UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

LIMONÓIDES E PROTOLIMONÓIDES DE
Trichilia elegans ssp. *elegans* A. Juss.
(MELIACEAE)

Volume 1

FERNANDA RODRIGUES GARCEZ
Tese de Doutorado

Nídia Franca Roque
Orientadora

São Paulo
1997

**“Limonóides e Protolimonóides de *Trichilia elegans*
ssp. *elegans* A. Juss. (MELIACEAE)”**

FERNANDA RODRIGUES GARCEZ

**Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Orgânica**

Aprovado por:

Profa. Dra. NIDIA FRANÇA ROQUE
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. VICENTE DE PAULO EMERENCIANO
IQ - USP

Prof. Dr. PAULO CEZAR VIEIRA
IQSCar - USP

Profa. Dra. MARIA LÚCIA PATITUCCI
UFRJ

Profa. Dra. MAYSA FURLAN
IQ - UNESP - Araraquara

SÃO PAULO
11 DE JUNHO DE 1997

CALVIN/Bill Watterson

*À memória de meu pai,
Philuvio de Cerqueira Rodrigues Filho*

Dedico este trabalho

aos meus amores - Walmir, Rafael, Felipe e Vicente

e

à Lia Durando Rodrigues, minha mãe querida

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Nídia Franca Roque, por seu entusiasmo, seriedade, competência e amizade, que estimulam o desenvolvimento do trabalho de seus orientados, pelas valiosas e sinceras opiniões e pela confiança em mim depositada, permitindo-me total liberdade de ação.

Aos meus queridos Rafael, Felipe e Vicente, pela compreensão (à maneira deles) em terem uma “semi-mãe viajante” , durante o período de realização deste trabalho.

Ao Walmir, por seu amor, incentivo, apoio e companheirismo constantes.

À minha mãe, Lia, por ser uma pessoa forte e positiva e pela ajuda contínua e ilimitada a cuidar da minha família e da minha casa, fundamental para que eu pudesse desenvolver com tranquilidade este trabalho.

A todos os componentes da grande família do B-11 Térreo, que dão vida e alegria ao IQ-USP, em especial aos queridos amigos:

Alberto J. Cavalheiro, Alexander de Freitas, Ana Luísa L. Lordello, Cecília V. Nuñez, Clara M. Isumizawa, Cláudia B. Brochini, Dulce H. S. Silva, Isabel C. Moreira, Mariana H. Chaves, Norberto (Beto) P. Lopes e Sergio M. Nunomura, pela acolhida tão carinhosa, companheirismo e agradável (e inesquecível) convivência.

Ao Alberto J. Cavalheiro, mais uma vez, pelos ensinamentos sobre a operação do cromatógrafo líquido de alta eficiência.

À Mariana H. Chaves, mais uma vez também, por administrar com tanto zelo minhas amostras para RMN, durante minhas viagens.

A todos os funcionários da Central Analítica do IQ-USP, pela obtenção dos espectros, em particular ao Luis Carlos Roque.

À Rute A. Santos, por sua amizade e, também, pela obtenção dos espectros HMQC de **B.2** e **F.1**.

Ao Dr. Leslie Gunatilaka (Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, U. S. A.), pelos espectros HMBC e COSY ^1H - ^1H (400 MHz), à Prof^aDr^a Vanderlan Bolzani (IQ-UNESP, Araraquara), pela gentileza em fazer chegar até ele as amostras e à Cláudia B. Brochini (mais uma vez), por trazê-las de volta.

Ao Sr. Mark Bayliss (Micromass UK Limited), pelos espectros de massas ESI.

À botânica Vali J. Pott, do Herbário CPAP (EMBRAPA, Corumbá) e ao Prof. Humberto Barreiros, da Divisão de Sistemática do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, responsáveis, respectivamente, pela coleta e identificação do material vegetal.

Aos bolsistas de iniciação científica da UFMS, Maura T. Tsutsumi e Vanderlei S. Ferreira, pela colaboração na parte inicial deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector (Departamento de Química-UFSCar), pelos dados de difração de raios-X.

À Prof^a Dr^a Lígia M. M. Valente, do IQ-UFRJ e Instituto de Tecnologia em Fármacos (FIOCRUZ), pelos testes de atividade antitumoral com linhagens mutantes de *S. cerevisiae*.

Aos professores do Departamento de Química da UFMS, por me liberarem da atividade profissional para cursar pós-graduação.

À CAPES/PICDT, pela bolsa de estudos concedida e ao CNPq, FINEP, FAPESP e CPq-PROPP/UFMS, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Relação de Figuras	IV
Relação de Tabelas	VI
Relação de Esquemas	VIII
Abreviaturas e Símbolos Utilizados	IX
Resumo	XII
Abstract	XIII
 1. INTRODUÇÃO	
1.1 A família Meliaceae: Limonóides	1
1.2 Atividades biológicas dos limonóides de Meliaceae	2
1.3 Constituintes químicos do gênero <i>Trichilia</i>	3
1.4 Objetivos	23
 2. <i>TRICHILIA ELEGANS</i> SSP. <i>ELEGANS</i> A. JUSS.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS SEMENTES	24
 3. DISCUSSÃO	29
3.1 Determinação estrutural do protolimonóide A.1	30
3.2 Determinação estrutural do protolimonóide A.2	40
3.3 Determinação estrutural do limonóide B.1	45
3.4 Determinação estrutural dos limonóides B.2 e B.2a	57
3.4.1 Limonóide B.2	57
3.4.2 Limonóide B.2a	60
3.5 Determinação estrutural dos limonóides C.2, C.2a e C.2b	63

3.5.1 Limonóide C.2	63
3.5.2 Limonóides C.2a e C.2b	66
3.6 Determinação estrutural dos limonóides C.1, C.1a e C.1b	77
3.6.1 Limonóide C.1	77
3.6.2 Limonóides C.1a e C.1b	80
3.7 Determinação estrutural dos limonóides F.1 e F.2	86
3.7.1 Limonóide F.2	86
3.7.2 Limonóide F.1	88
3.8 Determinação estrutural dos limonóides G. 1 e G.2	91
3.8.1 Limonóide G.1	91
3.8.2 Limonóide G.2	97
3.9 Determinação estrutural dos limonóides H. 1 e H.2	100
3.9.1 Limonóide H.1	100
3.9.2 Limonóide H.2	104
3.10 Identificação do esteróide glicosilado I	108
 4. ENSAIO BIOLÓGICO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL	111
 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
 6. PARTE EXPERIMENTAL	118
6.1 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos	118
6.2 Isolamento dos metabólitos secundários	119
6.3 Separação dos componentes de F-28	124
6.4 Separação dos componentes de F-29	128

6.5 Dados físicos complementares e quantidades das substâncias isoladas	146
6.6 Material e equipamentos utilizados	148
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
CURRICULUM VITAE	164

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias que apresentam os principais grupos de esqueletos dos limonóides de Meliaceae	5
Figura 2: Estruturas dos limonóides e protolimonóides isolados de espécies pertencentes ao gênero <i>Trichilia</i>	15
Figura 3: Fotografia de folhas e flores de um exemplar de <i>Trichilia elegans</i> ssp. <i>elegans</i>	24
Figura 4: Formação dos derivados acetilados C.2a e C.2b, a partir do limonóide E.2	73
Figura 5: Espectro de RMN ^1H de B.1, em mistura com matéria graxa	123
Figura 6: Espectro de RMN ^1H de uma fração obtida de CCDP das frações 148-169 (provenientes de F 29)	123
Figura 7: Cromatograma semi-preparativo de 28-6	126
Figura 8: Cromatograma semi-preparativo de 28-7	127
Figura 9: Cromatograma semi-preparativo de 28-8	127
Figura 10: Cromatogramas analíticos das frações 52-55, 56-59 e 60, provenientes da separação em coluna “flash” de 29-4	131
Figura 11: Cromatograma semi-preparativo da fração 52-55	131
Figura 12: Cromatograma semi-preparativo da fração 56-59	132
Figura 13: Cromatogramas semi-preparativo da fração 60 e analítico do material obtido	132

Figura 14: Cromatogramas analíticos das frações 38-66 e 100-107, resultantes da separação em coluna “flash” de 29-6	134
Figura 15: Cromatograma semi-preparativo da fração 38-66	135
Figura 16: Cromatograma semi-preparativo da fração 100-107	136
Figura 17: Cromatograma semi-preparativo da fração 29-32, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7	138
Figura 18: Cromatograma semi-preparativo da fração 33-36, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7	138
Figura 19: Cromatograma semi-preparativo da fração 37-39, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7	139
Figura 20: Cromatograma semi-preparativo da fração 40-44, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7	139
Figura 21: Cromatograma semi-preparativo da fração 45-50, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7	140
Figura 22: Espectros de RMN ^1H de 29-R e 29-S	141
Figura 23: Cromatogramas analítico e semi-preparativo da fração 29-R AC	144
Figura 24: Cromatogramas analítico e semi-preparativo da fração 29-S AC (1-2)	145

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Limonóides isolados de espécies do gênero <i>Trichilia</i> por grupo de esqueleto	7
Tabela 2: Espécies de <i>Trichilia</i> estudadas e respectivos limonóides isolados	11
Tabela 3: Protolimonóides obtidos de espécies do gênero <i>Trichilia</i>	22
Tabela 4: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de alguns dos prótons e dos carbonos relativos aos anéis A-D de A.1 e do modelo 84	35
Tabela 5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos prótons e carbonos relativos à cadeia lateral em C-17 de A.1 e do modelo 68	37
Tabela 6: Comparação entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C de alguns dos prótons e dos carbonos relativos à cadeia lateral em C-17 de A.2 e do modelo 69	42
Tabela 7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos protolimonóides A.1 e A.2	44
Tabela 8: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do limonóide B.1	55
Tabela 9: Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY do limonóide B.1	56
Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do limonóide B.2 e de seu derivado acetilado B.2a	62
Tabela 11: Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância observadas no espectro HMBC do limonóide C.2	66
Tabela 12: Dados de RMN ^1H da mistura de limonóides C.2a e C.2b (componente majoritário)	70
Tabela 13: Dados de RMN ^1H do limonóide C.2 e de seus derivados acetilados C.2a e C.2b	74

Tabela 14: Dados de RMN ^{13}C do limonóide C.2 e de seus derivados acetilados C.2a e C.2b	75
Tabela 15: Comparação entre os valores de deslocamento químico (δ) de C-20 a C-23, H-17 e H-22 dos limonóides B.2 e C.2 com os de B.2a , C.2a e C.2b , respectivamente	76
Tabela 16: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do limonóide C.1 , em CDCl_3 , comparados com os de B.1	83
Tabela 17: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do limonóide C.1 , em acetona- d_6 ...	84
Tabela 18: Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos limonóides C.1a e C.1b	85
Tabela 19: Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos limonóides F.2 e F.1	90
Tabela 20: Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância observadas no espectro HMBC do limonóide G.1	96
Tabela 21: Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos limonóides G.1 e G.2	99
Tabela 22: Dados de RMN ^1H dos limonóides H.1 e H.2	106
Tabela 23: Dados de RMN ^{13}C dos limonóides H.1 e H.2	107
Tabela 24: Dados de RMN ^{13}C de I e dos modelos 98 e 99	110

RELAÇÃO DE ESQUEMAS

Esquema 1: Fracionamento cromatográfico inicial da fase diclorometânica, obtida do extrato etanólico das sementes de <i>Trichilia elegans</i> ssp. <i>elegans</i>	122
Esquema 2: Separação dos principais componentes de F-28	125
Esquema 3: Sequência de fracionamento de F-29	129
Esquema 4: Separação dos principais componentes da fração 29-4, resultante do fracionamento de F-29	130
Esquema 5: Separação dos principais componentes da fração 29-6, resultante do fracionamento de F-29	133
Esquema 6: Separação dos principais componentes da fração 29-7, proveniente do fracionamento de F-29	137
Esquema 7: Separação dos principais componentes da fração 29-8 (proveniente do fracionamento de F-29), sob a forma de seus respectivos derivados acetilados	143

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

Ac - acetila

acetona-d₆ - acetona perdeuterada

ACN - acetonitrila

AcOEt - acetato de etila

AcOH - ácido acético

ax. - axial

[α] - rotação óptica específica

c - concentração (em g/100 mL)

CC - cromatografia em coluna

CCDA - cromatografia em camada delgada analítica

CCDP - cromatografia em camada delgada preparativa

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

cm⁻¹ - centímetro recíproco

COLOC - correlation spectroscopy via long-range couplings

COSY - correlation spectroscopy

δ - deslocamento químico em partes por milhão

$\Delta\delta$ - variação de deslocamento químico

d - dubleto

dd - duplo dubleto

ddl - duplo dubleto largo

dl - dubleto largo

dt - duplo tripleto

DEPT - distortionless enhancement by polarization transfer

DMAP - 4-dimetilaminopiridina

DMSO - dimetilsulfóxido

Δ - aquecimento

eq. - equatorial

ESI - Electrospray Ionization

ESIMS - Electrospray Ionization Mass Spectrometry

EtOH - etanol

eV - eletrons-volt

Fig. - figura

HMBC - heteronuclear multiple-bond connectivity

HMQC - heteronuclear multiple-quantum coherence

Hz - hertz

IV - infravermelho

J - constante de acoplamento

LH-20 - sephadex LH-20

Lit. - literatura

m - multiplicidade

m - multiplete

Me - metila

MeOH - metanol

MHz - megahertz

m/z - relação massa/carga

nm - nanômetro

NOE - efeito Overhauser nuclear

NOEdif. - NOE por diferença de espectro

NOESY - nuclear Overhauser and exchange spectroscopy

$\nu_{\text{máx.}}$ - frequência máxima

Ø - diâmetro interno

ORTEP - Oak Ridge Thermal Ellipsoids Plot

PENDANT - signal enhancement by polarization transfer and attached nucleus testing

PND - proton noise decoupling

Py - piridina

Py-d₅ - piridina perdeuterada

Ref. - referência

RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono-13

RP - fase reversa

s - singleto

Si- gel de sílica

sl - singleto largo

t - tripleto

tl - tripleto largo

UV - ultravioleta

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico das sementes de *Trichilia elegans* ssp. *elegans* A. Juss. (coletadas no município de Corumbá, MS), visando o isolamento e identificação ou elucidação estrutural dos seus metabólitos secundários, particularmente limonóides.

Da fase diclorometânica, obtida de uma partição efetuada com o extrato etanólico das sementes, foram isoladas, através de técnicas cromatográficas de separação (cromatografia em colunas de sílica gel, de Sephadex LH 20 e CLAE em fase reversa), dezoito substâncias, compreendendo:

dois protolimonóides, onze limonóides com esqueleto do tipo obacunol (abertura dos anéis A e D), quatro com esqueleto do tipo ivorensato de metila (abertura dos anéis A, B e D) e 3 β -O- β -D-glicopiranosilsterol. Todas as substâncias são inéditas, com exceção do esteróide glicosilado e de dois limonóides com esqueleto do tipo obacunol (kihadaninas A e B).

As determinações estruturais foram efetuadas com base em dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo experimentos bidimensionais (COSY ^1H - ^1H , COSY ^1H - ^{13}C , HMQC, NOESY e HMBC); a partir de informações obtidas dos espectros de massas e na região do IV e através de dados de difração de raios-X.

Quatro dos limonóides obtidos foram submetidos a um ensaio biológico de atividade antitumoral, utilizando-se linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, porém, mostraram-se inativos.

ABSTRACT

The present work describes the isolation and identification or structural elucidation of the chemical constituents of the seeds of *Trichilia elegans* ssp. *elegans* A. Juss., collected in Corumbá, MS.

From the dichloromethane solubles, obtained from partition of the ethanolic extract from the seeds, eighteen substances have been isolated, after a combination of column and flash chromatography on silica gel, gel filtration and reversed phase HPLC separations.

The isolated substances have been characterized as two new protolimonoids, nine new obacunol- and four new methyl ivorensate-type limonoids, in addition to two known limonoids belonging to the obacunol group (kihadanins A and B) and 3-O- β -D-glucopyranosyl-sitosterol.

The structures of these compounds have been established on the basis of 1D (^1H , ^{13}C) and 2D (^1H - ^1H and ^1H - ^{13}C COSY, HMQC, HMBC and NOESY) NMR spectroscopic techniques, IR and mass spectral data and X-ray crystallographic analyses.

Four of the isolated limonoids have been tested against DNA repair deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* but, nevertheless, shown to be inactive.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família Meliaceae: Limonóides

Pertencente à ordem Rutales, a família Meliaceae A. Juss. é composta na sua quase totalidade por espécies lenhosas que se distribuem em regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios terrestres. Compreende esta família cinqüenta e um gêneros e cerca de quinhentas e cinqüenta espécies, dispersas em diferentes habitats, com porte variando desde arbustos até árvores ¹.

De acordo com o arranjo taxonômico elaborado por Pennington e Styles, a família Meliaceae é subdividida em quatro subfamílias: Melioideae, Swietenioideae, Quivisianthoideae e Capuronianthoideae ¹.

Trichilia P. Browne, um dos gêneros que compõem a família, pertence à subfamília Melioideae. Este é constituído por cerca de setenta espécies, concentradas na América Tropical e África ¹. Segundo Pio Corrêa, o gênero é representado no Brasil por mais de quinze espécies, amplamente distribuídas por diferentes regiões do país ².

Quimicamente, as plantas da família Meliaceae destacam-se pela produção de tetranortriterpenos, substâncias altamente oxidadas, também conhecidas por limonóides ou meliacinas. Compostos deste tipo são encontrados em apenas mais três famílias do reino vegetal: Rutaceae, Cneoraceae e Simaroubaceae, nestas, porém, com esqueletos menos diversificados ³⁻⁵.

Estruturalmente, os limonóides caracterizam-se por possuir esqueletos carbocíclicos derivados dos triterpenos tetracíclicos Δ^7 -eufol (H-

20 β) ou Δ^7 -tirucalol (H-20 α), onde a cadeia lateral em C-17 sofreu alterações oxidativas, acarretando na perda de quatro átomos de carbono. Os produtos resultantes das oxidações preliminares destes triterpenos e que ainda conservam em C-17 uma cadeia de oito carbonos são considerados os precursores biogénéticos dos limonóides e denominados protolimonóides³⁻⁶.

1.2 Atividades biológicas dos limonóides de Meliaceae

Além da reconhecida importância econômica das meliáceas por fornecerem madeira de grande valor, como as dos gêneros *Swietenia*, *Cedrela*, *Cabralea*, *Guarea*, *Trichilia* e *Carapa*, há que se destacá-las também pela bioatividade de vários de seus metabólitos secundários, notadamente os limonóides.

Muitas destas substâncias apresentam atividades “antifeedant” e de inibição de crescimento de insetos polívoros, o que as tornam potencialmente úteis no combate a pragas agrícolas⁶⁻¹⁵. Neste sentido, merece destaque o limonóide azadiractina, isolado de *Azadirachta indica*, o qual afeta mais de duzentas espécies de insetos, já sendo utilizado comercialmente^{6,16,17}. Com relação aos limonóides de *Trichilia*, atividades significativas foram relatadas para alguns dos obtidos de *T. hirta*¹⁸, *T. roka*¹⁹⁻²¹ e *T. prieuriana*²².

No campo da farmacologia, vale mencionar a atividade citotóxica “*in vitro*” apresentada por certos limonóides^{6,23-25} e a inibição de carcinogênese quimicamente induzida “*in vivo*” por outros²⁶. Quanto ao gênero *Trichilia*, apenas os limonóides obtidos de *T. hispida* apresentaram atividade citotóxica relevante²⁷, enquanto que os isolados de *T. rubra* causaram inibição de adesão celular^{28,29}.

Outras atividades farmacológicas importantes têm sido descritas para os limonóides, tais como: antifúngica, bactericida, anti-viral e antimalárica “*in vitro*”^{6,30}.

Recentemente, verificou-se que o extrato aquoso de folhas de *Trichilia elegans* exerce um efeito inibitório sobre vários componentes do sistema imunológico de ratos, indicativo de atividade antiinflamatória³¹.

Na medicina popular brasileira, algumas espécies de *Trichilia* são empregadas para o tratamento de reumatismo e febre palustre e como agentes purgativos e eméticos².

1.3 Constituintes químicos do gênero *Trichilia*

Segundo a classificação proposta por Taylor, que abrange a maioria dos limonóides isolados de Meliaceae, estes podem ser divididos em onze grupos principais, de acordo com o padrão de esqueleto carbônico apresentado⁴ (**Figura 1**).

Os limonóides obtidos, até o momento, do gênero *Trichilia*, resultantes do estudo químico de doze espécies, podem ser distribuídos em oito desses grupos, conforme demonstra a **Tabela 1**. Neste aspecto, o gênero *Trichilia* destaca-se entre os demais gêneros da família Meliaceae, não só pela ocorrência de um elevado número de limonóides, como também pela diversidade dos seus esqueletos. Os dados mostrados na **Tabela 1** evidenciam que há uma predominância em *Trichilia* de substâncias com os esqueletos do tipo havanensina e prieurianina. Na **Tabela 2** são relacionados os limonóides isolados de cada espécie investigada, estando suas respectivas estruturas representadas na **Figura 2**.

A ocorrência de representantes de outras classes de substâncias também tem sido relatada em algumas espécies de *Trichilia*, podendo-se destacar os protolimonóides (**Tabela 3 e Figura 2**) e também triterpenóides derivados do cicloartano (*T. schomburgkii* ³², *T. connaroides* ³³, *T. claussenii* ³⁴). Outras substâncias obtidas dignas de nota incluem as pertencentes às classes dos sesquiterpenos (*T. claussenii* ³⁴, *T. catigua* ³⁵), esteróides (*T. schomburgkii* ^{32,36}, *T. claussenii* ³⁴, *T. hirta* ³⁷), ácidos ω -fenil-alcanóicos / alquenóicos; aminoácidos (*T. claussenii* ³⁴) e um fenil-alquil-hidroxibutanolídeo (*T. schomburgkii* ³⁶).

GRUPO A: tipo HAVANENSINA GRUPO B: tipo GEDUNINA GRUPO C: tipo EVODULONA GRUPO D: tipo OBACUNOL GRUPO E: tipo PRIEURIANINA GRUPO F: tipo NIMBINA

Figura 1. Substâncias que apresentam os principais grupos de esqueletos dos limonóides de Meliaceae ⁴.

GRUPO G: tipo ANDIROBINA

andirobina

GRUPO H: tipo MEXICANOLÍDEO

mexicanolídeo

GRUPO I: tipo FRAGMALINA

fragmalina

GRUPO J: tipo IVORENSATO DE METILA

ivorensato de metila

GRUPO L: tipo TOONAFOLINA

toonafolina

Figura 1. (continuação)

Tabela 1 - Limonóides isolados de espécies do gênero *Trichilia*, separados por grupo de esqueleto.

GRUPO A: Esqueleto tipo HAVANENSINA

Limonóide	Nome	Espécie	Ref.
1	hirtina	<i>T. hirta</i>	38
2	desacetil-hirtina	<i>T. hirta</i>	38
3	metil-11 β -acetoxi-6-hidroxi-12 α (2-metil-propioniloxi)-3,7-dioxo—	<i>T. hirta</i>	39
4	1,5,14,20,22-meliacapentaen-29-oato metil-11 β -acetoxi-6,23-di-hidroxi-12 α (2-metil-propioniloxi)-3,7,21-trioxo—1,5,14,20-meliacatetraen-29-oato	<i>T. hirta</i>	39
5	azadirona	<i>T. havanensis</i>	40
6	trichilenona	<i>T. havanensis</i>	41,42
7	1,7-diacetil-14,15-desoxi-havanensina	<i>T. havanensis</i>	40
8	triacetil-14,15-desoxi-havanensina	<i>T. havanensis</i>	40
9	1,7-diacetil-havanensina	<i>T. havanensis</i>	40
10	3,7-diacetil-havanensina	<i>T. havanensis</i>	42
11	triacetil-havanensina	<i>T. havanensis</i>	40-43
12	—	<i>T. havanensis</i>	40
13	—	<i>T. havanensis</i>	40,43
14	trifolina	<i>T. trifolia</i>	44
15	neo-havanensina	<i>T. havanensis</i>	41
16	heudelottina	<i>T. heudelottii</i>	45
17	heudelottina E	<i>T. heudelottii</i>	46
18	heudelottina C	<i>T. heudelottii</i>	46
19	heudelottina F	<i>T. heudelottii</i>	46
20	trichilina B	<i>T. roka</i>	19
21	trichilina A	<i>T. roka</i>	19
22	7-acetiltrichilina A	<i>T. roka</i>	47
23	trichilina D	<i>T. roka</i>	19
24	trichilina G	<i>T. roka</i>	59
25	sendanina	<i>T. roka</i>	20
26	trichilina E	<i>T. roka</i>	19
27	trichilina C	<i>T. roka</i>	19
28	trichilina F	<i>T. roka</i>	59
29	trichilinina	<i>T. roka</i>	48

Tabela 1. (continuação)**GRUPO B: Esqueleto tipo GEDUNINA**

Limonóide	Nome	Espécie	Ref.
30	gedunina	<i>T. trifolia</i>	44
31	7-desacetilgedunina	<i>T. trifolia</i>	44
32	7-desacetoxi-7-oxogedunina	<i>T. schomburgkii</i>	36

GRUPO C: Esqueleto tipo EVODULONA

Limonóide	Nome	Espécie	Ref.
32	dregeana 3	<i>T. dregeana</i>	49
34	dregeana 4	<i>T. dregeana</i>	49
35	rubralina 1	<i>T. rubra</i>	28
36	rubralina 2	<i>T. rubra</i>	28
37	rubralina 3	<i>T. rubra</i>	28
38	dregeana 5	<i>T. dregeana</i>	49

GRUPO D: Esqueleto tipo OBACUNOL

Limonóide	Nome	Espécie	Ref.
39	6 β -acetoxiobacunol	<i>T. trifolia</i>	44
40	6 β -acetoxi-7 α -acetilobacunol	<i>T. trifolia</i>	44

Tabela 1. (continuação)**GRUPO E: Esqueleto tipo PRIEURIANINA**

Limonoíde	Nome	Espécie	Ref.
41	prieurianina	<i>T. prieuriana</i>	50
42	dregeana-2	<i>T. dregeana</i>	49
43	Tr. A	<i>T. roka</i>	21
44	Tr. C	<i>T. roka</i>	21
45	trichavensina	<i>T. havanensis</i>	43
46	hispidina A	<i>T. hispida</i> <i>T. rubra</i>	27 29
47	rubrina A	<i>T. rubra</i>	29
48	rubrina B	<i>T. rubra</i>	29
49	rubrina D	<i>T. rubra</i>	29
50	nymania 1	<i>T. rubra</i>	29
51	rubrina F	<i>T. rubra</i>	29
52	rubrina G	<i>T. rubra</i>	29
53	dregeanina	<i>T. dregeana</i> <i>T. heudelottii</i> <i>T. splendida</i>	49,51 45 52
54	12-(2'-desacetil)-dregeanina	<i>T. heudelottii</i> <i>T. prieuriana</i> <i>T. dregeana</i>	51 53 51
55	D-5	<i>T. prieuriana</i>	54
56	D-4	<i>T. prieuriana</i>	53
57	rohituka-7 (hispidina C)	<i>T. hispida</i> <i>T. dregeana</i>	27 49
58	hispidina B	<i>T. hispida</i>	27
59	dregeana-1	<i>T. dregeana</i>	49
60	Tr. B	<i>T. roka</i>	21

Tabela 1. (continuação)**GRUPO F:** Esqueleto tipo NIMBINA

Limonoide	Nome	Espécie	Ref.
61	heudebolina*	<i>T. heudelottii</i>	55

* ocorrência duvidosa ⁴**GRUPO G' :** Esqueleto tipo ANDIROBINA (grupo G) modificado

Limonoide	Nome	Espécie	Ref.
62	trijugina A	<i>T. connaroides</i>	56
63	trijugina B	<i>T. connaroides</i>	56
64	acetato de trijugina B	<i>T. connaroides</i>	57

GRUPO H: Esqueleto tipo MEXICANOLÍDEO

Limonoide	Nome	Espécie	Ref.
65	2-hidroxi-3-O-tigloil-6-O-acetil-swietenolideo	<i>T. connaroides</i>	58

Tabela 2 - Espécies de *Trichilia* estudadas e respectivos limonóides isolados.

T. HIRTA

Limonóide	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
1	A	sementes e folhas	38
2	A	sementes	38
3	A	frutos	39
4	A	frutos	39

T. HAVANENSIS

Limonóide	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
5	A	frutos verdes	40
6	A	madeira e frutos maduros	41,42
7	A	frutos verdes	40
8	A	frutos verdes	40
9	A	frutos maduros	40
10	A	frutos maduros	42
11	A	madeira, fr. verdes e maduros	40-43
12	A	frutos verdes	40
13	A	frutos maduros	40,43
15	A	madeira	41
45	E	sementes maduras	43

T. TRIFOLIA

Limonóide	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
14	A		44
30	B		44
31	B		44
39	D		44
40	D		44

Tabela 2. (continuação)*T. HEUDELOTTII*

Limonoíde	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
16	A	madeira	45
17	A	madeira	46
18	A	madeira	46
19	A	madeira	46
53	E	madeira	45
54	E	madeira	51
61	F	raiz	55

* ocorrência duvidosa ⁴*T. ROKA*

Limonoíde	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
20	A	casca da raiz	19
21	A	casca da raiz	19
22	A	casca da raiz	47
23	A	casca da raiz	19
24	A	casca da raiz	59
25	A	frutos frescos	20
26	A	casca da raiz	19
27	A	casca da raiz	19
28	A	casca da raiz	59
29	A	casca da raiz	48
43	E	casca dos galhos	21
44	E	casca dos galhos	21
60	E	casca dos galhos	21

T. SCHOMBURGKII

Limonoíde	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
32	B	folhas, galhos e raiz	36

Tabela 2. (continuação)*T. PRIEURIANA*

Limonoíde	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
41	E	madeira	50
54	E	casca do caule	53
55	E	casca do caule	54
56	E	casca do caule	53

T. DREGEANA

Limonoíde	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
42	E	sementes	49
53	E	madeira	51
54	E	madeira	51
57	E	sementes	49
59	E	sementes	49
33	C	sementes	49
34	C	sementes	49
38	C	sementes	49

T. HISPIDA

Limonoíde	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
46	E	folhas	27
57	E	folhas	27
58	E	folhas	27

Tabela 2. (continuação)*T. RUBRA*

Limonoíde	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
35	C	raiz	28
36	C	raiz	28
37	C	raiz	28
46	E	raiz	29
47	E	raiz	29
48	E	raiz	29
49	E	raiz	29
50	E	raiz	29
51	E	raiz	29
52	E	raiz	29

T. SPLENDIDA

Limonoíde	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
53	E	madeira	52

T. CONNAROIDES

Limonoíde	Esqueleto	Parte da planta investigada	Ref.
62	G'	folhas	56
63	G'	folhas	56
64	G'	folhas	57
65	H	pericarpos	58

Figura 2. Estruturas dos limonóides (1 - 65) e protolimonóides (66 - 81) isolados de espécies pertencentes ao gênero *Trichilia*.

12

R₁ = AcR₂ = H

15

16 R, R₁, R₂ = Ac 20 R = α OH R₁ = H R₂ = α OAc R₃ = H21 R = β OH R₁ = H R₂ = α OAc R₃ = H22 R = β OH R₁ = H R₂ = α OAc R₃ = Ac23 R, R₁ = H R₂ = α OAc R₃ = H24 R = β OH R₁ = H R₂ = α OH R₃ = H 25 R = α OAc R₁ = H R₂ = H R₃ = H R₄ = OAc

Figura 2. (continuação)

30 $R = \alpha$ OAc $R_1 = H$

31 $R = \alpha$ OH $R_1 = H$

32 $R, R_1 = O$

	R	R ₁	R ₂
33		Ac	H
34			OH
35	Ac		
36	Ac		
37	Ac		H

Figura 2. (continuação)

38

39 R = OH

40 R = OAc

Figura 2. (continuação)

53 R = Ac

54 R = H

55

56

57 R = Ac

58 R =

59

60

Figura 2. (continuação)

61

62

63 R=H

64 R=Ac

65

Figura 2. (continuação)

Figura 2. (continuação)

Tabela 3 - Protolimonóides obtidos de espécies do gênero *Trichilia*.

Protolimonóide	Nome	Origem	Ref
66	melianona	<i>T. hirta</i> - frutos	38
		<i>T. connaroides</i> - pericarpos	58
67	melianodiol	<i>T. hirta</i> - frutos	38
		<i>T. connaroides</i> - pericarpos	58
68	bourjotinolona A	<i>T. hirta</i> - frutos	38
		<i>T. hispida</i> - folhas	60
		<i>T. schomburgkii</i> - folhas *	32
69	hispidona	<i>T. hispida</i> - folhas	60
70	niloticina	<i>T. schomburgkii</i> - folhas	36
71	piscidinol A	<i>T. schomburgkii</i> - folhas	36
72	melianol	<i>T. connaroides</i> - pericarpos	58
73	lipomelianol	<i>T. connaroides</i> - pericarpos	58
74	hispidol B	<i>T. hispida</i> - folhas	61
		<i>T. schomburgkii</i> - folhas	32
75	di-hidroniloticina	<i>T. schomburgkii</i> - folhas	36
		<i>T. connaroides</i> - pericarpos	58
76	lipo-3-episapelina A	<i>T. connaroides</i> - pericarpos	58
77	sapelina A	<i>T. hispida</i> - folhas	62
78	sapelina B	<i>T. hispida</i> - folhas	62
79	hispidol A	<i>T. hispida</i> - folhas	61
80	prieurona	<i>T. prieuriana</i> - folhas	63
81	29-hidroxiprieurona	<i>T. prieuriana</i> - folhas	63

* Denominada bourjotinolona B na referência 32.

1.4 Objetivos

O estado de Mato Grosso do Sul apresenta uma flora bastante rica e diversificada, destacando-se a vegetação dos cerrados, das matas fechadas e do complexo do Pantanal ^{64,65}. No entanto, tem-se observado nos últimos anos uma gradativa devastação da flora sul-matogrossense, em razão da intensificação das atividades agrícolas, pastoris e industriais ou pelo estabelecimento de núcleos populacionais. O estudo químico de plantas desta região torna-se, portanto, um empreendimento relevante a ser realizado.

Assim sendo, *Trichilia elegans* ssp. *elegans* A. Juss., espécie ainda não investigada quimicamente e que ocorre na região Centro-Oeste do Brasil, foi selecionada para um trabalho fitoquímico. Contribuíram também para a escolha desta espécie a riqueza de metabólitos secundários encontrada na família Meliaceae ^{3-5,52}, bem como as atividades biológicas descritas para algumas das substâncias presentes em espécies do gênero *Trichilia* ^{18-22, 27-29}.

Em razão da facilidade da coleta dos frutos, não havendo, portanto, destruição de árvores, associada à ocorrência de um elevado número de limonóides em sementes de outras espécies do mesmo gênero (**Tabela 2**), optou-se por efetuar o estudo químico das sementes da espécie mencionada.

Por conseguinte, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico das sementes de *Trichilia elegans* ssp. *elegans*, visando o isolamento e identificação ou elucidação estrutural dos seus metabólitos secundários, particularmente limonóides. Dessa forma, pretende-se contribuir para o conhecimento da composição química de meliáceas brasileiras.

2. *TRICHILIA ELEGANS* SSP. *ELEGANS* A. JUSS.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS SEMENTES

Trichilia elegans ssp. *elegans* A. Juss. (Figura 3), conhecida popularmente como “Cachuá”, produz madeira resistente e durável, sendo a casca empregada em curtumes ⁶⁶. Possui ampla dispersão no país, sendo encontrada desde Goiás até Santa Catarina e, em Mato Grosso do Sul, ocorre em matas semidecíduas, apresentando-se como uma arvoreta de três a seis metros de altura ⁶⁶. É uma planta apícola, cuja floração é observada de outubro a dezembro e com frutos encontráveis no período de janeiro a março ⁶⁶. Estes apresentam-se como cápsulas trivalvares ovaladas e pubescentes, medindo cerca de 6 mm de comprimento, enquanto as sementes, pretas, são parcialmente envoltas por um arilo de coloração alaranjada.

Figura 3

Fotografia de folhas e flores de um exemplar de *Trichilia elegans* ssp. *elegans* (extraída da referência 66).

O estudo químico das sementes de *T. elegans* ssp. *elegans*, coletada no município de Corumbá, MS, resultou no isolamento de dezoito substâncias, compreendendo: dois protolimonóides (A.1 e A.2), dez limonóides (B.1, B.2, C.1, C.2, F.1, F.2, G.1, G.2, H.1 e H.2) e 3-O- β -D-glucopiranosilsterol (I). Outros três limonóides (D.2, E.1 e E.2) foram purificados após acetilação e obtidos sob a forma de seus derivados acetilados em C-7 (C.1 e C.2) e em C-7 e C-23/C-21 (B.2a, C.1a, C.1b, C.2a e C.2b).

Todas as substâncias, com exceção de F.1, F.2 e I, estão sendo descritas pela primeira vez e suas respectivas estruturas encontram-se representadas a seguir.

B.2a

C

D.2

E

F

G

H

I

3. DISCUSSÃO

As substâncias apresentadas neste trabalho foram obtidas da fração diclorometânica, oriunda da partição do extrato etanólico das sementes de *Trichilia elegans* ssp. *elegans*, tendo sido purificadas através de técnicas cromatográficas (CC em sílica gel e em Sephadex LH 20 e CLAE em fase reversa).

As etapas referentes aos processos de isolamento das substâncias encontram-se descritas na Parte Experimental (seção 6).

A determinação estrutural das substâncias foi efetuada:

- a) com base em dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais homo- e heteronucleares (COSY ^1H - ^1H , COSY ^1H - ^{13}C , HMQC e NOESY), bem como de correlação à longa distância através de experimentos de HMBC;
- b) por comparação com dados espectrais de modelos existentes na literatura;
- c) a partir de informações obtidas dos espectros de massas e na região do IV;
- d) através de dados de difração de raios-X, no caso específico dos limonóides **B.2** e **C.2a**.

A discussão relativa à determinação estrutural das substâncias obtidas neste trabalho será conduzida por classe de substâncias (protolimonóides, limonóides e esteróide), independente da ordem de obtenção das mesmas a partir do fracionamento do extrato etanólico das sementes. Os limonóides, por sua vez, encontram-se organizados em dois

grupos, tendo sido adotado como critério de organização o tipo de esqueleto apresentado.

3.1 Determinação estrutural do protolimonóide A.1

Da fração 26-27 (**Parte Experimental; item 6.2**) foi isolada uma substância oleosa, designada por **A.1**.

O espectro de RMN ^1H de **A.1** [**espectro 1 (vol. 2); Tabelas 4, 5 e 7**] apresentou nove singletos referentes a grupos metílicos, sendo: cinco relativos a metilas terciárias, a 0,92; 0,95; 1,16; 1,25 e 1,29 δ ; um a 1,76 δ , atribuível a uma metila vinílica; dois sugestivos de metila de acetato, a 1,95 e 1,99 δ (IV: $\nu_{\text{máx.}}$ 1742 cm^{-1}) e um de metoxila a 3,63 δ .

No espectro de RMN ^{13}C de **A.1** [**espectros 2-4 (vol. 2); Tabelas 4, 5 e 7**)] foram evidenciados sinais para trinta e cinco carbonos, sendo que a presença dos dois grupamentos acetoxílicos, já mencionada, foi confirmada pelos sinais a 169,9; 170,2; 20,9 e 21,3 δ , enquanto que os sinais a 171,8 e 52,0 δ sugeriram um grupamento carbometoxílico.

Considerando-se a presença de trinta carbonos no esqueleto de **A.1**, uma vez que os demais corresponderam a dois acetatos e uma metoxila e ainda, com base na feição apresentada pelo espectro de RMN ^1H e nas informações contidas nos espectros de RMN ^{13}C PND e DEPT 135°, concluiu-se que a substância **A.1** tratava-se de um triterpenóide.

A presença de uma ligação dupla trissubstituída na estrutura de **A.1** foi proposta com base nos sinais presentes no espectro de RMN ^{13}C a 119,4 e 159,1 δ , atribuíveis, respectivamente, a um carbono olefínico terciário e a um quaternário. No espectro de RMN ^1H , um dubleto

observado a 5,30 δ ($J = 2,8$ Hz) poderia ser atribuído ao próton vinílico, cujo acoplamento com o carbono a 119,4 δ foi evidenciado no espectro COSY ^1H - ^{13}C (**espectros 6 e 7, vol. 2**).

A presença de um grupamento metilênico exocíclico foi evidenciada no espectro de RMN ^1H pelos dois singletes largos a 4,82 (1H) e 5,00 δ (1H). A correlação observada no espectro COSY ^1H - ^{13}C entre estes prótons e o carbono a 116,3 δ , assim como a presença de um sinal referente a carbono quaternário a 144,8 δ corroboraram esta proposta. No espectro COSY ^1H - ^1H (**espectro 5, vol. 2**), foi observado o acoplamento alílico entre os prótons da metila a 1,76 δ e o próton olefínico a 5,00 δ , definindo a ligação desta metila ao carbono olefínico tetrassubstituído a 144,8 δ e, conseqüentemente, a presença de uma isopropenila no esqueleto carbocíclico de **A.1**.

Na região mais desprotegida do espectro de RMN ^1H , foram ainda observados um dubleto largo a 5,47 δ ($J = 9,8$ Hz) e um singlete largo a 5,12 δ , ambos com integração para um próton. Tendo em vista a existência, já mencionada, de dois acetatos na estrutura de **A.1**, tais sinais corresponderiam aos prótons ligados aos respectivos carbonos que sustentam estes grupamentos. No espectro COSY ^1H - ^{13}C , as correlações observadas entre os carbonos representados pelos sinais a 74,8 e 76,6 δ e os prótons a 5,12 e 5,47 δ , respectivamente, confirmaram esta suposição.

Considerando-se que os espectros de RMN ^1H e ^{13}C de **A.1** também apresentaram, respectivamente, sinais na região de 2,50 a 4,00 δ e na de 64,0 a 87,0 δ e o fato de que os protolimonóides são derivados triterpênicos com alto grau de oxidação, o conjunto das informações obtidas sugeriu que o composto **A.1** deveria pertencer a esta classe de substâncias.

A presença na estrutura de **A.1** dos grupos carbometoxílico e isopropenílico apontou para a abertura de um dos anéis no esqueleto carbocíclico deste protolimonóide. De acordo com o levantamento feito na literatura, baseado em dados publicados no *Natural Product Reports*, verificou-se que a maioria dos *seco*-triterpenóides existentes na natureza apresenta abertura no anel A.

O local das oxigenações, bem como a estereoquímica relativa dos anéis A - D de **A.1** foram propostos considerando-se, também, a origem biogenética dos protolimonóides pertencentes ao grupo *apo*, ou seja, como derivados dos esqueletos tipo apotirucalol (**82**) ou apoeufol (**83**).

Com base nestas informações e nos dados espectrais de protolimonóides obtidos de Meliaceae, pôde-se propor para **A.1** a estrutura parcial A.

A

Assim, o dubleto largo a 5,47 δ ($J = 9,8$ Hz), observado no espectro de RMN ^1H de **A.1**, corresponderia a H-1, enquanto que H-7 equatorial seria representado pelo singlete largo a 5,12 δ . No espectro COSY ^1H - ^1H , picos cruzados entre o sinal referente a H-7 e o multipeto na região de 1,45-1,70 δ identificaram os dois prótons em C-6. A este carbono, por sua vez, foi atribuído o valor de 35,0 δ , em função da correlação observada no espectro COSY ^1H - ^{13}C com o multipeto supracitado.

O sinal correspondente a um dos prótons em C-2 (H-2A) foi identificado como fazendo parte de um multipeto na região de 2,36-2,48 δ , através da sua correlação com o sinal relativo a H-1 no espectro COSY ^1H - ^1H . Consequentemente, o próton representado pelo dubleto largo a 2,79 δ ($J = 13,7$ Hz), cujo acoplamento com H-2A foi observado neste mesmo espectro, foi identificado como H-2B. No espectro COSY ^1H - ^{13}C , ambos apresentaram correlação com o sinal a 35,3 δ , atribuído, portanto, a C-2.

Os dados espectrais referentes à estrutura parcial **A** proposta mostraram-se concordantes com os encontrados na literatura para os anéis A - D de nymania 2 (**84**), um 3,4-*seco*-limonóide isolado de *Nymania capensis* (Meliaceae)⁶⁷, conforme mostrado na **Tabela 4**.

84 - nymania 2

Com relação à natureza da cadeia lateral em C-17 de **A.1**, sabe-se que nos protolimonóides vários arranjos estruturais são possíveis para esta cadeia de oito carbonos, decorrentes de processos oxidativos e ciclizações, conforme ilustrado, por exemplo, na **Tabela 3 (item 1.3)**, onde são apresentados os protolimonóides isolados de espécies de *Trichilia*.

Assim, os sinais compreendidos entre 2,85 e 3,99 δ no espectro de RMN ^1H de **A.1** e representados por um dubleto a 2,88 δ (1H, $J = 9,1$ Hz), dois dubletos largos a 3,42 e 3,96 δ ($J = 10,0$ Hz) e um multipletto centrado em 3,85 δ , foram indicativos da presença de prótons ligados a carbonos contendo uma função oxigenada (IV: $\nu_{\text{máx.}}$ 3430,1173,1031 cm^{-1}). No espectro de RMN ^{13}C , os oito sinais relativos aos carbonos da cadeia lateral foram observados a 74,2 (carbono quaternário); 35,9; 64,4; 86,5 (carbonos metínicos); 36,3; 70,0 (carbonos metilênicos); 24,0 e 28,5 δ (carbonos metílicos) [**Tabela 5**]. Este conjunto de dados sugeriu a existência de uma cadeia lateral em conformidade com as já descritas para os protolimonóides de *Trichilia*.

Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de alguns dos prótons e dos carbonos relativos aos anéis A - D de **A.1** e do modelo **84**⁶⁴ (CDCl_3).

δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]			δ_{C}		
H	A.1 ^a	84 ^b	C	A.1 ^c	84 ^d
1	5,47 dl (9,8)	5,48 dd (2,0; 10,0)	1	76,6	76,6
2A	2,36-2,48 m	2,42 dd (10,0; 14,0)	2	35,3	35,4
2B	2,79 dl (13,7)	2,81 dd (2,0; 14,0)	3	171,8	171,7
7	5,12 sl	5,16 m	4	144,8	144,9
15	5,30 d (2,8)	5,29 m	5	34,6	34,4
16	2,06-2,28 m	2,03 e 2,18 m (16A, 16B)	6	35,0	34,7
18	0,95 s	1,02 s	7	74,8	74,4
19	0,92 s	0,97 s	8	42,3	42,4
28A	4,82 sl	4,86 sl	9	44,1	44,1
28B	5,00 sl	5,04 m	10	44,0	44,2
29	1,76 sl	1,79 sl	11	18,5	18,1
30	1,16 s	1,15 s	12	29,2	29,2
OAc	1,95 s	1,99 s	13	46,0	46,3
OMe	1,99 s	2,04 s	14	159,1	158,9
	3,63 s	3,67 s	15	119,4	118,9
			16	34,8	34,0
			17	52,4	58,3
			18	20,2	20,0
			19	15,0	15,0
			28	116,3	116,4
			29	22,7	22,8
			30	26,7	26,8
			OMe	52,0	52,0
			OAc	169,9	169,8
				170,2	170,2
				20,9	21,0
				21,3	21,2

^a 200 MHz
^b 80 MHz
^c 50 MHz
^d 20 MHz

Desta forma, foi demonstrado no espectro COSY ^1H - ^1H o acoplamento entre os prótons correspondentes aos dubletos a 3,42 (1 H) e 3,96 δ (1H). As correlações observadas entre tais prótons e o carbono a 70,0 δ no espectro COSY ^1H - ^{13}C , juntamente com a magnitude de 10 Hz supracitada, indicaram tratar-se de um acoplamento geminal.

Foram também observados naquele espectro acoplamentos entre os prótons relativos ao multipeto centrado em 3,85 δ e ao dubleto a 2,88 δ . No espectro COSY ^1H - ^{13}C , constatou-se que o próton correspondente ao multipeto apresentava conectividade com o carbono referente ao sinal a 64,4 δ , enquanto que o próton representado pelo dubleto apresentava com o carbono a 86,5 δ (**Tabela 5**).

Este espectro também mostrou correlações entre os prótons referentes às duas metilas desprotegidas, a 1,25 e 1,29 δ e os respectivos carbonos a 24,0 e 28,5 δ . Em função do valor do deslocamento químico e da multiplicidade apresentada no espectro de RMN ^1H , estas metilas estariam ligadas a um carbono quaternário portando uma função oxigenada. O sinal a 74,2 δ presente no espectro de RMN ^{13}C poderia ser atribuído a este carbono quaternário (**Tabela 5**).

Os dois carbonos restantes na cadeia lateral em C-17 de **A.1**, um metínico e um metilênico, foram identificados nos espectros de RMN ^{13}C PND e DEPT 135° pelos sinais a, respectivamente, 35,9 e 36,3 δ .

Os dados acima apresentados, juntamente com os disponíveis na literatura para os protolimonóides de *Trichilia*, permitiram caracterizar a estrutura da cadeia lateral presente em C-17 de **A.1** como a mesma encontrada em, por exemplo, bourjotinolona A (**68**)⁶⁰, cuja estrutura foi atribuída inequivocamente^{60,61,68}.

68

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C da cadeia lateral de **68** e os da proposta para **A.1** (C-21 a C-27) mostraram uma excelente correlação (Tabela 5).

Tabela 5- Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos prótons e carbonos relativos à cadeia lateral em C-17 de **A.1** e do modelo **68**⁶⁰ (CDCl_3).

C/H	A.1 [*]		68 [#]	
	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	δ_{C}	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	δ_{C}
21	3,42 dl (10,0) [21A] 3,96 dl (10,0) [21B]	70,0	3,40 d (11,5) 3,95 d (11,5)	70,1
22	1,45-1,70 m [22A] 1,95-2,10 m [22B]	36,3	-	36,4
23	3,79-3,90 m	64,4	4,05 m	64,6
24	2,88 d (9,1)	86,5	2,90 d (9,0)	86,4
25	-	74,2	-	74,1
26	1,25 s	24,0	1,30	23,9
27	1,29 s	28,5	1,30	28,4

^{*} ^1H : 200 MHz, ^{13}C : 50 MHz [#] ^1H : 60 MHz, ^{13}C : 22,6 MHz

Uma vez que a estereoquímica da cadeia lateral de **68** foi definida como 20S, 23R, 24R ⁶⁸, sendo, portanto, este protolimonóide derivado do esqueleto Δ^7 -tirucaleno, a conformação estabelecida para esta cadeia lateral, de acordo com esta informação e com os dados espectrais apresentados, é a representada por **85**, abaixo.

Com relação a **A.1**, o valor de 9,1 Hz apresentado pela constante de acoplamento do dublete a 2,88 δ , referente a H-24, sugeriu uma relação *trans*-diaxial deste próton com H-23. Já a multiplicidade para os dois sinais a 3,42 e 3,96 δ , relativos aos dois prótons em C-21 (dublete largo, $J = 10$ Hz) apontou para um posicionamento equatorial de H-20.

No caso de **A.1** ser derivado do apotirucalol (H-20 α), estes dados indicariam a conformação **85** (a mesma apresentada pela cadeia lateral da bourjotinolona A) como sendo a mais provável para a cadeia lateral. Por outro lado, se esta substância for originada a partir do esqueleto tipo apoeufol (H-20 β), a conformação **86** também acomodaria os dados espectrais apresentados por **A.1**.

No entanto, a informação de que os protolimonóides isolados do gênero *Trichilia* possuem esqueletos derivados de Δ^7 -tirucaleno sugeriu a configuração mostrada abaixo para C-20 de **A.1**, onde a cadeia lateral em C-17 teria a conformação **85**.

A.1

Desta maneira, a estrutura do protolimonóide **A.1**, até então inédita ⁶⁹, foi determinada como (Rel) metil-1 ξ ,7R-diacetoxi-23R,25-diidroxí-20S,24R-21,24-epoxi-3,4-*seco*-apotirucala-4(28),14(15)-dieno-3-oato.

No espectro de massas de **A.1**, obtido a 70 eV (espectro **8**, vol. **2**), foi observado o íon molecular a m/z 618 (0,5%), compatível com a estrutura proposta, assim como íons a m/z 600 (2,5%) e 582 (1,9%), relativos a, respectivamente, $[M-H_2O]^+$ e $[M-2 H_2O]^+$.

3.2 Determinação estrutural do protolimonóide A.2

Da mesma fração que originou o protolimonóide **A.1** (**Parte Experimental; item 6.2**), foi também obtida outra substância oleosa, a qual foi designada por **A.2**.

A comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de **A.1** com os de **A.2** indicou que suas estruturas eram bastante semelhantes, conforme atestaram os sinais característicos dos anéis A - D de **A.1** presentes também nos espectros de **A.2** [espectros 9-12 (vol. 2); Tabela 7], bem como os acoplamentos evidenciados no espectro COSY ^1H - ^1H (espectro 13, vol. 2). A diferença entre estes protolimonóides residia, portanto, na cadeia lateral ligada a C-17.

Com relação à natureza deste substituinte, verificou-se que tratava-se também de uma cadeia de oito carbonos relacionada estruturalmente com a descrita para **A.1**, conforme mostram os dados apresentados a seguir.

O espectro de RMN ^1H de **A.2** apresentou o mesmo sinal múltiplo atribuído a H-23 de **A.1**, na região de 3,68-3,81 δ , cujo acoplamento com H-24 foi observado no espectro COSY ^1H - ^1H . Este próton, por sua vez, mostrou-se desprotegido com relação a H-24 de **A.1**, tendo sido observado a 3,42 δ (d, $J = 9,2$ Hz). Finalmente, foi observado no espectro de **A.2** um sinal duplo largo a 3,56 δ ($J = 10$ Hz), o qual foi atribuído aos dois prótons em C-21, cujo acoplamento geminal foi mostrado pelo espectro COSY ^1H - ^1H .

Ao se comparar os espectros de RMN ^{13}C de **A.1** e **A.2**, observou-se uma correspondência com relação aos valores de deslocamento

químico e o número de prótons ligados aos carbonos da cadeia lateral destas duas substâncias. Com base nestas informações e, utilizando-se os protolimonóides presentes na **Figura 2** como modelos, verificou-se que os dados espectrais de **A.2** mostraram-se compatíveis com a alteração do anel de seis membros de **A.1** (21,24-epoxi) para um anel de sete membros (21,25-epoxi) [87].

87

A cadeia lateral proposta para **A.2** mostrou-se idêntica à de dois protolimonóides obtidos de *Trichilia*, hispidona⁶⁰ (**69**) e sapelina B⁶² (**78**) [**Figura 2**]. Na **Tabela 6** podem ser comparados os dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C relativos a esta cadeia lateral em **A.2** e **69**.

Tabela 6- Comparação entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C de alguns dos prótons e dos carbonos relativos à cadeia lateral em C-17 de **A.2** e do modelo **69**^{60,70} (CDCl_3).

C/H	A.2 ^a		69 ^b	
	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	δ_{C}	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	δ_{C}
20	-	36,4	-	38,6
21	3,56 dl (10,0)	64,2	3,50 dl (10 Hz)	64,4
22	-	37,9	-	37,5
23	3,68-3,81 m	68,0	3,30-3,90 m	68,7
24	3,42 d (9,2)	80,7	3,30-3,90 m	80,8
25	-	76,1	-	76,2
26	1,25 s	22,4	1,15	22,4
27	1,30 s	26,1	1,30	26,3

^a ^1H : 200 MHz, ^{13}C : 50 MHz ^b ^1H : 60 MHz, ^{13}C : 22,6 MHz

Assim sendo, definiu-se a estrutura do protolimonóide **A.2** como a representada a seguir, cujo espectro de massas a 70 eV, pouco informativo, mostrou íons a m/z 600 (0,2%) e 582 (0,4%), indicativos de $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ e $[\text{M}-2 \text{H}_2\text{O}]^+$, respectivamente (**espectro 14, vol. 2**).

A.2

A estereoquímica relativa proposta para **A.2** foi baseada nos mesmos argumentos apresentados para **A.1** (item 3.1) e considerando-se que a configuração absoluta da sapelina B é conhecida ⁷¹.

Dessa forma, caracterizou-se o protolimonóide **A.2** como (Rel) metil-1ξ,7R- diacetoxi- 23R, 24S- diidroxí- 20S- 21,25 -epoxi- 3,4-*seco*-apotirucala-4(28),14(15)-dieno-3-oato, o qual está sendo descrito pela primeira vez ⁶⁹.

Tabela 7 - Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) dos protolimonóides **A.1** e **A.2** (CDCl_3).

δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]			δ_{C}		
H	A.1	A.2	C	A.1	A.2
1	5,47 dl (9,8)	5,48 dl (10,0)	1	76,6	76,6
2A	2,36-2,48 m	2,36-2,49 m	2	35,3	35,3
2B	2,79 dl (13,7)	2,80 dl (12,9)	3	171,8	171,8
5	2,06-2,28 m	2,10-2,22 m	4	144,8	144,8
6	1,45-1,70 m	1,42-1,77 m	5	34,6	34,4
7	5,12 sl	5,14 sl	6	35,0	34,9
9	2,36-2,48 m	2,36-2,49 m	7	74,8	74,6
15	5,30 d (2,8)	5,29 d (2,9)	8	42,3	42,3
16	2,06-2,28 m	2,10-2,22 m	9	44,1	44,1
17	1,95-2,10 m *	1,85-2,01 m *	10	44,0	44,0
18	0,95 s	0,97 s	11	18,5	18,5
19	0,92 s	0,94 s	12	29,2	29,0
21A	3,42 dl (10,0)	3,56 dl (10,0)	13	46,0	45,9
		H ₂ -21	14	159,1	159,3
21B	3,96 dl (10,0)	-	15	119,4	118,9
22A	1,45-1,70 m	1,42-1,77 m	16	34,8	34,2
22B	1,95-2,10 m *	1,85-2,01 m *	17	52,4	54,2
23	3,79-3,90 m	3,68-3,81 m	18	20,2	19,9
24	2,88 d (9,1)	3,42 d (9,2)	19	15,0	15,0
26	1,25 s	1,25 s	20	35,9	36,4
27	1,29 s	1,30 s	21	70,0	64,2
28A	4,82 sl	4,84 sl	22	36,3	37,9
28B	5,00 sl	5,01 sl	23	64,4	68,0
29	1,76 sl	1,77 sl	24	86,5	80,7
30	1,16 s	1,15 s	25	74,2	76,1
OAc	1,95 s	1,96 s	26	24,0	22,4
	1,99 s	2,01 s	27	28,5	26,1
OMe	3,63 s	3,65 s	28	116,3	116,3
			29	22,7	22,7
			30	26,7	26,7
			OAc	169,9	170,0
				170,2	170,3
				20,9	20,9
				21,3	21,3
			OMe	52,0	52,0

* parcialmente encoberto pelos sinais dos grupos OAc

3.3 Determinação estrutural do limonóide B.1

Das frações 28-6 a 28-8 (**Parte Experimental, item 6.3**), 29-6 e 29-7 (**Parte Experimental, item 6.4**) foi isolado um sólido amorfo, designado por **B.1**.

O espectro de RMN ^1H em CDCl_3 desta substância [**espectro 15 (vol. 2); Tabela 8**] apresentou seis singletos a 1,13; 1,19; 1,32; 1,34 e 1,43 δ , referentes a metilas e um a 2,11 δ , atribuível aos prótons de um grupamento acetoxílico. Também foram observados neste espectro: um par de dubletos a 5,87 e 6,44 δ ($J = 12,2$ Hz) relativos a prótons de uma ligação dupla conjugada à carbonila; um sinal largo a 7,31 δ , atribuível a um próton olefínico desprotegido; três singletos largos a 4,47; 5,51 e 6,21 δ e um singlete a 3,48 δ .

No espectro de RMN ^{13}C - PND [**espectro 16 (vol. 2); Tabela 8**] foram observados sinais para vinte e oito carbonos, dois dos quais indicando a presença de um acetato (21,1 e 169,9 δ), já sugerida no espectro de RMN ^1H . Dos vinte e seis sinais restantes naquele espectro, os observados a 167,1; 167,4 e 169,6 δ foram indicativos da existência de três outras carbonilas de éster na estrutura de **B.1** (IV: $\nu_{\text{máx.}}$ 1747 e 1697 cm^{-1}), enquanto que a presença de quatro carbonos olefínicos foi revelada pelos sinais a 120,5; 133,3; 150,8 e 155,2 δ . Com o auxílio do espectro DEPT 135° (**espectro 17, vol. 2**), os sinais remanescentes foram atribuídos a cinco carbonos metílicos, três metilênicos, seis metínicos e a outros cinco carbonos quaternários.

Os dados apresentados, aliados às informações sobre a composição química da família Meliaceae e em particular, do gênero *Trichilia*, sugeriram um esqueleto tetranortriterpênico para **B.1**.

No entanto, os sinais característicos para o anel furânico em C-17, típico dos limonóides de Meliaceae, mostraram-se ausentes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C de **B.1** §. Em lugar destes, foram observados, no primeiro espectro, dois singletos largos a 6,21 e 7,31 δ , com integração para um próton cada, cujo acoplamento foi evidenciado através do espectro COSY ^1H - ^1H (espectro 18, vol. 2). Estas informações, juntamente com os dados obtidos do espectro de RMN ^{13}C , são coerentes com a presença na estrutura de **B.1** de um grupamento 23-hidroxi-20(22)-en- γ -lactônico (**88**) em C-17.

88

Desta forma, os sinais largos a 6,21 e 7,31 δ corresponderiam, respectivamente, aos prótons hemiacetálico (H-23) e olefínico (H-22) deste grupo, onde o carbono hemiacetálico correspondente apareceu como um sinal alargado a 97,7 δ . Os carbonos olefínicos C-20 e C-22 foram caracterizados, respectivamente, pelos sinais a 133,3 e 150,8 δ , tendo sido

§ No espectro de RMN ^1H , H-21 e H-23 de limonóides com anel furânico em C-17 apresentam, de um modo geral, valores de deslocamento químico na faixa de 7,30-7,50 δ , enquanto que os de H-22 são observados na região de 6,25-6,45 δ ⁷². Com relação ao espectro de RMN ^{13}C , observam-se sinais a, aproximadamente, 110 (C-22), 120 (C-20) e 140 δ (C-21 e C-23) ⁵².

observada uma correlação entre este último e o singlete largo a 7,31 δ no espectro COSY ^1H - ^{13}C (**espectro 19, vol. 2**). Ao carbono da carbonila γ lactônica α,β -insaturada foi atribuído o sinal a 169,6 δ .

A baixa intensidade, com relação aos demais, do sinal referente ao carbono hemiacetalico, bem como seu aspecto alargado no espectro de RMN ^{13}C , deve-se ao equilíbrio existente entre as duas formas epiméricas em C-23 do grupamento γ -hidroxibutenolídeo. Esse efeito pôde ser também observado, embora com menor intensidade, em C-20 e C-22.

A ocorrência de limonóides possuindo em C-17 cadeias laterais com o grupamento em questão já havia sido relatada em alguns gêneros da família Meliaceae⁷³⁻⁷⁸, incluindo *Trichilia*³⁹.

No espectro COSY ^1H - ^1H , H-22 e H-23 apresentaram acoplamentos adicionais com o próton correspondente ao singlete largo a 5,51 δ , conseqüentemente atribuído a H-17. A proposta estrutural para a cadeia lateral em C-17 foi corroborada pelos dados evidenciados no espectro resultante de um experimento HMBC: foram observadas correlações entre H-17/C-20, H-17/C-22 e H-17/C-21 [**espectro 21 (vol. 2)**; **Tabela 9**], sendo que esta última possibilitou a atribuição inequívoca de C-21 como 169,6 δ .

Por sua vez, o valor do deslocamento químico apresentado por H-17, assim como a multiplicidade do sinal correspondente a este próton, mostraram-se coerentes com a presença de uma δ -lactona no anel D de **B.1**⁷². O singlete com integração para um próton, observado a 3,48 δ e apresentando correlação com o sinal a 56,3 δ no espectro COSY ^1H - ^{13}C , assim como o sinal relativo a um carbono tetrassubstituído a 69,6 δ no

espectro de RMN ^{13}C , foram sugestivos da presença de um epóxido em C-14 e C-15 daquele anel ⁷² (**89**).

A confirmação da estrutura proposta para o anel D deu-se com as correlações H-C entre H-17 (5,51 δ) e C-14 (69,6 δ) e entre H-15 (3,48 δ) e C-16 (167,1 δ), constatadas no espectro HMBC (**espectros 22 e 23, vol. 2**).

A presença de uma ligação dupla conjugada a uma carbonila já havia sido evidenciada no espectro de RMN ^1H , pelo par de dubletos a 6,44 e 5,87 δ ($J = 12,2$ Hz). Considerando-se que foi observado, no espectro de RMN ^{13}C , um sinal relativo a carbono carbonílico a 167,4 δ e levando-se também em conta a presença de duas metilas desprotegidas no espectro de RMN ^1H (1,34 e 1,43 δ), pôde-se propor a existência de um anel A ϵ -lactônico α,β insaturado na estrutura do limonóide **B.1** (**90**). Esta hipótese foi reforçada pelas correlações observadas no espectro HMBC entre H-1/C-3 e H-2/C-3 (**espectro 21, vol. 2**). O sinal observado a 84,8 δ no espectro de RMN ^{13}C seria atribuível, portanto, ao carbono quaternário, oxigenado, presente na posição 4 deste anel.

90

O espectro de RMN ^{13}C da projeção F1, do experimento HMBC de **B.1**, mostrou uma sobreposição dos sinais referentes a C-3 e C-16 (espectros 21 e 23, vol. 2). Entretanto, no espectro de RMN ^{13}C unidimensional (espectro 16, vol. 2), duas carbonilas foram observadas a 167,1 e 167,4 δ . A atribuição inequívoca do primeiro valor a C-16 e a do segundo a C-3 foi possível por comparação com os espectros de HMBC das substâncias **C.2** (item 3.5.1) e **G.1** (item 3.8.1).

Através da análise dos sinais restantes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e, considerando-se os tipos de esqueletos apresentados por limonóides da família Meliaceae, notadamente os de *Trichilia*, chegou-se à conclusão que o esqueleto de **B.1** deveria ser o mesmo dos limonóides pertencentes ao grupo do obacunol (Grupo D - Figura 1).

O sinal largo a 4,47 δ , observado no espectro de RMN ^1H foi atribuído ao próton equatorial ligado ao carbono que sustenta o acetato. No espectro COSY ^1H - ^{13}C foi evidenciada a conectividade entre este próton e o carbono a 72,8 δ , reforçando a hipótese formulada. A localização daquele grupo no anel B, em C-7, seria compatível com a multiplicidade do sinal relativo a H-7 no espectro de RMN ^1H , assim como com as propostas biogênicas descritas para os esqueletos carbocíclicos dos limonóides ³⁻⁶. A confirmação da localização do grupamento acetoxílico no anel B e,

conseqüentemente, em C-7, deu-se em função do efeito NOE significativo entre H-15 e o próton atribuído a H-7, demonstrado através de um experimento NOESY (**espectro 29, vol. 2**).

Desta forma, foi proposta a estrutura representada abaixo para o limonóide **B.1**.

As atribuições efetuadas para H-5, C-5, H-6 e C-6 foram confirmadas com base nas correlações observadas nos espectros COSY ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C e pelos picos cruzados entre H-5/C-4 e H-5/C-29 no espectro HMBC (**espectros 24 e 25, vol. 2**).

Tentativas de obtenção de um espectro de massas de baixa resolução de **B.1**, via inserção direta a 70 e 30 eV, ou mesmo através de ionização química, não forneceram resultados satisfatórios. Sendo assim, foi empregada a técnica de ionização por “electrospray” em íons positivos e negativos (ESIMS), tendo fornecido melhor resultado o espectro contendo os íons negativos (**espectro 31, vol. 2**). Desta forma, o pico base observado neste espectro a m/z 529 foi atribuído ao íon pseudo-molecular $[\text{M-H}]^-$.

($C_{28}H_{34}O_{10}$ requer m/z 530), estando, portanto, em conformidade com a estrutura proposta.

A estrutura deste limonóide mostrou-se bastante semelhante à proposta para o acetato de 7α -obacunila⁷⁹, o qual difere de **B.1** por possuir em C-17 um anel furânico (**91**).

91 - acetato de 7α -obacunila

Os valores de deslocamento químico para os prótons e carbonos presentes nos anéis A - D de **B.1** foram comparáveis aos relatados para aquele limonóide⁷⁹. No entanto, no caso de **91**, não foi feita uma atribuição de deslocamentos químicos para os grupamentos metílicos.

Desta forma, através da inspeção do espectro COSY 1H - 1H de **B.1**, pôde-se verificar uma correlação entre H-17 e a metila representada pelo singlete a 1,19 δ , caracterizando-a, portanto, como a metila 18. Pela análise subsequente do espectro COSY 1H - ^{13}C (**espectro 20, vol. 2**) atribuiu-se o valor de 17,3 δ para C-18, corroborado pela correlação à longa distância com H-17, observada no espectro HMBC (**espectro 26, vol. 2**).

A atribuição dos valores de deslocamento químico para a metila 30, como sendo 1,13 δ (H) e 18,3 δ (C), mostrou-se compatível com os

dados espectrais descritos para este mesmo grupamento na estrutura da gedunina (δ H = 1,12 ; δ C = 18,3) [30]⁸⁰. A correlação presente no espectro de HMBC de **B.1** entre C-30 e H-9 (**espectro 25, vol. 2**) reforçou essa proposta, bem como a correlação espacial entre H-7 β e H-30, revelada pelo espectro resultante do experimento NOESY (**espectros 28 e 29, vol. 2**).

30 - gedunina

A escolha da gedunina como modelo para a atribuição da metila 30 foi pautada na grande semelhança entre os ambientes químicos deste grupamento nos limonóides **B.1** e **30**, como também pelo fato da estrutura da gedunina ter sido caracterizada com segurança, através de um conjunto de experimentos (COSY ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C , COLOC e NOEdif.)⁸⁰.

A atribuição dos valores de 1,34 e 1,43 δ , respectivamente, para as metilas 28 e 29 pôde ser confirmada através do experimento NOESY. O espectro resultante (**espectros 28 e 30, vol. 2**) evidenciou uma correlação espacial entre os prótons correspondentes ao singlete a 1,34 δ e H-5, representado, juntamente com H-9, pelo multiplete na faixa de 2,38-2,46 δ . Conseqüentemente, uma vez que H-5 possui orientação α , essa interação

com os prótons da metila indica que ambos estão localizados no mesmo lado da molécula, estabelecendo, portanto, que o singlete a 1,34 δ refere-se à metila 28 e, não, à 29. Através da correlação observada no espectro COSY ^1H - ^{13}C entre os prótons daquela metila e o carbono representado pelo sinal a 32,0 δ , definiu-se a atribuição para C-28. Desta forma, para a metila 29 foram atribuídos os valores de 1,43 δ (H) e 26,3 δ (C). Finalmente, os valores de deslocamento químico 1,32 δ (H) e 16,3 δ (C) foram atribuídos para a metila 19.

A configuração relativa proposta para o esqueleto carbônico de **B.1** foi baseada em dados biogenéticos, tendo em vista que considera-se os esqueletos tipo *apo-tirucalol* (**82**) ou *apo-eufol* (**83**) como os precursores dos limonóides de Meliaceae³⁻⁶ e também pela coerência do conjunto de dados espectrais apresentados, notadamente os resultados obtidos do experimento NOESY (**Tabela 9**).

Com o objetivo de se verificar eventuais alterações no multipletto observado na região de 2,38-2,46 δ , resultante da sobreposição dos sinais relativos a H-5 e H-9, foi registrado o espectro de RMN ^1H de **B.1** em acetona- d_6 [espectros **32 e 33 (vol. 2)**; **Tabela 8**]. Através deste artifício, foram observados naquela região dois grupos de sinais: um duplo dubleto a 2,49 δ ($J = 13,3$ e $3,7$ Hz) e um multipletto na faixa de 2,53-2,60 δ . A atribuição do primeiro sinal a H-5 e a do segundo a H-9 foi feita com base no espectro COSY ^1H - ^{13}C , onde C-5 (49,2 δ) apresentou uma correlação com o próton mais protegido e C-9 (41,2 δ) com o mais desprotegido (espectros **37 e 38, vol. 2**).

A atribuição feita anteriormente para um dos hidrogênios em C-11 ($H-11\alpha$) no espectro de RMN 1H em $CDCl_3$ (**Tabela 8**) pôde ser confirmada através do espectro COSY $^1H-^1H$ obtido em acetona- d_6 (**espectro 36, vol. 2**). Neste espectro, foi possível observar o acoplamento entre H-9 (2,53-2,60 δ) e $H-11\alpha$ (1,46-1,58 δ). Este espectro também mostra a correlação da metila a 1,32 δ com H-17, caracterizando-a, portanto, como a metila 18. A maior desproteção sofrida por esta metila com relação às demais, quando comparados os valores correspondentes obtidos no espectro em $CDCl_3$, é coerente, uma vez que a metila 18, por estar mais próxima da hidroxila em C-23, sofreria maior influência do efeito causado pela acetona.

Os dados espectrais de RMN ^{13}C obtidos em acetona- d_6 para o limonóide **B.1** (**espectros 34 e 35, vol. 2**) são apresentados na **Tabela 8**.

Este limonóide, cuja estrutura é inédita ⁸¹, foi caracterizado, portanto, como 7-desoxo-7 α -acetoxikihadanina B (nome baseado na estrutura do limonóide **F.1**, descrito no **item 3.7.2**).

Tabela 8 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do limonóide B.1

C/H	CDCl_3 [#]		Acetona- d_6 [†]	
	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	δ_{C}	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	δ_{C}
1	6,44 d (12,2)	155,2	6,68 d (12,0)	156,8
2	5,87 d (12,2)	120,5	5,78 d (12,0)	121,0
3	-	167,4	-	166,5
4	-	84,7	-	83,8
5	2,38-2,46 m	49,0	2,49 dd (13,3; 3,7)	49,2
6	1,75-2,01 m [H ₂ -6]	26,6*	1,87 dt (15,0; 3,7) [6eq.] 1,89-2,07 m [6ax.]	26,7
7	4,47 sl	72,8	4,55 dd (3,6; 2,1)	72,7
8	-	44,1	-	43,7
9	2,38-2,46 m	41,3	2,53-2,60 m	41,2
10	-	42,1	-	42,0
11	1,34-1,43 m [11 α] 1,75-2,01 m [11 β]	16,2	1,46-1,58 m [11 α] 1,89-2,07 m [11 β]	15,9
12	1,75-2,01 m [H ₂ -12]	25,4*	1,89-2,07 m [H ₂ -12]	25,6
13	-	39,2	-	39,0
14	-	69,6	-	69,6
15	3,48 s	56,3	3,52 s	56,1
16	-	167,1	-	166,4
17	5,51 sl	76,1	5,43 sl	75,9
18	1,19 s	17,3	1,32 s*	17,2
19	1,32 s	16,3	1,36 s	15,5
20	-	133,3	-	132,7
21	-	169,6	-	169,5
22	7,31 sl	150,8	7,44 d (1,1)	151,3
23	6,21 sl	97,7	6,29 sl	98,2
28	1,34 s	32,0	1,33 s*	31,5
29	1,43 s	26,3	1,41 s	26,2
30	1,13 s	18,3	1,19 s	17,5
OAc	2,11 s	169,9 21,1	2,07 s	169,5 20,3

[#] ^1H : 200 MHz, ^{13}C : 50 MHz[†] ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz

* valores na mesma coluna que podem estar trocados.

Tabela 9 - Correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY do limonóide **B.1** (CDCl₃).

H	δ_H [m]	δ_C	HMBC [#]	NOESY [‡]
1	6,44 [d]	155,2	C-3	H-11 α , H-11 β , H-9
2	5,87 [d]	120,5	C-3	-
5 α	2,38-2,46 [m]	49,0	C-4, C-29	H-28
6 α	1,75-2,01 [m]	26,6	-	H-28
6 β	1,75-2,01 [m]			H-30, H-29
7 β	4,47 [sl]	72,8	-	H-15, H-30
9 α	2,38-2,46 [m]	41,3	C-8, C-10, C-11, C-30	H-18
11 α	1,34-1,43 [m]	16,2	-	H-1
11 β	1,75-2,01 [m]			H-1
15	3,48 [s]	56,3	C-16	H-7
17	5,51 [sl]	76,1	C-14, C-18, C-20 C-21, C-22	-
18	1,19 [s]	17,3	-	H-9, H-12 α , -OAc, H-22
22	7,31 [sl]	150,8	-	H-18
28	1,34 [s]	32,0	-	H-5, H-6 α
29	1,43 [s]	26,3	-	H-6 β
30	1,13 [s]	18,3	-	H-6 β , H-7

[#] 400 MHz

[‡] 300 MHz

3.4 Determinação estrutural dos limonóides B.2 e B.2a

3.4.1 Limonóide B.2

Das frações 28-6 a 28-8 (**Parte Experimental, item 6.3**), 29-6 e 29-7 e de 29-8, após acetilação (**Parte Experimental, item 6.4**) foi isolado um material cristalino, designado por **B.2**.

Os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de **B.2** [espectros 39-41 (vol.2); Tabela 10], quando comparados com os da substância **B.1** (item 3.3), revelaram que ambas possuíam anéis A, B, C e D idênticos, diferindo apenas na natureza da cadeia lateral em C-17.

A proposta de que em C-17 de **B.2** havia um γ -hidroxibutenolídeo isomérico com relação ao existente na estrutura de **B.1** foi baseada na presença de dois sinais largos a 6,08 e 6,25 δ , relativos a um próton cada, no espectro de RMN ^1H da primeira. Estes sinais mostraram-se compatíveis com H-21 e H-22, respectivamente, de um resíduo 21-hidroxi-20(22)en- γ -lactônico (**92**).

92

Esta proposta pôde ser confirmada ao serem observados, nos espectros de RMN ^{13}C (PND e DEPT 135 $^\circ$), quatro sinais a 98,9 (CH),

163,3 (C), 122,9 (CH) e 169,1 (C) δ , os quais corresponderiam, respectivamente, a C-21, C-20, C-22 e C-23 do grupamento em questão. Por sua vez, as conectividades entre H-21/C-21 e entre H-22/C-22 foram estabelecidas através das correlações observadas no espectro HMQC (espectros 42 e 43, vol. 2). Da mesma maneira que o observado para o limonóide **B.1**, o equilíbrio entre as duas formas epiméricas em C-21 de **B.2** traduz-se pelo alargamento dos sinais correspondentes a H-21 e H-22, bem como dos relativos aos carbonos deste grupamento, nos espectros de RMN correspondentes.

As demais correlações observadas no espectro HMQC, bem como as presentes no espectro COSY ^1H - ^1H (espectro 44, vol. 2) contribuíram para que se estabelecesse a estrutura de **B.2** como a representada abaixo.

B.2

As atribuições dos valores de deslocamento químico para os prótons e carbonos dos grupos metílicos presentes em **B.2** foram efetuadas por comparação com os valores apresentados pelas metilas correspondentes

no composto **B.1**, bem como através das correlações existentes no espectro HMQC (**espectro 42, vol. 2**). O valor atribuído para os prótons da metila 18 pôde também ser confirmado pelo pico cruzado observado no espectro COSY ^1H - ^1H , relativo ao acoplamento alílico com H-17.

O espectro de massas ESI de **B.2** (**espectro 45, vol. 2**) apresentou um íon pseudo-molecular a m/z 529 (M-H) $^-$, de acordo, portanto, com a estrutura proposta.

A comprovação definitiva da estrutura e da configuração relativa propostas com base em dados espectrais para o limonóide **B.2** veio com os resultados obtidos da análise por difração de raios-X desta substância, os quais definiram sua estrutura como a representada a seguir pelo diagrama ORTEP (**93**).

Esta substância, caracterizada como 7-desoxo-7 α -acetoxikihadanina A, está sendo descrita pela primeira vez⁸¹.

3.4.2 Limonóide B.2a

Da fração 29-8, após acetilação, foi isolado um sólido amorfo, designado por **B.2a** (**Parte Experimental, item 6.4**).

Apesar de ter sido obtido em pequena quantidade (0,9 mg), os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **B.2a** permitiram que se estabelecesse sua estrutura, conforme demonstram as informações apresentadas a seguir.

Ao serem comparados os espectros de RMN ^1H de **B.2** e **B.2a** [espectros 39 e 46 (vol. 2); Tabela 10], notou-se que os mesmos sinais relativos aos prótons do esqueleto carbocíclico de **B.2**, assim como os de H-21 e H-22 da cadeia lateral em C-17, estavam presentes no espectro de **B.2a**. No entanto, observou-se um deslocamento do sinal referente a H-21 de **B.2** (6,08 δ) para 6,92 δ , no espectro de **B.2a**. Foram também observados neste espectro dois singletos a 2,10 e 2,20 δ , indicativos da presença de dois acetatos na estrutura deste limonóide, ao invés de apenas um, como em **B.2**. Estas informações sugeriram que **B.2a** tratava-se do derivado acetilado em C-21 de **B.2**.

No espectro de RMN ^{13}C [espectros 47 e 48 (vol. 2); Tabela 10], a presença de sinais relativos a dois grupamentos acetoxílicos, bem como as alterações ocorridas com os valores de deslocamento químico dos carbonos da cadeia lateral, notadamente C-21, mostraram-se coerentes com a proposta apresentada.

Sendo assim, a estrutura deste limonóide, até então inédita, foi definida como **B.2a**, representada a seguir.

A configuração sugerida para C-21 (grupo -OAc α) foi baseada nos dados espectrais apresentados pelos limonóides **C.2a** e **C.2b**, cuja determinação estrutural é discutida no item 3.5.2.

O constituinte genuíno das sementes de *Trichilia elegans* ssp. *elegans* trata-se, na verdade, do limonóide **D.2**, uma vez que, conforme já mencionado, **B.2a** foi obtido da fração 29-8 após acetilação da mesma. É importante ressaltar que esta fração, originalmente, não continha substâncias acetiladas, conforme demonstrado pelo seu espectro de RMN ^1H (**Parte Experimental**, item 6.4).

B.2a

D.2

Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do limonóide **B.2** e de seu derivado acetilado **B.2a**.

C/H	B.2[#]		B.2a[†]	
	δ_{H} [m, J (Hz)]	δ_{C}	δ_{H} [m, J (Hz)]	δ_{C}
1	6,47 d (12,1)	155,4	6,43 d (12,1)	155,0
2	5,92 d (12,1)	121,1	5,92 d (12,1)	121,4
3	-	166,9	-	167,1
4	-	84,2	-	84,5
5	2,37-2,45 m	48,9	2,38-2,45 m	49,2
6	1,69-1,96 m	26,7*	1,65-1,98 m	26,9*
7	4,52 sl	72,6	4,51 sl	72,9
8	-	43,4	-	43,9
9	2,37-2,45 m	41,0	2,38-2,45 m	41,3
10	-	41,9	-	42,3
11	1,69-1,96 m	16,2	1,65-1,98 m	16,5
12	1,69-1,96 m	25,9*	1,65-1,98 m	26,3*
13	-	38,7	-	39,4
14	-	69,2	-	69,3
15	3,50 s	55,3	3,51 s	55,8
16	-	165,8	-	165,5
17	5,50 sl	77,8	5,29 sl	77,3
18	1,32 s	18,9	1,31 s	19,0
19	1,32 s	15,8	1,28 s	16,3
20	-	163,3	-	160,6
21	6,08 sl	98,9	6,92 sl	92,9
22	6,25 sl	122,9	6,39 sl	124,5
23	-	169,1	-	167,8
28	1,35 s	31,8	1,35 s	32,2
29	1,43 s	26,3	1,42 s	26,5
30	1,11 s	17,8	1,10 s	18,3
OAc	2,11 s	169,6	2,10 s	169,9
		20,8	2,20 s	168,9
				20,8
				21,2

* valores na mesma coluna que podem estar trocados.

[#] ^1H : 200 MHz, CDCl_3 ; ^{13}C : 50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{Py-d}_5$.

[†] ^1H : 300 MHz, CDCl_3 ; ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 .

3.5 Determinação estrutural dos limonóides C.2, C.2a e C.2b

3.5.1 Limonóide C.2

O limonóide designado por **C.2** foi obtido como um sólido amorfo das frações 28-6 a 28-8 e 29-7 e de 29-8, após acetilação (**Parte Experimental, itens 6.3 e 6.4**).

O espectro de RMN ^1H de **C.2** [**espectro 49 (vol. 2); Tabela 13**], por apresentar uma feição bastante semelhante às dos espectros dos limonóides **B.1** e **B.2**, indicou que aquela substância possuía também o mesmo esqueleto carbocíclico presente nestes limonóides.

Dois singletos largos, observados naquele espectro a 6,09 e 6,23 δ , definiram a natureza da cadeia lateral em C-17 de **C.2** como sendo o mesmo γ -hidroxibutenolídeo já descrito para o limonóide **B.2**. Tais sinais caracterizaram os prótons em C-21 e C-22, respectivamente, enquanto que aos carbonos deste grupamento foram atribuídos os valores de 162,7 (C-20); 97,6 (C-21); 123,4 (C-22) e 168,9 δ (C-23), obtidos nos espectros de RMN ^{13}C (PND e DEPT 135°) [**espectros 50 e 51 (vol. 2); Tabela 14**].

A não ser por algumas variações nos valores de deslocamento químico dos sinais, o espectro de RMN ^1H de **C.2**, ao ser comparado com o de **B.2**, diferenciou-se por apresentar dois duplos dubletos a 5,13 δ ($J = 10,2$ e 4,5 Hz) e 2,32 δ ($J = 12,8$ e 4,5 Hz), com integração para um próton cada. Estes sinais substituíram, respectivamente, o singlete largo relativo a H-7 e o multiplete relativo a H-5 e H-9, presentes no espectro de **B.2**.

Assim, o duplo dubleto a 2,32 δ ($J = 12,8$ e 4,5 Hz) foi atribuído a H-5 no esqueleto de **C.2**, tendo em vista a correlação observada com o sinal

a 54,7 δ no espectro COSY ^1H - ^{13}C (**espectros 52 e 53, vol. 2**). Neste mesmo espectro, a correlação do sinal a 48,3 δ com o multiplete na região de 1,80-1,85 δ permitiu a identificação de C-9/H-9.

O duplo dubleto a 5,13 δ ($J = 10,2$ e $4,5$ Hz) foi atribuído a H-7, cuja correlação com o carbono representado pelo sinal a 75,4 δ no espectro COSY ^1H - ^{13}C indicou a presença do acetato em C-7. Os valores das constantes de acoplamento caracterizaram, respectivamente, um acoplamento do tipo axial/axial e outro axial/equatorial e portanto, definiram a orientação equatorial do substituinte acetoxílico em C-7 de **C.2**.

Desta maneira, foi proposta para este limonóide a estrutura **C.2**, abaixo representada.

As atribuições efetuadas para os valores de deslocamento químico dos prótons e carbonos na estrutura de **C.2** foram confirmadas através das informações contidas nos espectros COSY ^1H - ^1H (**espectro 54, vol. 2**),

COSY ^1H - ^{13}C e pelas correlações à longa distância presentes no espectro resultante de um experimento HMBC (**espectros 55-59, vol. 2**).

Os dados obtidos deste experimento foram especialmente úteis na definição das atribuições dos carbonos quaternários na estrutura de **C.2**, particularmente das carbonilas. Assim, os carbonos carbonílicos correspondentes aos sinais a 167,5; 165,8 e 168,9 δ foram caracterizados, respectivamente, como C-3, C-16 e C-23, em função de suas respectivas correlações com H-1, H-15 e H-22 (**espectros 55 e 56, vol. 2**). A definição do valor de 42,9 δ para C-10 (e conseqüentemente, de 44,3 δ para C-8) foi obtida pela correlação daquele carbono com H-2, enquanto que o valor de deslocamento químico de C-13 foi confirmado como 38,9 δ pela sua conectividade com H-17 (**espectro 57, vol. 2**). O espectro de HMBC possibilitou também a confirmação do valor de 21,7 δ para o carbono da metila 18, em função de seu acoplamento com H-17 (**espectro 57, vol. 2**). Estas e outras correlações à longa distância evidenciadas através do experimento HMBC podem ser vistas nos **espectros 56 a 59 (vol. 2)** e encontram-se relacionadas na **Tabela 11**.

Ao serem comparados os espectros de RMN ^{13}C de **B.2** e **C.2**, foram observadas, conforme esperadas, mudanças significativas nos valores de deslocamento químico dos carbonos dos anéis B, C e D, causadas pelo posicionamento axial (em **B.2**) ou equatorial (em **C.2**) do substituinte acetoxílico em C-7. Dentre estas, pode-se destacar a desproteção de C-7 em **C.2**, em função da localização equatorial deste substituinte e de C-5 e C-9, pela redução do efeito γ exercido pelo acetato, que em **B.2** encontra-se em posição axial. Por outro lado, em função da orientação β deste substituinte em **C.2**, ocorreu uma proteção da metila 30.

Tabela 11 - Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância observadas no espectro HMBC do limonóide **C.2** (CDCl_3 , 400 MHz).

δ_{C}	δ_{H}
167,5 (C-3)	6,55 (H-1)
75,4 (C-7)	1,70-1,80 (H-6eq.); 1,85-1,92 (H-6ax.)
42,9 (C-10)	5,94 (H-2)
38,9 (C-13)	5,39 (H-17)
165,8 (C-16)	3,68 (H-15)
21,7 (C-18)	5,39 (H-17)
97,6 (C-21)	6,23 (H-22)
123,4 (C-22)	5,39 (H-17); 6,09 (H-21)
168,9 (C-23)	6,23 (H-22)

No espectro de massas ESI (íons negativos) de **C.2** (espectro 60, vol. 2), o íon observado a m/z 529 (100%) foi atribuído a $[\text{M-H}]^-$, compatível, portanto, com a fórmula molecular proposta para este limonóide ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$).

A confirmação definitiva da estrutura de **C.2** foi conseguida através dos dados obtidos do limonóide **C.2a**, cuja determinação estrutural é discutida a seguir.

3.5.2 Limonóides **C.2a** e **C.2b**

A fração 29-8, após ter sido submetida à acetilação, forneceu um material cristalino, o qual foi designado por **C.2a** (Parte Experimental, item 6.4).

O espectro de RMN ^1H de **C.2a** [espectro 61 (vol. 2); Tabela 13] revelou que esta substância, de maneira idêntica à já relatada para os limonóides **B.2** e **B.2a**, tratava-se de um dos epímeros do derivado acetilado de **C.2** em C-21. Assim, foram evidenciados naquele espectro os mesmos sinais atribuídos aos prótons presentes na estrutura de **C.2**, a não ser pelo deslocamento sofrido pelo sinal relativo a H-21, agora observado a 6,88 δ e pela presença de um singlete adicional a 2,19 δ , atribuído à metila do grupamento acetoxílico em C-21.

Os sinais presentes no espectro de RMN ^{13}C de **C.2a** (espectros 62-65, vol. 2) mostraram-se praticamente coincidentes com os observados no espectro de **C.2** (Tabela 14), com alterações significativas apenas nos valores relativos aos carbonos 20-23, causadas pela presença do substituinte acetoxílico em C-21.

As informações fornecidas pelas correlações existentes nos espectros HMQC e COSY ^1H - ^1H de **C.2a** (espectros 66-70, vol. 2) confirmaram a proposta estrutural para o limonóide **C.2a** sem, contudo, permitirem uma definição da estereoquímica em C-21. Esta substância seria representada, portanto, pela estrutura **94**, abaixo.

94

A configuração relativa em C-21 foi, no entanto, estabelecida por meio dos dados obtidos da difração de raios-X de **C.2a** (diagrama ORTEP reproduzido em **95**), os quais definiram a estrutura deste limonóide como sendo a representada por **C.2a**.

95

C.2a

Esta substância, um dos epímeros em C-21 de **94**, até então, desconhecida, foi caracterizada, portanto, como (Rel) 21S-acetato de 7-desoxo-7 β -acetoxikihadanina A.

Um outro material sólido obtido em pequena quantidade (2,0 mg) da fração 29-8 (**Parte Experimental, item 6.4**) mostrou ser constituído predominantemente por duas substâncias, conforme demonstraram os sinais presentes em seu espectro de RMN ^1H (**espectros 71-73, vol. 2**). As informações contidas neste espectro revelaram também que tais substâncias seriam limonóides com estruturas relacionadas às anteriores.

Através da análise dos valores de deslocamento químico e das multiplicidades dos sinais relativos ao componente presente em menor proporção na mistura, verificou-se que esta substância correspondia ao limonóide **C.2a**, também obtido da fração 29-8 (**Tabelas 12 e 13**).

Tabela 12 - Dados de RMN ^1H da mistura de limonóides **C.2a** e **C.2b** (componente majoritário) [CDCl_3 , 300 MHz].

	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	
H	C.2a	C.2b
1	6,50 d (11,7)	6,52 d (11,7)
2	5,94 d (11,7)	5,95 d (11,7)
7	parcialmente encoberto pelo sinal de H-7 de C.2b	5,13 dd (10,8; 4,4)
15	3,70 s	3,69 s
17	5,22 sl	5,40 sl
18	1,33 s	1,43 s
19	1,29 s	1,31 s
21	6,88 sl	7,01 sl
22	6,38 sl	6,10 sl
28	1,45 s	1,45 s
29	1,45 s	1,45 s
30	0,98 s	0,98 s
OAc	2,14 s	2,13 s
	2,19 s	2,15 s

Os dados obtidos do espectro de RMN ^{13}C da mistura (**espectros 74-76, vol. 2**) reiteraram esta proposta, uma vez que os sinais relativos ao componente minoritário mostraram-se equivalentes aos obtidos para o limonóide **C.2a**.

Os sinais predominantes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , correspondentes aos prótons e carbonos do limonóide **C.2b**, apresentaram uma semelhança acentuada com os apresentados nos espectros de **C.2a**, conforme demonstrado nas **Tabelas 12-14**. Tais dados, ao serem

comparados, demonstraram que apenas os valores relativos aos prótons situados próximos a C-21 haviam sofrido alterações ligeiramente maiores que os demais, o mesmo tendo ocorrido com os valores de deslocamento químico relativos aos carbonos 20 a 23. Estas informações indicaram, portanto, que **C.2a** e **C.2b** seriam epiméricos em C-21 e conseqüentemente, definiram a estrutura de **C.2b** como a representada abaixo.

Através de uma comparação feita entre os valores de deslocamento químico de alguns prótons e carbonos na vizinhança de C-21 de **B.2**, **C.2** e seus respectivos derivados acetilados **B.2a**, **C.2a** e **C.2b** (Tabela 15), foi possível propor a estereoquímica relativa de C-21 para o limonóide **B.2a**.

A análise dos dados presentes nesta tabela revelou que a magnitude de proteção e/ou desproteção dos carbonos 20 a 23 e dos prótons

17 e 22 em **B.2a**, com relação a **B.2** mostrou-se similar à ocorrida com os carbonos e prótons correspondentes de **C.2a**, com relação a **C.2**.

Sendo assim, foi proposto que a substância **B.2a**, correspondente ao derivado acetilado em C-21 de **B.2**, teria a estereoquímica relativa neste centro como a representada na estrutura abaixo.

B.2a

Uma vez que **C.2a** e **C.2b** foram isolados da fração 29-8 acetilada, a qual, originalmente, não continha substâncias com grupos acetoxílicos (**item 6.4**), concluiu-se que estes limonóides resultaram da acetilação de **E.2**, em função do equilíbrio existente em solução entre as duas formas epiméricas em C-21 (**Figura 4**).

Figura 4 - Formação dos derivados acetilados C.2a e C.2b, a partir do limonóide E.2.

Tabela 13 - Dados de RMN ^1H do limonóide **C.2** e de seus derivados acetilados **C.2a** e **C.2b** (CDCl_3).

H	δ_{H} [m, J (Hz)]		
	C.2[#]	C.2a[‡]	C.2b[‡]
1	6,55 d (11,8)	6,50 d (11,7)	6,52 d (11,7)
2	5,94 d (11,8)	5,94 d (11,7)	5,95 d (11,7)
5	2,32 dd (12,8; 4,5)	2,30 dd (13,2; 4,5)	2,31 dd (13,3; 4,5)
6	1,70-1,78 dt (12,0; 4,5) 6eq.* 1,85-1,92 m 6ax.*	1,70-1,78 m 6eq. 1,80-1,91 m 6ax.	1,71-1,78 m 6eq. 1,80-1,95 m 6ax.
7	5,13 dd (10,2; 4,5)	5,12 dd (10,8; 4,5)	5,13 dd (10,8; 4,4)
9	1,80-1,85 m*	1,80-1,91 m	1,80-1,95 m
11	1,60-1,95 m*	1,80-1,91 m	1,80-1,95 m
12	1,85-2,14 m*	1,70-1,91 m	1,71-1,91 m
15	3,68 s	3,70 s	3,69 s
17	5,39 sl	5,22 sl	5,40 sl
18	1,33 s	1,33 s	1,43 s
19	1,30 s	1,29 s	1,31 s
21	6,09 sl	6,88 sl	7,01 sl
22	6,23 sl	6,38 sl	6,10 sl
28	1,45 s	1,44 s	1,45 s
29	1,45 s	1,44 s	1,45 s
30	0,99 s	0,99 s	0,98 s
OAc	2,14 s	2,14 s 2,19 s	2,13 s 2,15 s

[#] 200 MHz

[‡] 300 MHz

* valores obtidos a partir dos espectros COSY ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C e HMBC.

Tabela 14 - Dados de RMN ^{13}C do limonóide **C.2** e de seus derivados acetilados **C.2a** e **C.2b** (CDCl_3).

C	δ_{C}		
	C.2[#]	C.2a[‡]	C.2b[‡]
1	157,7	157,3	157,5
2	122,7	122,8	121,1
3	167,5	167,2	167,3
4	84,8	84,5	84,6
5	54,7	54,6	54,8
6	30,2	30,2	30,3
7	75,4	75,3	75,5
8	44,3	44,2	44,3
9	48,3	48,0	48,6
10	42,9	42,9	43,0
11	19,5	19,4	19,8
12	32,3	32,3	33,6
13	38,9	39,0	39,4
14	67,3	67,2	67,4
15	51,0	51,1	51,3
16	165,8	165,0	164,7
17	78,5	78,1	78,4
18	21,7	21,5	21,2
19	16,3	16,2	16,4
20	162,7	160,4	158,8
21	97,6	92,3	93,6
22	123,4	124,3	123,1
23	168,9	167,6	168,3
28	32,3	32,3	32,4
29	26,9	26,9	27,1
30	12,1	12,0	12,3
OAc	170,4	170,3; 21,2	170,3; 21,2
	21,2	168,6; 20,7	168,4; 20,7

[#] 50 MHz

[‡] 75 MHz

Tabela 15 - Comparação entre os valores de deslocamento químico (δ) de C-20 a C-23, H-17 e H-22 dos limonóides **B.2** e **C.2** com os de **B.2a**, **C.2a** e **C.2b**, respectivamente (CDCl_3).

C/H	B.2	B.2a	$\Delta\delta$	C.2	C.2a	$\Delta\delta$	C.2b	$\Delta\delta$
C-20	163,3	160,6	- 2,7	162,7	160,4	- 2,3	158,8	- 3,9
C-21	98,9	92,9	- 6,0	97,6	92,3	- 5,3	93,6	- 4,0
C-22	122,9	124,5	+ 1,6	123,4	124,3	+ 0,9	123,1	- 0,3
C-23	169,1	167,8	- 1,3	168,9	167,6	- 1,3	168,3	- 0,6
H-17	5,50	5,29	- 0,21	5,39	5,22	- 0,17	5,40	+ 0,01
H-22	6,25	6,39	+ 0,14	6,23	6,38	+ 0,15	6,10	- 0,13

B.2 R = α OAc R₁ = X

B.2a R = α OAc R₁ = Y

C.2 R = β OAc R₁ = X

C.2a R = β OAc R₁ = Y

C.2b R = β OAc R₁ = Z

3.6 Determinação estrutural dos limonóides C.1, C.1a e C.1b

3.6.1 Limonóide C.1

Das frações 28-6 a 28-8 (**Parte experimental, item 6.3**) e da 29-8, após acetilação (**item 6.4**), foi obtido um sólido amorfo, designado por C.1.

Os dados espectrais de RMN ^1H (**espectro 77, vol.2**) e RMN ^{13}C (**espectro 78, vol. 2**) obtidos em CDCl_3 para a substância C.1, quando comparados com os de B.1 (**Tabela 16**), sugeriram que ambas diferiam apenas na estereoquímica em C-7, da mesma forma que o ocorrido com os limonóides B.2 e C.2.

A posição equatorial de H-7 em B.1 havia sido definida pelo singlete largo a 4,47 δ , presente no seu espectro de RMN ^1H . No espectro de C.1, este sinal foi substituído por um tripleto largo a 5,05 δ ($J = 7,6 \text{ Hz}$), compatível, portanto, com uma localização axial de H-7 e conseqüentemente, uma orientação β para o substituinte acetoxílico.

Os mesmos efeitos causados pela mudança na orientação deste substituinte sobre os deslocamentos químicos dos prótons e carbonos dos anéis B, C e D de C.2, com relação aos do limonóide B.2 foram também constatados, ao serem comparados os valores de deslocamento químico presentes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C de C.1 e B.1 (**Tabela 16**).

Com base nestas informações e, ainda, nos dados obtidos dos espectros COSY ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C (**espectros 79-82, vol. 2**), foi proposta para o limonóide C.1 a estrutura representada abaixo. O íon presente no espectro

de massas ESI a m/z 529 (100 %) (**espectro 83, vol. 2**) e atribuído a $[M-H]^-$ ($C_{28}H_{33}O_{10}$) mostrou-se de acordo com a proposta estrutural apresentada.

C.1

Com relação aos dados de RMN 1H de **B.1** e **C.1**, no que diz respeito ao multipeto observado na região de 2,1 a 2,5 δ , verificou-se que, no caso de **B.1**, este sinal correspondia a H-5 e H-9. Já no espectro de **C.1**, H-9 apresentou-se mais protegido e o multipeto em questão foi atribuído a H-5 e H-12B, de acordo com os resultados obtidos de experimentos bidimensionais:

No espectro COSY 1H - ^{13}C (**espectros 81 e 82, vol. 2**), o sinal correspondente a C-9 (47,9 δ) apresentou correlação com o multipeto na faixa de 1,75-1,87 δ , caracterizando, portanto, H-9. Neste espectro, porém, não foram observadas correlações entre C-12 e os prótons correspondentes. No entanto, no espectro COSY 1H - 1H (**espectros 79 e 80, vol. 2**), a conectividade existente entre o sinal relativo a H-11 α (multipeto na região de 1,21-1,32 δ) e o multipeto a 2,19-2,35 δ permitiu identificar o outro próton referente a este sinal como sendo H-12B.

Uma vez que o emprego de acetona- d_6 para a obtenção do espectro de RMN 1H de **B.1** permitiu a separação dos sinais relativos a H-5 e H-9 (**Tabela 8**), utilizou-se este mesmo recurso para se efetuar uma atribuição inequívoca de H-12B em **C.1**, uma vez que houve sobreposição do sinal atribuído a este próton com o referente a H-5, no espectro em $CDCl_3$.

O espectro de RMN 1H de **C.1** em acetona- d_6 (**espectros 84 e 85, vol. 2**) apresentou, no entanto, vários sinais duplicados, indicando que o equilíbrio entre as duas formas epiméricas em C-23 havia se tornado mais lento neste solvente (**Tabela 17**).

Conseqüentemente, foi possível observar neste espectro o sinal relativo ao próton da hidroxila de cada epímero, como um dubleto a 6,86 δ ($J = 8,9$ Hz) e um dubleto largo a 6,99 δ ($J = 8,0$ Hz), em função dos acoplamentos com os respectivos prótons em C-23. Estes, por sua vez, se apresentaram como dois sinais distintos: um dubleto largo a 6,30 δ ($J = 8,3$ Hz) e um multipletto a 6,23-6,24 δ , ao contrário do espectro em $CDCl_3$, onde H-23 havia sido observado como um único sinal (singleto largo) a 6,21 δ (**Tabela 16**). Os acoplamentos acima mencionados foram confirmados no espectro COSY 1H - 1H (**espectro 87, vol 2**), que mostrou a correlação do dubleto largo a 6,99 δ (próton hidroxílico do epímero **C.1 "A"**) com o multipletto a 6,23-6,24 δ (H-23 do epímero **C.1 "A"**) e a do dubleto a 6,86 δ (próton hidroxílico do epímero **C.1 "B"**) com o dubleto largo a 6,30 δ (H-23 do epímero **C.1 "B"**). O acoplamento de H-23 de **C.1 "A"** e H-23 de **C.1 "B"** com H-22 também pôde ser evidenciado neste espectro.

No espectro de RMN ^{13}C [**espectros 88-91 (vol.2); Tabela 17**] também ocorreram duplicações de alguns sinais e os referentes a C-23 dos

dois epímeros foram observados a 98,3/98,7 δ . As conectividades C-23/H-23 presentes no espectro HMQC (**espectro 92, vol.2**) entre os sinais a 98,7 δ /6,30 δ e 98,3 δ /6,23-6,24 δ corroboraram as atribuições efetuadas.

De maneira análoga à ocorrida com o espectro de RMN ^1H de **B.1** em acetona- d_6 , houve, no espectro de **C.1**, a separação dos sinais relativos a H-5 e H-12B. O primeiro foi observado como um duplo dubleto a 2,50 δ ($J = 13,3$ e $4,5$ Hz), semelhante a H-5 de **B.1**, enquanto que o referente a H-12B (agora sobreposto a H-9), foi representado pelo multiplete na região de 2,04-2,12 δ . Estas informações e as demais atribuições efetuadas para os sinais presentes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram confirmadas pelas correlações evidenciadas nos espectros COSY ^1H - ^1H (**espectros 86 e 87, vol.2**) e HMQC (**espectros 92-94, vol. 2**).

3.6.2 Limonóides C.1a e C.1b

Da fração 29-8, após acetilação, foram obtidas duas substâncias como sólidos amorfos, designadas por **C.1a** e **C.1b** (**Parte experimental, item 6.4**).

A análise dos espectros de RMN ^1H de **C.1a** (**espectro 95, vol. 2**) e **C.1b** (**espectro 99, vol. 2**) revelou a ocorrência de uma situação análoga à descrita para **C.2a** e **C.2b**, com relação ao limonóide **C.2**, ou seja: os espectros das substâncias **C.1a** e **C.1b** apresentaram uma acentuada semelhança entre si, em termos de número, valores de deslocamento químico e multiplicidade dos sinais apresentados (**Tabela 18**); estes sinais, por sua vez, mostraram-se comparáveis aos presentes no espectro de RMN ^1H de **C.1** (**espectro 77**), com exceção da presença de um singlete adicional

relativo à metila de um acetato e pelo deslocamento do sinal correspondente a H-23, de 6,21 δ em **C.1** para 6,89 δ em **C.1a** e 7,02 δ em **C.1b**.

Este conjunto de dados indicou, portanto, que haviam sido isolados os dois epímeros em C-23 da substância **C.1** acetilada, representados por **C.1a** e **C.1b**, a seguir.

Os dados fornecidos pelos espectros de RMN ^{13}C de **C.1a** [espectros 96 e 97 (vol. 2); Tabela 18] e de **C.1b** [espectros 100-102 (vol. 2); Tabela 18], bem como pelo espectro COSY ^1H - ^1H de **C.1a** (espectro 98, vol. 2) mostraram-se de acordo com a hipótese formulada.

As informações contidas nos espectros supracitados não foram suficientes, no entanto, para permitir a correspondência entre os espectros e as substâncias **C.1a** e **C.1b**. O fato do carbono epimérico fazer parte de um anel γ lactônico- α,β insaturado tornou os valores dos acoplamentos de H-23 com H-22 e com H-17 muito semelhantes nos dois epímeros, impossibilitando, assim, qualquer conclusão relativa à estereoquímica relativa daquele centro. Diferentemente de **C.2a**, não foi possível a obtenção

destes limonóides sob a forma de cristais, de modo que uma análise por difração de raios-X tornou-se, também, inviável.

De maneira análoga a **C.2a** e **C.2b**, que resultaram da acetilação de **E.2**, os limonóides **C.1a** e **C.1b** originaram-se de **E.1**, a partir da acetilação das duas formas epiméricas em C-23 deste limonóide.

E.1

Tabela 16 - Dados de RMN ^1H (200 MHz) e RMN ^{13}C (50 MHz) do limonóide **C.1**, em CDCl_3 , comparados com os de **B.1**.

C/H	C.1		B.1	
	δ_{H} [m, J (Hz)]	δ_{C}	δ_{H} [m, J (Hz)]	δ_{C}
1	6,49 d (11,9)	156,7	6,44 d (12,2)	155,2
2	5,90 d (11,9)	121,9	5,87 d (12,2)	120,5
3	-	167,4	-	167,4
4	-	84,7	-	84,7
5	2,19-2,35 m	54,2	2,38-2,46 m	49,0
6	1,75-1,87 m [H ₂ -6]	29,6*	1,75-2,01 m [H ₂ -6]	26,6*
7	5,05 tl (7,6)	76,2	4,47 sl	72,8
8	-	43,8	-	44,1
9	1,75-1,87 m	47,9	2,38-2,46 m	41,3
10	-	43,4	-	42,1
11	1,21-1,32 m [11 α] 1,75-1,87 m [11 β]	18,8	1,34-1,43 m [11 α] 1,75-2,01 m [11 β]	16,2
12	1,75-1,87 m [12A] 2,19-2,35 m [12B]	29,5*	1,75-2,01 m [H ₂ -12]	25,4*
13	-	39,1	-	39,2
14	-	68,7	-	69,6
15	3,67 s	52,3	3,48 s	56,3
16	-	166,8	-	167,1
17	5,44 sl	75,7	5,51 sl	76,1
18	1,27 s	20,1	1,19 s	17,3
19	1,31 s	16,3	1,32 s	16,3
20	-	133,3	-	133,3
21	-	169,5	-	169,6
22	7,31 sl	151,3	7,31 sl	150,8
23	6,21 sl	97,5	6,21 sl	97,7
28	1,44 s	32,2	1,34 s	32,0
29	1,45 s	26,8	1,43 s	26,3
30	1,07 s	12,9	1,13 s	18,3
OAc	2,14 s	170,4 21,3	2,11 s	169,9 21,1

* valores na mesma coluna que podem estar trocados.

Tabela 17 - Dados de RMN ^1H (300 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) do limonóide **C.1**, em acetona- d_6

C/H	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	δ_{C}
1	6,68 / 6,70 d (11,9) *	158,1
2	5,79 / 5,80 d (11,9) *	122,3
3	-	167,3
4	-	84,5
5	2,50 dd (13,3; 4,5)	54,3
6	1,77-1,96 m [H ₂ -6]	30,1*
7	5,19 dd (10,8; 4,7))	76,5 / 76,6 *
8	-	44,1 / 44,5 *
9	2,04-2,12 m	48,1 / 48,2 *
10	-	44,1 / 44,5 *
11	1,39-1,53 m [11 α] 1,77-1,96 m [11 β]	19,3 / 19,4 *
12	1,77-1,96 m [12A] 2,04-2,12 m [12B]	30,4*
13	-	39,8 / 39,9 *
14	-	69,6 / 69,7 *
15	3,69 s	53,3 / 53,4 *
16	-	167,0 / 167,1 *
17	5,37 sl / 5,35 sl *	76,1 / 76,4 *
18	1,31 s / 1,32 s *	19,8 / 19,9 *
19	1,34 s / 1,35 s *	16,5 / 16,6 *
20	-	133,0
21	-	170,6
22	7,46 sl	152,8 / 153,5 *
23	6,23-6,24 m / 6,30 dl (8,3) *	98,3 / 98,7 *
28	1,37 s	32,3
29	1,43 s	27,1
30	1,09 s / 1,10 s *	13,0
OAc	2,04 s	170,6 21,2
OH	6,99 dl (8,0) / 6,86 d (8,9) *	-

* valores na mesma coluna que podem estar trocados. * sinais duplicados

Tabela 18 - Dados de RMN ^1H (200 MHz) e RMN ^{13}C (75 MHz) dos limonóides **C.1a** e **C.1b** (CDCl_3).

C/H	C.1a		C.1b	
	δ_{H} [m, J (Hz)]	δ_{C}	δ_{H} [m, J (Hz)]	δ_{C}
1	6,44 d (11,9)	157,2	6,45 d (11,8)	156,6
2	5,88 d (11,9)	122,8	5,91 d (11,8)	122,3
3	-	167,9	-	167,4
4	-	85,1	-	84,5
5	2,23-2,31 m	55,0	2,24-2,33 m	54,5
6	1,77-1,88 m [H ₂ -6]	30,2*	1,77-1,85 m [H ₂ -6]	29,8
7	5,04 tl (7,5)	76,8	5,04 tl (8,0)	76,2
8	-	44,4	-	43,9
9	1,77-1,88 m	48,6	1,77-1,85 m	48,1
10	-	44,0	-	43,4
11	1,29-1,43 m [11 α] 1,77-1,88 m [11 β]	19,5	1,26-1,44 m [11 α] 1,77-1,85 m [11 β]	19,0
12	1,77-1,88 m [12A] 2,23-2,31 m [12B]	30,3*	1,77-1,85 m [12A] 2,24-2,33 m [12B]	29,8
13	-	39,8	-	39,3
14	-	69,3	-	68,6
15	3,67 s	53,1	3,67 s	52,4
16	-	166,9	-	166,3
17	5,46 t (1,3)	76,3	5,49 sl	76,0
18	1,29 s	20,9	1,26 s	20,3
19	1,30 s	16,9	1,30 s	16,3
20	-	134,9	-	134,4
21	-	168,9	-	168,8
22	7,32 t (1,3)	149,7	7,33 d (0,9)	149,6
23	6,89 t (1,5)	92,7	7,02 sl	92,8
28	1,43 s	32,9	1,44 s	32,3
29	1,44 s	27,3	1,44 s	26,8
30	1,06 s	13,5	1,06 s	12,9
OAc	2,13 s	169,2; 21,3	2,13 s	168,8; 20,6
	2,16 s	171,1; 22,0	2,15 s	170,4; 21,4

* valores na mesma coluna que podem estar trocados.

3.7 Determinação estrutural dos limonóides F.1 e F.2

Das frações 28-6 a 28-8 (**Parte experimental, item 6.3**) e 29-7 (**item 6.4**) foram obtidas duas substâncias, sob a forma de sólidos amorfos, designadas por **F.2** e **F.1**.

3.7.1 Limonóide F.2

O espectro de RMN ^1H de **F.2** [**espectro 103 (vol. 2); Tabela 19**] apresentou o mesmo padrão já observado nos espectros de **B.2** e **C.2**, diferindo destes pelo fato de, ao invés dos sinais relativos a H-7 e à metila do grupo acetoxílico em C-7, apresentar um par de duplos dubletos a 2,63 δ (1H, $J = 14,0$ e 4,9 Hz) e 2,27 δ (1H, $J = 14,0$ e 4,9 Hz) e um tripleto a 3,01 δ (1H, $J = 14,0$ Hz). Estas informações, aliadas à observação no espectro de RMN ^{13}C de **F.2** de um sinal a 207,5 δ [**espectro 104 (vol. 2); Tabela 19**], mostraram-se coerentes com a presença de uma carbonila na posição 7 do esqueleto deste limonóide.

No espectro COSY ^1H - ^1H de **F.2** (**espectros 106 e 107, vol. 2**) verificou-se o acoplamento entre os dois prótons correspondentes ao duplo dubleto a 2,27 δ e ao tripleto a 3,01 δ . No espectro COSY ^1H - ^{13}C (**espectros 108 e 109, vol. 2**), a correlação observada entre estes prótons e o carbono representado pelo sinal a 39,4 δ indicou um acoplamento geminal, caracterizando, portanto, os dois prótons em C-6. A multiplicidade do sinal a 3,01 δ (t, $J = 14,0$ Hz) possibilitou sua atribuição a H-6 axial e conseqüentemente, o duplo dubleto a 2,27 δ ($J = 14,0$ e 4,9 Hz) a H-6 equatorial. Ambos apresentaram no espectro COSY ^1H - ^1H um acoplamento

adicional com o próton correspondente ao duplo dubleto a 2,63 δ ($J = 14,0$ e 4,9 Hz), atribuído, portanto, a H-5, cuja correlação com C-5 a 56,9 δ foi revelada pelo espectro COSY ^1H - ^{13}C .

A presença do grupo carbonílico em C-7 mostrou-se também de acordo com o efeito β exercido sobre C-6 e C-8, representados pelos sinais a 39,4 e 52,8 δ , respectivamente, quando comparados com os valores obtidos para C-6 (26,7 δ) e C-8 (43,4 δ) de **B.2**. Já a ausência do grupo acetoxílico em C-7 resultou numa desproteção (causada pela redução do efeito γ) dos carbonos 5 e 9 em **F.2**, observados agora a 56,9 e 48,7 δ , respectivamente (no limonóide **B.2**, os valores respectivos para C-5 e C-9 foram 48,9 e 41,0 δ).

Conseqüentemente, o limonóide **F.2** foi caracterizado como o derivado 7-ceto de **B.2**, cuja estrutura é representada abaixo.

No espectro de massas ESI de **F.2** (espectro 110, vol 2), um íon observado a m/z 485 (80%), quarenta e quatro unidades de massa a menos que $[\text{M}-\text{H}]^-$ de **B.2** e compatível com $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{O}_9$, reiterou a proposta estrutural apresentada.

Os dados espectrais de **F.2** que levaram à sua determinação estrutural confirmaram também sua identidade com o limonóide isolado previamente de *Phellodendron amurense* (Rutaceae) e denominado kihadanina A ⁸².

No presente trabalho ⁸¹, foi feita a atribuição dos valores de deslocamento químico obtidos nos espectros de RMN ¹H e ¹³C de **F.2** (**Tabela 19**), não efetuada anteriormente ⁸². Esta atribuição baseou-se nas informações adicionais fornecidas pelos espectros COSY ¹H-¹H e ¹H-¹³C, bem como nos dados espectrais das substâncias **B.2** e **C.2**.

3.7.2 Limonóide F.1

A análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C (PENDANT e DEPT 135°) e COSY ¹H-¹H de **F.1** [espectros 111 - 116 (vol.2); **Tabela 19**] mostrou a manutenção nesta substância do esqueleto carbocíclico presente no limonóide **F.2**, com as alterações ocorrendo apenas na cadeia lateral em C-17. Este substituinte foi prontamente identificado pelos singletos largos a 6,11 e 7,20 δ , no espectro de RMN ¹H, como sendo o γ -hidroxibutenolídeo isomérico já encontrado nos limonóides **B.1** e **C.1** (no espectro de RMN ¹³C, os carbonos C-20 a C-23 foram identificados pelos sinais a 132,5; 169,9; 152,0 e 97,6 δ , respectivamente).

Da mesma forma que **F.2**, este limonóide apresentou no espectro de massas ESI (**espectro 117, vol. 2**) um íon a m/z 485 (100%), atribuído ao íon pseudo-molecular $[M-H]^-$.

Assim, foi proposta a estrutura de **F.1** como a representada abaixo.

F.1

Esta substância possui a mesma estrutura apresentada por kihadanina B, isolada, assim como kihadanina A (F.2), de *Phellodendron amurense* ^{82,83} Estes dois limonóides também foram obtidos, porém em forma de mistura, de uma outra espécie de Rutaceae, *Citrus natsudaïdai* ⁸⁴.

Foi verificado que kihadanina A (F.2) é uma das substâncias responsáveis pela forte atividade “antifeedant” do extrato metanólico da casca de *P. amurense* com relação a cupins (*Reticulitermes speratus*), enquanto que kihadanina B (F.1) mostrou-se inativa ⁸².

Da mesma maneira que o ocorrido com o limonóide F.2, a atribuição completa dos valores de deslocamento químico obtidos nos espectros de RMN ¹H e ¹³C de F.1 (kihadanina B) não havia sido efetuada anteriormente e encontra-se relacionada na **Tabela 19**.

Tabela 19 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos limonóides **F.2** e **F.1** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$).

C/H	F.2 [#]		F.1 [‡]	
	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	δ_{C}	δ_{H} [<i>m</i> , J (Hz)]	δ_{C}
1	6,65 d (11,7)	157,3	6,47 d (11,7)	156,8
2	5,95 d (11,7)	122,1	5,87 d (11,7)	122,3
3	-	167,5	-	167,3
4	-	84,3	-	84,2
5	2,63 dd (14,0; 4,9)	56,9	2,53 dd (14,0; 4,7)	57,0
6	2,27 dd (14,0; 4,9) [6eq.] 3,01 tl (14,0) [6ax.]	39,4	2,21 ddl (13,8; 4,7) [6eq.] 2,90 tl (14,0) [6ax.]	39,7
7	-	207,5	-	207,8
8	-	52,8	-	52,8
9	2,01-2,14 m	48,7	2,21 ddl (13,8; 4,7)	49,1
10	-	42,8	-	43,2
11	1,88-1,93 m [H ₂ -11]	19,0	1,17-1,32 m [11 α] 1,74-1,84 m [11 β]	19,0
12	1,70 tl (10,4) [12ax.] 2,01-2,14 m [12eq.]	31,7	1,74-1,84 m [12ax.] 2,00-2,09 m [12eq.]	30,1
13	-	37,3	-	37,7
14	-	64,7	-	64,9
15	3,59 s	52,3	3,59 s	53,0
16	-	165,9	-	166,7
17	5,34 dl (1,4)	78,1	5,33 sl	75,4
18	1,10 s	20,8	1,04 s	20,2
19	1,48 s	16,0	1,36 s	16,3
20	-	162,7	-	132,5
21	6,14 sl	98,9	-	169,9
22	6,26 sl	122,1	7,20 sl	152,0
23	-	169,7	6,11 sl	97,6
28	1,43 s	31,5	1,41 s	31,7
29	1,49 s	26,2	1,42 s	26,4
30	1,22 s	16,2	1,17 s	16,9

[#] ^1H : 200 MHz, ^{13}C : 50 MHz

[‡] ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 50 MHz

3.8 Determinação estrutural dos limonóides G.1 e G.2

3.8.1 Limonóide G.1

Das frações 28-6, 28-7, 29-4 e 29-6 (**Parte experimental, itens 6.3 e 6.4**) foi obtido um sólido amorfo designado por **G.1**.

Uma análise preliminar do espectro de RMN ^1H de **G.1** (**espectro 118, vol. 2**) revelou que este apresenta o mesmo par de dubletos presente nos espectros dos limonóides descritos até agora (**itens 3.3 a 3.7**), relativos aos prótons olefínicos do anel A [6,71 e 6,19 δ ($J = 12,9$ Hz)], bem como dois singletos largos a 7,28 e 6,26 δ , já observados nos espectros de **B.1**, **C.1** e **F.1** e atribuídos a H- 22 e 23 do substituinte 23-hidroxi-20(22)en- γ -lactônico localizado em C-17. Foram ainda observados naquele espectro um singlete a 4,01 δ , atribuível ao próton em C-15 do grupamento epóxido (também presente nos espectros dos limonóides discutidos nos itens anteriores), um sinal referente à metila de um grupo acetoxílico, a 2,11 δ e um singlete a 3,69 δ , indicativo da presença de um grupamento metoxílico.

Dos sinais relativos a vinte e nove carbonos evidenciados no espectro de RMN ^{13}C PND (**espectro 119, vol. 2**), dois foram atribuídos ao acetato (20,7 e 170,2 δ) e um terceiro à metoxila (52,4 δ).

A presença do resíduo γ -hidroxibutenolídeo em C-17 de **G.1** foi confirmada, com auxílio do espectro DEPT 135° (**espectro 120, vol. 2**), pelos sinais observados a 132,5 (C-20); 169,5 (C-21); 150,4 (C-22) e 97,7 δ (C-23).

Desta forma, os sinais restantes no espectro de RMN ^{13}C corresponderiam aos carbonos dos anéis A-D do esqueleto carbocíclico de **G.1**.

A confirmação de que os anéis A e D presentes em **G.1** eram idênticos aos dos limonóides já apresentados nos **itens 3.3 a 3.7** foi conseguida com base nas informações fornecidas pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e reiteradas pelas correlações observadas nos espectros COSY ^1H - ^1H , HMQC e HMBC, as quais são discutidas a seguir.

O sinal relativo a H-17 foi identificado como fazendo parte de um multipletto na região de 5,39-5,45 δ , com integração para quatro prótons, através das correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^1H (**espectro 121, vol.2**) com o singletto largo referente a H-22 e no espectro HMQC (**espectros 122 e 123, vol. 2**), com o sinal a 74,5 δ , correspondente a C-17.

Através de um experimento HMBC, foram definidos os valores de deslocamento químico para os carbonos quaternários 14 e 16, em função das correlações observadas entre H-17 e C-14 (66,3 δ) [**espectro 124, vol. 2**] e entre H-15 e C-16 (165,7 δ) [**espectro 125**].

Da mesma forma, os carbonos quaternários 3 e 10 tiveram suas atribuições confirmadas como 167,7 e 46,5 δ , respectivamente, pelas correlações à longa distância evidenciadas entre H-1/C-3 (**espectro 126, vol. 2**) e H-2/C-10 (**espectro 127**).

Os sinais observados no espectro de RMN ^{13}C a 173,5 e 52,4 δ , sugestivos da presença de um grupo carbometoxílico e os a 136,6 e 124,7 δ , referentes, respectivamente, ao carbono tetrassubstituído e ao metilênico de uma ligação dupla exocíclica foram indicativos de uma alteração estrutural ocorrida nos anéis B e C. Em função deste conjunto de informações e pelo

fato do espectro de RMN ^1H de **G.1** ter apresentado sinais para quatro metilas (0,95; 1,05; 1,29 e 1,53 δ), ao invés dos cinco presentes em limonóides com anéis A - D intactos, concluiu-se que **G.1** possuía um anel B aberto, semelhante ao encontrado nos limonóides pertencentes aos grupos E e G (**Figura 1**) e representado pela estrutura parcial **96**.

96

Assim, o grupamento exometilênico evidenciado no esqueleto de **G.1** estaria localizado nas posições 8 e 30, enquanto que C-7 seria representado pela carbonila a 173,5 δ do grupo carbometoxílico. Os sinais relativos aos dois prótons em C-30, em função do valor de deslocamento químico, estariam contidos no multipeto a 5,39-5,45 δ , já mencionado. A correlação deste multipeto com o sinal a 124,7 δ (C-30) no espectro HMQC (**espectro 122, vol. 2**) confirmou a atribuição efetuada, assim como a correlação à longa distância com C-14, observada no espectro HMBC (**espectro 124, vol. 2**).

Os dois prótons em C-6 foram caracterizados pelo multipeto na região de 2,15-2,23 δ , cujo acoplamento com o próton atribuível a H-5 e correspondente ao duplo dubleto a 3,56 δ ($J = 6,4$ e $3,2$ Hz) foi demonstrado

no espectro COSY ^1H - ^1H . As correlações observadas no espectro HMQC entre os prótons relativos àquele multipletto e o carbono a 34,7 δ e entre H-5 e o carbono correspondente ao sinal a 49,5 δ permitiram a atribuição de C-6 e C-5, esta última confirmada no espectro HMBC pela correlação daquele sinal com H-1 (**espectro 127, vol. 2**).

Dos quatro prótons representados pelo multipletto a 5,39-5,45 δ , restava ser efetuada a atribuição de um. Este foi definido como o próton ligado ao carbono que sustenta o acetato (cuja presença na estrutura de **G.1** já havia sido mencionada) estando compatível com a conectividade observada no espectro HMQC entre o multipletto supracitado e o sinal a 68,7 δ .

O substituinte acetoxílico, por sua vez, poderia estar localizado em C-11 ou C-12. Em função da presença, no espectro de RMN ^1H , de um dubleto a 2,97 δ (1H, $J = 6,7$ Hz), este grupamento foi posicionado em C-11, sendo o dubleto atribuído, portanto, a H-9. A confirmação do acoplamento entre H-11 e H-9 foi dada pela conectividade existente entre os respectivos sinais no espectro COSY ^1H - ^1H .

Várias correlações observadas no espectro HMBC entre o sinal referente a H-9 e C-1, C-5, C-12, C-14, C-30 (3J), C-8, C-10 e C-11 (2J) [**espectros 128 e 129, vol. 2**] reiteraram a atribuição efetuada para este próton e uma vez que H-9 mostrou uma conectividade com o carbono a 52,7 δ no espectro HMQC (**espectro 123, vol. 2**), confirmou-se também a atribuição de C-9.

O triplete largo a 2,39 δ ($J = 13,5$ Hz) e o duplo dubleto a 1,38 δ ($J = 13,5$ e $4,7$ Hz), presentes no espectro de RMN ^1H , foram, conseqüentemente, atribuídos a H-12 axial e H-12 equatorial,

respectivamente. O primeiro apresentou correlações à longa distância com C-11, C-13 e C-17 no espectro HMBC (**espectros 129 e 130, vol. 2**), assim como com a metila correspondente ao sinal a 14,6 δ , caracterizado, portanto, como C-18.

A atribuição dos valores de deslocamento químico para a metila 19 foi definida através da correlação à longa distância, observada no espectro HMBC (**espectro 127**), entre H-1 e o carbono metílico a 22,8 δ e da conectividade do sinal referente a este carbono com o singlete a 0,95 δ , no espectro HMQC (**espectro 123**). Conseqüentemente, aos prótons e carbonos das metilas 28 e 29 foram atribuídos, respectivamente, os valores de 1,29/30,1 δ e 1,53/22,1 δ .

Desta forma, ficou estabelecida para o limonóide **G.1** a estrutura, até então inédita ⁸¹, abaixo representada.

G.1

O espectro de massas ESI de **G.1** (**espectro 131, vol. 2**) apresentou um íon pseudo-molecular $[M-H]^-$ a m/z 573, de acordo com a estrutura apresentada.

A orientação β do substituinte acetoxílico foi proposta com base na magnitude da constante de acoplamento entre H-9 e H-11. O valor de 6,7 Hz apresentado mostrou-se compatível com o relatado na literatura para limonóides que possuem anel B aberto e substituintes em C-11 β -orientados ^{49,67}. No caso da presença neste carbono de substituintes possuindo orientação α , o sinal relativo a H-9 apresenta-se, no espectro de RMN ¹H, sob a forma de um singlete largo ^{77,85}.

Os dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C descritos para o limonóide **G.1** são apresentados na **Tabela 21**, enquanto que as correlações à longa distância observadas no espectro HMBC encontram-se relacionadas na **Tabela 20**, abaixo.

Tabela 20 - Correlações ¹³C-¹H à longa distância observadas no espectro HMBC do limonóide **G.1** (CDCl₃, 400 MHz).

δ_C	δ_H
149,4 (C-1)	2,97 (H-9)
167,7 (C-3)	6,71 (H-1)
49,5 (C-5)	6,71 (H-1); 2,97 (H-9)
136,6 (C-8)	2,97 (H-9)
52,7 (C-9)	5,39-5,45 (H-11, H-30)
46,5 (C-10)	6,19 (H-2); 2,97 (H-9)
68,7 (C-11)	2,97 (H-9); 2,39 (H-12 ax.)
33,4 (C-12)	2,97 (H-9)
38,9 (C-13)	2,39 (H-12 ax.)
66,3 (C-14)	2,97 (H-9); 5,39-5,45 (H-17, H-30)
165,7 (C-16)	4,01 (H-15)
74,5 (C-17)	2,39 (H-12 ax.)
14,6 (C-18)	2,39 (H-12 ax.)
22,8 (C-19)	6,71 (H-1)
124,7 (C-30)	2,97 (H-9)

3.8.2 Limonóide G.2

Das frações 28-4, 28-6 (**Parte experimental, item 6.3**), 29-2 e 29-4 (**item 6.4**) foi obtido um sólido amorfo, codificado por **G.2**.

A indicação de que esta substância possuía anéis A - D idênticos aos de **G.1** foi dada por seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C [**espectros 132-134 (vol. 2); Tabela 21**].

De maneira semelhante à já descrita para os pares de limonóides **B.1-B.2**, **C.1-C.2** e **F.1-F.2**, a única diferença entre **G.1** e **G.2** consistia na natureza da cadeia lateral em C-17. Os singletos largos no espectro de RMN ^1H de **G.2** a 6,09 e 6,27 δ e os sinais a 161,8; 97,7; 122,9 e 169,1 δ no espectro de RMN ^{13}C , comparáveis aos observados nos espectros correspondentes de **B.2**, **C.2** e **F.2**, caracterizaram a presença em C-17 de um resíduo 21-hidroxibut-20(22)en- γ -lactônico.

O espectro de massas ESI de **G.2** (**espectro 136, vol. 2**) apresentou, da mesma forma que o de **G.1**, um íon a m/z 573 (100%), o qual foi atribuído a $[\text{M-H}]^-$.

Conseqüentemente, a estrutura do limonóide **G.2** foi definida como a ilustrada a seguir e está sendo relatada pela primeira vez⁸¹.

O espectro COSY ^1H - ^1H de **G.2** (**espectro 135, vol. 2**) mostrou-se mais informativo que o de **G.1**, uma vez que nele foram evidenciados outros acoplamentos, além dos já mencionados quando da elucidação estrutural de **G.1** (**item 2.8.1**), os quais reforçaram as propostas estruturais efetuadas.

Assim, o sinal relativo à metila 18 apresentou correlações com os sinais de H-12 axial e H-17 e os sinais correspondentes a H-12 axial e H-12 equatorial com o multiplete referente a H-11.

Neste espectro foi possível verificar também o acoplamento tipo W existente entre os prótons das metilas 28 e 29.

G.2

Tabela 21 - Dados de RMN ^1H (200 MHz) e RMN ^{13}C (50 MHz) dos limonóides **G.1** e **G.2** (CDCl_3)

C/H	G.1		G.2	
	δ_{H} [m, J (Hz)]	δ_{C}	δ_{H} [m, J (Hz)]	δ_{C}
1	6,71 d (12,9)	149,4	6,78 d (12,9)	150,0
2	6,19 d (12,9)	121,8	6,11 d (12,9)	121,8
3	-	167,7	-	168,5
4	-	84,4	-	85,3
5	3,56 ddl (6,4; 3,2)	49,5	3,66-3,72 m	49,3
6	2,15-2,23 m [H_2 -6]	34,7	2,10-2,33 m [H_2 -6]	34,5
7	-	173,5	-	173,4
8	-	136,6	-	135,9
9	2,97 d (6,7)	52,7	2,99 d (6,6)	52,6
10	-	46,5	-	46,4
11	5,39-5,45 m *	68,7	5,38-5,56 m #	68,6
12	2,39 tl (13,5) [12ax.] 1,38 dd (13,5; 4,7) [12eq.]	33,4	2,43 tl (12,8) [12ax.] 1,65 dd (12,8; 5,2) [12eq.]	33,4
13	-	38,9	-	38,9
14	-	66,3	-	66,3
15	4,01 s	54,9	4,03 s	54,9
16	-	165,7	-	164,9
17	5,39-5,45 m *	74,5	5,38-5,56 m #	76,4
18	1,05 s	14,6	1,06 s	15,8
19	0,95 s	22,8	0,97 s	22,8
20	-	132,5	-	161,8
21	-	169,5	6,09 sl	97,7
22	7,28 sl	150,4	6,27 sl	122,9
23	6,26 sl	97,7	-	169,1
28	1,29 s	30,1	1,33 s	30,0
29	1,53 s	22,1	1,57 s	21,8
30	5,39-5,45 m *	124,7	5,38-5,56 m #	125,2
OAc	2,11 s	170,2	2,17 s	169,9
		20,7		20,6
OMe	3,69 s	52,4	3,72 s	52,4

*, # sinais sobrepostos.

3.9 Determinação estrutural dos limonóides H.1 e H.2

Das frações 28-6 (**Parte experimental, item 6.3**) e 29-4 (**item 6.4**) foram obtidos como sólidos amorfos as substâncias designadas por **H.1** e **H.2**, esta última também isolada da fração 29-6 (**item 6.4**).

3.9.1 Limonóide H.1

O espectro de RMN ^1H de **H.1**, obtido à temperatura ambiente, apresentou sinais mal resolvidos e alguns com duplicação (**espectro 137, vol. 2**). Apesar desta característica, sua feição mostrou-se semelhante à do espectro apresentado pelo limonóide **G.1**.

Os espectros de RMN ^{13}C PND e DEPT 135° de **H.1** (**espectros 139-141, vol. 2**), também com vários sinais duplicados, apresentaram absorções a 126,1/126,4 δ e 136,1/136,4 δ , referentes aos carbonos olefinicos C-30 e C-8 e a 173,0/173,1 δ e 52,2/52,3 δ correspondentes ao grupo carbometoxílico, confirmando, portanto, a presença em **H.1** do mesmo esqueleto *B-seco* do limonóide **G.1**.

As principais diferenças observadas no espectro de RMN ^1H de **H.1** com relação ao de **G.1** foram a presença de dois grupamentos acetoxílicos, ao invés de um, representados pelos singletos a 2,12 e 2,14 δ e a ausência do par de dubletos correspondentes aos prótons olefinicos do sistema ε -lactônico α,β insaturado existente no anel A de **G.1**. No espectro IV de **H.1** também não foi observada uma absorção na faixa de 1690-1700 cm^{-1} , presente nos limonóides descritos até agora, relativa à carbonila de uma ε -lactona α,β insaturada.

A análise dos dados supracitados demonstrou, portanto, que a ligação dupla entre C-1 e C-2 presente em **G.1** havia sido substituída por um grupo acetoxílico no limonóide **H.1**. Assim, no espectro de RMN ^{13}C , os sinais a 71,0/71,3; 36,5 e 171,0/171,8 δ corresponderiam aos carbonos C-1, C-2 e C-3, respectivamente.

O espectro de massas ESI de **H.1** (espectro 143, vol. 2) apresentou um íon a m/z 633 (100%), atribuído a $[\text{M}-\text{H}]^-$, reforçando a hipótese formulada acima.

Um levantamento efetuado na literatura, baseado em dados espectrais de limonóides, revelou que a má resolução dos sinais presentes nos espectros de RMN ^1H de alguns destes compostos é uma característica que tem sido observada naqueles que possuem anel B-*seco* e ε -lactona no anel A, quando há impedimento rotacional em torno da ligação C-9/C-10^{21,27,50,51,53}. Este impedimento pode ser causado por substituintes presentes no anel A, como ocorre, por exemplo, na prieurianina (**97**) e em outros limonóides estruturalmente relacionados.

97 - prieurianina

Em função da rotação restrita em torno da ligação C-9/C-10, a interconversão entre os múltiplos isômeros conformacionais torna-se lenta à temperatura ambiente e é responsável pela má resolução dos espectros destes limonóides, como a observada no de **H.1**. De um modo geral, os sinais que se mostram alargados são os relativos aos prótons situados na vizinhança da ligação supracitada. Foi demonstrado, no entanto, que a resolução pode ser melhorada pela aquisição dos espectros em temperaturas mais altas ⁵⁰.

Em função dos dados acima discutidos, registrou-se o espectro de RMN ¹H de **H.1** a 60°C e conforme esperado, conseguiu-se uma melhor resolução dos sinais (**espectro 138, vol. 2**). Assim, com o auxílio dos picos cruzados observados no espectro COSY ¹H-¹H, também obtido a 60°C, (**espectro 142, vol. 2**), foi possível se efetuar a atribuição dos sinais presentes naquele espectro (**Tabela 22**).

O sinal múltiplo atribuído aos prótons em C-11, C-17 e C-30 no espectro do limonóide **G.1** foi observado na região de 5,28 a 5,55 δ no de **H.1**, com integração para cinco prótons, indicando que nele estaria contido também o sinal relativo a H-1. Uma análise mais detalhada deste multipletto e de suas respectivas correlações presentes no espectro COSY ¹H-¹H, possibilitou a definição de cada um dos sinais que o compõem.

Assim, o singlete largo a 5,44 δ foi atribuído a H-17, através de sua conectividade com o sinal referente a H-22 e o duplo dubleto situado na região mais protegida, a 5,30 δ ($J = 6,0$ e $4,3$ Hz), a H-11, por ter apresentado correlações com H-9, H-12 axial e H-12 equatorial. Na região mais desprotegida do multipletto, o dubleto largo, a 5,53 δ ($J = 7,8$ Hz), foi atribuído a H-1 e suas correlações com o dubleto largo a 3,05 δ ($J = 16,5$

Hz) e com o multipeto a 3,18-3,34 δ caracterizaram tais sinais como sendo os de H-2A e H-2B. Finalmente, o singlete largo a 5,38 δ identificou os dois prótons olefinicos de C-30.

Desta maneira, foi estabelecida para o limonóide **H.1** a estrutura, até então inédita ⁸¹, abaixo representada.

H.1

A localização do grupo acetoxílico em C-1 foi baseada nos dados espectrais apresentados e também por comparação com os valores de deslocamento químico relatados para os prótons em C-1 e C-2 de limonóides estruturalmente relacionados a **H.1** ^{21,49,53,67}. A orientação α deste grupo foi proposta por analogia com a dos limonóides que possuem substituintes neste carbono, até agora isolados, e considerando-se também que esta foi a configuração estabelecida em C-1 no limonóide prieurianina (**97**), através de difração de raios X ⁵⁰.

Ao serem comparados os valores de deslocamento químico dos prótons das metilas de **H.1** e **G.1**, observou-se, no primeiro caso, uma desproteção das metilas 19, 28 e 29, compatível com a presença do acetato

no anel A. O fato do efeito de desproteção ter sido maior sobre a metila 28 (α -orientada) do que sobre 29 (β -orientada) reforçou a proposta da orientação α para o grupo acetoxílico em C-1.

A boa resolução apresentada à temperatura ambiente pelos espectros de RMN ^1H de **G.1** e **G.2**, ao contrário do de **H.1**, pode ser explicada pela ausência do acetato em C-1 naqueles limonóides, o que atenuou o congestionamento nas proximidades da ligação C-9/C-10.

Os dados espectrais completos de RMN ^1H do limonóide **H.1** encontram-se relacionados na **Tabela 22** e os de RMN ^{13}C , na **Tabela 23**.

3.9.2 Limonóide H.2

Os espectros de RMN ^1H à temperatura ambiente e a 50°C [espectros 144 e 145 (vol. 2); **Tabela 22**] e os de RMN ^{13}C [espectros 146 e 147 (vol. 2); **Tabela 23**] de **H.2** apresentaram uma acentuada semelhança com os de **H.1**, no que diz respeito aos sinais referentes aos anéis A - D. Esta informação, aliada ao fato de que, nos espectros de **H.2**, foram também constatados os mesmos sinais relativos ao substituinte na cadeia lateral em C-17 presente em **B.2**, **C.2**, **F.2** e **G.2** (**Tabelas 10, 13, 19 e 21**) permitiram a definição da estrutura do limonóide **H.2** como sendo a representada a seguir.

H.2

O espectro de RMN ^1H obtido em alta temperatura (50°C) [espectro 145] apresentou uma melhor resolução, quando comparado com o de **H.1** (espectro 138), dos sinais relativos a H-2A, observado como um duplo dubleto a 3,06 δ ($J = 16,5$ e $1,3$ Hz); H-6B, como um duplo dubleto a 2,66 δ ($J = 18,3$ e $3,1$ Hz) e H-9, caracterizado pelo dubleto a 3,19 δ ($J = 6,8$ Hz). Tais atribuições e as demais presentes na **Tabela 22** foram confirmadas pelas correlações existentes no espectro COSY ^1H - ^1H de **H.2** (espectro 148, vol. 2).

Esta substância também está sendo descrita pela primeira vez ⁸¹e seu espectro de massas ESI (espectro 149, vol. 2) mostrou, em conformidade com a estrutura proposta, um íon pseudo-molecular a m/z 633, correspondente a $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Tabela 22 - Dados de RMN ^1H dos limonóides **H.1** e **H.2** (200 MHz, CDCl_3).

H	δ_{H} [m, J (Hz)]	
	H.1 *	H.2 **
1	5,53 dl (7,8)	5,34-5,56 m [‡]
2	3,05 dl (16,5) [2A] 3,18-3,34 m [‡] [2B]	3,06 dd (16,5; 1,3) [2A] 3,25-3,47 m [§] [2B]
5	3,18-3,34 m [§]	3,25-3,47 m [§]
6	2,03-2,19 m ^{§, *} [6A] 2,64-2,74 m [6B]	2,03-2,17 m [*] [6A] 2,66 dd (18,3; 3,1) [6B]
9	3,18-3,34 m [‡]	3,19 d (6,8)
11	5,30 dd (6,0; 4,3)	5,34-5,56 m [‡]
12	2,03-2,19 m ^{§, *} [12ax.] 1,33-1,34 m [12eq.]	1,94 tl (12,2) [12ax.] 1,57-1,78 m [12eq.]
15	3,87 sl	3,91 s
17	5,44 sl	5,34-5,56 m [‡]
18	1,03/1,06 sl [•]	1,12 s
19	1,17/1,22 sl [•]	1,12 s
21	-	6,01 sl
22	7,27 sl	6,23 sl
23	6,14 sl	-
28	1,42 sl	1,44 s
29	1,57 s	1,57 s
30	5,38 sl	5,34-5,56 m [‡]
OAc	2,12 s; 2,14 s	2,11 s; 2,18 s
OMe	3,66 s	3,68 s

* registrado a 60°C.

** registrado a 50 °C.

‡, § sinais sobrepostos

• sinais duplicados.

♣ os sinais dos grupos acetoxila ficaram parcialmente sobrepostos aos de H-12 ax. e H-6A.

Tabela 23 - Dados de RMN ^{13}C dos limonóides **H.1** e **H.2** (50 MHz, CDCl_3).

C	δ_{C}	
	H.1	H.2
1	71,0/71,3 •	71,6
2	36,5	36,5
3	171,0/171,8 •	171,6
4	84,5/85,0 •	84,6
5	45,5	45,7
6	34,7	34,7
7	173,0/173,1 •	173,0
8	136,1/136,4 •	136,0
9	51,4/51,8 •	51,5
10	48,2/48,7 •	48,0
11	68,8/69,3 •	68,5
12	34,3	34,1
13	38,9/39,0 •	39,0
14	67,3/67,4 •	67,4
15	54,9	55,0
16	165,6/165,8 •	164,9
17	74,7/75,4 •	76,6
18	15,0	15,7
19	24,4 #	24,4
20	132,7/133,6 •	161,7
21	168,8/169,0 •	98,1
22	149,9/150,3 •	123,4
23	97,1/97,7 •	168,6
28	33,7/34,0 •	34,0
29	24,3/24,4 •, #	21,2
30	126,1/126,4 •	126,3
OAc	170,3/170,4 •; 170,5/170,6 • 21,2; 21,5/21,6 •	170,3; 170,7 21,4; 21,5
OMe	52,2/52,3 •	52,4

• sinais duplicados.

sinais na mesma coluna que podem estar trocados.

3.10 Identificação do esteróide glicosilado I

Da fração 34-36, conforme descrito na **Parte experimental**, item **6.2**, foi obtido um sólido amorfo, designado por **I**.

Esta substância foi identificada como sendo o esteróide glicosilado 3 β -O- β -D-glicopiranosilsterol, amplamente difundido no reino vegetal e representado pela estrutura **I**, abaixo.

No espectro de RMN ^1H (**espectro 150**, vol. 2), a presença de múltiplos sinais na região de 0,5 a 2,5 δ indicou a presença de um esqueleto esteroidal em **I**, juntamente com o dubleto largo a 5,2 δ , atribuível ao próton olefínico em C-6. Já a presença de um resíduo de açúcar na estrutura de **I** foi sugerida pelos sinais presentes na região de 3,7 a 4,8 δ , compatível com a natureza bastante polar desta substância.

A identificação de **I** como sendo 3 β -O- β -D-glicopiranosilsterol foi definida, no entanto, através dos dados fornecidos pelos espectros de RMN ^{13}C PND e DEPT 135° (**espectros 151 e 152**, vol. 2). Nestes espectros, os carbonos C-1' a C-6' da glicose foram identificados através dos sinais a 102,6; 75,4; 78,5; 71,7; 78,1 e 62,9 δ , respectivamente,

comparáveis aos descritos na literatura para metil- β -D-glicopiranosídeo (98) ⁸⁶ [Tabela 24]. Os demais sinais presentes no espectro apresentaram valores de deslocamento químico e multiplicidades semelhantes aos disponíveis na literatura para o sitosterol (99) ⁸⁷ [Tabela 24].

98

99

As diferenças observadas nos valores de deslocamento químico referentes aos carbonos C-2, C-3 e C-4 de I e do sitosterol (desproteção de C-3 e proteção de C-2 e C-4 em I) foram justificadas pela presença em C-3 da substância I do resíduo de β -D-glicose.

Ainda com base nos valores obtidos no espectro de RMN ¹³C, foi possível definir como sendo β a configuração do carbono anomérico da glicose, uma vez que a forma α apresenta diferenças significativas nos valores de deslocamento químico para os carbonos C-1, C-2, C-3 e C-5 ⁸⁶.

Tabela 24 - Dados de RMN ^{13}C de **I** (50 MHz) e dos modelos **98**⁸⁶ e **99**⁸⁷.

C	δ_{C}		C	δ_{C}	
	I *	99 §		I	99
1	37,5	37,3	16	28,6	28,9
2	30,3	31,6	17	56,3	56,1
3	78,6 **	71,7	18	12,0	11,9
4	40,0	42,3	19	19,5	19,4
5	141,0	140,8	20	36,4	36,2
6	122,0	121,6	21	19,1	18,8
7	32,2	31,9	22	34,3	34,0
8	32,1	31,9	23	26,4	26,1
9	50,4	50,2	24	46,1	45,9
10	37,0	36,5	25	29,5	29,2
11	21,3	21,1	26	20,0	19,8
12	39,4	39,8	27	19,3	19,1
13	42,5	42,3	28	23,4	23,1
14	56,9	56,8	29	12,2	12,3
15	24,6	24,3			

C	δ_{C}	
	I	98 #
1'	102,6	104,0
2'	75,4	74,1
3'	78,5 **	76,8
4'	71,7	70,6
5'	78,1	76,8
6'	62,9	61,8

* Py-d₅§ CDCl₃# D₂O

** valores que podem estar trocados.

4. ENSAIO BIOLÓGICO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL

Considerando-se que alguns limonóides de Meliaceae possuem atividade citotóxica (**item 1.2**), quatro limonóides isolados no presente trabalho (**B.1**, **B.2**, **G.1** e **G.2**) foram encaminhados ao Instituto de Tecnologia em Fármacos (FIOCRUZ, RJ), para serem testados frente a linhagens mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Este teste baseia-se na resposta diferencial de uma determinada amostra com relação a células de leveduras mutantes, deficientes na regeneração do DNA, em comparação àquelas capazes de regenerá-lo e é um dos bioensaios utilizados para se avaliar uma possível atividade antitumoral de extratos brutos ou de substâncias puras obtidas de plantas ⁸⁸.

A detecção de amostras capazes de danificar o DNA é feita através da observação da inibição do crescimento das diferentes culturas de leveduras mutantes, comparadas a uma linhagem controle, a qual não perdeu a capacidade de regeneração do DNA. As amostras que apresentam resultados positivos mostram zonas de inibição de crescimento da cultura em torno do local de aplicação da amostra. Aquelas que apresentarem um diâmetro do halo de inibição de 10 a 12 mm são então submetidas a um novo ensaio para se calcular o seu valor correspondente de CI_{12} (concentração mínima necessária para produzir um halo de inibição de 12 mm).

Um extrato é considerado ativo se mostrar atividade seletiva contra uma ou mais leveduras mutantes, com um valor de CI_{12} inferior a 1000 µg/mL e pelo menos três vezes menor que o apresentado na linhagem

controle. No caso de substâncias puras, o valor de CI_{12} deve ser abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Os limonóides **B.1**, **B.2**, **G.1** e **G.2** mostraram-se, no entanto, inativos, quando submetidos ao bioensaio em questão, uma vez que não houve, em nenhum caso, a formação de halo de inibição.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que, a exemplo de outras espécies da família Meliaceae, as sementes de *Trichilia elegans* ssp. *elegans* A. Juss. contêm limonóides, os quais possuem esqueletos dos grupos D (abertura dos anéis A e D) e J (abertura dos anéis A, B e D), além de *seco*-protolimonóides.

Estes resultados permitem desenvolver algumas considerações, conforme apresentado a seguir:

- Dos protolimonóides encontrados em espécies de *Trichilia* (relacionados na **Tabela 3**), nenhum apresenta abertura do anel A e portanto, o tipo estrutural presente em **A.1** e **A.2** está sendo descrito pela primeira vez neste gênero.
- Dentre os limonóides obtidos de espécies de *Trichilia* e relacionados nas **Tabelas 1** e **2**, observa-se que apenas dois foram isolados com esqueletos correspondentes ao do grupo D e nenhum do grupo J, havendo uma predominância de representantes dos grupos de esqueleto A (tipo havanensina) e E (tipo prieurianina).

• Deve-se ressaltar também que poucos limonóides com o esqueleto carbocíclico apresentado por **G.1** a **H.1** têm sido relatados na literatura. Na família Meliaceae, a ocorrência de limonóides com esqueletos do tipo A, B e D-*seco* (grupo J) tem sido descrita apenas em espécies da subfamília Swietenioideae, como, por exemplo, em *Khaya ivorensis* ⁸⁹ e *Soymida febrifuga* ⁹⁰. Já cneorina R (**100**), estruturalmente relacionado com **G.1** - **H.1**, foi obtido de uma espécie da família Cneoraceae, *Neochamaelea pulverulenta* ⁹¹. Portanto, a presença deste tipo de esqueleto em limonóides de uma espécie do gênero *Trichilia* é digna de nota, uma vez que trata-se do primeiro relato da ocorrência de substâncias com este esqueleto carbocíclico pouco comum na subfamília Melioideae, à qual pertence o gênero *Trichilia*.

100 - cneorina R

• Todos os limonóides isolados neste trabalho apresentam em C-17 um substituinte do tipo γ -hidroxibutenolídeo (21- ou 23-hidroxibut-20(22)en- γ -lactônico). Tais substituintes são encontrados em alguns dos limonóides de Meliaceae, Rutaceae e Simaroubaceae, tendo sido relatados, por exemplo, nos gêneros *Azadirachta* ⁷³, *Cabralea* ⁷⁴, *Cedrela* ⁷⁵, *Chisocheton* ⁷⁶, *Toona* ^{77,78} e *Trichilia* ^{39,40,43} (Meliaceae); *Citrus* ⁸⁴,

*Dictyoloma*⁹² e *Phellodendron*^{82,83} (Rutaceae); *Harrisonia*⁹³ e *Picrolemma*⁹⁴ (Simaroubaceae). A origem biogenética destes γ -hidroxibutenolídeos ainda não foi esclarecida, tendo sido considerados, ora um estágio intermediário na formação do anel furânico, ora um provável produto de foto-oxidação ou de oxidação enzimática do mesmo^{4,6,73, 74-76,95}.

Quando limonóides que possuem anel furânico em C-17 são submetidos à foto-oxidação na ausência de um fotossensibilizante, apenas os isômeros 23-hidroxibutenolídeos são formados^{74,75,96}. A obtenção da mistura de 21- e 23-hidroxibutenolídeos só ocorre quando a reação é efetuada na presença de um fotossensibilizante^{78,83,84,92}.

Com relação aos γ -hidroxibutenolídeos obtidos no presente trabalho, considerando-se as informações supracitadas e que:

- a) foram isolados os isômeros 21- e 23-hidroxibut-20(22)en- γ -lactônicos,
- b) não foi detectada por RMN ¹H a presença de substâncias com anel furânico nas frações menos polares,
- c) o trabalho foi realizado com as sementes, aparentemente sem a presença de substâncias que pudessem atuar como fotossensibilizantes,
- d) a metodologia empregada para o isolamento destes limonóides foi semelhante às descritas na literatura para a obtenção daqueles possuindo anel furânico,

pode-se propor que tais substâncias não se constituem produtos de foto-oxidação.

- Quanto à estereoquímica do substituinte presente em C-7 nos limonóides do grupo D, observa-se que a apresentada pelas substâncias **B.1**, **B.2** e **D.2** (orientação α do grupo acetoxílico) é a encontrada em todos os limonóides de Meliaceae, quando não apresentam função oxigenada em C-6. Esta orientação está de acordo com a proposta biogenética clássica dos limonóides, cujo esqueleto é derivado dos precursores *apo-tirucalol* (**82**) ou *apo-eufol* (**83**), não possibilitando, portanto, a formação diretamente de limonóides possuindo hidroxila β -orientada em C-7 ⁴⁻⁶.

A presença de **C.1**, **C.2**, **E.1** e **E.2** nas sementes de *Trichilia elegans* ssp. *elegans* representa o primeiro relato da ocorrência de limonóides sem função oxigenada em C-6 e que possuem em C-7 substituintes com orientação β .

Duas propostas biogenéticas poderiam ser feitas para tais limonóides:

a) estes seriam formados a partir da redução da carbonila em C-7 de **F.1** e **F.2**, a despeito de haver uma tendência na natureza de se ter sequências biogenéticas com grau de oxidação crescente. O fato da formação do produto com a hidroxila β -orientada ser estericamente favorecida ⁹⁷ reforça esta hipótese.

b) outro caminho possível seria a partir dos precursores Δ^7 -tirucalol ou Δ^7 -eufol, através de uma hidroxilação alílica em C-6, seguida de isomerização e de um rearranjo tipo apotirucalol / apoeufol, para originar **101**. A hidratação subsequente da ligação dupla entre C-6/C-7 de **101**, via carbocátion **102**, levaria à formação de **103** e **104**, os quais originariam, respectivamente, os limonóides 7α - e 7β -hidroxilados.

Pode-se destacar neste trabalho o isolamento de quinze substâncias com estruturas inéditas, a importância destes resultados, em termos quimiotaxonômicos e também, a contribuição dada para o conhecimento da composição química de meliáceas brasileiras, particularmente do gênero *Trichilia*. Além disto, o isolamento das substâncias já conhecidas, bem como a análise do conjunto de dados

espectrais, especialmente os resultantes do emprego de técnicas modernas de RMN, permitiram, não só um aprofundamento de conhecimentos em termos de isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários, como também o fornecimento de dados que poderão facilitar futuramente a determinação estrutural de substâncias afins.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos

O material vegetal foi coletado em fevereiro de 1990, no município de Corumbá (MS), pela botânica Vali Joana Pott, do Herbário CPAP, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Corumbá). Neste herbário encontram-se depositados exemplares do espécimen vegetal coletado, sob o código AP5473. A identificação da planta foi realizada pelo Prof. Humberto Barreiros, da Divisão de Sistemática do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RJ).

Os frutos de *T. elegans* ssp. *elegans* foram secos em local ventilado e logo após, partidos um a um para a retirada das sementes.

A metodologia adotada para a obtenção dos extratos foi semelhante à descrita por Schroeder e Nakanishi no isolamento do limonóide azadiractina das sementes de *Azadirachta indica*⁹⁸. As sementes (225 g), já moídas, foram extraídas a frio com hexano, por agitação mecânica, durante cinco minutos (duas extrações), visando a eliminação de matéria graxa. Em seguida, o material foi extraído com etanol, a frio, até esgotamento (cerca de 1,5 L por extração).

O extrato etanólico obtido foi concentrado sob pressão reduzida até consistência xaroposa. Após adição de etanol / água (1:1) [350 mL], o extrato foi submetido a partições sucessivas com éter de petróleo, diclorometano e acetato de etila. As frações orgânicas obtidas neste processo, após secagem com sulfato de sódio anidro e concentração do solvente sob pressão reduzida, forneceram:

- 10,5 g da fase em éter de petróleo
- 10,3 g da fase diclorometânica
- 0,5 g da fase em acetato de etila.

Os espectros de RMN ^1H , tanto da fase em éter de petróleo, como do material proveniente do extrato hexânico supracitados, mostraram que ambos eram constituídos predominantemente de substâncias de natureza graxa, razão pela qual não foram selecionados para estudo. Da mesma forma, o material originado da fase em acetato de etila não se constituiu objeto de investigação, por tratar-se de uma mistura complexa de substâncias de alta polaridade e que foge, no momento, do objetivo do presente trabalho. O material que continha as substâncias de interesse foi o proveniente da fase diclorometânica e este foi submetido a um processo de fracionamento, visando o isolamento de seus constituintes, particularmente limonóides.

6.2 Isolamento dos metabólitos secundários

O material proveniente da fase diclorometânica foi submetido inicialmente ao fracionamento cromatográfico apresentado no **Esquema 1**, o qual mostra os processos de obtenção dos protolimonóides **A.1** e **A.2**, de $3\beta\text{-O-}\beta\text{-D-glicopiranosilstitosterol}$ (**I**) e das frações F28 e F29. Neste esquema foram apresentadas apenas as frações investigadas. As demais não foram analisadas porque os respectivos espectros de RMN ^1H e/ou cromatogramas em CCDA não mostraram evidência de substâncias de interesse.

— A fração F 26-27 mostrou, através de CCDA, ser constituída de duas substâncias predominantes. A separação destas foi efetuada por

cromatografia em coluna “flash” , eluída com gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$ (95:7:0,3) até a proporção de 90:10:0,9, tendo sido recolhidas uma fração de 75 mL e cento e vinte e seis de 10 mL. Deste processo (**Esquema 1**), resultou o isolamento dos protolimonóides **A.1** (fração 52-76) e **A.2** (fração 89-106). Os espectros de RMN ^1H de ambas as substâncias revelaram, no entanto, a existência de contaminação por matéria graxa. A eliminação desta da fração 52-76 foi efetuada através de cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (10 g, 1 x 36 cm), eluída no sistema hexano / diclorometano (1:4). Foram coletadas uma fração de 10 mL e oito frações de 5 mL. O material de natureza graxa ficou contido na segunda fração, enquanto que **A.1** foi obtido nas frações de número 3 a 5 (**Esquema 1**).

— O material sólido amarelado presente em F 34-36 (**Esquema 1**) originou, após sucessivas lavagens com acetona a quente, 10 mg da substância identificada como sendo $3\beta\text{-O-}\beta\text{-D-glicopiranosil}$ sitosterol (I).

— As frações F28 e F29 apresentaram composição semelhante através de análise por CCDA e forneceram, após concentração sob pressão reduzida, grande quantidade de um material sólido (1800 e 1100 mg, respectivamente). O espectro de RMN ^1H de F29 indicou a presença de substâncias de interesse. Sendo assim, F29 e conseqüentemente, F28 foram selecionadas para um estudo químico mais detalhado.

Inicialmente, tentou-se efetuar a separação dos constituintes de F29 através de CC tipo “flash” , seguida de CCDP de algumas das frações obtidas deste processo. Parte de F29 (200 mg) foi então submetida ao fracionamento por CC em sílica 60H (30 g), eluída sob pressão de nitrogênio no sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$ (95:5:0,2), com aumentos gradativos na proporção de AcOEt e MeOH, até $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$

(90:20:1,1). Foram coletadas duzentas e sessenta frações de 10 mL cada e uma última, de 300 mL em CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH (40:30:2,5).

Das frações 134-147 [eluídas com CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH (90:9:0,7)] foi obtido o limonóide **B.1**, juntamente com grande quantidade de matéria graxa, conforme demonstra seu espectro de RMN ¹H [Figura 5].

Tentativas de purificação das demais frações por CCDP mostraram-se infrutíferas. Apesar dos cromatogramas apresentarem boa resolução, sugerindo ter havido a separação dos componentes presentes, os espectros das substâncias obtidas indicavam que estas ainda se apresentavam sob a forma de misturas. Este fato é ilustrado, por exemplo, no espectro de RMN ¹H correspondente a uma das frações obtidas na CCDP das frações 148-169 [eluídas em CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH (90:9:0,7)] [Figura 6].

Em virtude dos resultados obtidos, adotou-se uma nova estratégia visando a separação dos componentes do restante de F29 e de F28: as frações foram inicialmente submetidas à separação por cromatografia em Sephadex LH-20. Foi empregada a técnica de eluição por gradiente de solventes, de acordo com o método descrito por Cardellina⁹⁹.

A seguir, são descritas as etapas executadas, as quais resultaram no isolamento dos limonóides **B.1**, **B.2**, **C.1**, **C.2**, **D.2**, **E.1**, **E.2**, **F.1**, **F.2**, **G.1**, **G.2**, **H.1** e **H.2** e dos derivados acetilados **B.2a**, **C1.a**, **C1.b**, **C.2a** e **C.2b**.

Esquema 1. Fracionamento cromatográfico inicial da fase diclorometânica, obtida do extrato etanólico das sementes de *T. elegans* ssp. *elegans*.

Figura 5. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de **B.1**, em mistura com matéria graxa.

Figura 6. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de uma fração obtida de CCDP das frações 148-169 (provenientes de **F 29**).

6.3 Separação dos componentes de F-28

(Esquema 2):

A separação foi inicialmente efetuada em colunas de Sephadex LH-20 (30 g, 2 x 30 cm), tendo sido aplicados cerca de 300 mg de material de cada vez. A primeira fração coletada (35 mL), teve como eluente hexano / diclorometano 1:4. Em seguida, foram recolhidas frações de cerca de 10 mL cada, empregando-se os eluentes hexano / diclorometano 1:4 (250 mL) e diclorometano / acetona 3:2 (150 mL).

As frações cujas composições mostraram-se equivalentes por CCDA foram reunidas, resultando neste processo nove grupos (28-1 → 28-9).

Foram selecionadas para estudo as frações 28-4, 28-6, 28-7 e 28-8. As demais não foram investigadas por serem constituídas preponderantemente por material de natureza graxa e/ou apresentarem composição extremamente complexa.

— A fração 28-4 mostrou tratar-se do limonóide **G.2**.

— A separação dos componentes das frações 28-6, 28-7 e 28-8 foi efetuada através de CLAE semi-preparativa, em colunas RP-8 ou RP-18, conforme mostrado nas **figuras 7, 8 e 9**, respectivamente. O sistema de eluição que apresentou melhor resultado foi ACN/MeOH/H₂O, sendo as proporções de cada eluente na mistura descritas nos respectivos cromatogramas. O material foi dissolvido em ACN/MeOH (na mesma proporção do sistema de eluição a ser utilizado) e à solução resultante, após filtração, acrescentou-se água até

haver turvação. Foram utilizados em cada injeção de 5 a 10 mg de material.

Dessa forma, de 28-6 foram obtidos os limonóides **B.1**, **B.2**, **C.1**, **C.2**, **F.1**, **F.2**, **G.1** e **G.2**, além de **H.1** e **H.2**, sob a forma de mistura; de 28-7 foram isolados os limonóides **B.1**, **B.2**, **C.1**, **C.2**, **F.1**, **F.2** e **G.1** e de 28-8, os limonóides **B.1**, **B.2**, **C.1**, **C.2**, juntamente com **F.1** e **F.2** em mistura.

Esquema 2 . Separação dos principais componentes de F-28.

Fig 7. Cromatograma semi-preparativo de 28-6. Coluna RP-18, 7 μ m, 250 x 25 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 11,5:38,5:50, 16 mL/min.; detector UV, 250 nm.

Fig. 8. Cromatograma semi-preparativo de 28-7. Coluna RP-18, 5 μ m, 250 x 20 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 13,5:44,5:42, 10 mL/min.; detector UV, 240 nm.

Fig 9. Cromatograma semi-preparativo de 28-8. Coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 22 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 18:27:55, 8 mL/min; detector UV, 250 nm.

6.4 Separação dos componentes de F-29:

O restante do material referente a F-29 (900 mg) foi submetido ao mesmo processo inicial de separação descrito para F-28, ou seja: cromatografia em colunas de Sephadex LH-20 (30 g, 2 x 30 cm), sendo aplicados cerca de 300 mg de material por separação. Foram recolhidas no eluente hexano / diclorometano (1:4) uma fração de 50 mL e vinte e duas frações de 10 mL. Em seguida, utilizando-se a fase móvel diclorometano / acetona 3:2, coletou-se quatorze frações de 10 mL. As frações cujas composições mostraram-se semelhantes por CCDA foram reunidas, resultando neste processo nove grupos (29-1 → 29-9) [Esquema 3]. O interesse na investigação das frações assim obtidas recaiu sobre as de número 29-2, 29-4, 29-6, 29-7 29-8. As demais não foram trabalhadas, ou por serem constituídas de misturas muito complexas, ou por apresentarem substâncias de natureza graxa como seus principais componentes.

— A fração 29-2 mostrou ser composta pelo limonóide

G.2.

— A sequência de operações adotada para a separação dos constituintes da fração 29-4 envolveu inicialmente um fracionamento por cromatografia em coluna tipo “flash”, seguido de CLAE semi-preparativa de algumas das frações obtidas, conforme mostrado no Esquema 4. Na separação por cromatografia em coluna “flash” (15 x 2,5 cm), a eluição foi feita inicialmente com diclorometano / isopropanol (18:0,5), seguida por diclorometano / isopropanol (10:0,5) e finalmente, AcOEt puro. Foram coletadas cinquenta e nove frações de 10 mL e duas de 200 mL.

Esquema 3. Sequência de fracionamento de F-29.

As frações 27 a 41 mostraram ser constituídas do limonóide **G.2**.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C das frações 52-55 e 56-59 não apresentaram um grau de pureza satisfatório, de modo a permitir uma definição completa dos sinais observados. Através de CLAE analítica das respectivas frações (**Figura 10**), pôde-se constatar que ambas apresentavam basicamente um único componente majoritário. A purificação posterior destas frações por CLAE semi-

preparativa (**Figuras 11 e 12**) resultou no isolamento de **H.1**, proveniente da fração 52-55 e de **H.2**, proveniente da fração 56-59.

A fração 60 mostrou conter, através de CLAE analítica, um único componente principal (**Figura 10**). A purificação por CLAE semi-preparativa (**Figura 13**), levou ao isolamento do limonóide **G.1**.

Esquema 4. Separação dos principais componentes da fração 29-4, resultante do fracionamento de F-29.

Figura 10. Cromatogramas analíticos das frações 52-55 (A), 56-59 (B) e 60 (C), provenientes da separação em coluna “flash” de 29-4. Fração 52-55: coluna RP-18, 4 μ m, 150 x 3,9 mm; eluente - ACN/MeOH/H₂O 10:35:55, 1 mL/min.; detector UV, 230 nm. Frações 56-59 e 60: coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 4,6 mm, eluente - ACN/MeOH/H₂O 22:26:52, 0,5 mL/min.; detector UV, 230 nm.

Figura 11. Cromatograma semi-preparativo da fração 52-55. Coluna RP-18, 7 μ m, 250 x 25 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 13:42:45, 8 mL/min.; detector UV, 250 nm; cerca de 6 mg por injeção.

Figura 12. Cromatograma semi-preparativo da fração 56-59. Coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 22 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 22:26:52, 8 mL/min.; detector UV, 250 nm; cerca de 5 mg por injeção.

Figura 13. Cromatogramas semi-preparativo (A) da fração 60 e analítico (B) do material obtido. Condições preparativas: coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 22 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 22:26:52, 8 mL/min.; detector UV, 250 nm; cerca de 12 mg por injeção. Condições analíticas: coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 4,6 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 22:26:52, 0,5 mL/min.; detector UV, 230 nm.

— A separação dos componentes da fração 29-6 foi realizada de maneira semelhante à descrita para a fração 29-4: o material correspondente a 29-6 foi submetido à cromatografia em coluna “flash”, seguido de CLAE semi-preparativa de algumas das frações obtidas, conforme demonstrado no **Esquema 5**.

Esquema 5. Separação dos principais componentes da fração 29-6, resultante do fracionamento de F-29.

A separação em coluna “flash” (15 x 2,5 cm), foi efetuada no sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{AcOH}$ (9:2:0,1), seguido de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{AcOH}$ (9:4:0,1). Foram recolhidas trinta e seis frações de 5 mL, sessenta de 2 mL e vinte de 11 mL, nesta ordem, sendo que as primeiras trinta e sete frações não apresentaram nenhum componente através de análise por CCDA.

Os sinais observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da fração 38-66 indicaram a presença de dois componentes majoritários, apesar da CCDA do material sugerir apenas um. A inspeção do cromatograma resultante de CLAE analítica do material confirmou a primeira observação (**Figura 14**). Dessa forma, uma purificação posterior através de CLAE semi-preparativa levou ao isolamento dos limonóides **B.1** e **B.2** (**Figura 15**).

Figura 14. Cromatogramas analíticos das frações 38-66 (A) e 100-107 (B), resultantes da separação em coluna “flash” de 29-6. Fração 38-66: coluna RP-8, 10 μm , 250 x 4,6 mm; eluente - $\text{ACN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 22:30:48, 0,5 mL/min.; detector UV, 230 nm. Fração 100-107: coluna RP-18, 4 μm , 150 x 3,9 mm; eluente $\text{ACN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 15:29:56, 1 mL/min.; detector UV, 230 nm.

Figura 15. Cromatograma semi-preparativo da fração 38-66 (vide **figura 14**): coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 22 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 22:30:48, 8 mL/min.; detector UV 250 nm; cerca de 5 mg por injeção.

Dois componentes foram também observados no cromatograma proveniente de CLAE analítica da fração 100-107 (**Figura 14**). Após CLAE semi-preparativa do material, foram obtidos os limonóides **G.1** e **H.2** (**Figura 16**).

Figura 16: Cromatograma semi-preparativo da fração 100-107 (vide **figura 14**): coluna RP-18, 7 μ m, 250 x 25 mm; eluente ACN/MeOH/H₂O 14:46:40, 8 mL/min.; detector UV, 250 nm; cerca de 10 mg por injeção.

— Tentativa de separação dos componentes da fração 29-7 por cromatografia em coluna “flash” não foi bem sucedida. Foram coletadas setenta e sete frações de 10 mL, no eluente CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH (20:4:0,15) (**Esquema 6**).

Apenas as frações 25-28 (6 mg) eram constituídas de um único componente, o qual foi identificado como sendo o limonóide **B.1**.

As demais frações apresentaram cromatogramas em CCDA bastante semelhantes e que indicavam não ter havido separação dos componentes. Por esta razão, foram submetidas à nova purificação através de CLAE semi-preparativa (**Figuras 17 - 21**), levando à obtenção dos limonóides **B.1**, **B.2**, **C.2**, **F.1** e **F.2** (**Esquema 6**).

Esquema 6. Separação dos principais componentes da fração 29-7, proveniente do fracionamento de F-29.

Figura 17. Cromatograma semi-preparativo da fração 29-32, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7: coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 22 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 21:29:50, 8 mL/min.; detector UV, 250 nm; cerca de 7-8 mg por injeção.

Figura 18. Cromatograma semi-preparativo da fração 33-36, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7: coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 22 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 21:29:50, 8 mL/min.; detector UV, 250 nm; cerca de 4-5 mg por injeção.

Figura 19. Cromatograma semi-preparativo da fração 37-39, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7: coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 22 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 21:29:50, 8 mL/min.; detector UV, 250 nm; cerca de 6 mg por injeção.

Figura 20. Cromatograma semi-preparativo da fração 40-44, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7: coluna RP-8, 10 μ m, 250 x 22 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 21:29:50, 8 mL/min.; detector UV, 250 nm; cerca de 4-5 mg por injeção.

Figura 21. Cromatograma semi-preparativo da fração 45-50, proveniente da separação em coluna “flash” de 29-7: coluna RP-8, 10 μm , 250 x 22 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 21:29:50, 8 mL/min.; detector UV, 250 nm; cerca de 6-7 mg por injeção.

— O material presente na fração 29-8, de polaridade maior que o das frações anteriormente obtidas, apresentou dificuldade de solubilização em clorofórmio, acetato de etila e metanol (mesmo a quente). O resíduo que permaneceu insolúvel, após tentativas de solubilização em metanol a quente, e denominado 29-R, foi separado, por decantação do sobrenadante solúvel, o qual foi designado por 29-S. Ambos apresentaram cromatogramas com resolução insatisfatória e espectros de RMN ¹H semelhantes. Nestes espectros, ao contrário dos anteriormente analisados, não foram observados sinais referentes a grupamentos acetato (**Figura 22**). Em contrapartida, os sinais presentes na região de 3,0 a 4,0 δ sugeriram a presença de protons carbinólicos.

Após estas observações e tendo em vista a já mencionada dificuldade de solubilização da fração 29-8, procedeu-se à separação de seus componentes após acetilação das frações 29-R e 29-S, conforme descrito a seguir e ilustrado no **Esquema 7**: a dois frascos de 10 mL, contendo, respectivamente, 29-R e 29-S, foram adicionados anidrido acético (0,5 mL), piridina (0,5 mL) e quantidades catalíticas de DMAP. O material permaneceu em repouso à temperatura ambiente por cerca de doze horas e em seguida, eliminou-se o excesso de reagente sob jato de ar frio.

As frações acetiladas assim obtidas e denominadas, respectivamente, 29-R AC e 29-S AC foram então purificadas por CLAE semi-preparativa. No caso de 29-S AC foi feita uma filtração prévia em coluna de sílica “flash”, no sistema CH₂Cl₂ / isopropanol (18:0,5), tendo sido coletadas treze frações de 5 mL. O material de interesse, a ser submetido a CLAE semi-preparativa, concentrou-se nas duas primeiras frações. Tal procedimento não foi repetido com a fração 29-R AC pois, além de ter ocasionado perda considerável dos limonóides acetilados presentes em 29-S AC, revelou-se também desnecessário: tanto 29-R AC (bruta) como 29-S AC (fração 1-2, resultante da filtração em sílica “flash”) forneceram cromatogramas analíticos em CLAE bastante semelhantes.

A separação por CLAE semi-preparativa de 29-R AC e 29-S AC resultou no isolamento dos limonóides **B.2**, **B.2a**, **C.1**, **C.1a**, **C.1b**, **C.2**, **C.2a** e **C.2b** (**Figuras 23 e 24**).

Esquema 7. Separação dos principais componentes da fração **29-8** (proveniente do fracionamento de **F-29**), sob a forma de seus respectivos derivados acetilados.

Figura 23. Cromatogramas analítico (A) e semi-preparativo (B) da fração 29-R AC.

Condições analíticas: coluna RP-18, 7 μ m, 250 x 4 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 13,5:44,5:42, 1 mL/min.; detector UV, 240 nm.

Condições preparativas: coluna RP-18, 7 μ m, 250 x 25 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 13,5:44,5:42, 15 mL/min.; detector UV, 240 nm; cerca de 15 mg por injeção.

Figura 24. Cromatogramas analítico (A) e semi-preparativo (B) da fração 29-S AC (1-2). Condições analíticas: coluna RP-18, 7 μ m, 250 x 4 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 13,5:44,5:42, 1 mL/min.; detector UV, 240 nm. Condições preparativas: coluna RP-18, 7 μ m, 250 x 25 mm; eluente: ACN/MeOH/H₂O 13,5:44,5:42, 12 mL/min.; detector UV, 240 nm.

6.5 Dados físicos complementares e quantidades das substâncias isoladas

• A.1 (22,0 mg)

IV $\nu_{\text{filme max.}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3430, 1742, 1241, 1173, 1031

• A.2 (16,0 mg)

IV $\nu_{\text{filme max.}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3457, 1740, 1241, 1171, 1031

• B.1 (139,0 mg)

$[\alpha]_D^{24}$: + 48,7° (CHCl₃; *c* 0,575)

IV $\nu_{\text{KBr max.}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3442, 1747, 1697, 1275, 1260, 1235, 1130, 1024

• B.2 (122,9 mg)

$[\alpha]_D^{24}$: + 37,6° (acetona; *c* 0,34)

IV $\nu_{\text{KBr max.}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3453, 1748, 1696, 1276, 1255, 1235, 1131, 1034

• C.1 (29,5 mg)

$[\alpha]_D^{24}$: + 70,7° (acetona; *c* 0,18)

• C.2 (33,5 mg)

$[\alpha]_D^{23}$: + 19,8° (CHCl₃; *c* 0,092)

• F.1 (26,0 mg)

$[\alpha]_D^{24}$: - 15,8° (acetona; *c* 0,1) [Lit. -7,4° (acetona)]⁸³

IV $\nu_{\text{KBr max.}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3438, 1752, 1702, 1282, 1119, 1026

• **F.2** (33,0 mg)

$[\alpha]_D^{24} : - 34,2^\circ$ (MeOH; c 0,24)

IV $\nu_{\max.}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3433, 1765, 1701, 1283, 1121, 1045

• **G.1** (89,0 mg)

$[\alpha]_D^{24} : + 58,5^\circ$ (CHCl₃; c 0,41)

IV $\nu_{\max.}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3452, 1746, 1690, 1264, 1231, 1127, 1039

• **G.2** (61,0 mg)

$[\alpha]_D^{24} : + 41,2^\circ$ (CHCl₃; c 0,422)

IV $\nu_{\max.}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3439, 1745, 1690, 1263, 1127, 1039

• **H.1** (12,0 mg)

$[\alpha]_D^{24} : - 9,7^\circ$ (CHCl₃; c 0,6)

IV $\nu_{\max.}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3445, 1740, 1254, 1194, 1123, 1026

• **H.2** (21,0 mg)

$[\alpha]_D^{24} : - 11,7^\circ$ (CHCl₃; c 0,35)

IV $\nu_{\max.}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3444, 1740, 1254, 1196, 1123, 1040, 1028

• **I** (10,0 mg)

$[\alpha]_D^{23} : - 42,9^\circ$ (C₅H₅N; c 0,108) [Lit. - 41,7° (C₅H₅N)]¹⁰⁰

IV $\nu_{\max.}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3405, 1105, 1074, 1025, 925, 892

6.6 Material e Equipamentos utilizados

As sementes de *Trichilia elegans* ssp. *elegans* foram moídas em moinho de facas tipo Wiley, da marca Tecnal.

Foram utilizados para extração, partição por solventes e técnicas cromatográficas (com exceção de CLAE) solventes de grau P.A. (Merck, Grupo Química ou Vetec) ou grau técnico (B. Herzog), estes após destilação fracionada. No caso de CLAE e nas determinações de rotação óptica, foram empregados solventes de grau cromatográfico (Merck).

Nas separações cromatográficas foram utilizados:

- gel de sílica do tipo 60G e/ou 60GF₂₅₄ (5-40 µm, Merck) em camadas de 0,25mm de espessura para CCDA.

- gel de sílica do tipo 60PF₂₅₄ (5-40 µm, Merck) em camadas de 1,0mm de espessura para CCDP.

- gel de sílica do tipo 60, partículas de 63-200 µm (Merck) e Sephadex LH-20, partículas de 25-100 µm (Sigma) para cromatografia em coluna.

- gel de sílica do tipo 60, partículas de 40-63 µm (Merck) e tipo 60H, partículas de 5-40 µm (Merck), para cromatografia em coluna tipo “flash”.

A revelação dos cromatogramas em placas de camada delgada analítica foi feita através de inspeção à luz UV (254 nm) e empregando-se solução a 2% de sulfato cérico em H₂SO₄ 2N e/ou vapores de iodo.

Nas separações por CLAE foram utilizadas:

- bomba quaternária Perkin-Elmer series 4, com detetor UV/VIS variável HP 1050, para condições analíticas e semi-preparativas.

- bomba binária Perkin-Elmer series 3B, com detetor UV/VIS variável Perkin-Elmer LC-85B, para condições semi-preparativas.

- bomba binária Shimadzu LC 6AD, com detetor UV/VIS variável Shimadzu SPD-6 AV, para condições analíticas e semi-preparativas.

- coluna de fase reversa C-8 (base sílica derivatizada com octilsilano), com partículas de 60 Å de poro e diâmetro médio de 10 µm, dimensões de 4,6Ø x 250 mm (analítica) e 22Ø x 250 mm (semi-preparativa) [Perkin-Elmer].

- colunas de fase reversa C-18 (base sílica derivatizada com octadecilsilano), com partículas de 60 Å de poro e diâmetro médio de 4 µm, dimensões de 3,9Ø x 150 mm (Waters- Nova-Pak) e com diâmetro médio de 7 µm, dimensões 4,0Ø x 250 mm (Merck) [analíticas]; partículas de 60 Å de poro e diâmetro médio de 7 µm, dimensões de 25Ø x 250 mm (Merck) [semi-preparativa] e com partículas de 100 Å de poro e diâmetro médio de 5 µm, dimensões de 4,6Ø x 250 mm [analítica] e 20Ø x 250 mm [semi-preparativa] (Shimadzu).

As medidas de rotação óptica foram feitas em polarímetros digitais JASCO DIP-370, filtro de Na (589 nm) e cela de 0,1 dm (IQ-USP) e Perkin-Elmer 341, filtro de Na (589 nm) e cela de 1 dm (DQI-UFMS).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200 (200 MHz) [IQ-USP] e DPX-300 (300 MHz) [DQI-UFMS e IQ-USP]. Os experimentos de HMBC foram realizados a 400 MHz, pelo Dr. Leslie Gunatilaka, num espectrômetro Varian Unity-400, por cortesia do Dr. David Kingston (Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA., U.S.A.). Foram utilizados como padrões de referência interna os sinais dos solventes: δ_{H} 7,24 e δ_{C}

77,0 para CDCl_3 , δ_{H} 3,30 e δ_{C} 49,0 para CD_3OD , δ_{H} 2,04 e δ_{C} 29,8 e 206,0 para $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ e δ_{C} 149,9; 135,5 e 123,5 para Py d-5. Os solventes deuterados empregados foram os das marcas Merck ou Aldrich.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT 1750, tendo sido as amostras preparadas sob a forma de discos prensados de KBr ou de filmes, utilizando-se janelas de NaCl. O padrão de referência empregado foi a absorção da água em 1638 cm^{-1} .

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em:

- espectrômetro Micromass Platform II (quadrupolo), utilizando-se o método de injeção tipo “loop” e ionização por “electrospray” em íons positivos e negativos. Os espectros foram obtidos pelo Sr. Mark Bayliss, por cortesia da Micromass UK Limited (U.K.).

- espectrômetro Finnigan MAT, modelo INCOS 50, utilizando-se injeção direta e impacto eletrônico a 70 eV.

Os dados de difração de raios-X foram obtidos no Instituto de Física de São Carlos-USP, em um difratômetro CAD-4, pelo Prof. Dr. Júlio Zukerman-Schpector, tendo sido as amostras cristalizadas em EtOH.

Os bioensaios para atividade antitumoral, utilizando linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, foram realizados pela Prof^a Dr^a Ligia Maria Marino Valente (UFRJ), no Laboratório para Bioensaio de Atividade Antitumoral, Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ, RJ. As amostras foram testadas numa concentração de 1,0 mg/mL em DMSO/MeOH (1:1), tendo sido utilizadas as cepas RS188N (rad +) “wild type”, RS322YK (rad 52Y) e RS321N (rad 321).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PENNINGTON, T. D. e STYLES, B. T. A generic monograph of the Meliaceae. *Blumea*, **22**, 419-540, 1975.
2. CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, v. 1-6, 1984.
3. TAYLOR, D. A. H. Biogenesis, distribution and systematic significance of limonoids in the Meliaceae, Cneoraceae and allied taxa. In WATERMAN, P. G. e GRUNDON, M. F. eds. Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales, London, Academic Press, 1983, p. 353-375.
4. TAYLOR, D. A. H. The chemistry of the limonoids from Meliaceae. In HERZ, W., GRISEBACH, H. e KIRBY, G. W. eds. Progress in the chemistry of organic natural products, New York, Springer, v. 45, 1984, p. 1-102.
5. SILVA, M. F. G. F. e GOTTLIEB, O. R. Evolution of quassinoids and limonoids in the Rutales. *Biochem. Syst. Ecol.* **15**, 85-103, 1987.
6. CHAMPAGNE, D. E., KOUL, O., ISMAN, M. B., SLUDDER, G. G. E. e NEIL TOWERS, G. H. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, **31**, 377-394, 1992.
7. BENTLEY, M. D., ADUL, G. D., ALFORD, A. R., HUANG, F. Y., GELBAUM, L. e HASSANALI, A. An insect antifeedant limonoid from *Turreae nilotica*. *J. Nat. Prod.* **58**, 748-750, 1995.
8. CHEN, W., ISMAN, M. B. e CHIN, S. F. Antifeedant and growth inhibitory effects of the limonoid toosendanin and *Melia toosendan* extracts on the variegated cutworm, *Peridroma saucia*. *J. Appl. Entom.* **119**, 367-370, 1995.

9. HUANG, R. C., OKAMURA, H., IWAGAWA, T., TADERA, K. e NAKATANI, M. Azadirachtin C, a limonoid antifeedant from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* **38**, 593-594, 1995.
10. NAKATANI, M., HUANG, R. C., OKAMURA, M., IWAGAWA, T., TADERA, K. e NAOKI, H. Three new antifeeding meliacarpinins from chinese *Melia azedarach* Linn. *Tetrahedron*, **51**, 11731-11736, 1995.
11. GOVINDACHARI, T. R., NARASIMHAN, N. S., SURESH, G., PARTHO, P. D., GOPALAKRISHNAN, G. e KRISHNA KUMARI, G. N. Structure insect antifeedant and growth regulating activities of some limonoids. *J. Chem. Ecol.* **21**, 1585-1600, 1995.
12. ZHOU, J. B., OKAMURA, H., IWAGAWA, T. e NAKATANI, M. Limonoid antifeedants from *Melia toosedan*. *Phytochemistry* **41**, 117-120, 1996.
13. NAKATANI, M., ZHOU, J. B., NAKAYAMA, N., OKAMURA, H. e IWAGAWA, T. Nimbolidins C-E, limonoid antifeedants from *Melia toosedan*. *Phytochemistry*, **41**, 739-743, 1996.
14. SRIVASTAVA, S. D. e SRIVASTAVA, S. K. Insect antifeedant novel limonoids from the roots of *Melia azedarach*. *J. Ind. Chem. Soc.* **73**, 467-469, 1996.
15. GOVINDACHARI, T. R., NARASIMHAN, N. S., SURESH, G., PARTHO, P. D. e GOPALAKRISHNAN, G. Insect antifeedant and growth-regulating activities of salannin and other C-*seco* limonoids from neem oil in relation to azadirachtin. *J. Chem Ecol.* **22**, 1453-1461, 1996.
16. HANSEN, D. J., CUOMO, J., KHAN, M., GALLAGHER, R. T. e ELLENBERGER, W. P. Advances in neem and azadirachtin

- chemistry and bioactivity. In HEDIN, P. A., MENN, J. J. e HOLLINGWORTH, R. M. eds. Natural and Engineered Pest Management Agents - ACS Symposium Series 551. Washington, American Chemical Society, 1994, p.103-129.
17. LEY, S. V., DENHOLM, A. A. e WOOD, A. The chemistry of azadirachtin. *Nat Prod. Rep.*, **10**, 109-155, 1993.
 18. KIE, Y. S., ISMAN, M. B., GUNNING, P., MACKINNON, S., ARNASON, J. T., TAYLOR, D. R., SANCHEZ, P., HASBUN, C. e NEIL TOWERS, G. H. Biological Activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against lepidopteran larvae. *Biochem. Syst. Ecol.* **22**, 129-136, 1994.
 19. NAKATANI, M., JAMES, J. C. e NAKANISHI, K. Isolation and structures of trichilins, antifeedants against the southern army worm. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1228-1230, 1981.
 20. KUBO, I. e KLOCKE, J. A. An insect growth inhibitor from *Trichilia roka* (Meliaceae). *Experientia*, **38**, 639-640, 1982.
 21. NAKATANI, M., OKAMOTO, M., IWASHITA, T., MIZUKAWA, K., NAOKI, H. e HASE, T. Isolation and structures of three *seco*-limonoids, insect antifeedants from *Trichilia roka* (Meliaceae). *Heterocycles*, **22**, 2335-2340, 1984.
 22. LIDERT, Z., TAYLOR, D. A. H e THIRUGNANAM, M. Insect antifeeding activity of four prierianin-type limonoids. *J. Nat. Prod.* **48**, 843-845, 1985.
 23. ITOKAWA, H., QIAO, Z. S., HIROBE, C. e TAKEYA, K. Cytotoxic limonoids and tetranortriterpenoids from *Melia azedarach*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 1171-1175, 1995.

24. COHEN, E., QUISTAD, G. B. e CASIDA, J. E. Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadirone and other limonoids from neem insecticide. *Life Sci.* **58**, 1075-1081, 1996.
25. TAKEYA, K., QIAO, Z. S., HIROBE, C., ITOKAWA, H. Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* **42**, 709-712, 1996.
26. LAM, L. K. T, ZHANG, J. e HASEGAWA, S. Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. *Food Technology* **48**, 104-108, 1994.
27. JOLAD, S. D., HOFFMANN, J. J., SCHRAM, K. H., COLE, J. R., TEMPESTA, M. S. e BATES, R. B. Constituents of the cytotoxic limonoids: hispidins A, B and C. *J. Org. Chem.* **46**, 641-644, 1981.
28. MUSZA, L. L., KILLAR, L. M., SPEIGHT, P., BARROW, C. J., GILLUM, A. M. e COOPER, R. Minor limonoids from *Trichilia rubra*. *Phytochemistry*, **39**, 621-624, 1995.
29. MUSZA, L. L., KILLAR, L. M., SPEIGHT, P., MCELHINEY, S., BARROW, C. J., GILLUM, A. M. e COOPER, R. Potent new cell adhesion inhibitory compounds from the root of *Trichilia rubra*. *Tetrahedron*, **50**, 11369-11378, 1994.
30. BRAY, D. H., WARHURST, D. C., CONNOLLY, J. D., O'NEILL, M. J. e PHILLIPSON, J. D. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of Meliaceae plants and their constituent limonoids. *Phytotherapy Res.* **4**, 29-35, 1990.
31. NORES, M. M., COURRÈGES, M. C., BENENCIA, F. e COULOMBIÉ, F. C. Immunomodulatory activities of *Cedrela lilloi* and *Trichilia elegans* aqueous leaf extracts. *J. Ethnopharmacol.*, **55**, 99-106, 1997.

32. KETWARU, P., KLASS, J., TINTO, W. F., MCLEAN, S. e REYNOLDS, W. F. Pregnane steroids from *Trichilia schomburgkii*. *J. Nat. Prod.*, **56**, 430-431, 1993.
33. PURUSHOTHAMAN, K. K., SARADA, A. e VENKATANARASIMHAN, M. Structure of heynic acid: a new triterpene acid from *Heynea trijuga* Roxb. *Ind. J. Chem.* **22B**, 820-821, 1983.
34. PUPO, M. T., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B. e SILVA, M. F. G. F. A cycloartane triterpenoid and ω -phenyl alkanoic and alkenoic acids from *Trichilia claussenii*. *Phytochemistry*, **42**, 795-798, 1996.
35. GARCEZ, W. S., GARCEZ, F. R., RAMOS, L., CAMARGO, M. J. e DAMASCENO JR., G. A. Sesquiterpenes from *Trichilia catigua*. *Fitoterapia*, **LXVIII**, 87-88, 1997.
36. TINTO, W. F., JAGESSAR, P. K., KETWARU, P., REYNOLDS, W. F. e MCLEAN, S. Constituents of *Trichilia schomburgkii*. *J. Nat. Prod.*, **54**, 972-977, 1991.
37. CHAURET, D. C., DURST, T., ARNASON, J. T., SANCHEZVINDAS, P., ROMAN, L. S., POVEDA, L. e KEIFER, P. A. Novel steroids from *Trichilia hirta* as identified by nanoprobe INADEQUATE 2D-NMR spectroscopy. *Tet. Lett.* **37**, 7875-7878, 1996.
38. CHAN, W. R. e TAYLOR, D. R. Hirtin and deacetylhirtin: new limonoids from *Trichilia hirta*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 206-207, 1966.
39. CORTEZ, D. A. G., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., SILVA, M. F. G. F., FERREIRA, A. G. Limonoids from *Trichilia hirta*. *Phytochemistry*, **31**, 625-628, 1992.

40. ARENAS, C. e RODRIGUEZ-HAHN, L. Limonoids from *Trichilia havanensis*. *Phytochemistry*, **29**, 2953-2956, 1990.
41. CHAN, W. R., GIBBS, J. A. e TAYLOR, D. R. The limonoids of *Trichilia havanensis*: an epoxide rearrangement. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 720-721, 1967.
42. CHAN, W. R., GIBBS, J. A. e TAYLOR, D. R. Triterpenoids from *Trichilia havanensis* Part I. The acetates of havanensin and trichilenone, new tetracarboxylic tetranortriterpenes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1047-1050, 1973.
43. RODRIGUEZ-HAHN, L., CÁRDENAS, J. e ARENAS, C. Trichavensin, a prieurianin derivative from *Trichilia havanensis*. *Phytochemistry*, **43**, 457-459, 1996.
44. TAYLOR, D. R. New limonoids from *Trichilia trifolia* (Meliaceae). *Rev. Latinoamer. Quím.* **2**, 87-92, 1971.
45. OKORIE, D. A. e TAYLOR, D. A. H. The structure of heudelottin, an extractive from *Trichilia heudelottii*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 83-84, 1967.
46. OKORIE, D. A. e TAYLOR, D. A. H. Limonoids from *Trichilia heudelottii* part II. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1488- 1490, 1972.
47. NAKATANI, M., IWASHITA, T., NAOKI, H. e HASE, T. Structure of a limonoid antifeedant from *Trichilia roka*. *Phytochemistry*, **24**, 195-196, 1985.
48. NAKATANI, M., IWASHITA, T., MIZUKAWA, K. e HASE, T. Trichilinin, a new hexacyclic limonoid from *Trichilia roka*. *Heterocycles*, **26**, 43-46, 1987.

49. MULHOLLAND, D. A. e TAYLOR, D. A. H. Limonoids from the seed of the Natal mahogany, *Trichilia dregeana*. *Phytochemistry*, **19**, 2421-2425, 1980.
50. GULLO, V. P., MIURA, I., NAKANISHI, K., CAMERON, A. F., CONNOLLY, J. D., DUNCANSON, F. D., HARDING, A. E., MCCRINDLE, R. e TAYLOR, D. A. H. Structure of prieurianin, a complex tetranortriterpenoid; nuclear magnetic resonance analysis at nonambient temperatures and X-ray structure determination. *J Chem Soc. Chem. Comm.*, 345-346, 1975.
51. CONNOLLY, J. D., OKORIE, D. A., DE WIT, L. D. e TAYLOR, D. A. H. Structure of dregeanin and rohitukin, limonoids from the subfamily Melioideae of the family Meliaceae. An unusual high absorption frequency for a six-membered lactone ring. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 909-910, 1976.
52. BANERJI, B. e NIGAM, S. K. Wood constituents of Meliaceae: a review. *Fitoterapia* **LV**, 3-36, 1984.
53. CONNOLLY, J. D., LABBÉ, C., RYCROFT, D. S., OKORIE, D. e TAYLOR, D. A. H. Tetranortriterpenoids and related compounds. Part 23. Complex tetranortriterpenoids from *Trichilia prieuriana* and *Guarea thompsonii*. *J. Chem. Res. (S)*, 256,(M),2858-2886, 1979.
54. MACLACHLAN, L. K. e TAYLOR, D. A. H. A revision of the structures of three limonoids. *Phytochemistry*, **21**, 2426-2427, 1982.
55. ADESIDA, G. A. e OKORIE, D. A. Heudebolin, a new limonoid from *Trichilia heudelottii*. *Phytochemistry*, **12**, 3007- 3008, 1973.
56. PURUSHOTHAMAN, K. K., VENKATANARASIMHAN, M., SARADA, A., CONNOLLY, J. D. e RYCROFT, D. S. Trijugins A

- and B, tetranortriterpenoids with a novel rearranged carbon skeleton from *Heynea trijuga* (Meliaceae). *Can. J. Chem.*, **65**, 35-37, 1987.
57. VENKATANARASIMHAN, M. e KUNDU, A. B. Isolation and characterization of trijugin-B acetate from *Heynea trijuga* Roxb. *Ind. J. Chem.*, **29B**, 970, 1990.
 58. INADA, A., KONISHI, M., MURATA, H. e NAKANISHI, T. Structures of a new limonoid and a new triterpenoid derivative from pericarps of *Trichilia connaroides*. *J. Nat. Prod.*, **57**, 1446-1449, 1994.
 59. NAKATANI, M. e NAKANISHI, K. Structures of antifeedant limonoids trichilins F and G, from *Trichilia roka*. *Heterocycles*, **36**, 725-731, 1993.
 60. JOLAD, S. D., HOFFMANN, J. J., COLE, J. R., TEMPESTA, M. S. e BATES, R. B. Constituents of *Trichilia hispida* (Meliaceae). 2. A new triterpenoid, hispidone and bourjotinolone A. *J. Org. Chem.*, **45**, 3132-3135, 1980.
 61. JOLAD, S. D., HOFFMANN, J. J., SCHRAM, K. H., COLE, J. R., TEMPESTA, M. S. e BATES, R. B. Constituents of *Trichilia hispida* (Meliaceae). 4. Hispidols A and B, two new tirucallane triterpenoids. *J. Org. Chem.*, **46**, 4085-4088, 1981.
 62. JOLAD, S. D., WIEDHOPF, R. H. e COLE, J. R. Cytotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae) I. Isolation of sapelins A and B. *J. Pharm. Sci.*, **66**, 889-890, 1977.
 63. OLUGBADE, T. A. Tetracyclic triterpenoids from *Trichilia prieuriana* leaves. *Phytochemistry*, **30**, 698-700, 1991.
 64. LOUREIRO, R. L., LIMA, J. P. S. e FONZAR, B. C. Estudo fitogeográfico. In Ministério das Minas e Energia ed. Projeto

- RADAMBRASIL Folha SE.21 Corumbá, Rio de Janeiro, v. 27, 1982, p. 329-372.
65. FURTADO, P. P., GUIMARÃES, J. G. e FONZAR, B. C. Estudo fitogeográfico. In Ministério das Minas e Energia ed. Projeto RADAMBRASIL Folha SF.21 Campo Grande, Rio de Janeiro, v. 28, 1982, p. 281-336.
 66. POTT, A. e POTT, V. J. Plantas do Pantanal. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994, p. 204.
 67. MACLACHLAN, L. K. e TAYLOR, D. A. H. Limonoids from *Nymania capensis*. *Phytochemistry*, **21**, 1701-1703, 1982.
 68. BREEN, G. J. W., RITCHIE, E., SIDWELL, W. T. L. e TAYLOR, W. C. The chemical constituents of australian *Flindersia* species. XIX. Triterpenoids from the leaves of *F. bourjotiana* F. Muell. *Aust. J. Chem.*, **19**, 455-481, 1966.
 69. GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., RODRIGUES, E. D., POTT, V. J. e ROQUE, N. F. Seco-protolimonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, **42**, 1399-1403, 1996.
 70. KISHI, K., YOSHIKAWA, K. e ARIHARA, S. Limonoids and protolimonoids from the fruits of *Phellodendron amurense*. *Phytochemistry*, **31**, 1335-1338, 1992.
 71. LYONS, C. W. e TAYLOR, D. R. Stereochemistry of sapelin B; correlation with sapelin D. Anomalies in the use of shift reagents for determining the absolute configurations of α -glycols. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 647-648, 1976.
 72. POWELL, J. W. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. A correlation of the spectra of some meliacins and their derivatives. *J. Chem. Soc. (C)*, 1794-1798, 1966.

73. SIDDIQUI, S., SIDDIQUI, B. S., FAIZI, S. e MAHMOOD, T. Tetracyclic triterpenoids and their derivatives from *Azadirachta indica*. *J. Nat. Prod.*, **51**, 30-43, 1988.
74. RAO, M. M., MESHULAM, H., ZELNIK, R. e LAVIE, D. Structure and stereochemistry of limonoids of *Cabralea eichleriana*. *Phytochemistry*, **14**, 1071-1075, 1975.
75. BURKE, B. A., CHAN, W. R., MAGNUS, K. E. e TAYLOR, D. R. Extractives of *Cedrela odorata* L.-III. The structure of photogedunin. *Tetrahedron*, **25**, 5007-5011, 1969.
76. CONNOLLY, J. D., LABBÉ, C., RYCROFT, D. S. e TAYLOR, D. A. H. Tetranortriterpenoids and related compounds. Part 22. New apotirucallol derivatives and tetranortriterpenoids from the wood and seeds of *Chisocheton paniculatus* (Meliaceae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2959-2964, 1979.
77. KRAUS, W. e GRIMMINGER, W. 23-(R,S)-hydroxytoonacilid und 21-(R,S)-hydroxytoonacilid, zwei neue B-*seco*-tetranortriterpenoid mit insektenfrasshemmender wirkung aus *Toona ciliata* M. J. Roem. var. *australis* (Meliaceae). *Nouv. J. Chim.*, **4**, 651-655, 1980.
78. AGOSTINHO, S. M., SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., PINHEIRO, A. L. e VILELA, E. F. Limonoids from *Toona ciliata* and speculations on their chemosystematic and ecological significance. *Biochem. Syst. Ecol.*, **22**, 323-328, 1994.
79. BENNETT, R. D. e HASEGAWA, S. 7 α -oxygenated limonoids from the Rutaceae. *Phytochemistry*, **21**, 2349-2534, 1982.
80. KHALID, S. A., DUDDECK, H. e GONZALEZ-SIERRA, M. Isolation and characterization of an antimalarial agent of the neem tree *Azadirachta indica*. *J. Nat. Prod.*, **52**, 922-927, 1989.

81. GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., TSUTSUMI, M. T. e ROQUE, N. F.
Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, **45**, 141-148, 1997.
82. KAWAGUCHI, H., KIM, M., ISHIDA, M., AHN, Y., YAMAMOTO, T., YAMAOKA, R., KOZUKA, M., GOTO, K. e TAKAHASHI, S.
Several antifeedants from *Phellodendron amurense* against *Reticulitermes speratus*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2635-2640, 1989.
83. KONDO, Y., SUZUKI, H. e NOZOE, S. Two γ -hidroxibutenolides from the bark of *Phellodendron amurense* and photooxidation of limonoids. *Yakugaku Zasshi*, **105**, 742-746, 1985.
84. MAKITA, T., OHTA, K. e NAKABAYASHI, T. New limonoid from the seeds of *Citrus natsudaoidai*. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 693-694, 1980.
85. OLANO NETO, J., AGOSTINHO, S. M. M., SILVA, M. F. G. F., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., PINHEIRO, A. L. e VILELA, E. F. Limonoids from seeds of *Toona ciliata* and their chemosystematic significance. *Phytochemistry*, **38**, 397-401, 1995.
86. AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, **31**, 3307-3330, 1992.
87. WRIGHT, J. L. C., McINNES, A. G., SHIMIZU, S., SMITH, D. G., WALTER, J. A., IDLER, D. e KHALIL, W. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Chem.*, **56**, 1898- 1903, 1978.
88. GUNATILAKA, L. A. A., KINGSTON, D. G. I. e JOHNSON, R. K. Mechanism-based isolation and structures of some anticancer active natural products. *Pure and Appl. Chem.*, **66**, 2219-2222, 1994.

89. ADESOGAN, E. K. e TAYLOR, D. A. H. Limonoid extractives from *Khaya ivorensis*. *J. Chem Soc. (C)*, 1710-1714, 1970.
90. PURUSHOTHAMAN, K. K., CHANDRASEKHARAN, S., CONNOLLY, J. D. e RYCROFT, D. S. Tetranortriterpenoids and related substances. Part 18. Two new tetranortriterpenoids with a modified furan ring from the bark of *Soymida febrifuga* A. Juss. (Meliaceae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1873-1875, 1977.
91. EPE, B. e MONDON, A. Zur kenntnis der bitterstoffe aus Cneoraceen, XII. *Tetrahedron Letters*, **22**, 2015-2018, 1979.
92. VIEIRA, P. C., LÁZARO, A. R., FERNANDES, J. B. e SILVA, M. F. G. F. The chemosystematics of *Dictyoloma*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **16**, 541-544, 1988.
93. SUNG, T. V., PHUONG, N. M., KAMPERDICK, C. e ADAM, G. Perforatinolone, a limonoid from *Harrisonia perforata*. *Phytochemistry*, **38**, 213-215, 1995.
94. RODRIGUES FILHO, E., FERNANDES, J. B., SILVA, M. F. G. F. e VIEIRA, P. C. Quassinoids and tetranortriterpenoids from *Picrolemma granatensis*. *Phytochemistry*, **34**, 501-504, 1993.
95. GARG, H. S. e BHAKUNI, D. S. Salannolide, a meliacin from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, **23**, 2383-2385, 1984.
96. SIDDIQUI, S., FAIZI, S., MAHMOOD, T. e SIDDIQUI, B. S. Two new insect growth regulator meliacins from *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1021-1025, 1986.
97. MELERA, A., SCHAFFNER, K., ARIGONI, D. e JEGER, O. Zur Konstitution des Limonins I. Über den Verlauf der alkalischen Hydrolyse von Limonin und Limonol. *Helv. Chim. Acta*, **XL**, 1420-1437, 1957.

98. SCHROEDER, D. R. e NAKANISHI, K. A simplified isolation procedure for azadirachtin. *J. Nat. Prod.*, **50**, 241-244, 1987.
99. CARDELINA II, J. H. Step gradient elution in gel permeation chromatography. A new approach to natural products separations. *J. Nat. Prod.*, **46**, 196-199, 1983.
100. DUNOUAU, C., BELLÉ, R., OULAD-ALI, A., ANTON, R. e DAVID, B. Triterpenes and sterols from *Ruscus aculeatus*. *Planta Med.*, **62**, 189-190, 1996.