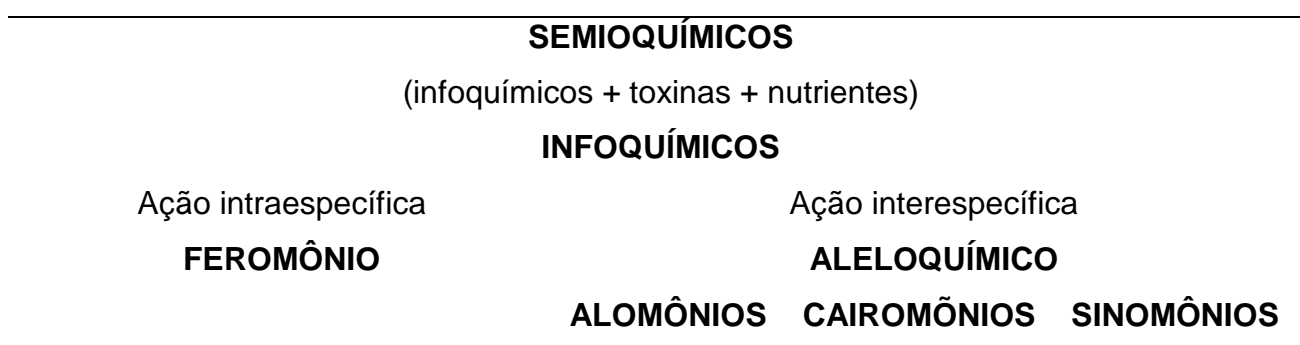
Em análise dos diferentes tipos de néctar feita por Baker e Baker em 1900, estes sugerem que existe uma relação entre a razão dos açúcares presentes e o tipo de polinizador que visita a flor (HARBONE, 1993).

Análises do néctar para encontrar proteínas (Baker e Baker, 1975), mostram que são geralmente ausentes, e apenas em 14% das amostras foi detectada alguma concentração destes compostos (HARBONE, 1993).

1.2.4 Óleos florais

Quando os insetos, de maneira geral, visitam as flores para se alimentar ou coletar o néctar e o pólen para consumo, estes usualmente polinizam as flores neste processo, sendo que ambas as partes (flor e inseto) são beneficiados a partir dessa associação mutualística, onde vários fatores tais como o odor, a coloração das flores e o valor nutricional dos recursos florais estão envolvidos (HARBONE, 1993). Dentre as interações ecológicas, mediadas por semioquímicos (substâncias químicas envolvidas nas interações dos organismos) a polinização de flores por insetos se constitui na mais importante delas dentro das angiospermas.

O termo semioquímico é amplo, não se referindo apenas as substâncias químicas responsáveis pelo fornecimento de informações, como também às toxinas. Assim utilizou-se o termo infoquímicos para enfatizar a diferença entre esta categoria de substâncias químicas, que transportam informações e as toxinas e nutrientes. O termo infoquímicos pode ser definido, então, como uma substância química que, em seu contexto natural, fornece informações em uma interação entre dois indivíduos, provocando, no receptor, um comportamento ou uma resposta fisiológica. Os infoquímicos, portanto se constituem em uma subcategoria dos semioquímicos. A classificação dos infoquímicos baseia-se no tipo de interação; se intraespecífica ou interespecífica, bem com na relação custo/benefício que cada organismo terá. A esquema 1 ilustra com podem ser subdivididos os semioquímicos.



Esquema 1 – Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses.

Os polinizadores, em especial, as abelhas, utilizam recursos florais para a sua alimentação e também na construção de seus ninhos. Dentre estes recursos, o pólen e o néctar são os mais amplamente utilizados e vários autores versam sobre estes recursos analisando sua composição química e seu valor nutricional. Além de pólen e néctar, um grupo relativamente restrito de plantas oferece óleos florais como recompensa aos seus polinizadores. As primeiras observações sobre flores produtoras de óleos remontam o século XIX, quando Darwin em 1862 relata que Fritz Muller, durante suas investigações em matas brasileiras, observou que flores de *Oncidium flexuosum* possuíam “mamilas nutritivas” que eram raspadas por insetos. Depois disso VOGEL, 1969 foi o primeiro autor a descrever a “síndrome floral” que se constitui na presença de estruturas especializadas denominadas de “elaióforos” que são estruturas produtoras de óleos florais em um grupo restrito de famílias vegetais. A partir daí essa nova área de investigação passou a ser conhecida como ecologia da polinização.

A presença de óleos florais foi, até agora, observada em um grupo bastante restrito e seletivo de plantas que estão distribuídas em 8 ordens, 8 famílias (Iridaceae, Krameriasceae, Malpighiaceae, Orchidaceae, Scrophulaceae, Curcubitaceae,

Melastomataceae, Solanaceae, Myrcinaceae), 79 gêneros e 2402 espécies espalhadas por todo o mundo (BUCHMANN, 1987).

Nas famílias Scrophulariaceae, Solanaceae, Primulaceae, Iridaceae, os óleos são armazenados em tricomas localizados nas pétalas, na base das anteras ou em partes do ovário denominados de elaióforos tricomáticos. Nas famílias Malpighiaceae, Orchidaceae e Krameriaceae, os óleos se localizam em células epidérmicas denominados de elaióforos epiteliais.

A família Malpighiaceae está amplamente distribuída nas regiões tropicais, sendo que, dentre os 60 gêneros reconhecidos, 47 são exclusivamente neotropicais. Dentre eles, os mais representativos são: *Banisteria*, *Byrsonima*, *Malpighia*, *Stigmaphyllon* e *Thryallis*.

A despeito da grande diversidade de hábitos, morfologia das partes vegetativas e dos frutos, a morfologia floral de Malpighiaceae é relativamente constante, sendo que somente as espécies neotropicais possuem glândulas de óleos funcionais. A literatura refere-se a 945 espécies (BUCHMANN, 1987; VOGEL, 1990), fazendo da família Malpighiaceae a mais importante família dentro da ecologia da polinização. Segundo TREMBLAY *et al.*, 1992 a especialização das espécies em relação a polinizadores específicos reduz o número de espécies polinizadas e aumenta a eficiência da transferência do pólen entre indivíduos, reduzindo o custo energético de uma fecundação bem sucedida.

As abelhas coletoras de óleo são os principais polinizadores das Malpighiaceae na região Neotropical (FRANKIE *et al.*, 1976; FRANKIE & VINSON, 1997). Este grupo, especializado na coleta e consumo de óleos florais é pequeno e está distribuídos em 15 gêneros e 4 tribos (SIMPSON & NEFF, 1981; BUCHMANN, 1987; VOGEL, 1990 e MICHENER, 2000). Entre estes grupos destacam-se Centrini (*Centris* e *Epicharis*) Tapinotaspidini (ex. *Paratetrapedia*) e Tetrapediini (ex. *Tetrapedia*), todas pertencentes à antiga família Anthophoridae e atualmente agrupadas na família Apidae (Apoidea, Hymenoptera).

Centridini**Tapinotaspidini****Tetrapediini**

Figs. 1-4. Espécies de Centris (Melicentris): 1, C. (M.) plicata n. sp.; 2, C. (M.) melanosoma sp. nov. (holótipo); 3, C. (M.) (Abdogenes) Mauer & Szilady, 1961; 4, C. (M.) rapitosa Friese, 1906.

As principais polinizadoras das Malpighiaceae Além da ***Epicharis***

Paratetrapedia fêmea em *B. brachybotrya* Tetrapedia macho em *B. brachybotrya*

Figura 1. Principais abelhas coletoras de óleo floral.

A função destes óleos para as abelhas ainda permanece uma área pouco investigada. VOGEL em 1974, foi o primeiro a sugerir que os óleos seriam usados basicamente na alimentação larval, e as abelhas coletoras de óleo teriam passado a utilizar esse recurso como substituto do néctar, pelo seu alto valor nutricional, pois alguns óleos florais chegam a fornecer até quatro vezes mais energia por unidade de massa do que os carboidratos presentes no néctar (BUCHMANN, 1987). A análise do alimento larval retirado de células de *Centris* confirmam também esta suposição. (SIMPSON *et al.*, 1977; SIMPSON & NEFF, 1981; VINSON *et al.*, 1997).

As relações ecológicas entre flores e seus polinizadores têm despertado a atenção de pesquisadores há muito tempo, mas tradicionalmente, essas interações têm sido analisadas sob uma perspectiva morfo-funcional com base na morfologia das flores e das abelhas e no seu comportamento associado (PERCIVAL, 1965; VAN DER PIJL & DODSON, 1966; FAEGRI & VAN DER PIJL, 1979; REAL, 1983; SIMPSON & NEFF, 1983). Abordagens correlacionando variações na composição química das recompensas florais com diferentes grupos de polinizadores têm focado principalmente ‘flores de néctar’ (KEVAN & BAKER, 1983) e ‘flores de fragrância’ (WILLIAMS, 1983) e seus polinizadores.

Poucos estudos foram até hoje realizados no sentido de identificar a composição química dos óleos florais. VOGEL (1974) analisou os óleos de espécies de *Calceolaria*

(Scrophulariaceae) identificando diacilglicerídeos como seus principais constituintes, resultado semelhante tendo sido encontrado também em espécies de *Lysimachia* (Primulaceae). Em *Krameria* (Krameriaceae), os principais constituintes foram identificados como sendo ácidos graxos livres. REIS *et al.* (2000) relataram a composição química dos óleos florais de *Oncidium pubes* (Orchidaceae), formados de di e triacilglicerídeos. O único trabalho relativo à química de óleos florais de Malpighiaceae é um estudo sobre *Byrsonima crassifolia*, que mostrou uma variação intra-específica na composição química onde dois tipos de óleo floral puderam ser observados. No tipo mais comum o óleo consiste de mono e diglicerídeos, ácidos graxos e uma pequena quantidade de triglicerídeos, além de traços de carboidratos. A composição dos glicerídeos é predominantemente de ésteres de ácidos graxos de C-18 a C-22. O segundo tipo é similar ao primeiro, com exceção da presença de grandes quantidades de um lipídio desconhecido mais polar que os padrões analisados (VINSON *et al.*, 1997).

Também foi encontrado que o componente majoritário da *Oncidium pubes* Lindl., *O. hookeri* Rolfe, *O. cornigerum* Lindl., *O. truncatum* Pabst, *O. amictum* Lindl., *O. longicornu* Mutel, *O. welteri* Pabst, *Baptistonia echinata* Barb. Rodr. E *Ornithofhora radicans* Barb. são diacilglicerídeos substituídos assimetricamente. Diacilglicerídeos substituídos assimetricamente são conhecidos por ativar a proteína kinase C (PKC), responsável pelo sinal celular que promove a hidrólise do lipídio e fosforilação de várias proteínas que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Portanto o papel destes lipídios para as abelhas pode ser muito mais importante que somente para revestimento do ninho. (MARSAIOLI, *et al.*, 2000)



Calceolarea
(VOGEL, 1974)



Krameria
(SEIGLER, 1978)



Byrsonima crassifolia
(VINSON *et al.*, 1997)



Oncidium pubes
(REIS *et al.* 2000)

Figura 2. Foto das espécies cuja composição química dos óleos florais já foram estudados.

Sabe-se também que os óleos coletados pelas abelhas são empregados como material de revestimento de seus ninhos (SIMPSON & NEFF, 1981; BUCHMANN, 1987). Nas abelhas *Centris* spp, o óleo é coletado especialmente pelas fêmeas, que o carregam para os ninhos, misturando-o com pólen (proteína), que depositam seus ovos nesta mistura. As larvas que nascem possuem uma dieta especial de lipídios para se desenvolver. Deste modo os lipídios desempenham um papel muito importante na evolução da relação entre plantas e polinizadores; ou seja, as abelhas se beneficiam pela dieta de alto valor nutricional e as plantas são fielmente polinizadas por elas.



Figura 3. Foto da fêmea da abelha *Centris flavifrons* cavando o solo para construir seu ninho.

Estudos mais recentes relatam a coleta de óleo também por abelhas machos o que de alguma forma amplia a nossa visão a cerca da função dos óleos florais para as abelhas.

Como o conhecimento da composição química dos óleos produzidos nas glândulas florais versus visitantes (abelha) pode fornecer dados importantes na compreensão de diversos mecanismos de polinização, e como muito pouco têm sido feito no sentido de se entender essas possíveis correlações. Propomo-nos a, dentro de uma área de estudo específica, investigar a composição química dos óleos florais de plantas da família Malpighiaceae, bem como sua variação intra- e interespecífica e a correlacionar à fauna de abelhas visitantes. Para tanto neste trabalho, fez-se necessário uma colaboração com os profs. Gabriel Melo do Depto de Zoologia/UFPR e Anita J. Marsaioli do IQ-UNICAMP.

1.3 Objetivos

Identificar quimicamente os principais constituintes presentes nos óleos florais de *Byrsonima brachybotria* (Malpighiaceae).

1.3.1 Objetivos Específicos

Observação de campo, para detectar as espécies de Malpighiaceae visitadas por abelhas coletoras de óleo.

Identificação dos espécimes coletados (plantas e abelhas).

Retirada dos elaiofóros epiteliais das flores e/ou botões de *Byrsonima brachybotria*.

Extração e derivatização do óleo floral obtido.

Análise por CG/EM

Interpretação dos resultados obtidos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais utilizados

Todos os solventes utilizados neste trabalho, desde a extração até o fracionamento cromatográfico, de grau espectroscópico: acetato de etila (TMEDIA), hexano, diclorometano e metanol (VETEC).

As placas de CCD foram efetuadas utilizando-se sílica gel 60 da Merck, e reveladas com irradiação de luz UV, em comprimento de onda de 254 e 365 nm; e/ou anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento.

A coluna cromatográfica foi feita com sílica gel Merck (0,04-0,063 mm) para separação dos padrões de n-alcenos e sílica gel Merck (0,063-0,2000 mm) para o fracionamento cromatográfico do óleo.

O diazometano foi preparado dissolvendo-se 1g de N-metil-N-nitrosotolueno-p-sulfonamida (CAS nº 80-11-5), em 20 mL de éter etílico em banho de gelo. Adicionou-se em seguida 1 g de KOH em 2 mL de água destilada com 8mL de etanol. Após 5 minutos, foi destilada a solução formada em banho-maria à temperatura de 65°C.

Os espectros de RMN ¹H foram obtidos em espectrofotômetro da AC-200 da Brucker, operando a 200 MHz.

As análises de CG/EM foram realizadas na Universidade de Campinas (UNICAMP), no laboratório da Profa. Dra. Anita J. Marsaioli.

O aparelho utilizado para análise das amostras, como para a injeção do padrão de n-alcenos foi o Hewlett Packard 6890/5973. Injetou-se 2µL de amostra solubilizada em acetato de etila grau espectroscópico em injetor splitless, a 250°C, conectado a uma coluna apolar HP-5 (sílica fundida) de 30m x 0,25mm x 0,25µm, onde a temperatura inicial foi de 50 °C e a final de 290°C, sendo a rampa de aquecimento 5°C por minuto (temperatura programada) e espera de 12 min em 290°C. O gás carreador foi hélio com vazão de 1mL/min. A ionização dos compostos eluídos da coluna foi feita com impacto eletrônico de 70 eV.

3. Experimental

3.1 Coleta do material vegetal e as observações de campo

A coleta de material biológico e as observações de campo foram realizadas na Reserva Ecológica Itaytyba, uma reserva particular do patrimônio natural (RPPN) pertencente à Fazenda Santa Lúcia do Cercadinho, no município de Tibagi. A RPPN possui uma área total de 1090 ha e é vizinha ao Parque Estadual do Guartelá. A área é coberta predominantemente por campos limpos, contendo também remanescentes de cerrado e matas de galeria. O trabalho de campo foi concentrado nas áreas de campo limpo e cerrado pela facilidade de locomoção e observação (plantas com estatura média e baixa).

3.2 Extração do Óleo Floral

Devido a pouca quantidade de material disponível para análise, o procedimento de extração envolveu a retirada dos elaióforos epiteliais manualmente com o auxílio de microscópio estereoscópico, em seguida uma lavagem rápida da organela em água destilada, para retirada de eventuais impurezas e/ou pólen. Para extração do óleo floral foram realizados vários processos clássicos de extração: nitrogênio líquido seguido de maceração, ultrassom e por imersão, sendo que o último método foi o mais simples. Os óleos dos elaióforos foram então submetidos a extração por imersão em acetato de etila grau espectroscópico. Foi feito um total de cinco extrações. Em seguida o óleo floral remanescente foi extraído utilizando banho de ultra-som por 20 minutos em acetato de etila, e posteriormente filtrados.



Figura 4. Foto dos elaióforos extraídos da *B. brachybotria*.

3.3 Reação de Metilação

Para reação de metilação, adicionou-se o reagente de metilação (diazometano) diretamente sob o óleo. A ocorrência da reação pode ser verificada pela liberação de N₂.

3.4. Preparação do Padrão de N-alcenos

O padrão de n-alcenos, comumente obtido na empresa Sigma Aldrich, foi preparado usando o petróleo como matéria prima.

Em uma coluna cromatográfica com sílica gel pura (0,04mm-0,063mm), foram colocados 100mL de petróleo, onde foi utilizado hexano (100%) como fase móvel. As cinco primeiras frações foram reunidas e analisadas no cromatógrafo gasoso com detector de massas. O cromatograma desta análise encontra-se nos anexos (figura 33-p.69).

3.5 Análise de CG/EM e Cálculo do Índice de Retenção

O cálculo do índice de retenção foi feito a partir das fórmulas 1 e 2 mostradas abaixo (VAN DEN DOOL E KRATZ, 1963).

$$I = 100.Z + 100 \left[\frac{t'r(x) - t'r(z)}{t'r(z+1) - t'r(z)} \right] \quad (1)$$

$$I = 100.Z + 100 \left[\frac{\log t'r(x) - \log t'r(z)}{\log t'r(z+1) - \log t'r(z)} \right] \quad (2)$$

Onde:

t'r(x) é o tempo de retenção do pico analisado subtraído do tempo de retenção do alcano eluído mas rapidamente da coluna;

t'r(z) é o tempo de retenção do alcano eluído imediatamente antes do pico analisado subtraído do tempo de retenção do alcano eluído mais rapidamente da coluna;

t'r(z+1) é o tempo de retenção do alcano eluído imediatamente depois do pico analisado subtraído do tempo de retenção do alcano eluído mais rapidamente da coluna;

Z é o número de átomos de carbono existente na estrutura do alcano eluído imediatamente antes do pico analisado;

Todos os tempos de retenção são utilizados em minutos.

3.6 Fracionamento do óleo floral

Devido a grande complexidade química do óleo floral, optou-se por fazer uma purificação deste óleo utilizando uma coluna cromatográfica de sílica gel 60 (0,063-0,2000 mm) na proporção de 1:20. Foram adicionados na coluna 160 mg de amostra bruta.

Com o fracionamento cromatográfico do óleo floral, foram obtidos num total de 378 frações, onde a troca de solventes acontecia quando não havia mais indícios de compostos eluídos da coluna, observados em CCD e UV. As primeiras 50 frações correspondem a fração hexânica, frações de 51 a 130 à hexano:diclorometano 1:1, frações 131 a 187 à diclorometano 100%, frações 188 a 237 á diclorometano:acetato de etila 1:1, frações 238 a 291 à acetato de etila 100%, frações 292 a 330 acetato de etila:metanol 1:1 e frações 330 a 378 à metanol 100%. Em seguida estas frações foram analisadas por placas cromatográficas padronizadas da Merck, onde foram reunidas as frações 11 a 49, 133 a 151, 152 a 158 e 163 a 173, as frações correspondentes ao acetato de etila 100% não apresentaram qualquer indício de amostra no UV e na revelação com anisaldeído. As frações obtidas com metanol ainda não foram analisadas.

4. Resultados e Discussão

Os resultados parciais deste trabalho consistem na coleta, extração e caracterização dos óleos florais da espécie *Byrsonima brachybotrya* Nied.

4.1. Coleta e observação de campo

A coleta de material biológico e as observações de campo foram realizadas na Reserva Ecológica Itaytyba, onde foram feitas, três visitas para coleta e observação de campo durante o período de floração das Malpighiaceas que compreendeu o período de Outubro de 2003 a Março de 2004. **Todas as espécies coletadas que constam da relação abaixo foram (através de observações de campo), em algum momento, visitadas por abelhas coletoras de óleo.**

A primeira coleta foi feita no início da floração, que ocorreu no final do mês de outubro de 2003, onde foram coletadas várias espécies de Malpighiaceae, posteriormente identificadas como: *Byrsonima brachybotrya* Nied., *Byrsonima* sp., *Peixotoa parviflora* A. Juss. e *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. sendo que algumas das espécies acima foram coletadas tanto na região de mata quanto na região do cerrado.

A segunda coleta foi realizada um mês após a primeira visita (novembro de 2003), onde foram coletadas várias espécies que foram posteriormente identificadas como: *Byrsonima* sp., *Byrsonima subterranea* Brade & Markgr, *Peixotoa parviflora* A. Juss., *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC., *Banisteriopsis campestris* (A. Juss.) Little, e a espécie *Byrsonima brachybotrya* Nied., esta última apenas na região de cerrado.

A terceira coleta foi realizada no final do mês de março de 2004, que corresponde ao final do período de floração, onde foram encontradas poucas espécies ainda floridas, dentre as quais foram coletas: *Banisteriopsis muricata* (Cav.) Cuatrec. e *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss, sendo que a espécie *Byrsonima brachybotrya* Nied foi novamente coletada, com pouca amostragem, na região de mata.

O material será depositado no Herbário da UFPR e as exsicatas estão com o Prof. Dr. Gabriel Melo da UFPR, mas serão levadas para o herbário oportunamente. A identificação do material vegetal foi feita pela Dra. Maria Cândida H. Mamede, do Instituto de Botânica de São Paulo, que é especialista na família Malpighiaceae.

A escolha de se começar as análises pela espécie *Byrsonima bachybotria* foi baseada no fato de que a espécie (dentro da área de estudo) apresentar a maior população comparada a outras espécies e também por ter sido obtida em todas as

coletas realizadas, tornando possível uma análise comparativa entre os óleos florais obtidos.

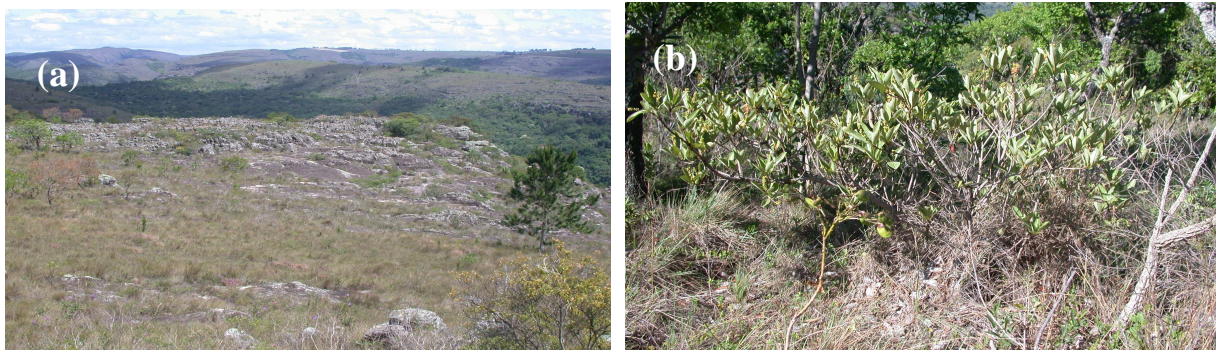


Figura 5. Fotos da região do cerrado (a) e da região da mata (b).

4.2 Obtenção dos Óleos Florais

Como existem poucos estudos sobre métodos de extração destes óleos, bem como a sua composição, optou-se em extrair amostras em plantas em estágio inicial de maturação (botão), separadamente ao óleo de plantas maduras (flores abertas). Inicialmente o processo de extração utilizado foi por imersão, assim os elaióforos foram retirados manualmente das flores e botões e imediatamente mergulhados em acetato de etila no próprio local de coleta, evitando qualquer tipo de reações oxidativas e/ou degradativas do material vegetal fresco.

Depois de repetir o procedimento de troca de solvente por 5 vezes consecutivas, os elaióforos foram então extraídos com acetato de etila em ultra-som, por 20 minutos afim de retirar qualquer material adsorvido remanescente.

O óleo obtido por percolação não foi misturado com aquele obtido por ultra-som. Assim como os óleos obtidos em cada uma das três coletas também não foram misturados entre si.

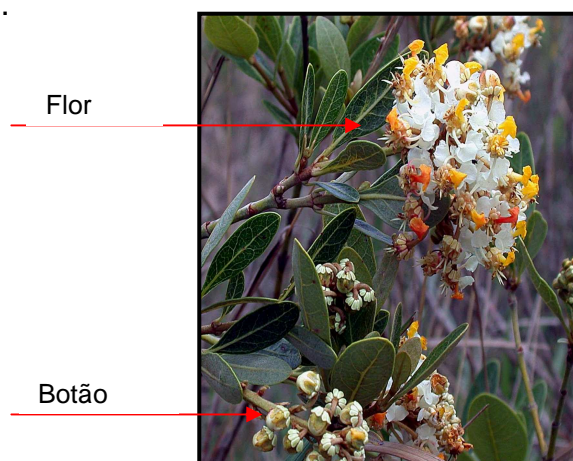


Figura 6: Foto mostrando as flores maduras e os botões de *Byrsonima Brachybotrya*.

A escolha do acetato de etila baseia-se na polaridade observada para os compostos presentes nas amostras

4.3 Massas de óleo floral extraído

Abaixo estão apresentadas as massas de óleo extraídas nas três coletas realizadas, além de apresentar outros dados tais como: local da coleta e o estágio de maturação das plantas.

TABELA 2 – Massas dos Óleos Extraídos na Primeira Coleta (Outubro/2003)

<i>Byrsonima Brachybotrya</i>	Massa de Óleo Extraído (mg)
Flor*	42,1
Botão*	91,5
Flor**	108,8
Botão**	125,9

* Mata: vegetação mais densa, local mais úmido, de menor insolação

**Cerrado: vegetação rasteira, local seco, pedregoso de maior insolação

TABELA 3 - Massas dos Óleos Extraídos na Segunda Coleta (Novembro/2003)

<i>Byrsonima Brachybotrya</i>	Massa de Óleo Extraído (mg)
Flor **	553,8
Botão**	182

**Cerrado: vegetação rasteira, local seco, pedregoso de maior insolação

TABELA 4 - Massas dos Óleos Extraídos na Terceira Coleta (Março/2004)

<i>Byrsonima Brachybotrya</i>	Massa de Óleo Extraído (mg)
Flor*	63,5
Botão*	122,7

* Mata: vegetação mais densa, local mais úmido, de menor insolação

É importante observar que não foi feito estudo estatístico para relacionar massa de óleo extraído por elaióforo; pelo fato da extração ter sido realizada em campo, onde não havia instrumentos para medição.

Na primeira coleta foram obtidas amostras na região de mata e cerrado, enquanto que nas demais coletas somente na mata ou cerrado. Isto leva a pensar que na primeira coleta houve o pico máximo de floração, o que poderia explicar o maior número de espécimes floridas. Porém, isto não pode ser afirmado com certeza.

Outro fato que chama atenção é que a quantidade de óleo extraído entre as coletas varia, porque durante a coleta foi-se retirando amostras de acordo com o número de flores e botões existentes na planta, portanto em alguns espécimes foi retirado um número maior de elaióforos comparado ao outro.

4.4 Análises por Cromatografia de Camada Fina

Foram realizadas inúmeras análises para encontrar o melhor sistema de solventes para constituir a fase móvel, e chegou-se a conclusão que o éter de petróleo:acetato de etila (1:1) separa em maior número os componentes do óleo floral. Estas análises foram realizadas utilizando todas as amostras na mesma concentração (1mg/mL).

Através destas análises em conjunto com técnicas mais apuradas, como RMN ¹H mostrado em anexo (Figura 34 e 35 – p.67) das amostras brutas, concluiu-se que não havia diferença marcante e/ou significativa nos constituintes químicos do óleo floral obtido a partir das espécies coletadas na região de mata com a do cerrado, sendo assim foram misturados as amostras de óleo da primeira coleta (botão com botão e flor com flor), sendo conservado 5 mg de cada amostra pura, por precaução.

Como nas outras coletas só foram coletadas espécies em uma determinada região da área de estudo em diferentes datas: cerrado (coleta 2) e mata (coleta 3), estas foram analisadas em separado, mesmo apresentando o mesmo perfil cromatográfico em placa (em todos os sistemas de solventes testados).

4.5 Análises por Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas

Os resultados obtidos com as análises do CG/EM e seus respectivos índices de retenção foram organizados em tabelas mostradas abaixo, para facilitar a comparação dos compostos químicos existentes entre as amostras, sendo que alguns destes compostos foram identificados utilizando-se o banco de dados da biblioteca WILEY e

NIST. Para os compostos não identificados pelas bibliotecas de massas, seus espectros depois de analisados foram comparados com substâncias da mesma classe de compostos com os da literatura.

As tabelas 5 e 6, mostram a relação de substâncias identificadas pelo banco de dados da biblioteca WILEY e NIST, além dos teores observados e os cromatogramas destas análises estão na figura 30, 31, 32, 33 nos anexos (p.63- 66).

TABELA 5. Substâncias identificadas no extrato em acetato de etila das flores de *B. brachybotria* nas três coletas realizadas (FC1/FC2/FC3).

Tr	Substâncias identificadas	%FC1	%FC2	%FC3	IR(calculado)
4,33	Não Identificada	0	0,65	0	
4,8	Não Identificada	0	0,3	0	
8,45	Butanodioato de dimetila	0	0,63	0	
8,9	2-nitro, propanoato de metila	?	?	?	
10,98	Não Identificada	0	0	0,3	
13,69	Não Identificada	0,25	0	2,22	1218
25,18	p-metoxicinamato de metila	0	0,5	0	
25,27	Não Identificada	0,18	0	0	
25,67	2-pentadecanona	0,82	0	1,48	1696
26,02	3,4,5-trimetoxibenzoato de metila	0,16	0	0	
26,24	Tetradecanoato de metila	0,15	0	0	1756
26,87	Não Identificada	0,36	0	0	
29,07	Não Identificada	0	0,41	0	
30,41	Hexadecanoato de metila	0,8	1,8	0,96	1923
30,96	Dibutilftalato	0	0,6	0	
32,7	Não Identificada	1,5	1,17	1,92	2042
33,6	9,12(Z,Z)-octadecadienoato de metila	0,79	1,97	0,94	2058
33,7	9,12,15 (Z,Z,Z)-octadecatrienoato de metila	0,3	0,6	0	2091
34,17	Não Identificada	0,13	0,02	0,77	
34,22	Octadecanoato de metila	0,13	0	0	
38,48	Não Identificada	0,12	0	0	2398
40,94	Não Identificada	0,63	1,12	3,06	2526
42,41	Não Identificada	0,26	0	0	
43,32	5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavanona	1,03	0	3,31	2686
43,85	Não Identificada	4,6	0	3,14	2724
43,94	Tetracosanoato de metila	1,04	0,74	1,24	2728
44,27	Não Identificada	0,3	0	0,46	
44,42	4',5-diidroxi-7-metoxiflavanona	1,92	1,43	2,31	2765
44,55	Não Identificada	1,65	1,01	1,52	2772
44,72	Não Identificada	6,3	0	5,6	2784
45,07	Não Identificada	0	0,7	0,39	
45,27	Não Identificada	0	0,51	0	
45,28	Não Identificada	0	0	1,53	
45,31	Não Identificada	3,4	0,46	0	2828
45,69	Não Identificada	1,58	0,34	0	2856
45,79	Não Identificada	0	0,58	0	
46,21	Não Identificada	1,85	1,56	5,23	
46,31	Não Identificada	4,1	4,06	2,85	2899
46,65	Não Identificada	9,64	8,6	10,21	2926
46,95	Não Identificada	0,7	0	0	
47,05	Não Identificada	1,39	0	1,8	2958
47,18	Não Identificada	0,77	0	0	
47,26	Não Identificada	0,58	0	0	2970
47,41	Não Identificada	14,46	3	12,18	2983
47,52	Não Identificada	6,46	0	5,36	2991
47,65	Não Identificada	1,04	0,4	1,16	2999

48,44	Não Identificada	2,35	1,48	2,46	3060
49	Não Identificada	0,64	0,55	0	3098
49,2	Não Identificada	0,24	0,23	0	3112
49,33	Não Identificada	1,18	0,4	0	3122
49,55	Não Identificada	0,31	0,5	0	
49,59	Não Identificada	0	0	1,95	
49,62	Não Identificada	0	0,6	0	
49,83	Não Identificada	1,37	1,76	0	
49,95	Não Identificada	3,28	3,1	4,17	3162
50,21	Não Identificada	0,93	0	0	3177
50,35	Não Identificada	3,88	5,2	3,28	
50,72	Não Identificada	0,43	3	0	
50,82	Não Identificada	0,27	0	0	
50,95	Não Identificada	1,2	0	0	
50,97	Não Identificada	0	1,55	2,13	
51,28	Não Identificada	1,34	0,33	0	3239
51,52	Não Identificada	1,76	3,78	2,84	3253
52,44	β -Sitosterol	0,64	1,7	0,35	3298
52,54	Não Identificada	0	1,45	0	
52,93	Não Identificada	0,42	2,71	0,7	
53,01	Não Identificada	0,7	0	0	
53,1	Não Identificada	0	1,4	0	
53,24	Olean-12-en-3-ol(β -amirina)	1,48	4,35	1,81	3339
53,55	Não Identificada	0	2,95	0	
53,99	Não Identificada	0,25	0	0	
54,24	Urs-12-en-3-ol (α -amirina)	0	2,15	1,15	3386
54,34	Não Identificada	2,36	0,4	0,97	
54,99	Não Identificada	0	0,3	0	
55,06	Não Identificada	0	0,1	0	
55,28	Não Identificada	0	0	0	
56,33	Não Identificada	0	0,65	0	
58,08	Não Identificada	1,07	0,7	0	3522
58,74	ácido 22 β -hidroxi-3,21-dioxo-D:A-Friedo-30-nor-olean-24-óico	3,9	23,26	7,8	3543
61,5	Não Identificada	0	1,3	0	
TOTAL		99,39	99,06	99,55	

TABELA 6. Substâncias identificadas no extrato em acetato de etila dos botões de *B. brachybotria* nas três coletas realizadas (BC1/BC2/BC3).

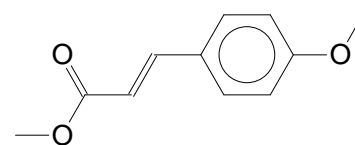
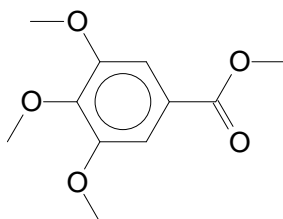
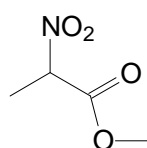
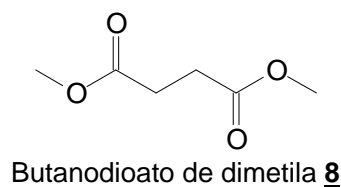
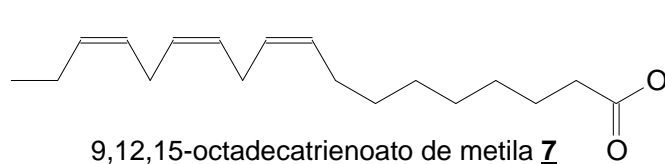
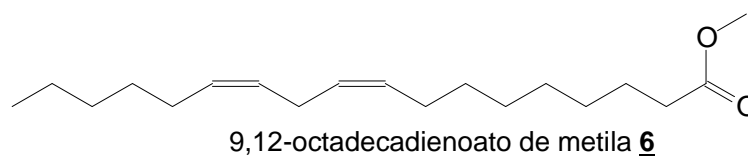
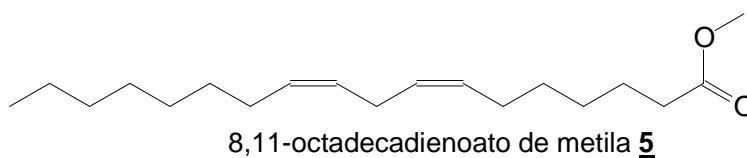
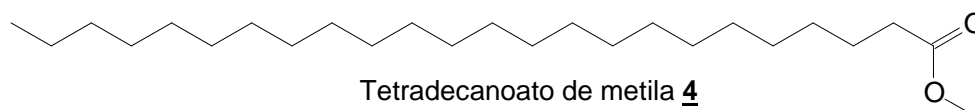
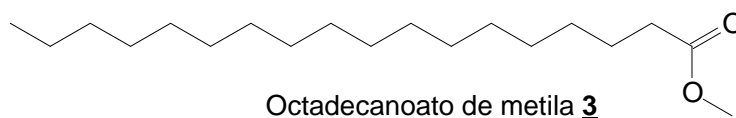
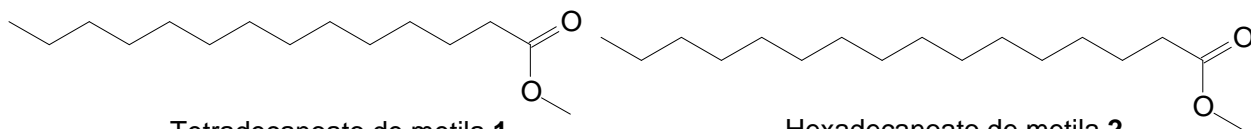
Tr	Substância Identificada	%BC1	%BC2	%BC3	IR(calculado)
4,33	Não Identificado	0	0,12	0	
4,8	Não Identificado	0	0,17	0	
8,45	Butanodioato de dimetila	0	0,47	0	
10,98	Não Identificado	0	0,25	0	
13,69	Não Identificado	0	0,24	0,98	1219
25,27	Não Identificado	0,28	0,43	0	
25,67	2-pentadecanona	0,62	0	0	1969
26,02	3,4,5-trimetoxibenzoato de metila	0,27	0,33	0	
29,07	Não Identificado	0	0,3	0	
30,41	Hexadecanoato de metila	0,87	1,15	1,3	1923
32,7	Não Identificado	1,5	1,23	1,06	2042
33,6	8,11 (Z,Z)-octadecadienoato de metila	0,64	1,18	0,54	2059
33,7	9,12,15(Z,Z,Z)-octadecatrienoato de metila	0	0,43	0	2091
34,22	Octadecanoato de metila	?	?	?	
40,94	Não Identificado	0,85	1,15	3,12	2527
42,41	Não Identificado	0,23	0	0	
43,32	5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavanona	0,95	0,44	0	2686
43,7	Não Identificado	0	0,22	0	
43,85	Não Identificado	5,16	0	0,57	2724
43,94	Tetracosanoato de metila	1,3	0,89	1,14	2728
44,42	4',5-diidroxi-7-metoxiflavanona	1,52	2,5	1,34	2765
44,55	Não Identificada	1,8	1,23	2,25	2772
44,72	Não Identificada	7	0	2,51	2784
45,07	Não Identificado	0,26	0,5	0,44	
45,28	Não Identificado	0	0	1,71	
45,31	Não Identificado	3,4	6,54	0	2828
45,69	Não Identificado	2,35	3,42	0	2856
46,21	Não Identificado	1,06	0,82	0,82	
46,31	Não Identificado	4,74	6,02	3,6	2899
46,65	Não Identificada	10,23	6,27	7,35	2926
46,95	Não Identificado	0,6	0	0	2945
47,05	Não Identificado	1,17	0,65	0	2961
47,18	Não Identificado	0,64	0	0	
47,26	Não Identificado	0,66	0	0	2971
47,41	Não Identificado	15,6	1,9	7,69	2983
47,52	Não Identificado	7,1	0	1,96	2991
47,65	Não Identificado	1,07	0,43	0	2999
47,72	Não Identificado	0	0	0,6	
48,44	Não Identificado	2,06	5,66	1,27	3059
48,68	Não Identificado	0	0,45	0	
49	Não Identificado	0,53	1,36	0,53	3098
49,2	Não Identificado	0	0,53	0	3113
49,33	Não Identificado	1,18	1,11	0	3123
49,55	Não Identificado	0	1,25	0	
49,83	Não Identificado	1,43	2,31	0,93	

49,95	Não Identificado	2,58	7,28	1,91	3162
50,21	Não Identificado	0,66	0	0	3177
50,35	Não Identificado	4,03	4,16	3,54	3186
50,72	Não Identificado	0,31	0,52	0,75	3210
50,82	Não Identificado	0	0,56	0	
50,97	Não Identificado	0,82	0,19	1,2	
51,28	Não Identificado	1,26	0,32	0,83	3240
51,52	Não Identificado	1,28	3,76	1	3253
52,04	Não Identificado	0	0,36	0,68	
52,44	β -Sitosterol	0,82	0,98	0,86	3298
52,54	Não Identificado	0	0,62	0	
52,6	Não Identificado	0	0	1,02	
52,93	Não Identificado	0	0,8	1,7	
53,01	Não Identificado	0	0,8	1	
53,24	Olean-12-en-3-ol (β -amirina)	0	2,73	6,1	3339
53,55	Não Identificado	0	1,21	2,03	
54,24	Urs-12-en-3-ol (α -amirina)	0	1,87	5,35	3385
55,28	Não Identificado	0	0,6	0	
56,37	Não Identificado	0	0	0,87	
58,08	Não Identificado	0	1,75	6,61	3522
58,74	ácido 22 β -hidroxi-3,21-dioxo-D:A-Friedo-30-nor-olean-24-óico	0	18,25	22,1	3544

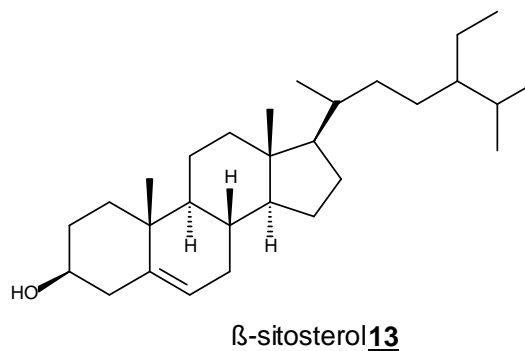
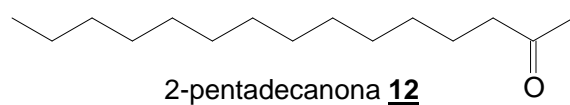
O sistema de índice de retenção, introduzido por Kováts, se baseia na comparação do tempo de retenção na coluna cromatográfica de uma série de homóloga de n-alcenos, utilizando-se sistema isotérmico.

Para temperatura programada o índice de retenção não é reprodutível, a menos que seja feita uma padronização, onde a rampa de temperatura escolhida deve permitir uma eluição dos padrões de n-alcenos com intervalos definidos. A cerca de três décadas, KRAZ E VAN DEN DOOL, definiram um índice de retenção para temperatura programada, que leva em consideração os tempos de retenção dos n-alcenos eluídos diretamente antes e imediatamente depois do pico a ser investigado. Após fixado estes pontos de referência, a posição do pico do composto analisado foi encontrado pela fórmula 1 e 2, descritos na parte experimental, onde a fórmula 1 é para análises com temperatura programada e a 2 para corrigir a linearidade da análise no momento em que a temperatura se torna constante (VAN DEN DOOL, H.). O cromatograma da co-injeção da amostra com o padrão se encontra na **figura 33** em anexo (p.66).

4.6 Estruturas dos compostos encontrados nas análises de CG/EM do óleo floral extraído dos botões e flores.



2-nitro, propanoato de metila **9** 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila **10** *p*-metoxicinamato de metila **11**



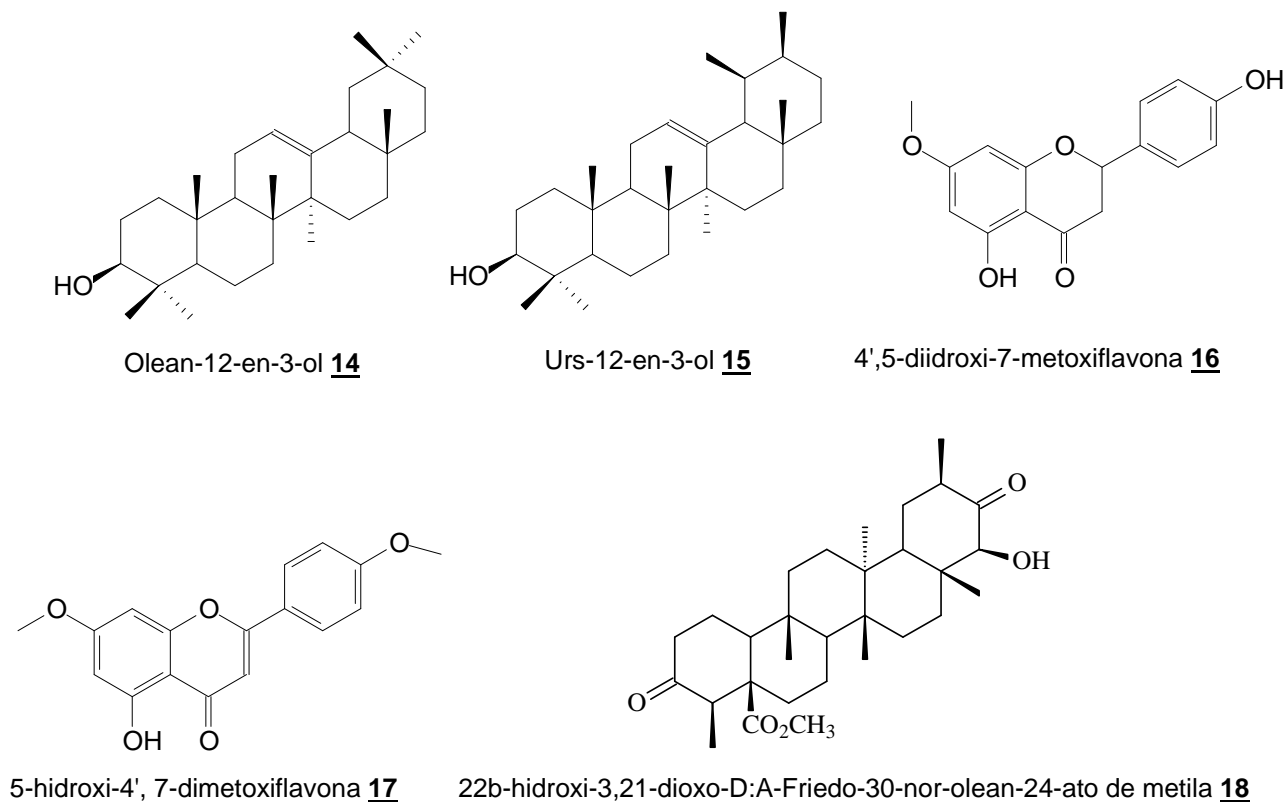


Figura 7. Estrutura molecular dos compostos encontrados no extrato em acetato de etila de flores e botões de *Byrsonima brachybotrya*.

4.7 Classe de compostos encontrados no óleo floral

Nos óleos florais estudados, foram identificadas as seguintes classes de compostos: cetonas, ácidos carboxílicos, terpenóides e flavonóides. Além destes, propomos ainda a presença de um diacilglicerol, de um triterpeno e de dois ésteres octílicos de ácido graxo (não identificado pelas bibliotecas NIST e WILEY).

Devido ao pequeno número de trabalhos encontrados na literatura sobre óleos florais pouco sabe-se sobre a composição química dessas misturas.

4.7.1 Ácidos carboxílicos

4.7.1.1 Ésteres de ácido graxo

Vários ácidos carboxílicos de C14-C24 foram identificados nos óleos florais de *B. brachybotrya*, na forma de seus ésteres metílicos (devido a derivatização química realizada). Os ésteres tetradecanoato de metila **1**, (**Figura 11 – p.44**); hexadecanoato de metila **2**, (**Figura 12 – p.45**); octadecanoato de metila **3**, (**Figura 13 – p.46**); tetracosanoato de metila **4**, (**Figura 14 – p.47**); (Z,Z) 8,11-octadecadienoato de metila **5**, (**Figura 15 – p.48**); (Z,Z) 9,12-octadecadienoato de metila **6**, (**Figura 16 – p.49**); (Z,Z,Z) 9,12,15-octadecatrienoato de metila **7**, (**Figura 17 – p.50**); foram identificados no óleo floral analisado por espectrometria de massas e índice de retenção.

O índice de retenção encontrado para o éster tetradecanoato de metila **1**, hexadecanoato de metila **2**, (Z,Z) 8,11-octadecanoato de metila **3**, foi 1756, 1923, 2058, muito próximo aos valores observados na literatura que correspondem a 1726, 1911, 2098, respectivamente (VAN DEN DOOL, 1963 e REIS, 2000).

Os ésteres foram uns dos primeiros compostos orgânicos estudados por espectrometria de massas em detalhes. Os ésteres metílicos saturados com mais de cinco carbonos, ao serem bombardeados com elétrons de alta energia dão origem a fragmentos do tipo: íons de alquila e íons contendo oxigênio da função éster.

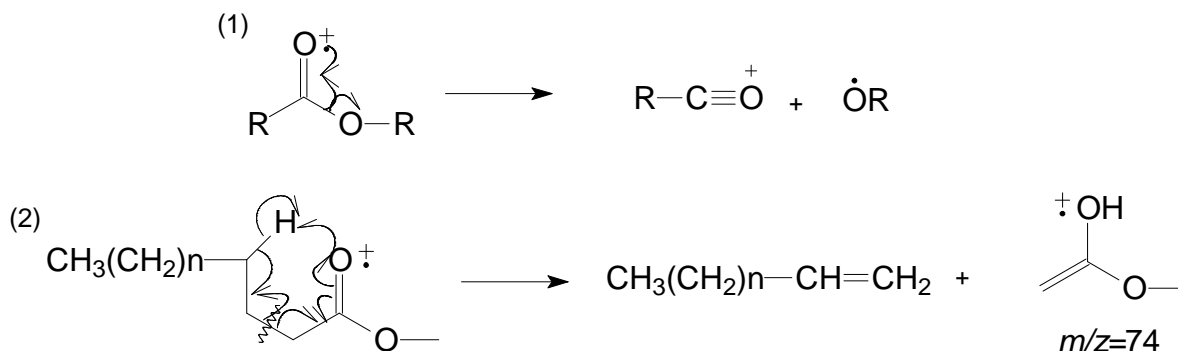
O íon alquila resulta em quebra de cadeia. O íon contendo oxigênio dá origem ao pico mais proeminente do espectro, que corresponde ao rearranjo de McLafferty. Dentre estes podem-se incluir o pico do íon molecular (M^+); do íon acílio (RCO^+) e do pico em m/z 74, característico da maioria dos ésteres metílicos, além de uma série de picos correspondentes à perda de grupos CH_2 .

De um modo geral, a fragmentação dos ésteres metílicos mostram o pico do íon molecular pouco intenso. Em comparação com o pico base, a intensidade do pico do íon molecular tende a aumentar com o aumento do tamanho da cadeia, como pode ser observado nos espectros das figuras 11 a 14 em anexo.

A perda do radical metóxi a partir do íon molecular dá origem ao íon acílio (RCO^+), que corresponde ao pico $M-31$, e que podem ser observados nos espectros das figuras 11 a 14 em anexo e esquema 2.

O pico base dos espectros dos ésteres saturados é o m/z 74. Este fragmento é resultado de rearranjo de McLafferty, no qual ocorre transferência $\gamma-H$ para o oxigênio da

carbonila através de um estado de transição cíclico, e quebra de ligação C2-C3, para gerar uma oleofina e um íon como mostrado no esquema 2.

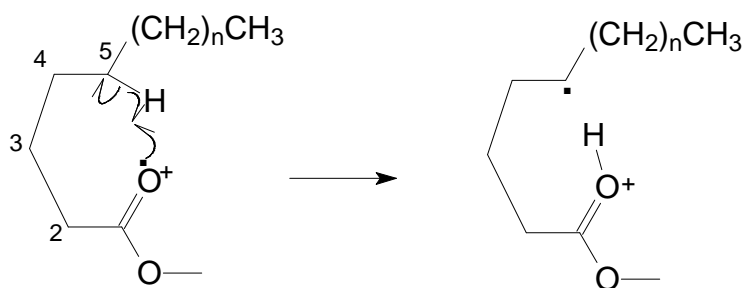


Esquema 2. Formação do íon acílio (1) e do pico base pelo rearranjo de McLafferty(2)

Este rearranjo pode ser visto nos espectros dos ésteres de ácido graxos saturados mostrados nas figuras 11 a 14 em anexo.

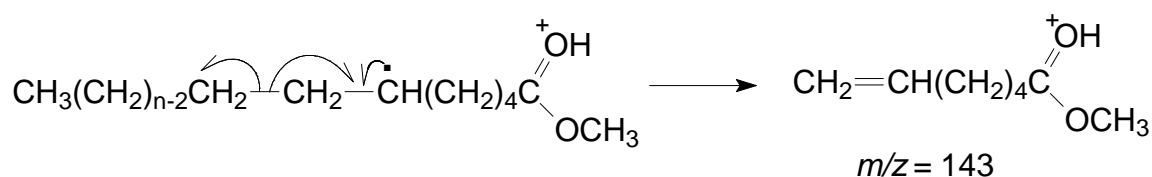
Entre os picos m/z 74 e o pico de íon molecular pode-se encontrar uma série de picos correspondentes à série homóloga: $[\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{COHOCH}_3]^+$, determinada por SPITELLER *et.al.* (1966) Estes picos mostram uma periodicidade peculiar nas suas intensidades em $m= 0,4,8,12\dots$

SPITELLER *et. al.* (1966) postularam que estes íons formados do intermediário mostrado no esquema 3, que é resultante da transferência do hidrogênio da posição 5 para o oxigênio carbonílico, sendo que o mesmo pode acontecer com o C6.



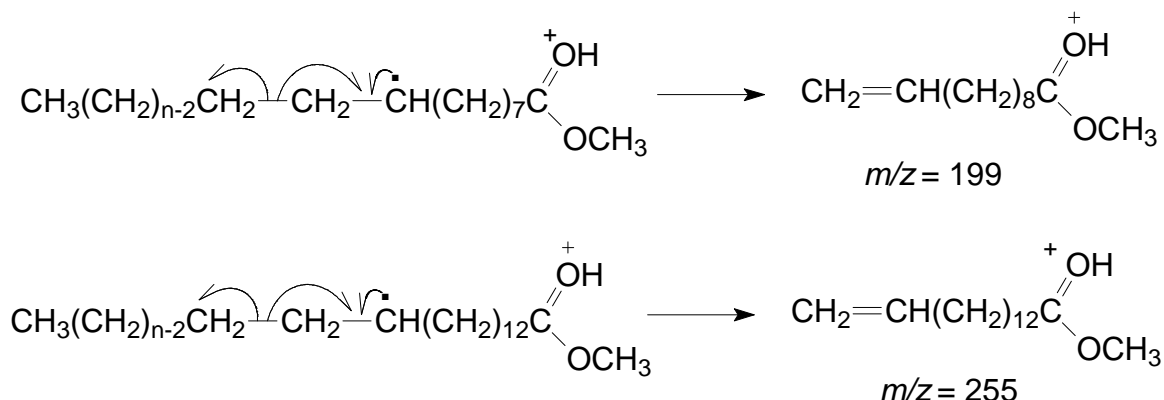
Esquema 3. Estado intermediário postulado por SPITELLER.

A quebra homolítica da ligação entre C7-C8 dá origem ao pico m/z 143 é mostrado no esquema 4.



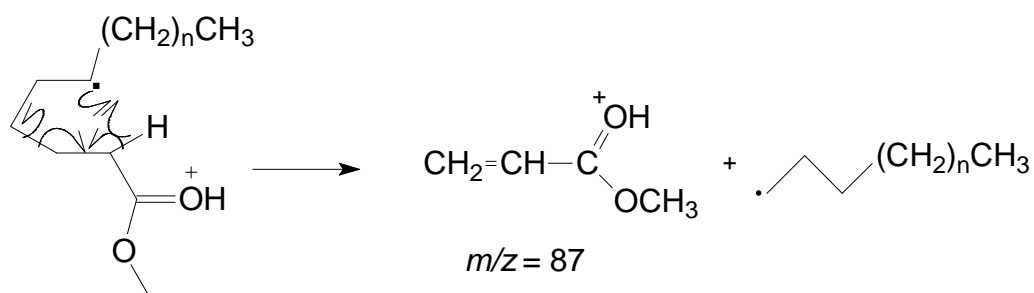
Esquema 4. Formação do fragmento m/z 143.

A formação dos fragmentos m/z 199 e m/z 255 são mostrados no esquema 5.



Esquema 5. Formação dos fragmentos m/z 199 e m/z 255.

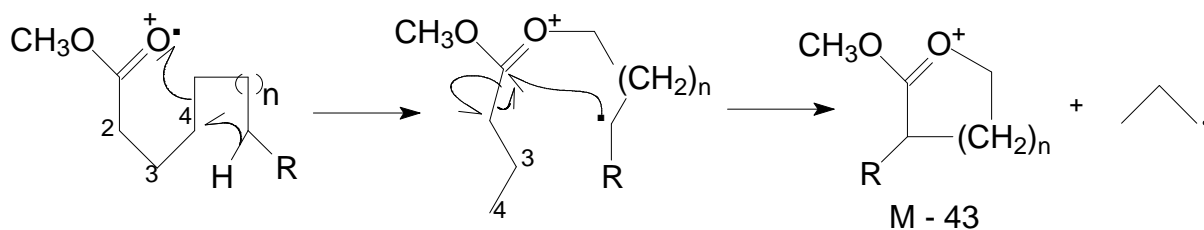
A transferência de hidrogênio do C2 para a C6, seguido da quebra da ligação entre C3-C4, forma o fragmento m/z 87, que é mostrado no esquema 6.



Esquema 6. Formação do fragmento m/z 87.

A energia requerida para formação do íon em m/z 143 é menor do que o requerido para o m/z 199 e 255, por isso a abundância destes picos diminui no espectro.

Segundo Budzikiewicz (1964) o pico do íon molecular $[\text{M} - 43]$ é resultado da perda de um radical propil do íon molecular. O grupo propil eliminado é formado pelos três grupos metilênicos na posição 2, 3 e 4, como mostrado no esquema 7.



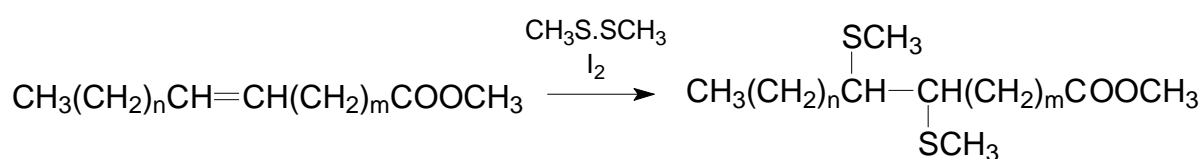
Esquema 7. Formação do pico $[\text{M} - 43]$ dos espectros de ácido graxo saturado.

A análise dos espectros de massas de ésteres insaturados é mais complexa porque além dos elétrons não ligantes do oxigênio, os elétrons π também podem sofrer o impacto de elétrons formando cátion-radical, que é possível ser detectado pelo espectrômetro de massas, o que gera espectros que fornecem pouca informação sobre a estrutura molecular. Os isômeros de ésteres insaturados são muito semelhantes entre si.

Verifica-se que a ligação dupla em uma cadeia longa de um éster ao ser delocalizada com o impacto de elétrons, impede que a espectrometria de massas possa revelar a posição original da insaturação. Biemann (1962) propôs uma seqüência de trocas sucessivas de hidretos e hidrogênios para explicar a deslocalização da ligação dupla.

Um método para localizar a posição da ligação dupla é oxidá-la para um epóxido, que posteriormente sofre fragmentação formando íons característicos. Entretanto, a aplicação destes métodos é restrita a ésteres monoinsaturados.

Atualmente, a utilização do dimetildissulfeto (DMDS) para derivatização de ácidos graxos monoinsaturados tem sido largamente utilizado (Esquema 8) para determinação da localização das ligações duplas por espectrometria de massas.



Esquema 8. Reação de derivatização por DMDS.

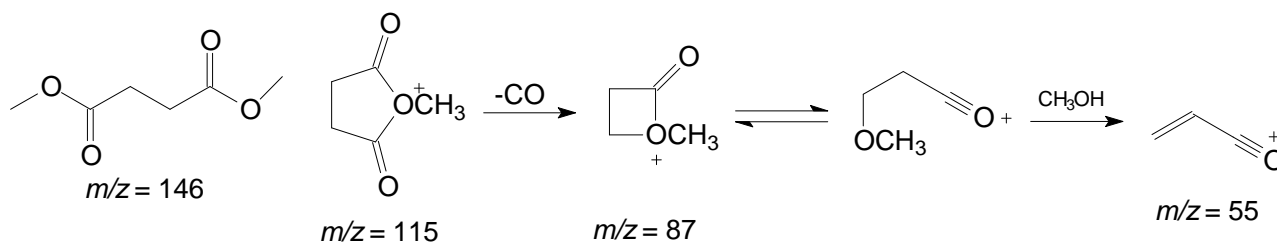
Para compostos poliinsaturados, um método que combina pirólise, cromatografia gasosa e espectrometria de massas pode ser satisfatório.

Além desses, outros compostos pertencentes a classe dos ácidos carboxílicos, foram também identificados na forma de seus ésteres metílicos, a saber: butanodioato de metila **8**, (Figura 18 – p.51); 2-nitropropanodioato de metila **9**, (Figura 19 – p.52); 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila **10**, (Figura 20 – p.53); parametoxicinamato de metila **11**, (Figura 21 – p.54); dibutilftalato, (Figura 22 – p.55) (este composto é um contaminante); foram identificados no óleo floral a partir da análise de seus espectros obtidos em comparação com espectro de massas no banco de dados NIST e Wiley. Para estes compostos, não foram encontrados os índices de retenção na literatura.

O espectro de massas encontrado do butanodioato de metila apresenta alta similaridade com o da literatura.

A protonação de um éster metílico leva a eliminação de CH_3OH do íon molecular M^+ . A interação entre as duas carboxilas esterificadas favorece a reação eliminação.

A fragmentação deste composto é mostrado no esquema 9.



Esquema 9. Fragmentação do butanodioato de metila.

Acredita-se que a ciclização ocorra, porque leva a um intermediário mais estável. (HARRISON., 1998)

A estrutura responsável pelo pico em m/z 114 presente no espectro da figura 18 em anexo, é mostrada na figura 8. (HARRISON, 1998)

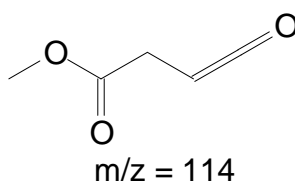


Figura 8. Estrutura geradora do pico em m/z 114 do diéster do ácido succínico.

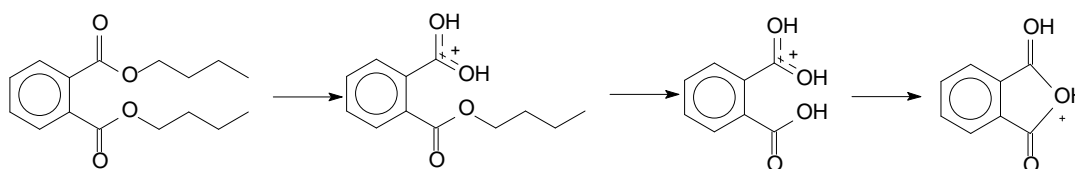
O composto 2-nitro-propanoato de metila possui os grupos funcionais éster e nitro.

O pico do íon molecular para os nitro compostos geralmente é fraco ou ausente. O espectro de massas obtido apresenta a fragmentação característica destas classes de compostos, como fragmentos resultantes da quebra da ligação α em relação ao grupo carbonila da função ácido, bem como a perda de M-NO_2 para a função nitro. Os picos em m/z 102, 87, 59 correspondem aos fragmentos M-31 , M-NO_2 e M-COOCH_3 respectivamente. (SILVERSTEIN, R.M., 1994).

O composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila possui os grupos funcionais éster e éter. O espectro de massas obtido apresenta a fragmentação características destas classes de compostos, como fragmentos resultantes da quebra da ligação α em relação ao grupo carbonila da função ácido, bem como a quebra da ligação β ao anel da função éter. Os picos em m/z 211, 195, 168, 136 corresponde a perda dos seguintes fragmentos: CH_3 , CH_3O , COOCH_3 , $\text{COOCH}_3 + \text{CH}_3\text{O}$ respectivamente.

O composto p-metoxicinamato de metila, por sua vez, apresenta no espectro de massas fragmentação característica de ésteres e éteres tais como os fragmentos resultantes da quebra da ligação α em relação ao grupo carboxila da função éster, bem como a quebra da ligação β ao anel da função éter. Os picos em m/z 179 [$M^+ -15$]; 161 [$M^+ -31$]; e 133 [$M^+ -59$], correspondem à perda dos fragmentos CH_3 , CH_3O , $COOCH_3$, respectivamente.

De um modo geral, a intensidade do pico do íon molecular para ésteres aromáticos diminui proporcionalmente com o aumento da cadeia alquila ligada à carboxila. O pico em m/z 149 é característico de ésteres de ácido ftálico. Este fragmento é provavelmente formado por duas quebras da ligação éster envolvendo rearranjo de dois átomos de hidrogênio, seguido da eliminação de água. (SILVERSTEIN, 1994)



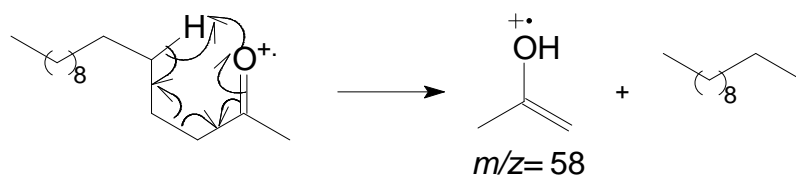
Esquema 10. Fragmentação do dibutilftalato.

4.7.2 Cetonas

Cetonas, como 2-pentadecanona **12**, (**Figura 23 – p.56**); foi identificada no óleo floral a partir da análise do seu espectro obtido em comparação com espectro de massas no banco de dados NIST e Wiley. O índice de retenção encontrado para este composto foi de 1696, enquanto na literatura que é 1704 (REIS, 2000).

O pico do íon molecular de cetonas é, em geral, bastante intenso. Os picos de fragmentação mais importantes no caso das cetonas alifáticas resultam da clivagem das ligações C-C adjacente ao átomo de oxigênio, permanecendo a carga com o íon acílio (RCO^+). No caso da 2-pentadecanona, essa quebra produz o pico em m/z 43.

Nas cetonas cujo grupo alquila ligado ao grupo carbonila for maior ou igual a C_3 , a quebra da ligação C-C α , β à carbonila ocorre com migração de hidrogênio (rearranjo de McLafferty) para dar o pico mais intenso do espectro denominado de pico base, em m/z 58 para o composto da figura 23 em anexo.



Esquema 11: Esquema da formação do pico base do espectro de massas da 2-pentadecanona

4.7.3 Terpenóides e Esteróides:

4.7.3.1 Esteróides

O esteróide β -sitosterol **13**, (Figura 24 – p.57); e os triterpenos: Olean-12-en-3-ol **14** ou β -amirina (Figura 25 – p.58) e Urs-12-en-3-ol **15** ou α -amirina (Figura 26 – p.59), foram identificados no óleo floral de *B. brachybotria*. A identificação destes constituintes foram feitas a partir da comparação do seu espectro de massas com o espectro obtido por CARERI & ELVIRI (2001) e JACOB & DISNAR (2005) respectivamente.

O índice de retenção encontrado para o esteróide β -sitosterol foi 3298 e o encontrado na literatura é 3275. Para os triterpenos α -amirina e β -amirina foram calculados valores de índices de retenção de 3386 e 3339, respectivamente, não tendo sido encontrados valores de IR para estes triterpenos na literatura.

Os esteróides são lipídios insaponificáveis. Os óleos e resinas dos vegetais, geralmente apresentam fitosteróis, os quais são encontrados no estado puro ou na forma esterificada ou ainda conjugados como glicosídeos. (CARERI & ELVIRI, 2001)

De maneira geral, o fitosterol predominante entre as espécies é β -sitosterol e os menores constituintes são o campesterol, estigmasterol, avenasterol e brassicasterol. (CARERI & ELVIRI, 2001)

Os fitosteróis têm sido reconhecidos como uma das substâncias que possuem atividade biológica contra o câncer. Nos animais, o sitosterol é utilizado como anti-inflamatório; anti-neoplásico, anti-pirético e modulador da atividade imunológica. Além disso, vale a pena citar, que o β -sitosterol ajuda na redução do colesterol existente no plasma dos seres humanos.

O espectro de massas do β -sitosterol é caracterizado pelo íon molecular em m/z 414 e um sinal intenso em m/z 396, devido a perda de uma molécula de água [(M-H₂O)]. Outros sinais citados pela literatura são os m/z 381, 357, 255, 129; originado pelos fragmentos [M-(H₂O+CH₃)]; [M-(C₁,C₃+ H₂O)]; [M-(parte da cadeia + H₂O)] e (C₁,C₃+ H₂O)].

H₂O) respectivamente. Todos estes sinais destacados pela literatura (CARERI & ELVIRI, 2001) puderam ser observados no espectro de massas da figura 24 em anexo.

A respeito dos triterpenos: β -amirina e α -amirina respectivamente Olean-12-en-3-ol; e Urs-12-en-3-ol, estes possuem uma grande ocorrência no reino vegetal, podendo estar na forma livre ou ligado à um grupo glicosil ou ácido graxo ou mesmo um composto fenólico.

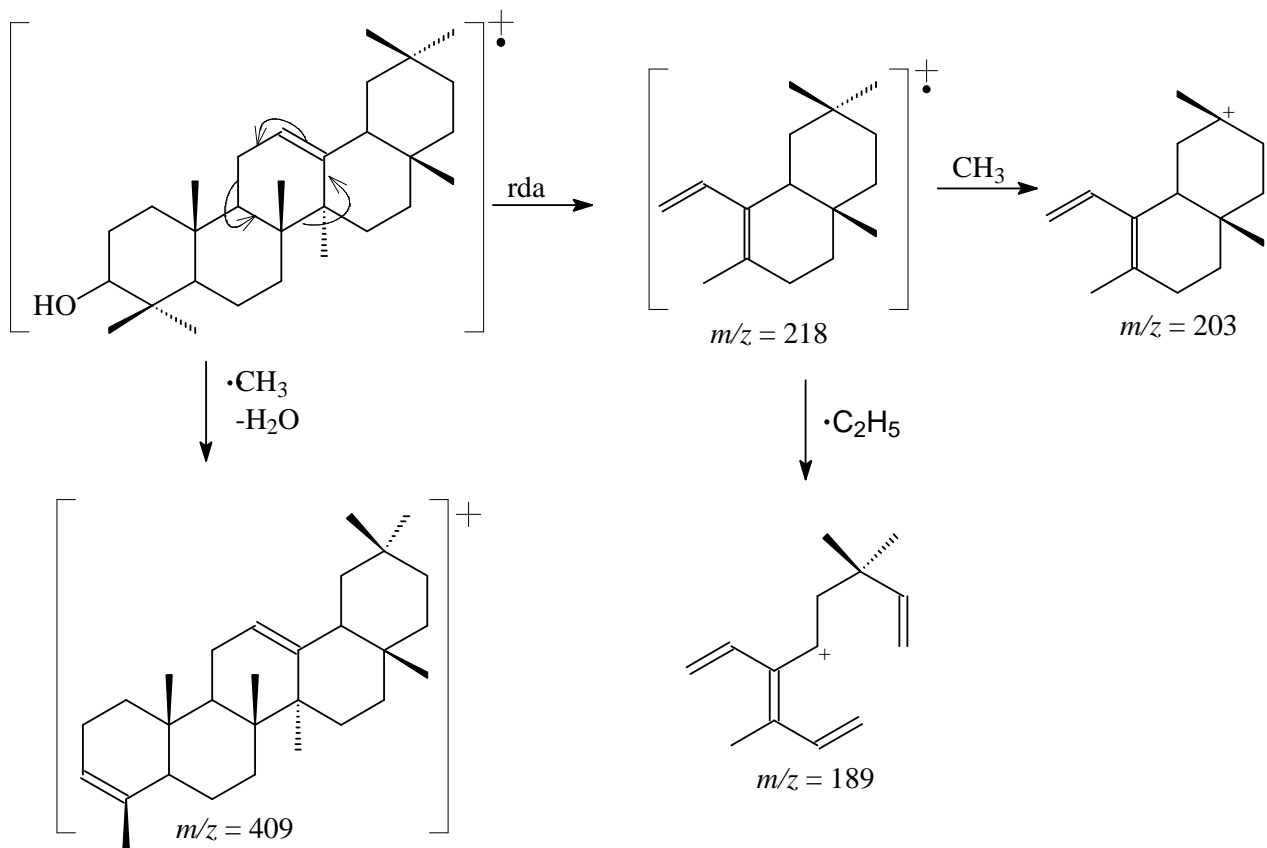
O esqueleto complexo e as diferentes funcionalidades dos triterpenos fazem desta família de compostos a mais diversificada da natureza.(JACOB & DISNAR, 2005).

Os triterpenos **14** e **15** (α e β - amirina) apresentam massa molecular de 440, mas o pico do íon molecular não pode ser observado nos seus respectivos espectros de massas, por apresentar uma intensidade muito pequena. Segundo a literatura, a presença de fragmentos m/z 408 [(M – 32)] e m/z 393, indicam a perda do grupo metóxi na forma de metanol durante a fragmentação (BRYCE *et al.*, 1967).

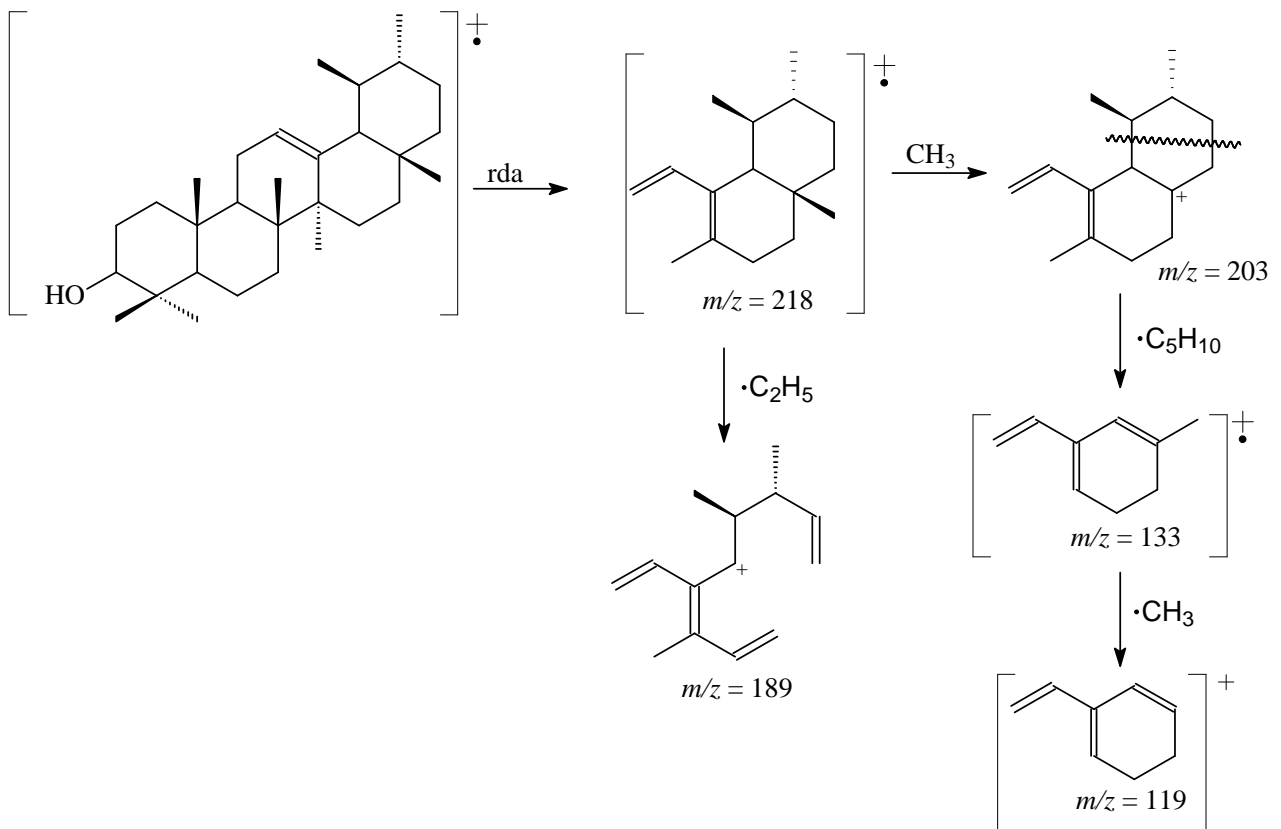
Conforme mostra a proposta de fragmentação dos triterpenos **14** e **15** abaixo, a fragmentação mais característica dos triterpenos pentacíclicos insaturados na posição C-12 se constitui no fragmento proveniente da retro Diels-Alder no anel C (MATHÉ & CULIOLI, 2004), que para os triterpenos **14** e **15**, apresentam o mesmo valor m/z 218, com intensidade de 100%.

Por outro lado, a diferenciação entre os esqueletos ursano **14** e oleano **15** pode ser observada na relação de intensidade entre os picos em m/z 203 e m/z 189. Para os triterpenos derivados do esqueleto oleano **15** o fragmento em m/z 203 é mais intenso que em m/z 189, enquanto que para os derivados do esqueleto ursano o que ocorre é o contrário (ou pelo menos, os picos em questão tem a mesma intensidade)

Estes triterpenos pentacíclicos são componentes minoritários em organismos vivos, e são definidos como metabólitos secundários. Os mesmos são encontrados nas plantas, onde ocupam um papel fundamental na defesa dos organismos vivos contra agentes externos, tais como: micróbios, fungos e raios UV (JACOB & DISNAR,. 2005). Esta informação pode sustentar a teoria formulada por Vogel sobre óleos florais citadas no início deste trabalho.



Esquema 12 - Proposta de fragmentação da β -amirina



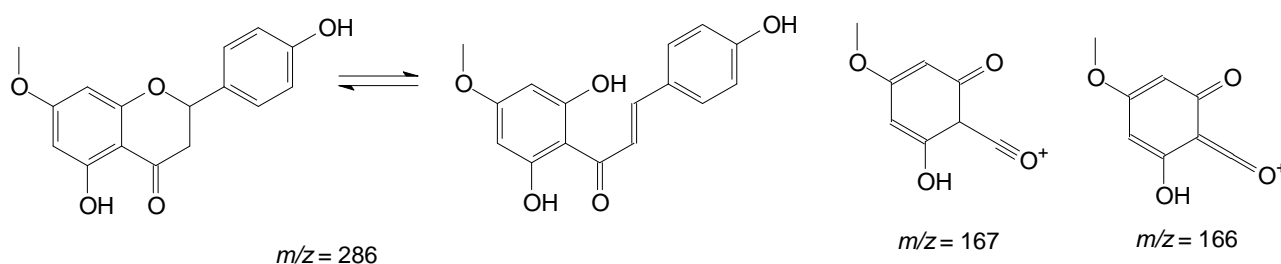
Esquema 13 - Proposta de fragmentação do α -amirina

4.7.4 Flavonóides

Apenas a espectrometria de massas não pode prover informações suficientes para identificar a estrutura completa de um flavonóide, mas pode dar muitas informações sobre os substituintes nos anéis A e B. Muitos estudos para identificar o padrão de fragmentação destes compostos tem sido feita, e mostram que várias classes de flavonóides apresentam fragmentos característicos (HEDIN, P.1992).

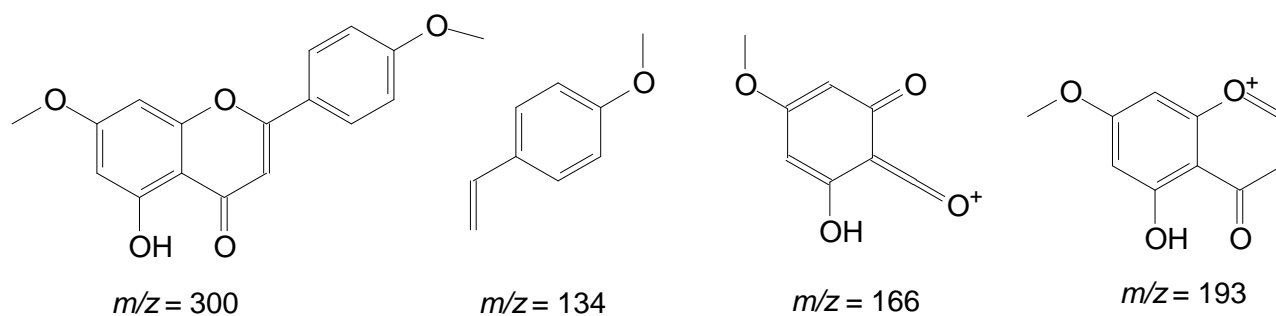
Foram identificados dois flavonóides: 4',5-diidroxi-7-metoxiflavona **16**, (**Figura 27 – p.60**) e 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona **17**, (**Figura 28 – p.61**). Os espectros de massas destes compostos foram comparados com o espectro do banco de dados Wiley e através de dados encontrados na literatura (BALZA, F. 1988; MORALES, G. 2003; HEDIN, P. 1992), onde apresentam grande semelhança.

Segundo MORALES, G (2003) a fragmentação do composto 4',5-diidroxi-7-metoxiflavona **16** possui o pico base em m/z 286 e outros picos característicos são em m/z 269, 243, 193, 180, 167, 138, 120, 95 e 69 que também são encontrados nas mesmas intensidades no espectro obtido neste trabalho. No esquema 16 encontra-se algumas estruturas dos fragmentos obtidos para composto 4',5-diidroxi-7-metoxiflavona **16**.



Esquema 14. Fragmentos do composto 4',5-diidroxi-7-metoxiflavona **16**.

Segundo HEDIN, P. (1992), o composto 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona **17** possui pico base em m/z 134 e outros picos característicos em m/z 300, 299, 193, 167, 166, 121 que também são encontrados nas mesmas intensidades no espectro obtido neste trabalho. No esquema 17 encontra-se algumas estruturas dos fragmentos obtidos para este composto.



Esquema 15. Fragmentos do composto 4'5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona **17**.

Os valores de índice de retenção calculados foram 2765 e 2686 para os compostos **16** e **17** respectivamente, porém não foram encontrados valores de índices de retenção na literatura para estes compostos.

4.7.5 Composto não identificado pelas bibliotecas WILEY e NIST.

Dentre os constituintes observados nos óleos florais de *B. bachybotria*, vários compostos não tiveram sua identificação realizada pela comparação entre seus espectros de massas com o da biblioteca de massas WILEY e NIST.

Para estes compostos, foi tentado em um primeiro momento, inferir a qual classe de composto pertence, para depois, com base numa revisão da literatura propormos sua provável estrutura.

Dentre os vários compostos não identificados, o pico em 58,75 minutos (cerca de 20% do óleo) foi atribuído ao éster 22 β -hidroxi-3,21-dioxo-D:A-Friedo-29-nor-olean-24-oato de metila **18 (Figura 29 – p.62)**, cujo índice de retenção foi 3544.

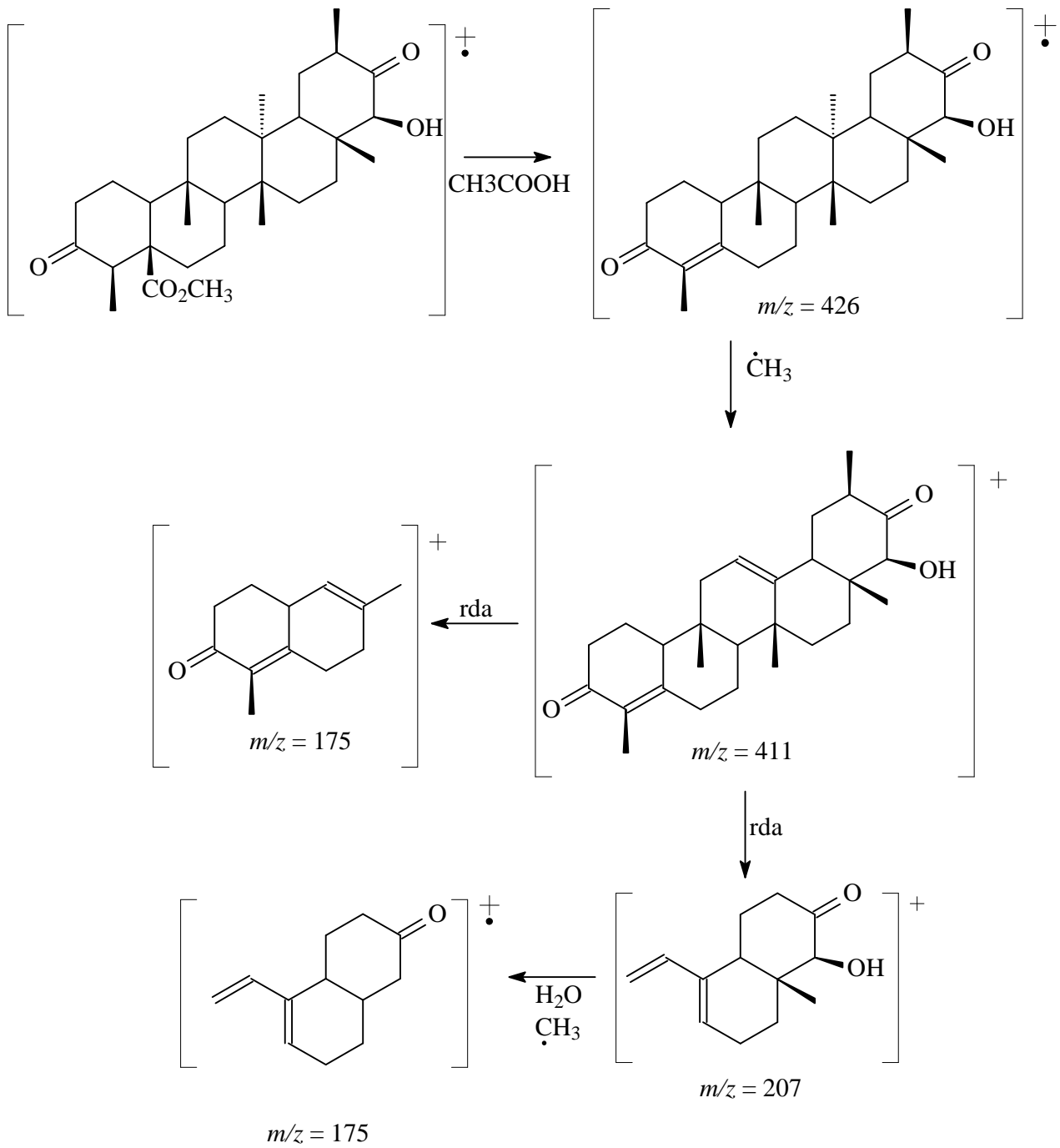
4.7.5.1 Triterpeno: Ester 22 β -hidroxi-3,21-dioxo-D:A-Friedo-30-nor-olean-24-oato de metila

O espectro de massas observado para o pico em 58,75 min, apresentava características de um álcool triterpênico. Após revisão da literatura, sobre a fragmentação dessa classe de compostos, foi encontrado um artigo que relata como principal componente do pólen de *elder* (*Sambucus nigra* L.) (STRANSKY *et. al.*, 2001) um composto com o mesmo padrão de fragmentação, cujo autor não conseguiu identificar.

Após ampla revisão bibliográfica sobre triterpenos, foi possível constatar que o triterpeno **(Figura 29 – p.62)** apresenta um espectro de massas muito semelhante ao éster 22 β -hidroxi-3,21-dioxo-D:A-Friedo-30-nor-olean-24-ato de metila, isolado de

Tripterygium wilfordii (Celastraceae) (KUTNEY *et al.*, 1992). A única diferença é que, no nosso caso, o pico do íon molecular não pode ser observado em m/z 486. O íon que apresentou maior massa foi em m/z 426 [$M^+ - 60$] característico da perda de ácido acético, muito comum em ésteres metílicos. Outros fragmentos observados no espectro de massa são característicos da classe dos triterpenos e estão relatados no esquema abaixo.

A única ressalva, diz respeito ao fato de que o triterpeno (**Figura 29 – p.62**) foi isolado de *Tripterygium wilfordii* (Celastraceae) na forma de seu éster metílico, enquanto que no óleo floral de *B. brachybotria* (Malpighiaceae) não é possível sabermos se este se apresenta na forma de ácido carboxílico ou de éster metílico, devido a derivatização realizada com o diazometano.



Esquema 16 - Proposta de fragmentação de massas para o triterpeno (**Figura 29**).

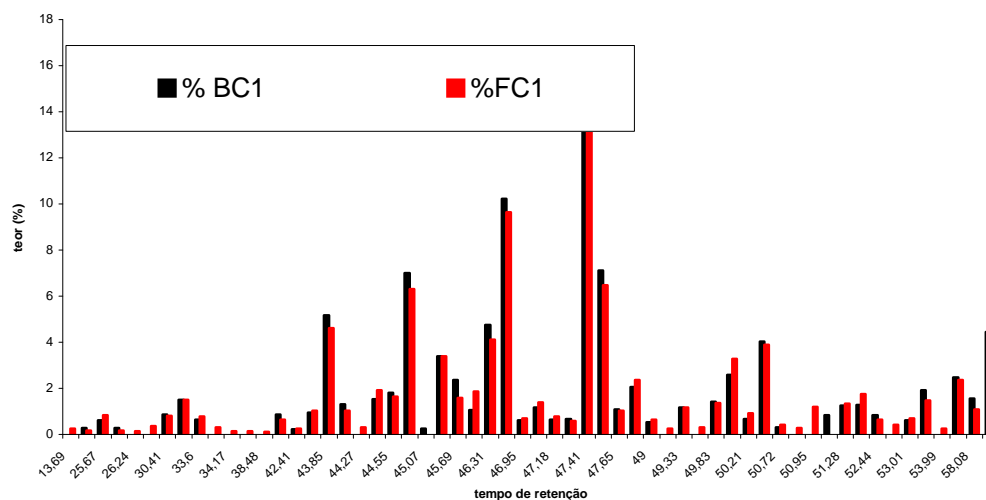
4.8 Análise Comparativa dos óleos florais de *Byrsonima bachybotria*

A análise comparativa dos cromatogramas (TIC) dos óleos florais entre as flores e entre os botões de *B. brachybotria* das três coletas realizadas mostrou constância no que diz respeito à composição química observada, conforme os gráficos 4-5 mostrados a seguir. Além do fato de que o número de compostos presentes no óleo floral das flores é ligeiramente maior do que óleo floral dos botões. Ou seja, o óleo floral das flores (grau de maturação maior) é mais rico tanto em quantidade (que caracteriza da recompensa floral), quanto em número de compostos.

A análise comparativa realizada entre os cromatogramas das flores e botões mostrou que os óleos florais provenientes da coleta 1 (que foi agrupado cerrado + mata) mostrou-se o mais rico dos três, tanto em número de compostos presentes quanto em quantidade. Já as coletas 2 e 3, mostraram-se ligeiramente diferentes entre si. Um acumulando em tempo de retenção maiores (coleta 2) e outro em tempos de retenção menores (coleta 3). Mostrando que a região de coleta e/ou período de estação possivelmente estão influenciando mais na composição química desses óleos do que os órgãos analisados.

Contudo fica evidente, nas três coletas realizadas (independente de todas as variáveis) os óleos florais analisados mostram que o maior acúmulo (teores) ocorrem na mesma região de tempo de retenção, a primeira em torno de 40-49 minutos e a segunda em torno de 58 –59 minutos. Ou seja, os principais constituintes estão variando em relação aos seus teores, mas não em relação à sua natureza química.

Análise comparativa do CG dos óleos florais de Flores e Botões de *B. bachybotria*



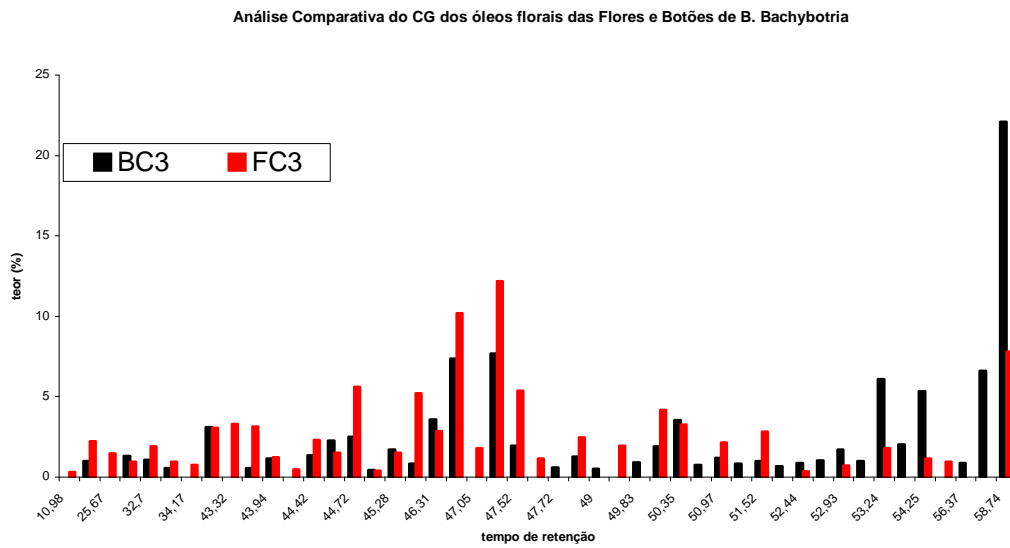
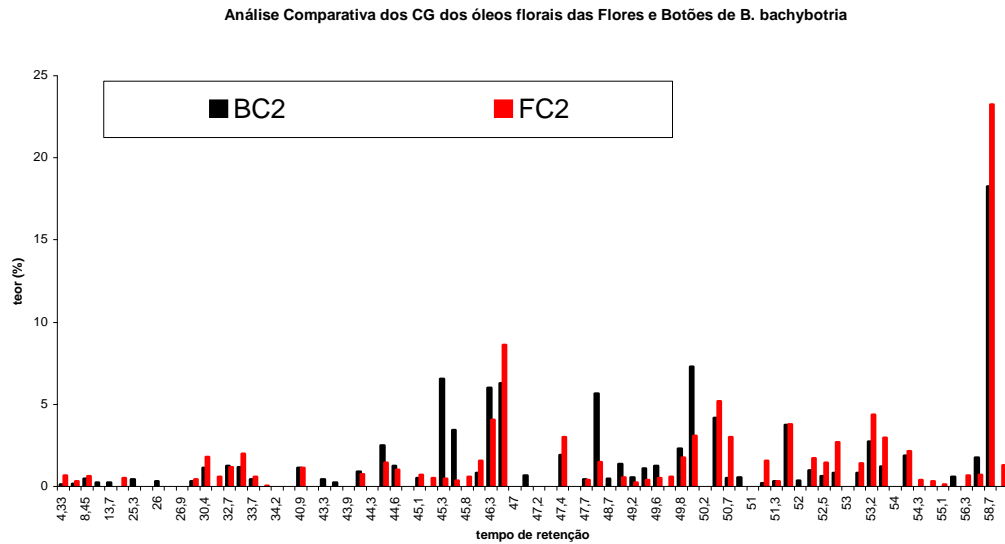
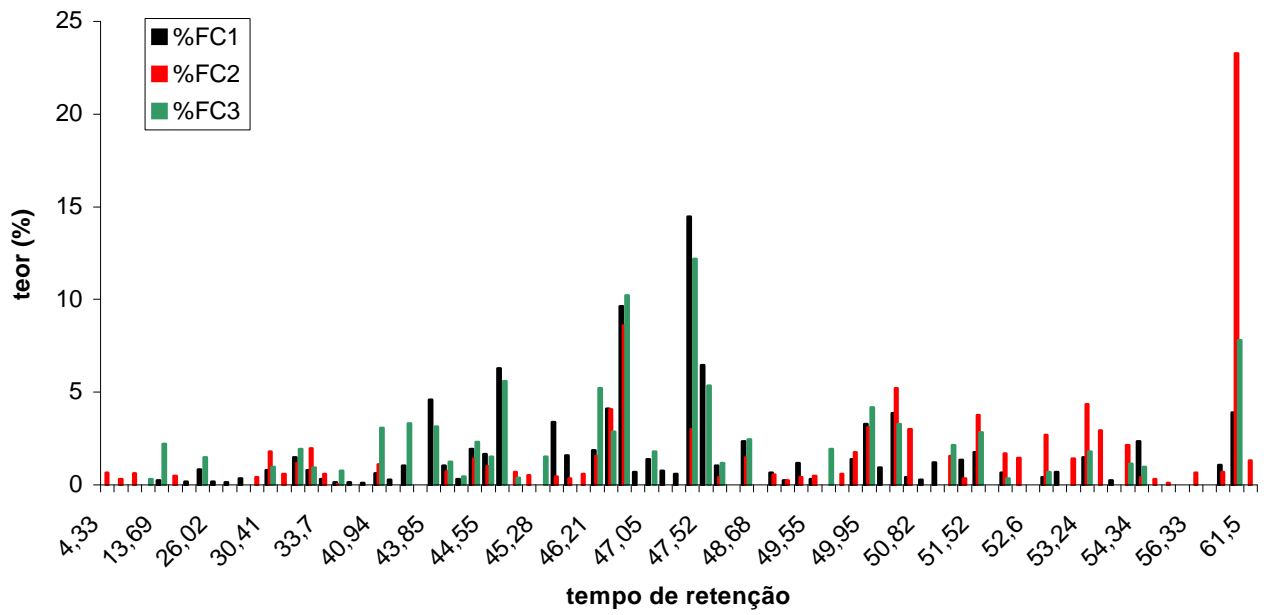


Figura 9. Gráfico da análise comparativa entre Flor e Botão dos óleos extraídos de *B. brachybotrya*.

Análise Comparativa dos óleos florais FC1XFC2XFC3 de *B. bachybotria*



Análise Comparativa dos óleos florais BC1XBC2XBC3 de *B. bachybotria*

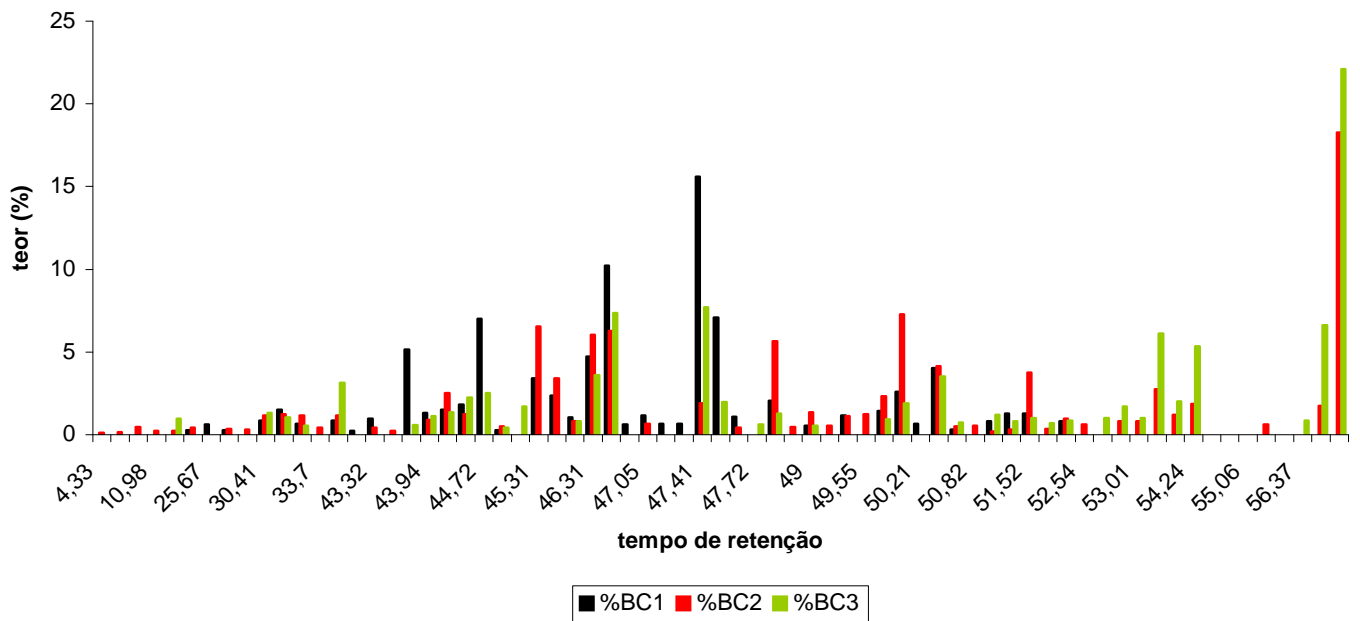


Figura 10. Gráfico da análise comparativa entre FlorXFlor e BotãoXBotão dos óleos extraídos de *B. brachybotrya*.

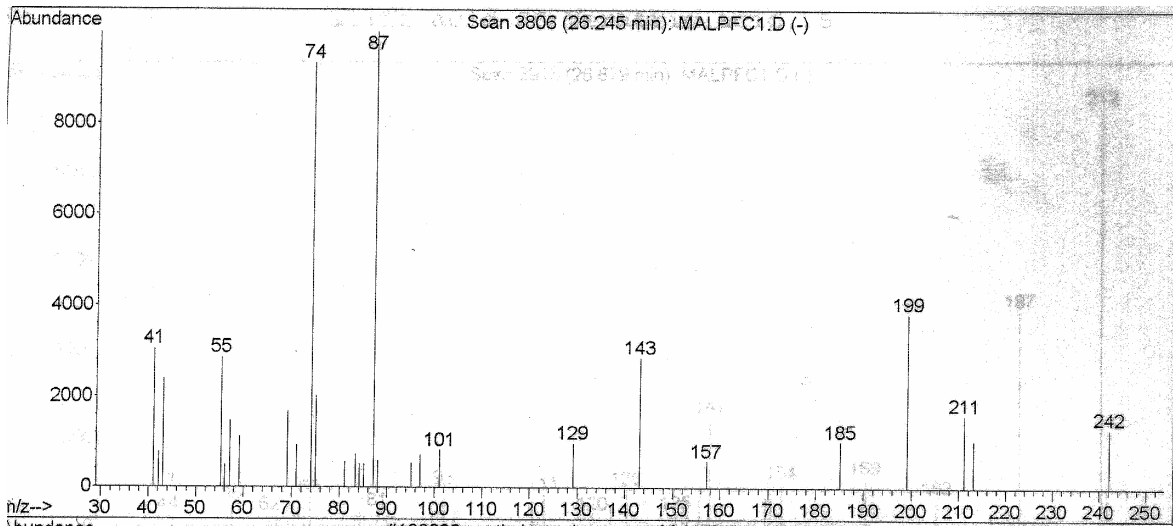
Conclusão

A análise comparativa dos óleos florais entre as flores e botões de *B. brachybotria* das três coletas realizadas mostrou constância no que diz respeito à composição química observada. Tendo sido observado que o número de compostos presentes no óleo floral das flores é ligeiramente maior do que no óleo floral dos botões. Ou seja, o óleo floral das flores (grau de maturação maior) é mais rico tanto em quantidade (que caracteriza a recompensa floral), quanto em número de compostos.

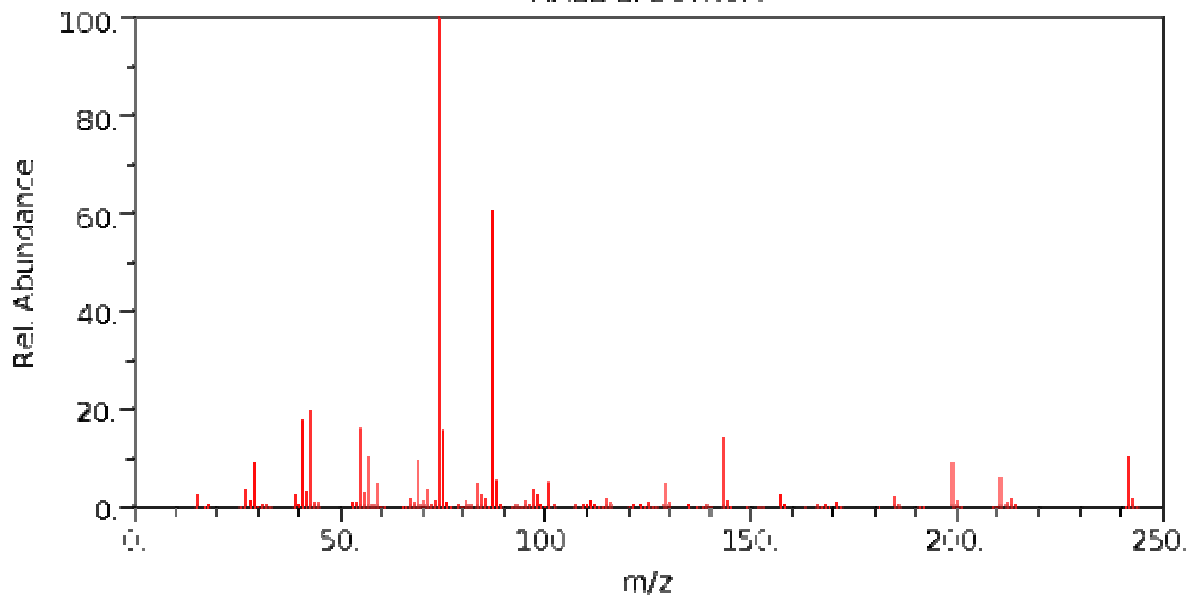
As análises de cromatografia gasosa com espectrometria de massas se mostrou um método muito eficiente na caracterização de amostras com elevada complexidade de compostos químicos como é o caso do óleo floral de *Byrsonima brachybotrya*. Com estas análises foi possível identificar que a composição químicas dos óleos, tanto dos botões quanto das flores, são muito semelhantes entre si, e pode-se verificar a presença dos compostos: tetradecanoato de metila, hexadecanoato de metila, octadecanoato de metila, tetracosanoato de metila, 8,11(Z,Z)-octadecadienoato de metila, 9,12(Z,Z)-octadecadienoato de metila, 9,12,15(Z,Z,Z)-octadecatrienoato de metila, butanodioato de dimetila, 2-nitro, propanoato de metila, 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila, p-metoxicinamato de metila, 2-pentadecanona, β -sitosterol, olean-12-en-3-ol, urs-12-en-3-ol, 4',5-diidroxí-7-metoxiflavona, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona, comparando seus respectivos espectros de massas com banco de dados WILEY e NIST, além de seus índices de retenção com valores encontrados na literatura.

Com relação ao compostos não identificado por seu espectros de massa com banco de dados de massas WILEY E NIST foi sugerido a estrutura baseado exclusivamente na fragmentação observada no espectro de massas, como o ácido 22 β -hidroxi-3,21-dioxo-D:A-Friedo-30-nor-olean-24-óico.

ANEXOS

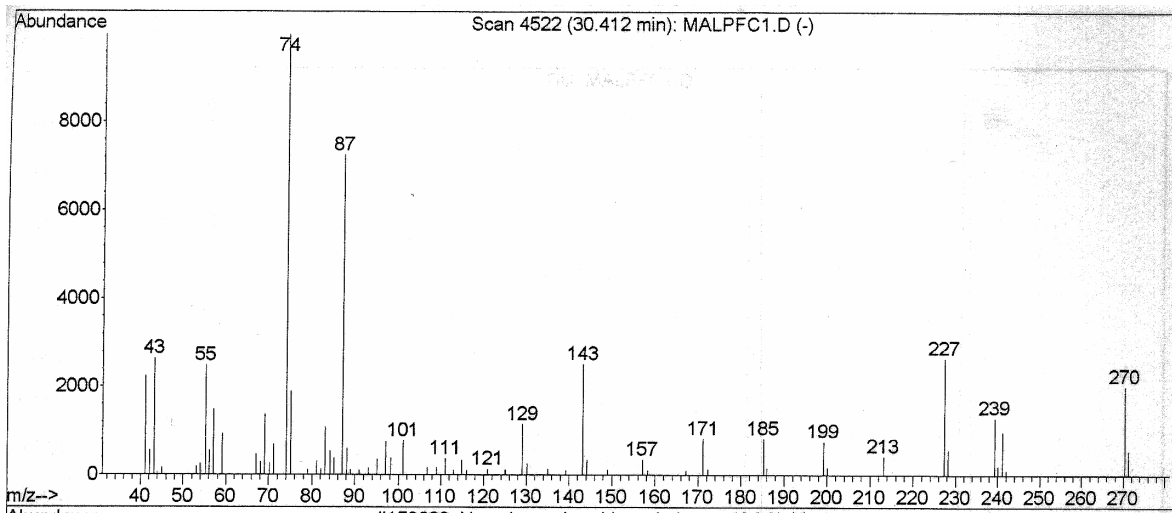


Methyl tetradecanoate
MASS SPECTRUM



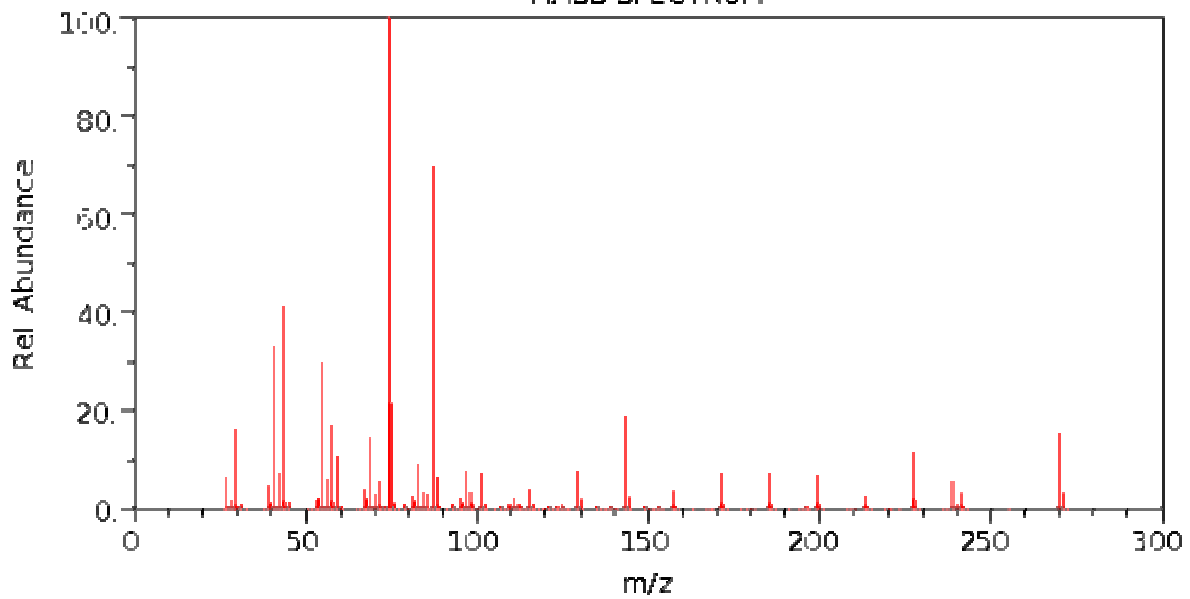
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figura 11. Espectro de massas do Tetradecanoato de metila



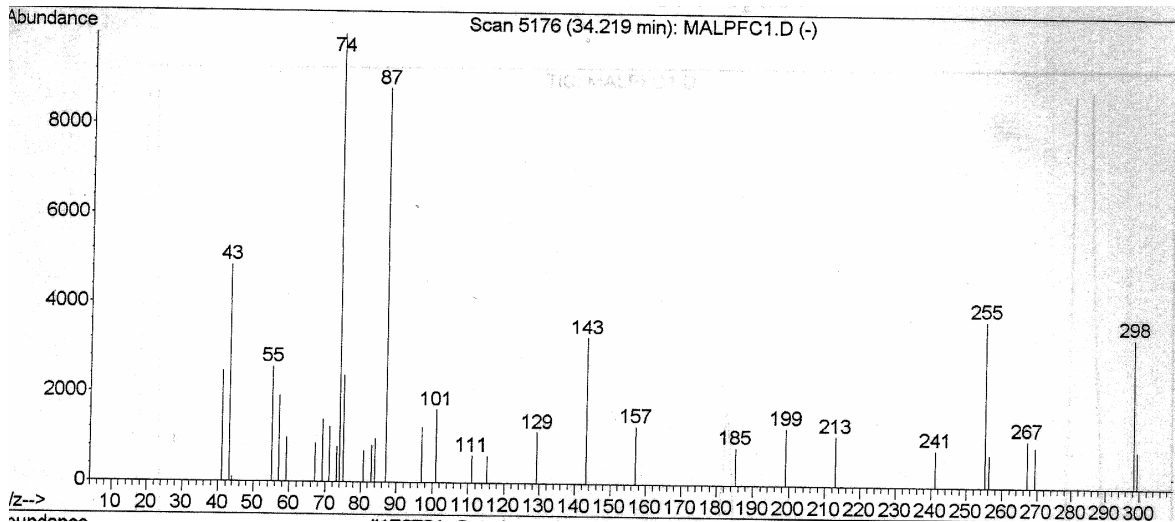
Hexadecanoic acid, methyl ester

MASS SPECTRUM

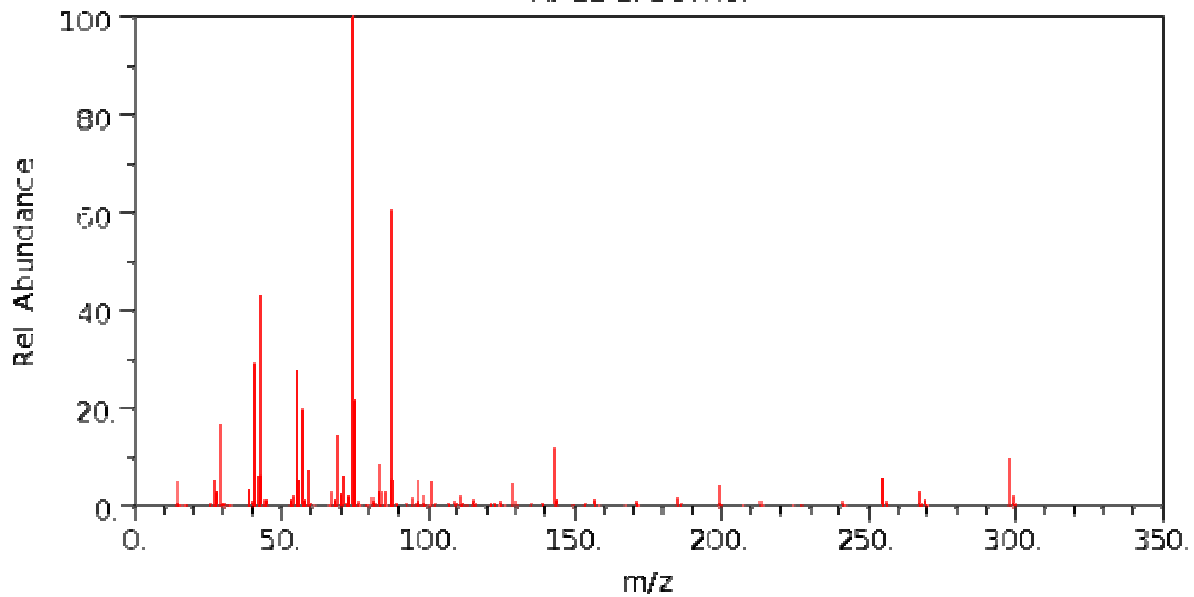


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figura 12. Espectro de massas do Hexadecanoato de metila

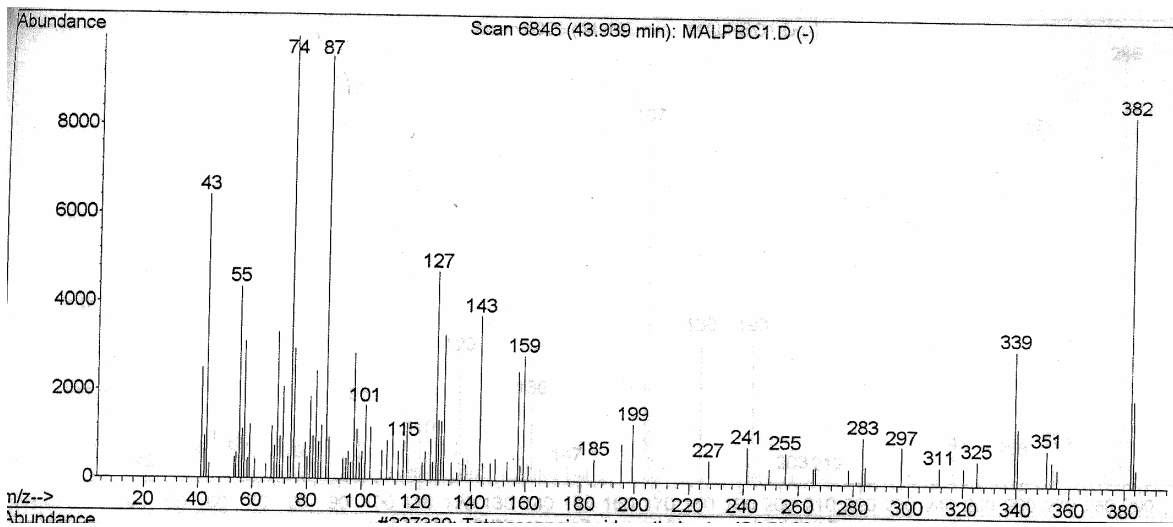


Octadecanoic acid, methyl ester
MASS SPECTRUM

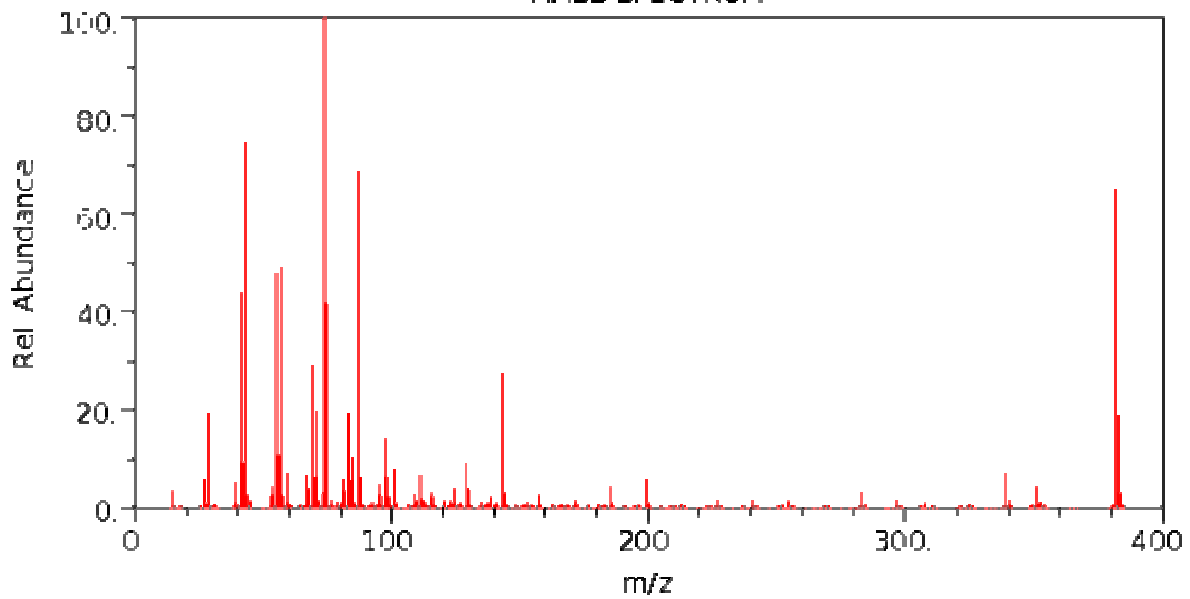


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figura 13. Espectro de massas do Octadecanoato de metila



Tetracosanoic acid, methyl ester
 MASS SPECTRUM



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)

Figura 14. Espectro de massas do Tetracosanoato de metila

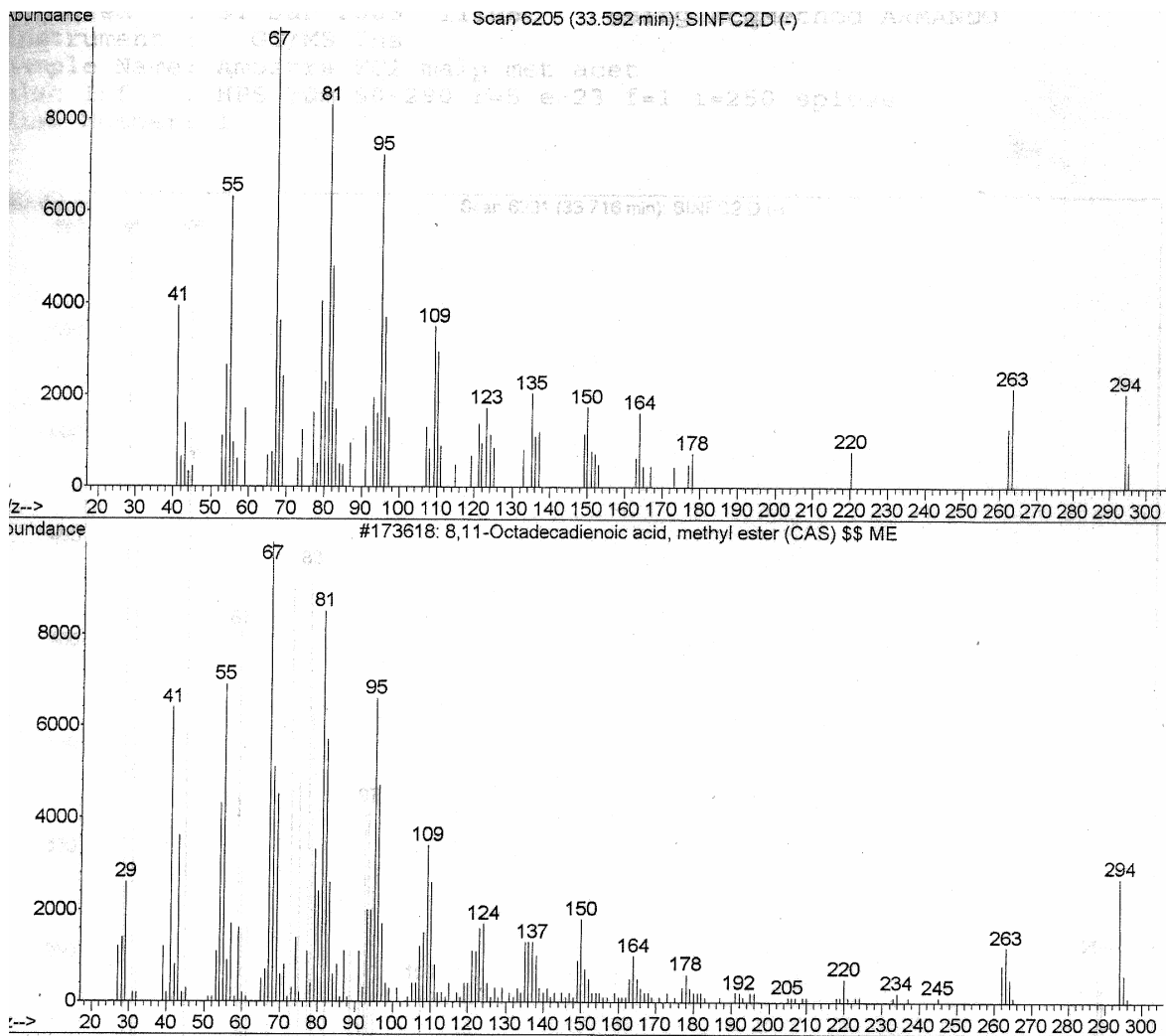
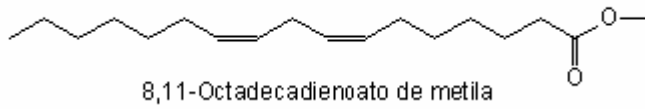
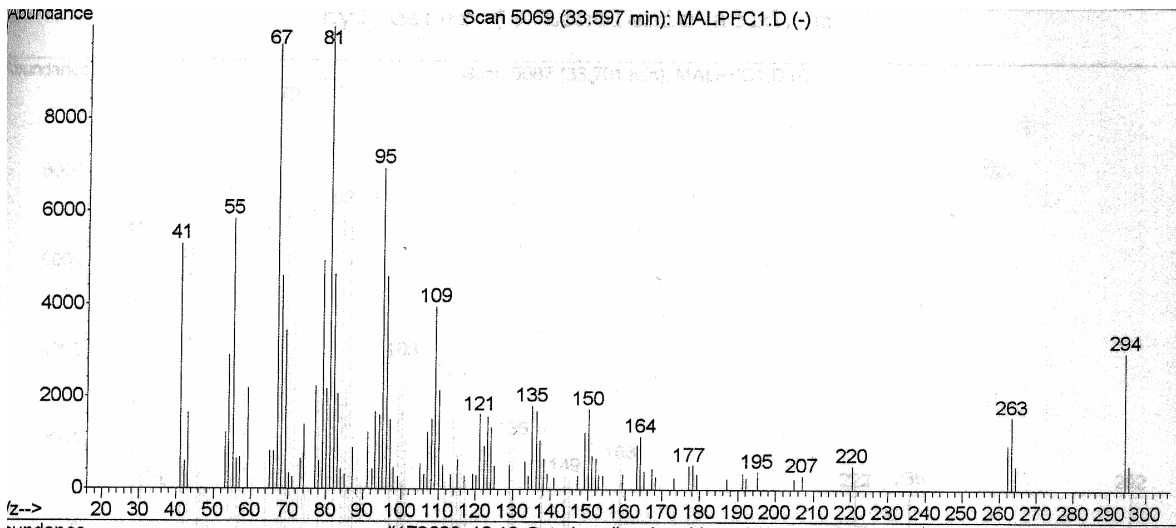
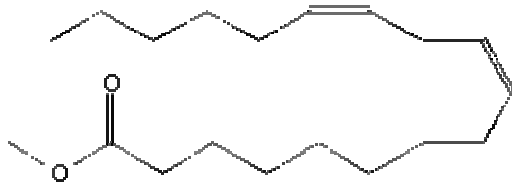
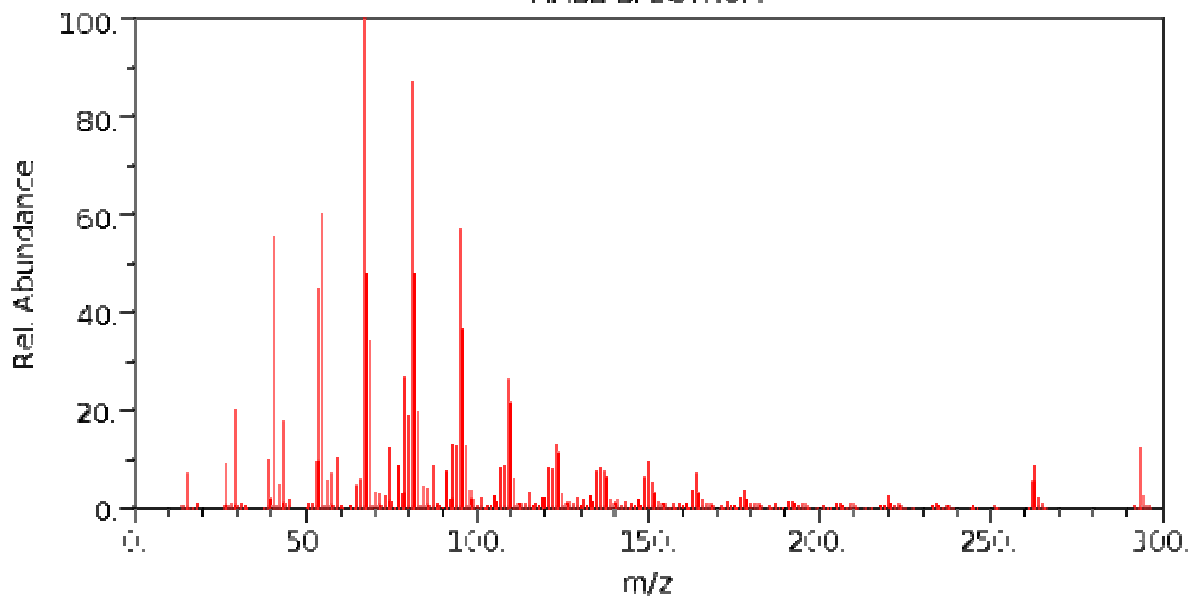


Figura 15. Espectro de massas do 8,11-octadecadienoato de metila

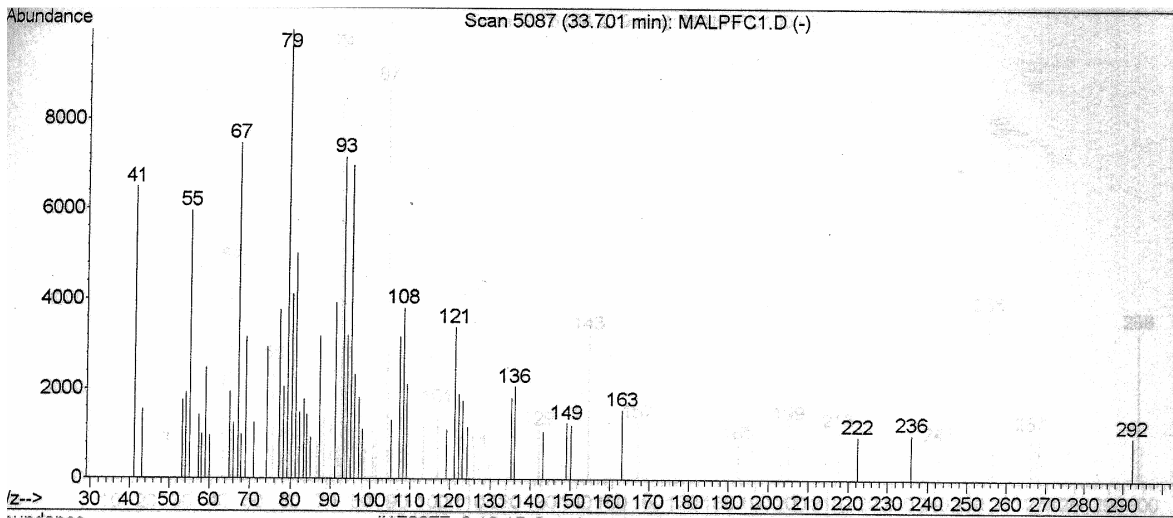


9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester
 MASS SPECTRUM

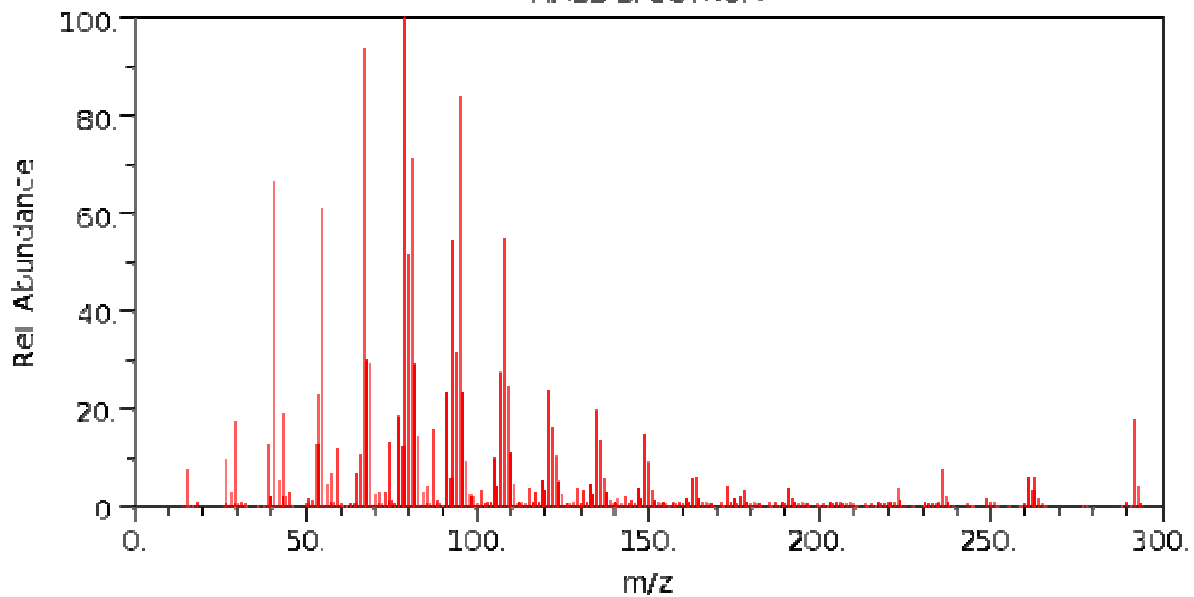


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figura 16. Espectro de massas do 9,12-octadecadienoato de metila (Z,Z)

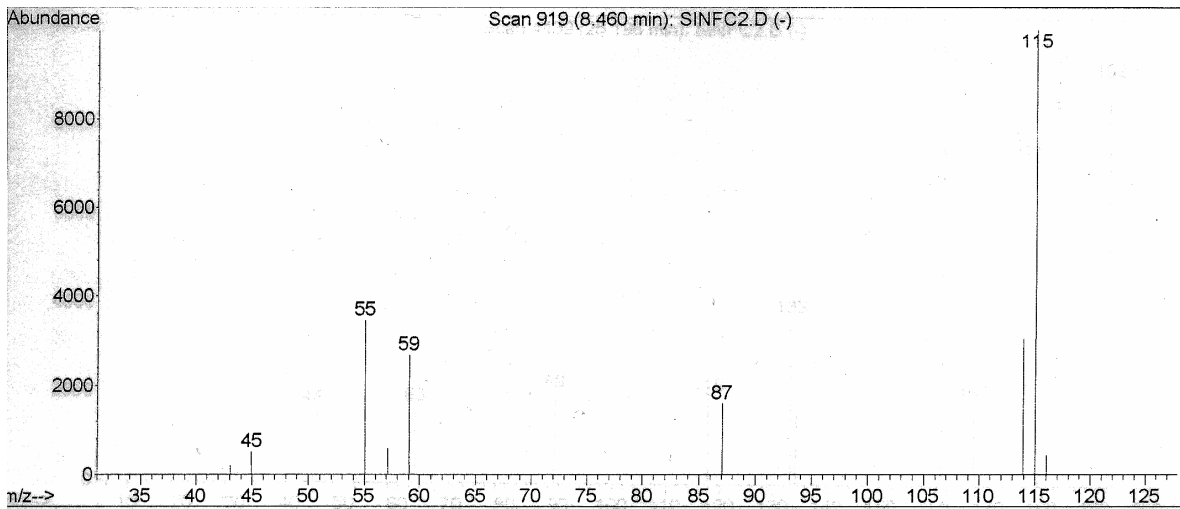
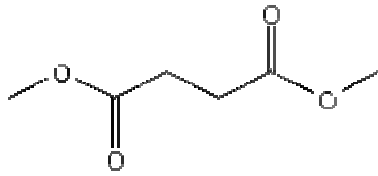


9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-
MASS SPECTRUM



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figura 17. Espectro de massas do 9,12,15-octadecatrienoato de metila (Z,Z,Z)



Butanedioic acid, dimethyl ester

MASS SPECTRUM

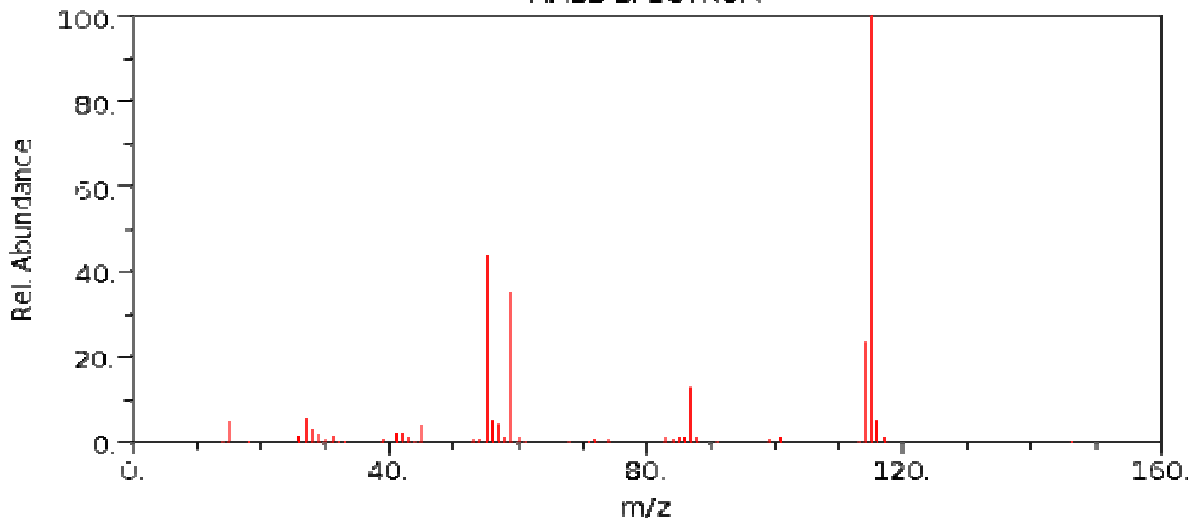
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figura 18. Espectro de massas do Butanodioato de dimetila.

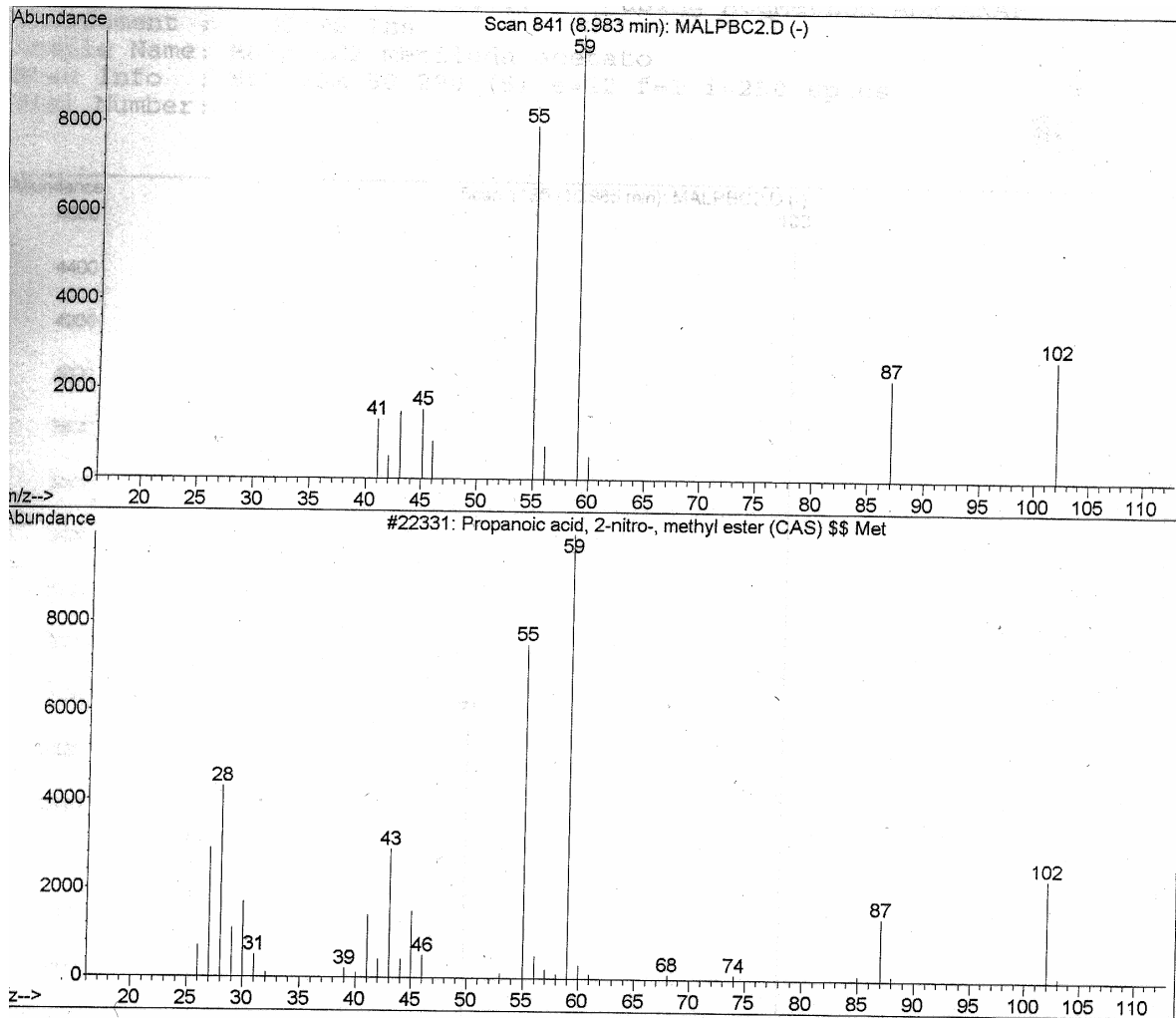
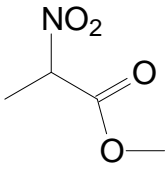
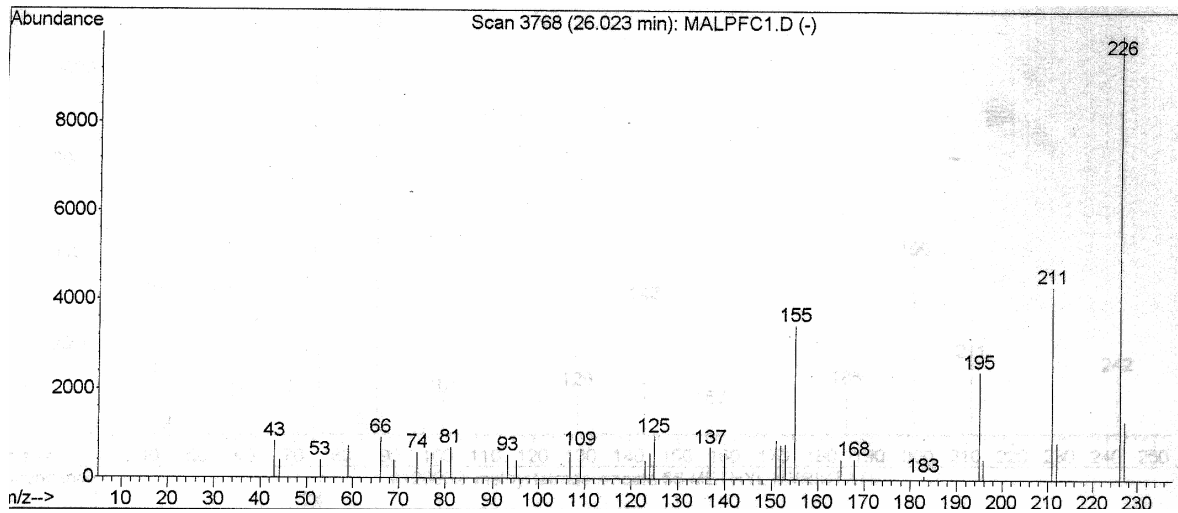
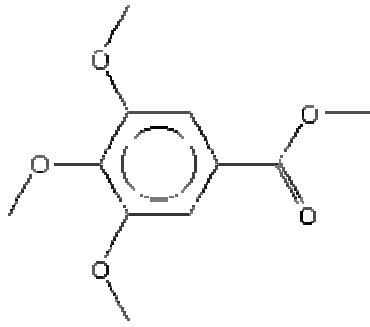
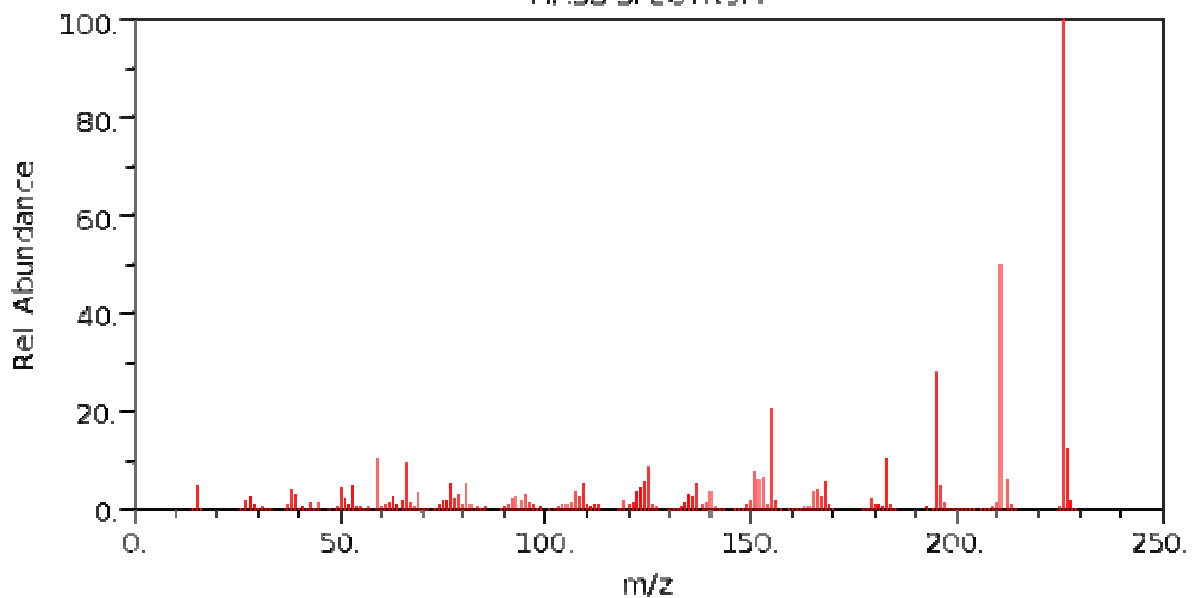


Figura 19. Espectro de massas do 2-nitro, propanoato de metila.



Benzoic acid, 3,4,5-trimethoxy-, methyl ester

MASS SPECTRUM



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figura 20. Espectro de massas do 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila.

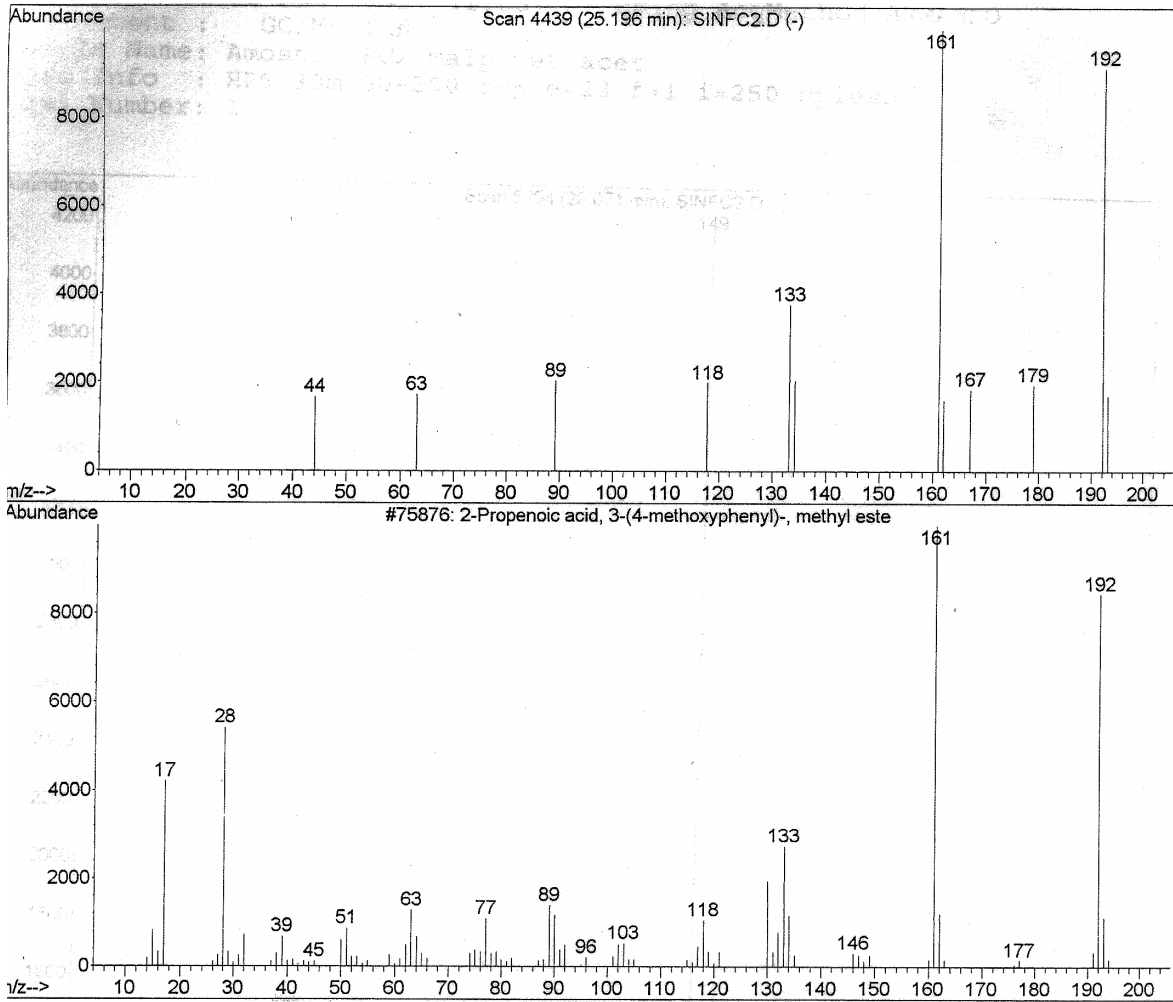
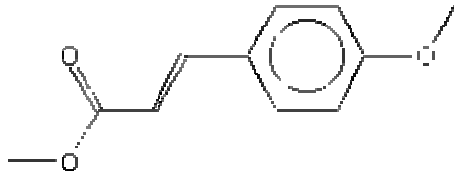
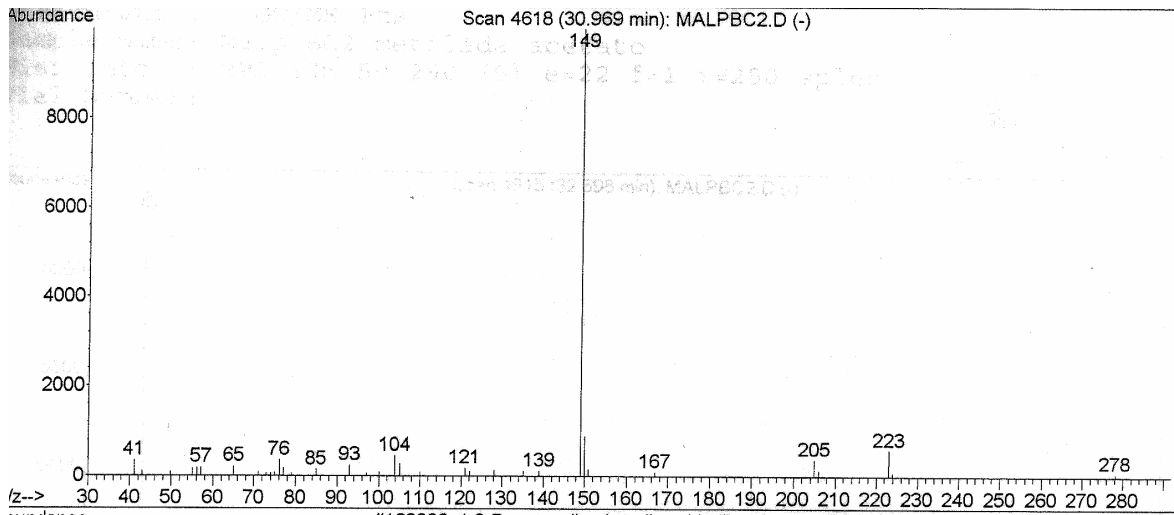
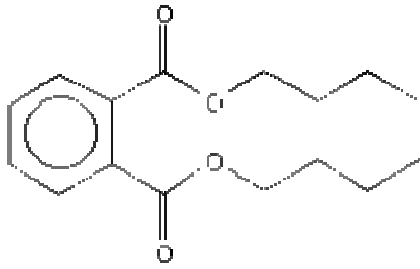
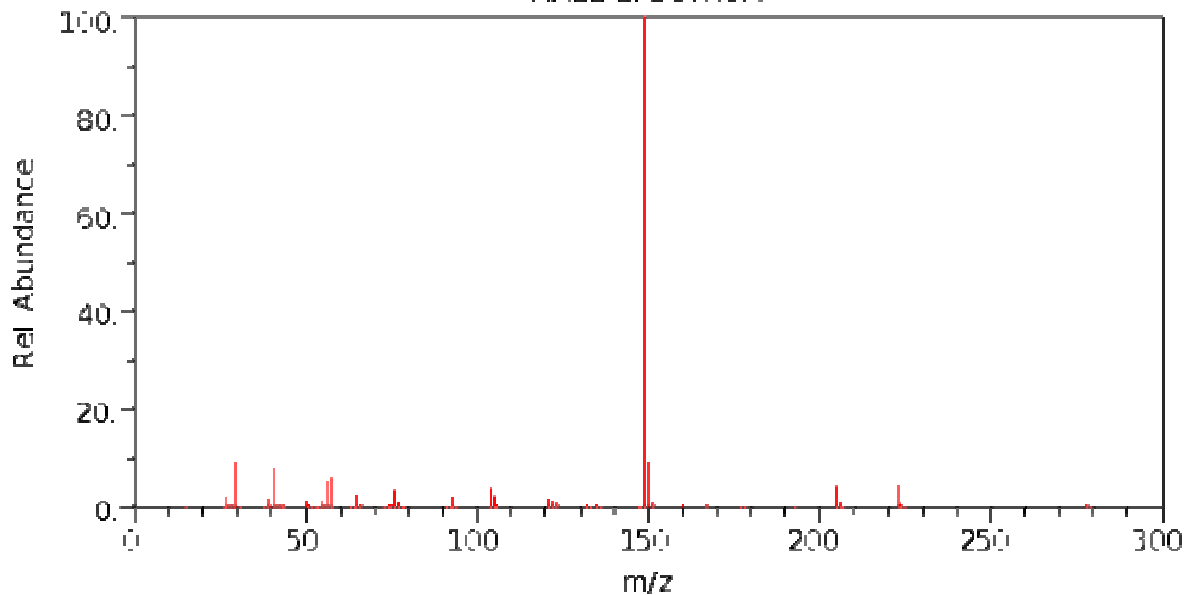


Figura 21. Espectro de massas do p-metoxicinamato de metila.

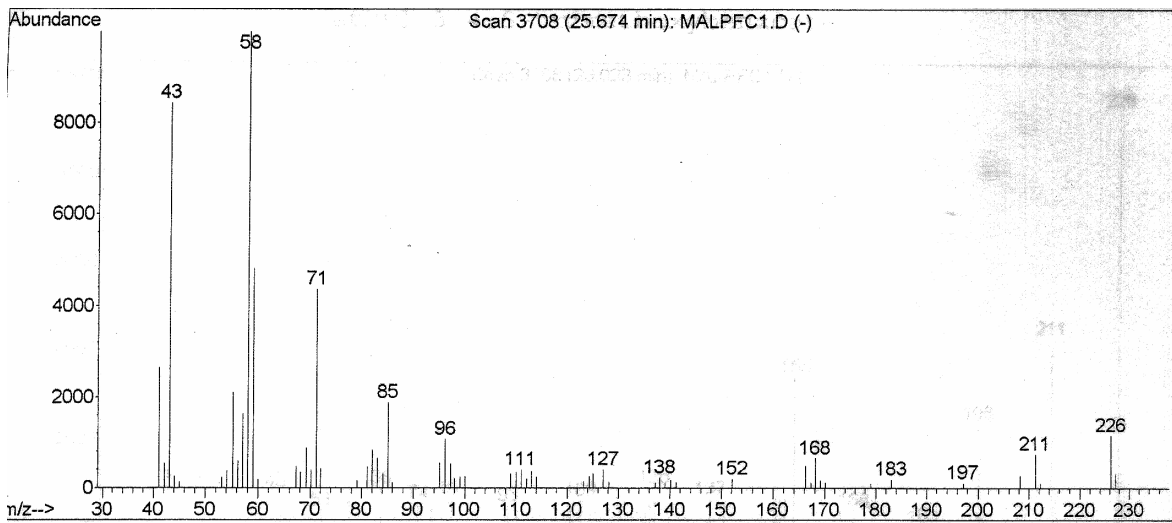


Dibutyl phthalate
MASS SPECTRUM

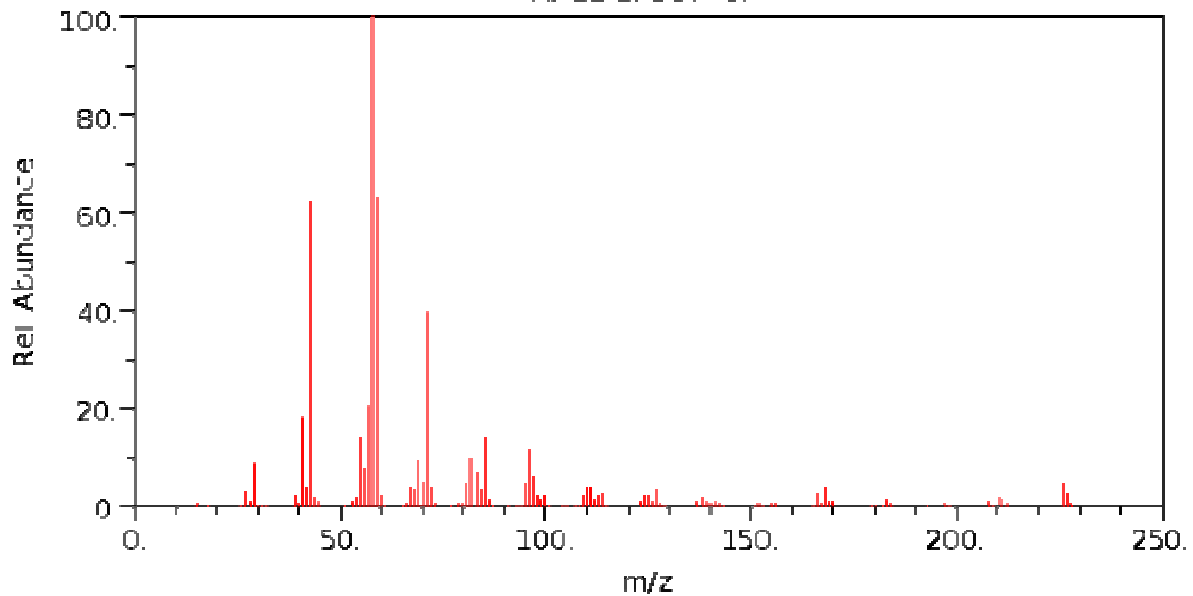


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figura 22. Espectro de massas do Dibutilftalato



2-Pentadecanone
MASS SPECTRUM



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Figura 23. Espectro de massas da 2-pentadecanona.

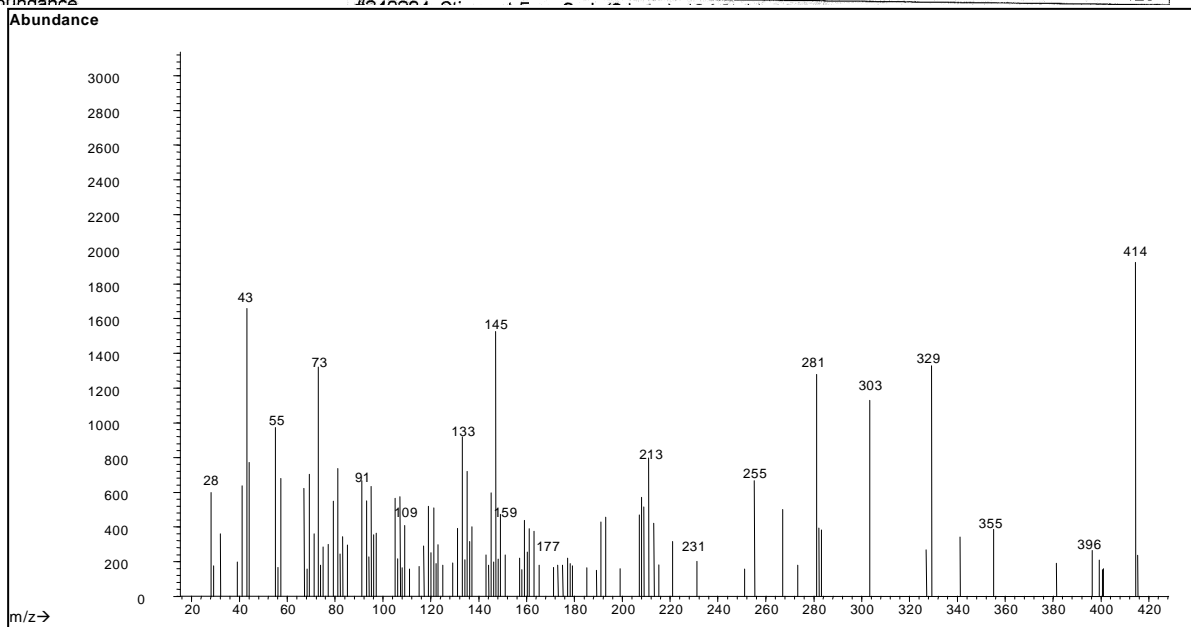
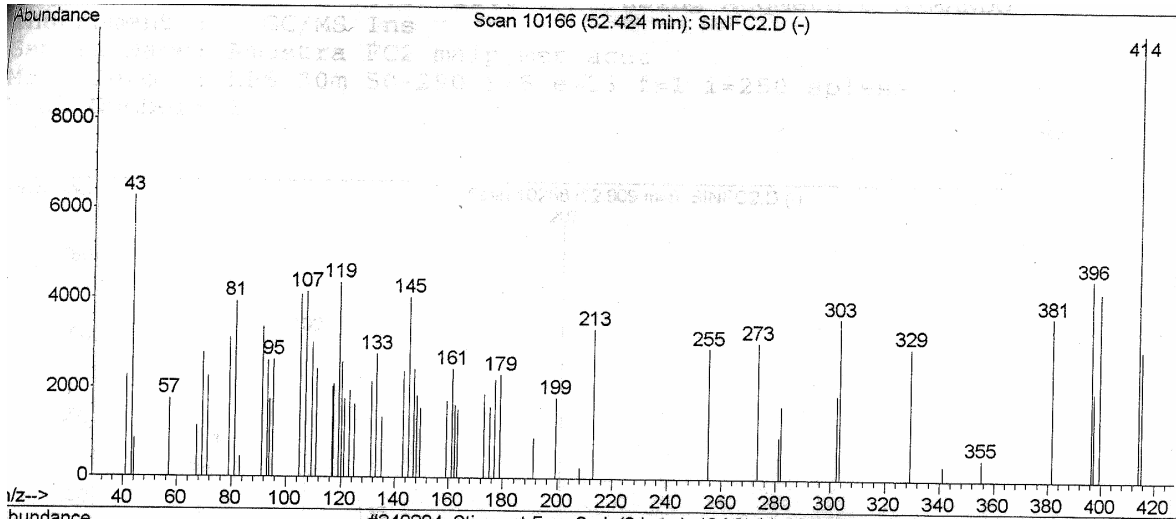
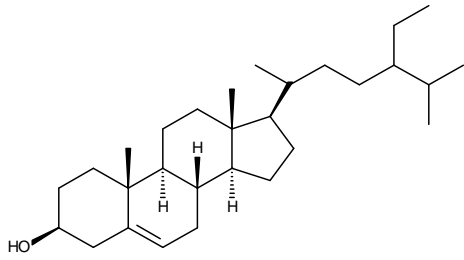


Figura 24. Espectro de Massas do β -Sitosterol

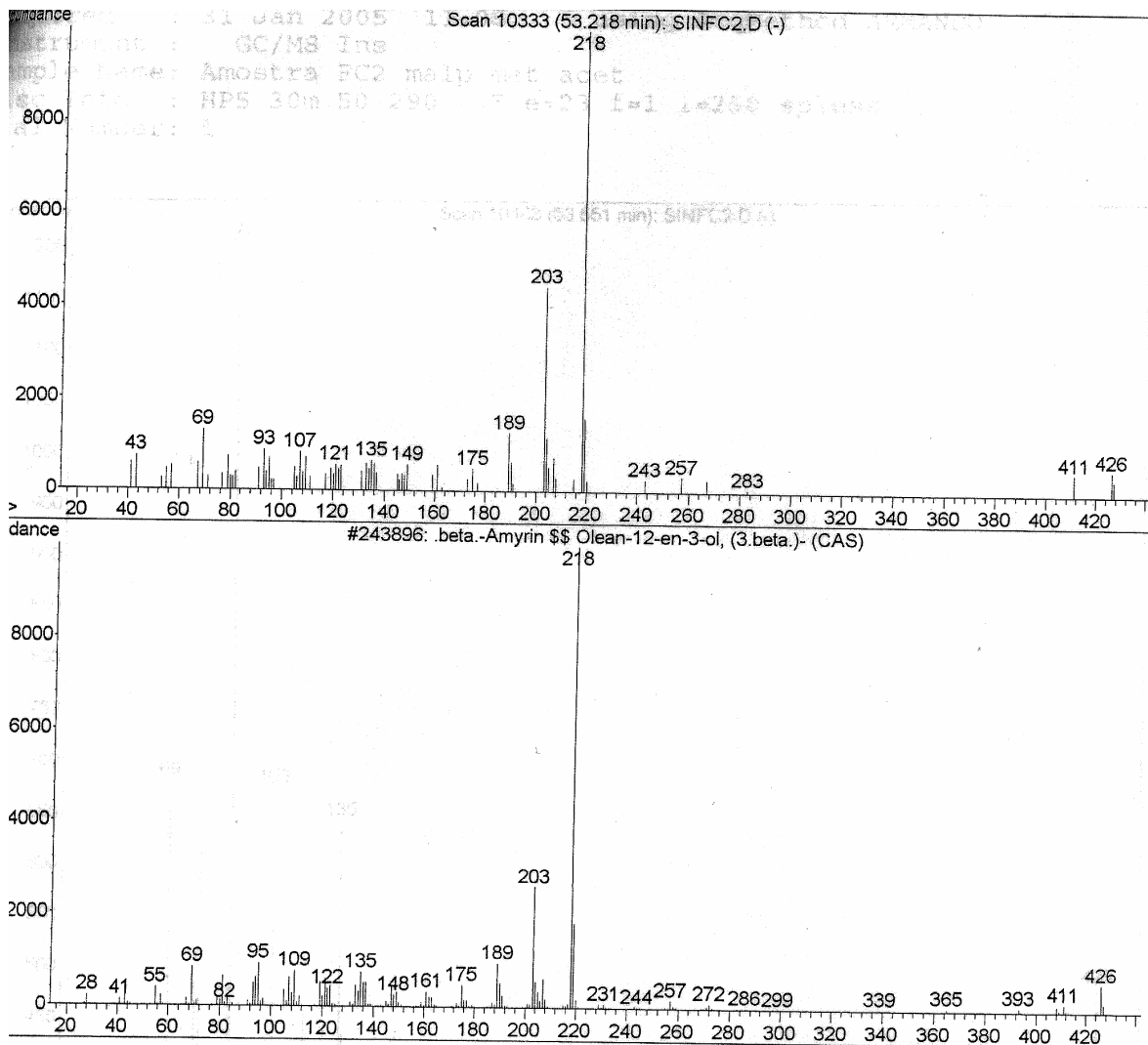
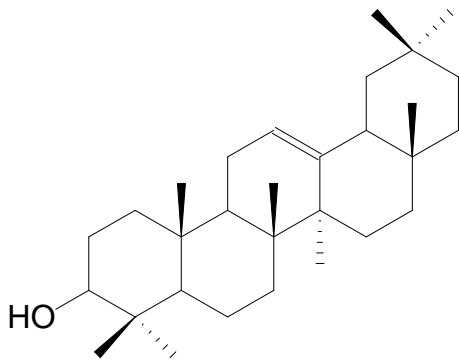


Figura 25. Espectro de massas do Olean-12-en-3-ol (β -amirina)

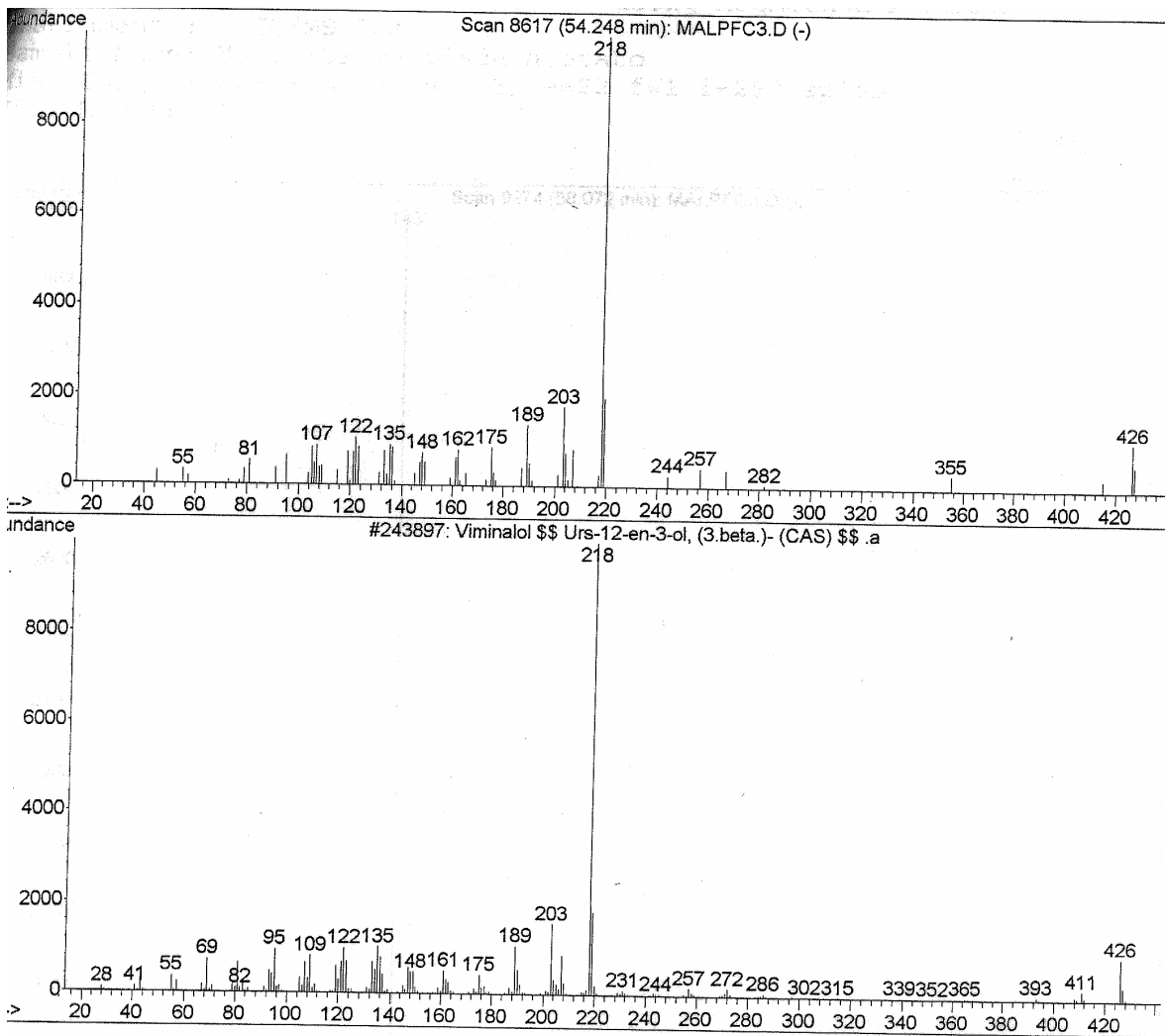
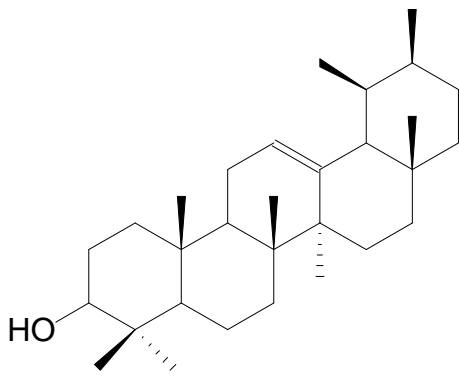


Figura 26. Espectro de massas do Urs-12-en-3-ol (α -amirina)

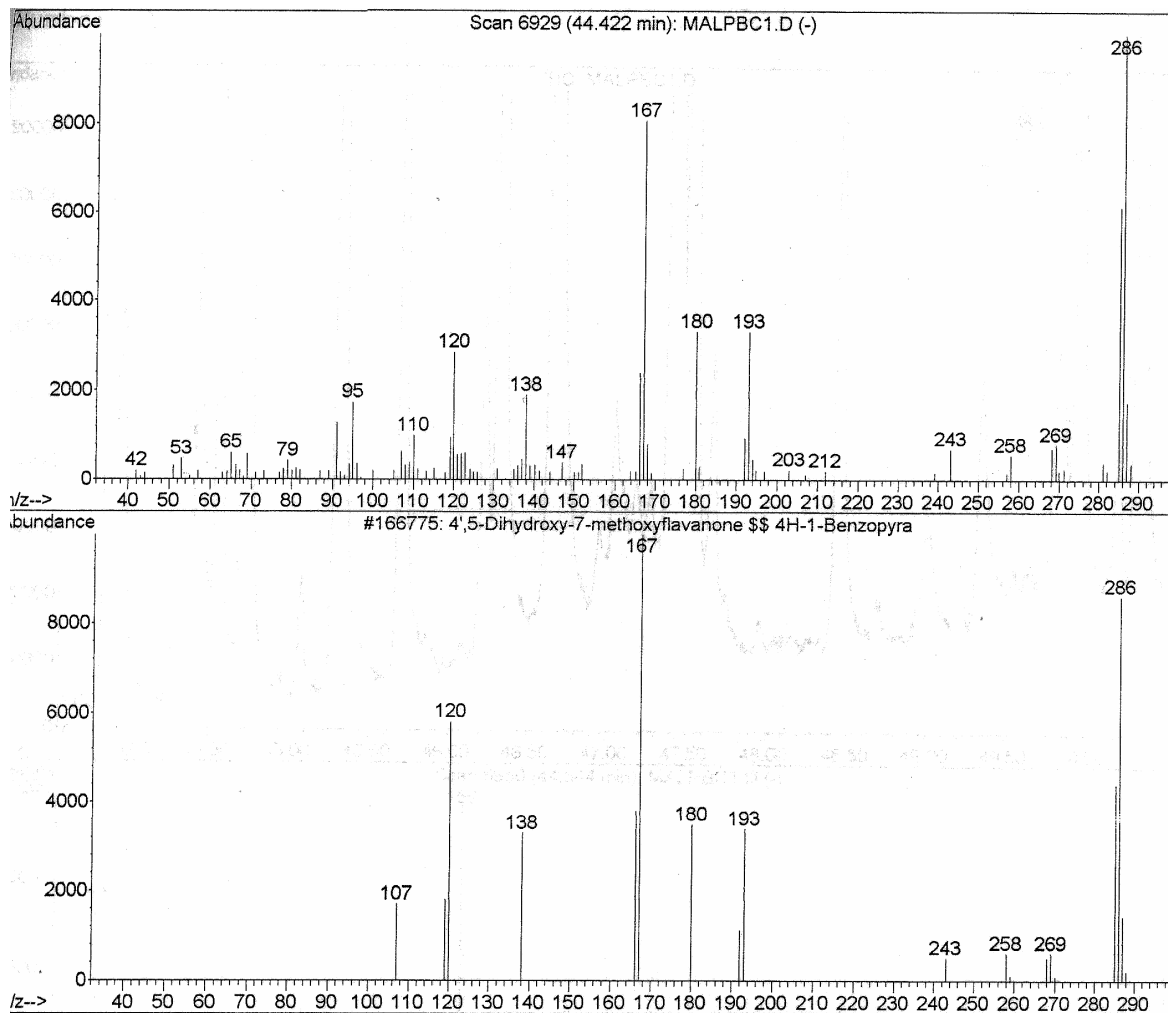
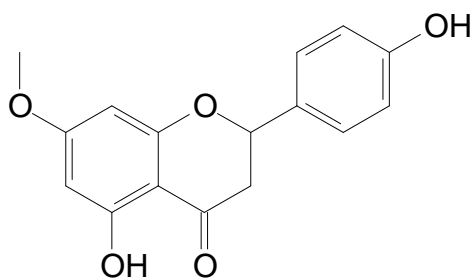


Figura 27. Espectro de massas do 4',5-diidroxi-7-metoxiflavona.

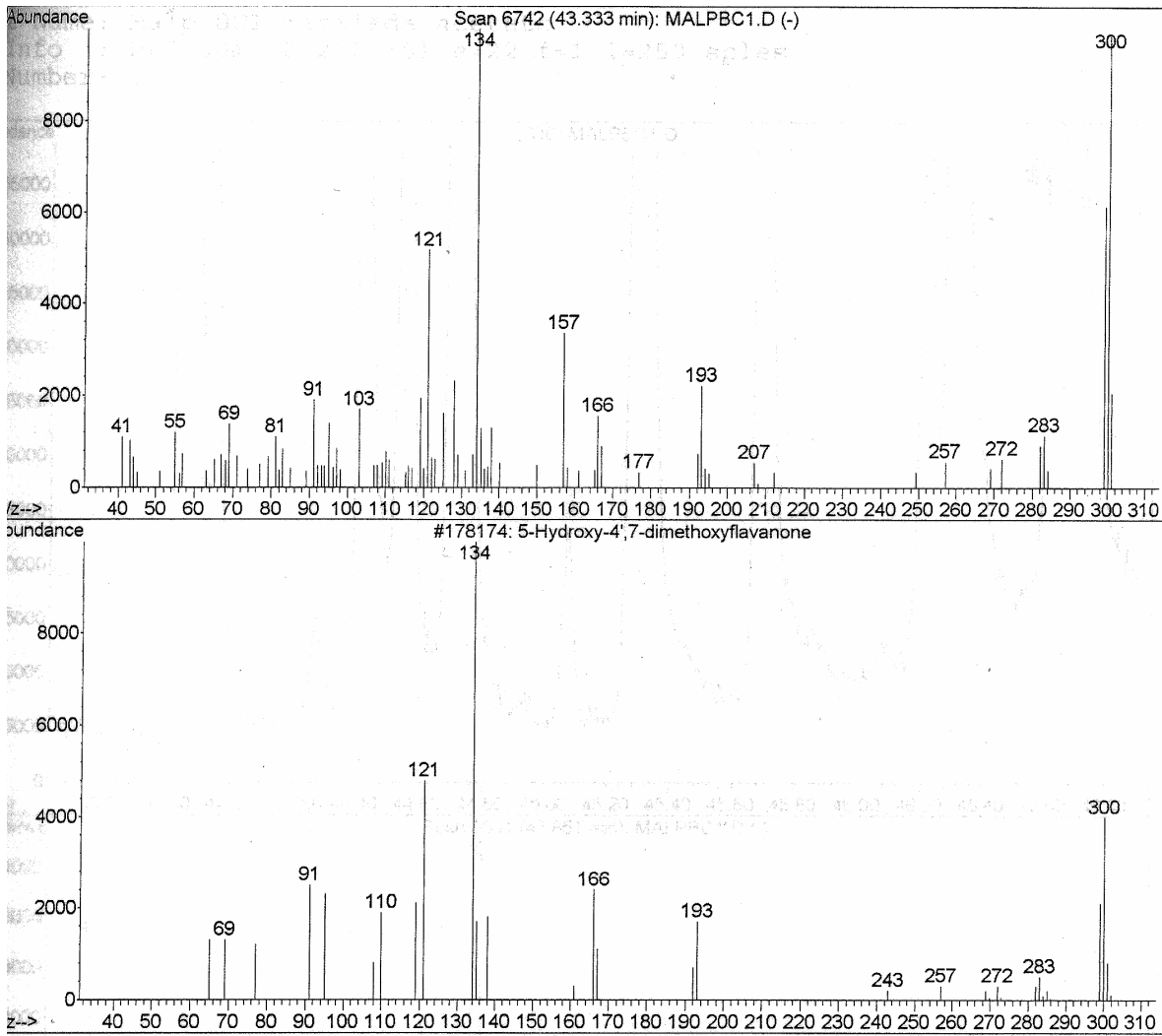
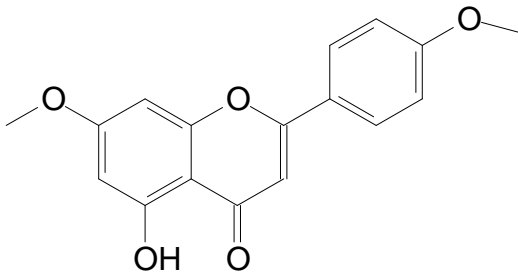


Figura 28. Espectro de massas do 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona

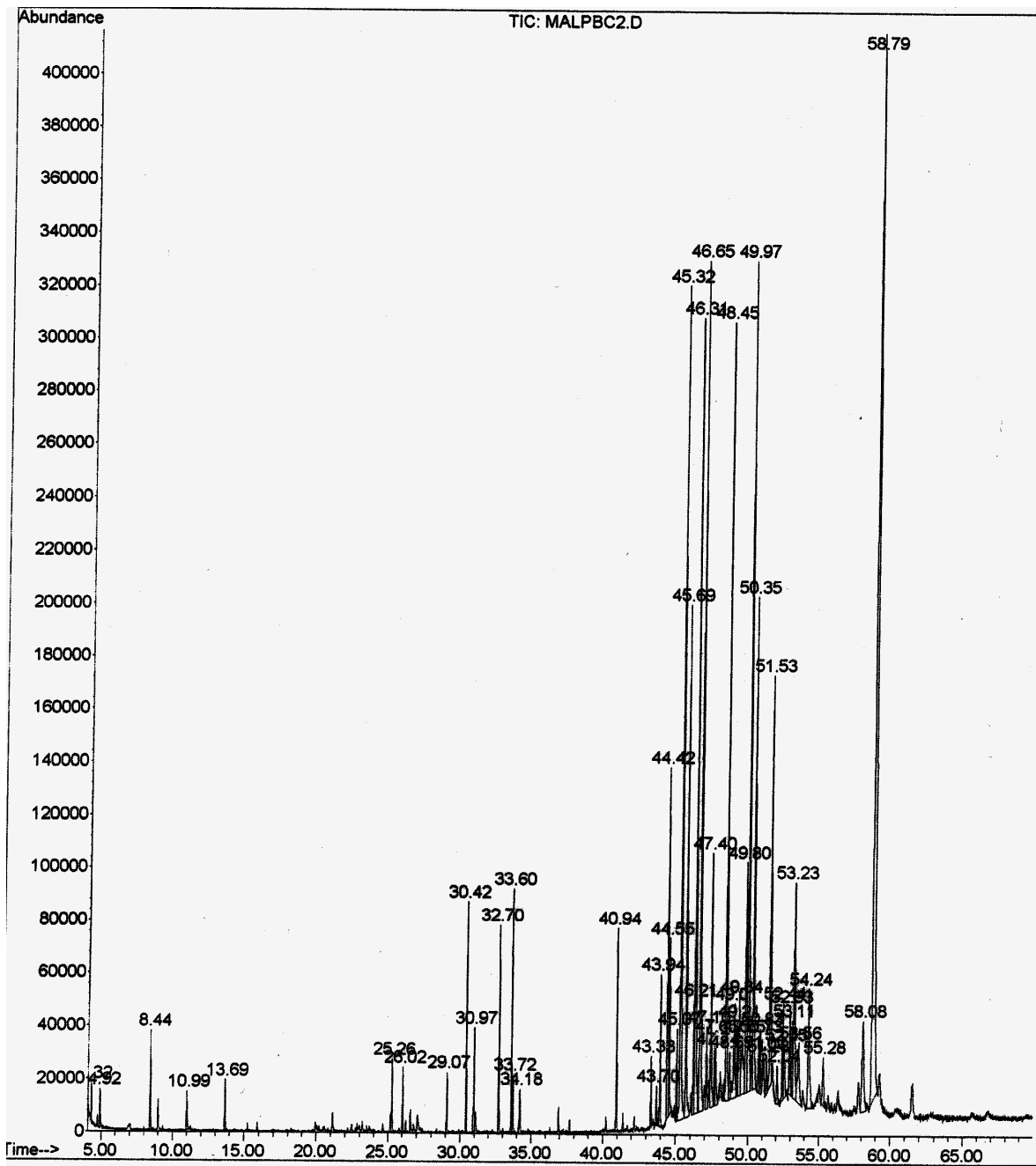


Figura 30. Cromatograma dos óleos florais obtidos dos botões de *Byrsonima bachybotria*

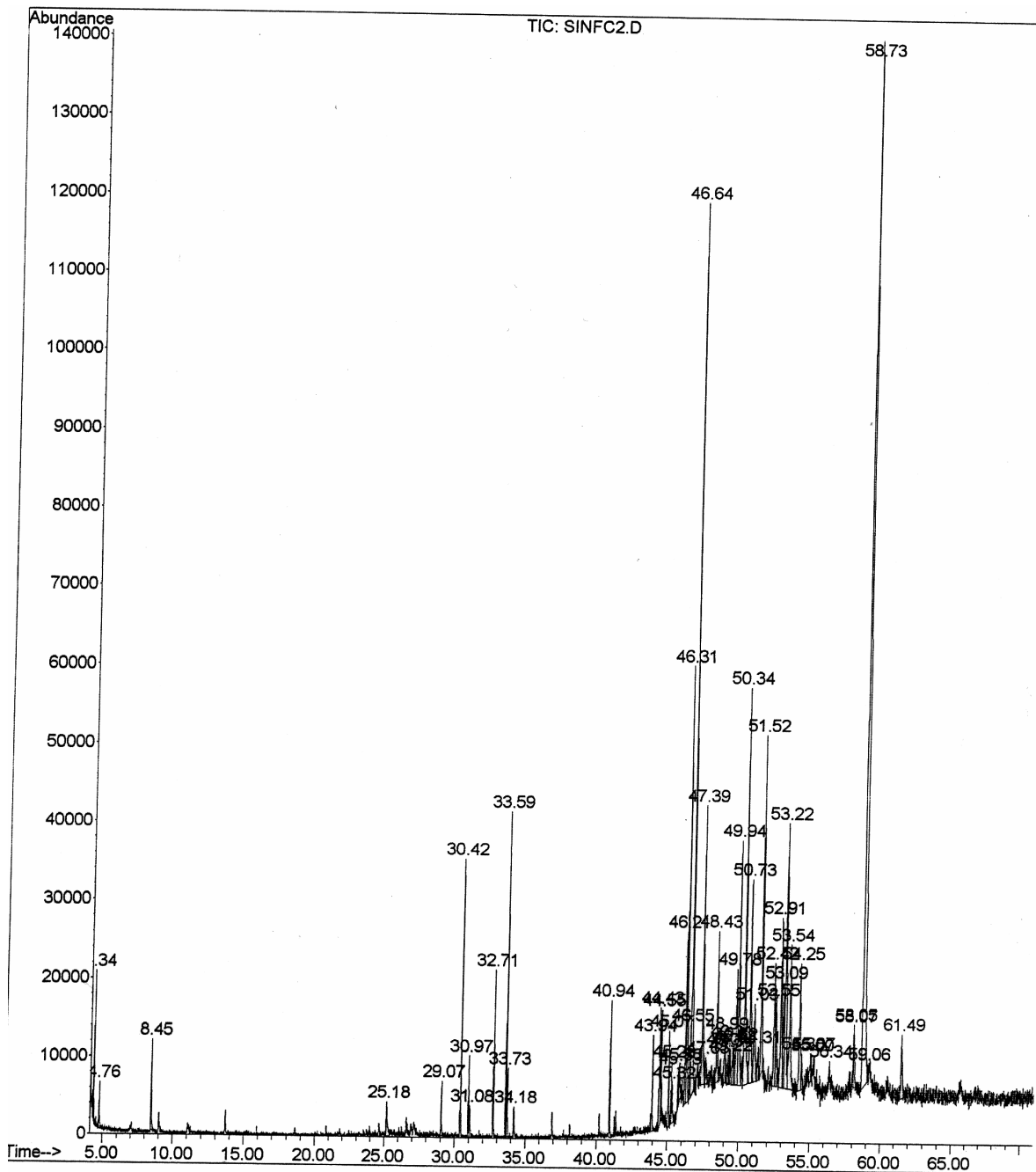


Figura 31. Cromatograma dos óleos florais obtidos das flores de *Byrsonima bachybotria*.

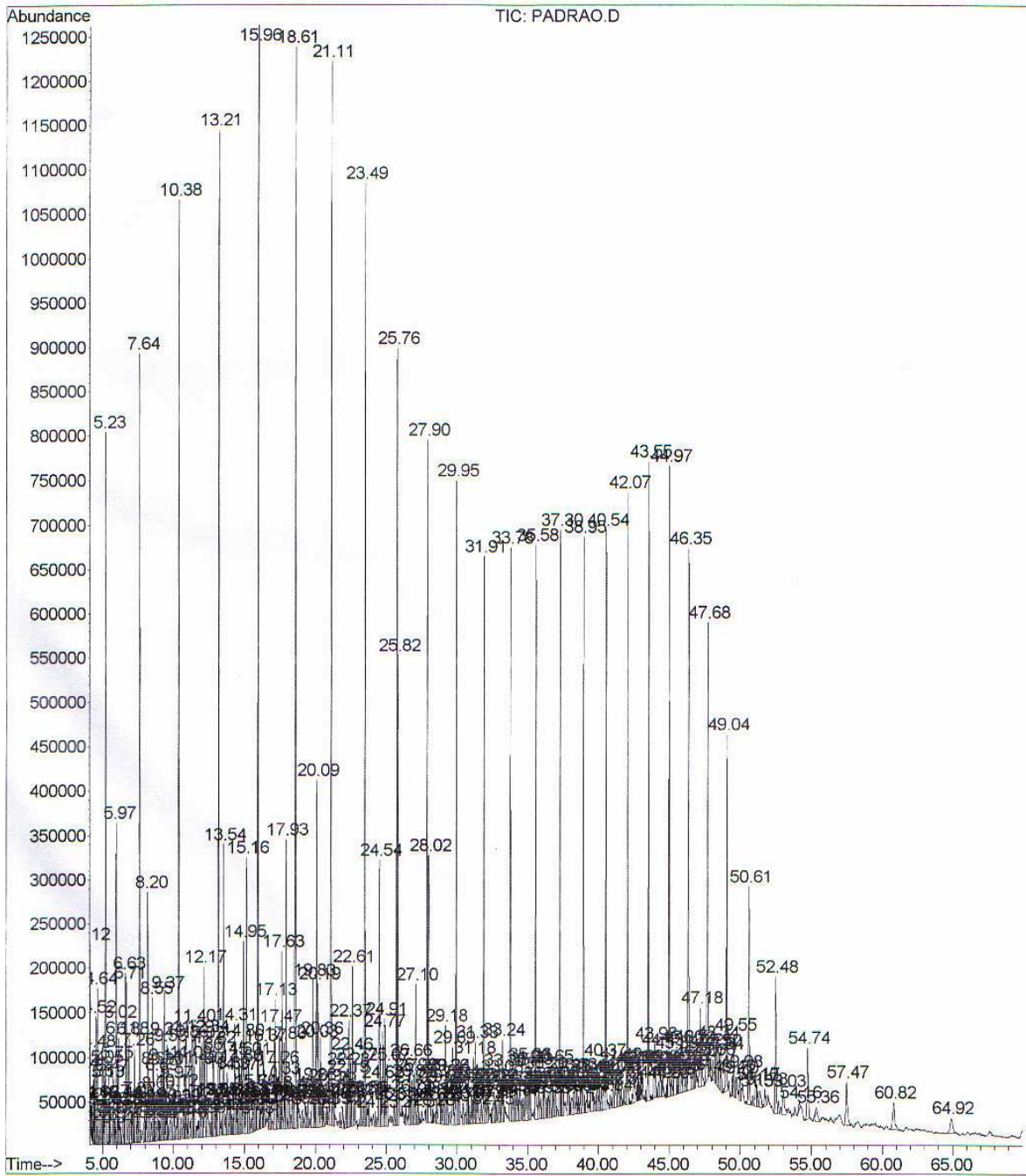


Figura 32 - Cromatograma do Padrão de Hidrocarbonetos

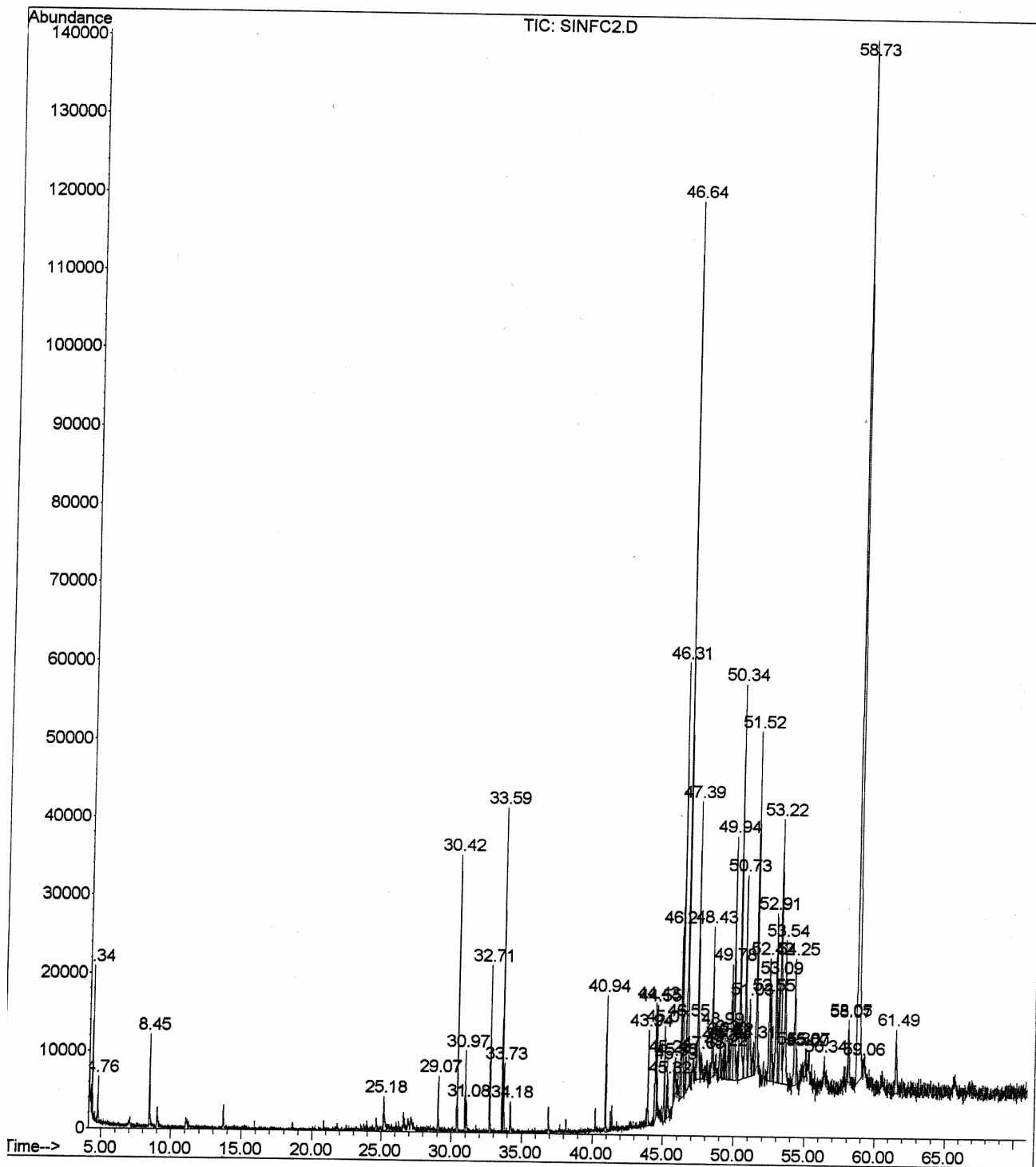


Figura 33 - Cromatograma da co-injeção do padrão com extrato do óleo floral obtido dos botões de *B. brachybotria* na primeira coleta.

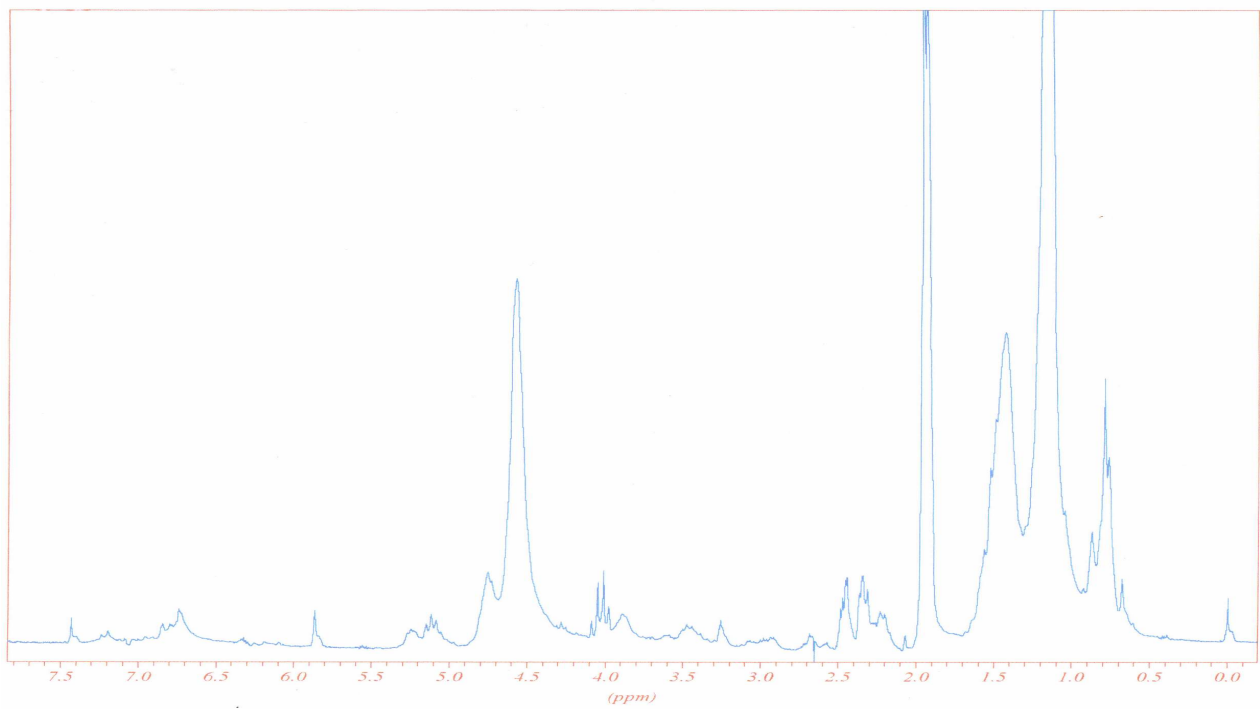


Figura 34 - Espectro de RMN ^1H do óleo floral bruto da flor de *Byrsonima Bachybotrya*

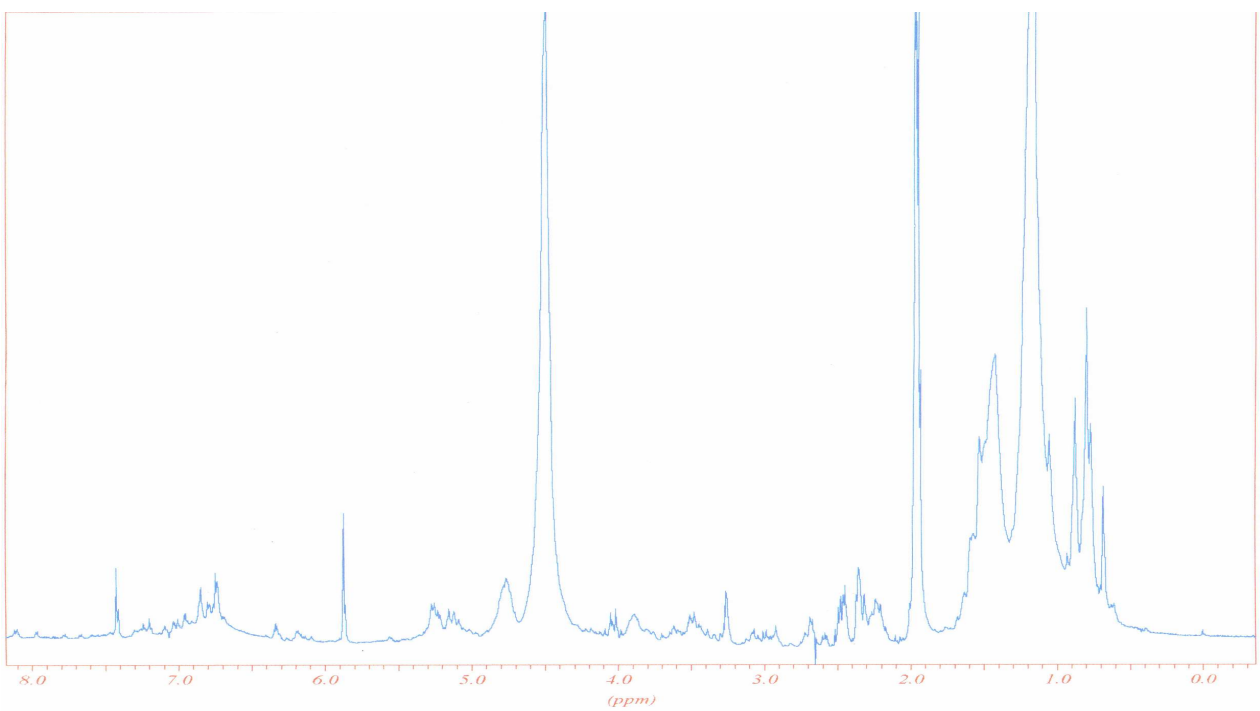


Figura 35 - Espectro de RMN ^1H do óleo floral bruto do botão de *Byrsonima Bachybotrya*

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P., *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corp., Carol Stream, Illinois, U.S. A., 1995.
- ALVES, G.L., FRANCO, M.R.B. *Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (Byrsonima crassifolia L. Rich)*. Journal of Chromatography A 985, 2003, p.297-301.
- BEJAR, E., MARVIN, H.M. *Pharmacological and chemical screening of Byrsonima crassifolia, a medicinal tree from Mexico. Part I*. Journal of Ethnopharmacology 39, 1993, p.141-158
- BIEMANN, K. *Mass spectrometry organic chemical application*, McGraw-Hill Co., Inc., Nova York, 1962, p. 83.
- BUCHMANN, S. L., *The ecology of oil flowers and their bees*. Ann. Rev. Ecol. Syst., v.18, 1987, p.343-369.
- BUDZIKIEWICZ, H.C; DJERASSI, C. E WILLIAMS, H. *Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds*, Holden-Day, Inc. San Francisco, 1964, p. 15.
- BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M. & DJERASSI, C., *Mass spectroscopy in structural and stereochemical problems XXXII. Pentacyclic triterpenes*. J. Am. Chem. Soc. v. 85, p. 3688-3691, 1963.
- BURNOUF-RADOSEVICH, M., DELFEL, N. E., ENGLAND, R. *Gas chromatography-mass spectrometry of oleanane- and ursane-type triterpenes-application to Chenopodium quinoa triterpenes*. Phytochemistry 24, 1985, p.2063-2066
- CARERI, M., ELVIRI, L., *Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil*. Journal of chromatography A, 935, 2001, p. 249-257
- COMBA, L., CORBET, S. *Garden flowers: Insect visits and the floral reward of horticulturally-modified variants*. Annals of Botany 83, 1999, p. 73-86
- FABBRI, D., SANGIORGI, F., VASSURA, I. *Pyrolysis-GC-MS to trace terrigenous organic matter in marine sediments: a comparison between pyrolytic and lipid markers in the Adriatic Sea*, Analytica Chimica Acta, 530, 2005, p. 253-261.
- FAEGRI, K. & VAN DER PIJL, L., *The Principles of Pollination Ecology*. Pergamon Press, Oxford, 1979.
- FERNANDEZ, M.P., WATSON, P.A. *Gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of wood extractive compounds in quaking aspen*. Journal of Chromatography A 922, 2001, p.225-233.

- FRANKIE, G. W. & VINSON, S. B., *Diversity and abundance of bees visiting a mass flowering tree species in disturbed seasonal dry forest*, Costa Rica. J. Kansas Entomol. Soc., v. 70, 1987, p.281-296.
- GUIOCHON, Anal.Chem. 36, p. 1964, p. 661.
- HABGOOD, W.E. HARRIS, Anal. Chem. 36, p. 1964, p. 663.
- HARBONE, J. B. *Introduction to Ecological Biochemistry*, Fourth Edition, University of Reading, UK ,1993.
- HARRIS, H.W. HABGOOD, *Programmed Temperature Gas Chromatography*, Wiley, New York, 1966.
- HARRISON, G.A., TU, Y., *Functional group interactions in the fragmentation of protonated and methylated succinic acid derivates*. International Journal of Mass Spectrometry 179/180, p. 1998, p.15-25
- JACOB, J., DISNAR, J.R., *Pentacyclic triterpene methyl ethers in recent lacustrine sediments (Lagoa do Caçó, Brazil)*. Organic Geochemistry 36, p. 2005, p. 449-461.
- KEVAN, P. G. & BAKER, H. G., Insects as flower visitors and pollinators. Ann. Rev. Entomol, v.28, 1983, p.407-453.
- KUTNEY, J.P.; HEWITT, G.N., LEE, G; PIOTROWSKA, K.; ROBERTS, M. & PETTIG, S. , *Studies with tissue cultures of the chinese herbal plant, Triptenygim wilfordii. Isolation of metabolites of intrest in rheumatoid arthritis, immunosppressor and male contraceptive activity*. Canadian Journal Chemistry v. 70, 1992, p. 1455-1462.
- LOPEZ, A., HUDSON, J.B. *Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology 77, 2001, p. 189-196.
- LORENZ, L., JOHANNES, C. *Preparation and mass spectrometry os 14 and O₂ – labeled oxidation products from the phytosterols β -sitosterol and stigmasterol*. Analitical Biochemistry 325, 2004, p. 107-116.
- MARSAIOLI, A. J. *The Fragrante Floral Oils of Tovomita Species*, Phytochemistry, Vol. 49, n^o4, 1998.
- MARSAIOLI, A. J., *Orcidinol – a novel diacylglycerol from Ornithophora radicans Barb. Rodr. (Orchidaceae) floral oil*, Tetrahedron Letters, 2003.
- MARTINEZ-VÁZQUEZ, M. *Antimicrobial activity of Byrsonima crassifolia (L.) H.B.K.* Journal of Ethnopharmacology 66, 1999, p. 79-82.
- MATHE, C., CULIOLI, G. *Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 1023, 2004, p. 277-285
- MICHENER, C.D.; *The bees of the ward*. Baltimore, Johns Hopkins, p. 913.

- MORALES, C., GOMEZ-SERRANILLOS, M.P. *Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala*. IL Farmaco 56, 2001, p. 523-526.
- NOMA, H., TANAKA, H. *Enzymatic formation of an unnatural novel tetracyclic sesterpene by β -amyirin synthase*. Tetrahedron Letters 45, 2004, p. 8299-8301.
- OGUNKOYA, L., *Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes*. Phytochemistry 20, 1981, p. 121-126.
- RAMALHO, M. & SILVA, M.; *Flora oleífera e suas abelhas em uma comunidade da restinga tropical*. Sitientibus 2, 2002, p.34–43.
- RYHAGE, R., and STENHAGEN, E., *Mass spectrometry in organic ions*. F. W. McLafferty, editor, Academic Press, N. York and London, 1963, p. 399.
- REIS, M. G., FARIA, A. D., BITTRICH, V., AMARAL, M. C. E. & MARSAIOLI, A. J., *The chemistry of flower rewards – Oncidium (Orchidaceae)*. J. Braz. Chem. Soc., v. 11, 2000, p.600-608.
- SILVERSTEIN, R.M. *Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- SIMPSON, B. B. & NEFF, J. L., *Evolution and diversity of floral rewards*. In: Jones, C. E. & Little, K. J. (eds.), *Handbook of Experimental Pollination Biology*, Van Norstrand Reinhold Co., New York, 1983, p. 142-159.
- SPITELLER, G., SPITELLER-FRIEDMANN M., HOURIET, R., *Monastsh Chem.*, 97, 1966, p. 121.
- SINGLER, D., SIMPSON, B.B., MARTIN, C., NEFF, J., *Free 3-acetoxylfatty acids in floral grands of Krameria species*, *Phytochemistry*, v.17, 1978, p.995-996.
- SUN, K.K., HOLMAN, R.T. *Mass spectrometry of lipid molecules*. The Hormel Institute, University of Minnesota, Austin, Minnesota, 1968.
- STRANSKY, K.; VALTEROVÁ, I.; FIELDER, P.; *Nonsaponifiable lipid components of pollen of elder*, *Journal of Chromatography*, 936, 2001, p. 173-181.
- TREMBLAY, R. L., *Trends in pollination ecology of the Orchidaceae: evolution an systematicity*. *Canadian Journal of Botany*, v.70, 1992, p. 642.
- VAN DEN DOOL, J. & KRATZ, P. D. J., *Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography*. *J. Chromatography*, v.11, 1963, p.463-471.
- VAN DEN DOOL, P.D. KRATZ, J. *Chromatogr.* 11, 1963, p. 463.
- VINSON, S. B., FRANKIE, G. W. & SHRUM, G., *Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a use of floral lipids by *Centris* bees (Hymenoptera, Apidae)*. *Biotropica*, v. 29, 1997, p.76-83.

- VOGEL, S. *Flower offering fatty oil instead of nectar*. Prox. XI Intl. Bot. Congress, Seattle, 1969
- VOGEL, S. *Ölblumen und ölsammelnde Bienen*. Tropische und Subtropische Pflanzenwelt, v.7, 1974.
- VOGEL, S.; *History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology*. Mem. N. York Bot. Garden 55, 1990, p. 130-142.
- WILLIAMS, N.H., *Floral fragrances as cues in animal behavior*. In Jones, C. E. & Little, K. J. (eds.), *Handbook of Experimental Pollination Biology*, Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1983, p.50-72.