

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“ATIVIDADE INSETICIDA DE ESPÉCIES DE *Trichilia*
FRENTE À LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO
Spodoptera frugiperda”**

LILIANE NEBO*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira
*** Bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2008**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

N361ai

Nebo, Liliane.

Atividade inseticida de espécies de *trichilia* frente à lagarta-do-cartucho do milho *spodoptera frugiperda* / Liliane Nebo. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
157 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Atividade inseticida. 4. *Spodoptera frugiperda*. 5. *Trichilia*. 6. *Meliaceae*. I. Título.

CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Liliane Nebo** realizado em 18 de julho de 2008:*



Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



Profª. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes



Profª. Dra. Mônica Tallarico Pupo

DEDICO ESTE TRABALHO
À MEMÓRIA DO MEU PAI, DENE NEBO
À MINHA MÃEZINHA QUERIDA, OLGA FUMICO NEBO
E A TODA MINHA FAMÍLIA, PELO AMOR E DEDICAÇÃO
E POR ESTAREM SEMPRE AO MEU LADO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pelo apoio, ensinamentos e orientação durante a realização deste trabalho.

Aos Professores, Dr. João Batista Fernandes, Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Dr. Edson Rodrigues Filho e Dra. Arlene Gonçalves Corrêa, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos demais professores do DQ-UFSCar pela contribuição na minha formação.

À Dra. Andréia Pereira Matos pelos ensinamentos, paciência, carinho e principalmente sua amizade.

Aos técnicos Waldir, Doraí, Paulo e Luciana pelo apoio durante este trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pela amizade, troca de experiências e ótimo convívio.

As alunas de iniciação científica Daniela, Alini e Érika que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos dos laboratórios de CLAE, SÍNTESE, MASSAS, RMN E LSPN, em especial à aluna Bruna do LSPN.

À minha mãe, aos meus irmãos, cunhados, cunhada, sobrinhas e sobrinhos, muito obrigada pelo amor, carinho e incentivo na realização deste sonho.

À minha irmã Carol pela amizade, conselhos e por me apoiar sempre.

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcO	Acetato
AcOEt	Acetato de etila
ax	Axial
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
D ₂ O	Água deuterada
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
<i>dq</i>	Duplo-quadrupletto
<i>dt</i>	Duplo-tripletto
<i>ddd</i>	Duplo-duplo-dubleto
<i>ddt</i>	Duplo-duplo-tripletto
eq	Equatorial
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
ESI/MS	Espectrometria de massas por ionização por <i>electrospray</i>
eV	Elétron volt
h	Altura
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Homonuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IE	Impacto eletrônico
<i>J</i>	Constante de acoplamento

<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Mega hertz
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
nm	nanômetro
OMe	Metoxila
p.	Página
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	tripleto
UR	Umidade relativa
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
ϕ	Diâmetro
λ	Comprimento de onda

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Classificação morfológica da família Meliaceae segundo Pennington e Styles (PENNINGTON, 1975)	5
TABELA 3.1: Identificação dos códigos dos extratos	25
TABELA 3.2: Resultado do ensaio realizado com as frações: Tslm1, Tslm2, Tslm3 e Tslm4 na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata	30
TABELA 3.3: Resultado do ensaio realizado com as frações: Tslm1-Fr1 a Tslm1-Fr6 na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata	31
TABELA 3.4: Resultado do ensaio realizado com as frações: Tslm1-Fr4(1) a Tslm1-Fr4(5) na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata	32
TABELA 3.5: Resultado do ensaio realizado com as frações: Tslm1-Fr4(4)-1 a Tslm1-Fr4(4)-6 na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata.	33
TABELA 3.6: Resultado do ensaio realizado com a fração Tslm1-Fr3(2) na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata.	34
TABELA 3.7: Identificação dos códigos dos ácidos graxos	38
TABELA 3.8: Resultado do ensaio realizado com as frações Tflcm1 a Tflcm4, na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata	41
TABELA 3.9: Compostos identificados na fração Tslm1-Fr4(4)-2, obtidos via CG-EM	50
TABELA 3.10: Compostos identificados na fração Tslm1-Fr3(2), obtidos via CG-EM	60
TABELA 3.11: Compostos identificados na fração Tslm1-Fr4(4)-3, obtidos via CG-EM	63
TABELA 3.12: Compostos identificados na fração Tslm1-Fr4(3), obtidos via CG-EM	71

TABELA 3.13: Dados de RMN de ^1H de N-metilprolina (XX) e comparação com a literatura	75
TABELA 3.14: Dados de RMN de ^1H de 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI) e comparação com a literatura	75
TABELA 3.15: Dados de RMN de ^{13}C de N-metilprolina (XX) e comparação com a literatura	76
TABELA 3.16: Dados de RMN de ^{13}C de 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI) e comparação com a literatura	76
TABELA 3.17: Dados de RMN de ^1H da uridina (XXII) e comparação com a literatura	80
TABELA 3.18: Dados de RMN de ^1H da uracila (XXIII) e comparação com a literatura	81
TABELA 3.19: Dados de RMN de ^{13}C da uridina (XXII) e comparação com a literatura	81
TABELA 3.20: Dados de RMN de ^1H da <i>ent</i> -catequina (XXIV) e comparação com a literatura	85
TABELA 3.21: Dados de RMN de ^{13}C da <i>ent</i> -catequina (XXIV) e comparação com a literatura	86
TABELA 3.22: Dados de RMN de ^1H do ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (XXV) e comparação com a literatura	90
TABELA 3.23: Dados de RMN de ^{13}C do ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (XXV) e comparação com a literatura	91
TABELA 3.24: Dados de RMN de ^1H de 11 β -acetoxiobacunona (XXVI) e comparação com a literatura (XXVIa).	99
TABELA 3.25: Dados de RMN de ^{13}C de 11 β -acetoxiobacunona (XXVI) e comparação com a literatura (XXVIa).	100
TABELA 3.26: Dados de RMN de ^1H de (XXVII) e comparação com a literatura (XXVIIa)	108

TABELA 3.27: Dados de RMN de ^{13}C de (XXVII) e comparação com a literatura (XXVIIa).	109
TABELA 3.28: Dados de RMN de ^{13}C da aglicona do sitosterol (XXVIII) e comparação com a literatura	117
TABELA 3.29: Dados de RMN de ^{13}C do grupo glicosil (XXVIII) e comparação com a literatura	118
TABELA 4.1: Extratos brutos das partes dos frutos de <i>T. elegans</i> e <i>T. clausseii</i>	126
TABELA 4.2: Extrato bruto das inflorescências de <i>T. catigua</i>	128
TABELA 4.3: Frações provenientes do fracionamento do extrato Tslm	129
TABELA 4.4: Frações provenientes do fracionamento do extrato Tflcm	134
TABELA 4.5: Frações provenientes do fracionamento do extrato Tcsem	137
TABELA 4.6: Frações provenientes do fracionamento do extrato Tsem	137

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1:	Estrutura dos limonóides gedunina e azadiractina	3
FIGURA 1.2:	Os triterpenos eufol (III) e tirucalol (IV)	3
FIGURA 1.3:	Substâncias que representam os principais tipos de esqueletos dos limonóides de Meliaceae	4
FIGURA 1.4:	O limonóide heudebolina	6
FIGURA 1.5:	Árvore adulta de <i>Trichilia clausenii</i> . Em destaque folhas com flores, frutos maduros sementes, casca e madeira	8
FIGURA 1.6:	γ -lactonas e ácidos ω -fenil alcanóicos e alcenóicos isolados dos frutos de <i>Trichilia clausenii</i>	9
FIGURA 1.7:	Esteróides isolados dos frutos de <i>Trichilia clausenii</i>	10
FIGURA 1.8:	Árvore adulta, folhas e flores de <i>Trichilia catigua</i>	10
FIGURA 1.9:	Limonóides isolados de sementes de <i>Trichilia catigua</i>	11
FIGURA 1.10:	Folhas e frutos de <i>Trichilia elegans</i> ssp. <i>elegans</i>	12
FIGURA 1.11:	Seco-A-protolimonóides isolados de sementes de <i>Trichilia elegans</i>	13
FIGURA 1.12:	Limonóides isolados de sementes de <i>Trichilia elegans</i>	14
FIGURA 1.13:	Limonóides isolados de sementes de <i>Trichilia elegans</i>	15
FIGURA 1.14:	Cumarinas isoladas dos frutos de <i>Trichilia elegans</i>	15
FIGURA 1.15:	Ciclo de vida da <i>Spodoptera frugiperda</i>	17
FIGURA 3.1:	Estrutura do TMOF, indicação da região do peptídeo em que foram baseados os ácidos não peptídicos	37
FIGURA 3.2:	Espectro de RMN ^1H da fração Tslm1-Fr4(4)-2 (400 MHz, CDCl_3)	48
FIGURA 3.3:	Cromatograma da fração Tslm1-Fr4(4)-2	49
FIGURA 3.4:	Ampliação do cromatograma da fração Tslm1-Fr4(4)-2	50

FIGURA 3.5	Espectros de massas referente aos picos 2, 3 e 5 obtidos via CG-EM.	51
FIGURA 3.6:	Espectros de massas referente aos picos 6, 8 e 9 obtidos via CG-EM	52
FIGURA 3.7	Espectros de massas referente aos picos 11, 12 e 13 obtidos via CG-EM	53
FIGURA 3.8:	Espectros de massas referente aos picos 14, 15 e 16 obtidos via CG-EM.	54
FIGURA 3.9:	Espectros de massas referente aos picos 17, 20 e 21 obtidos via CG-EM	55
FIGURA 3.10:	Espectros de massas referente aos picos 23, 25 e 26 obtidos via CG-EM	56
FIGURA 3.11:	Espectros de massas referente aos picos 27, 29 e 30 obtidos via CG-EM	57
FIGURA 3.12:	Espectro de RMN ^1H da fração Tslm1-Fr3(2) (400 MHz, CDCl_3)	59
FIGURA 3.13:	Cromatograma da fração Tslm1-Fr3(2)	59
FIGURA 3.14:	Cromatograma da fração Tslm1-Fr4(4)-3	63
FIGURA 3.15:	Principais fragmentos observados nos espectros de massas das γ -lactonas	64
FIGURA 3.16:	Espectros de massas referente aos picos 23 e 25 obtidos via CG-EM.	66
FIGURA 3.17:	Espectros de massas referente aos picos 26, 27 e 30 obtidos via CG-EM	67
FIGURA 3.18:	Espectros de massas referente aos picos 31, 32 e 33 obtidos via CG-EM	68
FIGURA 3.19:	Espectro de RMN de ^1H da fração Tslm1-Fr4(4)-3 (100 MHz, CDCl_3)	69

FIGURA 3.20: Espectro de RMN de ^{13}C da fração Tslm1-Fr4(4)-3 (100 MHz, CDCl_3)	69
FIGURA 3.21: Cromatograma da fração Tslm1-Fr4(3)	72
FIGURA 3.22: Espectro de massa referente ao pico 25 obtido via CG-EM	72
FIGURA 3.23: Espectros de massas referente aos picos 30 e 31 obtidos via CG-EM	73
FIGURA 3.24: Espectro de RMN de ^1H dos aminoácidos: N-metilprolina (XX) e 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI) (400 MHz, D_2O)	77
FIGURA 3.25: Ampliação do espectro de RMN de ^1H dos aminoácidos: N-metilprolina (XX) e 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI) (400 MHz, D_2O)	77
FIGURA 3.26 Espectro de RMN de ^{13}C dos aminoácidos: N-metilprolina (XX) e 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI) (100 MHz, D_2O)	78
FIGURA 3.27: Espectro de RMN de ^1H de XXII e XXIII (400 MHz, CD_3OD)	82
FIGURA 3.28: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de XXII e XXIII (400 MHz, CD_3OD)	82
FIGURA 3.29: Mapa de correlações HSQC de XXII e XXIII (400 MHz, CD_3OD)	83
FIGURA 3.30: Mapa de correlações HMBC de XXII e XXIII (400 MHz, CD_3OD)	83
FIGURA 3.31: Espectro de RMN de ^1H da <i>ent</i> -catequina (XXIV) (400 MHz, CD_3OD)	87
FIGURA 3.32: Expansão do espectro de RMN de ^1H da <i>ent</i> -catequina (XXIV) (400 MHz, CD_3OD)	87

FIGURA 3.33: Espectro de RMN de ^{13}C da <i>ent</i> -catequina (XXIV) (100 MHz, CD_3OD)	88
FIGURA 3.34: (A) Espectro de RMN de ^1H do ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (XXV) (400 MHz, CD_3OD). (B) Ampliação do espectro de RMN de ^1H de XXV	92
FIGURA 3.35: Mapa de correlações HSQC do ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (XXV) (400 MHz, CD_3OD)	93
FIGURA 3.36: Mapa de correlações HMBC do ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (XXV) (400 MHz, CD_3OD)	93
FIGURA 3.37: (A) Espectro de RMN de ^1H de 11 β -acetoxiobacunona (XXVI) (400 MHz, CDCl_3). (B) Ampliação do espectro de RMN de ^1H de XXVI	101
FIGURA 3.38: Espectro de RMN de ^{13}C de 11 β -acetoxiobacunona (XXVI) (100 MHz, CDCl_3)	102
FIGURA 3.39: Mapa de correlações HSQC de 11 β -acetoxiobacunona (XXVI) (400 MHz, CDCl_3)	102
FIGURA 3.40: Mapa de correlações HMBC de 11 β -acetoxiobacunona (XXVI) (400 MHz, CDCl_3)	103
FIGURA 3.41: Ampliação do mapa de correlações HMBC de 11 β -acetoxiobacunona (XXVI) (400 MHz, CDCl_3)	103
FIGURA 3.42: Espectro de RMN de ^1H de XXVII (400 MHz, CDCl_3)	110
FIGURA 3.43: Espectro de RMN de ^{13}C de XXVII (100 MHz, CDCl_3)	110
FIGURA 3.44: Espectro de Cosy ^1H - ^1H de XXVII (400 MHz, CDCl_3)	111
FIGURA 3.45: Mapa de correlações HSQC de XXVII (400 MHz, CDCl_3)	111
FIGURA 3.46: Mapa de correlações HMBC de XXVII (400 MHz, CDCl_3)	112
FIGURA 3.47: Ampliação do mapa de correlações HMBC de XXVII (400 MHz, CDCl_3)	112

- FIGURA 3.48: Espectro de massas (ESI no modo positivo) do limonóide (**XXVII**) 113
- FIGURA 3.49: Espectro de RMN de ^1H do 3- β -O- β -glucopiranosil sitosterol (**XXVIII**) (400 MHz, Piridina- d_5). 115
- FIGURA 3.50: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do 3- β -O- β -glucopiranosil sitosterol (**XXVIII**) (400 MHz, Piridina- d_5). 115
- FIGURA 3.51: Espectro de RMN de ^{13}C do 3- β -O- β -glucopiranosil sitosterol (**XXVIII**) (100 MHz, Piridina- d_5). 116

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 4.1:	Obtenção dos extratos de espécies de <i>Trichilia</i>	127
FLUXOGRAMA 4.2:	Procedimento geral de partição líquido-líquido dos extratos metanólicos	129
FLUXOGRAMA 4.3:	Fracionamento da fração Tslm1 e Tslm1(Fr-3)	130
FLUXOGRAMA 4.4:	Fracionamento da fração Tslm1Fr(4) e Tslm1Fr(4)-4	131
FLUXOGRAMA 4.5:	Fracionamento da fração Tslm3	133
FLUXOGRAMA 4.6:	Fracionamento da fração Tflcm1	135
FLUXOGRAMA 4.7:	Fracionamento da fração Tflcm2	136
FLUXOGRAMA 4.8:	Fracionamento da fração Tcsem2	139
FLUXOGRAMA 4.9:	Fracionamento da fração Tsem2	140
FLUXOGRAMA 4.10:	Fracionamento do extrato Tseh	141

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 3.1:	Resultado do ensaio de toxicidade realizado com extratos de <i>T. elegans</i> na concentração de 1,0 mg/mL em quintuplicata	26
GRÁFICO 3.2:	Resultado do ensaio realizado com extratos de <i>T. elegans</i> na concentração de 10,0 mg/mL	27
GRÁFICO 3.3:	Resultado do ensaio realizado com extratos de <i>T. clausenii</i> na concentração de 10,0 mg/mL	28
GRÁFICO 3.4:	Resultado do ensaio realizado com extrato de <i>T. catigua</i> na concentração de 10,0 mg/mL	28
GRÁFICO 3.5:	Resultado do ensaio realizado com os ácidos graxos (C5-C16) na concentração de 1,0 mg/mL em triplicata	38
GRÁFICO 3.6:	Resultado do ensaio realizado com os ácidos graxos (C5-C16) na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata	39

LISTA DE ESQUEMA

ESQUEMA 3.1:	Metodologia geral utilizada na obtenção de substâncias ativas	24
--------------	---	----

RESUMO

ATIVIDADE INSETICIDA DE ESPÉCIES DE *Trichilia* FRENTE À LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO *Spodoptera frugiperda* – Este trabalho apresenta o estudo fitoquímico e os ensaios biológicos realizados com os extratos orgânicos dos frutos e sementes das espécies *Trichilia clausenii*, *T. elegans* e inflorescências *T. catigua* sobre *Spodoptera frugiperda*. Dentre os extratos ensaiados, os extratos metanólicos das sementes de *T. clausenii* e inflorescências de *T. catigua* foram os que apresentaram a mais alta atividade inseticida, com 64,0 e 64,4 % de mortalidade, respectivamente. O estudo biomonitorado do extrato metanólico das sementes de *T. clausenii* levou a identificação dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos, substâncias ativas neste extrato. Do extrato metanólico das inflorescências de *T. catigua* foi isolado o flavonóide *ent*-catequina, associado à atividade inseticida encontrada neste extrato. Ácidos graxos com cadeias metilênicas variando entre C-5 a C-16 foram testados sobre *S. frugiperda*. Ensaios mostraram que os ácidos hexanóico, nonanóico e decanóico apresentaram altas taxas de mortalidade na concentração de 10,0 mg/mL. Através do estudo dessas três espécies foi possível isolar e ou identificar as substâncias: ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos, γ -lactonas, 4-hidróxi-N-metilprolina, N-metilprolina, uridina, uracila, *ent*-catequina, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, os esteróides 3- β -*O*- β -D-glucopiranosil sitosterol, β -sitosterol, campesterol, estigmasterol e sitostenona. Sendo os limonóides 11 β -acetoxiobacunona e 1,2-diidro-1 α -acetoxi-11 β -acetoxi-14,15-epoxicneorina R isolados pela primeira vez no gênero *Trichilia*.

ABSTRACT

INSECTICIDAL ACTIVITY OF *Trichilia* SPECIES AGAINST ON FALL ARMYWORM *Spodoptera frugiperda*. This work presents the phytochemical study and biological assays carried out with organic extracts of fruits and seeds from *Trichilia clausenii*, *T. elegans* and inflorescence from *T. catigua* against *S. frugiperda*. Among the extracts assayed, the methanol extracts of seeds from *T. clausenii* and inflorescence from *T. catigua* presented the highest insecticidal activity, with 64,0 and 64,4 % of mortality, respectively. The bioassay-guided study of the methanol extract of seeds from *T. clausenii* led to identification of ω -phenylalkyl and alkenyl fatty acids, active substances in this extract. The flavonoid *ent*-catequin was isolated from the methanol extract of inflorescence from *T. catigua* and it was associated with the insecticidal activity found in this extract. Fatty acids with the methylene chains ranging from C-5 to C-16 were assayed against *S. frugiperda*. Tests showed that the hexanoic, nonanoic and decanoic acids, displayed the highest rate of mortality at concentration of 10,0 mg/mL. The study of the three species allowed isolating and identifying the following compounds: a mixture of ω -phenylalkyl and alkenyl fatty acids, γ -lactonas, 4-hydroxy-N-methylproline, N-methylproline, uridine, uracile, *ent*-catequin, 5-*O*-cafeoylquinic acid and the steroids 3- β -*O*- β -D-glucopyranosilsitosterol, β -sitosterol, campesterol, estigmasterol e sitostenone. The limonoids 11 β -acetoxyobacunone and 1,2-dihydro-1 α -acetoxy-11 β -acetoxy-14,15-epoxycneorin R were isolated for the first time from a *Trichilia* species.

SUMÁRIO

1- Introdução	2
1.1 – A família Meliaceae	2
1.2 – O gênero <i>Trichilia</i>	5
1.2.1 - <i>Trichilia clausenii</i> C. DC.	8
1.2.1.1 – Constituintes químicos anteriormente isolados de frutos de <i>Trichilia clausenii</i> C. DC.	9
1.2.2 – <i>Trichilia catigua</i> A. Juss.	10
1.2.2.1 – Constituintes químicos anteriormente isolados de sementes de <i>Trichilia catigua</i> A. Juss.	11
1.2.3 - <i>Trichilia elegans</i> ssp. <i>elegans</i> A. Juss	12
1.2.3.1 - Constituintes químicos anteriormente isolados de frutos e sementes <i>Trichilia elegans</i> A. Juss.	13
1.3 Considerações sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae)	16
1.4 – Atividade de espécies de <i>Trichilia</i> sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	18
1.5 – A busca de novos compostos inseticidas para o controle de insetos-praga	20
2 – Objetivos	21
3 – Resultados e Discussões	23
3.1 - Busca de substâncias com atividade inseticida sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	24
3.1.1 - Extratos de espécies de <i>Trichilia</i>	24
3.1.2 - Avaliação da atividade inseticida dos extratos brutos de <i>Trichilia</i> ssp. sobre lagarta <i>Spodoptera frugiperda</i>	25
3.1.2.1 - Ensaio biológico realizado com o extrato metanólico das sementes de <i>T. clausenii</i>	29

3.1.2.2 - Ensaio biológico realizado com ácidos graxos	37
3.1.2.3 - Ensaio biológico realizado com o extrato metanólico das inflorescências de <i>T. catigua</i>	40
3.2 – Substâncias isoladas e identificadas	42
3.3 – Identificação estrutural	47
3.3.1 - Identificação dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos (I-VIII)	47
3.3.2 - Identificação das γ -lactonas (IX-XIX)	61
3.3.3 – Identificação dos aminoácidos N-metilprolina (XX) e 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI)	74
3.3.4 - Identificação da uridina (XXII) e uracila (XXIII)	79
3.3.5 - Identificação do flavonóide <i>ent</i> -catequina (XXIV)	84
3.3.6 - Identificação do ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (XXV)	89
3.3.7 – Determinação estrutural dos limonóides	94
3.3.7.1 – Identificação do limonóide 11 β -acetoxiobacunona (XXVI)	95
3.3.7.2 – Identificação do limonóide 1,2 –diidro-1 α -acetoxi-11 β -acetoxi-14,15-epoxicneorina R (XXVII)	104
3.3.8 – Identificação dos esteróides	114
3.3.8.1 – Identificação de 3- β - <i>O</i> - β -glucopiranosil sitosterol (XXVIII)	114
3.3.8.2 – Identificação da mistura do esteróides (XXIX a XXXII)	119
4 – Procedimentos Experimentais	121
4.1 – Materiais e Métodos	122
4.2 – Equipamentos	123
4.3 – Material Botânico	125
4.4 – Preparação dos materiais vegetais e obtenção extratos brutos de <i>T. catigua</i> , <i>T. elegans</i> e <i>T. clausenii</i>	125
4.4.1 – Obtenção dos extratos brutos dos frutos de <i>T. clausenii</i> e <i>T. elegans</i>	125
4.4.2 – Obtenção dos extratos brutos da inflorescência de <i>T. catigua</i>	127

4.5 – Fracionamento dos extratos de espécies de <i>Trichilia</i>	128
4.5.1 – Fracionamento do extrato Tslm	128
4.5.1.1 – Fracionamento da fração Tslm1	130
4.5.1.2 – Fracionamento da fração Tslm3	132
4.5.2 – Fracionamento do extrato Tflcm	134
4.5.2.1 – Fracionamento das frações Tflcm1 e Tflcm2	135
4.5.3 – Fracionamento dos extratos Tcsem e Tsem	137
4.5.3.1 – Fracionamento da fração Tcsem2	139
4.5.3.2 – Fracionamento da fração Tsem2	140
4.5.3.3 – Fracionamento do extrato Tseh	141
4.6 – Reação de esterificação com diazometano	142
4.7 – Ensaio biológico	143
4.7.1 - Ensaio de toxicidade realizados sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	143
5 – Conclusões	145
6 – Referências Bibliográficas	150

PARTE 1
INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - A família Meliaceae

A família Meliaceae, pertencente à ordem Rutales, é constituída por 51 gêneros de plantas lenhosas que se distribuem em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios terrestres. O número de espécies é de aproximadamente 1400 (BANERJI, 1984). Os gêneros encontrados no Brasil são *Cedrela*, *Cabralea*, *Swietenia*, *Carapa*, *Guarea* e *Trichilia*, sendo os três primeiros exclusivamente americanos (PENNINGTON & STYLES, 1975).

As meliáceas, geralmente são árvores de grande porte, conhecidas pela qualidade de suas madeiras (mogno, cedro-rosa, canjerana) (BANERJI & NIGAN, 1984), elas também se destacam pela bioatividade de vários de seus metabólitos secundários, principalmente os limonóides. Esta classe de compostos tem apresentado diversos tipos de atividades biológicas, tais como: antiparasitária, citotóxica, antimalárica, antiviral, antibacteriana e principalmente inseticida (BRAY *et al.*, 1990; CHAMPAGNE *et al.*, 1992).

A química dos limonóides de Meliaceae começou em 1960, com o isolamento da gedunina (I) (FIGURA 1.1) de *Entandrophragma angolense* (TAYLOR, 1984). A partir de então muitos limonóides têm sido isolados de espécies desta família, sendo a azadiractina (II) (FIGURA 1.1) de *Azadirachta indica* (Meliaceae) (BUTTERWORTH & MORGAN, 1968) o mais conhecido. A azadiractina possui um grande potencial inseticida, apresentando atividade frente a várias espécies de insetos. Este composto interfere no funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos, impedindo o desenvolvimento da ecdise (REMBOLD, 1989).

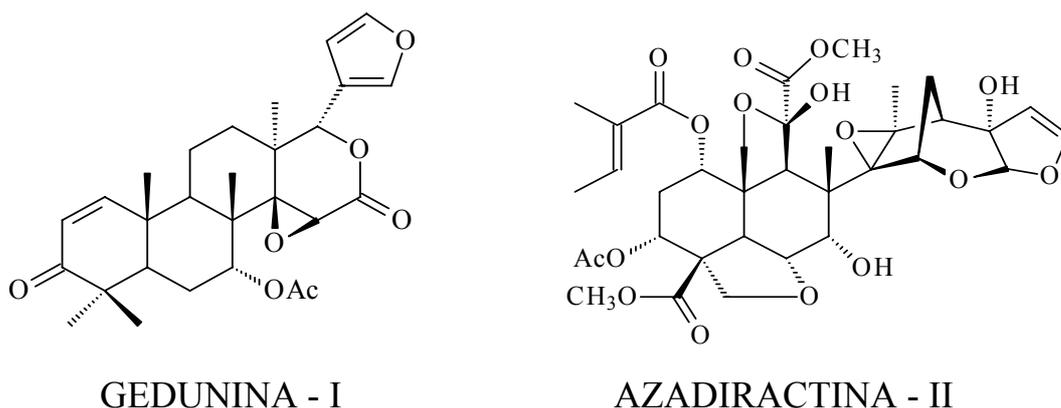


FIGURA 1.1 - Estrutura dos limonóides gedunina e azadiractina.

A azadiractina apresenta atividade fagoinibidora, que constitui uma das atividades mais relevantes relatadas para as plantas da família Meliaceae (LEE *et al.*, 1991), seu efeito foi comprovado para aproximadamente 300 espécies de insetos (MARTINEZ, 2002).

Quimicamente, os limonóides são derivados de triterpenos tetracíclicos, eufol (III) ou tirucalol (IV) (FIGURA 1.2), onde ocorrem várias oxidações e rearranjos, levando à formação de diferentes tipos estruturais (CONNOLLY, 1983). Segundo a classificação de proposta por Taylor (1984), os limonóides isolados de Meliaceae podem ser divididos em onze grupos principais, de acordo com o padrão de esqueleto carbônico apresentado (FIGURA 1.3).

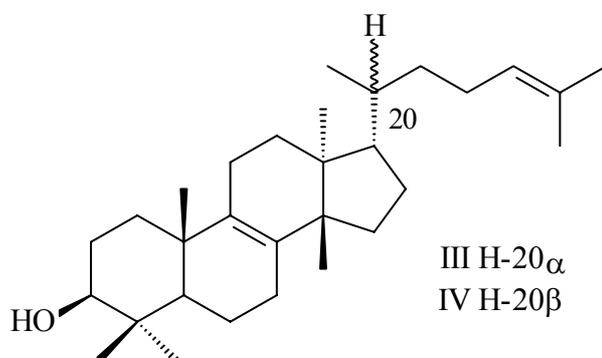


FIGURA 1.2 - Os triterpenos eufol (III) e tirucalol (IV).

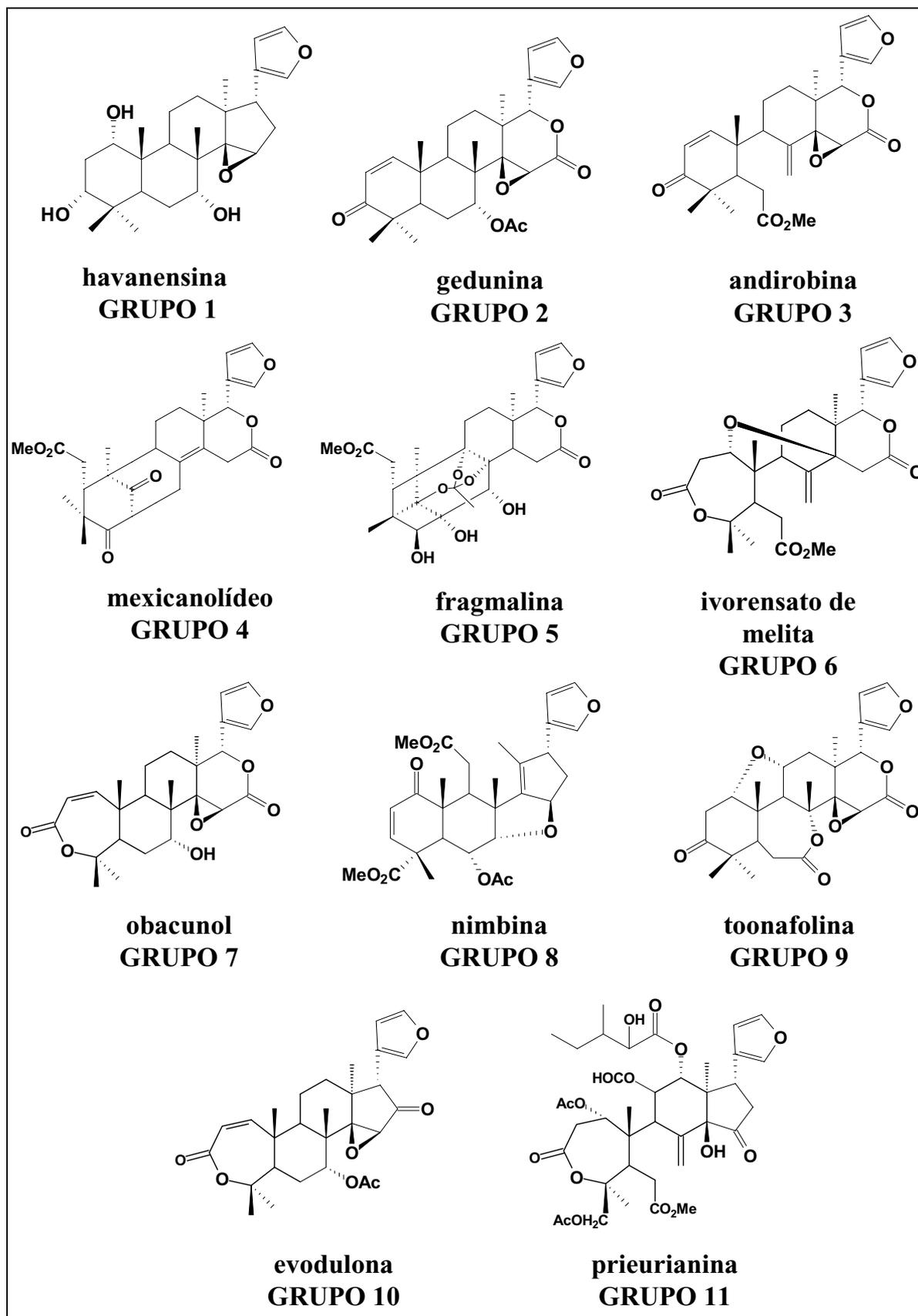


FIGURA 1.3 – Substâncias que representam os principais tipos de esqueletos dos limonóides de Meliaceae (TAYLOR, 1984).

1.2 - O gênero *Trichilia*

Segundo a classificação morfológica de Pennington e Styles (PENNINGTON, 1975) o gênero *Trichilia* encontra-se na mesma sub-família que os gêneros *Melia* e *Azadirachta* (TABELA 1.1.) e, portanto, existe a possibilidade de se isolar de *Trichilia* substâncias semelhantes às isoladas de *Melia* e *Azadirachta*.

TABELA 1.1. Classificação morfológica da família Meliaceae segundo Pennington e Styles (PENNINGTON, 1975).

Sub-famílias	Tribos	Gêneros
Swietenioideae	Cedreleae	<i>Cedrela, Toona</i>
	Swietenieae	<i>Khaya, Neobeguea, Soyimida, Chukrasia, Entandrophragma, Pseudocedrela, Lovoa, Schmardaea, Swietenia</i>
	Xylocarpeae	<i>Carapa, Xilocarpus</i>
Melioideae	Turraeeae	<i>Munronia, Naregamia, Turraea, Nymania, Humbertioturraea, Calodecaryia</i>
	Melieae	<i>Melia, Azadirachta</i>
	Vavaeeae	<i>Vavaea</i>
	Trichilieae	<i>Trichilia, Walsura, Pseudobersama, Pterorhachis, Cipadessa, Ekerbegia, Lepidotrichilia, Owenia, Malleastrum, Astrotrichilia</i>
	Aglaieae	<i>Aglaia, Lansium, Aphanamixis, Reinwardtiodendron, Sphaerosacme</i>
	Guareeae	<i>Heckeldora, Cabralea, Ruagea, Turreanthus, Guarea, Chisocheton, Megaphyllaea, Synoum, Anthocarapa, Pseudocarapa, Dysoxylum</i>
Quivisianthoideae	Sandoriceae	<i>Sandoricum, Quivisianthe</i>
Cuparonianthoideae		<i>Cuparonianthus</i>

O gênero *Trichilia* apresenta aproximadamente 230 espécies (RAMÍREZ *et al.*, 2000) e tem ocorrência na América tropical, África e região Indo-Malaio. É um dos gêneros que possui o maior número de espécies na família. Dentro da sub-família Melioideae é o gênero que apresenta maior número e tipos de limonóides (PENNINGTON, 1981).

Os limonóides do grupo 8 (FIGURA 1.3), com anel C-*seco*, são os mais ativos contra insetos (azadiractina) e parecem restritos aos gêneros *Melia* e *Azadirachta*. Porém, a heudebolina, um limonóide com anel C-*seco*, foi isolado de *Trichilia heudelotii* (ADESIDA *et al.*, 1973) e este é um dos motivos do interesse no estudo de espécies do gênero *Trichilia*.

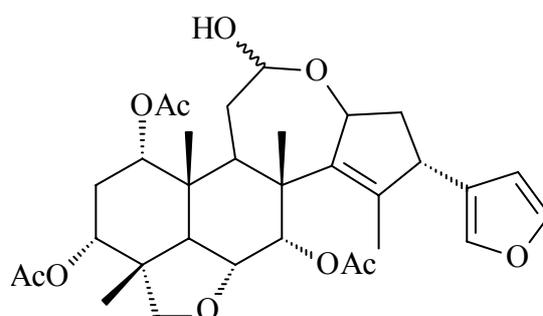


FIGURA 1.4 - O limonóide heudebolina

Vários limonóides foram isolados de diversas espécies de *Trichilia* (ADESIDA & OKORIE, 1973; CHAN *et al.*, 1973; CONNOLLY *et al.*, 1979; MULHOLAND & TAYLOR, 1980; JOLAD *et al.*, 1980; 1981a; ARENAS & RODRÍGUEZ-HANN, 1990; TINTO *et al.*, 1991; CORTEZ *et al.*, 1992; 2000; INADA *et al.*, 1994; MUSKA *et al.*, 1995; GARCEZ *et al.*, 1997; 2000; RODRÍGUEZ-HAHN *et al.*, 1996; RAMÍREZ *et al.*, 2000; MATOS, 2006; WANG *et al.*, 2008).

Além dos limonóides, outras classes de substâncias têm sido isoladas do gênero *Trichilia*: esteróides de *T. hirta* (CHAURET *et al.*, 1996), esteróides e cumarinas de *T. stipulata* (CORTEZ *et al.*, 1998), sesquiterpenos (GARCEZ, *et*

al., 1997b), lignanas e γ -lactonas (PIZZOLATTI *et al.*, 2002; 2004) de *T. catigua*, triterpenos do tipo tirucalano de *T. hispida* (JOLAD *et al.*, 1980, 1981b) e de *T. connaroides* (INADA *et al.*, 1994), esteróides pregnanos de *T. schomburgkii* (TINTO *et al.*, 1991; KETWARU *et al.*, 1993) e de *T. connaroides* (ZHANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2008), protolimonóides de *T. elegans* (GARCEZ *et al.*, 1996); protolimonóide glicosilado de *T. prieuriana* de (OLUGBADE *et al.*, 2000), triterpenos do tipo cicloartano, ácidos ω -fenil alcanóicos e alcenóicos, γ -lactonas, esteróides androstanos e pregnanos e sesquiterpenos de *T. clausenii* (PUPO *et al.*, 1996; 1997a; 1998 e 2002), sesquiterpenos, triterpenos e esteróides de *T. lepidota* (PUPO *et al.*, 2002), cumarinas de *T. elegans* (MATOS, 2006).

Diversos trabalhos comprovando a atividade inseticida de *Trichila* ssp. sobre *Spodoptera frugiperda* têm sido realizados (MIKOLAJCZAK *et al.*, 1987; 1989; RODRÍGUEZ & VENDRAMIM, 1996; 1997; ROEL *et al.*, 2000; WHEELER *et al.*, 2001a; 2001b; BOGORNÍ & VENDRAMIM, 2003; 2005; MATOS *et al.*, 2006).

1.2.1 – *Trichilia clausenii* C. DC.

Trichilia clausenii é popularmente conhecida como catiguá-vermelho, catiguá, quebra-machado. É uma espécie nativa do Brasil e ocorre desde Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul, na floresta latifoliada semidecídua (tipo floresta onde as árvores perdem de forma parcial ou total suas folhas durante a época mais seca e mais fria do ano).

A árvore atinge altura de 6 a 12m (FIGURA 1.5) (LORENZI, 1994), sua madeira é leve, compacta, medianamente resistente e moderadamente durável, sendo apropriada para marcenaria leve, forros, lambris e acabamentos internos em construção civil.

Florescem durante os meses de agosto-outubro e os frutos (FIGURA 1.5) amadurecem em janeiro-março.

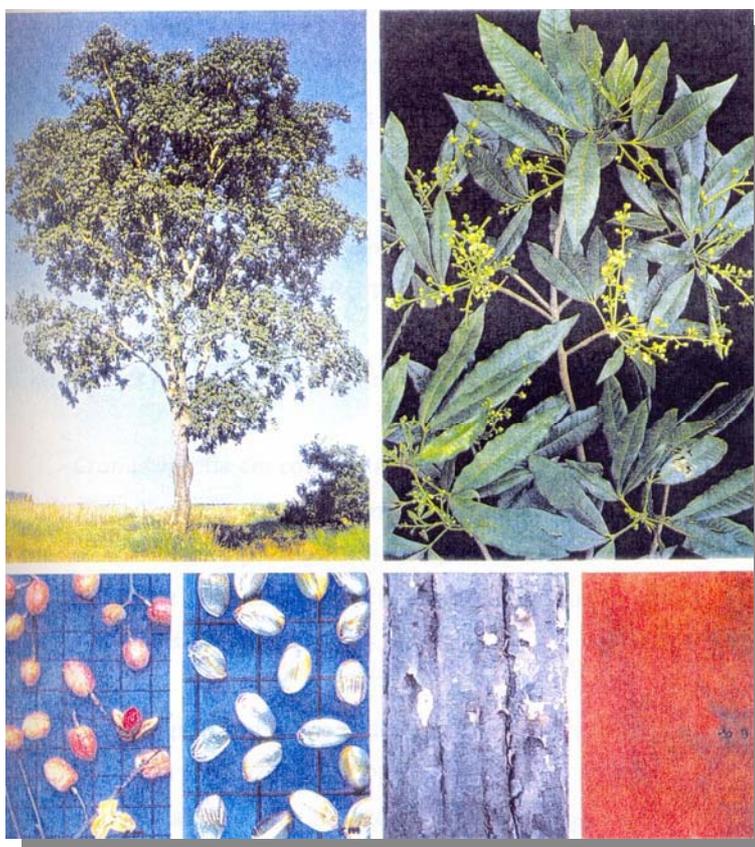


FIGURA 1.5 – Árvore adulta de *Trichilia clausenii*. Em destaque folhas com flores, frutos maduros, sementes, casca e madeira (LORENZI, 1994).

1.2.1.1 – Constituintes químicos anteriormente isolados de frutos de *Trichilia clausenii* C. DC.

O estudo químico realizado com os frutos de *T. clausenii* resultou no isolamento γ -lactonas (**1-4**), ácidos ω -fenil alcanóicos e alcenóicos (**5-6**) (PUPO *et al.*, 1996; 1998), e os esteróides β -sitosterol e estigmasterol (**7-8**) (FIGURA 1.6 e 1.7).

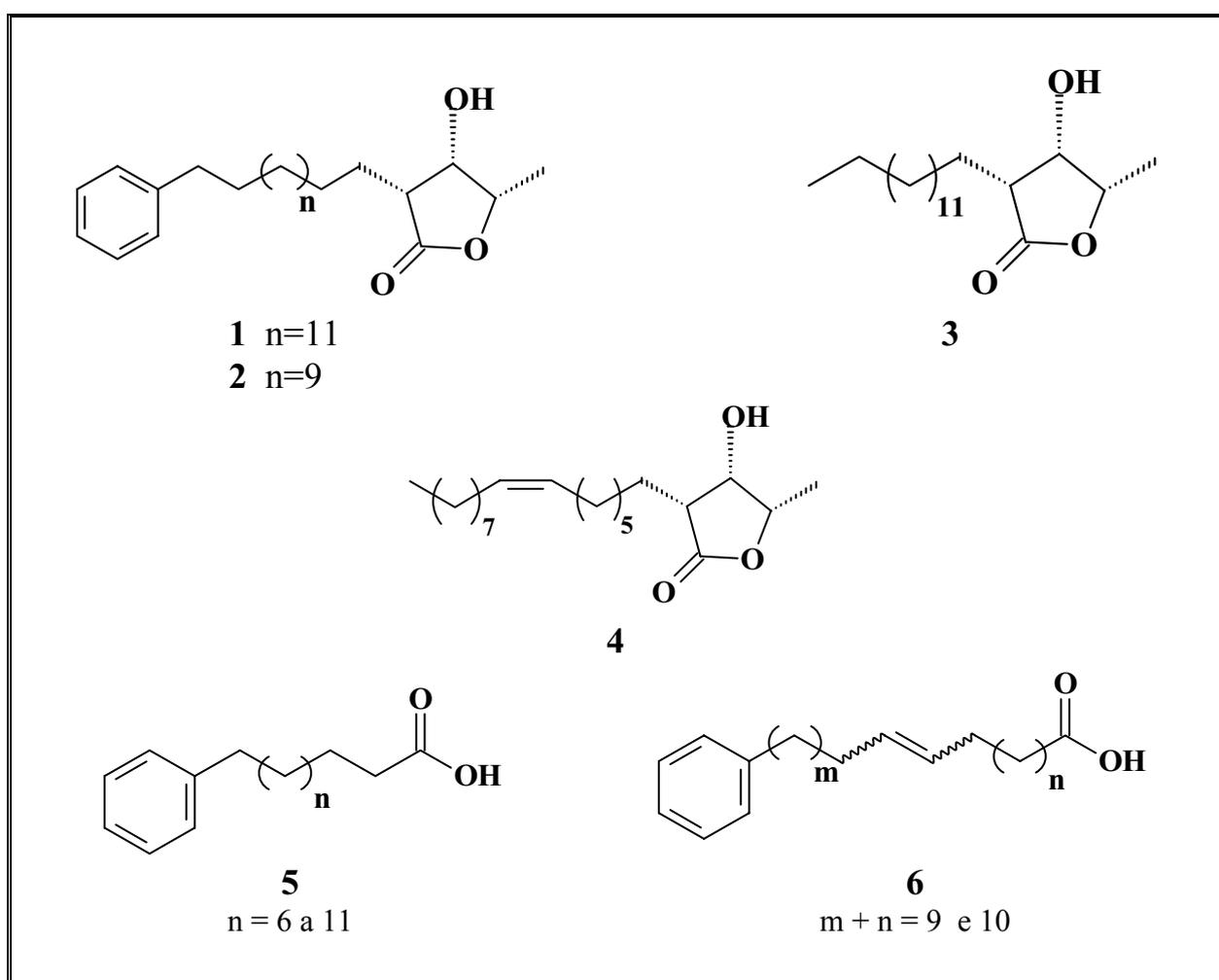


FIGURA 1.6 – γ -lactonas e ácidos ω -fenil alcanóicos e alcenóicos isolados dos frutos de *Trichilia clausenii*

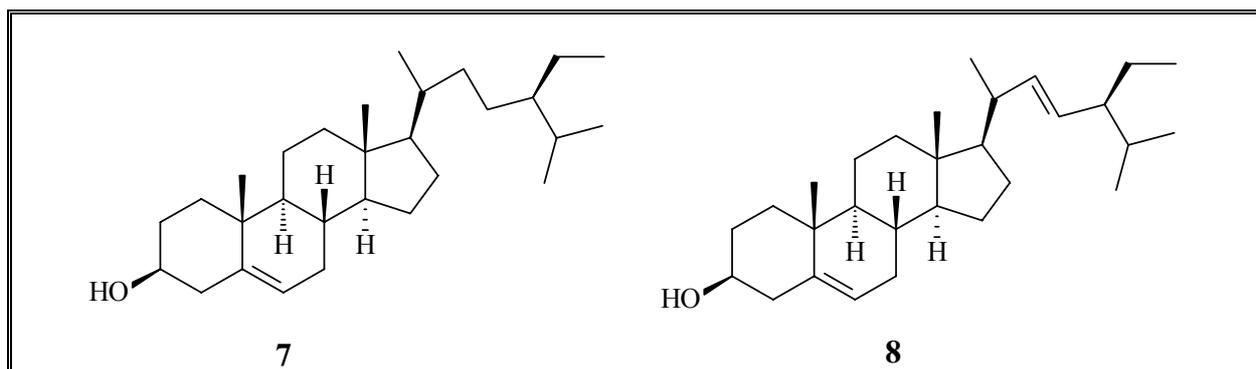


FIGURA 1.7 – Esteróides isolados dos frutos de *Trichilia claussenii*

1.2.2 – *Trichilia catigua* A. Juss.

Trichilia catigua é popularmente conhecida como catiguá, caatiguá, cedrinho, mangalô-catigá e angelim-rosa. São árvores com cerca de 10m de altura e flores de coloração branco-amareladas, frutos cápsulas, avermelhados com apenas uma semente (FIGURA 1.8). Suas flores são encontradas no período de setembro a outubro e os frutos de dezembro a janeiro. Ocorrem de São Paulo até o Rio Grande do Sul.

Popularmente, da casca produz-se uma tintura amarelada que é usada externamente contra reumatismo, hidropsia e, ainda é inseticida, purgativa e em doses moderadas é tônica. O óleo da casca é empregado, com muito bom resultado, no tratamento de eczemas rebeldes, da psoríasis e herpes.



FIGURA 1.8 – Árvore adulta, folhas e flores de *Trichilia catigua*

1.2.2.1 – Constituintes químicos anteriormente isolados de sementes de *Trichilia catigua* A. Juss.

Das sementes de *T. catigua* foram isolados os limonóides: angolesato de metila (**9**) mistura epimérica de fotogedunina (**10-11**), cedrelona (**12**) e 11- β -metoxicedrelona (**13**) (FIGURA 1.9) (MATOS, 2006).

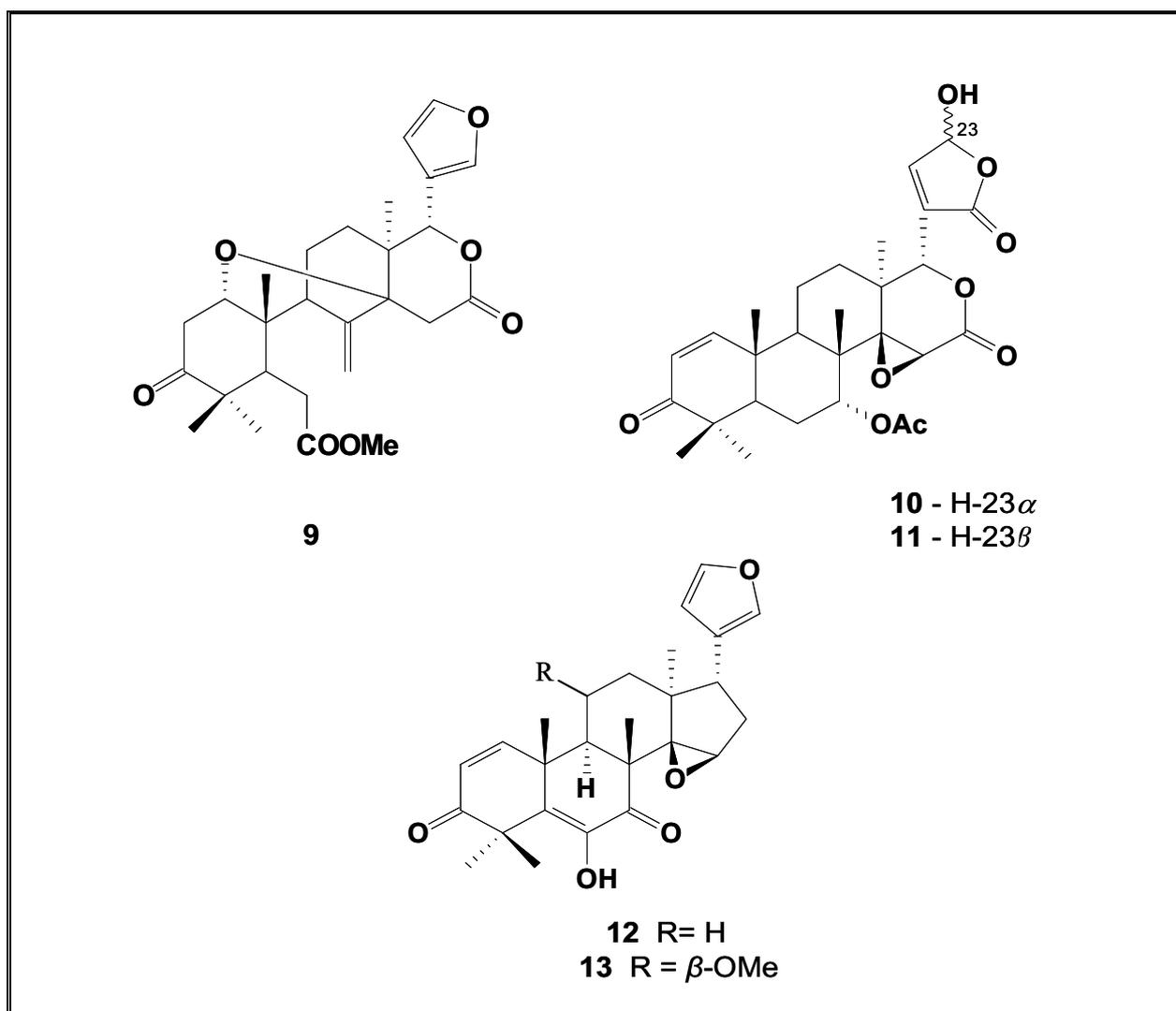


FIGURA 1.9 – Limonóides isolados de sementes de *Trichilia catigua*

1.2.3 - *Trichilia elegans* ssp. *elegans* A. Juss

Trichilia elegans ssp. *elegans* A. Juss., conhecida popularmente como “Cachuá”, produz madeira resistente e durável, sendo a casca empregada em curtumes. 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 árvoreta de três a seis metros de altura. É uma planta apícola, cuja floração é observada de outubro a dezembro e com frutos encontráveis no período de janeiro a março. Estes se apresentam 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 (POTT, 1994).



Fotos: Liliane Nebo

FIGURA 1.10 – Folhas e frutos de *Trichilia elegans* ssp. *elegans*

1.2.3.1 - Constituintes químicos anteriormente isolados de frutos e sementes *Trichilia elegans* A. Juss.

O estudo químico das sementes de *T. elegans* ssp *elegans*, resultou no isolamento de três *seco*-A-protolimonóides (**14** a **16**) (GARCEZ *et al.*, 1996), oito limonóides (**17-24**), além dos limonóides 7-desoxo-7 β -acetokiadaninas A e B (**25** e **26**), 7-desoxo-7 β -hidroxikiadaninas A e B (**27** e **28**) e 7-desoxo-7 α -hidroxikihadanina (**29**) (GARCEZ *et al.*, 1997; 2000).

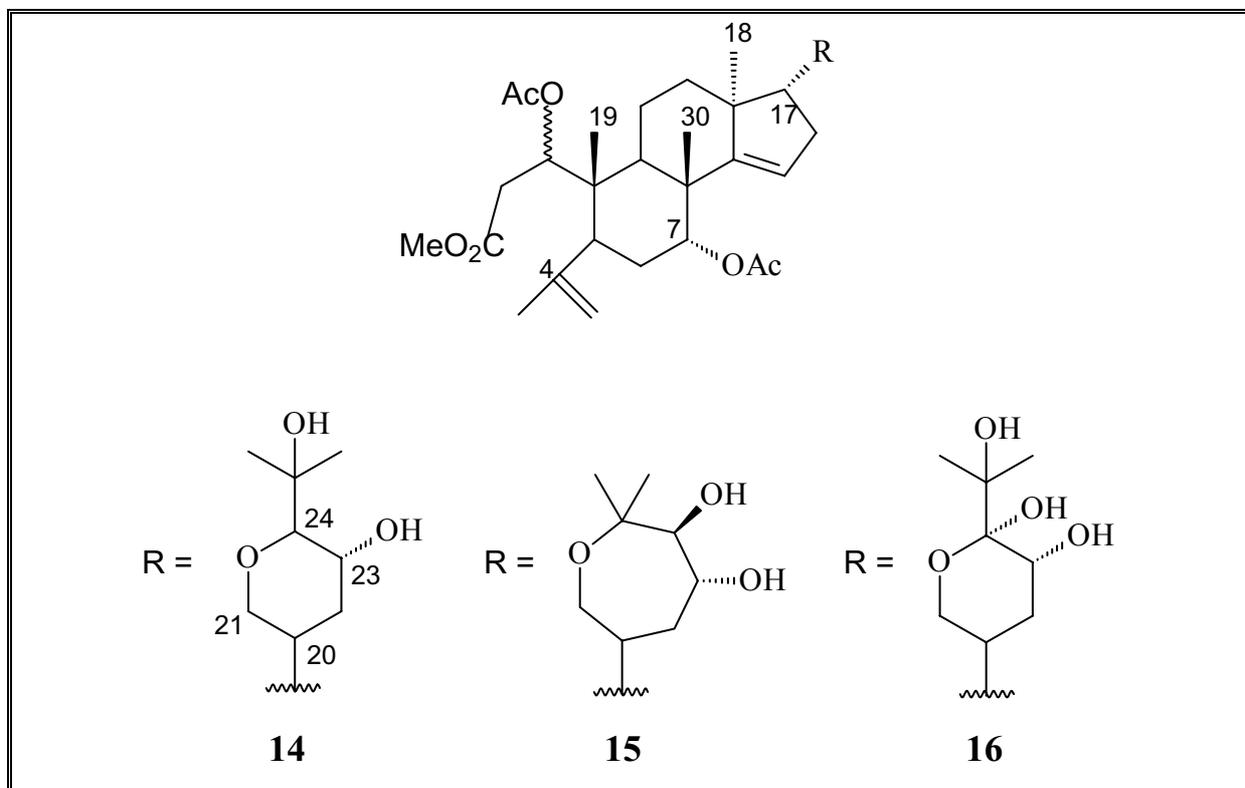


FIGURA 1.11 – *Seco*-A-protolimonóides isolados de sementes de *Trichilia elegans*

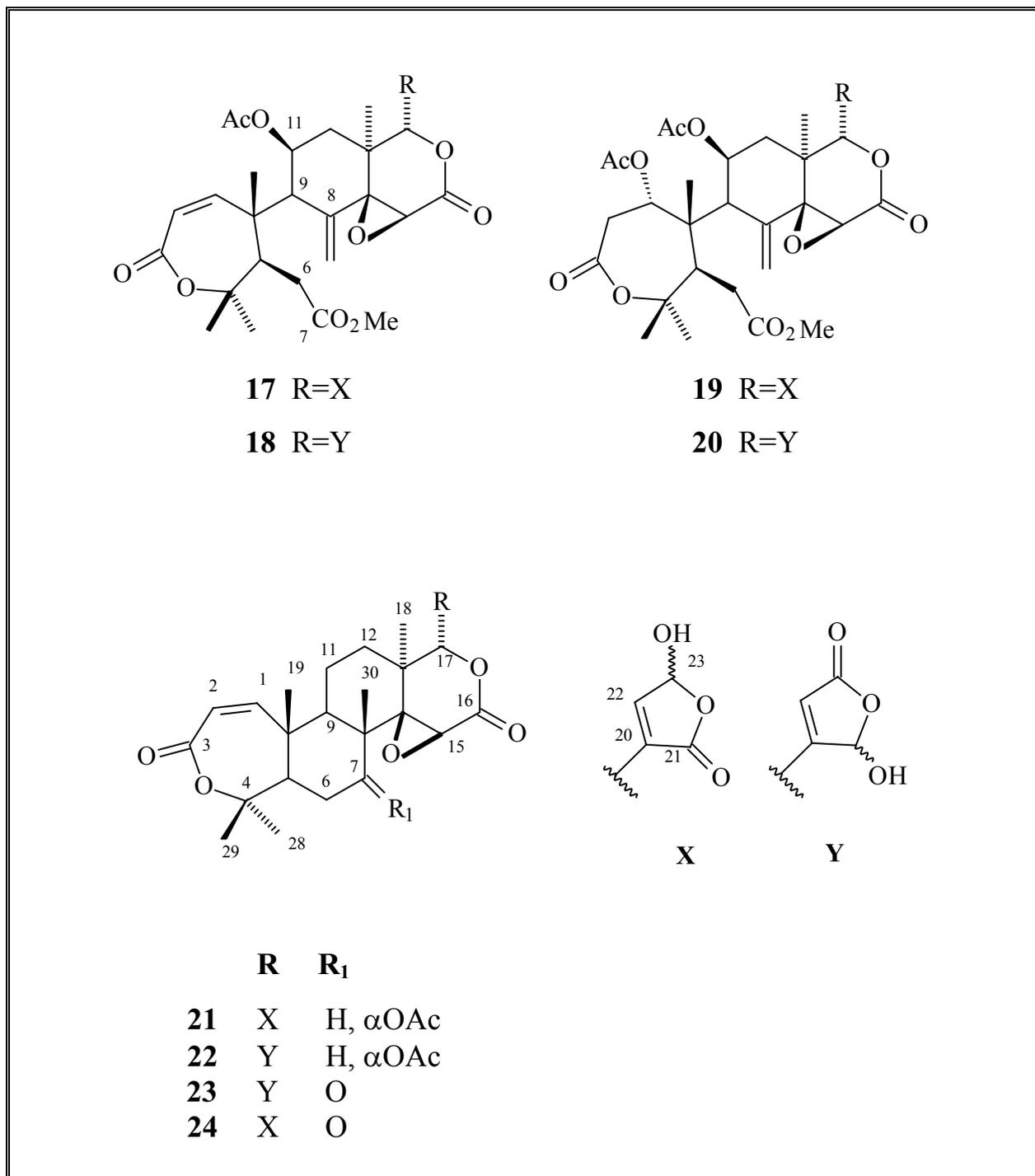


FIGURA 1.12 – Limonóides isolados de sementes de *Trichilia elegans*

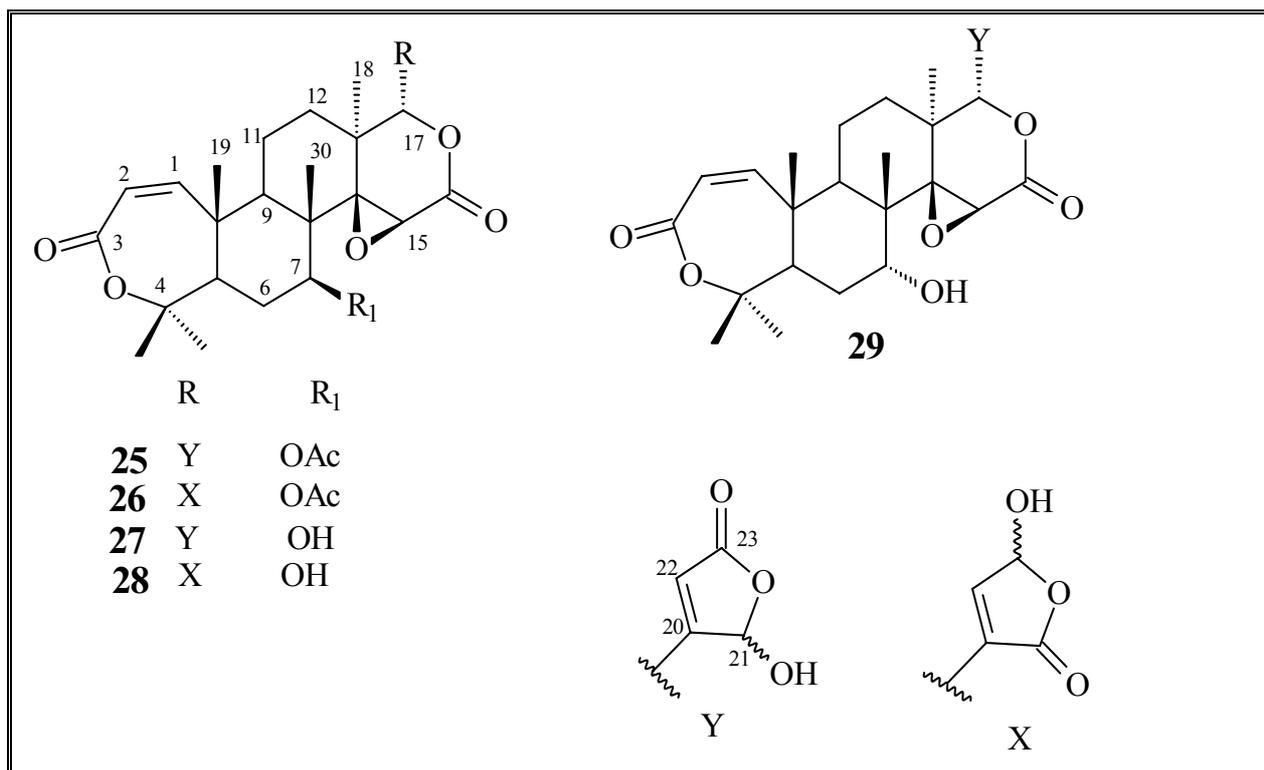


FIGURA 1.13 – Limonóides isolados de sementes de *Trichilia elegans*

Dos frutos de *T. elegans* foram isoladas as cumarinas 6,7-dimetoxicumarina (**30**), 6-metoxi-7-hidroxicumarina (**31**) e 7-hidroxicumarina (**32**) (MATOS, 2006) (FIGURA 1.14).

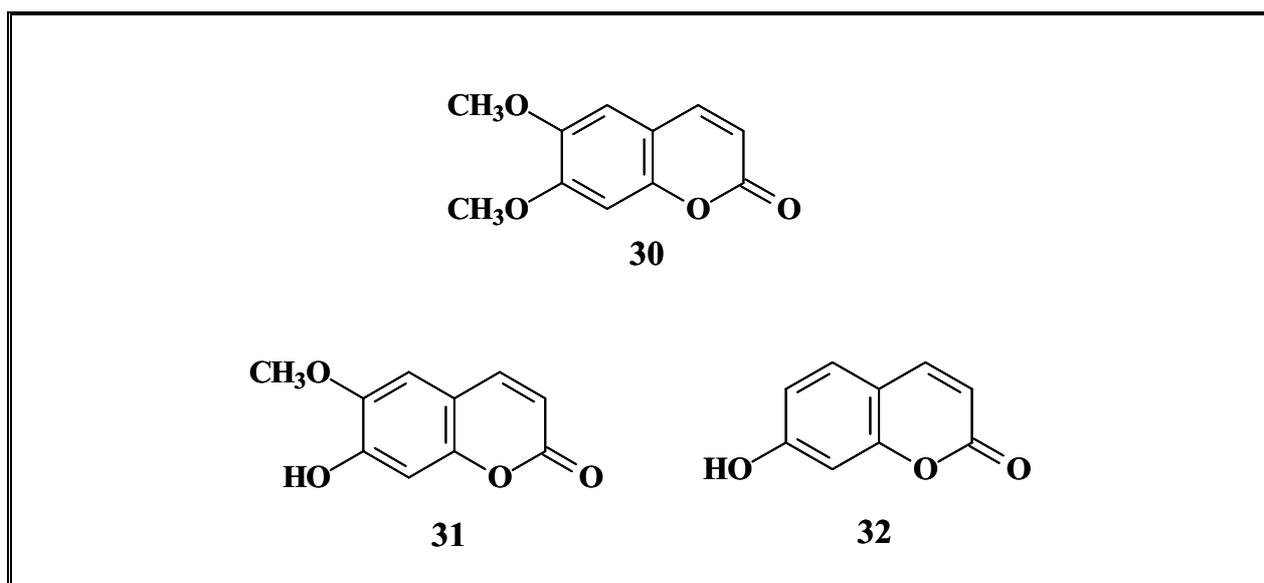


FIGURA 1.14 – Cumarinas isoladas dos frutos de *Trichilia elegans*

1.3 Considerações sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae)

Esta espécie foi reconhecida como praga do milho em 1797, nos Estados Unidos e hoje é relatada como causadora de injúrias em plantações de milho ao Sul dos Estados Unidos, México, Américas do Sul e Central.

Este inseto também é considerado praga de outras culturas, tais como feijão, arroz, cana-de açúcar, trigo, aveia, alfafa e hortaliças.

Larvas do inseto, no primeiro e segundo ínstares, alimentam-se de folhas sendo que a partir do terceiro passam, no caso da cultura do milho, a atacar o cartucho da planta podendo levá-la à morte. O período larval varia de 12 a 30 dias (COSTA *et al.*, 1984; VALICENTE & CRUZ, 1991). Nos últimos ínstares, medem aproximadamente 5 cm e apresentam coloração que varia do marrom, verde até quase preta (FIGURA 1.15).

Findo o período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas de coloração avermelhada medindo cerca de 10mm de comprimento. A duração da fase pupal varia de 7 a 27 dias (VALICENTE & CRUZ, 1991).

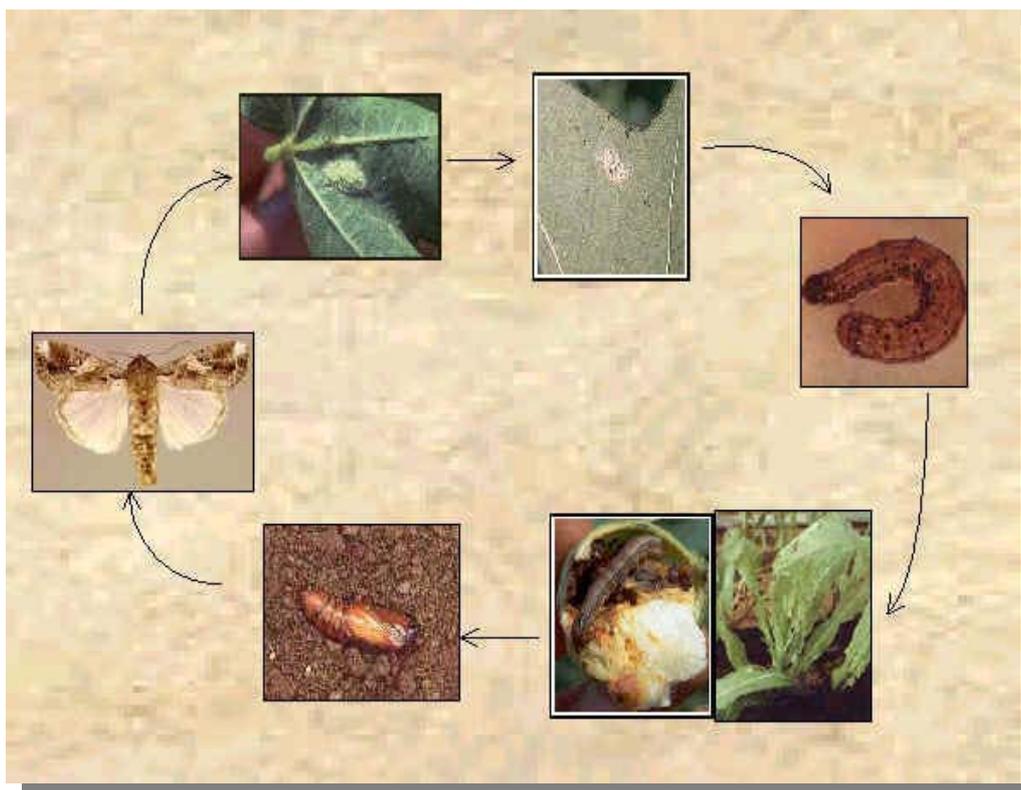


FIGURA 1.15 - Ciclo de vida da *Spodoptera frugiperda*.

Os adultos de *S. frugiperda* apresentam longevidade de aproximadamente 10 dias a temperatura de 25°C, umidade relativa de 60,0 % e fotofase de 14 horas. A ovoposição é realizada no período noturno. Os ovos são depositados em massas com cerca de 150 unidades, podendo uma fêmea colocar até 1000 ovos. O período de incubação é de aproximadamente 3 dias a temperatura entre 25 a 29°C, umidade relativa de 70,0 % e fotofase de 12 horas (PATEL, 1981). O ciclo de vida da *S. frugiperda* dura em média de 32 a 46 dias (COSTA, 1984, VALICENTE & CRUZ, 1991).

1.4 – Atividade de espécies de *Trichilia* sobre *Spodoptera frugiperda*

Diversos trabalhos comprovando a atividade inseticida de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) têm sido realizados. MIKOLAJCZAK & REED (1987) realizaram um dos primeiros trabalhos testando a atividade inseticida de *Trichilia* sobre *S. frugiperda*. Os extratos etanólicos testados de *T. pallida*, *T. connoroides*, *T. priureana*, *T. roka* e *T. triphyllaria* causaram mortalidade igual ou superior a 80,0 % das lagartas, sendo que apenas a última espécie não afetou a sobrevivência do inseto. MIKOLAJCZAK *et al.*, (1989), avaliaram a toxicidade das sementes de dez espécies pertencentes à família Meliaceae sobre *S. frugiperda* e constataram que os extratos etanólicos e hexânicos de *T. roka* incorporados à dieta artificial, apresentaram 100,0 % de mortalidade larval a 400 e 10.000 ppm, respectivamente. Já o extrato etanólico a 80 ppm afetou a fase larval, causando uma redução no peso da lagarta (25,0 %) e um alongamento na fase larval (4,6 dias) em relação ao controle.

Diversas espécies de meliáceas (incluindo cinco espécies de *Trichilia*) foram avaliadas em relação a *S. frugiperda*, extratos aquosos a 5,0 % de diversas estruturas vegetais foram testados através da incorporação em dieta artificial (20mL do extrato/100g de dieta). Foram constatadas grandes variações na bioatividade considerando-se as espécies e os órgãos vegetais utilizados. A maior eficiência foi obtida com os extratos de folhas e caules de *T. pallida* e de *M. azedarach* e caules (ramos) de *Cabralea canjerana*, onde foi registrada mortalidade larval de 100,0 %, destacando-se os caules de *T. pallida* e *C. canjerana*, onde essa mortalidade ocorreu já nos dois primeiros ínstares, resultando em bioatividade similar à registrada para o extrato de semente de *A. indica* (incluída como padrão de atividade inseticida). Menor atividade foi encontrada com as demais espécies de *Trichilia*, observando-se inibição alimentar (resultando em menor peso pupal) com o uso de extratos de caules

(ramos) de *T. catigua* e folhas de *T. casaretti* e inibição do crescimento (caracterizado pelo alongamento da fase larval) nos tratamentos com caules (ramos) de *T. clausenii*. Nenhum efeito apreciável sobre o inseto foi constatado nos demais tratamentos com espécies de *Trichilia* (folhas de *T. catigua*, *T. clausenii* e *T. elegans* e caules (ramos) de *T. elegans* e *T. casaretti*) (RODRIGUEZ & VENDRAMIM, 1996; 1997).

Além dessas espécies, alguns extratos orgânicos de *T. pallida* também afetaram a sobrevivência de *S. frugiperda* (ROEL & VENDRAMIM, 1998; ROEL, 2000). Em relação a extratos aquosos, houve redução significativa no dano causado à cultura do milho pela praga com aplicações de extratos de *T. americana* e *T. havanensis*.

Estudando o efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de ramos e folhas de *T. pallida* na sobrevivência e desenvolvimento de *S. frugiperda* criada em folhas de milho, verificou-se que o extrato de ramos a 5% provocou 100% de mortalidade larval até o 7º dia após o início do tratamento, com atividade inseticida similar a do extrato de sementes de *A. indica* (utilizada como padrão). A 1%, a mortalidade, nesse extrato, variou de 70,0 a 100,0 % e a 0,1% houve redução da sobrevivência e do peso pupal e alongamento da fase larval. O extrato de folhas a 5,0 % provocou mortalidade variável de 17,0 a 55,0 % (dependendo do genótipo) até o 7º dia e de 100,0 % ao final da fase, enquanto que a 0,1 % reduziu o peso pupal (TORRECILAS & VENDRAMIM, 2001).

MATOS *et al.* (2006) avaliaram a atividade biológica dos extratos orgânicos de folhas e ramos de três espécies de *Trichilia* (*T. catigua*, *T. clausenii* e *T. elegans*) sobre *S. frugiperda*, através da incorporação dos extratos hexânico, metanólico e hidrometanólico à dieta artificial. Os extratos hexânico e metanólico de folhas e o hexânico de ramos de *T. clausenii* na concentração de 1000 ppm foram os mais eficientes apresentando mortalidade larval de 80,0, 70,0 e 60,0 % respectivamente.

1.5 – A busca de novos compostos inseticidas para o controle de insetos-praga



A lagarta-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith), é uma das principais pragas da cultura do milho, podendo seu dano levar à redução de 34% a 40% na produção, dependendo principalmente do estágio de cultura em que ocorre o ataque, e prejuízos que chegam a 400 milhões de dólares-ano no Brasil (VALICENTE & CRUZ, 1991, CRUZ 1995). A utilização de inseticidas sintéticos tem sido o principal método de controle da praga, porém seu uso indiscriminado e incorreto tem aumentado o número de aplicações e diminuído sua eficiência, principalmente devido ao surgimento de populações de insetos resistentes. Tal uso agrava o problema de contaminação dos produtos agrícolas, agricultores e do ambiente. Desta forma, medidas de controle que causem menor impacto ambiental são de primordial importância, o que vem estimulando o ressurgimento do uso de plantas inseticidas como promissora ferramenta para controle de insetos.

Visando a busca de novos inseticidas naturais com menor impacto ambiental, o grupo de Produtos Naturais da UFSCar tem realizado estudos com várias plantas pertencentes à ordem Rutales sobre a *S. frugiperda*. Deste modo, BATISTA-PEREIRA *et al.* (2002) avaliaram a atividade do flavonóide astilbina, isolado de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae). ROCHA (2004) realizou o estudo fitoquímico de *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *T. pallida* e *T. rubra* (Meliaceae) visando à busca de compostos que alterem a biologia do inseto. Trabalhos semelhantes foram realizados com as espécies *Trichilia catigua*, *T. elegans* e *T. clausenii* (PEREIRA, 2001; MATOS, 2006) e *Siphoneugena densiflora* (Mirtaceae) e *Vitex polygama* (Verbenaceae) (GALLO *et al.*, 2006).

PARTE 2
OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- ◆ Determinar a atividade inseticida dos extratos dos frutos, sementes e inflorescências de espécies de *Trichilia* sobre *Spodoptera frugiperda*;
- ◆ Isolar e identificar os constituintes químicos das espécies de *Trichilia elegans*, *T. catigua* e *T. clausenii* que forem ativos sobre *Spodoptera frugiperda*.
- ◆ Determinar a atividade inseticida das substâncias isoladas

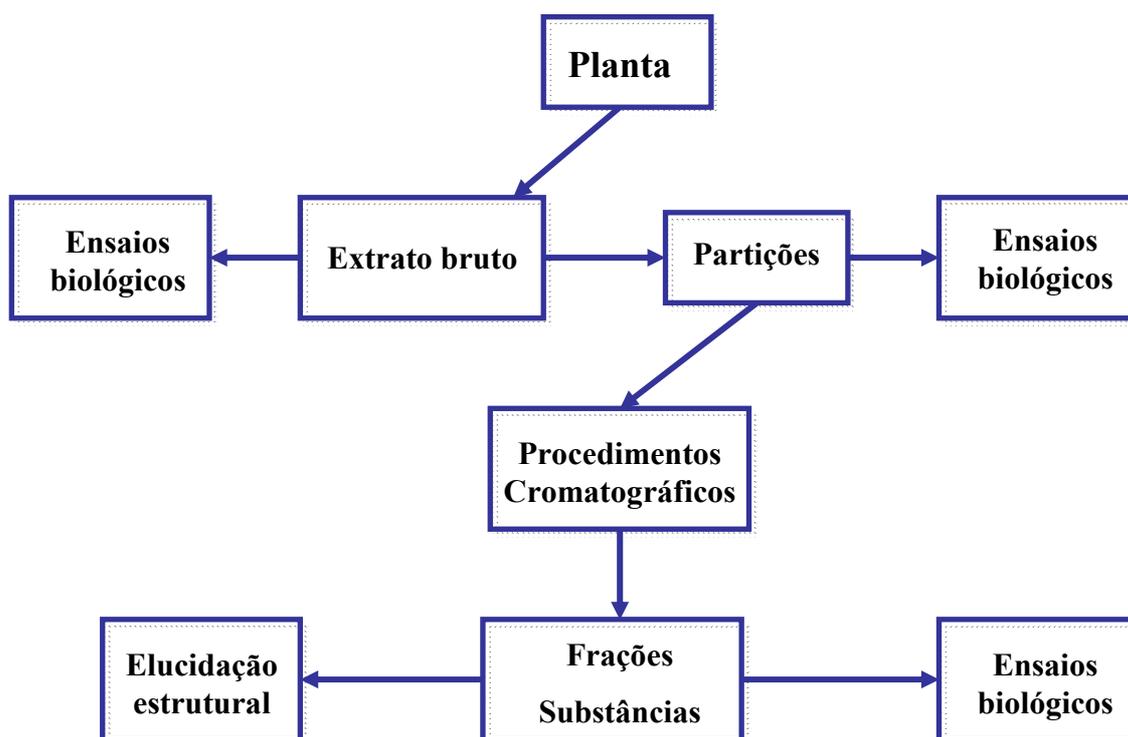
PARTE 3
RESULTADOS
E DISCUSSÕES

3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 – Busca de substâncias com atividade inseticida sobre *Spodoptera frugiperda*

3.1.1 - Extratos de espécies de *Trichilia*

Todos os extratos foram submetidos aos ensaios biológicos, e a partir dos resultados obtidos, os extratos foram selecionados e posteriormente fracionados. As frações e subfrações procedentes dos extratos ativos foram biomonitoradas, a fim de isolar e identificar as substâncias ativas (ESQUEMA 3.1).



ESQUEMA 3.1 - Metodologia geral utilizada na obtenção de substâncias ativas

3.1.2 – Avaliação da atividade inseticida dos extratos brutos de *Trichilia* ssp. sobre à lagarta *Spodoptera frugiperda*

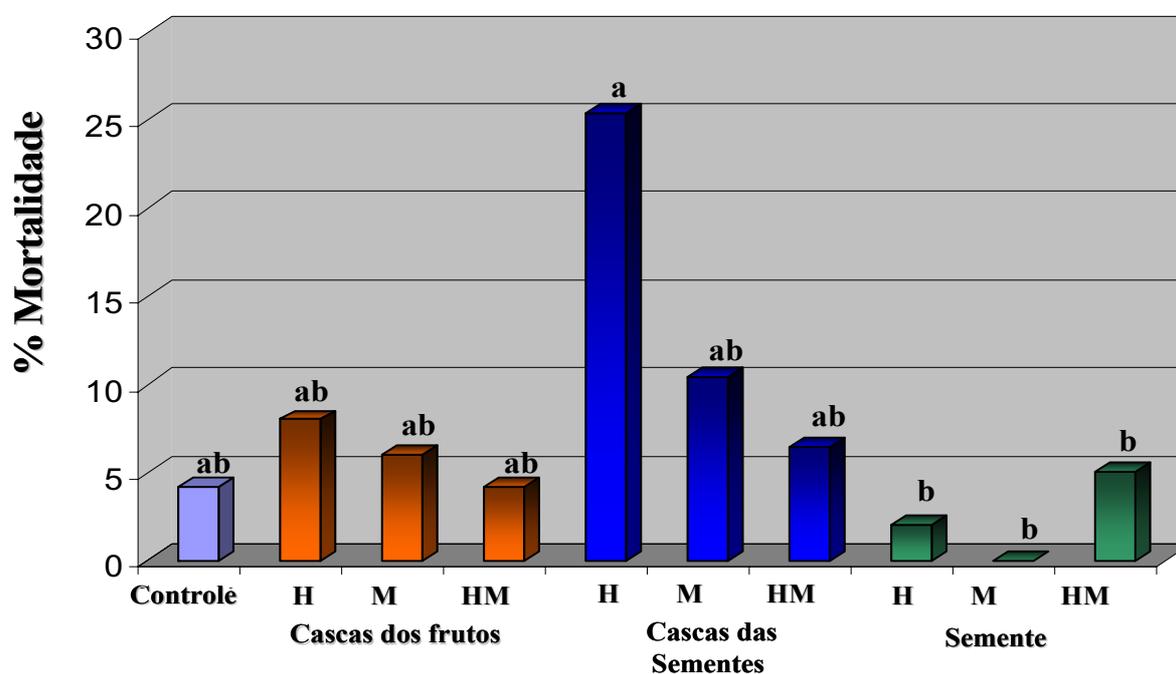
Na fase inicial do trabalho, a fim de constatar quais extratos apresentavam atividade inseticida, foram realizados ensaios de toxicidade com os extratos brutos de *Trichilia elegans*, *T. clausenii* e *T. catigua* frente à *S. frugiperda*, conforme metodologia descrita no item 4.7, p.143. Nesta etapa, foram utilizados os extratos brutos dos frutos e sementes de *T. elegans* e *clausenii* e também as inflorescências de *T. catigua* (TABELAS 4.1 e 4.2, ps.126 e 128). Os extratos foram identificados por códigos que podem ser observados na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 - Identificação dos códigos dos extratos

Planta	Parte da Planta	Extrato	Código
<i>Trichilia elegans</i>	Casca dos frutos	Hexânico	Tcfch
		Metanólico	Tcfem
		Hidrometanólico	Tcfea
	Semente	Hexânico	Tseh
		Metanólico	Tsem
		Hidrometanólico	Tsea
	Casca da semente	Hexânico	Tcseh
		Metanólico	Tcsem
		Hidrometanólico	Tcsea
<i>Trichilia catigua</i>	Inflorescências	Hexânico	Tflch
		Metanólico	Tflcm
		Hidrometanólico	Tflca

Planta	Parte da Planta	Extrato	Código
<i>Trichilia claussenii</i>	Casca dos frutos	Hexânico	Tcflh
		Metanólico	Tcflm
		Hidrometanólico	Tcfla
	Semente	Hexânico	Tslh
		Metanólico	Tslm
		Hidrometanólico	Tsla
	Casca da semente	Hexânico	Tcslh
		Metanólico	Tcslm
		Hidrometanólico	Tcsla

Desta forma, primeiramente utilizou-se os extratos de *T. elegans* na concentração de 1,0 mg/mL com dose média de 0,149 µg/mg de larva.



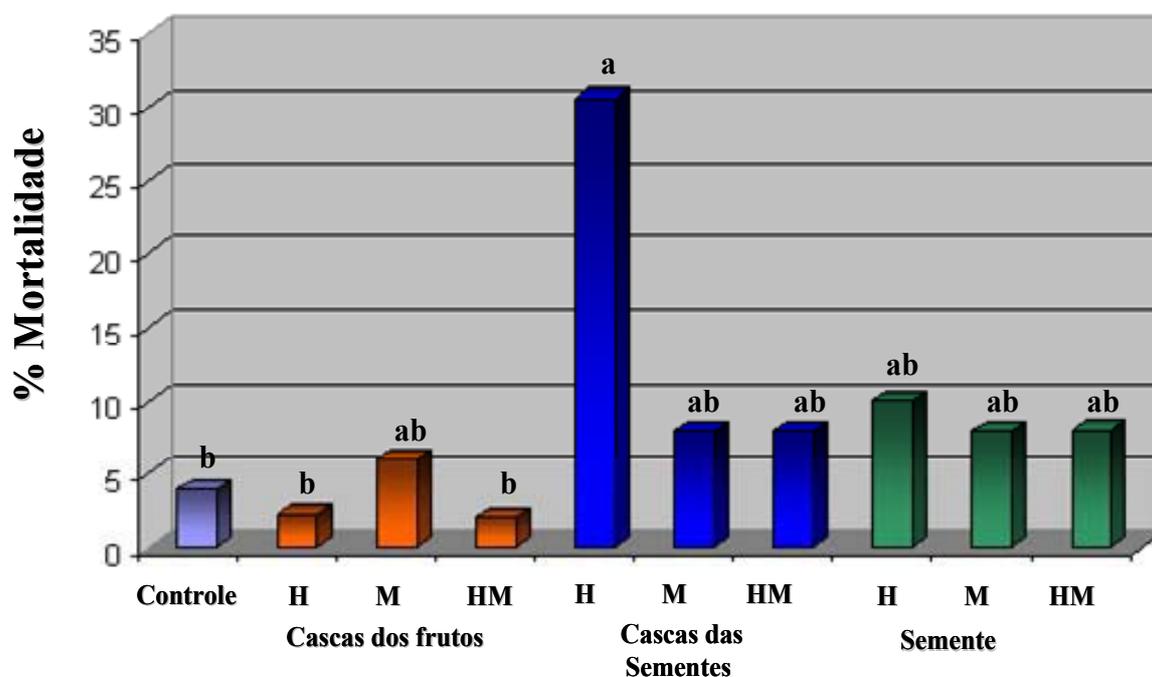
H = Ext. hexânico; M = Ext. metanólico; HM = Ext. hidrometanólico

GRÁFICO 3.1 – Resultado do ensaio de toxicidade realizado com os extratos de *T. elegans* na concentração de 1,0 mg/mL em quintuplicata

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Ao verificar os resultados obtidos do ensaio com os extratos brutos de *T. elegans* na concentração de 1,0 mg/mL, observou-se baixas porcentagens de mortalidade. Uma vez que, esses resultados poderiam estar relacionados a concentração inicial escolhida, optou-se pelo aumento da concentração na realização dos demais ensaios.

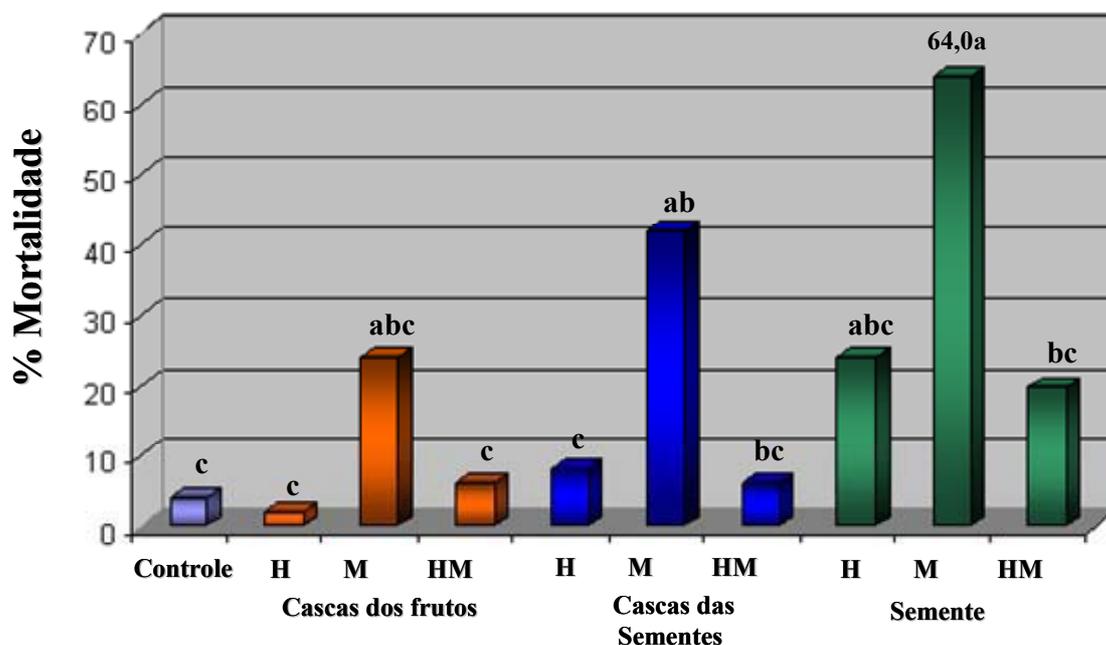
Assim, os extratos brutos de *T. elegans*, *T. clausenii* e *T. catigua* foram ensaiados em quintuplicata na concentração de 10,0 mg/mL, onde as doses médias observadas foram de 9,70, 10,33 e 14,30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de larva, respectivamente. Os resultados obtidos são mostrados nos Gráficos 3.2, 3.3 e 3.4.



H = Ext. hexânico; M = Ext. metanólico; HM = Ext. hidrometanólico

GRÁFICO 3.2 – Resultado do ensaio realizado com os extratos de *T. elegans* na concentração de 10,0 mg/mL

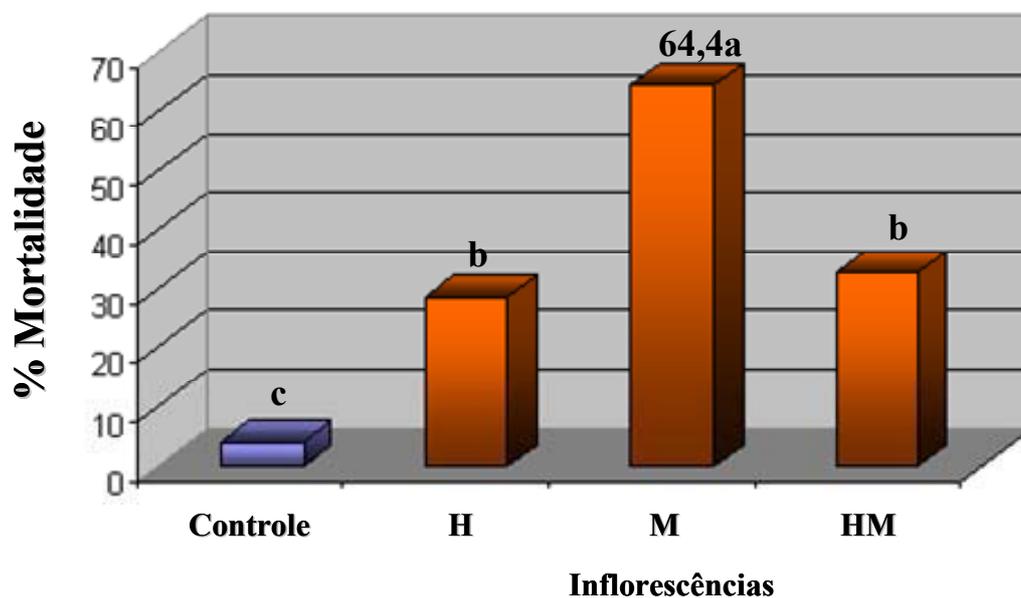
*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



H = Ext. hexânico; M = Ext. metanólico; HM = Ext. hidrometanólico

GRÁFICO 3.3 – Resultado do ensaio realizado com os extratos de *T. clausenii* na concentração de 10,0 mg/mL

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



H = Ext. hexânico; M = Ext. metanólico; HM = Ext. hidrometanólico

GRÁFICO 3.4 – Resultado do ensaio realizado com os extratos de *T. catigua* na concentração de 10,0 mg/mL

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Ao verificar os resultados dos ensaios de toxicidade realizados com os extratos de *T. elegans* nas concentrações de 1,0 e 10,0 mg/mL (GRÁFICOS 3.1 e 3.2, ps. 26 e 27), notou-se que não houve grandes modificações na mortalidade.

Entretanto, ao realizar os ensaios com os extratos de *T. clausenii* (GRÁFICO 3.3, p. 28) e *T. catigua* (GRÁFICO 3.4, p. 28), observou-se que os extratos metanólicos das sementes de *T. clausenii* (Tslm) e das inflorescências de *T. catigua* (Tflcm) foram os extratos que apresentaram as mais altas porcentagens de mortalidade. Desta forma, esses extratos foram selecionados para estudos posteriores e bioensaios.

3.1.2.1 - Ensaios biológicos realizados com o extrato metanólico das sementes de *T. clausenii*

A partir dos resultados obtidos do ensaio de toxicidade realizado com o extrato metanólico das sementes de *T. clausenii* (64,0 % de mortalidade), este foi fracionado através da partição líquido-líquido (FLUXOGRAMA 4.2, p. 129). Foram obtidas quatro frações (TABELA 4.3, p.129) Tslm1 (Hexano), Tslm2 (CH₂Cl₂), Tslm3 (AcOEt) e Tslm4 (MeOH/H₂O).

As frações obtidas foram ensaiadas sobre *S. frugiperda* (metodologia, p. 143) em triplicata, na concentração de 10,0 mg/mL com dose média de 14,75 µg/mg de larva.

TABELA 3.2 – Resultado do ensaio realizado com as frações: Tslm1, Tslm2, Tslm3 e Tslm4 na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata.

Frações	Mortalidade (%)
Controle	6,66c
Tslm1	70,00a
Tslm2	24,81bc
Tslm3	26,67bc
Tslm4	43,33ab

Dose média: 14,75 µg/mg larva

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Através do ensaio realizado com as frações Tslm1 a Tslm4, observou-se que a fração Tslm1 foi a que apresentou a maior taxa de mortalidade (70,0 %) sobre *S. frugiperda*. Desta forma, a amostra Tslm1 foi fracionada (FLUXOGRAMA 4.3, p. 130) e as 6 frações obtidas foram ensaiadas sobre *S. frugiperda*.

TABELA 3.3 – Resultado do ensaio realizado com as frações: Tslm1-Fr1 a Tslm1-Fr6 na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata.

Frações	Mortalidade (%)
Controle	10,00b
Tslm1-Fr1	31,00ab
Tslm1-Fr2	46,66ab
Tslm1-Fr3	70,00a
Tslm1-Fr4	66,66a
Tslm1-Fr5	36,67ab
Tslm1-Fr6	23,33b

Dose média: 13,43 µg/mg larva

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A partir dos resultados observados neste ensaio, as amostras Tslm1-Fr3 e Tslm1-Fr4 foram refracionadas. Do refracionamento da amostra Tslm1-Fr4 (FLUXOGRAMA 4.4, p. 131) foram obtidas 5 frações, as quais foram submetidas ao ensaio biológico.

TABELA 3.4 – Resultado do ensaio realizado com as frações: Tslm1-Fr4(1) a Tslm1-Fr4(5) na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata

Frações	Mortalidade (%)
Controle	6,66c
Tslm1-Fr4(1)	26,67bc
Tslm1-Fr4(2)	13,33bc
Tslm1-Fr4(3)	43,33ab
Tslm1-Fr4(4)	73,33a
Tslm1-Fr4(5)	30,00bc

Dose média: 12,49 µg/mg larva

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Os resultados descritos na TABELA 3.4 mostraram que a fração Tslm1-Fr4(4) apresentou maior porcentagem de mortalidade sobre *S. frugiperda*. Através da análise do espectro de RMN de ^1H da amostra Tslm1-Fr4(4) observou-se sinais característicos dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos sugerindo então, que estes compostos poderiam estar associados à atividade inseticida encontrada para esta amostra.

A fração Tslm1-Fr4(4) foi então refracionada (FLUXOGRAMA 4.4, p. 131), e as frações obtidas foram submetidas ao ensaio biológico.

TABELA 3.5 – Resultado do ensaio realizado com as frações: Tslm1-Fr4(4)-1 a Tslm1-Fr4(4)-6 na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata.

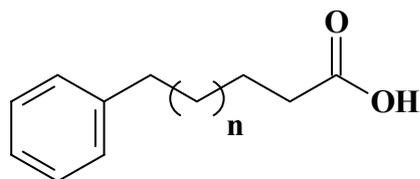
Frações	Mortalidade (%)
Controle	10,00b
Tslm1-Fr4(4)-1	42,96ab
Tslm1-Fr4(4)-2	70,00a
Tslm1-Fr4(4)-3	47,77ab
Tslm1-Fr4(4)-4	34,44ab
Tslm1-Fr4(4)-5	16,67b
Tslm1-Fr4(4)-6	36,67ab

Dose média: 11,02 µg/mg larva

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Através dos resultados obtidos neste ensaio (TABELA 3.5, p. 33), a fração Tslm1-Fr4(4)-2 foi analisada através do espectro de RMN ^1H , onde foram observados sinais característicos dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos. Para identificação do tamanho das cadeias metilênicas dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos, uma pequena alíquota da amostra foi esterificada (procedimento: p.142), e posteriormente analisada via CG-EM.

Pela análise via CG-EM (procedimento, item 4.2, p. 123) foram identificados os tamanhos das cadeias metilênicas desses ácidos (TABELA 3.9, p. 50), que variaram entre 10 a 15 carbonos.



$n = 6$ a 11

Ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos

A análise desta amostra via CG-EM também possibilitou a identificação de constituintes minoritários presentes nesta fração (TABELA 3.9, p. 50).

Através das porcentagens das áreas dos picos obtidas pela análise via CG-EM desta amostra observou-se, 75,50 % dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos e 14,50 % de ácidos graxos.

A partir dos resultados obtidos, pode-se constatar que a atividade tóxica encontrada no extrato metanólico das sementes de *T. clausenii* seria devido principalmente à presença dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos neste extrato.

Como citado anteriormente, a fração Tslm3-Fr3 (Mortalidade 70,0 %, TABELA 3.3, p.31) foi refractionada (FLUXOGRAMA 4.3, p. 130) e foram obtidas 7 frações. Todas as frações foram analisadas através do experimento de RMN ^1H , e na amostra Tslm3-Fr3(2) foram observados sinais característicos dos ácidos ω -fenil alcanóicos. Esta amostra foi então submetida ao ensaio biológico sobre *S. frugiperda*, apresentando 58,89 % de mortalidade.

TABELA 3.6 – Resultado do ensaio realizado com a fração Tslm1-Fr3(2) na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata.

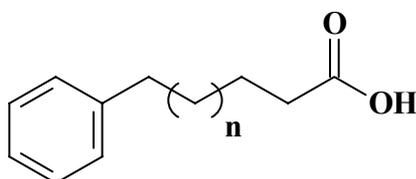
Frações	Mortalidade (%)
Controle	10,00b
Tslm1-Fr3(2)	58,89a

Dose média: 11,54 $\mu\text{g}/\text{mg}$ larva

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Para identificação dos ácidos foi adotado o mesmo procedimento citado anteriormente.

Através da análise via CG-EM foram identificados os ácidos ω -fenil alcanóicos, com cadeias metilênicas variando entre 12 a 15 carbonos e ácidos hexadecanóico e octadecanóico (TABELA 3.10, p. 60).



$$n = 8 \text{ a } 11$$

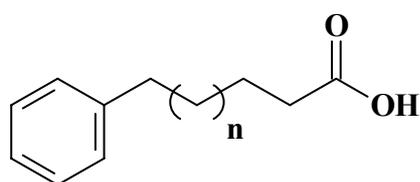
Ácidos ω -fenil alcanóicos

Através das porcentagens das áreas dos picos obtidas pela análise via CG-EM desta amostra observou-se: 85,44 % dos ácidos ω -fenil alcanóicos e 14,56 % de ácidos graxos (C-16 e C-18).

A partir dos ensaios biológicos juntamente com o estudo fitoquímico realizado com o extrato metanólico das sementes de *T. clausenii*, pode-se constatar que as substâncias que apresentavam toxicidade sobre *S. frugiperda* eram o conjunto dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos.

Matos (2006) avaliou a atividade biológica dos extratos hexânico, metanólico e hidrometanólico dos frutos de *T. clausenii* sobre *S. frugiperda*, através da incorporação dos extratos à dieta artificial na concentração de 1000,0 mg/kg. O extrato metanólico dos frutos de *T. clausenii* foi o mais eficiente causando 90,0 % de mortalidade, sendo observado que as larvas alimentadas com dieta artificial tratada com este extrato morreram antes de empuparem. Desta forma, os ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos identificados nos frutos de *T. clausenii* (PUPO *et al.*, 1996), podem também estar relacionados à atividade encontrado no extrato metanólico dos frutos de *T. clausenii*.

Há na literatura o relato da atividade inseticida dos ácidos 7-fenileptanóico e 7-fenilept-4-enóico sobre *Manduca sexta* (Lepdoptera: Sphingidae), *Heliothis virescens* (Lepdoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* (Lepdoptera: Noctuidae) (VANDERHERCHEN *et al.*, 2005). Ensaio por injeção abdominal foram realizados com os ácidos 7-fenileptanóico e 7-fenilept-4-enóico na dose de 50 µg/inseto em lagartas de 4º instar de *M. sexta*, *H. zea* e *H. virescens*. Para ambos ácidos e insetos foram observadas mortalidades na faixa de 55,0 a 70,0 %.



$$n = 3$$

Ácido 7-fenileptanóico

O estudo da atividade inseticida dos ácidos 7-fenileptanóico e 7-fenilept-4-enóico foi realizado devido a essas substâncias serem análogos não peptídicos do TMOF (*Trypsin Modulating Oostatic Factor*).

O TMOF (decapeptídeo) é um hormônio originalmente isolado dos ovários do inseto *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) que regula a biossíntese do sistema digestivo nos mosquitos. Foi verificado através de ensaios, que larvas de mosquitos alimentados com este hormônio apresentavam inibição do crescimento e desenvolvimento. Estudos do TMOF mostram que este decapeptídeo inibe a biossíntese da tripsina prejudicando a síntese de proteínas necessárias para o desenvolvimento e reprodução apresentando altos índices de mortalidade, para mosquitos alimentados com este hormônio (VANDERHERCHEN *et al.*, 2005).

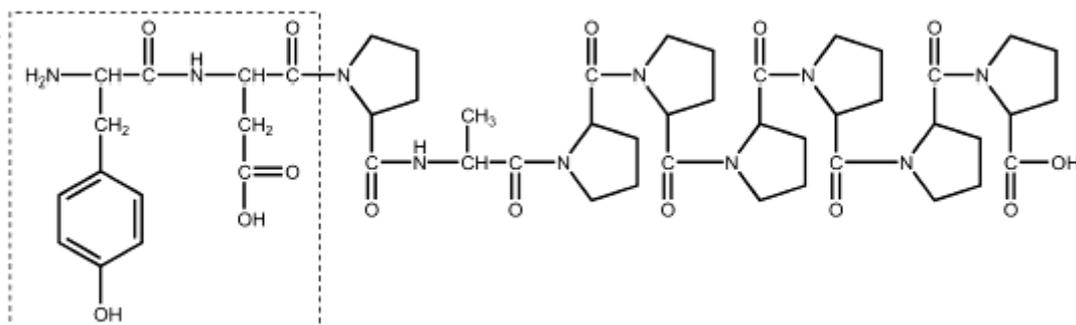


FIGURA 3.1: Estrutura do TMOF, indicação da região do peptídeo em que foram baseados os ácidos não peptídicos.

A atividade do TMOF também foi observada em *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) besouro do citrus e *Heliothis virescens* (Lepdoptera: Noctuidae) lagarta do tabaco.

VANDERHERCHEN *et al.* (2005) verificaram através de ensaios com TMOF e análogos não peptídicos do TMOF em *M. sexta*, que os análogos não peptídicos do TMOF apresentam um modo de ação ainda desconhecido, diferente do modo de ação do TMOF em mosquitos. Desta forma, o modo de ação dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos em *S. frugiperda* ainda é desconhecido.

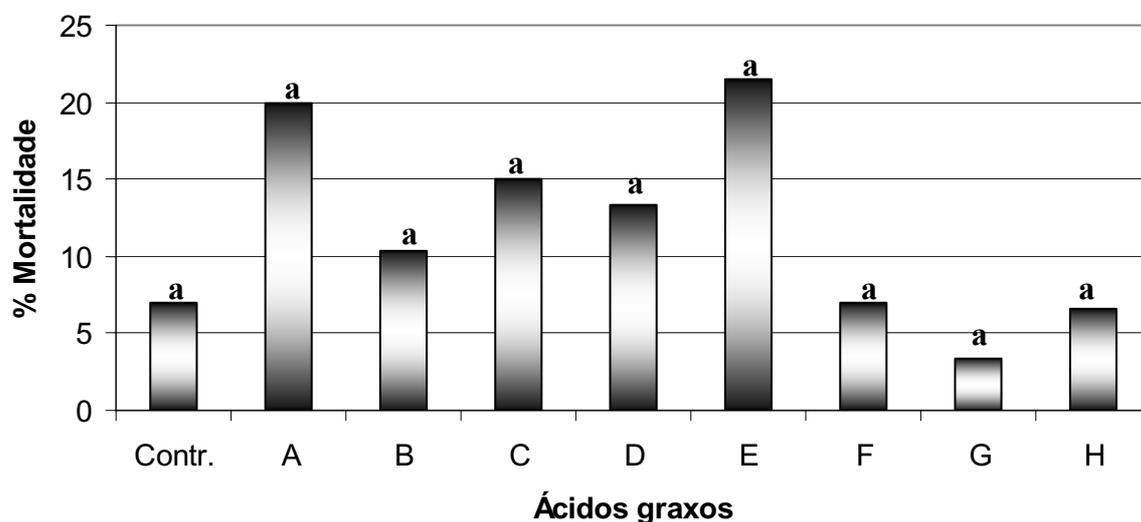
3.1.2.2 - Ensaios biológicos realizados com ácidos graxos

Devido à presença minoritária do ácido hexadecanóico em ambas as amostras, o ensaio de toxicidade foi realizado com este ácido. Visto que não havia nenhum relato na literatura de ensaios de toxicidade de ácidos graxos com cadeias metilênicas entre 5 a 16 carbonos sobre *S. frugiperda*, ensaios com estes ácidos comerciais foram realizados.

TABELA 3.7 – Identificação dos códigos dos ácidos graxos

Ácidos graxos	Código
Ácido pentanóico	A
Ácido hexanóico	B
Ácido heptanóico	C
Ácido octanóico	D
Ácido nonanóico	E
Ácido decanóico	F
Ácido dodecanóico	G
Ácido hexadecanóico	H

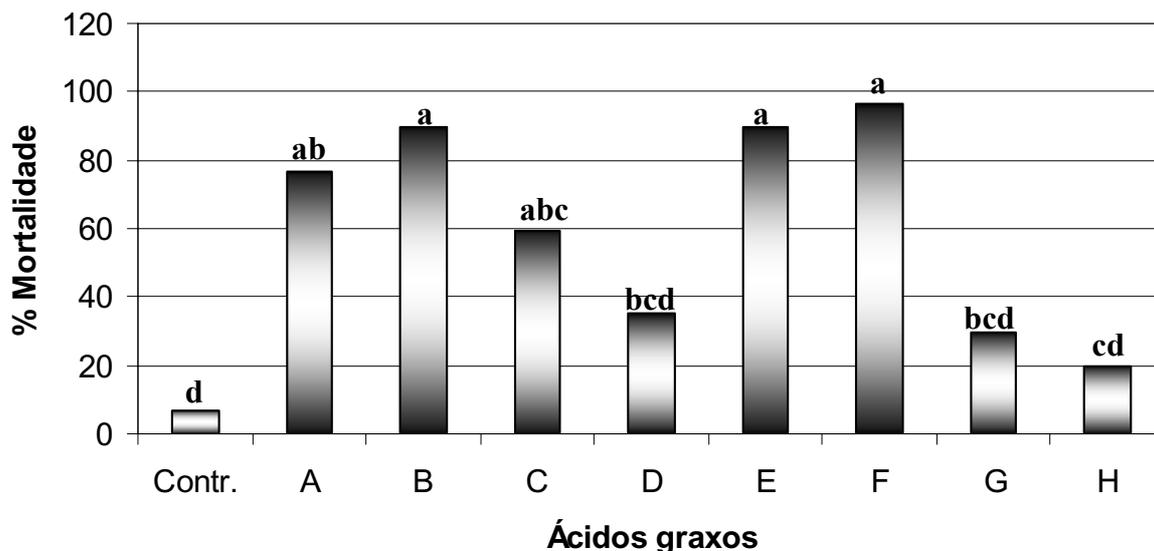
Os ensaios de toxicidade com ácidos graxos sobre *S. frugiperda* foram realizados conforme metodologia descrita no item 4.7 p.143, nas concentrações de 1,0 e 10,0 mg/mL em triplicata.



Dose média: 1,42 µg/mg larva

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

GRÁFICO 3.5 - Resultado do ensaio realizado com os ácidos graxos (C5-C16) na concentração de 1,0 mg/mL em triplicata



Dose média: 13,78 $\mu\text{g}/\text{mg}$ larva

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

GRÁFICO 3.6 - Resultado do ensaio realizado com os ácidos graxos (C5-C16) na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata

Através dos resultados obtidos, verificou-se que o ácido hexadecanóico (**H**) não apresentou alta porcentagem de mortalidade nas concentrações 1,0 e 10,0 mg/mL, demonstrando que este ácido apresenta baixa toxicidade se comparado ao conjunto dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alcenóicos, entretanto não podemos descartar a ocorrência de sinergismo entre a mistura desses compostos.

Observou-se também que os ácidos hexanóico, nonanóico e decanóico na concentração de 10,0 mg/mL apresentaram as mais altas porcentagens de mortalidade de 90,0, 96,67 e 96,67 %, respectivamente. Entretanto, na concentração de 1,0 mg/mL, não foram observados resultados significativos para nenhum dos ácidos.

Relatos da atividade tóxica dos ácidos graxos em outros tipos de insetos foram encontrados. PENÃFLOR *et al.* (2004) realizaram ensaios de toxicidade por aplicação tópica com ácidos graxos sintéticos com cadeias metilênicas entre 5 a 9 carbonos na dose de 0,1 mg/inseto em *Atta sexdens*

rubropilosa (formiga cortadeira). Os ácidos graxos que apresentaram atividade tóxica para formiga cortadeira foram os ácidos hexanóico e heptanóico, que diminuíram a longevidade mediana de 12 dias (controle) para 10 e 9 dias, respectivamente.

MANSSON *et al.* (2006) verificaram a atividade anti-alimentar dos ácidos graxos (C6 a C13) em *Hylobius abietis* (L.) (Coleóptera: Curculionidae) besouro do pinho. Testes de escolha mostraram que os ácidos graxos com cadeias metilênicas entre C-6 a C-11 foram ativos. Entretanto, o ácido nonanóico em 4,0 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ foi o mais ativo dentre os ácidos utilizados nos testes.

3.1.2.3 - Ensaio biológico realizado com o extrato metanólico das inflorescências *T. catigua*

A partir dos resultados obtidos do ensaio de toxicidade realizado com o extrato metanólico das inflorescências de *T. catigua* (64,4 % de mortalidade, GRÁFICO 3.4 p. 28), este foi fracionado através da partição líquido-líquido (FLUXOGRAMA 4.2, p. 129). Foram obtidas quatro frações (TABELA 4.4, p. 134): Tflcm1 (Hexano), Tflcm2 (CH_2Cl_2), Tflcm3 (AcOEt) e Tflcm4 (MeOH/ H_2O).

As frações obtidas foram ensaiadas sobre *S. frugiperda* (metodologia, p. 143) em triplicata, na concentração de 10,0 mg/mL com dose média de 17,01 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de larva.

TABELA 3.8 – Resultado do ensaio realizado com as frações Tflcm1 a Tflcm4, na concentração de 10,0 mg/mL em triplicata .

Frações	Mortalidade (%)
Controle	6,66b
Tflcm1	50,0a
Tflcm2	50,0a
Tflcm3	20,83ab
Tflcm4	13,33ab

Dose média: 17,01 µg/mg larva

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

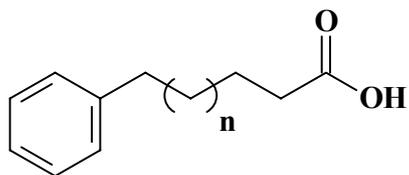
A partir dos resultados observados, as frações Tflcm1 (50,0 % mortalidade) e Tflcm2 (50,0 % mortalidade) foram selecionadas para o prosseguimento dos estudos.

Do refraçãoamento de Tflcm2 (FLUXOGRAMA 4.7, p. 136) foi isolado o flavonóide *ent*-catequina (XXIV), que devido à pequena quantidade de massa isolada, não pode ser ensaiada sobre *S. frugiperda*. Entretanto, foi observado na literatura o relato da atividade do flavonóide *ent*-catequina sobre *S. frugiperda*. Leite (2005) verificou através de ensaios de ingestão, que a substância *ent*-catequina nas concentrações de 1, 10 e 50 mg/kg apresentava mortalidade larval de 50,00, 53,33 e 66,67 %, respectivamente.

Os dados observados mostram que provavelmente o flavonóide *ent*-catequina possa estar associado à atividade encontrada no extrato metanólico das inflorescências de *T. catigua* (Tflcm).

O estudo da fração Tflcm1 (FLUXOGRAMA 4.6, p. 135) foi realizado, porém nenhuma substância foi identificada. Esforços foram realizados para isolamento de substâncias que poderiam estar relacionadas à atividade observada, entretanto a grande quantidade de pigmentos nas amostras e as quantidades de massa dificultaram o trabalho.

3.2 – Substâncias isoladas e identificadas



- | | | | | |
|------------|-------|-------------|--------|-------------|
| I | n = 6 | V | n = 10 | insaturação |
| II | n = 7 | VI | n = 10 | |
| III | n = 8 | VII | n = 11 | insaturação |
| IV | n = 9 | VIII | n = 11 | |

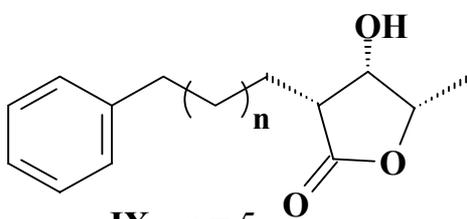
Ácidos ω-fenil alcanóicos e alcenóicos

Procedência: Sementes de *T. clausenii*

Isolamento: ps. 130 e 131

Identificação: p. 47

Atividade Biológica: p. 29



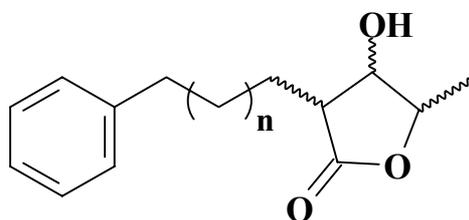
- | | |
|------------|--------|
| IX | n = 5 |
| X | n = 7 |
| XI | n = 9 |
| XII | n = 11 |

γ-lactonas

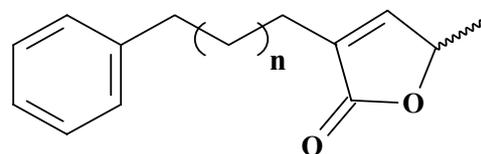
Procedência: Sementes de *T. clausenii*

Isolamento: ps. 130 e 131

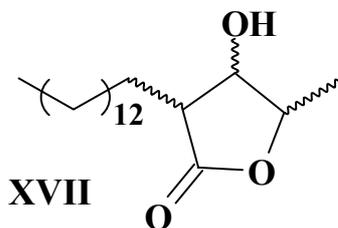
Identificação: p. 61



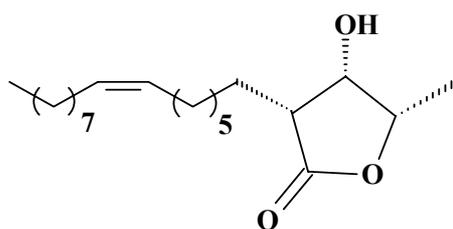
- | | |
|-------------|-------|
| XIII | n = 7 |
| XIV | n = 9 |



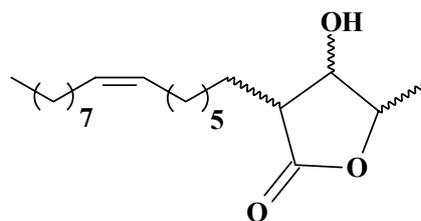
- | | |
|------------|--------|
| XV | n = 9 |
| XVI | n = 11 |



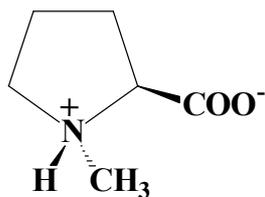
XVII



XVIII



XIX



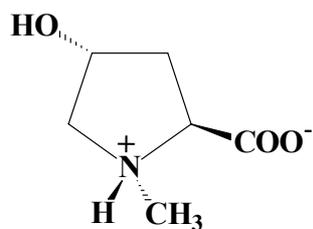
XX

N-metilprolina

Procedência: Sementes de *T. clausenii*

Isolamento: p. 133

Identificação: p. 74



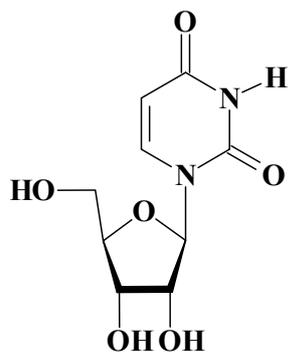
XXI

4-hidroxi-N-metilprolina

Procedência: Sementes de *T. clausenii*

Isolamento: p. 133

Identificação: p. 74



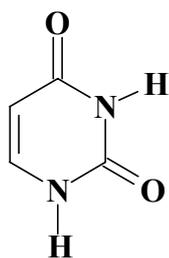
XXII

Uridina

Procedência: Sementes de *T. clausenii*

Isolamento: p. 133

Identificação: p. 79



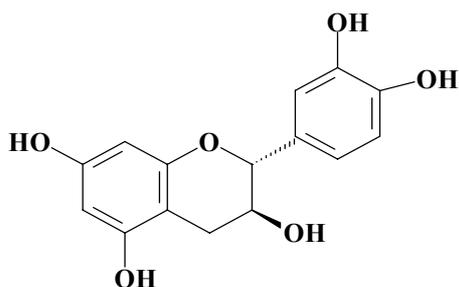
XXIII

Uracila

Procedência: Sementes de *T. clausenii*

Isolamento: p. 133

Identificação: p. 79



XXIV

ent-catequina

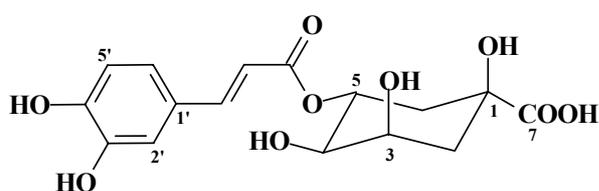
Procedência: Inflorescência de *T.*

catigua

Isolamento: p. 136

Identificação: 84

Atividade Biológica: p. 41



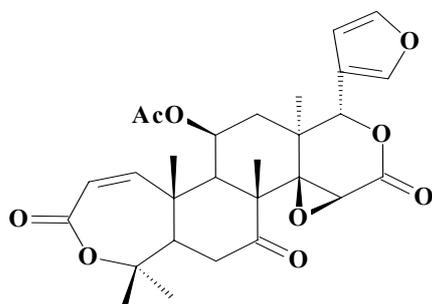
XXV

Ácido 5-O-cafeoilquínico

Procedência: Casca das sementes de *T. elegans*

Isolamento: p. 139

Identificação: p. 89



XXVI

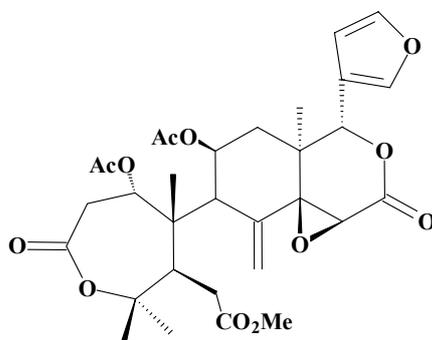
11β-acetoxibacunona

Procedência: Sementes de *T.*

elegans

Isolamento: p. 140

Identificação: p. 95



XXVII

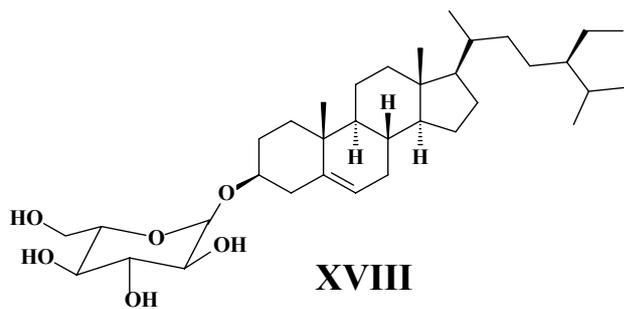
1,2-diidro-1α-acetoxi-11β-acetoxi-14,15-epoxicneorina R

Procedência: Sementes de *T.*

elegans

Isolamento: p. 140

Identificação: p. 104

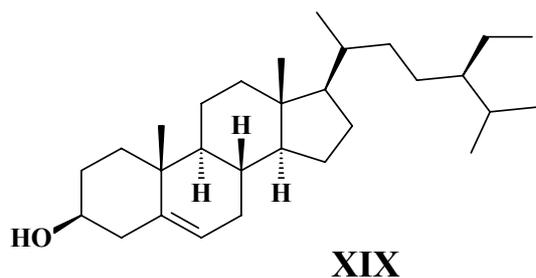


3-β-O-β-glucopiranosil sitosterol

Procedência: Sementes de *T. clausenii*

Isolamento: p. 133

Identificação: 114

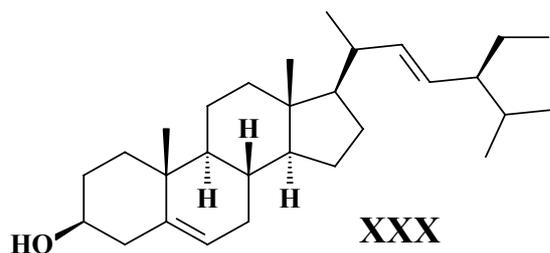


β-sitosterol (mistura)

Procedência: Sementes de *T. elegans*

Isolamento: p. 141

Identificação: p.119

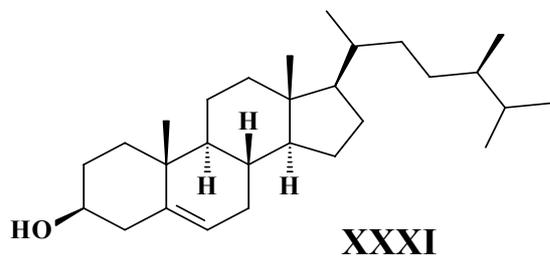


campesterol (mistura)

Procedência: Sementes de *T. elegans*

Isolamento: p. 141

Identificação: p. 119

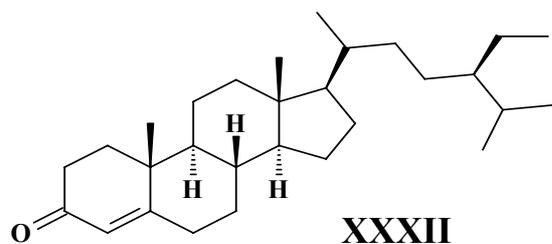


stigmasterol (mistura)

Procedência: Sementes de *T. elegans*

Isolamento: p. 141

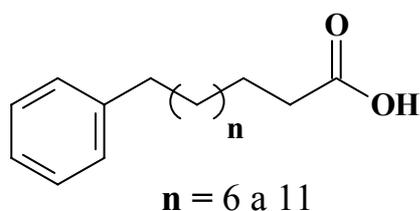
Identificação: p. 119



sitostenona (mistura)
Procedência: Sementes de *T. elegans*
Isolamento: p. 141
Identificação: p. 119

3.3 – IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL

3.3.1 - Identificação dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos (I-VIII)



A mistura dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos (I-VIII) foi isolada do extrato metanólico das sementes de *T. clausenii*. As substâncias I a VIII, já foram isoladas anteriormente das folhas e frutos de *T. clausenii* (PUPO *et al.*, 1996).

Os ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos (I-VIII) foram identificados através do espectro de RMN ^1H e principalmente pela análise via CG-EM. Os dados obtidos foram concordantes com a literatura (PUPO *et al.*, 1996).

A partir dos resultados obtidos dos ensaios biológicos, a amostra Tslm1-Fr4(4)-2 foi analisada. No espectro de RMN de ^1H desta amostra (FIGURA 3.2, p. 48) foram observados sinais característicos de hidrogênios aromáticos em δ 7,15-7,28 (*m*, 5H), dois tripletos em δ 2,59 ($J = 7,6$ Hz, 2H) e δ 2,34 ($J = 7,4$ Hz, 2H), referente aos hidrogênios benzílicos e α -carbonílicos, respectivamente. Foram observados também sinais entre δ 1,20-2,00 característicos da cadeia metilênica, e um sinal minoritário em δ 5,34 (*t*, $J = 4,4$ Hz) referente à hidrogênios olefínicos. A partir da análise realizada do espectro de RMN de ^1H , observou-se que havia nesta fração a mistura dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos.

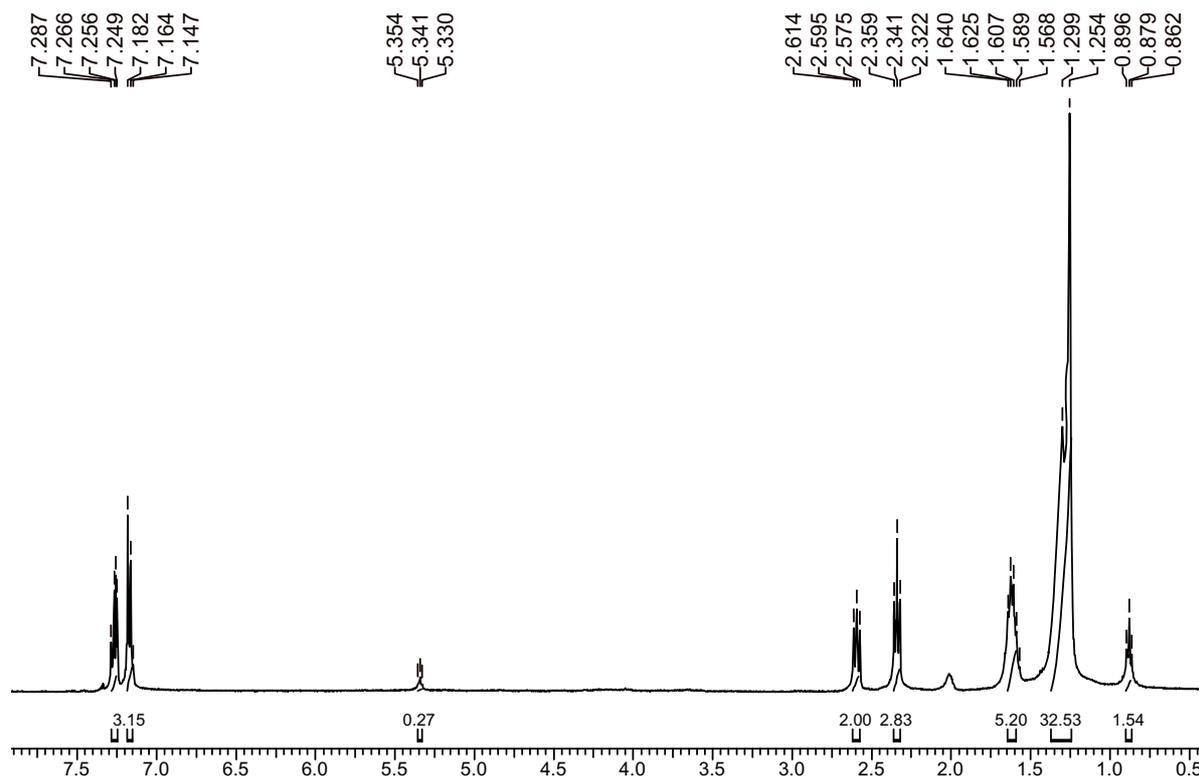
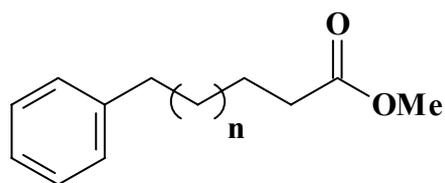


FIGURA 3.2: Espectro de RMN ^1H da fração Tslm1-Fr4(4)-2 (400 MHz, CDCl_3)

Para identificação do tamanho das cadeias metilênicas dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos, uma pequena alíquota da amostra foi esterificada (procedimento, p. 142), e posteriormente foi realizada a análise dos ésteres metílicos via CG-EM (condições, p. 123). A análise da fração Tslm1-Fr4(4)-2 via CG-EM possibilitou a identificação dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos e ácidos graxos presentes na amostra (FIGURA 3.3, p. 49).

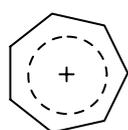
Os ésteres referentes aos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos analisados via CG-EM, foram nomeados como substâncias **I'** a **VIII'**.



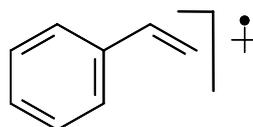
$$n = 6 \text{ a } 11$$

I' a **VIII'**

Nos espectros de massas das substâncias **I'** a **VIII'** (FIGURAS 3.8 a 3.11), observou-se a perda de fragmento com m/z de 32, referente à perda de MeOH. Para as substâncias com cadeia metilênica saturada (**I'** a **IV'**, **VI'** e **VIII'**), observou-se através dos respectivos espectros de massas, o pico base em m/z 91, referente ao íon tropílio. Já para os espectros de massas das substâncias **V'** e **VII'**, com insaturação na cadeia lateral, o pico base foi de m/z 104.



m/z 91



m/z 104

Os ácidos graxos foram identificados comparando-se os espectros de massas obtidos aos espectros de massas existentes na biblioteca de dados do CG-EM.

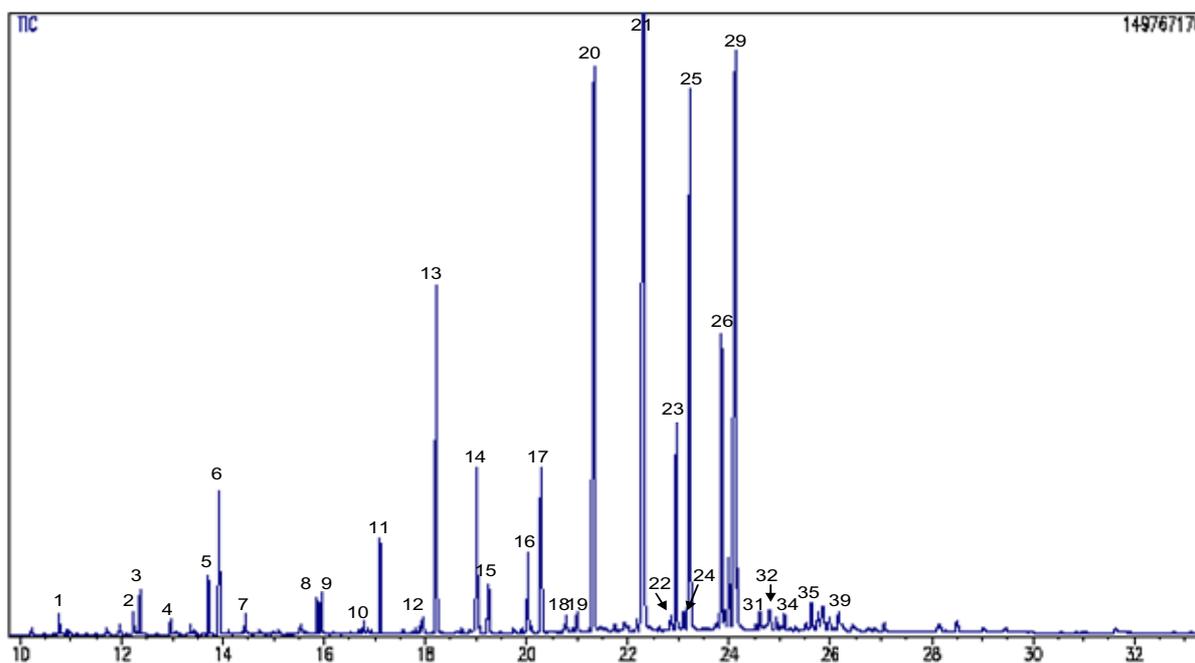


FIGURA 3.3: Cromatograma da fração Tslm1-Fr4(4)-2 (Condições, p. 123)

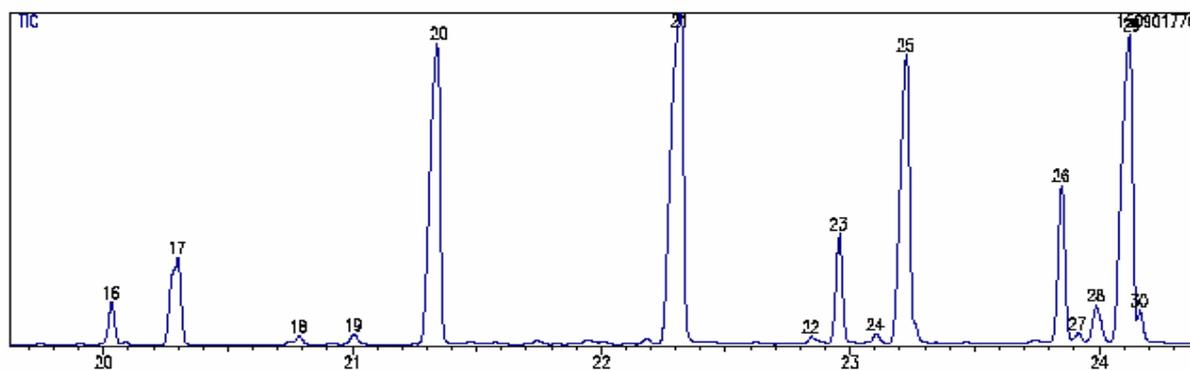


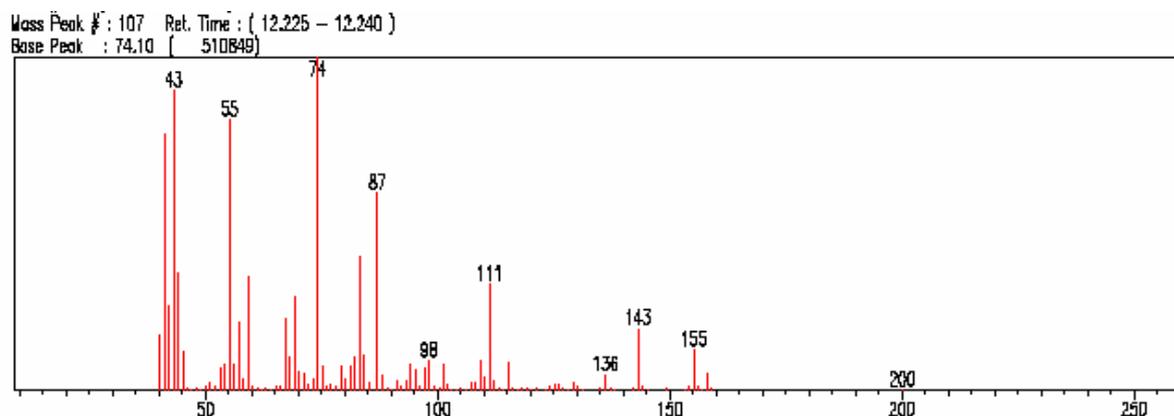
FIGURA 3.4: Ampliação do cromatograma da fração Tslm1-Fr4(4)-2

TABELA 3.9: Compostos identificados na fração Tslm1-Fr4(4)-2, obtidos via CG-EM

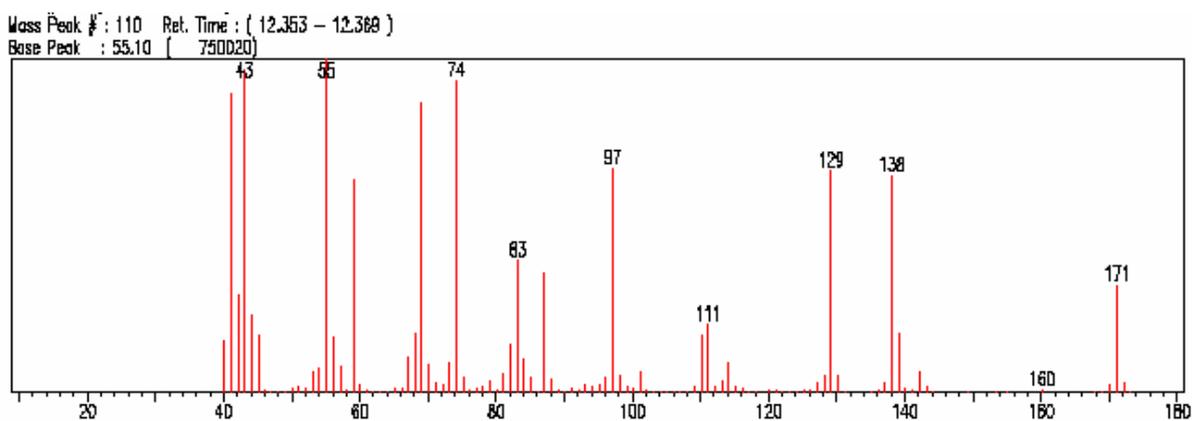
Pico	[M] ⁺	Nome	t _r (min.)
2	200	Decanoato-10-oxo de metila	12,230
3	202	Octanodioato de metila	12,361
5	216	Nonanodioato de metila	13,713
6	200	Ácido p-toluenosulfônico-etil-éster	13,928
8	213	N-etil-N,4-dimetil-benzenosulfonamida	15,864
9	242	Tetradecanoato de metila	15,948
11	256	Pentadecanoato de metila	17,107
12	268	Hexadecenoato de metila	17,949
13	270	Hexadecanoato de metila	18,217
14	282	Heptadecenoato de metila	19,017
15	262	ω-fenil decanoato de metila	19,242
16	296	Octadecenoato de metila	20,029
17	276	ω-fenil undecanoato de metila	20,295
20	290	ω-fenil dodecanoato de metila	21,348
21	304	ω-fenil tridecanoato de metila	22,317
23	316	ω-fenil tetradecenoato de metila	22,953
25	318	ω-fenil tetradecanoato de metila	23,222
26	330	ω-fenil pentadecenoato de metila	23,848
27	354	Docosanoato de metila	23,913
29	332	ω-fenil pentadecanoato de metila	24,131
30	382	Tetracosanoato de metila	25,755

FIGURA 3.5: Espectros de massas referente aos picos 2, 3 e 5 obtidos via CG-EM.

Substância: Decanoato-10-oxo de metila



Substância: Octanodioato de metila



Substância: Nonanodioato de metila

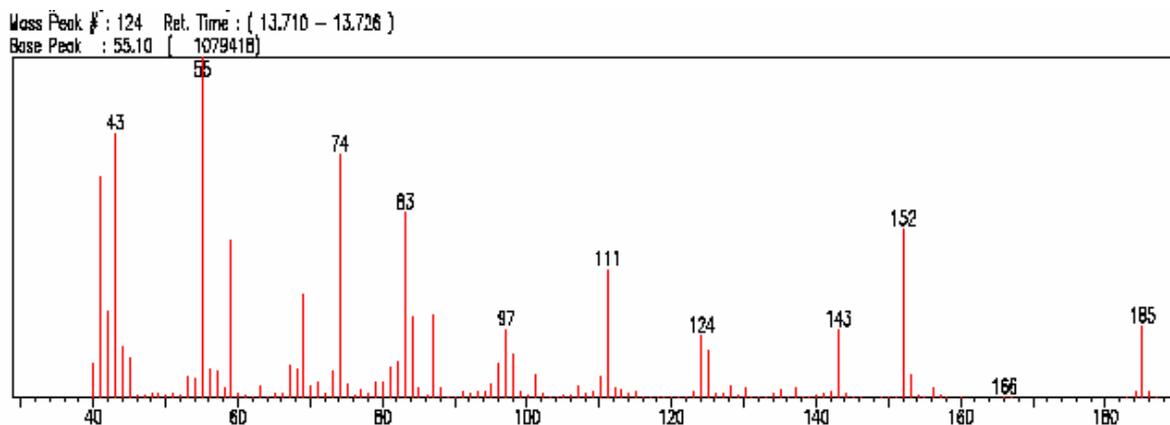
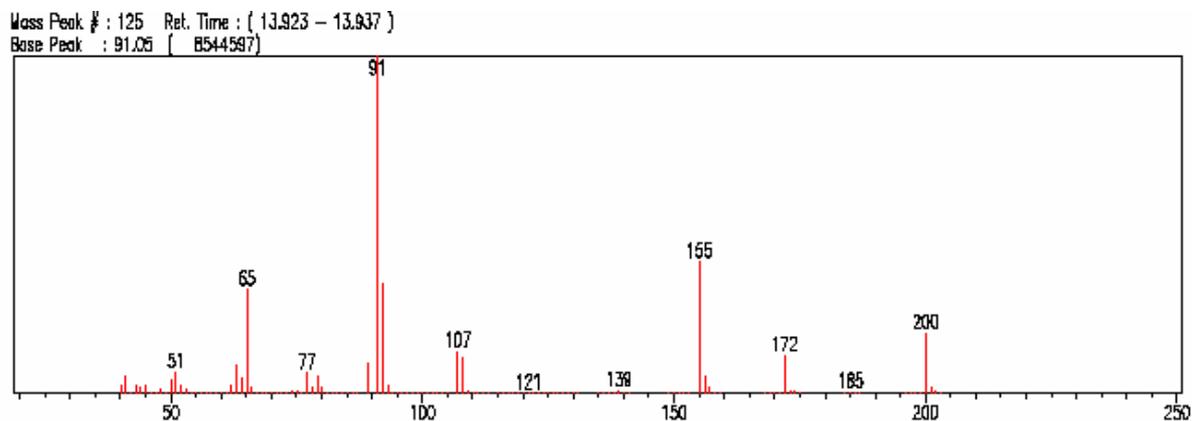
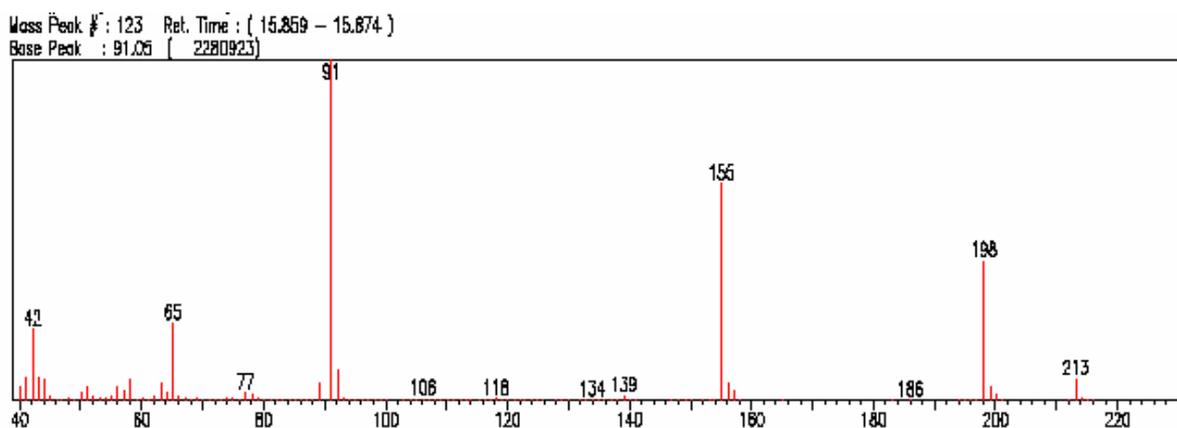


FIGURA 3.6: Espectros de massas referente aos picos 6, 8 e 9 obtidos via CG-EM.

Substância: Ácido p-toluenosulfônico-etil-éster



Substância: N-etil-N,4-dimetil-benzenosulfonamida



Substância: Tetradecanoato de metila

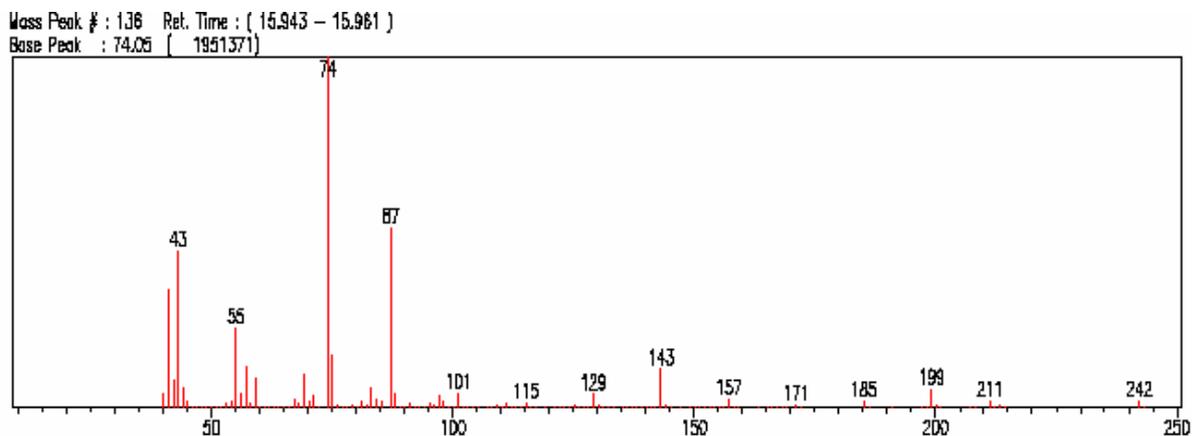
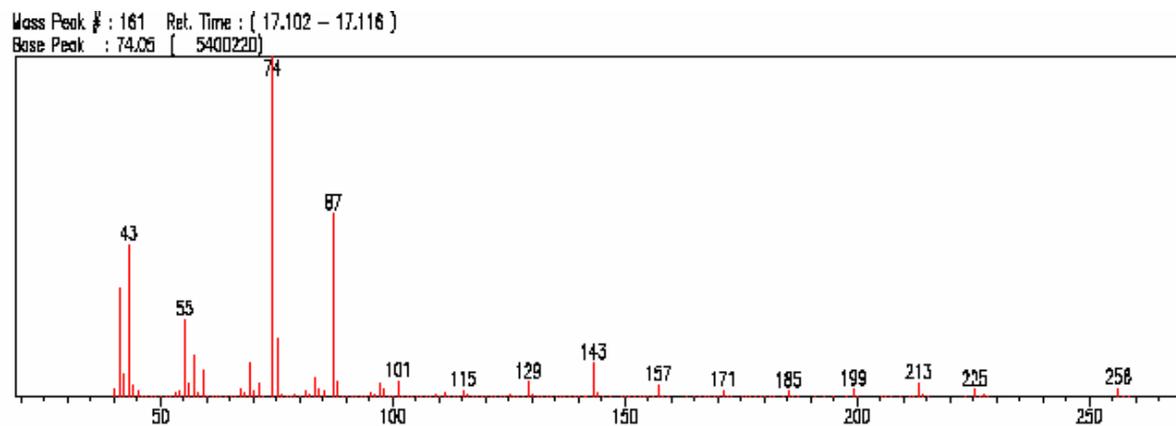
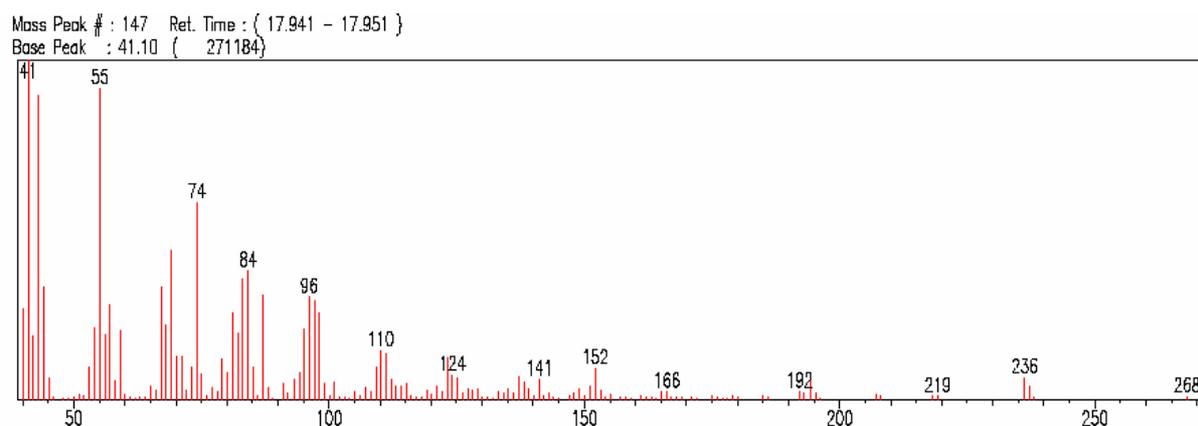


FIGURA 3.7: Espectros de massas referente aos picos 11, 12 e 13 obtidos via CG-EM.

Substância: Pentadecanoato de metila



Substância: Hexadecenoato de metila



Substância: Hexadecanoato de metila

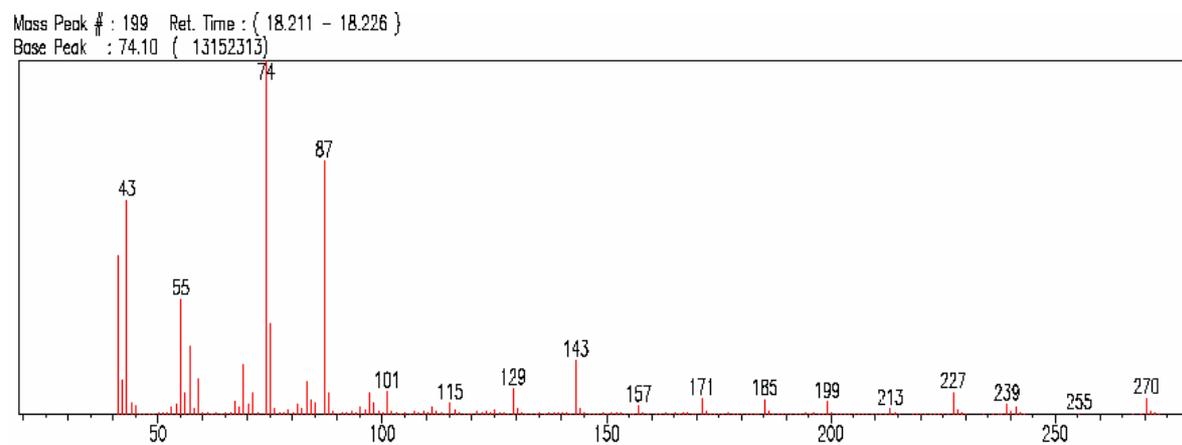
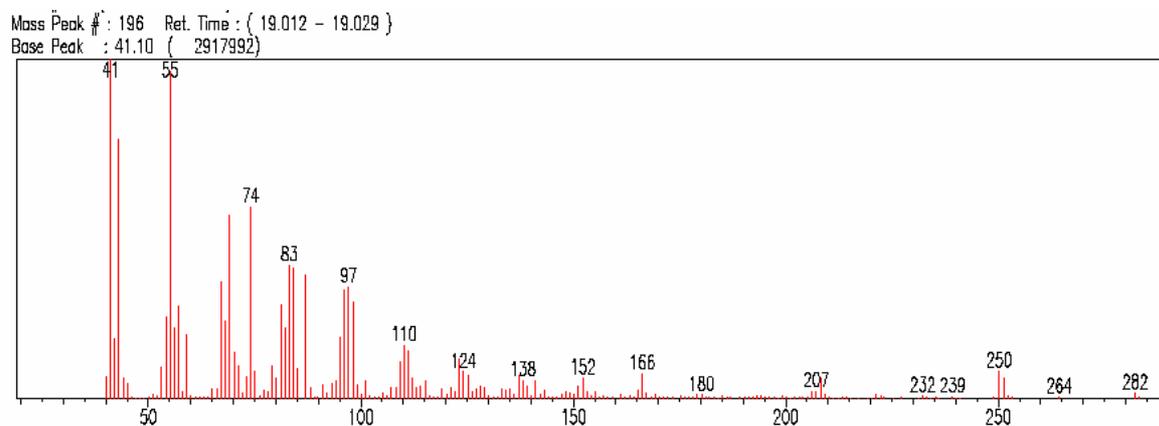
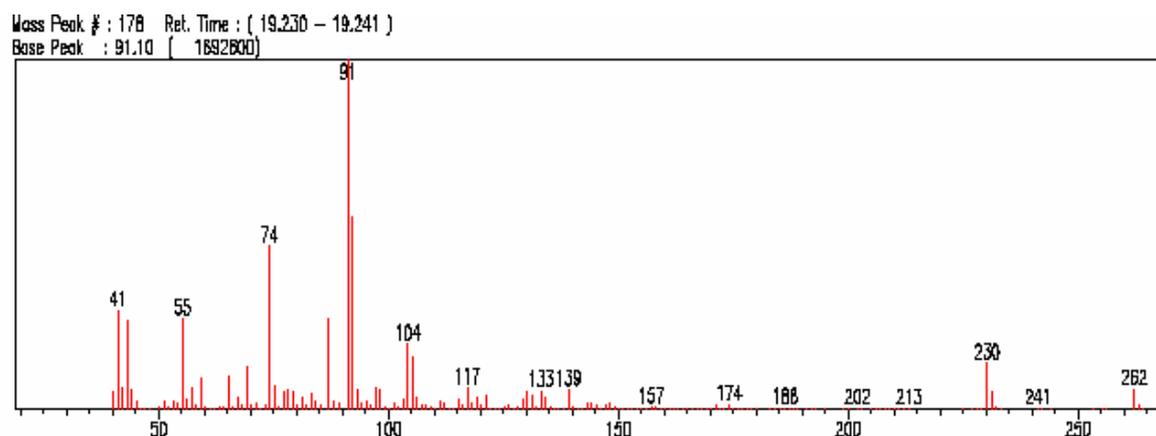


FIGURA 3.8: Espectros de massas referente aos picos 14, 15 e 16 obtidos via CG-EM.

Substância: Heptadecenoato de metila

Substância: ω -fenil decanoato de metila

Substância: Octadecenoato de metila

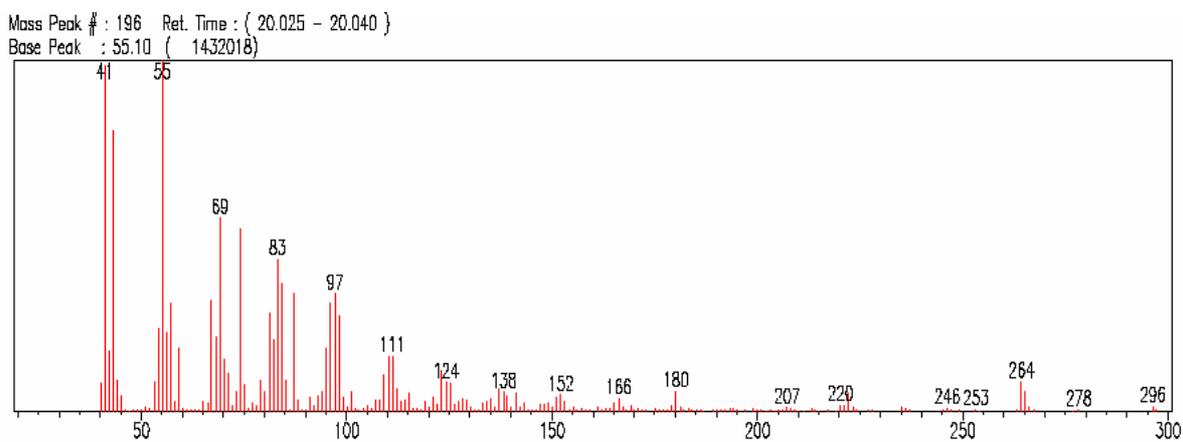


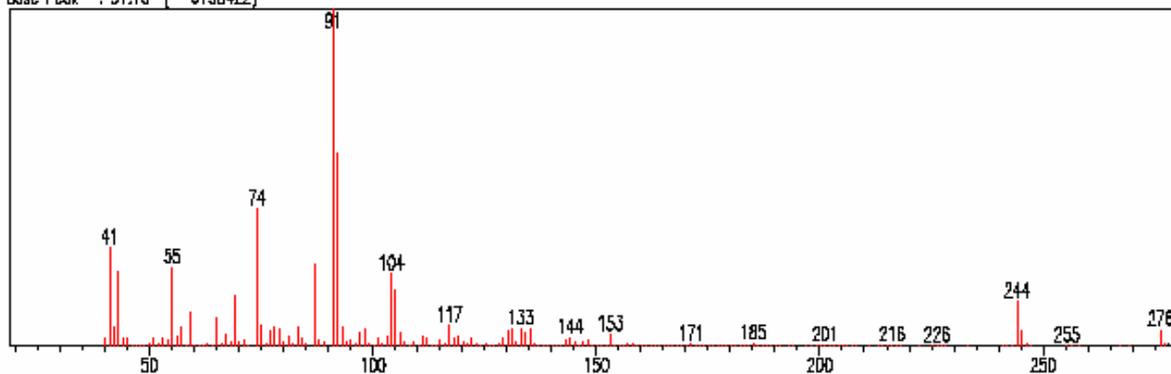
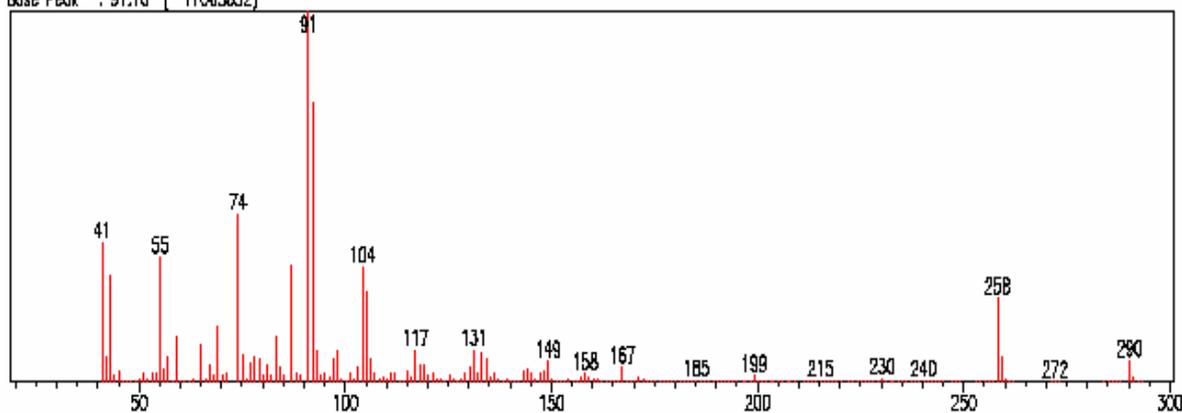
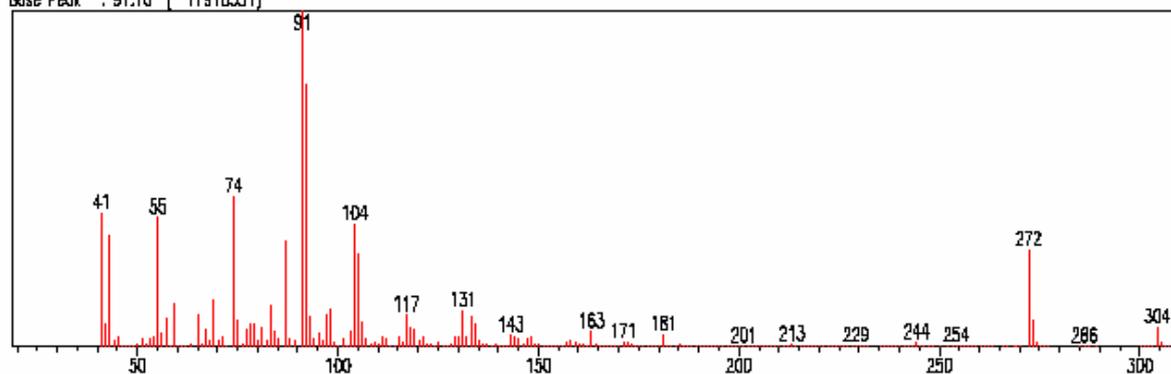
FIGURA 3.9: Espectros de massas referente aos picos 17, 20 e 21 obtidos via CG-EM.Substância: ω -fenil undecanoato de metilaMass Peak #: 190 Ret. Time: (20.296 - 20.304)
Base Peak : 91.10 (6198422)Substância: ω -fenil dodecanoato de metilaMass Peak #: 221 Ret. Time: (21.327 - 21.349)
Base Peak : 91.10 (17063832)Substância: ω -fenil tridecanoato de metilaMass Peak #: 236 Ret. Time: (22.298 - 22.322)
Base Peak : 91.10 (17918531)

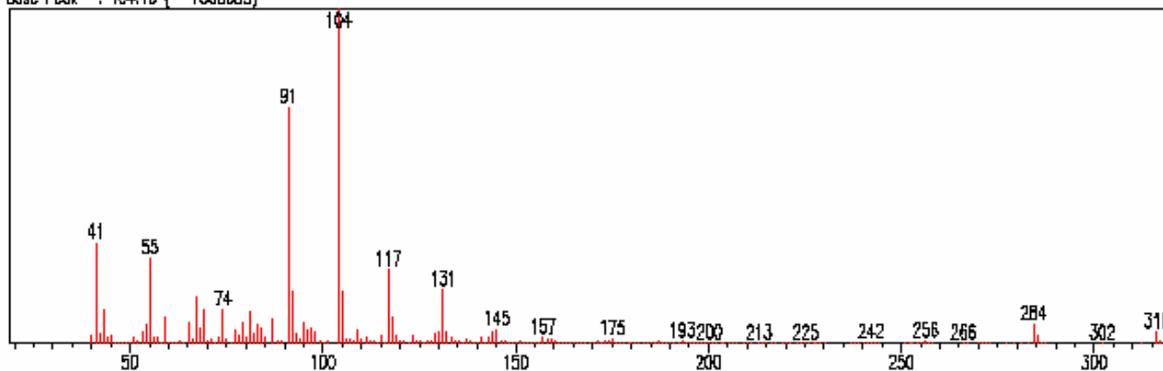
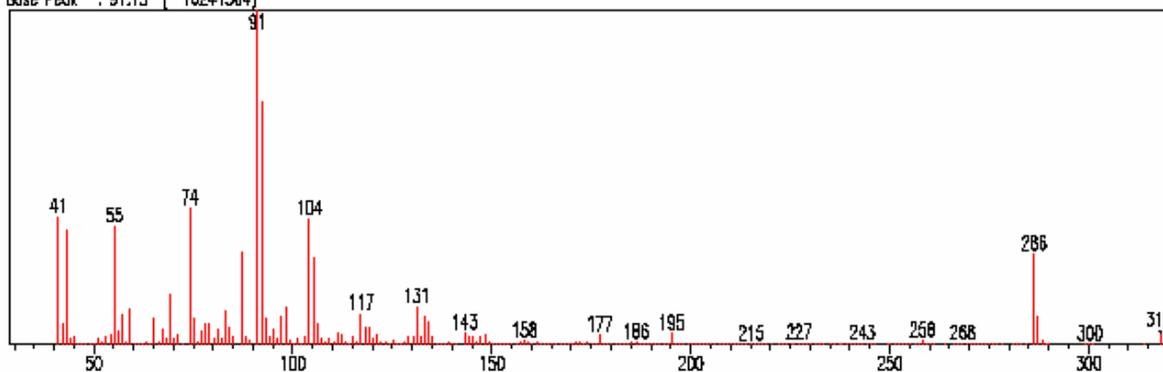
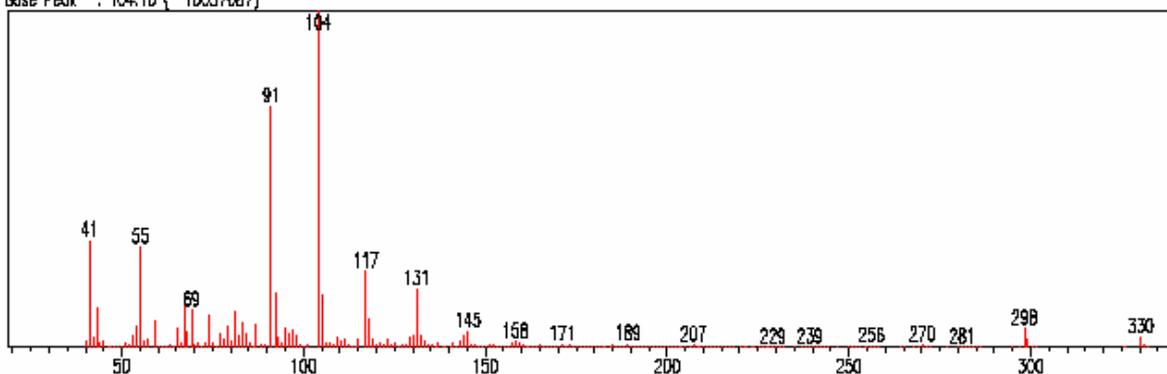
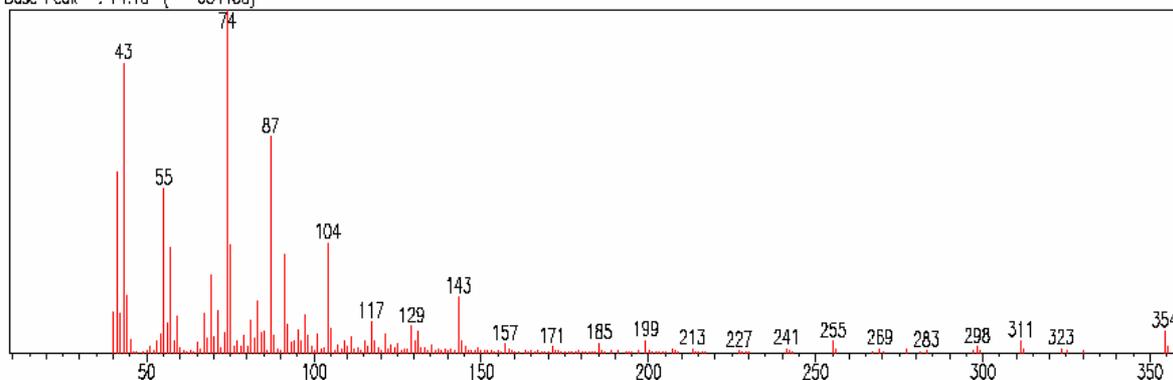
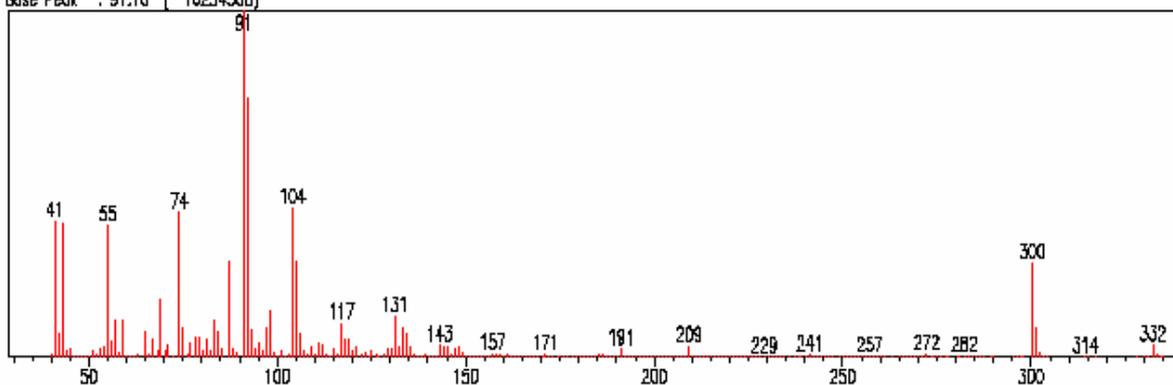
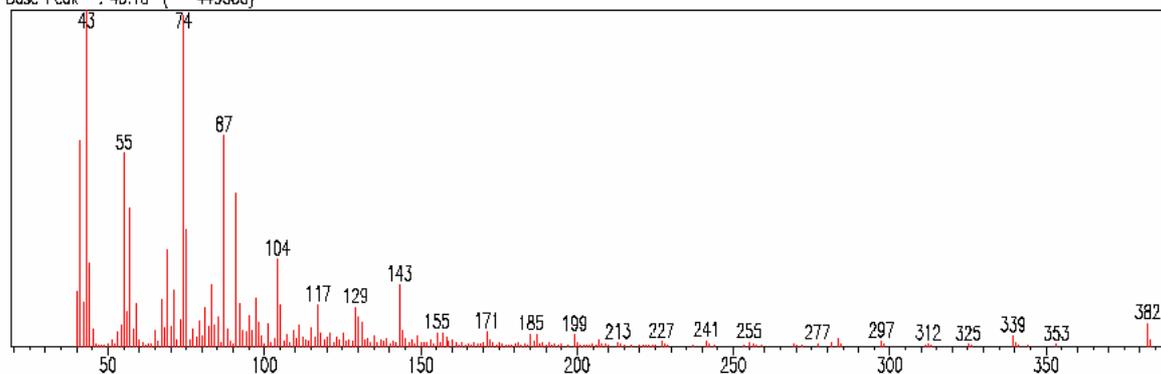
FIGURA 3.10: Espectros de massas referente aos picos **23**, **25** e **26** obtidos via CG-EM.Substância: ω -fenil tetradecenoato de metilaMass Peak #: 217 Ret. Time: (22.950 - 22.964)
Base Peak : 104.10 (7808085)Substância: ω -fenil tetradecanoato de metilaMass Peak #: 242 Ret. Time: (23.212 - 23.232)
Base Peak : 91.15 (16241564)Substância: ω -fenil pentadecenoato de metilaMass Peak #: 231 Ret. Time: (23.843 - 23.858)
Base Peak : 104.10 (10067087)

FIGURA 3.11: Espectros de massas referente aos picos **27**, **29** e **30** obtidos via CG-EM.

Substância: Docosanoato de metila

Mass Peak #: 192 Ret. Time: { 23.912 - 23.924 }
Base Peak: 74.10 (634480)Substância: ω -fenil pentadecanoato de metilaMass Peak #: 258 Ret. Time: { 24.109 - 24.129 }
Base Peak: 91.10 (16254500)

Substância: Tetracosanoato de metila

Mass Peak #: 212 Ret. Time: { 25.747 - 25.770 }
Base Peak: 43.10 (449588)

Através das identificações dos ésteres referentes aos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos via CG-EM, pode-se confirmar a presença das substâncias **I** a **VIII** na fração Tslm1-Fr4(4)-2.

Não foi possível realizar a identificação de alguns picos minoritários presentes no cromatograma, visto que somente os dados de seus respectivos espectros de massas eram insuficientes para a caracterização de outras substâncias. Isso porque estes picos representavam substâncias minoritárias na amostra e também analisando o espectro de RMN de ^1H não foi possível obter maiores informações sobre estas substâncias, não permitindo assim as suas caracterizações.

O ácido *p*-toluenossulfônico-etil-éster e *N*-etil-*N*,4-dimetil-benzenossulfonamida identificados são derivados do Diazald e provavelmente foram obtidos através da reação de esterificação dos ácidos desta fração.

Através dos resultados obtidos dos ensaios biológicos, a amostra Tslm1-Fr3(2) também foi analisada. No espectro de RMN de ^1H desta fração foram observados sinais característicos dos ácidos ω -fenil alcanóicos. Assim, o mesmo procedimento foi adotado para caracterização dos ácidos e através da análise realizada (CG-EM: condições, p.123), as substâncias **III**, **IV**, **VI** e **VIII** e também os ácidos hexadecanóico e octadecanóico foram identificados nesta amostra.

Com relação à biogênese dos ácidos, Pupo *et al.* (1996) propõem que os ácidos ω -fenil alcanóicos seriam biossintetizados através da condensação das unidades $\text{C}_6\text{-C}_3$ com cadeias policetílicas de vários tamanhos. Vieira *et al.* (1983) propõem que os ácidos ω -fenil alcanóicos seriam intermediários biogénéticos das γ -lactonas.

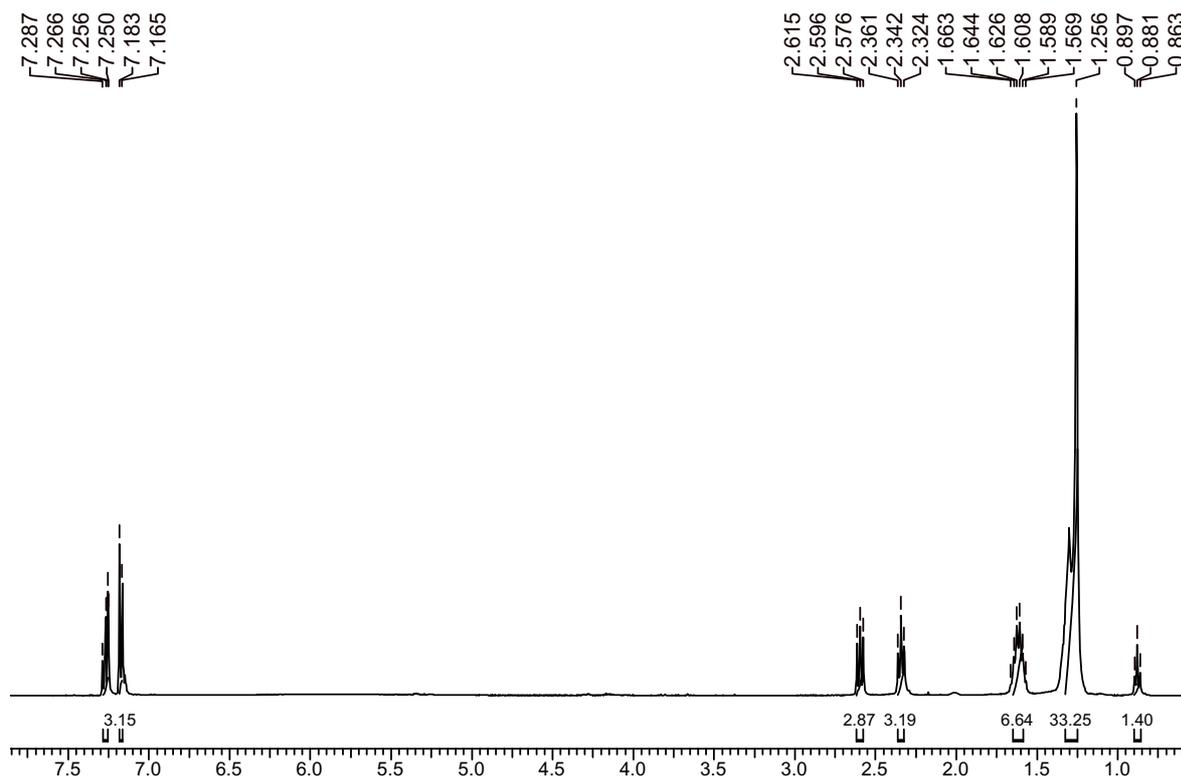


FIGURA 3.12: Espectro de RMN ^1H da fração Tslm1-Fr3(2) (400 MHz, CDCl_3)

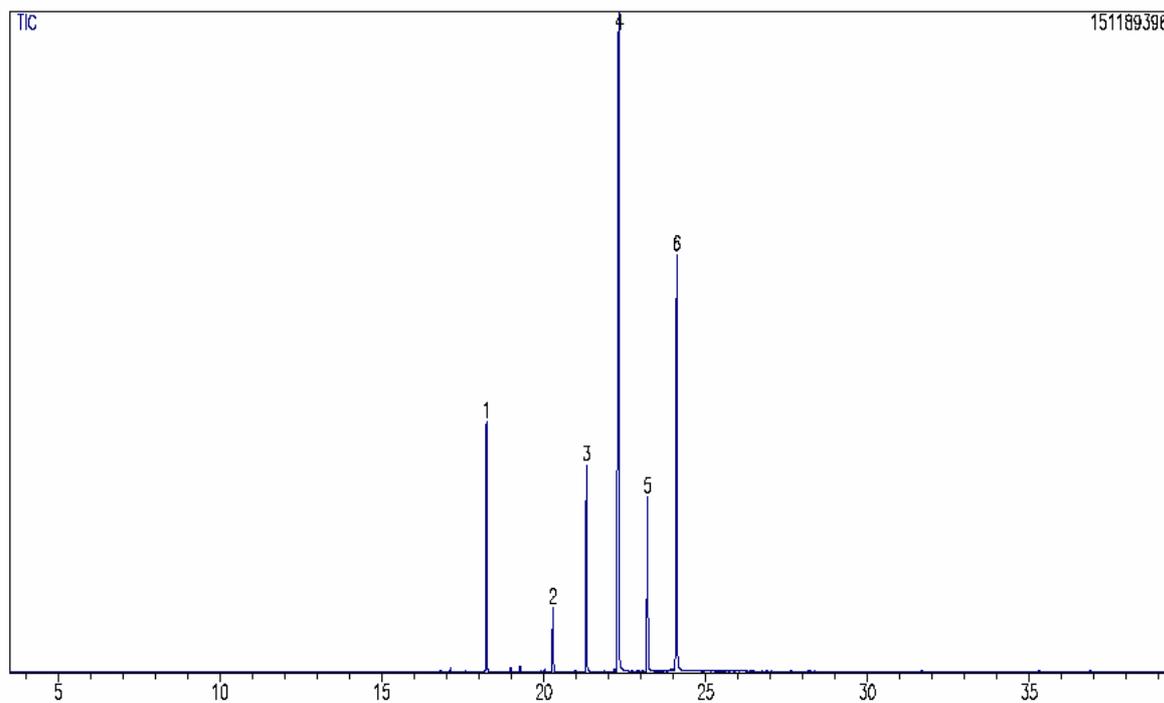
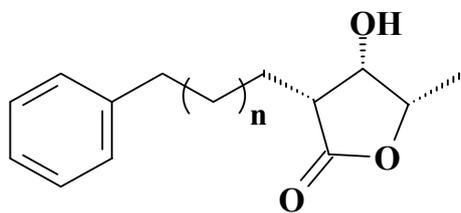


FIGURA 3.13: Cromatograma da fração Tslm1-Fr3(2) (Condições, p.123)

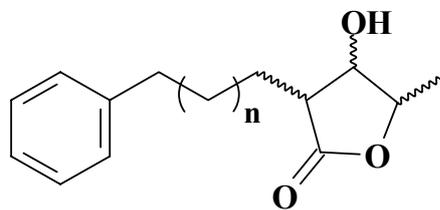
TABELA 3.10: Compostos identificados na fração Tslm1-Fr3(2), obtidos via CG-EM

Pico	[M] ⁺	Nome	t _r (min.)
1	270	Hexadecanoato de metila	18,234
2	298	Octadecanoato de metila	20,288
3	290	ω-fenil dodecanoato de metila	21,327
4	304	ω-fenil tridecanoato de metila	22,331
5	318	ω-fenil tetradecanoato de metila	23,215
6	332	ω-fenil pentadecanoato de metila	24,114

3.3.2 - Identificação das γ -lactonas

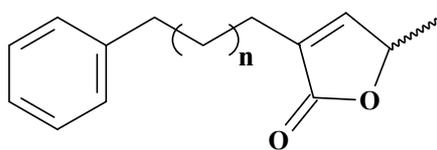
$$n = 5, 7, 9 \text{ e } 11$$

IX a XII



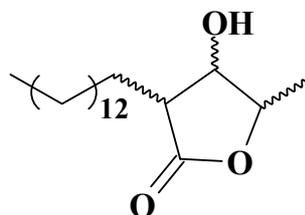
$$n = 7 \text{ e } 9$$

XIII e XIV

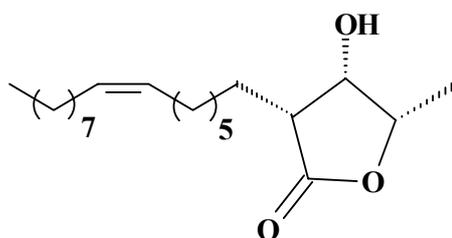


$$n = 9 \text{ e } 11$$

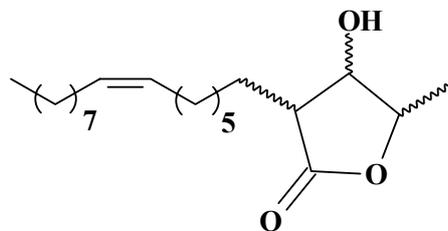
XV e XVI



XVII



XVIII



XIX

O conjunto de γ -lactonas (**IX a XIX**) foi identificado no extrato metanólico das sementes de *T. clausenii*. As substâncias **XI, XII e XV-XVIII**, já foram isoladas anteriormente dos frutos de *T. clausenii* (PUPO *et al.*, 1998).

As γ -lactonas (**IX a XIX**) foram identificadas através do espectro de RMN de ^1H , ^{13}C e principalmente pela análise via CG-EM. Dados da literatura foram utilizados para análise do conjunto das γ -lactonas (PUPO *et al.*, 1998, PIZZOLATTI *et al.*, 2004).

No espectro de RMN de ^1H da fração Tslm1-Fr4(4)-3 (FIGURA 3.19, p. 69) foram observados sinais característicos da unidade γ -lactônica em δ 4,45 (*dq*, $J = 6,4$ e $3,2$ Hz) e δ 4,31 (*dd*, $J = 5,2$ e $3,0$ Hz) referente à hidrogênios carbinólicos, e um sinal de metila em δ 1,44 (*d*, $J = 6,4$ Hz). Foram observados também sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,16-7,29 (*m*, 5H), multiplete em δ 2,59 e um dubleto em δ 2,34 ($J = 8,60$ Hz), característicos de hidrogênios benzílicos e α carbonílicos, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C da fração Tslm1-Fr4(4)-3 (FIGURA 3.20, p. 69), foram observados sinais de carbonos aromáticos (δ 128,4, δ 128,2 e 142,9), carbinólicos (δ 78,7 e δ 71,2), α -carbonílicos (δ 47,6 e δ 33,7) e de carbono carboxílico (δ 177,5). Além de vários sinais em δ 23,0-29,6 referente aos carbonos metilênicos.

Devido à presença de sinais no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C que poderiam caracterizar tanto o conjunto de γ -lactonas quanto os ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos, uma pequena alíquota da amostra foi esterificada (procedimento, p. 142), e posteriormente analisada via CG-EM (condições: p. 123).

Na análise realizada via CG-EM da amostra Tslm1-Fr4(4)-3, pode-se observar a presença das γ -lactonas, ácidos ω -fenil alcanóicos e alcenóicos e ácidos graxos. Pupo *et al.* (1998) propõem que os ácidos ω -fenil alcanóicos seriam intermediários biogénéticos das γ -lactonas, através da condensação das unidades $\text{C}_6\text{-C}_3$ com cadeias policetídicas de vários tamanhos e a condensação com o ácido pirúvico, seguido da ciclização do anel lactônico. Deste modo, a identificação dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos e ácidos graxos juntamente com as γ -lactonas reforçam a biossíntese proposta.

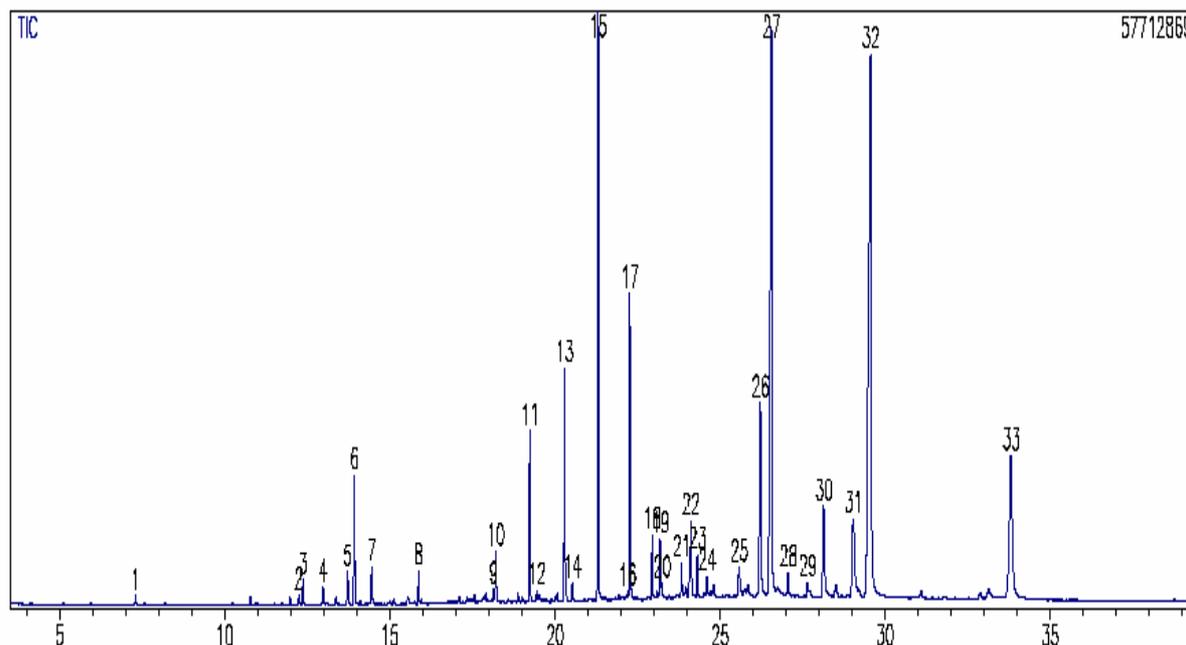


FIGURA 3.14: Cromatograma da fração Tslm1-Fr4(4)-3 (Condições, p.124)

TABELA 3.11: Compostos identificados na fração Tslm1-Fr4(4)-3, obtidos via CG-EM

Pico	[M] ⁺	Nome	t _r (min.)
2	200	Decanoato-10-oxo de metila	12,243
5	216	Nonanodioato de metila	13,722
6	200	Ácido p-toluenosulfônico-etil-éster	13,925
8	213	N-etil-N,4-dimetil-benzenosulfonamida	15,872
9	248	9-fenilnonanoato de metila	18,144
10	270	Hexadecanoato de metila	18,216
11	262	ω-fenil decanoato de metila	19,245
13	274	ω-fenil undecanoato de metila	20,299
15	290	ω-fenil dodecanoato de metila	21,316
17	304	ω-fenil tridecanoato de metila	22,275
18	316	ω-fenil tetradecenoato de metila	22,953
19	318	ω-fenil tetradecanoato de metila	23,197
21	330	ω-fenil pentadecenoato de metila	23,842
22	332	ω-fenil pentadecanoato de metila	24,123

Pico	[M] ⁺	Nome	t _r (min.)
23	290	γ-lactona (IX)	24,317
25	318	γ-lactona (XIII)	25,581
26	328	γ-lactona (XV)	26,230
27	318	γ-lactona (X)	26,566
30	346	γ-lactona (XIV)	28,152
31	356	γ-lactona (XVI)	29,049
32	346	γ-lactona (XI)	29,570
33	374	γ-lactona (XII)	33,825

Os espectros de massas das substâncias (IX-XVI) (FIGURAS 3.16 a 3.18, ps. 66 a 68) confirmaram a presença da unidade lactônica através dos fragmentos com m/z 129, 116, 111 e 99, e para o anel aromático o fragmento m/z 91 referente ao íon tropílio.

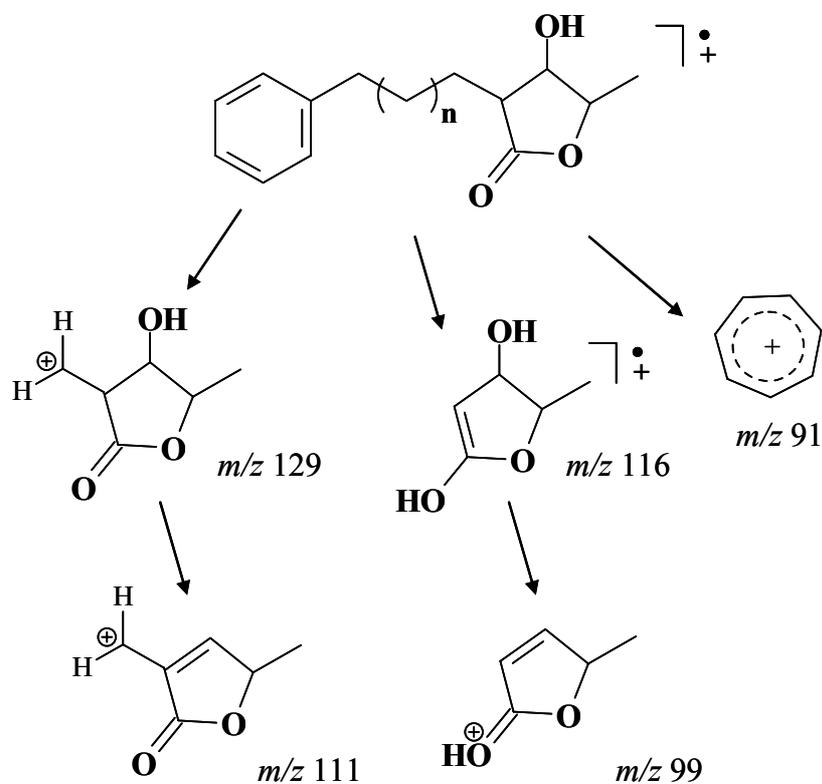
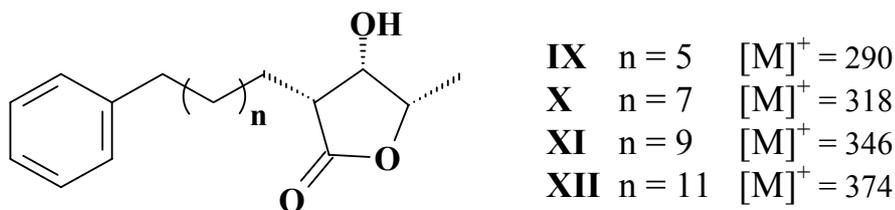
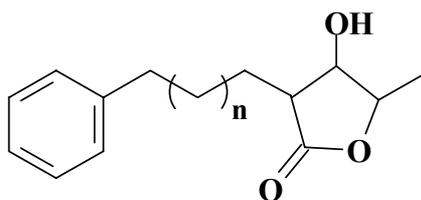


FIGURA 3.15: Principais fragmentos observados nos espectros de massas das γ -lactonas



As substâncias **IX-XII** foram identificadas através dos seus respectivos picos dos íons moleculares, que possibilitaram a determinação de suas cadeias metilênicas. A configuração relativa dos substituintes nas γ -lactonas (**IX-XII**) foi definida através de comparações dos dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e também pela intensidade dos fragmentos observados em seus respectivos espectros de massas em relação à literatura (PUPO *et al.*, 1998).



As γ -lactonas possuem três centros estereogênicos na unidade lactônica possuindo então, oito isômeros possíveis. Desta forma foi observado através da análise do cromatograma dois picos ($t_r = 25,585$ min. (pico 25) e $28,152$ min. (pico 30), FIGURAS 3.16 e 3.17, p. 66 e 67) com $[\text{M}]^+$ de 318 e 346 referentes às substâncias **XIII** e **XIV**, respectivamente. Os espectros de massas dos compostos **XIII** e **XIV** apresentaram fragmentos típicos das γ -lactonas e os picos dos íons moleculares idênticos às substâncias **X** (pico 27) e **XI** (pico 32) apresentando-se, portanto como diastereoisômeros das γ -lactonas **X** e **XI**. Já as substâncias **XV** ($[\text{M}]^+$ 328) e **XVI** ($[\text{M}]^+$ 356) apresentam-se como derivados da γ -lactonas através da perda de água.

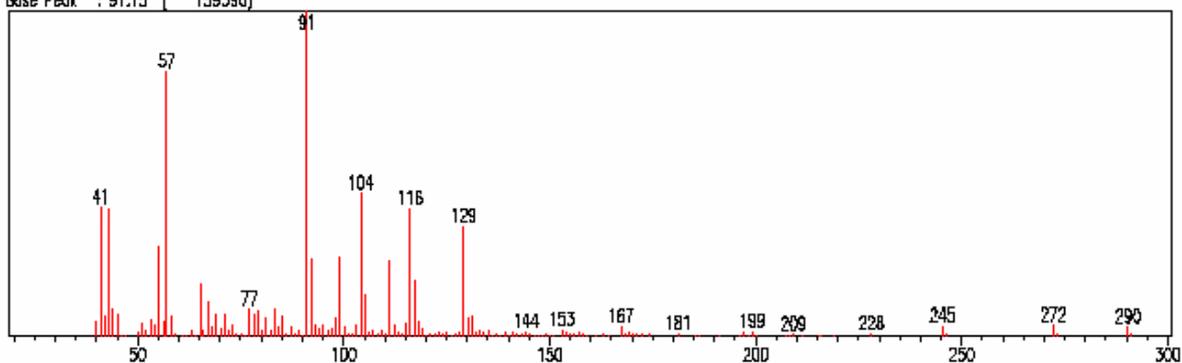
No espectro de massas da substância **XVI** ($t_r = 29.049$, p. 68) além do pico $[M]^+$ 356 referente à **XVI**, notou-se também a presença de outro pico com m/z 346, que possivelmente devido a presença dos fragmentos característicos das γ -lactonas, poderia caracterizar para este pico à mistura da substância **XVI** com um diastereoisômero da substância **XIII**.

Os ácidos graxos e as demais substâncias foram identificados comparando-se os espectros de massas obtidos aos espectros de massas existentes na biblioteca de dados do CG-EM.

FIGURA 3.16: Espectros de massas referente aos picos **23** e **25** obtidos via CG-EM.

Substância: γ -lactona **IX**

Mass Peak #: 149 Ret. Time: (24.317 - 24.342) B.G. Time: (24.365 - 24.438)
Base Peak: 91.15 (159390)



Substância: γ -lactona **XIII**

Scan #: (2651 - 2653)
Mass Peak #: 192 Ret. Time: (25.581 - 25.588)
Base Peak: 91.10 (378488)

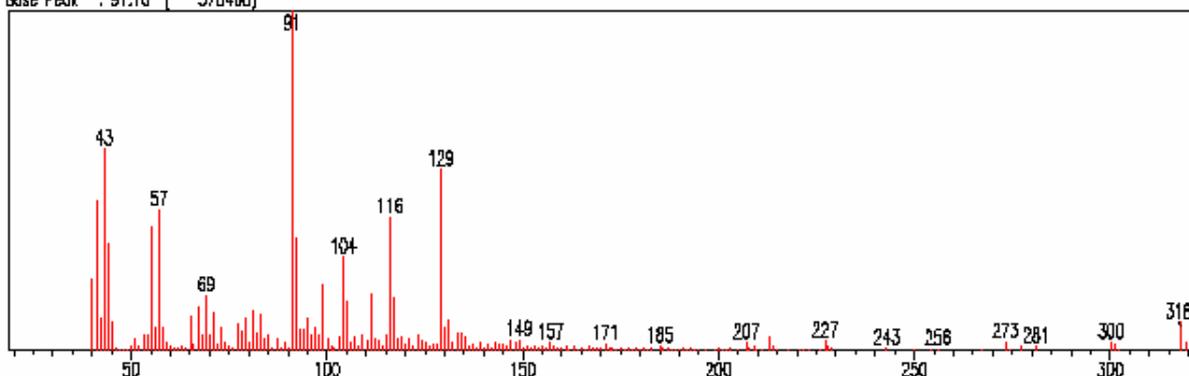


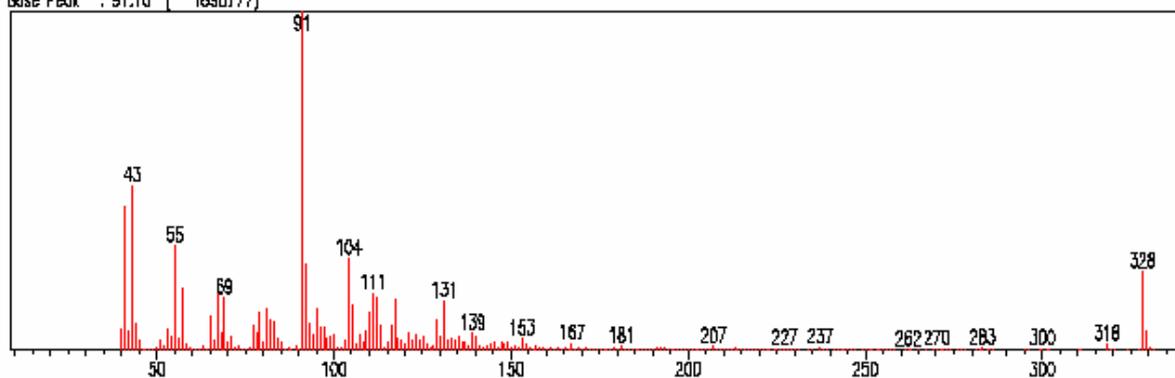
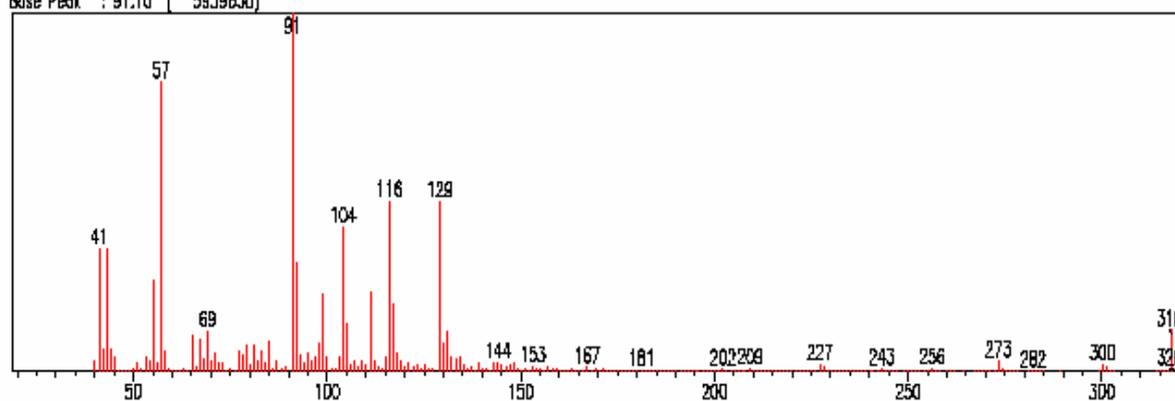
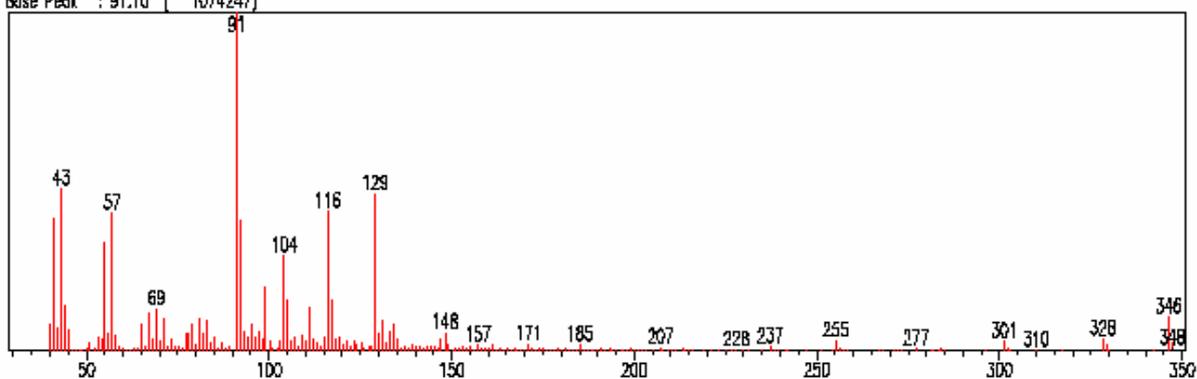
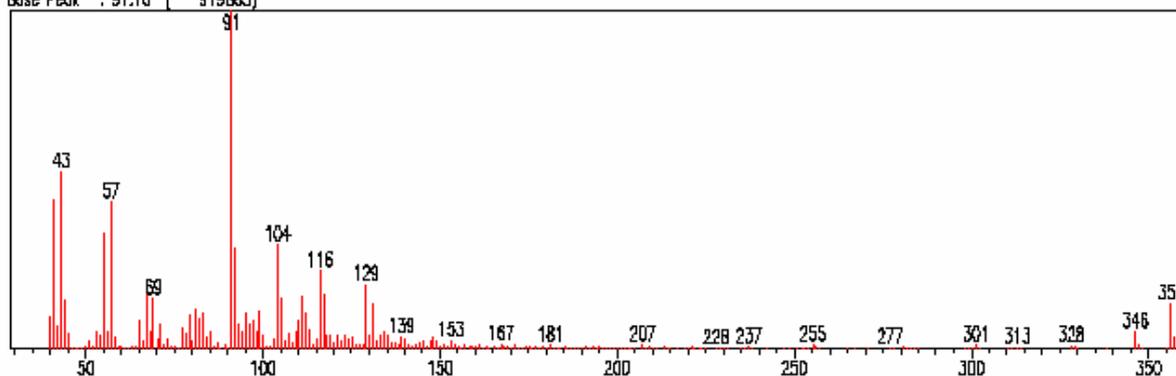
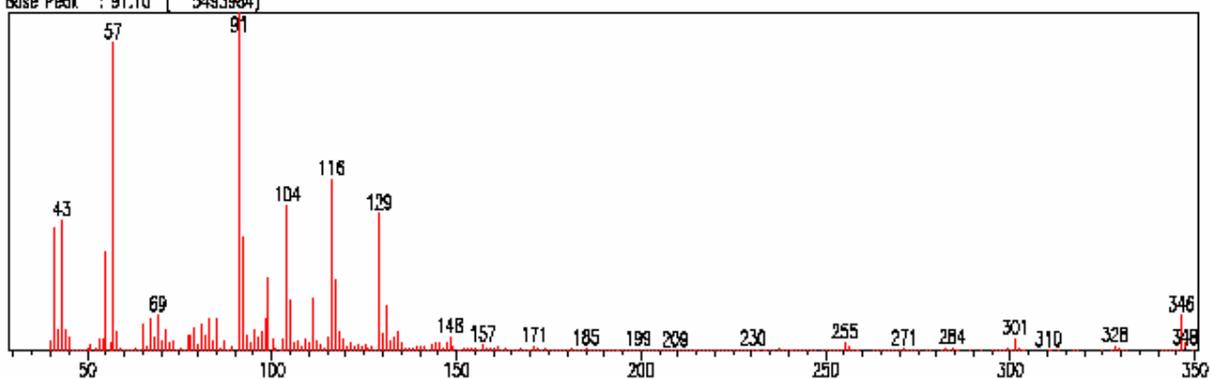
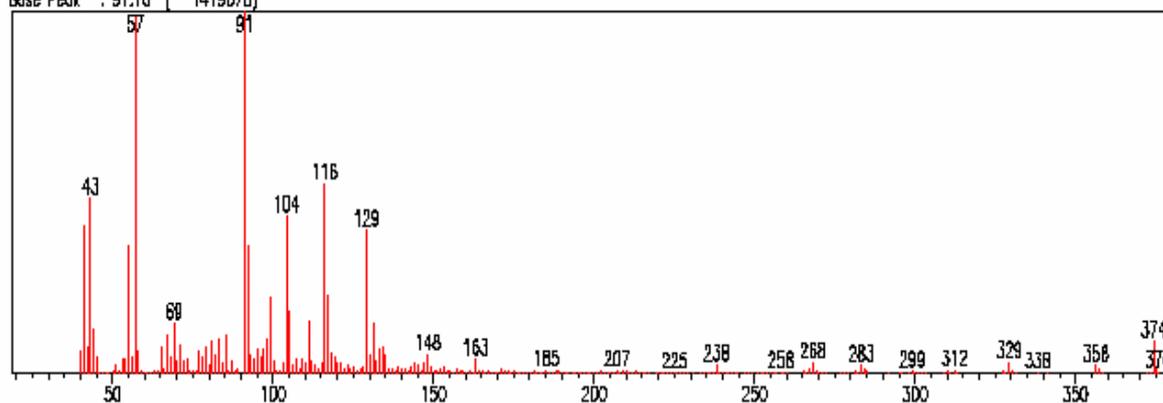
FIGURA 3.17: Espectros de massas referente aos picos **26**, **27** e **30** obtidos via CG-EM.Substância: γ -lactona **XV**Scan # : { 2727 - 2732 }
Mass Peak # : 250 Ret. Time : { 26.212 - 26.250 }
Base Peak : 91.10 [1890777]Substância: γ -lactona **X**Scan # : { 2767 - 2771 }
Mass Peak # : 249 Ret. Time : { 26.542 - 26.581 }
Base Peak : 91.10 [5939630]Substância: γ -lactona **XIV**Scan # : { 2959 - 2961 }
Mass Peak # : 217 Ret. Time : { 28.146 - 28.163 }
Base Peak : 91.10 [1074247]

FIGURA 3.18: Espectros de massas referente aos picos **31**, **32** e **33** obtidos via CG-EM.Substância: γ -lactona **XVI**Scan # : { 3065 - 3069 }
Mass Peak # : 330 Ret. Time : { 29.028 - 29.066 }
Base Peak : 91.10 [919583]Substância: γ -lactona **XI**Scan # : { 3127 - 3132 }
Mass Peak # : 269 Ret. Time : { 29.545 - 29.587 }
Base Peak : 91.10 [5493984]Substância: γ -lactona **XII**Scan # : { 3639 - 3643 }
Mass Peak # : 260 Ret. Time : { 33.810 - 33.846 }
Base Peak : 91.10 [1419678]

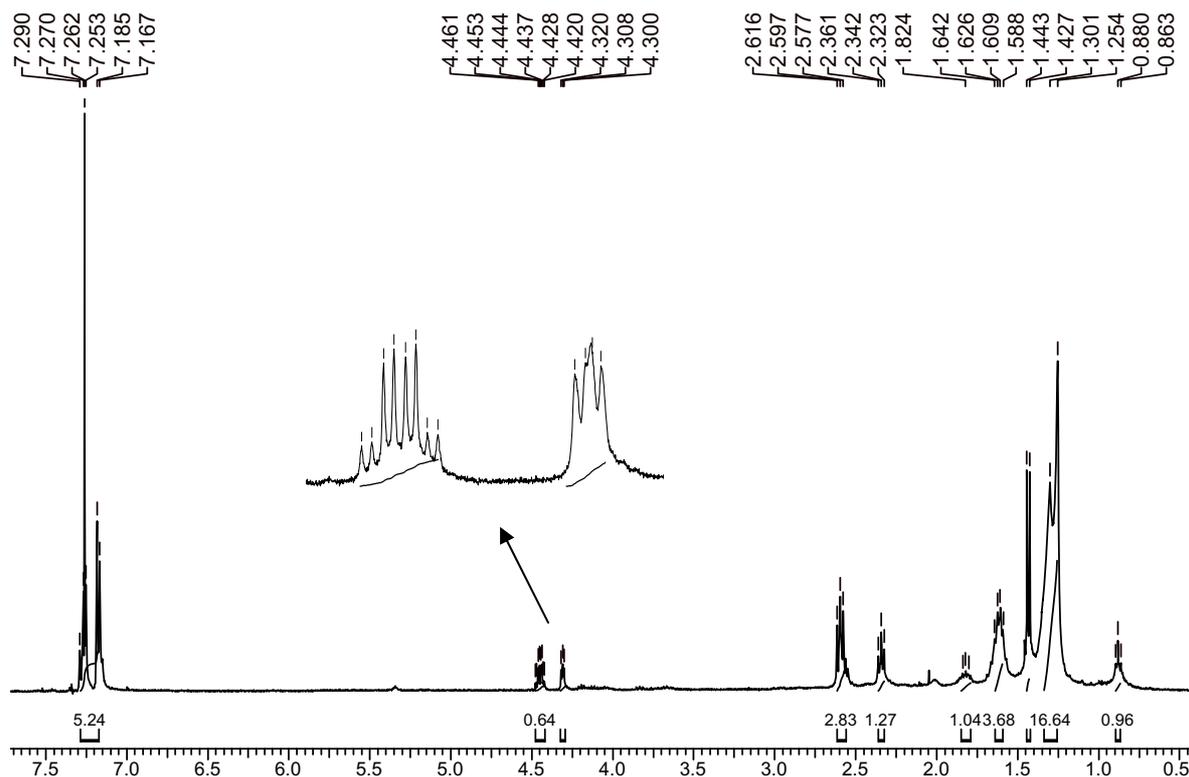


FIGURA 3.19: Espectro de RMN de ^1H da fração Tslm1-Fr4(4)-3 (100 MHz, CDCl_3)

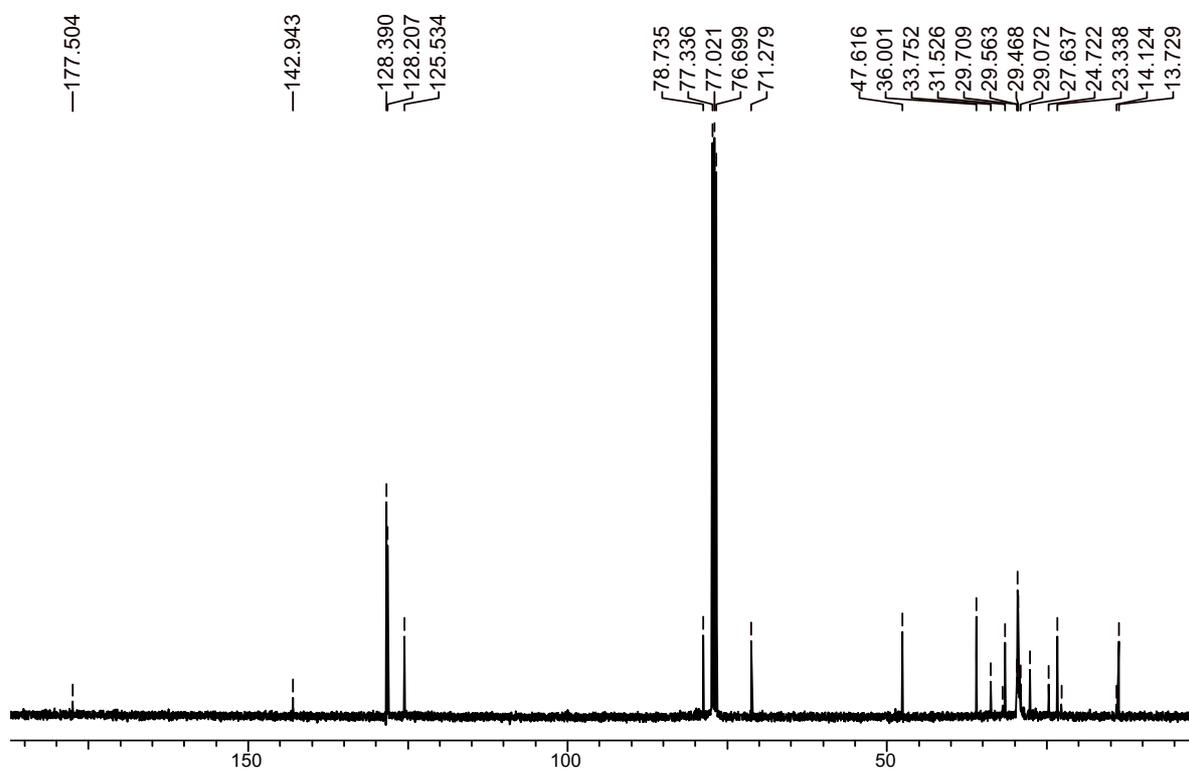


FIGURA 3.20: Espectro de RMN de ^{13}C da fração Tslm1-Fr4(4)-3 (100 MHz, CDCl_3)

Ao realizar a análise do espectro de RMN ^1H da fração Tslm1-Fr4(3), também foram observados sinais referentes aos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos, ácidos graxos e as γ -lactonas. Desta forma, o mesmo procedimento foi adotado para identificação das respectivas substâncias.

Através da análise via CG-EM (condições, p.124) da amostra Tslm1-Fr4(3), observou-se a presença das γ -lactonas **X-XII** e **XIV-XVI** já detectadas na fração Tslm1-Fr4(4)-3, e também a presença das γ -lactonas **XVII** a **XIX**.

O espectro de massa da substância **XVII** apresentou os fragmentos característicos da unidade γ -lactônica, apresentando como pico base m/z 116, entretanto, não foi observado o fragmento m/z 91 característico do anel aromático, sugerindo que a γ -lactona estaria ligada a uma cadeia metilênica (FIGURA 3.22, p. 72).

Os espectros de massas de **XVIII** e **XIX** mostraram que ambos possuíam íons moleculares idênticos ($[M^+]$ m/z de 338) e fragmentos típicos das γ -lactonas. A identificação da substância **XVIII** foi realizada através da comparação dos dados do espectro de massas em relação à literatura (PUPO et al., 1998). Deste modo, a γ -lactona **XIX** apresenta-se como diastereoisômero de **XVIII**.

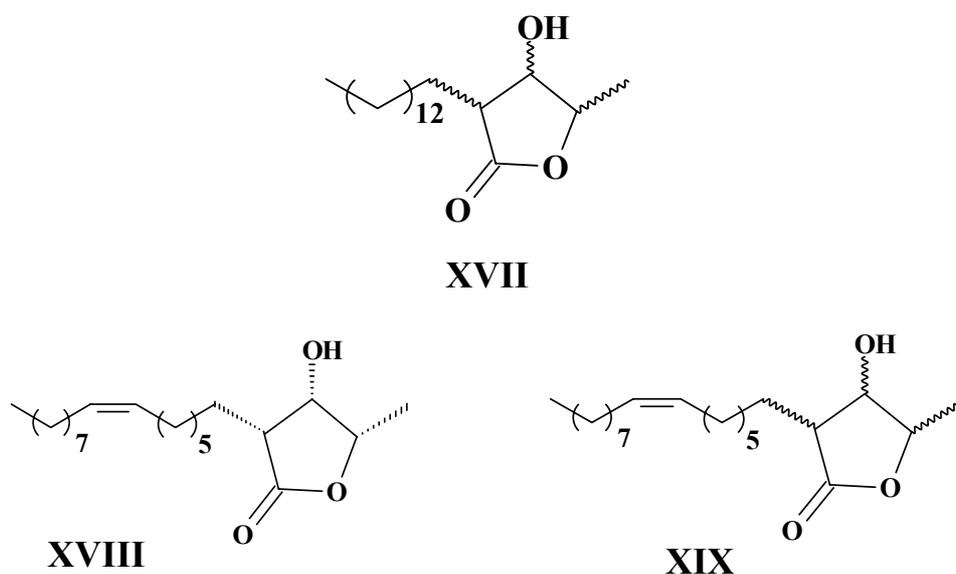


TABELA 3.12: Compostos identificados na fração Tslm1-Fr4(3), obtidos via CG-EM

Pico	[M] ⁺	Substância	t _r (min.)
1	200	Decanoato-10-oxo de metila	12,238
2	216	Nonanodioato de metila	13,713
3	200	Ácido p-toluenosulfônico-etil-éster	13,928
4	213	N-etil-N,4-dimetil-benzenosulfonamida	15,869
5	256	Pentadecanoato de metila	17,110
6	268	Hexadecenoato de metila	17,948
7	270	Hexadecanoato de metila	18,227
8	282	Heptadecenoato de metila	19,021
9	284	Heptadecanoato de metila	19,266
12	296	Octadecenoato de metila	20,041
13	296	Octadecenoato de metila	20,088
14	298	Octadecanoato de metila	20,275
17	290	ω-fenil dodecanoato de metila	21,307
22	326	Eicosanoato de metila	22,161
23	304	ω-fenil tridecanoato de metila	22,272
24	318	ω-fenil tetradecanoato de metila	23,196
25	312	γ-lactona (XVII)	23,464
28	332	ω-fenil pentadecanoato de metila	24,088
30	338	γ-lactona (XIX)	25,056
31	338	γ-lactona (XVIII)	25,883
33	328	γ-lactona (XV)	26,224
34	318	γ-lactona (X)	26,511
35	346	γ-lactona (XIV)	28,143
36	356	γ-lactona (XVI)	29,032
37	346	γ-lactona (XI)	29,503
38	374	γ-lactona (XII)	33,794

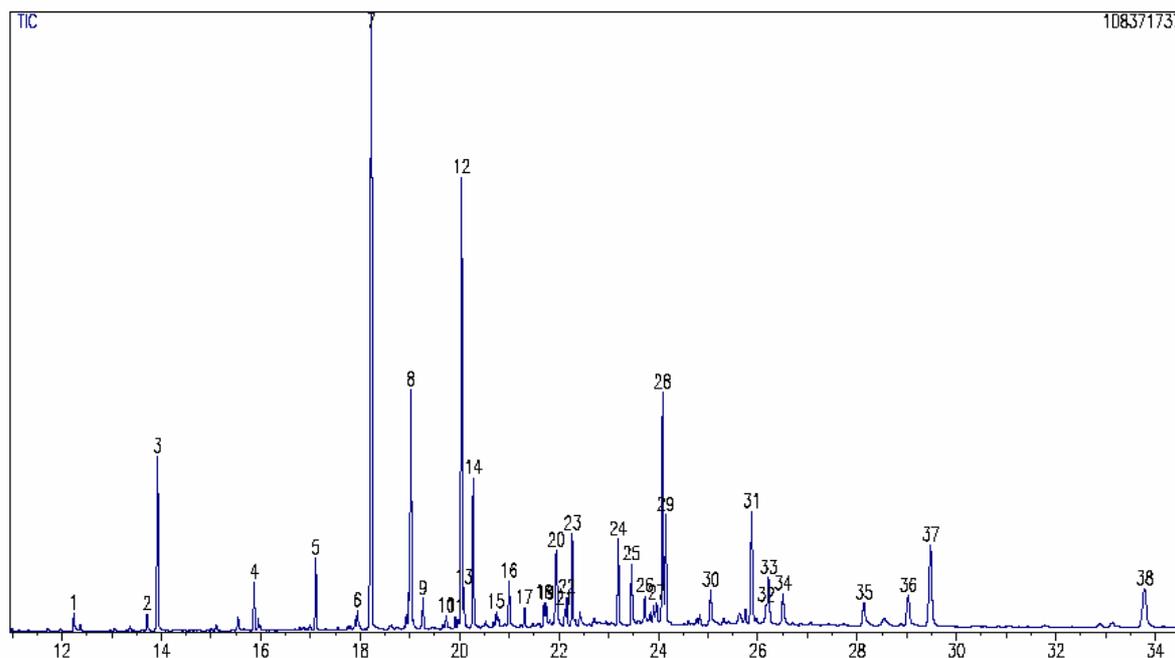


FIGURA 3.21: Cromatograma da fração Tslm1-Fr4(3) (Condições, p.124).

FIGURA 3.22: Espectro de massa referente ao pico 25 obtido via CG-EM

Substância: γ -lactona XVII

Scan # : { 2396 - 2399 } B.G. Scan # : { 2400 - 2404 }

Mass Peak # : 80 Ret. Time : { 23.458 - 23.483 }

Base Peak : 116.05 { 1071362 }

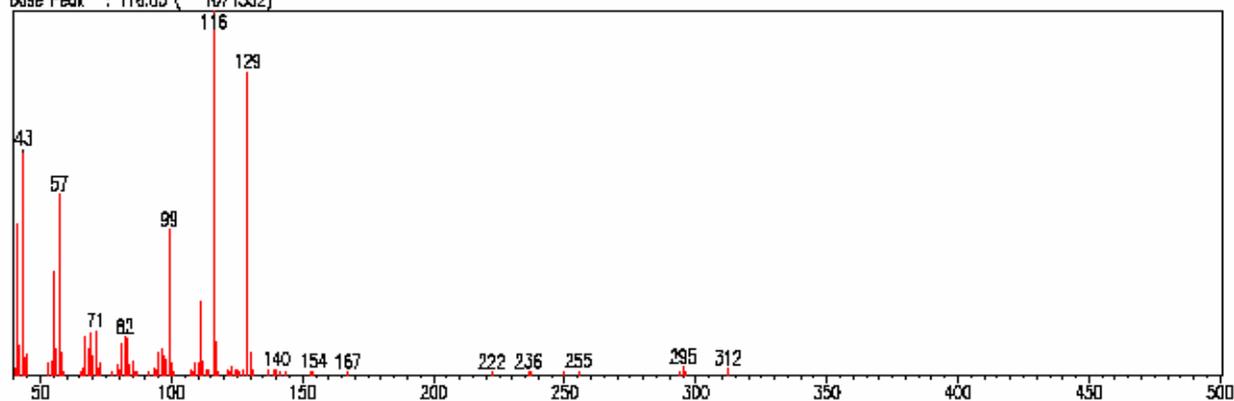
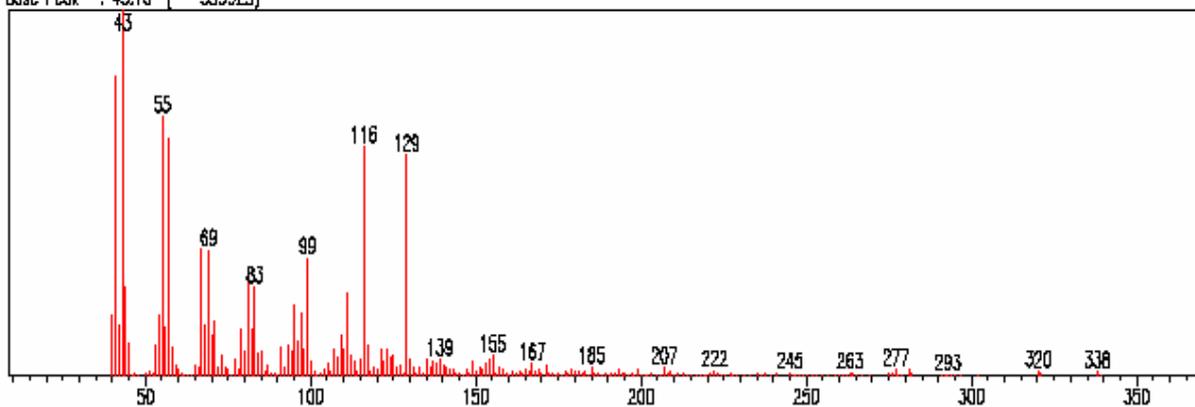


FIGURA 3.23: Espectros de massas referente aos picos **30** e **31** obtidos via CG-EM

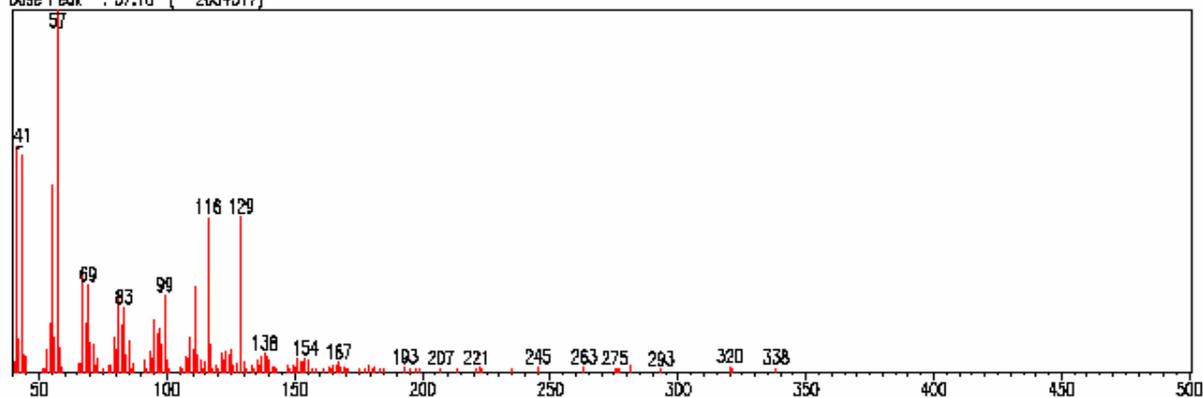
Substância: γ -lactona **XIX**

Scan # : { 2587 - 2590 }
Mass Peak # : 229 Ret. Time : { 25.048 - 25.067 }
Base Peak : 43.10 { 539923 }



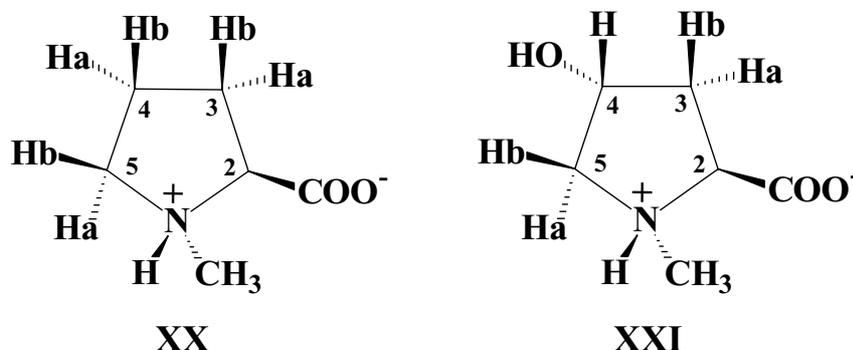
Substância: γ -lactona **XVIII**

Scan # : { 2687 - 2688 } B.C. Scan # : { 2678 - 2684 }
Mass Peak # : 132 Ret. Time : { 25.883 - 25.892 }
Base Peak : 57.10 { 2034317 }



Os demais picos presentes nos cromatogramas das frações Tslm1-Fr4(3) e Tslm1-Fr4(4)-3 não puderam ser identificados, visto que somente os dados de seus respectivos espectros de massas eram insuficientes para a caracterização das mesmas. Isso porque estes picos representavam substâncias minoritárias na amostra e através da análise do espectro de RMN de ^1H não foi possível obter maiores informações sobre estas substâncias, impossibilitando assim as suas caracterizações.

3.3.3 – Identificação dos aminoácidos N-metilprolina (XX) e 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI)



Os aminoácidos **XX** e **XXI** foram isolados em mistura do extrato metanólico das sementes de *T. clausenii*. As substâncias **XX** e **XXI** já foram isoladas anteriormente das folhas de *T. clausenii* (PUPO, 1997b). As estruturas foram determinadas com base em espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e através dos dados da literatura (PUPO, 1997b).

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 3.24, p. 77) observou-se a presença de sinais referentes à hidrogênios de carbonos ligados a heteroátomos em : δ 3,90 (*dd*, $J = 10,0$ e $7,2$ Hz, 1H); δ 3,15-3,22 (*m*, 1H) e δ 3,72-3,78 (*m*, 1H), referentes aos hidrogênios, H-2, H-5a e H-5b, respectivamente de **XX**. Da mesma forma, o espectro de RMN ^1H apresenta em δ 4,20 (*dd*, $J = 11,0$ e $7,0$ Hz, 1H); δ 3,15-3,22 (*m*, 1H) e δ 3,97 (*dd*, $J = 12,6$ e $5,0$ Hz, 1H) sinais referentes aos hidrogênios, H-2, H-5a e H-5b, respectivamente de **XXI**. Foram observados também dois singletos em δ 2,94 e δ 3,05 integrando três hidrogênios, referente a duas metilas ligadas a heteroátomos. Através das integrações dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H , pode-se caracterizar a presença da mistura dos aminoácidos **XX** e **XXI**. A análise dos dados obtidos via RMN de ^1H e ^{13}C , juntamente com os dados da literatura, confirmaram as substâncias N-metilprolina (**XX**) e 4-hidroxi-N-metilprolina (**XXI**).

TABELA 3.13: Dados de RMN de ^1H de N-metilprolina (**XX**) e comparação com a literatura

H	XX (400 MHz, D ₂ O)	PUPO, 1997b (400 MHz, D ₂ O)
2	3,90 (<i>dd</i> , $J = 10,0$ e $7,2$ Hz)	3,78 (<i>dd</i> , $J = 9,6$ e $7,2$ Hz)
3a	2,41-2,54 (<i>m</i>)	2,36 (<i>m</i>)
3b	2,06-2,27 (<i>m</i>)	1,79-2,09 (<i>m</i>)
4a	2,06-2,27 (<i>m</i>)	1,79-2,09 (<i>m</i>)
4b	2,06-2,27 (<i>m</i>)	1,79-2,09 (<i>m</i>)
5a	3,15-3,22 (<i>m</i>)	3,04 (<i>dt</i> , $J = 11,6$, $8,4$ e $8,4$ Hz)
5b	3,72-3,78 (<i>m</i>)	3,62 (<i>ddd</i> , $J = 12,0$, $7,6$ e $4,8$ Hz)
CH ₃	2,94 (<i>s</i>)	2,75 (<i>s</i>)

TABELA 3.14: Dados de RMN de ^1H de 4-hidroxi-N-metilprolina (**XXI**) e comparação com a literatura

H	XXI (400 MHz, D ₂ O)	PUPO, 1997b (400 MHz, D ₂ O)
2	4,20 (<i>dd</i> , $J = 11,0$ e $7,0$ Hz)	4,07 (<i>dd</i> , $J = 10,8$ e $7,2$ Hz)
3a	2,41-2,54 (<i>m</i>)	2,36 (<i>ddt</i> , $J = 14,0$, $7,2$, $2,0$ e $2,0$ Hz)
3b	2,06-2,27 (<i>m</i>)	2,12 (<i>ddd</i> , $J = 13,5$, $10,5$ e $4,8$ Hz)
4	4,80 (<i>m</i>)*	4,50 (<i>m</i>)
5a	3,15-3,12 (<i>m</i>)	3,06 (<i>dt</i> , $J = 13,2$, $2,0$ e $2,0$ Hz)
5b	3,97 (<i>dd</i> , $J = 12,6$ e $5,0$ Hz)	3,82 (<i>dd</i> , $J = 13,2$ e $4,8$ Hz)
CH ₃	3,05 (<i>s</i>)	2,92 (<i>s</i>)

* Encoberto pelo sinal da água.

TABELA 3.15: Dados de RMN de ^{13}C de N-metilprolina (**XX**) e comparação com a literatura

C	XX	PUPO, 1997b
	(400 MHz, D₂O)	(100 MHz, acetona-d₆)
2	73,6	70,5
3	31,6	28,7
4	25,7	22,8
5	59,2	56,2
CH ₃	43,6	40,6
<u>C</u> OOH	173,4	173,7

TABELA 3.16: Dados de RMN de ^{13}C de 4-hidroxi-N-metilprolina (**XXI**) e comparação com a literatura

C	XXI	PUPO, 1997b
	(400 MHz, D₂O)	(100 MHz, acetona-d₆)
2	73,0	70,0
3	41,0	38,2
4	72,3	69,5
5	65,6	62,6
CH ₃	46,0	43,1
<u>C</u> OOH	175,8	172,9

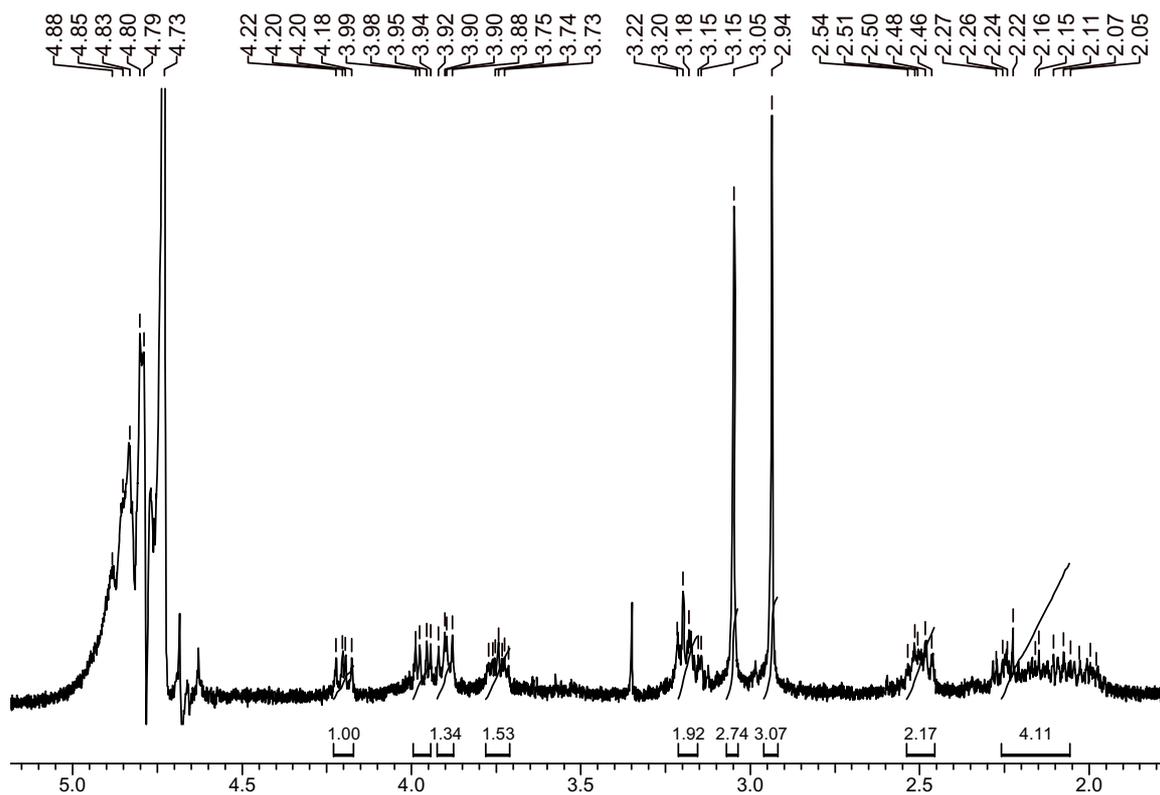


FIGURA 3.24: Espectro de RMN de ^1H dos aminoácidos: N-metilprolina (XX) e 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI) (400 MHz, D_2O)

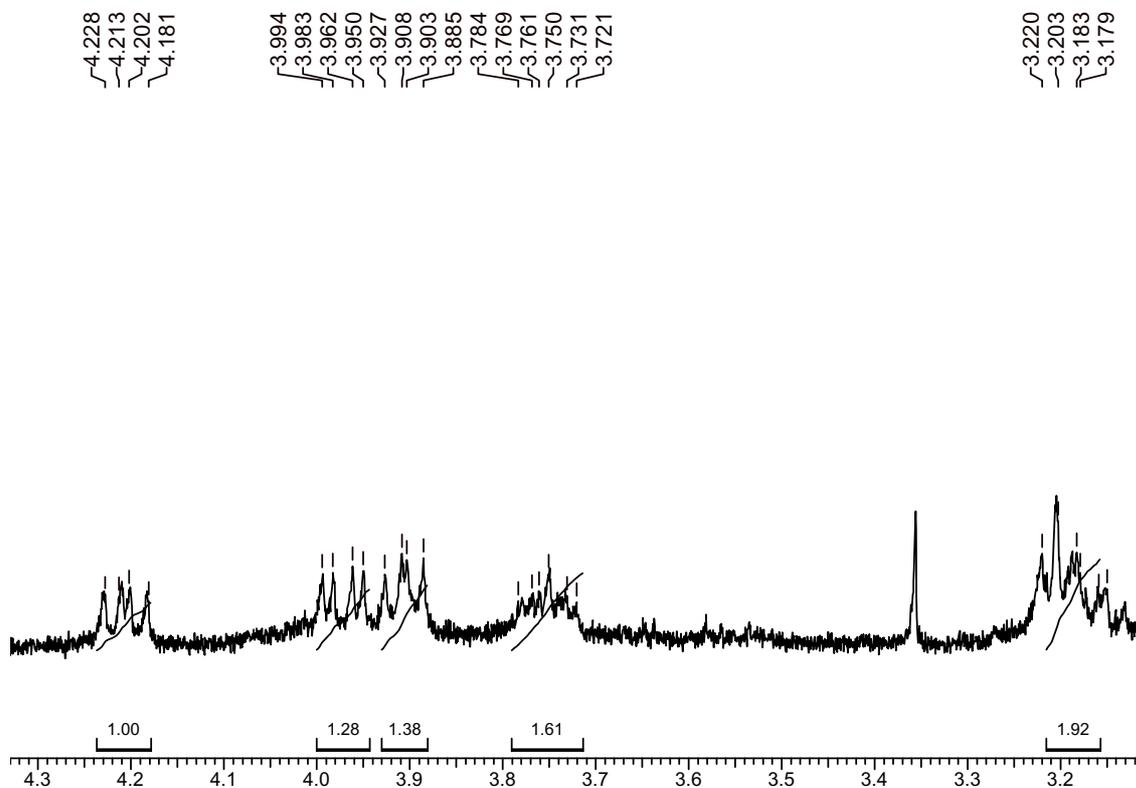


FIGURA 3.25: Ampliação do espectro de RMN de ^1H dos aminoácidos: N-metilprolina (XX) e 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI) (400 MHz, D_2O)

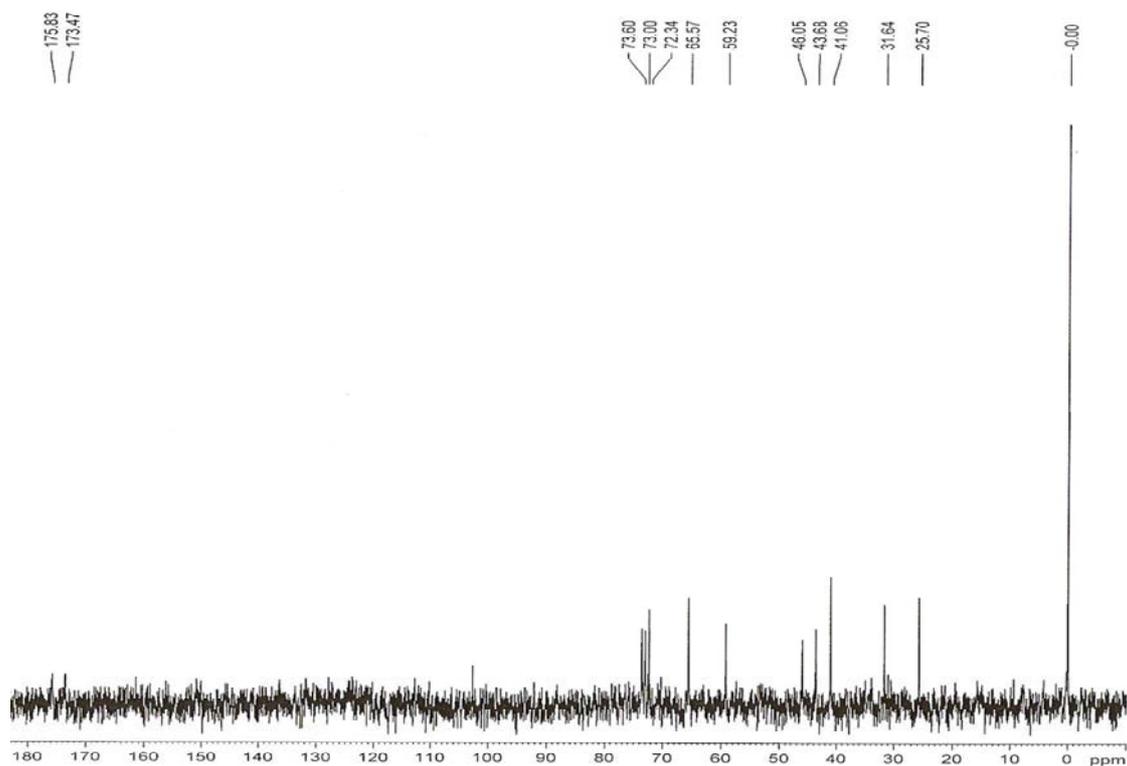
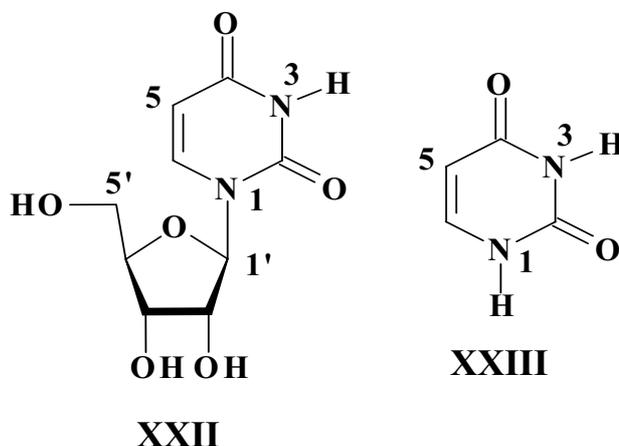


FIGURA 3.26: Espectro de RMN de ^{13}C dos aminoácidos: N-metilprolina (**XX**) e 4-hidroxi-N-metilprolina (**XXI**) (100 MHz, D_2O)

3.3.4 - Identificação da uridina (XXII) e uracila (XXIII)



As substâncias **XXII** e **XXIII** foram isoladas em mistura do extrato metanólico das sementes de *T. clausenii*. As estruturas foram determinadas com base em espectros de RMN em uma e duas dimensões, e pela comparação com dados da literatura (YALÇIN *et al.*, 2003; SILVA, 2007).

O espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 3.27 e 3.28, p. 82) mostra dois dubletos em δ 7,98 ($J = 8,0$ Hz, 1H) e δ 5,78 ($J = 8,0$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios olefinicos H-6 e H-5, respectivamente de **XXII**. Da mesma forma, este mostra dois dubletos em δ 7,46 ($J = 7,6$ Hz, 1H) e δ 5,68 ($J = 7,6$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios olefinicos H-6 e H-5, respectivamente, de **XXIII**. Foram observados também, um dubleto em δ 5,90 ($J = 5,0$ Hz, 1H) o qual foi atribuído ao hidrogênio H-1'(**XXII**); dois tripletos em δ 4,23 ($J = 5,0$ Hz, 1H) e δ 4,19 ($J = 5,0$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios H-2' e H-3' de **XXII** respectivamente. Em δ 4,05 (*dd*, $J = 6,80$ e 3,40 Hz, 1H); 3,85 (*dd*, $J = 11,4$ e 3,4 Hz, 1H) e em 3,75 (*dd*, $J = 11,4$ e 3,4 Hz, 1H), observou-se os sinais referentes ao hidrogênio H-4' e os hidrogênios diasterotópicos H-5'a e H-5'b, respectivamente.

No mapa de correlações HMBC (FIGURA 3.30, p. 83), pode-se observar para a substância **XXII**, as correlações dos hidrogênios: H-6 (δ 7,98, *d*)

com os carbonos em δ 89,0 (C-1'), δ 102,0 (C-5), δ 153,0 (C-2) e δ 167,0 (C-4), e para H-5 (δ 5,78, *d*) foram observadas as correlações com os sinais δ 142,0 (C-6) e δ 167,0 (C-4). Da mesma forma, observaram-se para a substância **XXIII** as correlações: H-6 (δ 7,46, *d*) com os carbonos em δ 101,0 (C-5), δ 153,0 (C-2); δ 167,0 (C-4); e para H-5 (δ 5,68 *d*) a correlação com o carbono em δ 143,0 referente ao C-6.

Os sinais dos demais carbonos para as substâncias **XXII** e **XXIII**, foram atribuídos através da análise do mapa de correlações HSQC (FIGURA 3.29, p. 83).

TABELA 3.17: Dados de RMN de ^1H da uridina (**XXII**) e comparação com a literatura

H	XXII	SILVA, 2007
	(400 MHz, CD ₃ OD)	(400 MHz, DMSO)
5	5,78 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	5,62 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
6	7,98 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	7,87 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
1'	5,90 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)	5,77 (<i>d</i> , $J = 5,4$ Hz)
2'	4,23 (<i>t</i> , $J = 5,0$ Hz)	4,01 (<i>t</i> , $J = 5,2$ Hz)
3'	4,19 (<i>t</i> , $J = 5,0$ Hz)	3,96 (<i>t</i> , $J = 5,0$ Hz)
4'	4,05 (<i>dd</i> , $J = 6,8$ e $3,4$ Hz)	3,82 (<i>dd</i> , $J = 7,0$ e $3,3$ Hz)
5'a	3,85 (<i>dd</i> , $J = 11,4$ e $3,4$ Hz)	3,60 (<i>dd</i> , $J = 12,0$ e $3,3$ Hz)
5'b	3,75 (<i>dd</i> , $J = 11,4$ e $3,4$ Hz)	3,54 (<i>dd</i> , $J = 12,0$ e $3,3$ Hz)

TABELA 3.18: Dados de RMN de ^1H da Uracila (**XXIII**) e comparação com a literatura

H	XXIII (400 MHz, CD₃OD)	SILVA, 2007 (400 MHz, DMSO)
5	5,68 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	5,65 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)
6	7,46 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)	7,50 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)

TABELA 3.19: Dados de RMN de ^{13}C da Uridina (**XXII**) e comparação com a literatura

C	XXII (400 MHz, CD₃OD)	SILVA, 2007 (400 MHz, DMSO)
2	153,0	151,0
4	167,0	163,5
5	102,0	101,7
6	142,0	140,6
1'	89,0	87,7
2'	74,0	73,5
3'	70,0	69,8
4'	85,5	84,6
5'	61,0	60,8

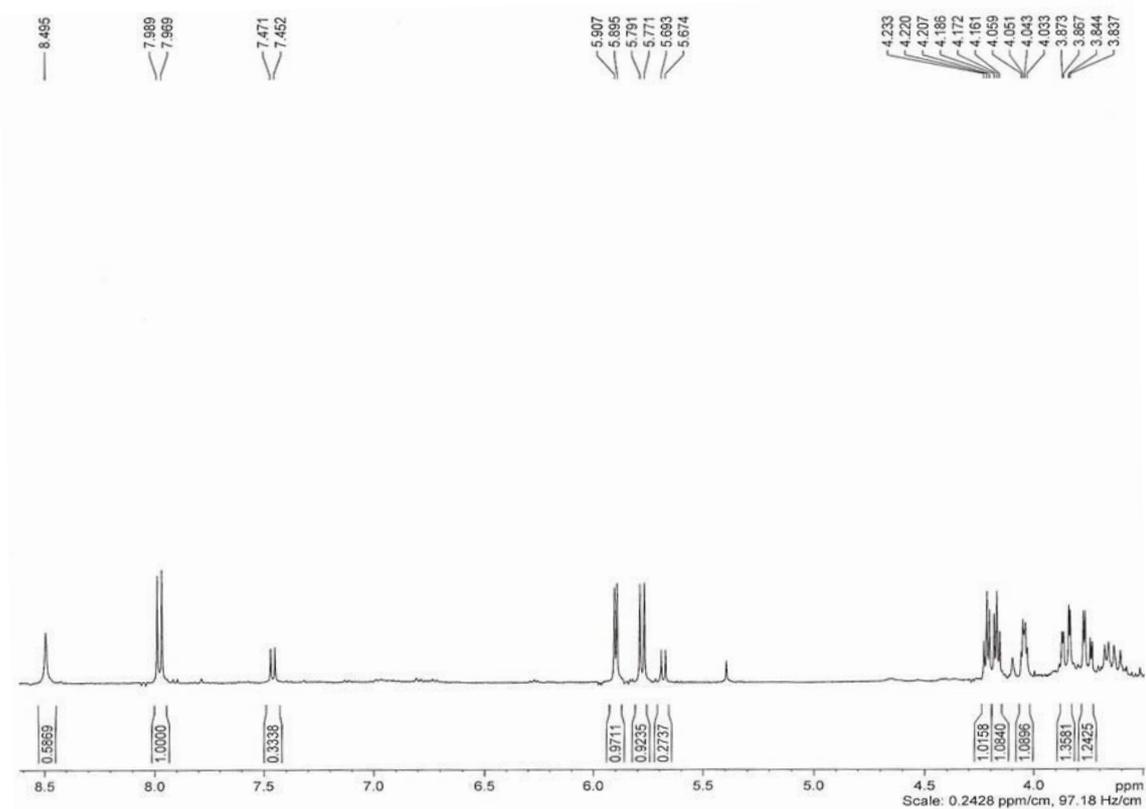


FIGURA 3.27: Espectro de RMN de ^1H de **XXII** e **XXIII** (400 MHz, CD_3OD)

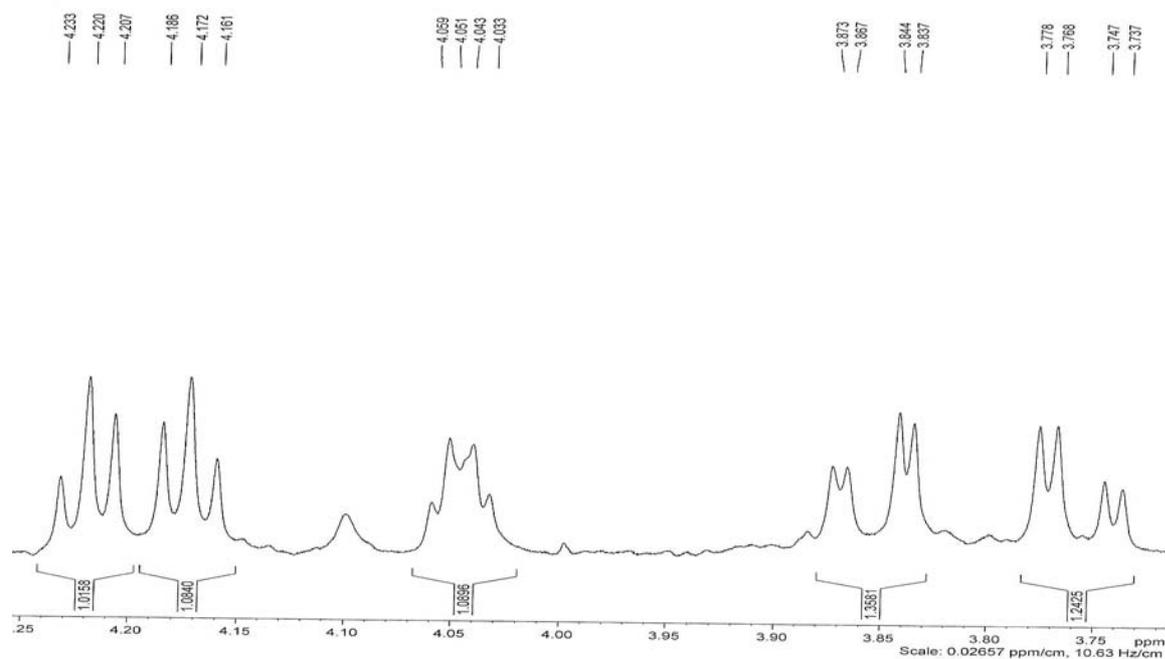


FIGURA 3.28: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **XXII** e **XXIII** (400 MHz, CD_3OD)

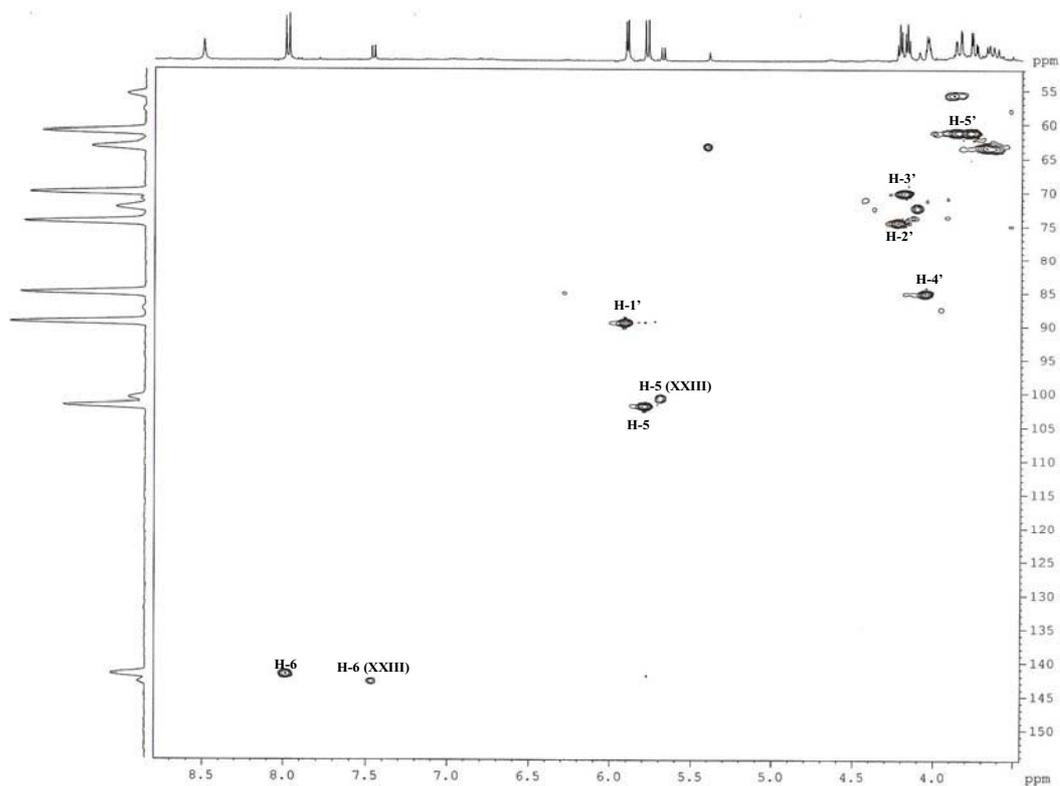


FIGURA 3.29: Mapa de correlações HSQC de **XXII** e **XXIII** (400 MHz, CD₃OD)

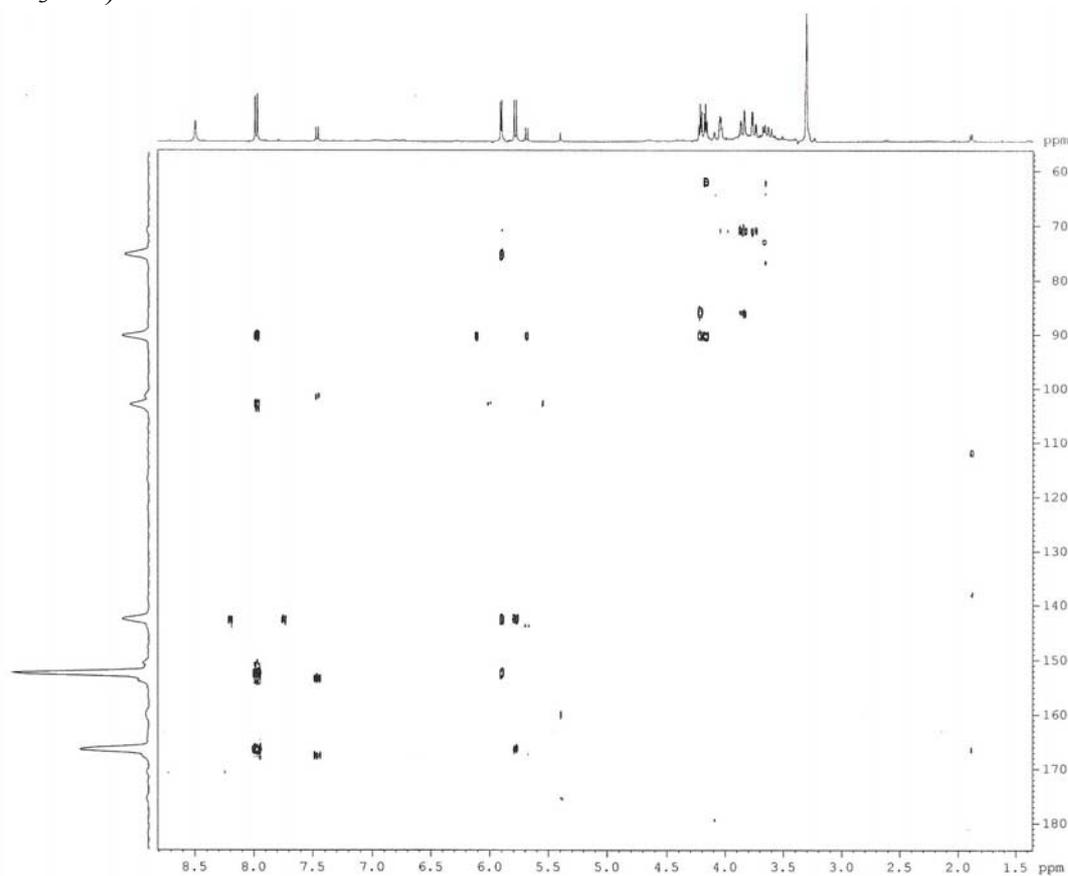
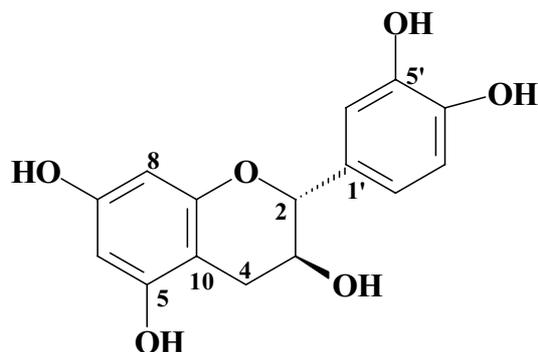


FIGURA 3.30: Mapa de correlações HMBC de **XXII** e **XXIII** (400 MHz, CD₃OD)

3.3.5 - Identificação do flavonóide *ent*-catequina



XXIV

O flavonóide *ent*-catequina (XXIV), foi isolado do extrato metanólico das inflorescências de *T. catigua*.

Este flavonóide foi caracterizado através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e pela comparação com dados da literatura (NAHRTEDT *et al.*, 1987; LEITE, 2005).

O modo de oxidação do anel A foi definido, através da análise do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 3.31, p.87) de XXIV, devido a presença de dois dubletos com constantes típicas de acoplamento *meta* ($J = 2,4$ Hz) em δ 5,86 e 5,94, relativos a H-8 e H-6 respectivamente.

Os hidrogênios H-2', H-3' e H-6' foram atribuídos aos valores de deslocamentos químicos: duplo dubleto em δ 6,72 ($J = 1,9$ e 8,1 Hz) atribuído a H-2' devido ao seu acoplamento *orto* ($J = 8,1$ Hz) com H-3' (δ 6,77, *d*, $J = 8,1$ Hz) e *meta* ($J = 1,9$ Hz) com H-6' (δ 6,84, *d*, $J = 1,9$ Hz)

O anel C foi caracterizado pela presença de um dubleto em δ 4,57 ($J = 8,0$ Hz), atribuído a H-2, que acopla com H-3 (δ 3,98, *m*). A configuração 2,3-*trans* foi determinada pela constante de acoplamento ($J = 8,0$ Hz) observada, e pelo valor de C-2 em δ 83,0. A presença do sinal referente à H-2, indicou a ausência da dupla ligação entre C-2 e C-3, e o sinal em δ 69,0 no espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.33, p. 88) foi atribuído ao carbono carbinólico em C-3.

Para os hidrogênios diastereotópicos H-4 α e H-4 β observou-se um duplo dubleto em δ 2,85 ($J = 16,2$ e $5,2$ Hz), sendo correspondente a H-4 α , devido ao seu acoplamento geminal com H-4 β ($J = 16,2$ Hz) e acoplamento pseudo-equatorial-axial com H-3 ($J = 5,2$ Hz). O duplo dubleto em δ 2,51 ($J = 16,2$ e $8,0$ Hz) foi atribuído ao H-4 β , devido ao seu acoplamento pseudo-diaxial com H-3 ($J = 8,0$ Hz).

Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C estão de acordo com os dados da literatura para *ent*-catequina (NAHRTEDT, et al., 1987; LEITE, 2005) (TABELA 3.21, p. 86).

TABELA 3.20: Dados de RMN de ^1H da *ent*-catequina (XXIV) e comparação com a literatura

H	XXIV (400 MHz, CD ₃ OD)	NAHRTEDT, 1987 (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆)
2	4,57 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	4,54 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)
3	3,98 (<i>m</i>)	3,98 (<i>m</i>)
4	2,85 (<i>dd</i> , $J = 16,2$ e $5,2$ Hz)	2,86 (<i>dd</i> , $J = 16,0$ e $5,4$ Hz)
4	2,51 (<i>dd</i> , $J = 16,2$ e $7,8$ Hz)	2,52 (<i>dd</i> , $J = 16,0$ e $8,5$ Hz)
6	5,94 (<i>d</i> , $J = 2,4$ Hz)	6,02 (<i>d</i> , $J = 2,1$ Hz)
8	5,86 (<i>d</i> , $J = 2,4$ Hz)	5,87 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
2'	6,72 (<i>dd</i> , $J = 8,1$ e $1,9$ Hz)	6,7 a 6,9 <i>m</i>
3'	6,77 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)	6,7 a 6,9 <i>m</i>
6'	6,84 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)	6,7 a 6,9 <i>m</i>

TABELA 3.21: Dados de RMN de ^{13}C da *ent*-catequina (XXIV) e comparação com a literatura

C	XXIV (100 MHz, CD₃OD)	NAHRTEDT, 1987 (100 MHz, acetona-<i>d</i>₆)
2	83,0	82,9
3	69,0	68,5
4	28,7	28,5
5	157,0	157,9 ^c
6	96,5	96,4
7	157,0	157,6 ^c
8	95,7	95,6
9	157,0	156,9 ^c
10	101,0	100,9
1'	132,4	132,3
2'	120,2	120,1
3'	116,3	116,2
4'	146,6	146,2
5'	146,4	146,2
6'	120,2	120,1

^c valores intercambiáveis

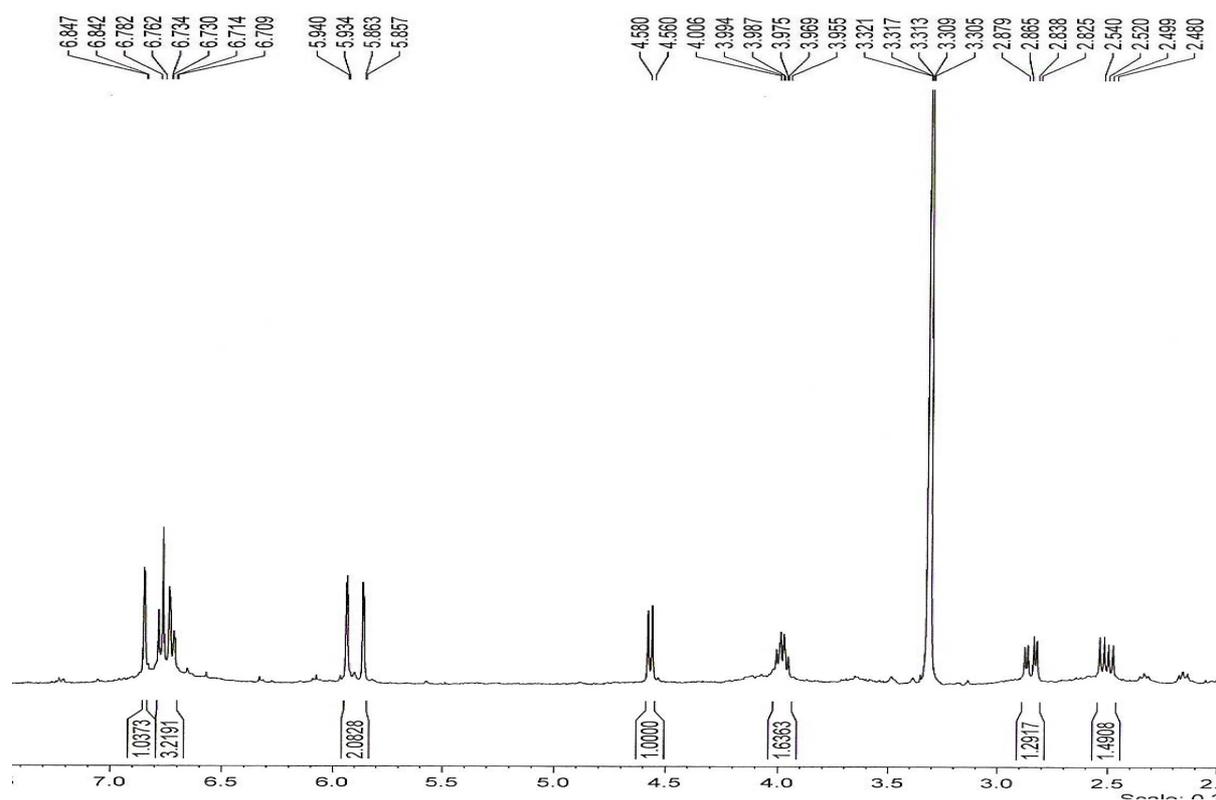


FIGURA 3.31: Espectro de RMN de ^1H da *ent*-catequina (XXIV) (400 MHz, CD_3OD)

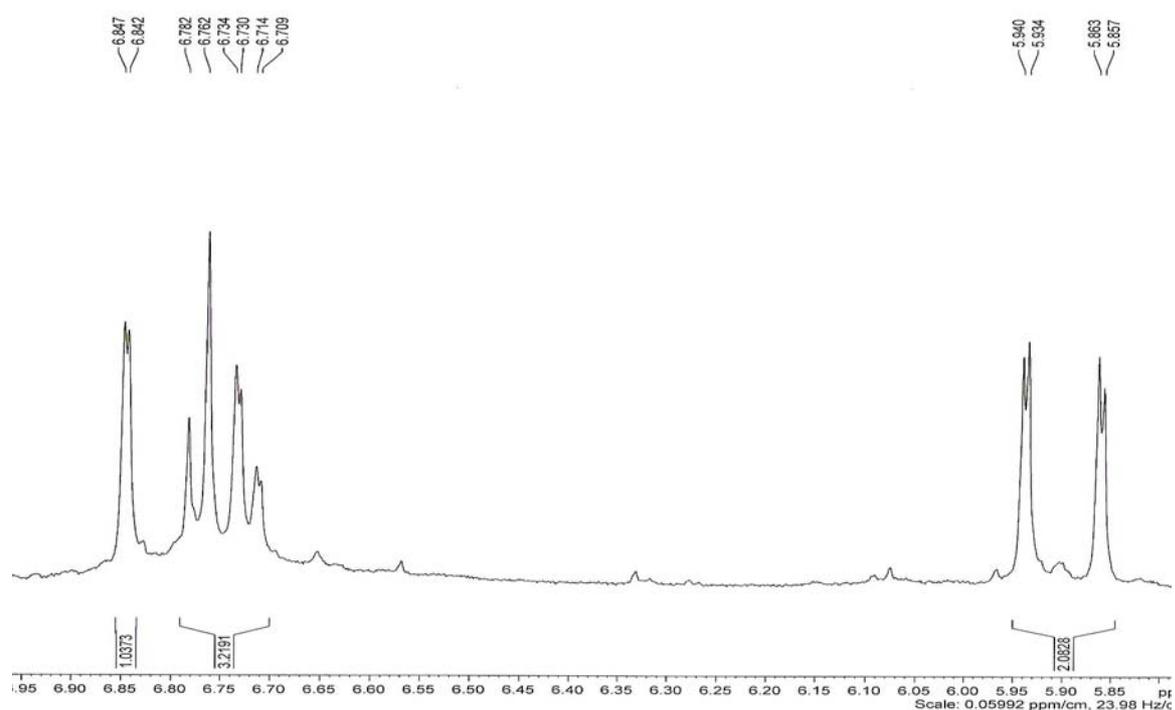


FIGURA 3.32: Expansão do espectro de RMN de ^1H da *ent*-catequina (XXIV) (400 MHz, CD_3OD)

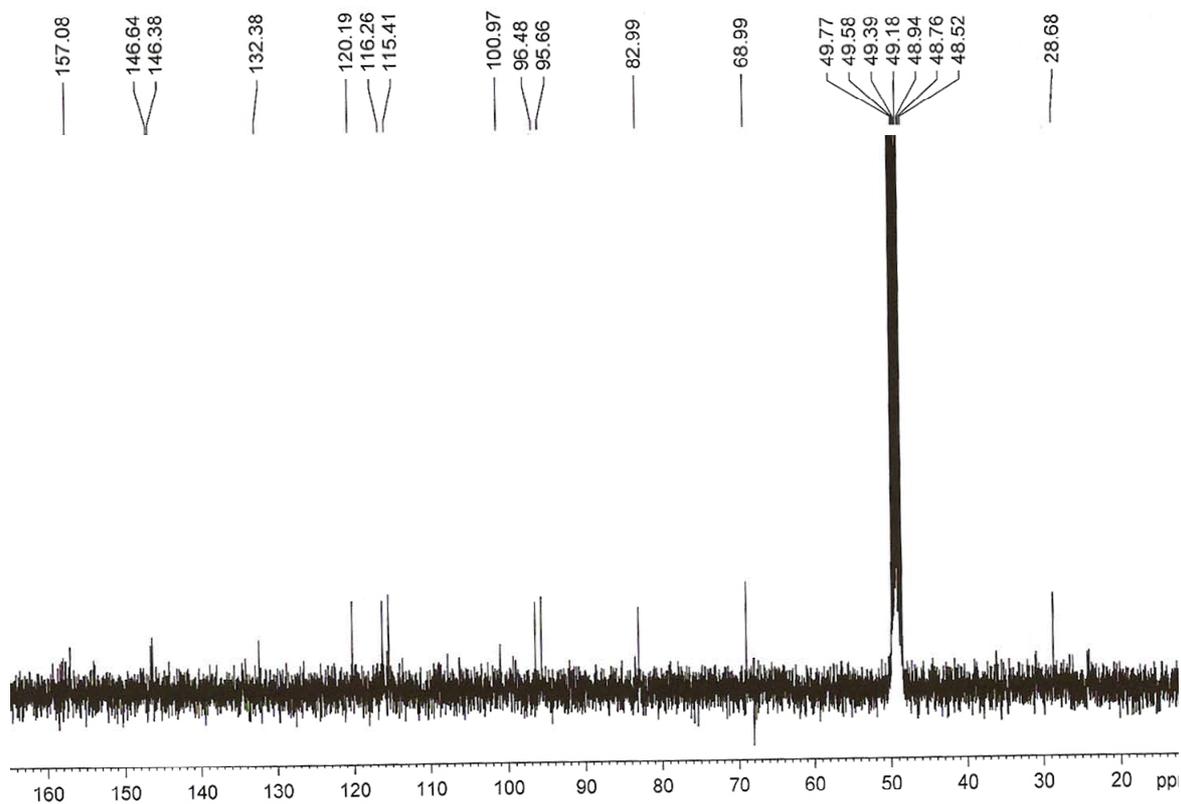
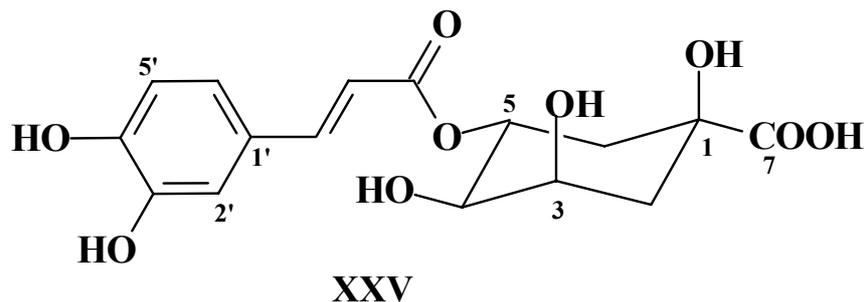


FIGURA 3.33: Espectro de RMN de ^{13}C da *ent*-catequina (XXIV) (100 MHz, CD_3OD).

3.3.6 - Identificação do Ácido 5-*O*-cafeoilquínico



O ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**XXV**) foi caracterizado através de RMN em uma e em duas dimensões e pela comparação com os dados da literatura (MERFORT *et al.*, 1992, VALENTE, 2003).

No espectro de RMN de ^1H de **XXV** (FIGURAS 3.34, p. 92) foram observados sinais característicos de hidrogênios olefínicos em δ 7,56 (*d*, $J = 15,4$ Hz, H-7') e δ 6,28 (*d*, $J = 15,4$ Hz, H-8'), com constantes de acoplamento ($J = 15,4$ Hz) típicas para a configuração *trans* do ácido cafeíco. Observou-se também, três sinais de hidrogênios aromáticos: um dubleto em δ 7,05 (H-2') com $J = 1,8$ Hz, devido ao acoplamento com hidrogênio H-6' (*meta*); em δ 6,91 um duplo dubleto (H-6') com $J = 1,8$ Hz (*meta*) e $J = 8,2$ Hz (*orto*), e um dubleto em δ 6,77 (H-5') com $J = 8,2$ Hz (*orto*), devido ao acoplamento com hidrogênio H-6'.

Os hidrogênios carbinólicos aparecem em δ 3,74 como um duplo dubleto (H-4ax) com $J = 10,3$ e 2,8 Hz, causado pelo acoplamento com H-5ax e H-3eq, respectivamente; em δ 5,38 (H-5ax) um triplo dubleto com $J = 10,3$ Hz (acoplamento: H-4ax e H-6ax) e 4,8 Hz (acoplamento: H-6eq); e um singleto em δ 4,22 referente ao H-3ax.

Os hidrogênios metilênicos (H-6ax, H-6eq, H-2ax e H-2eq) aparecem como um multipletto em δ 2,03-2,26. Os sinais e as constantes de acoplamento dos hidrogênios referentes ao ácido quínico, coincidem com a

conformação preferida do ácido quínico, segundo a literatura (MERFORT et al., 1992).

Todos os sinais de hidrogênios observados no espectro de RMN de ^1H foram atribuídos e correlacionados aos seus respectivos carbonos, através do mapa de correlações HSQC (FIGURA 3.35, p. 93). Já os carbonos quaternários foram atribuídos através do mapa de correlações HMBC (FIGURA 3.36, p. 93). Os dados obtidos foram concordantes com os dados da literatura (VALENTE, 2003).

TABELA 3.22: Dados de RMN de ^1H do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**XXV**) e comparação com a literatura

H	XXV (400 MHz, CD₃OD)	VALENTE, 2003 (400 MHz, CD₃OD)
2	2,13 (<i>m</i>)	2,18 ax (<i>dd</i> , $J = 14,9$ e $3,2$ Hz) 2,04 eq (<i>ddd</i> , $J = 14,9$, $5,4$ e $1,9$ Hz)
3	4,22 (<i>sl</i>)	4,18 eq (<i>dtd</i> , $J = 5,4$ e $3,2$ Hz)
4	3,74 ax (<i>dd</i> , $J = 10,3$ e $2,8$ Hz)	3,73 ax (<i>dd</i> , $J = 9,1$ e $3,2$ Hz)
5	5,38 ax (<i>td</i> , $J = 10,3$ e $4,8$ Hz)	5,33 ax (<i>td</i> , $J = 9,1$ e $4,0$ Hz)
6	2,24 eq (<i>m</i>) 2,03 ax (<i>m</i>)	2,23 eq (<i>ddd</i> , $J = 14,9$, $4,0$ e $1,9$ Hz) 2,08 ax (<i>dd</i> , $J = 14,9$ e $9,1$ Hz)
2'	7,05 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	7,05 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)
5'	6,78 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz)	6,78 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz)
6'	6,91 (<i>dd</i> , $J = 8,2$ e $1,8$ Hz)	6,95 (<i>dd</i> , $J = 8,2$ e $1,9$ Hz)
7'	7,56 (<i>d</i> , $J = 15,4$ Hz)	7,56 (<i>d</i> , $J = 15,9$ Hz)
8'	6,28 (<i>d</i> , $J = 15,4$ Hz)	6,27 (<i>d</i> , $J = 15,9$ Hz)

TABELA 3.23: Dados de RMN de ^{13}C do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**XXV**) e comparação com a literatura

C	XXV (100 MHZ, CD₃OD)	VALENTE, 2003 (100 MHZ, CD₃OD)
1	*	76,2
2	38,2	38,3
3	72,5	71,3
4	74,5	73,5
5	71,5	72,0
6	39,8	38,8
7	*	177,1
1'	126,0	127,8
2'	115,2	115,3
3'	145,0	146,8
4'	148,0	149,6
5'	116,0	116,5
6'	123,0	123,1
7'	147,0	147,1
8'	115,2	115,3
9'	169,0	168,7

* Valores não observados nos experimentos de RMN

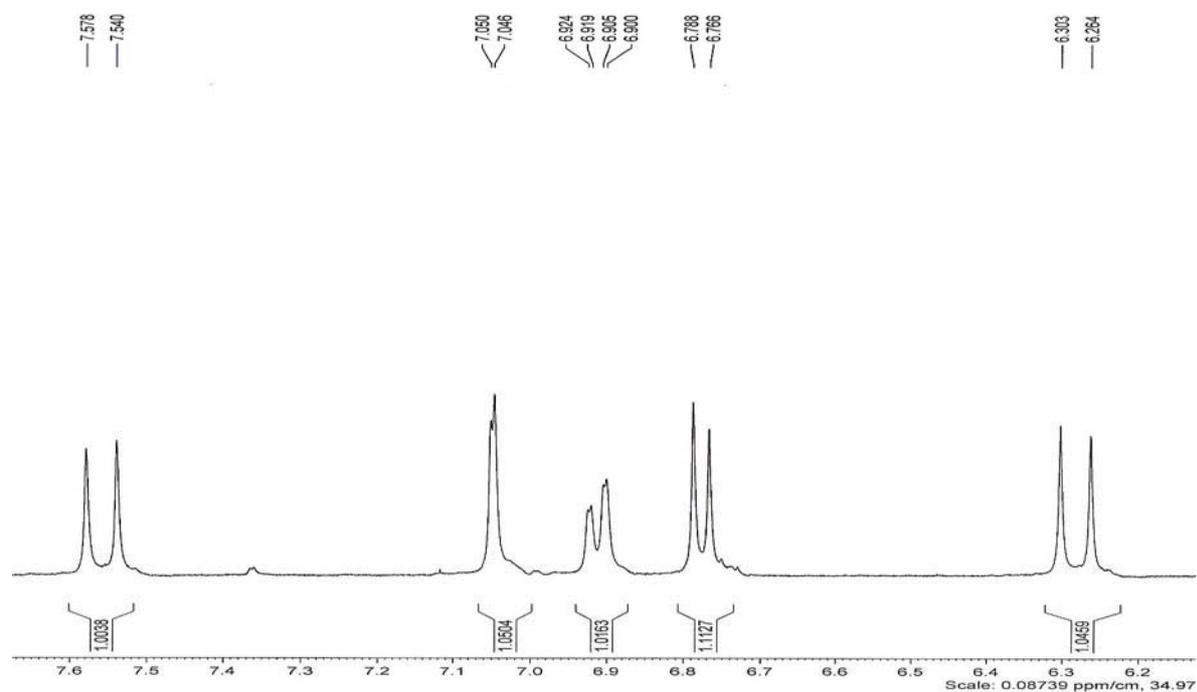
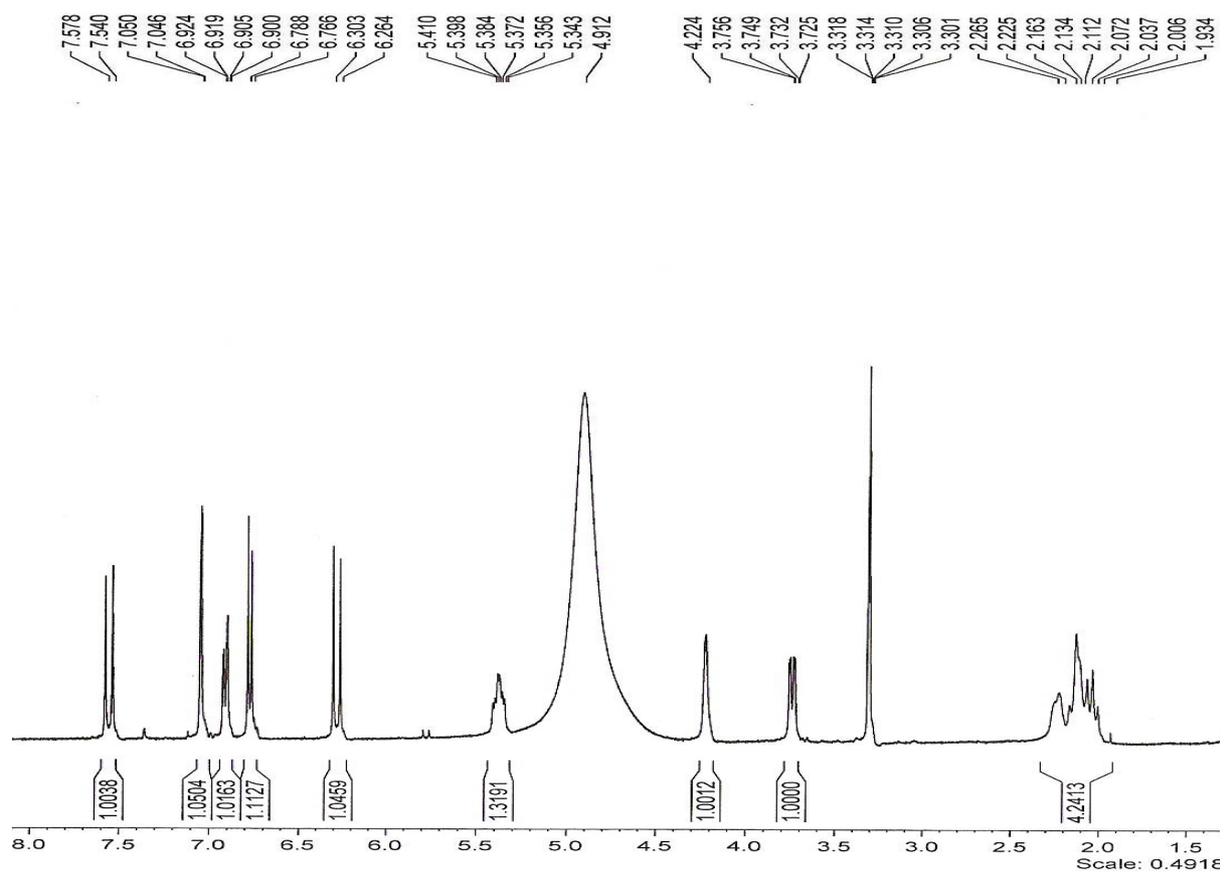


FIGURA 3.34: (A) Espectro de RMN de ^1H do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (XXV) (400 MHz, CD_3OD). (B) Ampliação do espectro de RMN de ^1H de XXV.

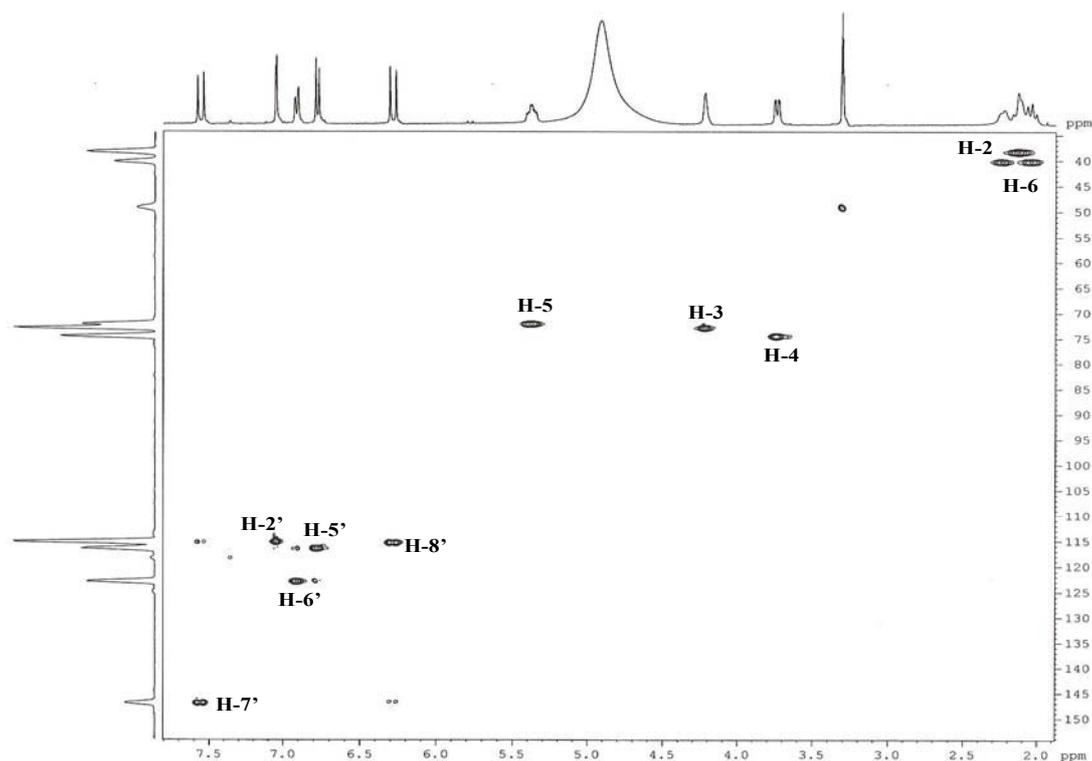


FIGURA 3.35: Mapa de correlações HSQC do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (XXV) (400 MHz, CD₃OD)

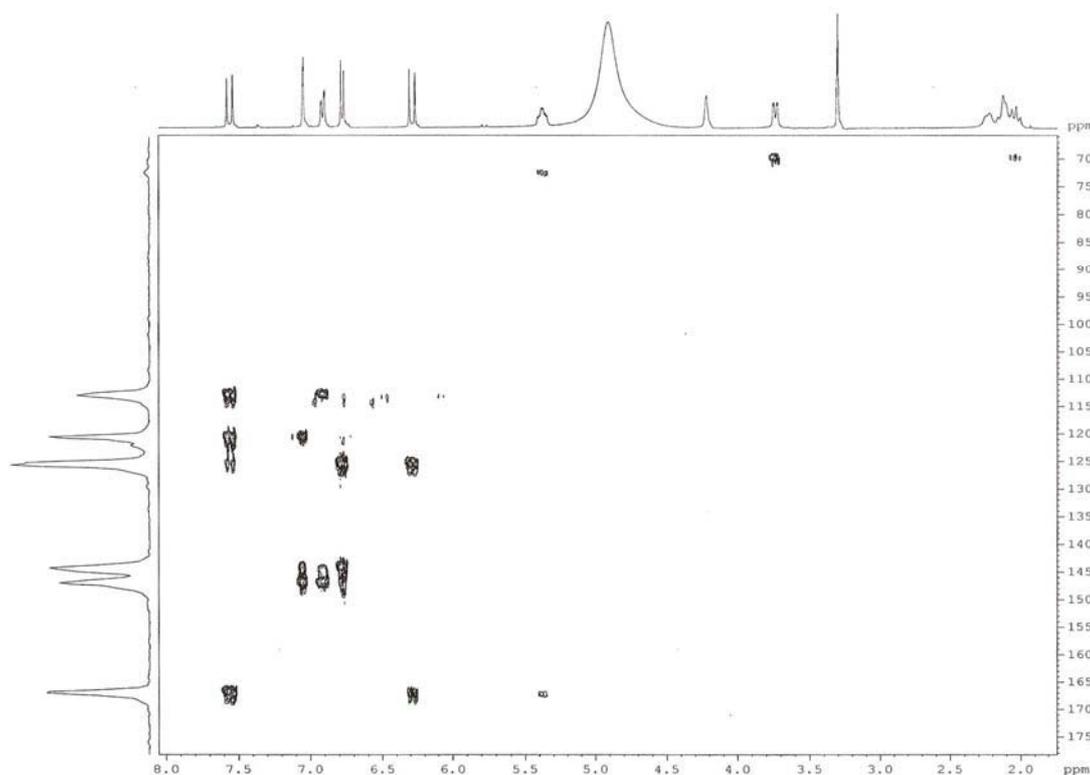
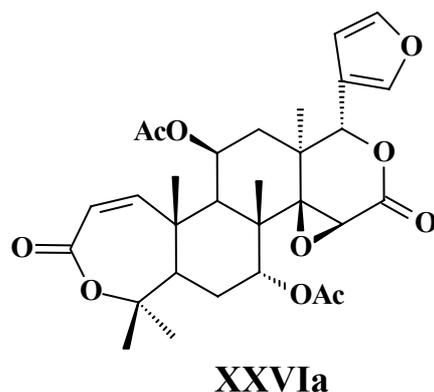
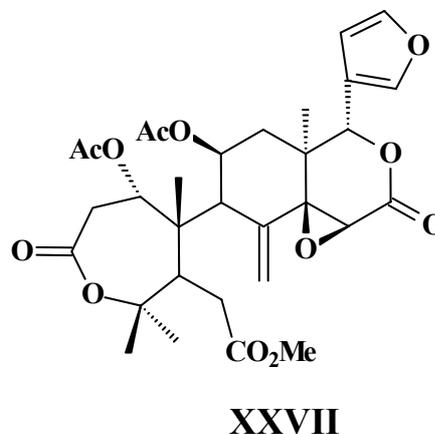
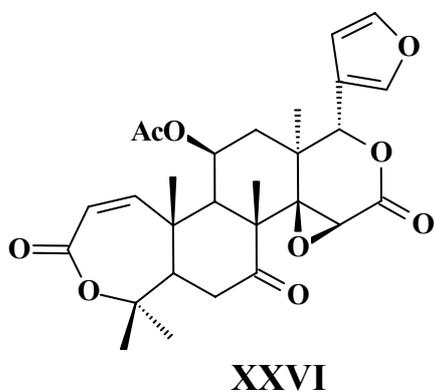
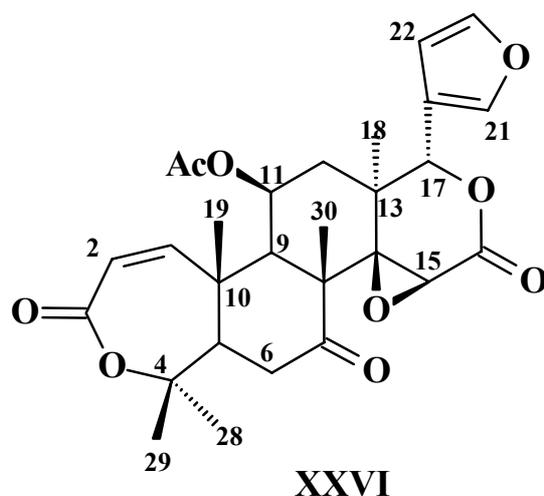


FIGURA 3.36: Mapa de correlações HMBC do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (XXV) (400 MHz, CD₃OD)

3.3.7 – Determinação estrutural dos limonóides



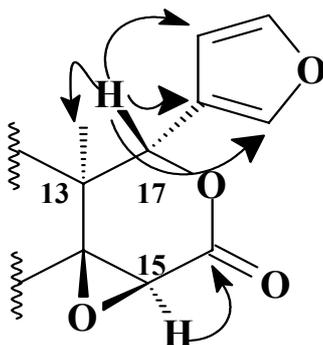
Os limonóides **XXVI** e **XXVII** provenientes do extrato metanólico das sementes de *T. elegans*, estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Trichilia*. O limonóide (**XXVIa**) acetato de 11 β -acetoxiobacunila isolado de *Cedrela odorata* (KIPASSA *et al.*, 2008) foi utilizado como modelo na caracterização do anel furânico ligado ao C-17 dos limonóides **XXVI** e **XXVII**.

3.3.7.1 – Identificação do limonóide 11 β -acetoxibacunona

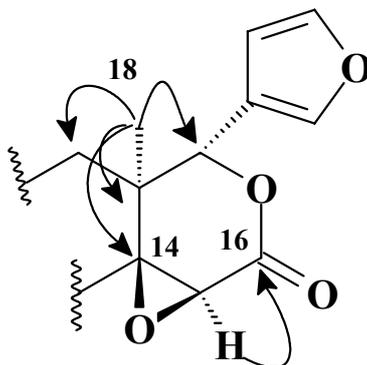
O limonóide **XXVI** foi caracterizado através de RMN em uma e duas dimensões, e pela comparação com dados da literatura do limonóide com estrutura semelhante a **XXVI** (KIPASSA *et al.*, 2008).

No espectro de RMN de ^1H de **XXVI** (FIGURA 3.37, p. 101) foram observados sinais característicos do anel furano em δ 7,42 (*sl*, H-21), δ 7,40 (*t*, $J = 1,76$ Hz, H-23) e δ 6,35 (*sl*, H-22). No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.38, p. 102), o anel furano foi caracterizado pelos sinais em δ 119,5 (C-20), δ 141,4 (C-21), δ 109,6 (C-22) e δ 143,3 (C-23). Estas atribuições foram confirmadas através do mapa de correlações HSQC de **23** (FIGURA 3.39, p. 102).

No espectro de RMN de ^1H observou-se também a presença de seis sinais de metilas como singletos em δ 1,08, 1,45, 1,50, 1,53, 1,60 e 2,19. Os dois singletos integrando para um hidrogênio cada, em δ 3,74 e δ 5,45 foram atribuídos a H-15 e H-17, respectivamente. As atribuições dos sinais de H-15 e H-17 e a presença de um anel D δ -lactônico com epóxido entre C-14 e C-15, foram confirmadas através das correlações observadas no mapa de correlações HMBC (FIGURA 3.40, p. 103).

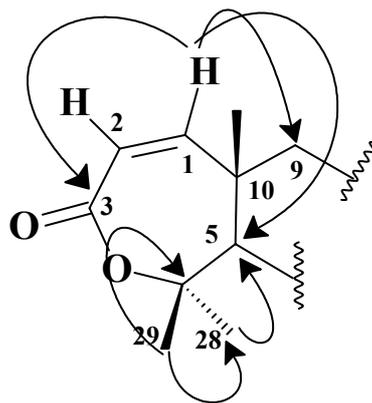


As atribuições dos deslocamentos químicos de C-15 (δ 53,5) e C-17 (δ 78,0) foram realizadas através da análise do mapa de correlações HSQC de **XXVI**. No mapa de correlações do HMBC foi observada a correlação do sinal em δ 1,08 (s, Me-18) com os sinais em δ 36,3 e δ 63,9, atribuídos aos carbonos tetrassubstituídos C-13 e C-14 respectivamente.



No espectro de RMN de ^1H , a presença de uma ligação dupla conjugada a uma carbonila no anel A, foi determinada pela presença de dois dubletos em δ 6,01 e δ 6,55 ($J = 12,1$ Hz) atribuídos aos hidrogênios olefinicos H-2 e H-1. Os carbonos da dupla ligação foram caracterizados em δ 153,3 (C-1) e δ 122,4 (C-2), através da análise do mapa de correlações HSQC.

As atribuições realizadas para H-1 e H-2, assim como a presença de uma carbonila conjugada em C-3 (δ 166,4), foram confirmadas através do mapa de correlações HMBC.



Foram observadas através do mapa de correlações HMBC, as correlações dos sinais em δ 1,45 (*s*, Me-28) e δ 1,53 (*s*, Me-29) com os carbonos C-4 (δ 83,7) e C-5 (δ 56,6). Deste modo pode-se propor a existência de um anel A ϵ -lactônico α - β insaturado na estrutura do limonóide **XXVI**.

Os sinais dos hidrogênios H-5, H-6 α e H-6 β foram atribuídos através da análise do espectro de RMN de ^1H e das constantes de acoplamento observadas. O hidrogênio H-6 β (*t*, δ 3,01, $J = 14,2$ Hz) apresenta um acoplamento geminal com H-6 α e diaxial com H-5 (*dd*, δ 2,56, $J = 14,2$ e 4,5 Hz), com a mesma constante de acoplamento ($J = 14,2$ Hz). A constante de acoplamento equatorial-axial de H-6 α (*dd*, δ 2,44, $J = 14,2$ e 4,5 Hz) com H-5 é de 4,5 Hz.

Além dos sinais de carbonos carboxílicos atribuídos a C-16 e C-3, o espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.38, p. 102) de **XXVI** apresentou mais um sinal de carbonila não conjugada em δ 205,8, atribuído a C-7. Esta atribuição foi confirmada através de comparações realizadas com a literatura (GARCEZ et al., 1997).

Os singletos em δ 1,50 (Me-30, δ 19,4) e 1,61 (Me-19, δ 17,9) foram atribuídos através dos mapas de correlações HSQC e HMBC.

O sinal em δ 5,71 (*dd*, $J = 6,1$ e $2,2$ Hz) foi atribuído H-11 devido a correlação com carbono em δ 68,3, observado através do mapa de correlações HSQC. A localização do grupamento acetoxílico no anel C (C-11), foi evidenciada devido à presença do sinal em δ 1,83 (*m*, H-12) no espectro de RMN de ^1H . Essas atribuições foram confirmadas através de dados da literatura.

TABELA 3.24: Dados de RMN de ^1H de 11 β -acetoxiobacunona (**XXVI**) e comparação com a literatura (**XXVIa**).

H	XXVI (400 MHz, CDCl₃)	KIPASSA, 2008 (XXVIa) (600 MHz, CDCl₃)
1	6,55 (<i>d</i> , $J = 12,1$ Hz)	6,29 (<i>d</i> , $J = 12,6$ Hz)
2	6,01 (<i>d</i> , $J = 12,1$ Hz)	5,94 (<i>d</i> , $J = 12,6$ Hz)
5	2,56 (<i>dd</i> , $J = 14,2$ e $4,6$ Hz)	2,50 (<i>dd</i> , $J = 13,1$ e $2,4$ Hz)
6 α	2,44 (<i>dd</i> , $J = 14,2$ e $4,6$ Hz)	2,12 (<i>ddd</i> , $J = 15,4$, $2,6$ e $2,4$ Hz)
6 β	3,01 (<i>t</i> , $J = 14,2$ Hz)	1,94 (<i>ddd</i> , $J = 15,4$, $13,1$, e $2,4$ Hz)
7	--	4,56 (<i>dd</i> , $J = 2,6$ e $2,4$ Hz)
9	2,15 (<i>s</i>)	2,49 (<i>d</i> , $J = 4,6$ Hz)
11	5,71 (<i>dd</i> , $J = 6,1$ e $2,2$ Hz)	5,60 (<i>ddd</i> , $J = 9,8$, $5,5$ e $4,6$ Hz)
12	1,82 (<i>m</i>)	2,33 (α , <i>dd</i> , $J = 14,3$ e $9,8$ Hz) 1,51 (β , <i>dd</i> , $J = 14,3$ e $5,5$ Hz)
15	3,74 (<i>s</i>)	3,55 (<i>s</i>)
17	5,45 (<i>s</i>)	5,59 (<i>s</i>)
18	1,08 (<i>s</i>)	1,21 (<i>s</i>)
19	1,61 (<i>s</i>)	1,53 (<i>s</i>)
21	7,42 (<i>sl</i>)	7,40 (<i>t</i> , $J = 1,6$ Hz)
22	6,35 (<i>sl</i>)	6,32 (<i>d</i> , $J = 1,0$ Hz)
23	7,40 (<i>t</i> , $J = 1,76$ Hz)	7,39 (<i>s</i>)
28	1,45 (<i>s</i>)	1,34 (<i>s</i>)
29	1,53 (<i>s</i>)	1,45 (<i>s</i>)
30	1,50 (<i>s</i>)	1,34 (<i>s</i>)
11-OAc	2,19 (<i>s</i>)	2,15 (<i>s</i>)
7-OAc	--	2,13 (<i>s</i>)

TABELA 3.25: Dados de RMN de ^{13}C de 11β -acetoxiobacunona (**XXVI**) e comparação com a literatura (**XXVIa**).

C	XXVI (100 MHz, CDCl₃)	KIPASSA, 2008 (XXVIa) (150 MHz, CDCl₃)
1	153,3	149,8
2	122,4	120,0
3	166,4	166,4
4	83,7	83,9
5	56,6	45,5
6	38,9	27,0
7	205,8	74,1
8	51,8	42,0
9	49,5	49,5
10	43,8	45,5
11	68,3	67,7
12	40,8	36,5
13	36,3	37,6
14	63,9	68,6
15	53,5	55,2
16	166,2	166,7
17	78,0	78,0
18	20,3	17,2
19	17,9	19,4
20	119,5	119,7
21	141,1	141,3
22	109,6	109,7
23	143,3	143,4
28	31,8	31,8
29	26,3	25,5
30	19,4	20,1
OAc	21,4	21,2
	169,9	169,7
OAc	--	21,5
	--	169,7

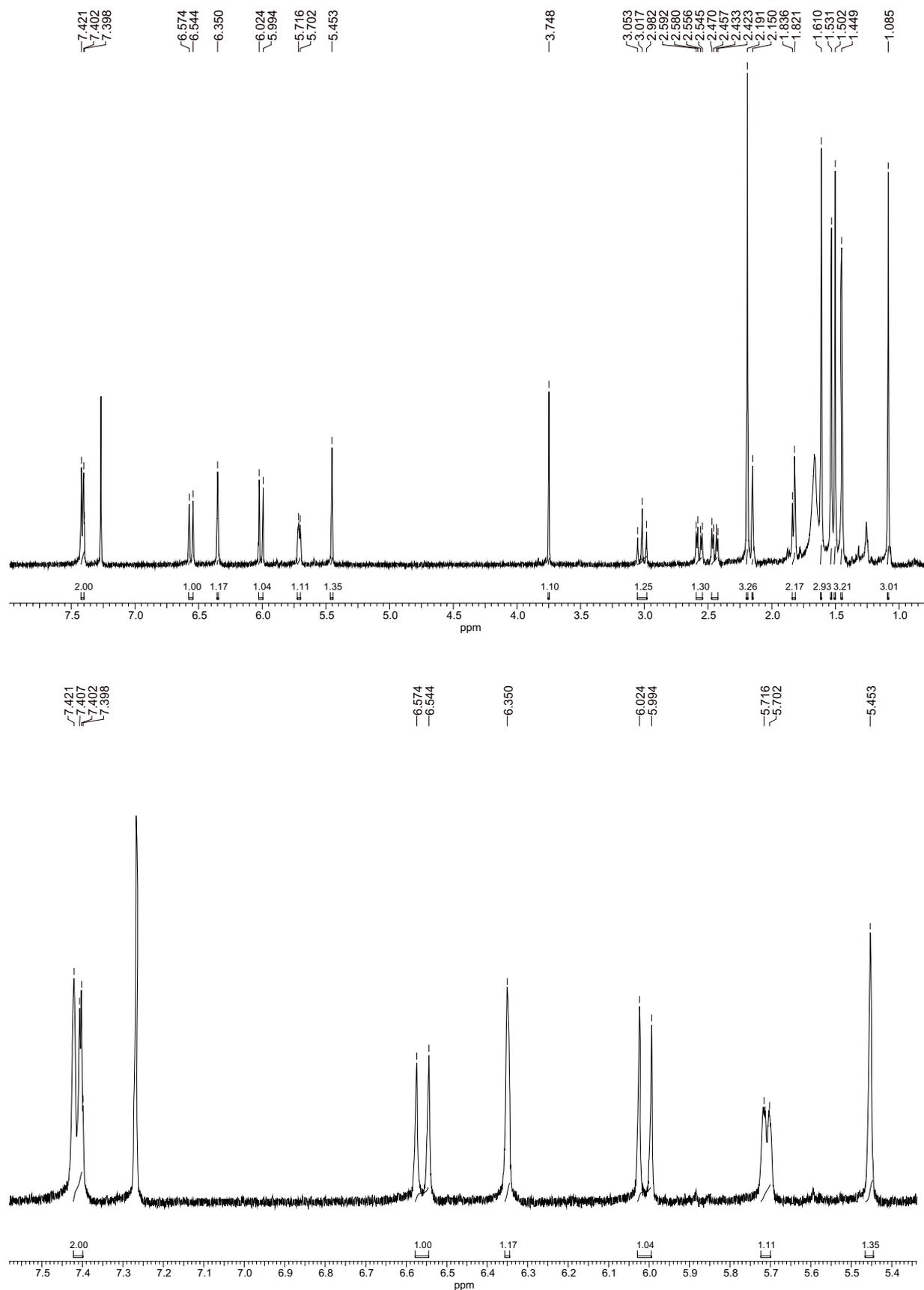


FIGURA 3.37: (A) Espectro de RMN de ^1H de 11 β -acetoxibacunona (**XXVI**) (400 MHz, CDCl_3). **(B)** Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **XXVI**.

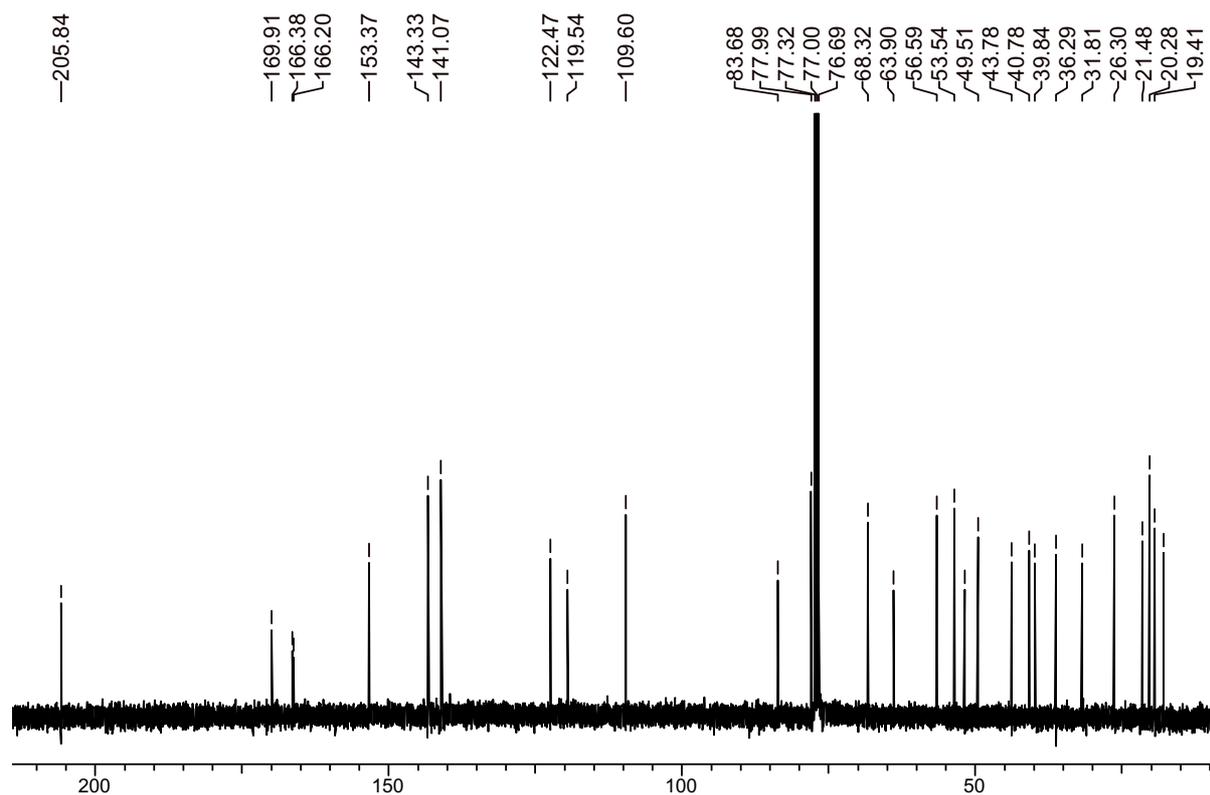


FIGURA 3.38: Espectro de RMN de ^{13}C de 11 β -acetoxibacunona (XXVI) (100 MHz, CDCl_3)

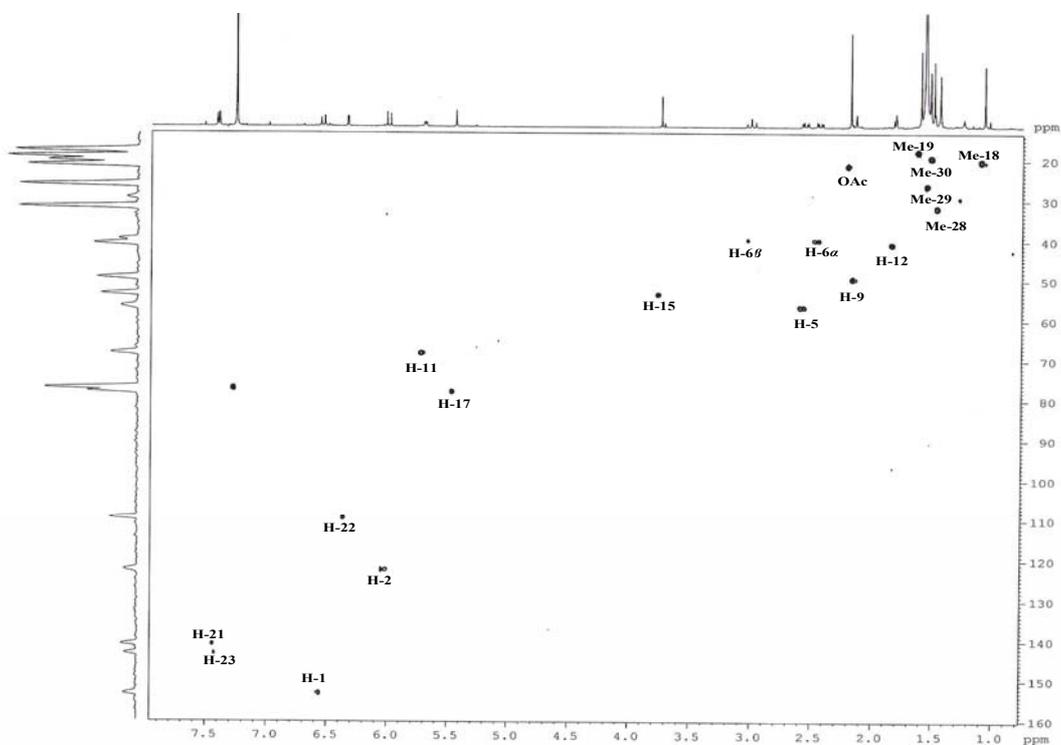


FIGURA 3.39: Mapa de correlações HSQC de 11 β -acetoxibacunona (XXVI) (400 MHz, CDCl_3)

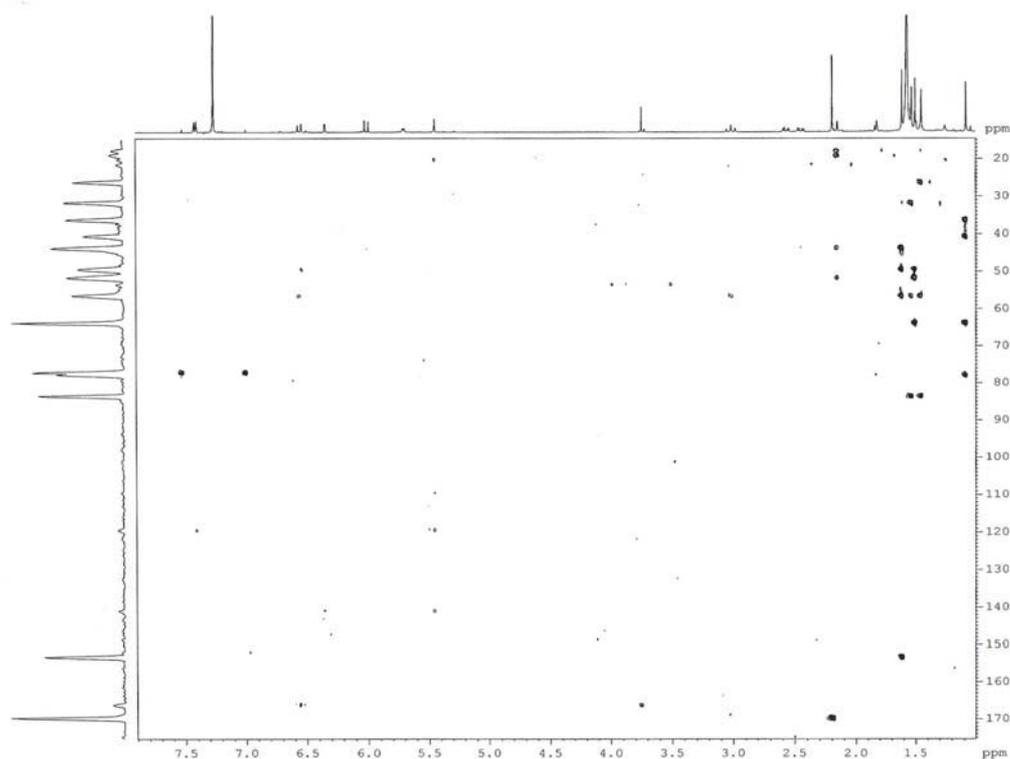


FIGURA 3.40: Mapa de correlações HMBC de 11β-acetoxibacunona (XXVI) (400 MHz, CDCl₃)

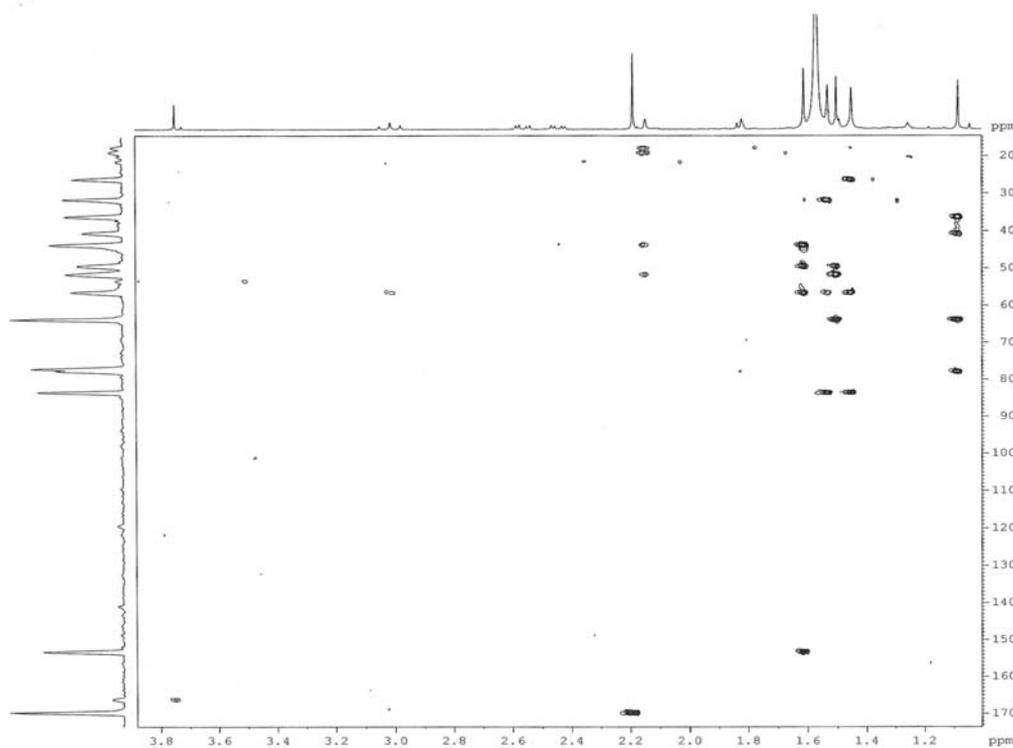
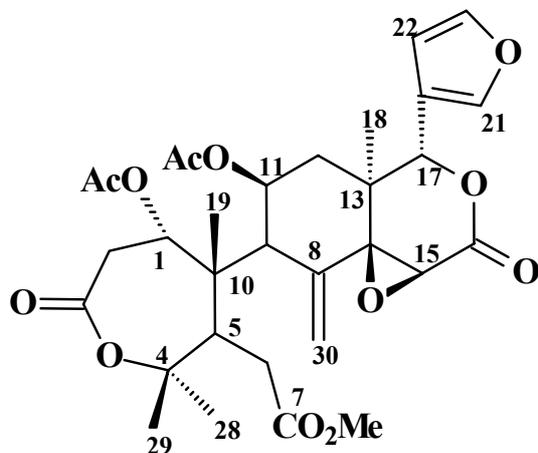


FIGURA 3.41: Ampliação do mapa de correlações HMBC de 11β-acetoxibacunona (XXVI) (400 MHz, CDCl₃)

3.3.7.2 – Identificação do limonóide 1,2 –diidro-1 α -acetoxi-11 β -acetoxi-14,15-epoxicneorina R



XXVII

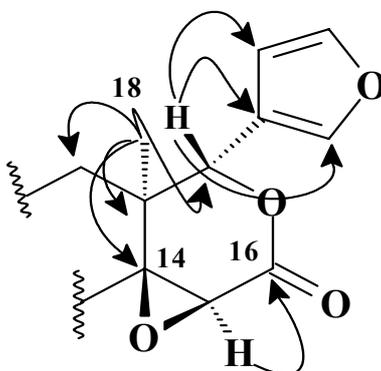
O limonóide **XXVII** foi caracterizado através de RMN em uma e duas dimensões, ESI/MS e também pela comparação com dados da literatura do limonóide 1,2-diidro-1 α -acetoxielegantina B (**XXVIIa**), semelhante ao **XXVII** (GARCEZ *et al.*, 1997a).

No espectro de RMN de ^1H de **XXVII** (FIGURA 3.42, p. 110) foram observados sinais característicos do anel furano em δ 7,41 (*t*, $J = 2,0$ Hz, H-23), δ 7,38 (*s*, H-21) e δ 6,32 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-22). No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.43, p. 110), o anel furano foi caracterizado pelos sinais em δ 119,2 (C-20), δ 141,1 (C-21), δ 109,5 (C-22) e δ 143,5 (C-23). Estas atribuições foram confirmadas através do mapa de correlações HSQC de **XXVII** (FIGURA 3.45, p. 111).

No espectro de RMN de ^1H observou-se também a presença de sete sinais de metilas como singletos em δ 1,06, 1,25, 1,42, 1,59, 2,11, 2,15 e 3,67. Os dois singletos integrando para um hidrogênio cada, em δ 3,92 e δ 5,50 foram atribuídos a H-15 e H-17, respectivamente. As atribuições dos sinais de H-15 e H-17 e a presença de um anel D δ -lactônico com epóxido entre C-14 e C-15,

foram confirmadas através das correlações observadas no mapa de correlações HMBC (FIGURA 3.46, p. 112).

Os deslocamentos químicos de C-15 (δ 55,4) e C-17 (δ 76,4) foram determinados através da análise do mapa de correlações HSQC (FIGURA 3.45, p. 111) de **XXVII**. No mapa de correlações do HMBC (FIGURA 3.46, p. 112) foi observada a correlação do sinal em δ 1,06 (*s*, Me-18) com os sinais em δ 76,4 (C-17), 38,6 (C-13), 67,2 (C-14) e 34,8 (C-12).



O mapa de correlações HSQC mostra o sinal em δ 34,8 (C-12) se correlacionando com o sinal em δ 1,25 (*m*, 1H), atribuído ao hidrogênio H-12b. Através do espectro de Cosy ^1H - ^1H observou-se o acoplamento do hidrogênio H-12b (δ 1,25, *m*) com o sinal em δ 1,80 (*m*, 1H), atribuído ao H-12a.

No espectro de Cosy ^1H - ^1H (FIGURA 3.44, p. 111) também foi possível observar o acoplamento dos hidrogênios H-12a e H-12b com o hidrogênio em δ 5,35, atribuído a H-11. O acoplamento do H-11 (δ 5,35, *m*) ao hidrogênio em δ 3,20 (*m*, 1H) atribuído à H-9, foi observado através do espectro de Cosy ^1H - ^1H . A presença de um sinal em δ 2,15 (*s*, 3H) se correlacionando com o sinal em δ 170,2 no mapa de correlações HMBC, evidenciou a presença do grupo acetoxílico na posição 11.

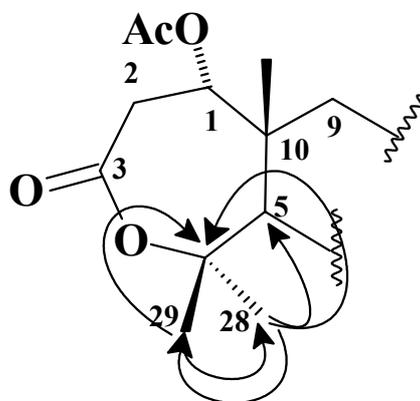
No espectro de RMN de ^1H , a presença de uma ligação dupla exocíclica entre C8-C30 foi determinada pela presença dos sinais em δ 5,35 (*m*, 1H) e δ 5,55 (*m*, 1H) atribuídos aos hidrogênios olefinicos da posição 30. O

deslocamento químico de C-30 (δ 125,7) foi determinado através do mapa de correlações HSQC, confirmando o anel B *seco* para este limonóide.

Os sinais em δ 5,55 (*m*, 1H) e δ 2,11 (*s*, OAc) no espectro de RMN de ^1H evidenciaram a presença do grupo acetoxílico no anel A. No espectro de Cosy ^1H - ^1H observou-se o acoplamento do hidrogênio em δ 5,55 (*m*, H-1) com os hidrogênios em δ 3,08 (*d*, $J = 16,5$ Hz, 1H) e δ 3,32 (*m*, 1H) atribuídos aos hidrogênios H-2a e H-2b. Os carbonos C-1 (δ 72,0) e C-2 (δ 36,5) foram caracterizados através do mapa de correlações HSQC.

A presença do sinal em δ 170,6 observado no espectro de RMN de ^{13}C , característico de carbono carboxílico foi atribuído a C-3, sendo coerente com os dados da literatura (GARCEZ *et al.*, 1997a).

Foram também observadas através do mapa de correlações HMBC, as correlações dos sinais em δ 1,42 (*s*, Me-28) e δ 1,59 (*s*, Me-29) com os carbonos C-4 (δ 84,5) e C-5 (δ 45,7).



Os sinais dos hidrogênios H-5 e H-6 foram atribuídos através do espectro de RMN de ^1H e por comparações com a literatura.

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 3.43, p. 110) observou-se sinais em δ 52,2 e δ 173,1 atribuídos ao grupo carbometoxílico em C-7. Essa atribuição foi confirmada através do mapa de correlações HMBC.

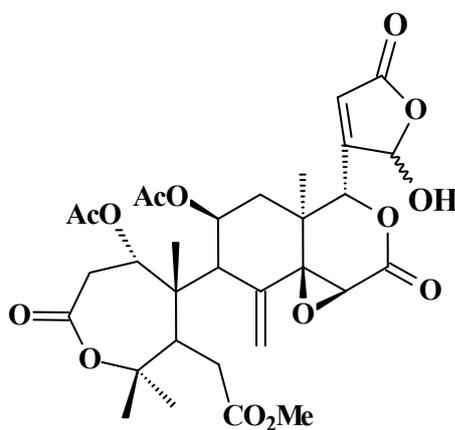
O singlete em δ 1,25 (Me-19) apresentou correlação no HSQC com o sinal em δ 20,0, atribuído ao C-19.

Nos espectros de RMN de ^1H e RMN ^{13}C do limonóide **XXVII** foram observados alguns sinais com má resolução, Garcez *et al.* (1997a) relatam que a má resolução dos sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de compostos que possuem anel B-*seco* e ϵ -lactônico no anel A, seria devido ao impedimento rotacional em torno da ligação C-9/C-10. Este impedimento pode ser causado por substituintes presentes no anel A. Desta forma, os sinais relativos aos prótons situados na vizinhança da ligação citada se mostram mais alargados.

O espectro de massas (ESI) no modo positivo do limonóide **XXVII** (FIGURA 3.48, p. 113) apresentou um pico em m/z 625 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, correspondente ao aduto de sódio, de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{O}_{12}$ proposta para este limonóide.

A partir da análise dos experimentos realizados, juntamente com os dados da literatura pode-se confirmar a estrutura do limonóide **XXVII**.

O limonóide **XXVIIa** foi utilizado como modelo para comparação dos dados da estrutura **XXVII**.



XXVIIa

TABELA 3.26: Dados de RMN de ^1H de XXVII e comparação com a literatura.

H	XXVII (400 MHz, CDCl_3)	GARCEZ, 1997a (XXVIIa) (300 MHz, CDCl_3)
1	5,55 (<i>m</i>)	5,34-5,56 (<i>m</i>)
2a	3,08 (<i>d</i> , $J = 16,5$ Hz)	3,06 (<i>d</i> , $J = 16,5$ Hz)
2b	3,32 (<i>m</i>)	3,25-3,47 (<i>m</i>)
5	3,20 (<i>m</i>)	3,25-3,47 (<i>m</i>)
6a	2,10 (<i>m</i>)	2,03-2,17 (<i>m</i>)
6b	2,75 (<i>m</i>)	2,66 (<i>dd</i> , $J = 18,3$ e $3,1$ Hz)
9	3,20 (<i>m</i>)	3,19 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)
11	5,35 (<i>m</i>)	5,34-5,56 (<i>m</i>)
12a	1,80 (<i>m</i>)	1,94 (<i>t</i> , $J = 12,2$ Hz)
12b	1,25 (<i>m</i>)	1,57-1,78 (<i>m</i>)
15	3,92 (<i>s</i>)	3,91 (<i>s</i>)
17	5,50 (<i>s</i>)	5,34-5,56 (<i>m</i>)
18	1,06 (<i>s</i>)	1,12 (<i>s</i>)
19	1,25 (<i>s</i>)	1,12 (<i>s</i>)
21	7,38 (<i>s</i>)	6,01 (<i>s</i>)
22	6,32 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,23 (<i>s</i>)
23	7,41 (<i>t</i> , $J = 2,0$ Hz)	--
28	1,42 (<i>s</i>)	1,44 (<i>s</i>)
29	1,59 (<i>s</i>)	1,55 (<i>s</i>)
30a	5,35 (<i>m</i>)	5,34-5,56 (<i>m</i>)
30b	5,55 (<i>m</i>)	5,34-5,56 (<i>m</i>)
OAc	2,11 (<i>s</i>) e 2,15 (<i>s</i>)	2,15 (<i>s</i>) e 2,18 (<i>s</i>)
OMe	3,68 (<i>s</i>)	3,68 (<i>s</i>)

TABELA 3.27: Dados de RMN ^{13}C de **XXVII** e comparação com a literatura.

C	XXVII (100 MHz, CDCl_3)	GARCEZ, 1997a (XXVIIa) (100 MHz, CDCl_3)
1	71,5	71,6
2	36,5	36,5
3	170,6	171,6
4	84,5	84,6
5	45,7	45,7
6	34,8	34,7
7	173,1	173,0
8	136,6	136,0
9	51,6	51,5
10	48,5	48,0
11	69,3	68,5
12	34,8	34,1
13	38,6	39,0
14	67,2	67,4
15	55,4	55,0
16	166,1	164,9
17	76,4	76,6
18	15,4	15,7
19	20,0	24,4
20	119,2	161,7
21	141,1	98,1
22	109,5	123,4
23	143,5	168,6
28	33,8	34,0
29	24,6	21,2
30	125,7	126,3
OAc	170,2	170,3
	21,4	21,4
OAc	170,0	170,7
	21,6	21,5
OMe	52,2	52,4

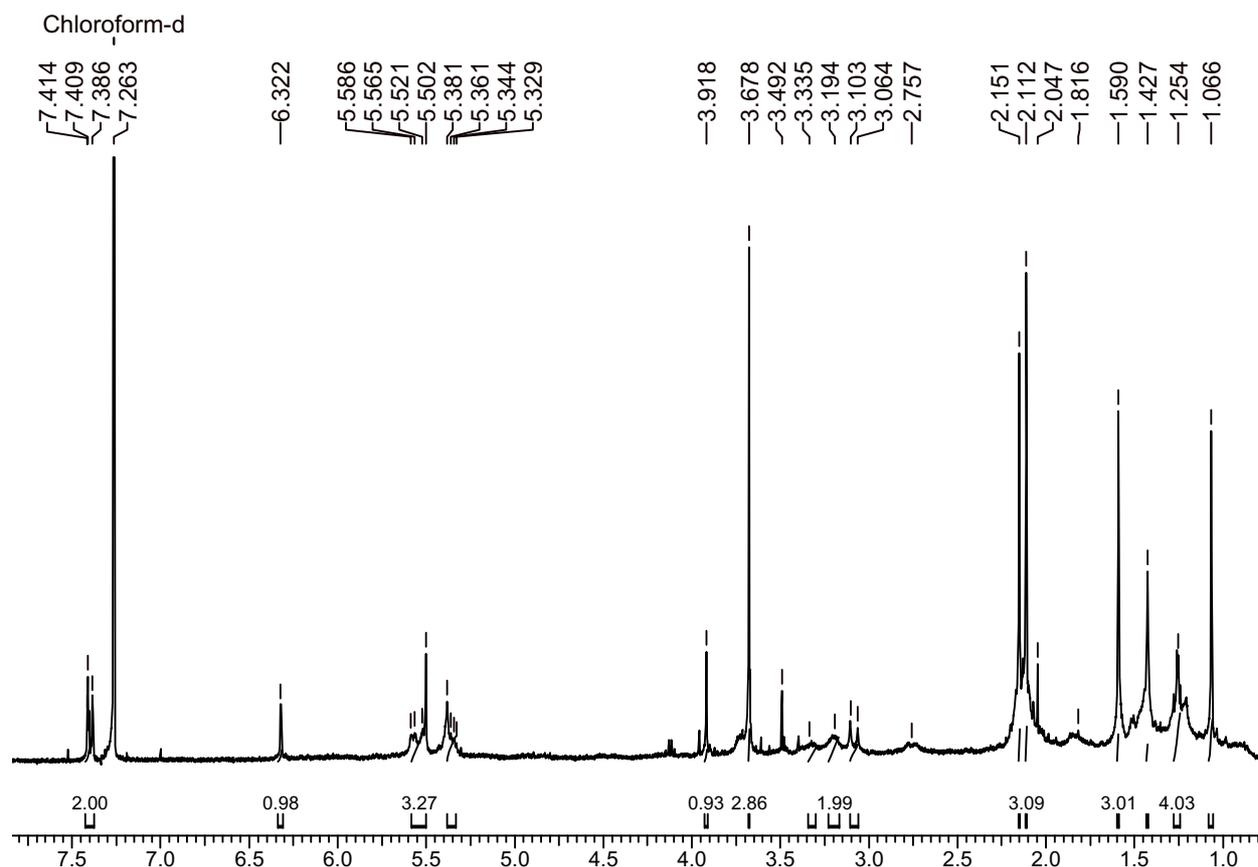


FIGURA 3.42: Espectro de RMN de ^1H de **XXVII** (400 MHz, CDCl_3)

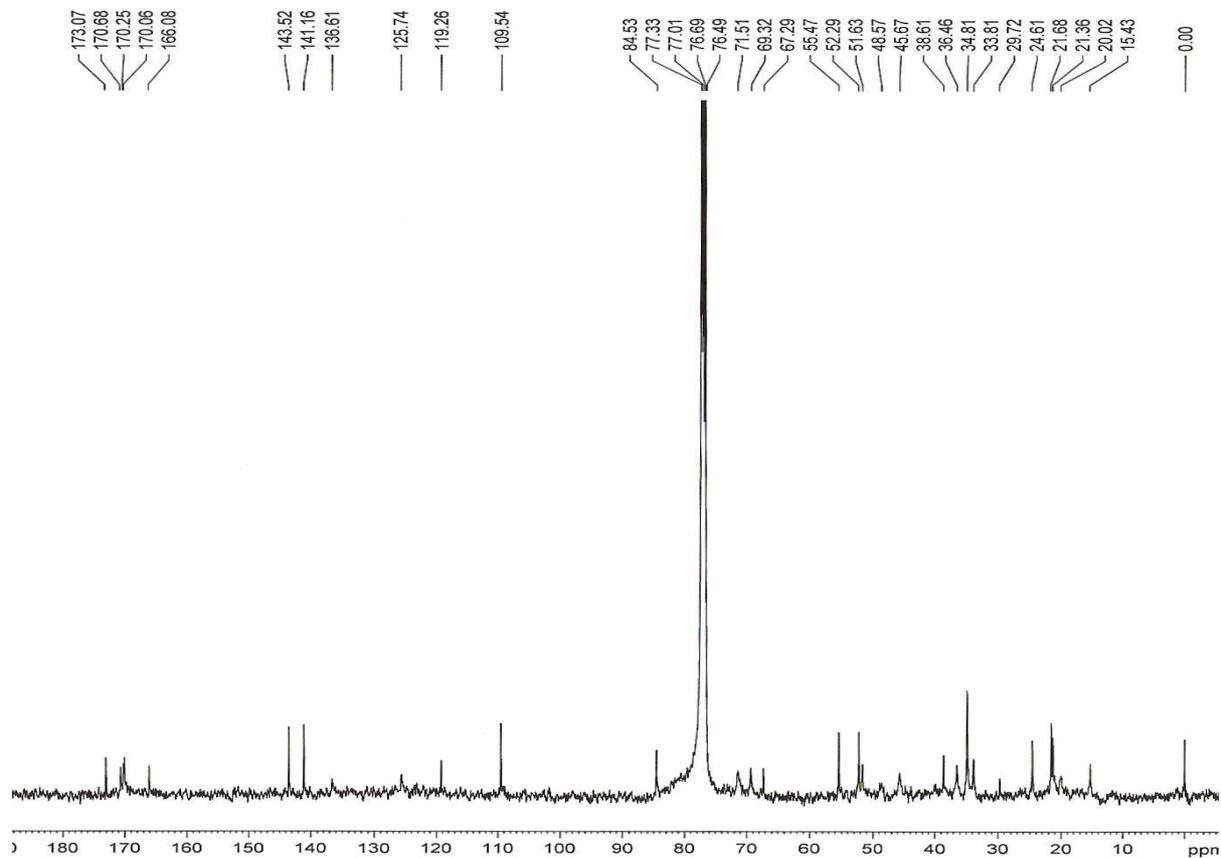


FIGURA 3.43: Espectro de RMN de ^{13}C de **XXVII** (100 MHz, CDCl_3)

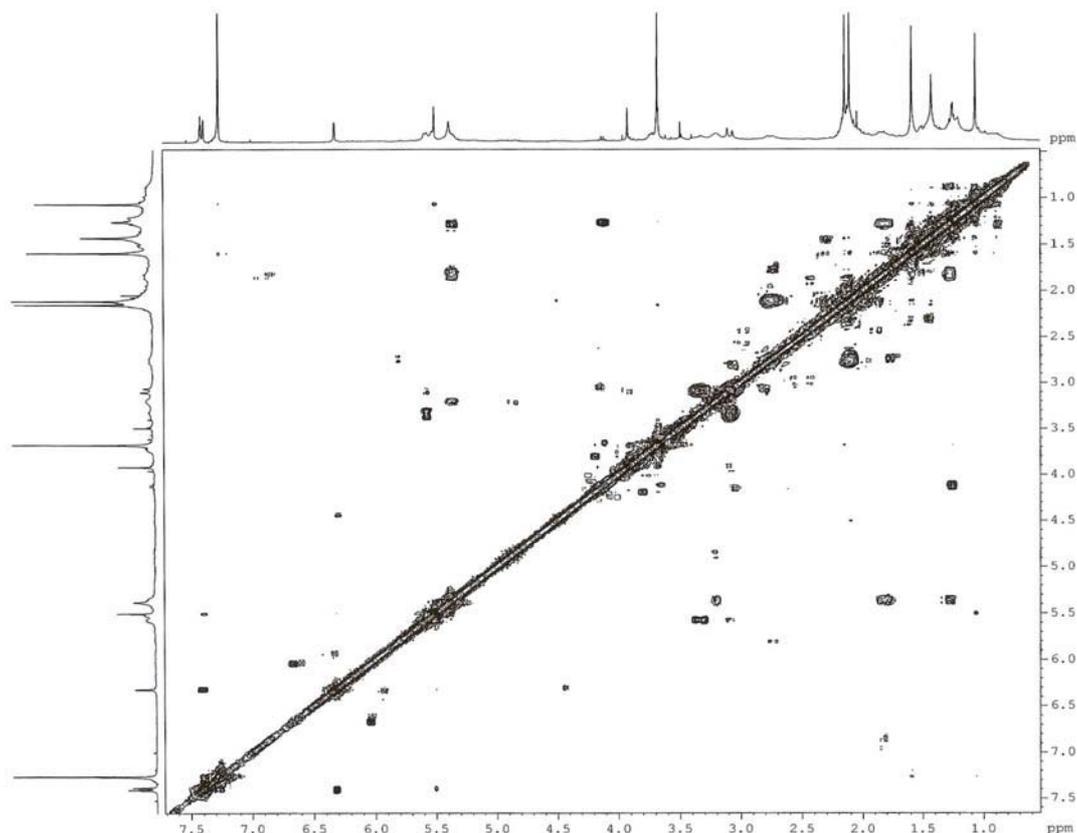


FIGURA 3.44: Espectro de Cosy ¹H-¹H de XXVII (400 MHz, CDCl₃)

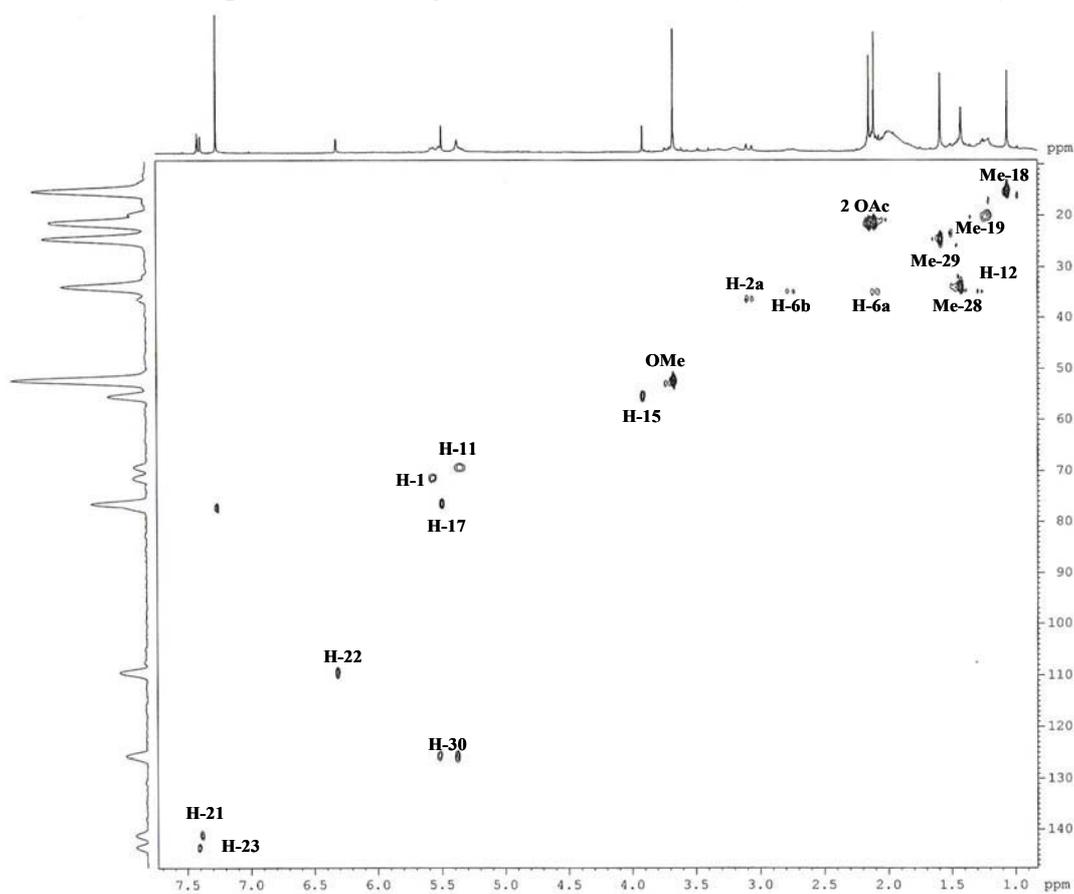


FIGURA 3.45: Mapa de correlações HSQC de XXVII (400 MHz, CDCl₃)

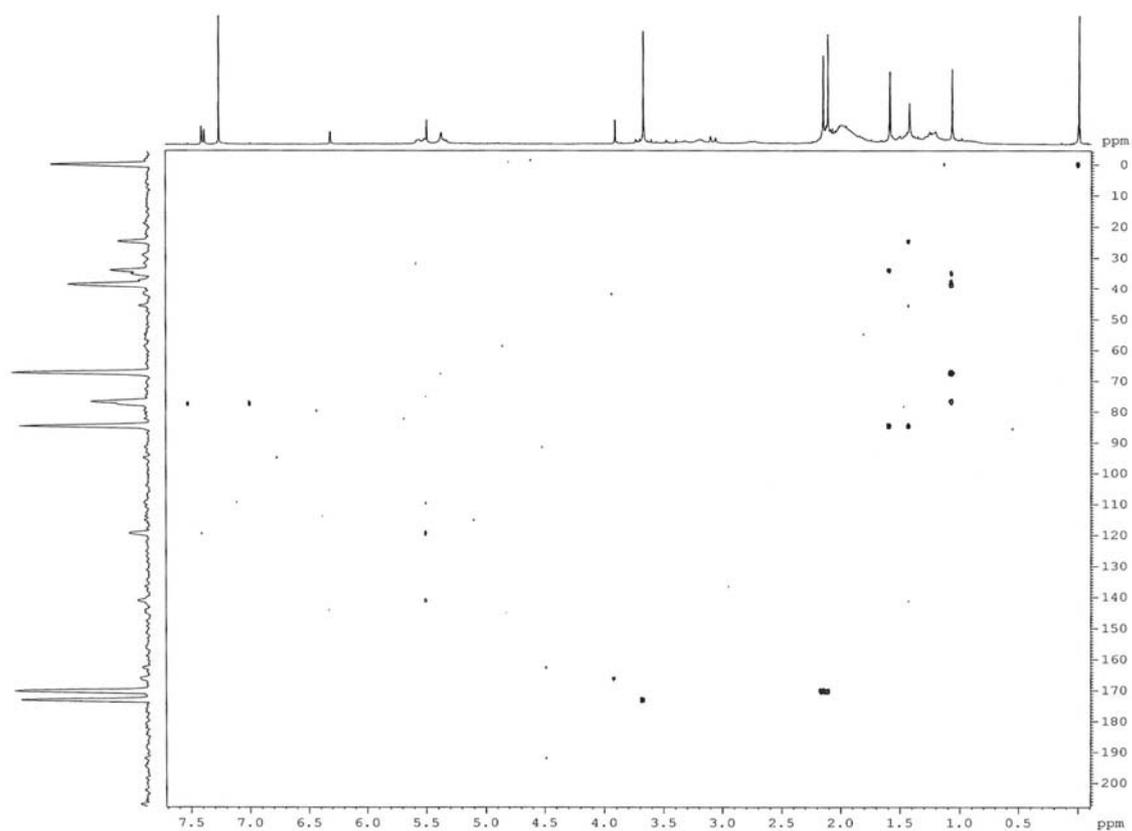


FIGURA 3.46: Mapa de correlações HMBC de **XXVII** (400 MHz, CDCl_3)

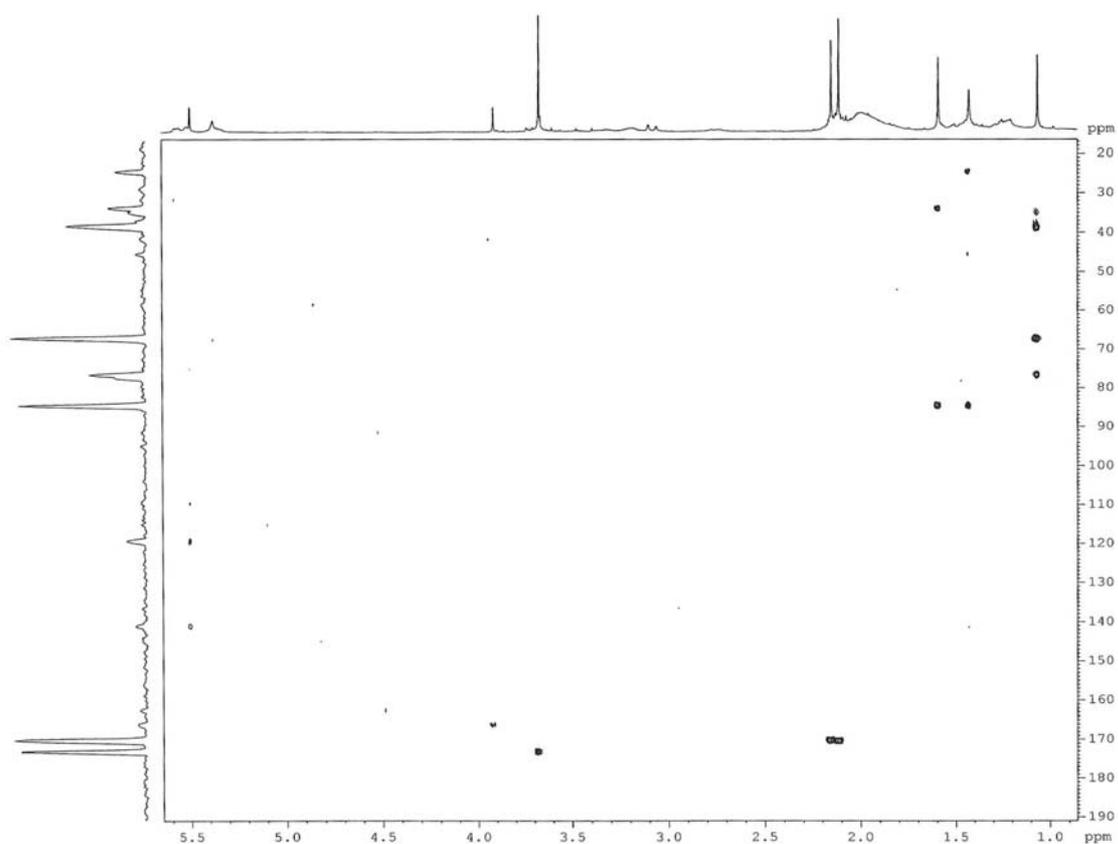


FIGURA 3.47: Ampliação do mapa de correlações HMBC de **XXVII** (400 MHz, CDCl_3)

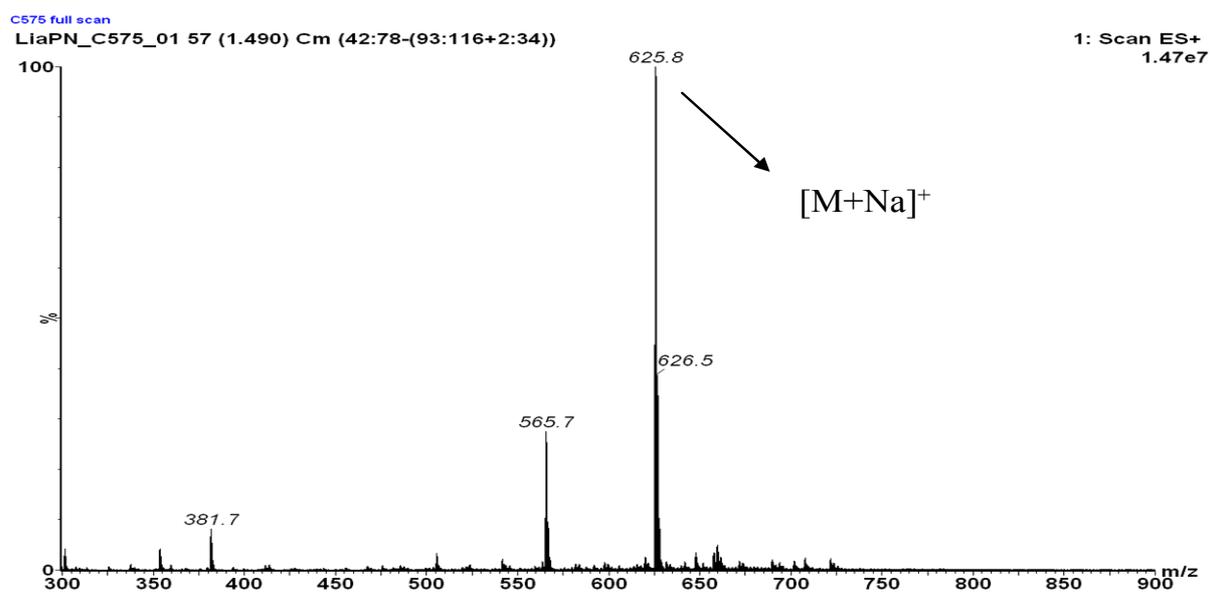
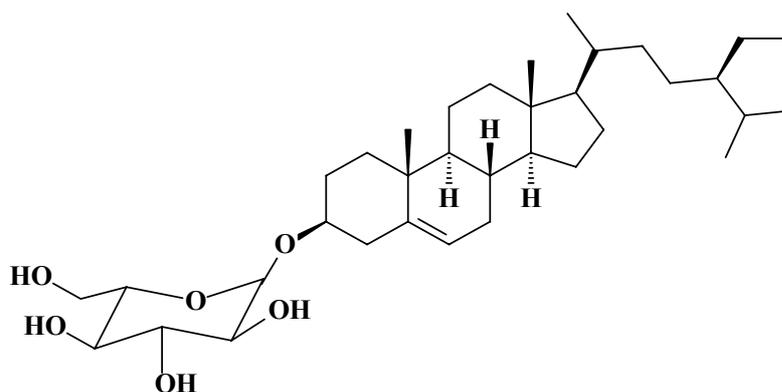


FIGURA 3.48: Espectro de massas (ESI no modo positivo) do limonóide **XXVII**.

3.3.8 – Identificação dos esteróides

3.3.8.1 – Identificação do 3- β -O- β -glucopiranosil sitosterol



A substância **XXVIII** foi isolada do extrato metanólico das sementes de *T. clausenii* e a sua estrutura foi determinada com base em experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação com dados da literatura (SAKAKIBARA *et al.*, 1983).

Através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **XXVIII** (FIGURAS 3.49 e 3.51, ps. 115 e 116) observou-se um duplo dubleto em δ 4,58 ($J = 11,6$ e $2,4$ Hz) (RMN de ^1H) e δ 102,5 (RMN de ^{13}C) correspondente ao H-1' e o carbono anomérico, sinais nas regiões δ 4,00 a 5,20 referentes aos hidrogênios carbinólicos também foram observados.

O espectro de RMN de ^1H de **XXVIII** mostra vários sinais nas regiões de δ 0,67 a 2,76 indicando a presença de hidrogênios metílicos e metilênicos característicos do esqueleto esteroidal.

Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C estão de acordo com os dados da literatura para o esteróide 3- β -O- β -glucopiranosil sitosterol.

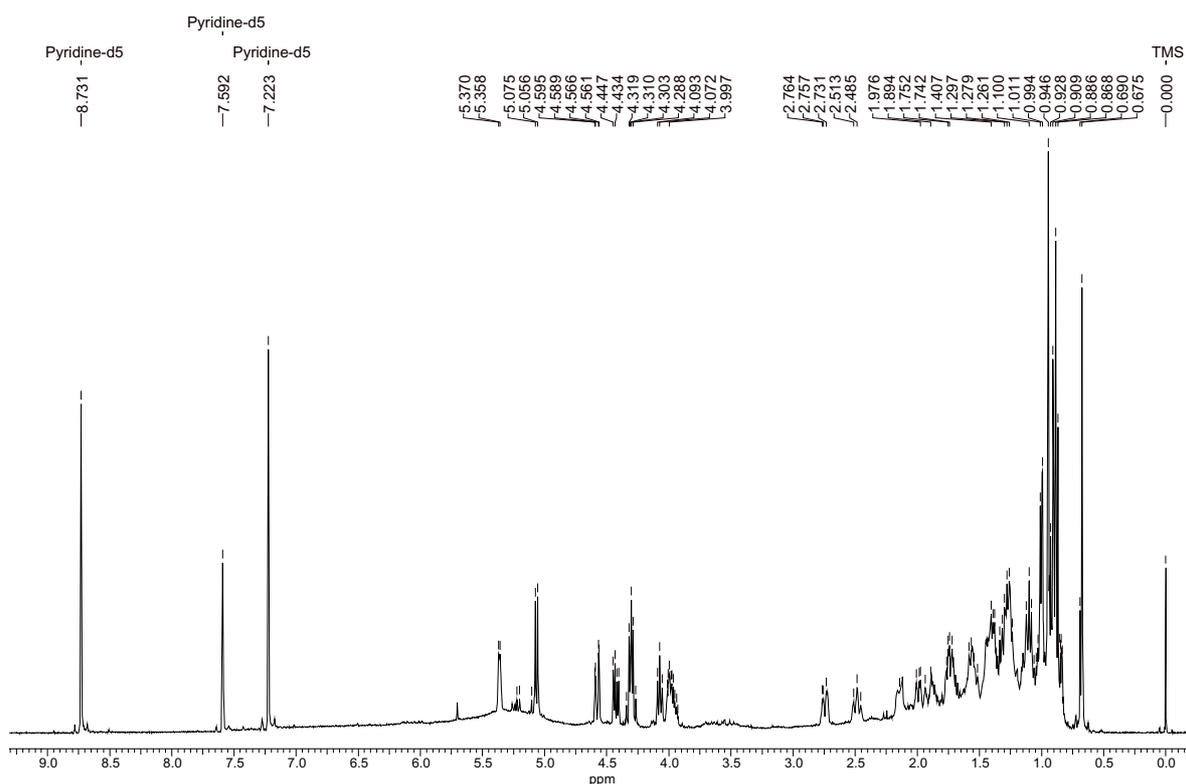


FIGURA 3.49: Espectro de RMN de ^1H do 3- β -O- β -glucopiranosil sitosterol (XXVIII) (400 MHz, Piridina- d_5).

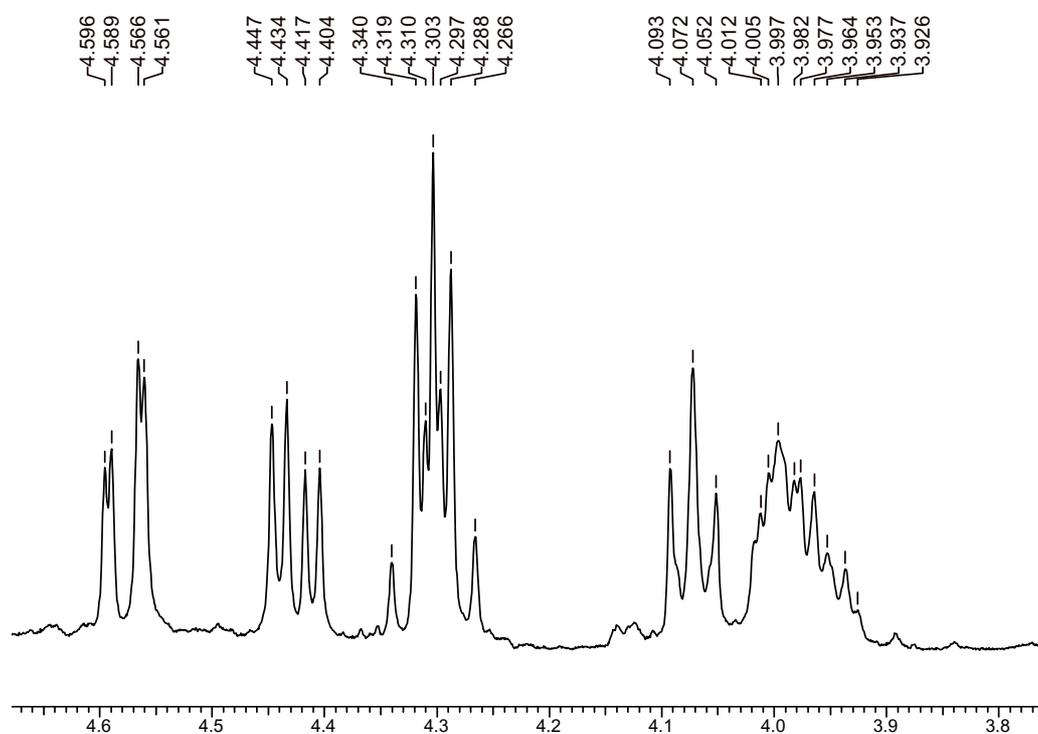


FIGURA 3.50: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do 3- β -O- β -glucopiranosil sitosterol (XXVIII) (400 MHz, Piridina- d_5).

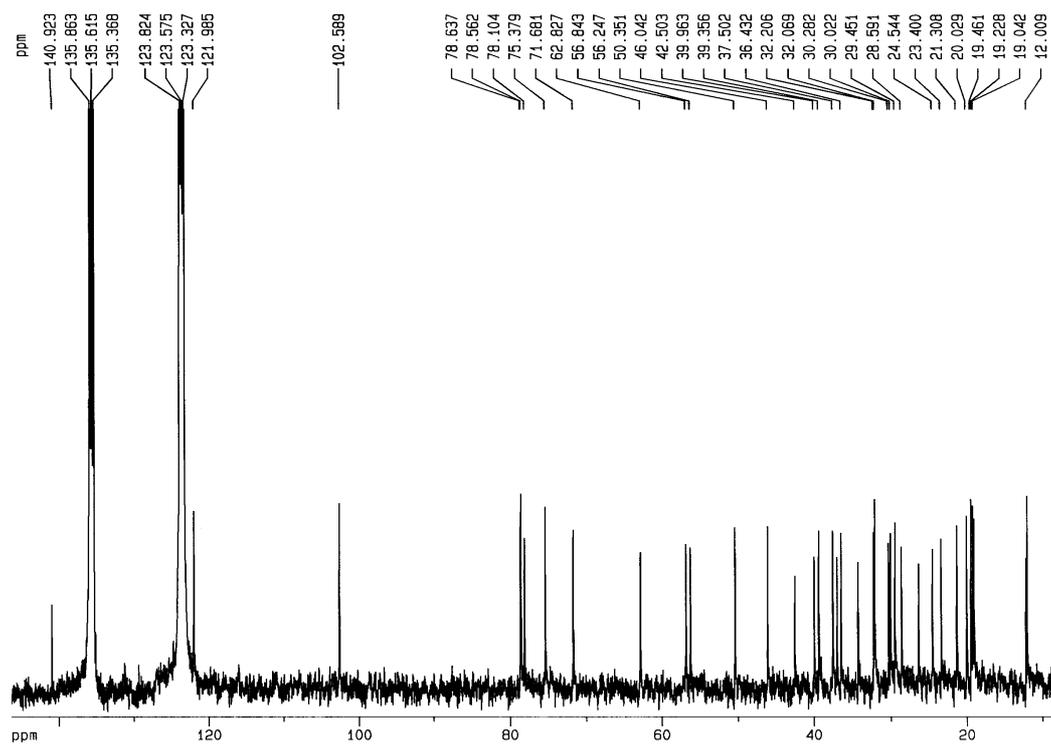


FIGURA 3.51: Espectro de RMN de ^{13}C do 3- β -O- β -glucopiranosil sitosterol (XXVIII) (100 MHz, Piridina- d_5).

TABELA 3.28: Dados de RMN de ^{13}C da aglicona do sitosterol (XXVIII) e comparação com a literatura

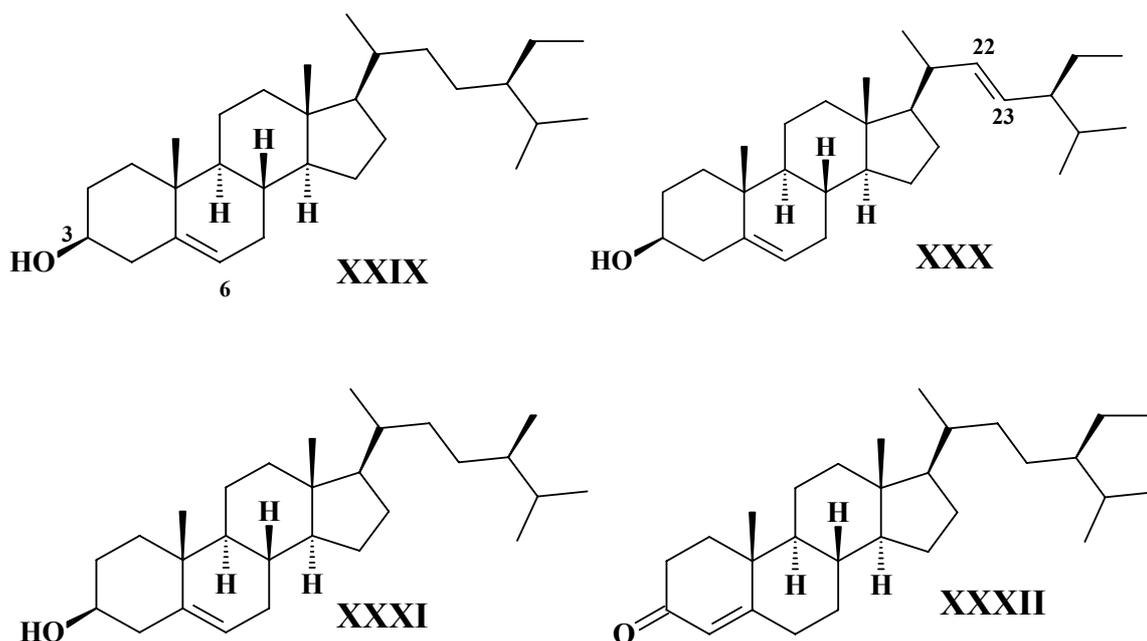
C	XXVIII (100 MHz, Piridina-d ₅)	SAKAKIBARA, 1983 (50 MHz, Piridina-d ₅)
1	37,5	37,5
2	30,3	30,2
3	78,5	78,5
4	40,0	40,0
5	140,9	140,9
6	122,0	121,8
7	32,2	32,1
8	32,1	32,1
9	50,3	50,3
10	37,0	36,9
11	21,3	21,3
12	39,3	39,3
13	42,5	42,5
14	56,8	56,9
15	24,5	24,5
16	28,6	28,6
17	56,2	56,3
18	12,0	12,0
19	19,5	19,4
20	36,4	36,4
21	19,0	19,1
22	34,2	34,3
23	26,3	26,5
24	46,0	46,1
25	29,4	29,5
26	19,2	19,2
27	20,0	20,0
28	23,4	23,4
29	12,2	12,2

TABELA 3.29: Dados de RMN de ^{13}C do grupo glicosil (XXVIII) e comparação com a literatura

C	XXVIII (100 MHz, Piridina-d₅)	SAKAKIBARA, 1983 (50 MHz, Piridina-d₅)
1'	102,6	102,5
2'	75,4	75,3
3'	78,6	78,6
4'	71,7	71,7
5'	78,1	78,4
6'	62,8	62,8

3.3.8.2 – Identificação da mistura do esteróides

Os esteróides β -sitosterol (XXIX), campesterol (XXX), estigmasterol (XXXI), e sitostenona (XXXII) são de ampla ocorrência no reino vegetal. Estes esteróides foram isolados em mistura do extrato hexânico das sementes de *T. elegans*.



A mistura de esteróides foi identificada através da análise dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , CG/EM (condições: p. 123) e os dados obtidos foram concordantes com a literatura. (SUGA & KONDO, 1974; SAKAKIBARA *et al.*, 1983).

PARTE 4
PROCEDIMENTOS
EXPERIMENTAIS

4 – Procedimentos Experimentais

4.1 – Materiais e Métodos

◆ Solventes utilizados para cromatografia:

Solventes comerciais destilados no DQ/UFSCar

Solventes P.A. da Merck, Synth, Vetec e Labsynth

Solventes de grau cromatográfico da JTB para análises em CLAE

◆ Solventes utilizados em RMN:

Deuterados da Merck, Isotec Inc. e Aldrich (TMS 0,03%)

◆ Reagentes utilizados na reação de esterificação:

N-metil-N-nitroso-4-toluol-sulfonamida (Diazald) – Merck

KOH P.A. – Merck

◆ Fases estacionárias para cromatografia:

- Cromatografia em coluna de vidro:

Sílica gel 60 (70-230 mesh) da Merck

Sílica gel 60 (230-400 mesh) da Merck

Florisil da Merck

Sephadex LH-20 da Amersham Pharmacia Biotech AB

- Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA):

Cromatofolhas – Sílica gel F₂₅₄ Al TLC 20 x 20 cm da Merck

Reveladores: radiação UV (254 e 360 nm) e vanilina em ácido sulfúrico

4.2 – Equipamentos

◆ Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear

Brüker DRX 400 MHz

Brüker ARX 200 MHz

◆ CG-EM

GC – 17A Shimadzu, CG/MS – QP 5000 Shimadzu

Coluna DB-5 (30m x 0,25mm)

Ionização por impacto eletrônico (IE) (70 e.V)

Todas as análises via CG-EM foram realizadas utilizando:

Temperatura do injetor: 250°C

Temperatura do detector: 280°C

Modo: split

Volume de injeção: 1µL

Programações de temperatura utilizadas nas análises:

❖ Mistura dos esteróides:

- Programação de temperatura: 150°C (1 min.); 6°C/min. até 280°C; 280°C (15min.)

❖ Ácidos ω-fenil alcanóicos e alcenóicos

- Programação de temperatura: 70°C (2 min.); 10°C/min. até 290°C; 290°C (20min.)

❖ γ -lactonas

- Programação de temperatura: 70°C (2 min.); 10°C/min. até 290°C; 290°C (20min.)

◆ **Espectrômetro de Massas**

MICROMASS QUATTRO LC

As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria e Massas (LEM)

– DQ/UFSCar

Modo de ionização:

Substância: **XXVII** ESI (modo positivo)

◆ **CLAE**

Cromatógrafo: Shimadzu LC-8A (preparativo) com válvula de reciclo, injetor

Rheodyne 7123 com loop de 500,0 μ L

Detector: UV-VIS, Shimadzu SPD-6AV

Coluna: Asahipak GS-310 2G (h x ϕ = 50,0 x 2,15 cm) com fase polimérica.

◆ **Evaporadores**

Büchi – modelo rotavapor R – 114 – DQ-UFSCar

Büchi – modelo EL – 131 – DQ-UFSCar

4.3 – Material Botânico

Os frutos de *T. clausenii* e *T. elegans* foram coletados em Piracicaba/SP (coleta realizada em dezembro de 2004) no Campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” (ESALQ) e identificados pelo botânico Dr. Ricardo Ribeiro Rodrigues, professor daquela instituição. As inflorescências de *T. catigua* foram coletadas (fevereiro de 2007) no mesmo local e identificadas pelo Dr. Ricardo Ribeiro Rodrigues.

4.4 – Preparação dos materiais vegetais e obtenção extratos brutos de *T. catigua*, *T. elegans* e *T. clausenii*

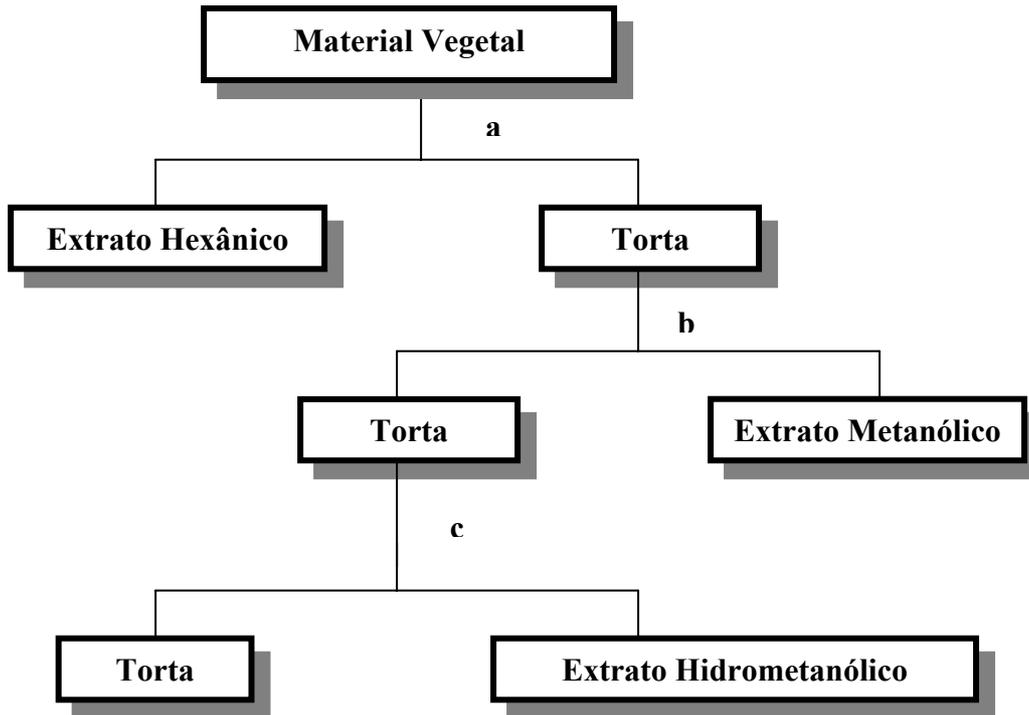
4.4.1 – Obtenção dos extratos brutos dos frutos de *T. clausenii* e *T. elegans*

Os frutos de *T. clausenii* e *T. elegans* foram secos em estufa de circulação de ar a 40°C, por aproximadamente 7 dias e posteriormente separados em exocarpo (casca do fruto), arilo (casca da semente) e semente e então moídos em liquidificador. Após a moagem, foi realizada a extração à temperatura ambiente e em repouso, com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, MeOH e MeOH/H₂O 1:1) durante 7 dias (FLUXOGRAMA 4.1, p. 127). Após a evaporação dos solventes foram extraídos os extratos brutos descritos na TABELA 4.1.

TABELA 4.1: Extratos brutos das partes dos frutos de *T. elegans* e *T. clausenii*

Planta	Parte do Fruto Massa (g)	Código do extrato*	Massa do extrato (g)
<i>T. elegans</i>	Exocarpo (70,164)	Tcfch	1,135
		Tcfem	7,008
		Tcfea	6,156
	Arilo (5,333)	Tcseh	0,125
		Tcsem	2,270
		Tcsea	0,553
	Semente (14,591)	Tseh	0,200
		Tsem	9,341
		Tsea	1,352
<i>T. clausenii</i>	Exocarpo (56,796)	Tcflh	15,587
		Tcflm	4,700
		Tcfla	3,596
	Arilo (7,966)	Tcslh	1,763
		Tcslm	0,702
		Tcsla	0,181
	Semente (35,127)	Tslh	7,118
		Tslm	4,539
		Tsla	2,144

* h:hexano; m:MeOH; a: MeOH:H₂O 1:1



FLUXOGRAMA 4.1: Obtenção dos extratos de espécies de *Trichilia* .

- a) Extração com n-hexano por sete dias.
- b) Extração com metanol por sete dias.
- c) Extração com metanol/água na proporção de 1:1 por sete dias

4.4.2 – Obtenção dos extratos brutos da inflorescência de *T. catigua*

Os extratos das inflorescências de *T. catigua* foram secos em estufa de circulação de ar a 40°C, por aproximadamente 7 dias e após a moagem, foi realizada a extração conforme descrito anteriormente (FLUXOGRAMA 4.1, p. 127). Após a evaporação dos solventes foram extraídos os extratos brutos descritos na TABELA 4.2.

TABELA 4.2: Extrato bruto das inflorescências de *T. catigua*

Planta	Massa (g)	Código do Extrato*	Massa do extrato (g)
<i>T. catigua</i>	Inflorescências	Tflch	0,384
	(16,795)	Tflcm	4,229
		Tflca	2,985

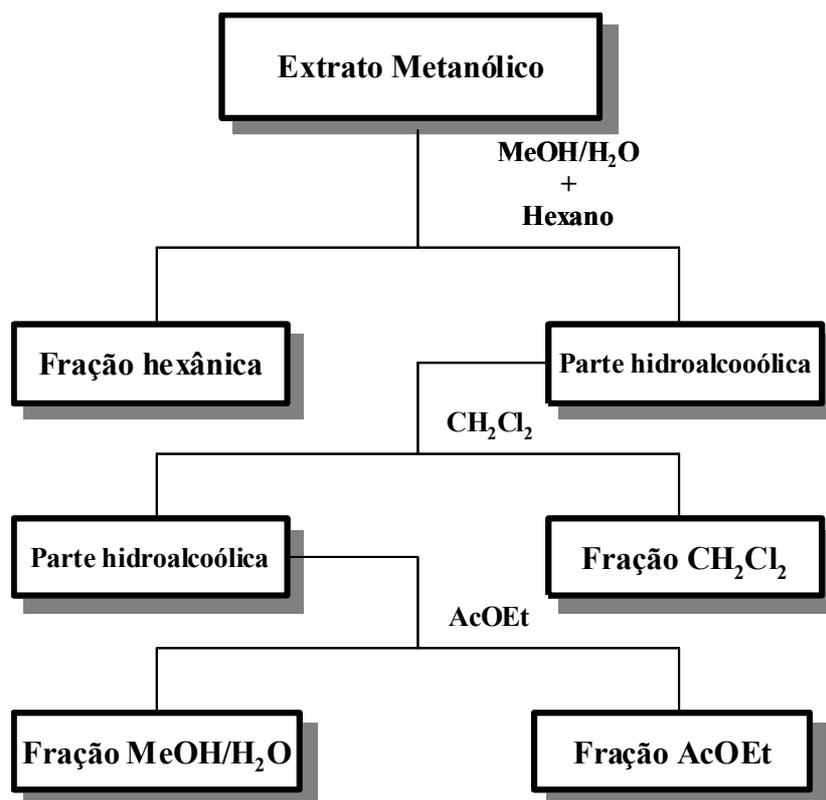
* h:hexano; m:MeOH; a: MeOH:H₂O 1:1

4.5 – Fracionamento dos extratos de espécies de *Trichilia*

4.5.1 – Fracionamento do extrato Tslm

De acordo com os resultados obtidos dos ensaios biológicos dos extratos de *Trichilia* ssp. sobre *S. frugiperda* (item 3.1.2, p. 28), o extrato metanólico das sementes de *T. clausenii* (Tslm) foi fracionado através da partição líquido-líquido, conforme o procedimento descrito no FLUXOGRAMA 4.2.

Do extrato Tslm foram obtidas 4 frações após evaporação dos solventes: hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH/H₂O, conforme descrito na TABELA 4.3.



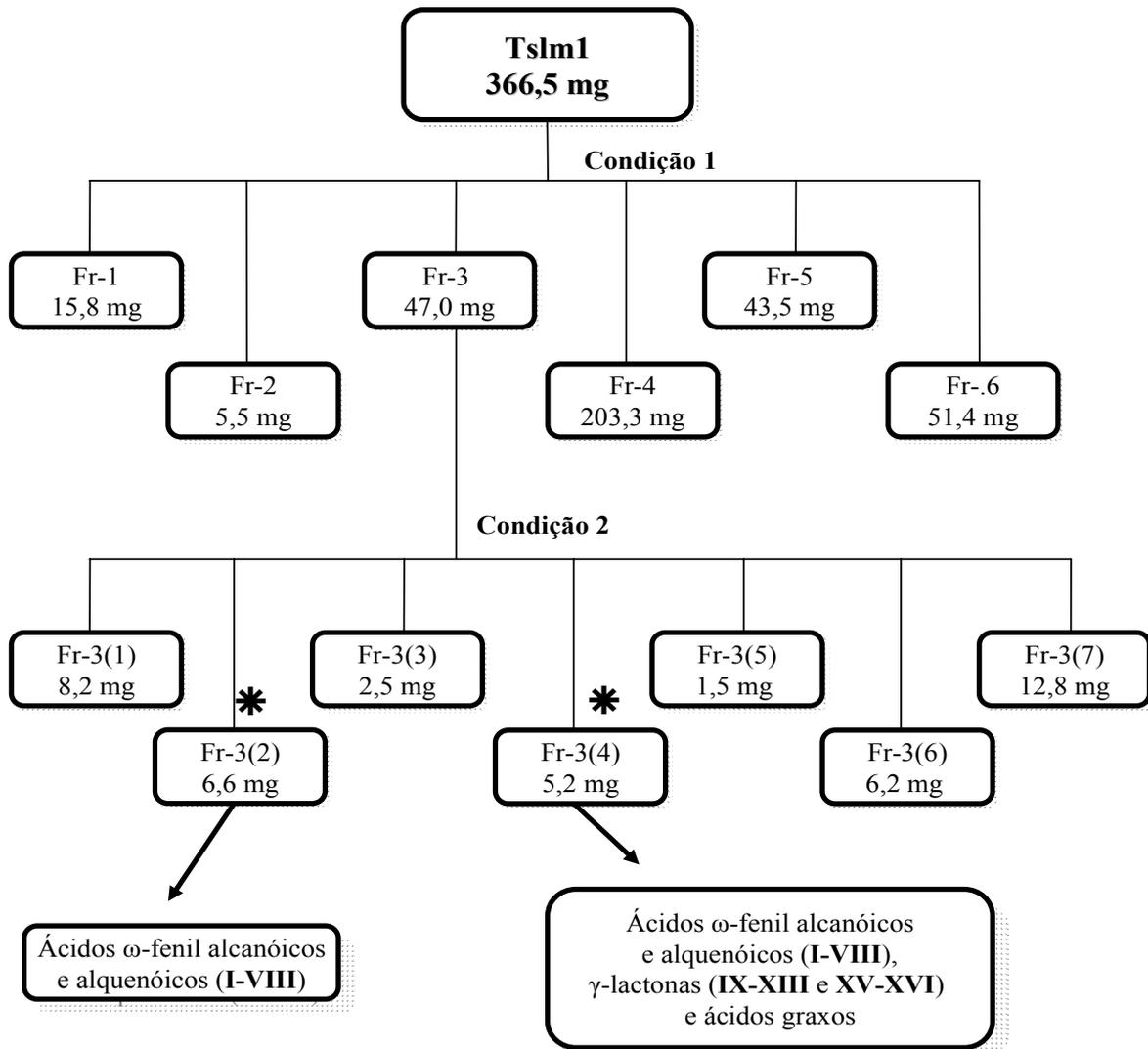
FLUXOGRAMA 4.2: Procedimento geral de partición líquido-líquido dos extratos metanólicos

TABELA 4.3: Frações provenientes do fracionamento do extrato Tslm

Extrato Metanólico	Fração	Solvente	Massa (g)
Tslm (4,539g)	Tslm1	Hexano	0,380
	Tslm2	CH ₂ Cl ₂	0,057
	Tslm3	AcOEt	1,004
	Tslm4	MeOH/H ₂ O	3,098

As frações obtidas da partición líquido-líquido (TABELA 4.3) foram ensaiadas sobre *S. frugiperda* (item 3.1.2.1, p. 30). As frações ativas foram submetidas a sucessivos fracionamentos.

4.5.1.1 – Fracionamento da fração Tslm1



FLUXOGRAMA 4.3: Fracionamento da fração Tslm1 e Tslm1(Fr-3)

* Foi realizada reação de metilação em pequenas alíquotas das amostras para análise via CG/EM

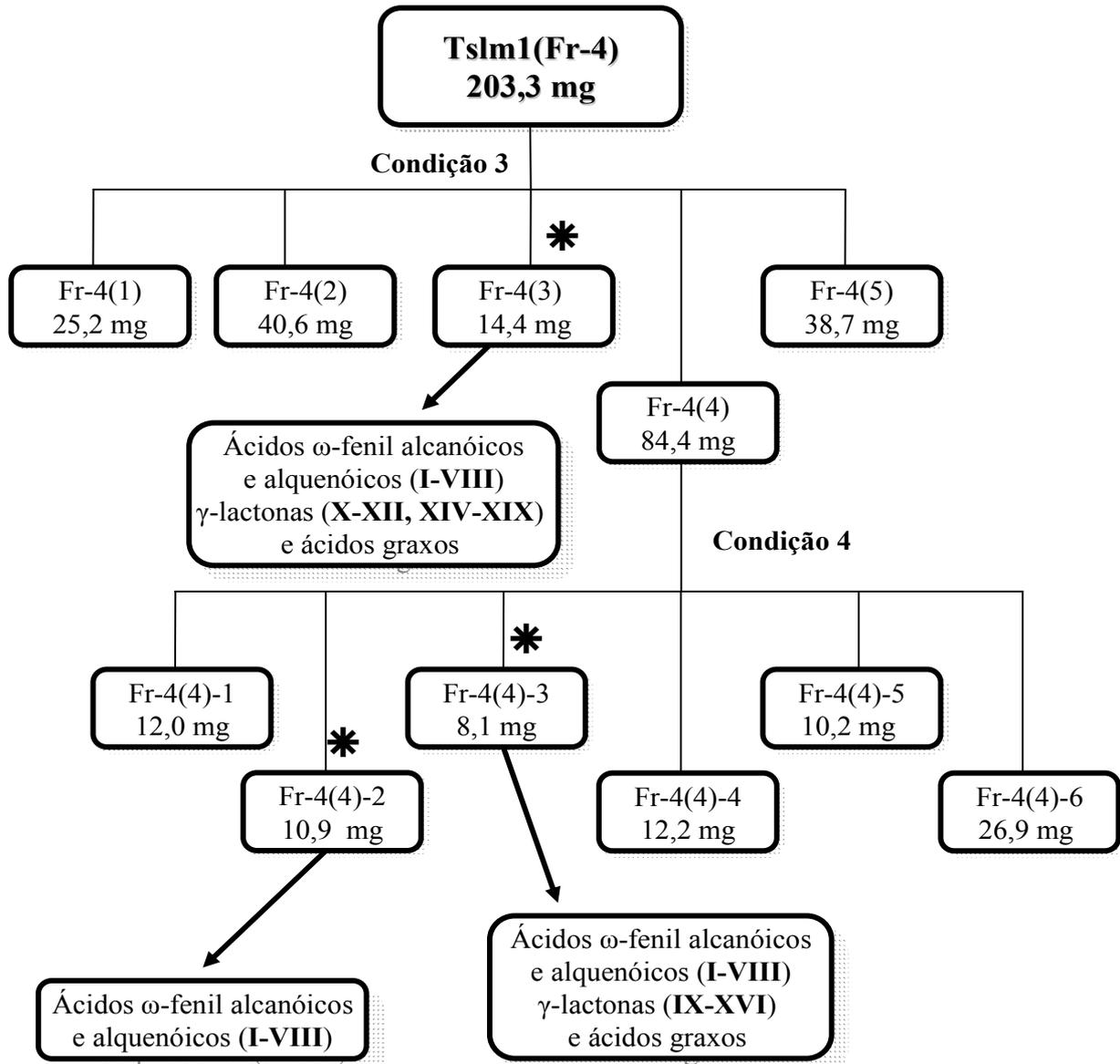
Condição 1:

- Coluna em sílica gel (70-230 mesh), $\phi = 3,5$ cm e $h = 30,0$ cm
- Gradiente de Eluição: Hexano100%, Hex/AcOEt (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), MeOH 100%.

Condição 2:

- Coluna em sílica gel (70-230 mesh), $\phi = 2,0$ cm e $h = 14,5$ cm
- Gradiente de Eluição: Hexano100%, Hex/AcOEt (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), MeOH 100%.

Código: T = *Trichilia*; s = sementes; l = *clausenii*; m = metanólico



FLUXOGRAMA 4.4: Fracionamento da fração Tslm1(Fr-4) e Tslm1(Fr-4)-4

* Foi realizada reação de metilação em pequenas alíquotas das amostras para análise via CG/EM

Condição 3:

- Coluna em sílica gel (70-230 mesh), $\phi = 3,0$ cm e $h = 22,0$ cm
- Gradiente de Eluição: Hexano100%, Hex/AcOEt (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), MeOH 100%.

Condição 4:

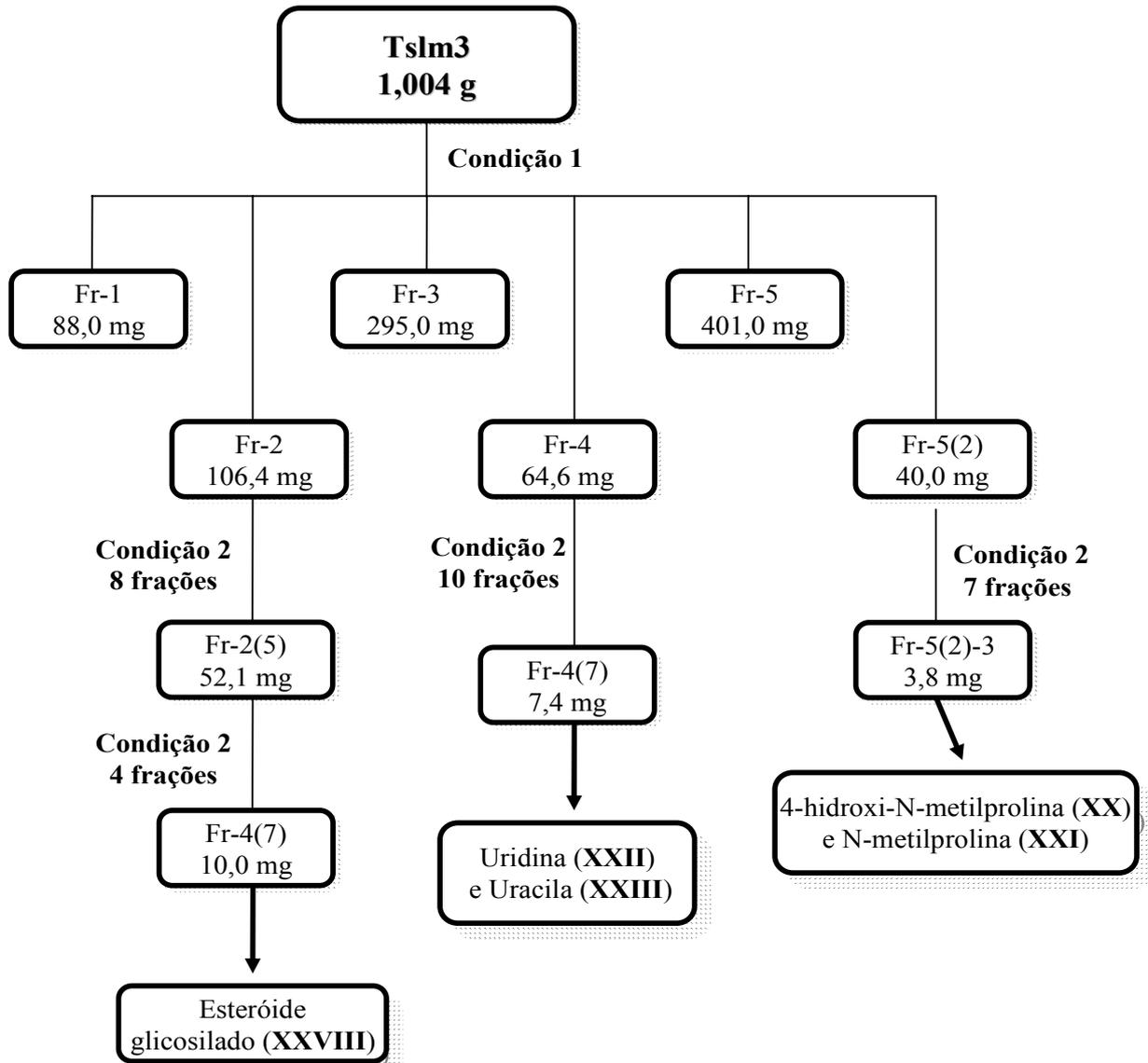
- Coluna em sílica gel (70-230 mesh), $\phi = 2,2$ cm e $h = 15,0$ cm
- Gradiente de Eluição: Hexano100%, Hex/AcOEt (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), MeOH 100%.

Código: T = *Trichilia*; s = sementes; l = *clausenii*; m = metanólico

Das frações Tslm1(Fr3) e Tslm1(Fr4)-4 foram isolados os ácidos ω -fenil alcanóicos e alcenóicos (I-VIII) e também o conjunto de γ -lactonas (IX-XIX).

4.5.1.2 – Fracionamento da fração Tslm3

O fracionamento do subextrato Tslm3 (FLUXOGRAMA 4.5) levou ao isolamento da N-metilprolina (XX), 4-hidroxi-N-metilprolina (XXI), uridina (XXII), uracila (XXIII) e do esteróide glicosilado (XXVIII).



FLUXOGRAMA 4.5: Fracionamento da fração Tslm3

Condição 1:

- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 3,5$ cm e $h = 76,0$ cm
- Eluente: MeOH, MeOH/H₂O (1:1) (modo gradiente)

Condição 2:

- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 2,0$ cm e $h = 56,0$ cm
- Eluente: MeOH

Condição 3:

- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 2,0$ cm e $h = 56,0$ cm
- Eluente: MeOH/H₂O (1:1)

Código: T = *Trichilia*; s = sementes; l = *clausenii*; m = metanólico

4.5.2 – Fracionamento do extrato Tflcm

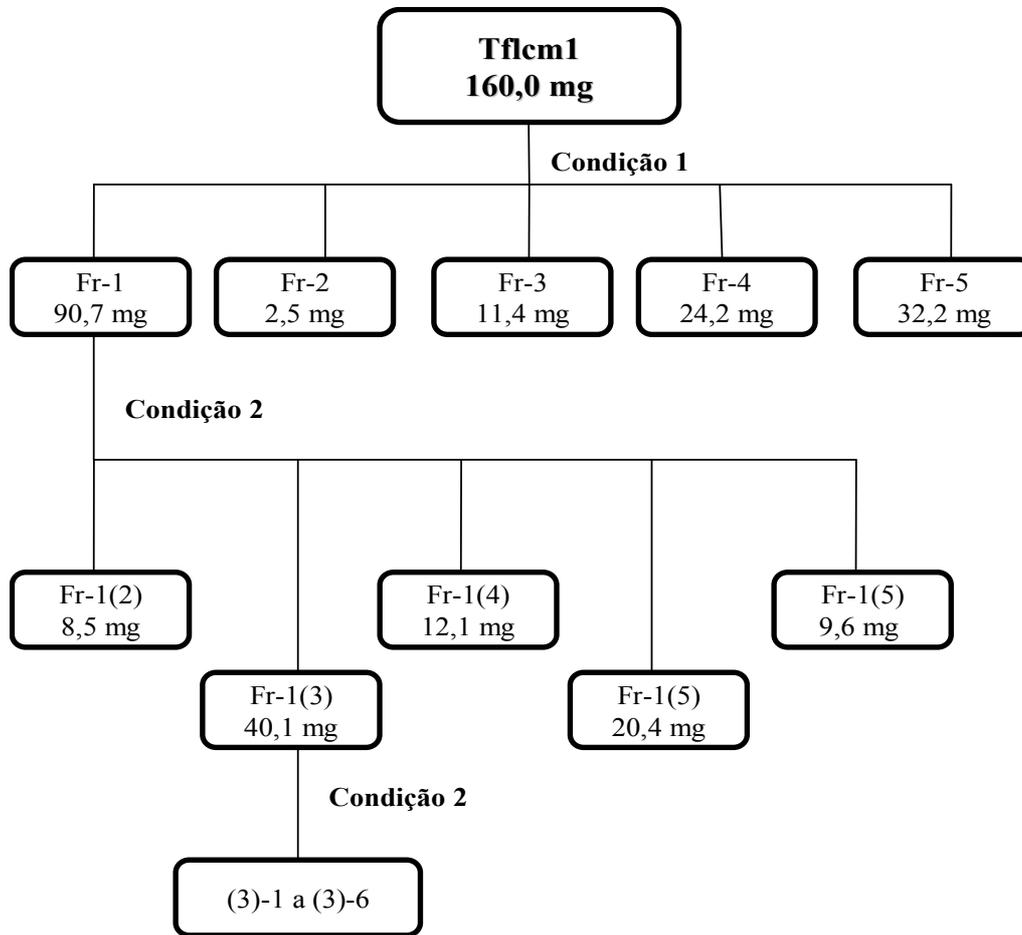
O extrato metanólico das inflorescências de *T. catigua* (Tflcm) foi fracionado através da partição líquido-líquido de acordo com procedimento descrito no FLUXOGRAMA 4.2. Foram obtidas 4 frações após evaporação dos solventes: hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH/H₂O, conforme descrito na TABELA 4.4.

TABELA 4.4: Frações provenientes do fracionamento do extrato Tflcm

Extrato Metanólico	Fração	Solvente	Massa (g)
Tflcm (4,100g)	Tflcm1	Hexano	0,160
	Tflcm2	CH ₂ Cl ₂	0,091
	Tflcm3	AcOEt	0,833
	Tflcm4	MeOH/H ₂ O	2,877

As 4 frações oriundas do extrato Tflcm foram ensaiadas sobre *S. frugiperda* (item 3.1.2.3, p. 40). As frações ativas foram submetidas a sucessivos refrações.

4.5.2.1 – Fracionamento das frações Tflcm1 e Tflcm2

**FLUXOGRAMA 4.6:** Fracionamento da fração Tflcm1

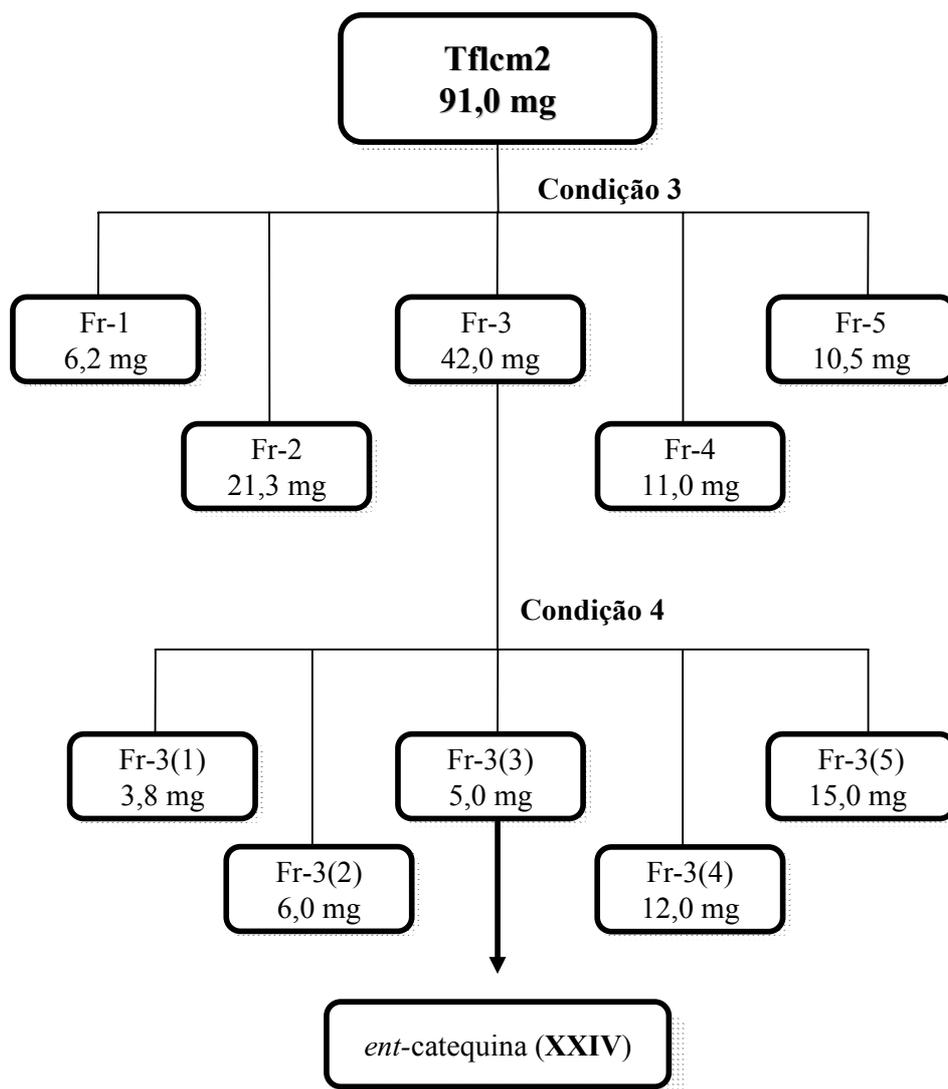
Condição 1:

- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 2,5$ cm e $h = 40,0$ cm
- Eluente: MeOH/CH₂Cl₂ (1:1)

Condição 2:

- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 2,0$ cm e $h = 32,0$ cm
- Eluente: MeOH/CH₂Cl₂ (1:1)

Código: T = *Trichilia*; fl = inflorescências; c = *catigua*; m = metanólico



FLUXOGRAMA 4.7: Fracionamento da fração Tflcm2

Condição 3:

- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 2,0$ cm e $h = 56,0$ cm
- Eluente: MeOH

Condição 4:

- CLAE Polimérica – Asahipak GS-310 2G ($h \times \phi = 50,0 \times 2,15$ cm)
- Eluente: MeOH
- vazão: 3,0 mL/min.; $\lambda = 217$ e 254 nm.

Código: T = *Trichilia*; fl = inflorescências; c = *catigua*; m = metanólico

4.5.3 – Fracionamento dos extratos Tcsem e Tsem

Os extratos metanólicos das sementes e cascas das sementes de *T. elegans* (TABELA 4.1, p. 126), foram fracionados através da partição líquido-líquido, de acordo com o procedimento descrito no FLUXOGRAMA 4.2. As frações obtidas após evaporação dos solventes estão descritas nas TABELAS 4.5 e 4.6.

TABELA 4.5: Frações provenientes do fracionamento do extrato Tcsem

Extrato Metanólico	Fração	Solvente	Massa (g)
Tcsem (2,270 g)	Tcsem1	Hexano	0,182
	Tcsem2	AcOEt	0,643
	Tcsem3	MeOH/H ₂ O	1,175

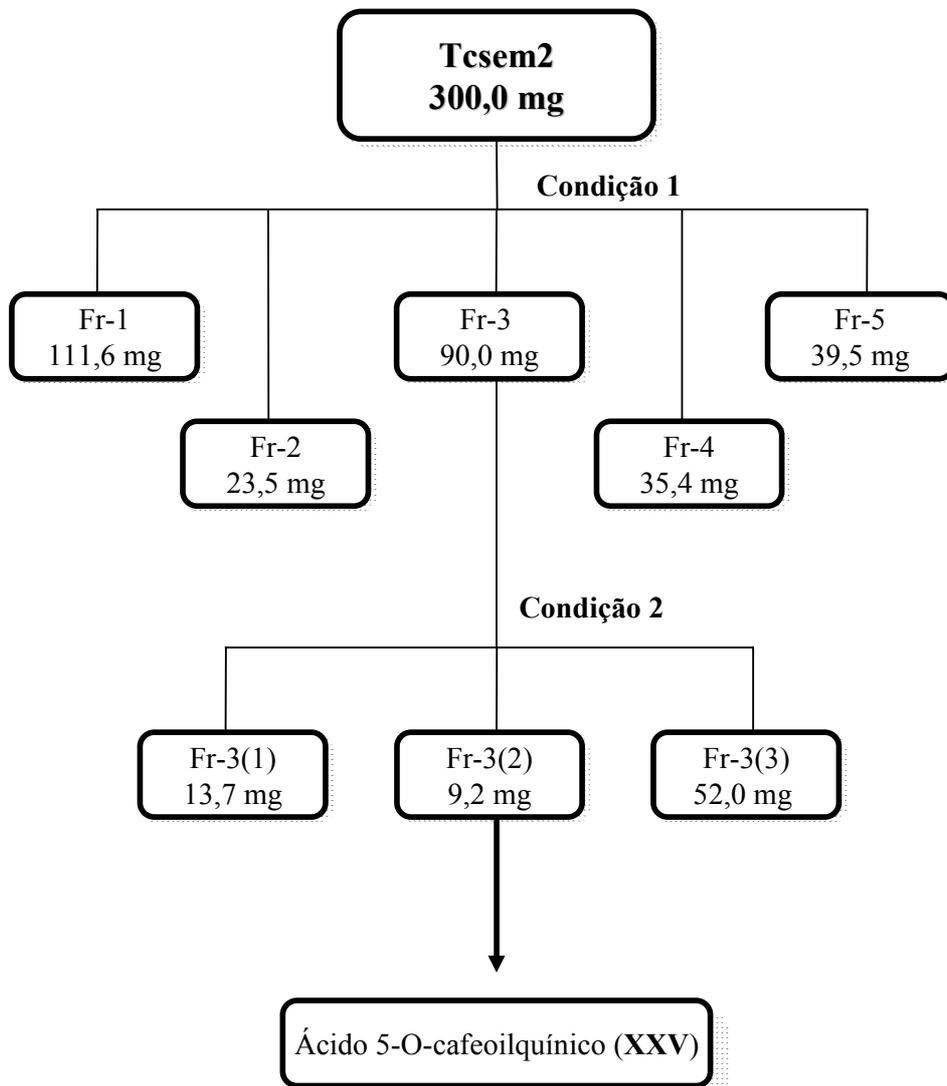
TABELA 4.6: Frações provenientes do fracionamento do extrato Tsem

Extrato Metanólico	Fração	Solvente	Massa (g)
Tsem (9,341 g)	Tsem1	Hexano	0,687
	Tsem2	CH ₂ Cl ₂	0,499
	Tsem3	AcOEt	1,307
	Tsem4	MeOH/H ₂ O	6,847

Após a análise dos espectros de RMN ^1H das frações provenientes do fracionamento dos extratos Tsem e Tcsem, decidiu-se pelo isolamento das substâncias presentes nestes extratos.

Da fração Tcsem2, foi isolado o ácido 5-*O*-cafeoilquinico (**XXV**) (FLUXOGRAMA 4.8). Já a fração Tsem2, após sucessivos refrações (FLUXOGRAMA 4.9) foram isolados os limonóides **XXVI** e **XXVII**.

4.5.3.1 – Fracionamento da fração Tcsem2

**FLUXOGRAMA 4.8:** Fracionamento da fração Tcsem2

Condição 1:

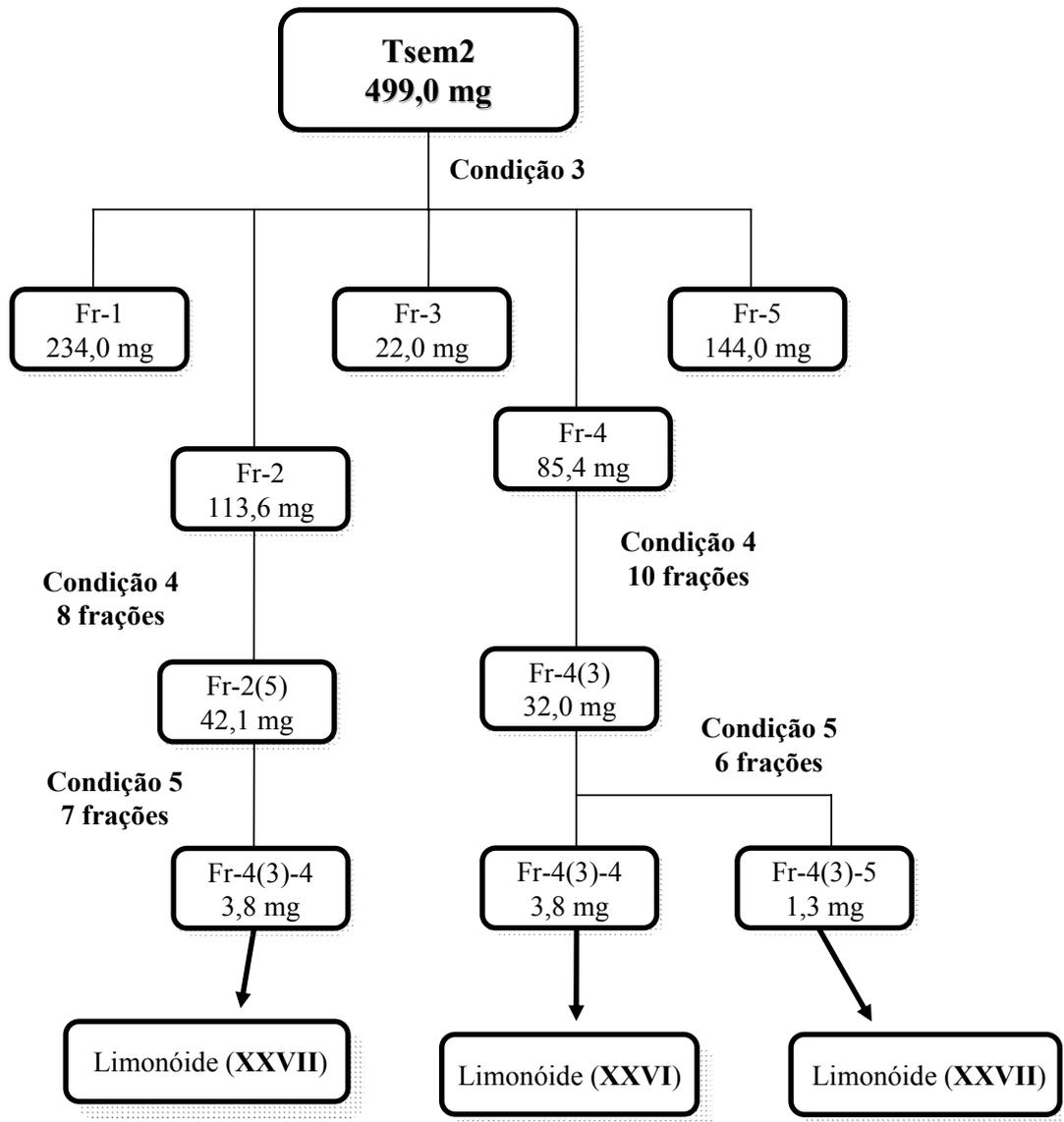
- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 2,5$ cm e $h = 76,0$ cm
- Eluente: MeOH

Condição 2:

- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 2,0$ cm e $h = 56,0$ cm
- Eluente: MeOH

Código: T = *Trichilia*; cs = cascas das sementes; e = *elegans*; m = metanólico

4.5.3.2 – Fracionamento da fração Tsem2

**FLUXOGRAMA 4.9:** Fracionamento da fração Tsem2

Condição 3:

- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 2,5$ cm e $h = 76,0$ cm- Eluente: MeOH/CH₂Cl₂ (1:1)

Condição 4:

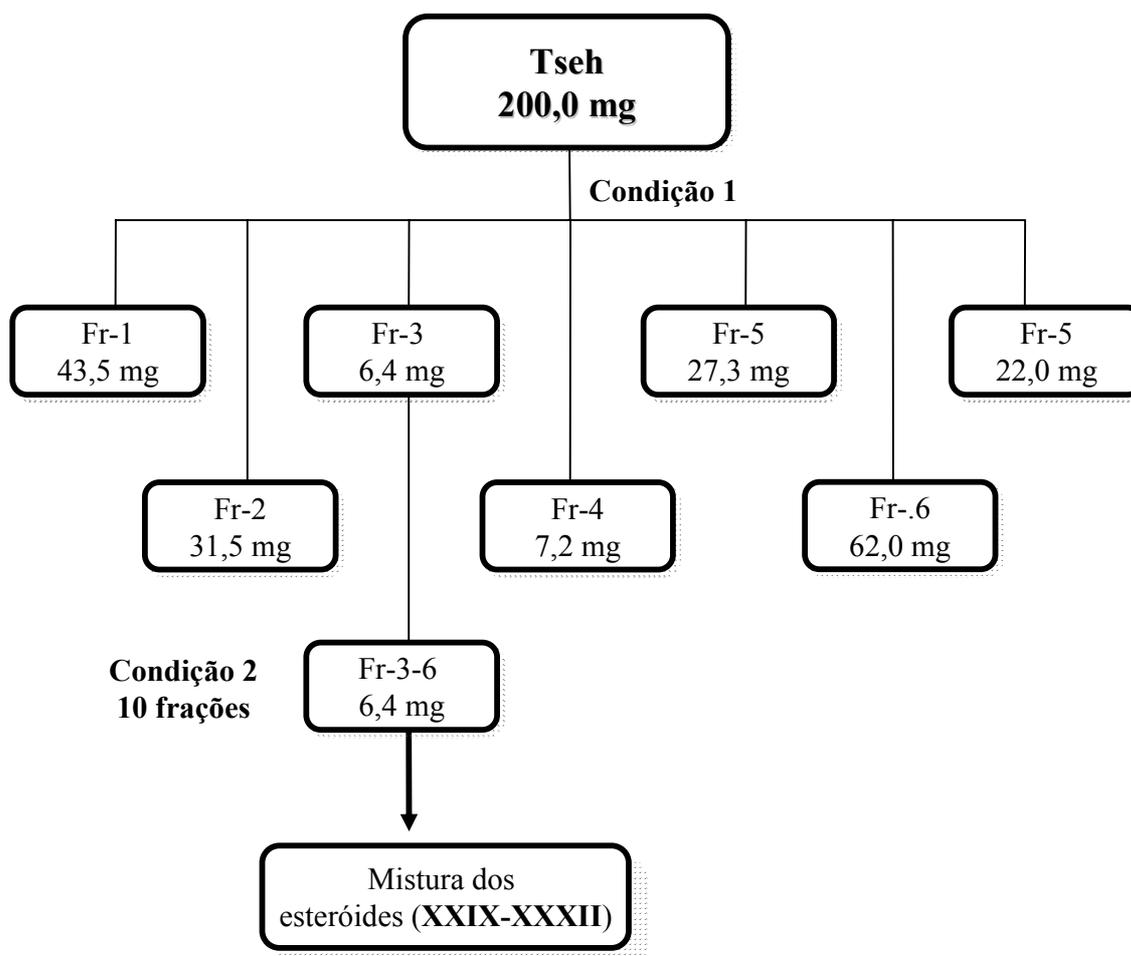
- Coluna Sephadex LH-20, $\phi = 2,0$ cm e $h = 56,0$ cm- Eluente: MeOH/CH₂Cl₂ (1:1)

Condição 5:

- CLAE Polimérica – Asahipak GS-310 2G ($h \times \phi = 50,0 \times 2,15$ cm)- Eluente: MeOH/CH₂Cl₂ (7:3)- vazão: 3,0 mL/min.; $\lambda = 217$ e 254 nm.Código: T = *Trichilia*; s = sementes; e = *elegans*; m = metanólico

4.5.3.3 – Fracionamento do extrato Tseh

O extrato Tseh foi fracionado, e levou ao isolamento dos esteróides (XXIX a XXXII)



FLUXOGRAMA 4.10: Fracionamento do extrato Tseh

Condição 1:

- Coluna em sílica gel (70-230 mesh), $\phi = 2,0$ cm e $h = 30,0$ cm
- Gradiente de Eluição: Hexano100%, Hex/AcOEt (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), MeOH 100%.

Condição 2:

- Coluna em sílica gel (70-230 mesh), $\phi = 1,5$ cm e $h = 22,0$ cm
- Gradiente de Eluição: Hexano100%, Hex/AcOEt (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), MeOH 100%.

Código: T = *Trichilia*; s = sementes; e = *elegans*; h = hexânico

4.6 – Reação de esterificação com diazometano

Para realização da reação de esterificação, adicionou-se uma solução de diazometano em éter etílico às amostras até não ser mais observada a liberação de gás de N₂.

A solução de diazometano foi preparada dissolvendo-se 1,0 g de *p*-toluilsulfonilmetilnitrosamida (diazald) em 15,0 mL de éter etílico. A solução (em balão de destilação) foi posteriormente resfriada em banho de gelo, onde foram adicionados 1,0 g de hidróxido de potássio em 10,0 mL de etanol. Após 5 minutos a solução etérea de diazometano foi destilada em banho de óleo a 65°C, o destilado foi coletado sobre éter etílico em banho de gelo.

4.7 – Ensaio biológico

4.7.1 - Ensaios de toxicidade realizados sobre *Spodoptera frugiperda*

Os ensaios biológicos realizados sobre *S. frugiperda* foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12h. Para realização dos testes, criação de *S. frugiperda* (J. E. Smith) foi mantida em laboratório sendo as lagartas alimentadas com dieta artificial (KASTEN *et al.*, 1978; PARRA, 1986) e os adultos com solução de mel a 10%.

Os ensaios de toxicidade realizados neste trabalho, basearam-se na metodologia descrita por PAULA *et al.* (2000). Para realização dos bioensaios, foram preparadas soluções das amostras em acetona e/ou água.

Foram utilizados grupos de 10 larvas de *Spodoptera frugiperda* no segundo instar (5 dias), onde cada grupo foi transferido para placas de Petri. As médias dos pesos dos grupos de insetos foram obtidas pelas medidas realizadas em balança analítica. Em cada inseto $1\mu\text{L}$ da solução em acetona ou água, foi aplicado topicamente, via uma micro-seringa. Para evitar a possível morte do inseto, em cada grupo de larvas foram colocadas pequenas porções (300,0mg) da dieta artificial. Este processo foi realizado uma hora após a aplicação da solução. O controle foi realizado sobre as mesmas condições; $1\mu\text{L}$ de acetona ou água, foi aplicado em cada inseto.

A mortalidade dos insetos foi verificada após 48horas. Todos os experimentos e o respectivo controle foram realizados em replicatas.

Na primeira etapa do trabalho, foram realizados ensaios de toxicidade para verificar quais extratos apresentavam atividade inseticida. Os ensaios com os extratos hexânicos, metanólicos e hidrometanólicos de *Trichilia ssp.*, foram realizados primeiramente na concentração de 1mg/mL e posteriormente na

concentração de 10mg/mL, já as frações obtidas das análises cromatográficas foram todas realizadas na concentração de 10mg/mL.

PARTE 5
CONCLUSÕES

5 – CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das espécies *T. catigua*, *T. elegans* e *T. clausseii* proporcionou o isolamento e identificação do conjunto dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos, γ -lactonas, 4-hidróxi-N-metilprolina, N-metilprolina, uridina, uracila, *ent*-catequina, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, limonóides 11 β -acetoxiobacunona, 1,2-diidro-1 α -acetoxi-11 β -acetoxi-14,15-epoxicneorina R e os esteróides 3- β -*O*- β -D-glucopiranosil, sitosterol, β -sitosterol, campesterol, estigmasterol e sitostenona.

Os limonóides 11 β -acetoxiobacunona, 1,2-diidro-1 α -acetoxi-11 β -acetoxi-14,15-epoxicneorina R isolados de *T. elegans* estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Trichilia*. Já as γ -lactonas IX e X estão sendo relatadas pela primeira vez na espécie *T. clausseii*.

A partir dos ensaios biológicos realizados com os extratos orgânicos dos frutos, sementes e inflorescências das espécies *T. catigua*, *T. elegans* e *T. clausseii* na concentração 10 mg/mL, foram observados que os extratos metanólicos da semente de *T. clausseii* e inflorescências de *T. catigua* apresentaram as maiores porcentagem de mortalidade sobre *S. frugiperda*. O biomonitoramento do fracionamento do extrato metanólico das sementes de *T. clausseii* juntamente com a identificação estrutural das substâncias isoladas mostraram que o conjunto dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos foram às substâncias ativas no ensaio de toxicidade sobre *S. frugiperda*. Essas substâncias apresentam-se como uma nova classe química inseticida, visto que era esperado que os limonóides estivessem relacionados à atividade inseticida encontrada para espécies da família Meliaceae.

Os ensaios de toxicidade realizados com ácidos graxos (C5-C16) na concentração de 1,0 mg/mL não apresentaram altas taxas de mortalidade, entretanto na concentração de 10,0 mg/mL observou-se que os ácidos

hexanóico, nonanóico e decanóico apresentaram resultados interessantes (90,0, 96,67 e 96,67 %, respectivamente).

A atividade do extrato metanólico das inflorescências de *T. catigua* sobre *S. frugiperda*, provavelmente está relacionada à presença do flavonóide *ent*-catequina, que através de ensaios de ingestão nas concentrações de 1, 10 e 50 mg/kg apresentaram mortalidade larval de 50,00, 53,33 e 66,67 %, respectivamente (LEITE, 2005).

O estudo fitoquímico biomonitorado por ensaio biológico realizado neste trabalho contribuiu para a descoberta da atividade biológica de algumas substâncias, mostrando ser uma ferramenta muito importante para a descoberta de compostos ativos.

Espera-se que os ensaios biológicos aqui reportados estimulem o estudo do conjunto dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenóicos identificados, a fim de conseguir uma substância, que sendo ativa possa servir de protótipo para o desenvolvimento de novos inseticidas sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*.

PARTE 6
REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIDA, G. A. & OKORIE, D. A. “Heudebolin: a new limonoid from *Trichilia heudelotti*”. *Phytochemistry*, **12**: 3007, 1973.

ARENAS C. & RODRÍGUEZ-HAHN, L. “Limonoids from *Trichilia havanensis*”. *Phytochemistry*, **29**: 2953, 1990.

BANERJI, B. & NIGAM, S. K. “Wood constituents of Meliaceae: a review”. *Fitoterapia*, **55**: 3, 1984.

BATISTA-PEREIRA, L. G.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. & MALASPINA, O. “Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*”. *Pest. Manag. Sci.*, **58**: 503, 2002.

BOGORNI P. C. & VENDRAMIM, J. D. “Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* ssp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidade) em milho”. *Neotrop. Entomol.*, **32**: 665, 2003.

BOGORNI P. C. & VENDRAMIM, J. D. “Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* ssp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidade) em milho”. *Neotrop. Entomol.*, **34**: 311, 2005.

BRAY D. H.; WARHURST, D. C.; CONNOLY, J. D.; O’NEILL, M, J. & PHILLIPSON, J. D. “Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of MELIACEAE plants and their constituent limonoids”. *Phytother. Res.*, **4**: 29, 1990.

BUTTERWORTH J. H. & MORGAN E. D. “Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts”. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **23**, 1968.

CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. & TOWERS, G. H. N. “Biological activity of limonoids from the Rutales”. *Phytochemistry*, **31**: 377, 1992.

CHAN W. R.; GIBBS, J. A. & TAYLOR, D. R. “Triterpenoids from *Trichilia havanensis* Jacq. Part I. The acetates of havanensin and trichilenone, new tetracarbocyclic tetranortriterpenes”. *J. Chem. Soc. Perkin*, **1**: 1047, 1973.

CHAURET, D. C.; DURST, T.; ARNASON, J.T.; SANCHEZ-VINDAS, P.; ROMAN, L.S.; POVEDA, L & KEIFER, P.A.; “Novel steroids from *Trichilia*

hirta as identified by nanoprobe INADEQUATE 2D-NMR spectroscopy”. *Tetrahedron Lett.*, **37**: 7875, 1996.

CONNOLLY J. D.; LABBÉ, C.; RYCROFT, D.; OKORIE, D. A.; & TAYLOR, D. A. H. “Tetranortriterpenoids and related compounds. Part 23. Complex tetranortriterpenoids from *Trichilia prieuriana* and *Guarea thompsonii* (Meliaceae), and the hydrolysis products of dregeanin, prieurianin and related compounds”. *J. Chem. Res. (S)* 256, 1979.

CONNOLLY, J. D. “Chemistry of the limonoids of the Meliaceae and Cneoraceae”. IN: *Chemical and Chemical Taxonomy of the Rutales*. WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. (Eds.). Londres, Academic Press, 1983. p. 175-213.

CORTEZ, D. A. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. & FERREIRA, A. G. “Limonoids from *Trichilia hirta*”. *Phytochemistry*, **31**: 625, 1992.

CORTEZ, D. A. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M. F. G. F. & FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B. & PIRANI, J. R., “Meliacin butenolides from *Trichilia stipulata*”. *Phytochemistry*, **49**: 2493, 1998.

CORTEZ, D. A. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. & FERREIRA, A. G. “Limonoids from *Trichilia estipulata*”. *Phytochemistry*, **55**: 711, 2000.

COSTA, J.M. da; SANTOS, Z.F.A.F.; CORREIA, J.S. “Pragas da cultura do milho e meios de controle”. (EPABA Circular Técnica, 8). Salvador: EBAPA . 19, 1984.

CRUZ, I. “A lagarta-do-cartucho na cultura do milho”. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS. 1995. 45p. (EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, 21) 1995.

GALLO, M. B. C.; CUNHA, U. S.; DIOGO, F. A.; SILVA, F. C.; VIEIRA, P. C.; VENDRAMIM, J. D.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. & ROCHA, W. C. “Bioactivities of extracts and compounds from *Vitex polygama* Cham. and *Siphoneugena densiflora* Berg against *Spodoptera frugiperda* (Lepoptera: Noctuidae)” *Pest Manag. Sci.*, **62**: 1072, 2006.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; RODRIGUES, E. D.; POTT, V. J. & ROQUE, N. F. “Seco-protolimonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*”. *Phytochemistry*, **42**: 1399, 1996.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; TSUTSUMI, M. T. & ROQUE, N. F. "Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*". *Phytochemistry*, **45**: 141, 1997a.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; RAMOS, I. & CAMARGO, M. J. "Sesquiterpenes from *Trichilia catigua*". *Fitoterapia*, **LXVIII**: 87, 1997b.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; ROQUE, N. F.; CASTELLANO, E. E. & ZUCKERMAN-SCHPECTOR, J. "7 β -Oxygenated limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*". *Phytochemistry*, **55**: 733, 2000.

INADA, A.; KONISHI, M.; MURATA, H. & NAKANISHI, T. "Structures of a new limonoid and a new triterpenoid derivative from pericarps of *Trichilia connaroides*". *J. Nat. Prod.*, **57**: 1446, 1994.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J. & COLE, J. R. "Constituents of *Trichilia hispida* (Meliaceae). 2. A new triterpenoid, hispidone and bourjotinolone A". *J. Org. Chem.* **45**: 3132, 1980.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. R.; M.S. TEMPESTA & BATES, R. B. "Constituents of *Trichilia hispida* (Meliaceae). 3. Structures of the cytotoxic limonoids: hispidins A, B and C". *J. Org. Chem.*, **46**: 641, 1981a.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H. & COLE, J. R. "Constituents of *Trichilia hispida* (Meliaceae). 4. Hispidols A and B, two new tirucallane triterpenoids". *J. Org. Chem.*, **46**: 4085, 1981b.

KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M. & PARRA, J. R. P. "Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural". *Rev. Agric.*, **53**: 68, 1978.

KETWARU, P.; KLASS, J. & TINTO, W. F. "Pregnane steroids from *Trichilia schomburgkii*". *J. Nat. Prod.*, **56**: 430, 1993.

KIPASSA, N. T.; IWAGAWA, T.; OKAMURA, H.; DOE, M.; MORIMOTO, Y. & NAKATANI, M. "Limonoids from the stem bark of *Cedrela odorata*". *Phytochemistry*, **69**: 1782, 2008.

LEE, S. M.; KLOCKE, J. A.; BARNABI, M. A.; YAMASAKI, R. B. & BALANDRIN, M. F. "Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae)". IN: *Naturally Occurring Pest Bioregulators*, ACS Symposium Series 449. HEDIN, P. H. (Eds.) Washington, ACS, 1991. p.293.

LEITE, A. C. *Estudo Químico e Atividades Biológicas de Cedrela fissilis e Cipadessa fruticosa (Meliaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2005. Tese de Doutorado. 323p.

LORENZI, H. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova odessa: Plantarum, 1992, p.244.

MANSSON, P. E.; SCHLYTER, F.; ERIKSSON, C. & SJÖDIN, K. “Nonanoic acid, other alkanolic acids, and related compounds as antifeedants in *Hylobius abietis* pine weevils”. *Entomol. Exp. Appl.*, **121**: 191, 2006.

MARTINEZ, S.S. (Ed.) “O Nim *Azadirachta indica*: Natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, Instituto Agrônômico do Paraná, 142p.

MATOS, A. P., *Busca de compostos inseticidas: Estudo de espécies do gênero Trichilia (Meliaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2006. Tese de Doutorado. 174p.

MATOS, A. P.; NEBO, L.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F & RODRIGUEZ, R. R. “Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia* spp. sobre a lagarta do cartucho-domilho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em dieta artificial”. *Bioassay*, 1:X;1-6, 2006.

MERFORT, I. “Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*”. *Phytochemistry*, **31**: 211, 1992.

MIKOLAJCZAK, K.L. & REED, D.K. “Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach”. *J. Chem. Ecol.*, **13**: 99, 1987.

MIKOLAJCZAK, K. L.; ZILKOWSKI, B. W. & BARTELT, R. J. “Effects of meliaceous seed extracts on growth and survival of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)”. *J. Chem. Ecol.*, **15**: 121, 1989.

MULHOLAND, D. A. & TAYLOR, D. H. “Limonoids from the seed of the natal mahogany, *Trichilia dregeana*”. *Phytochemistry*, **19**: 2421, 1980.

MUSZA, L. L.; KILLAR, L. M.; SPEIGHT, P.; BARROW C. J.; GILLUM A. M. & COOPER R. “Minor limonoids from *Trichilia rubra*”. *Phytochemistry*, **39**: 621, 1995.

NAHRTEDT, A.; PROKSCH, P. & CONN, E. E. “Dhurrin, (-)-catequin, flavonol glycosides and flavones from *Chamaebatia foliolosa*”. *Phytochemistry*, **26**: 1546, 1987.

OLUGBADE, T. A. & ADESANYA, S. A. “Priurianoside, a protolimonoid glucoside from the leaves of *Trichilia priuriana*”. *Phytochemistry*, **54**: 867, 2000.

PARRA, J. R. P. “Criação de insetos para estudos com patógenos”, p. 348-373. In S. B. Alves (Eds.) Controle microbiano de insetos. São Paulo, Editora Manole, 1986.

PATEL, P. N. *Estudos de Fatores Bióticos de Controle Natural de População de Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepdoptera: Noctuidae)*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Estadual de Campinas, 1981. Dissertação de Mestrado. 98p.

PAULA, V. F.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A. J.; PILÓ-VELOSO, D.; PICANÇO, M. C. “Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine”. *Pest Manag. Sci.*, **56**: 168-174, 2000.

PENÃFLOR, M. F. G. V.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; JÚNIOR, M. B.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; LEITE, A. C. & DA SILVA, M. F. G. V. “Efeitos tóxicos de ácidos graxos para formigas cortadeiras, em laboratório”. *Arq. Inst. Biol.*, **71**: 151, 2004.

PENNINGTON, T. D. & STYLES, B. D. “A generic monograph of Meliaceae”. *Blumea*, **22** (2), 419, 1975.

PENNINGTON, T. D. “A monograph of neotropical Meliaceae”. *Flora Neotr.*, **28**: 1, 1981.

PEREIRA, A. “*Química e Atividade Inseticida de Trichilia catigua em Relação à Lagarta do Cartucho-do-Milho Spodoptera frugiperda*” Dissertação de Mestrado, UFSCar, 2001. Dissertação de Mestrado. 103p.

PIZZOLATTI, M. G.; VENSON, A. F.; SMÂNIA JR, A.; SMÂNIA, E. F. A. & BRAZ-FILHO, R. “Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity”. *Z. Naturforsch.*, **57c**: 483, 2002.

PIZZOLATTI, M. G.; VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C. “Minor γ -lactones from *Trichilia catigua* (Meliaceae) and its precursors by GC-MS”. *Nat. Prod. Res.*, **18**: 433, 2004.

POTT, A. & POTT, V. J. Plantas do Pantanal. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994, p. 204.

PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. & DA SILVA, M. F. G. F. “A cycloartane triterpenoid and ω -phenyl alkanolic and alkenoic acids from *Trichilia clausenii*”. *Phytochemistry*, **42**: 795, 1996.

PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. & DA SILVA, M. F. G. F. & RODRIGUES FILHO, E. “Androstane e pregnane 2- β ,19-hemiketal steroids from *Trichilia clausenii*”. *Phytochemistry*, **45**: 1495, 1997a.

PUPO, M. T. *Constituintes Químicos de Trichilia clausenii (Meliaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 1997b. Tese de Doutorado. 315 p.

PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. & DA SILVA, M. F. G. F. “Gamma-lactones from *Trichilia clausenii*”. *Phytochemistry*, **48**: 307, 1998.

PUPO, M.T.; ADORNO, M. A. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M.F.G.F. “Terpenoids and steroids from *Trichilia* Species”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**: 382, 2002.

RAMÍREZ, M. C.; TOSCANO; R. A.; ARNASON, J.; OMAR, S.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C. M. & MATA, R. “Structure, conformation and absolute configuration of new antifeedant dolabellanes from *Trichilia trifolia*”. *Tetrahedron*, **56**: 5085, 2000.

REMBOLD, H. “Azadirachtins”. IN: *Insecticides of Plant Origin, ACS Symposium Series 387*. ARNASON, J. T.; PHILÓGENE, B. & MORAND, P. (Eds.) Washington, ACS, 1989, p.150.

ROCHA, W. C. *Busca de substâncias bioativas em plantas amazônicas: Adiscanthus fusciflorus (Rutaceae), Trichilia pallida e Trichilia rubra (Meliaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2004. Tese de Doutorado. 221 p.

RODRÍGUEZ-HAHN, L.; CÁRDENAS, J. & ARENAS, C. “Trichavensin, a prieurianin derivative from *Trichilia havanensis*”. *Phytochemistry*, **43**: 457, 1996.

RODRÍGUEZ, H. C. & VENDRAMIM, J. D. “Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepdoptera: Noctuidae)”. *Man. Integ. Plagas*, **42**: 14, 1996.

- RODRÍGUEZ, H. C. & VENDRAMIM, J. D. “Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)”. *Rev. Agric.*, **72**: 305, 1997.
- ROEL, A. R. *Efeito de extratos orgânicos de Trichilia pallida Swartz (Meliaceae) na sobrevivência e desenvolvimento de Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae)*. Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Entomologia., ESALQ, 1998. Tese de Doutorado.
- ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D.; FRIGHETTO, R. T. S. & FRIGHETTO, N. “Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho”. *Bragantia*, **59**: 53, 2000.
- SAKAKIBARA, J.; KAIYA, T.; FUKUDA, H. & OHKI, T. “6 β -hydroxyursolic acid and other triterpenoids of *Enkianthus cemuus*”. *Phytochemistry*, **22**: 2553, 1983.
- SILVA, S. C. *Estudo Químico de Microorganismos Associados a Khaya ivorensis (Meliaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2007. Tese de Doutorado. 216 p.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C. & MORRILL, T. C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Editora Guanabara Koogan, S.A.; 5^o Edição, 1994. 387p.
- SUGA, T. & KONDO, S. “Alkanes and triterpenoids of *Quercus glauca*”. *Phytochemistry*, **13**: 522, 1974.
- TAYLOR, D. A. H.; “The chemistry of the limonoids from Meliaceae”. IN: *Progress in the chemistry of organic natural products*. Herz, W.; GRISEBACH, H. & KIRBY, G. W. (Eds.) New York, Springer, 1984. p. 1-102.
- TINTO, W. F.; JAGESSAR, P. K.; KETWARU, P.; REYNOLDS, W. F. & MCLEAN, S. “Constituents of *Trichilia schomburgkii*”. *J. Nat. Prod.*, **54**: 972, 1991.
- TORRECILAS, S. M. & VENDRAMIM, J. D. “Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho”. *Scientia Agricola*, **58**: 27, 2001.

VALENTE, A. M. M. P. *Análises de Componentes Fixos em Produtos de Coffea arabica e dos seus Produtos de Fermentação*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2003. Dissertação de Mestrado. 189p.

VALICENTE, F. H. & CRUZ, I. “Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus”. Sete Lagoas, Embrapa, 23.(EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, 15) 1991.

VANDERHERCHEN, M. B.; ISHERWOOD, M.; THOMPSON, D. M.; LINDERMAN, R. J. & ROE, R. M. “Toxicity of novel aromatic and aliphatic organic acid and ester analogs of trypsin modulating oostatic factor to larvae of the northern house mosquito, *Culex pipiens* complex, and the tobacco hornworm, *Manduca sexta*”. *Pest. Biochem. Physiol.*, **81**: 71, 2005.

VIEIRA, P. C.; YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R.; PAULINO FILHO, H. F.; NAGEM, T. J. & BRAZ FILHO, R. “ γ -Lactones from *Iryanthera* species”. *Phytochemistry*, **22**: 711, 1983.

WANG, X.; FAN, C.; YIN, S.; GRAN, L. & YUE, J. “Structural elucidation of limonoids and steroids from *Trichilia connaroides*”. *Phytochemistry*, **69**: 1319, 2008.

WHEELER, D. A.; ISMAN, M. B.; SANCHEZ-VINDAS, P. E. & ARNASON, J. T. “Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepdoptera: Noctuidae)”. *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**: 347, 2001a.

WHEELER, D. A. & ISMAN, M. B. “Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae *Spodoptera litura*”. *Entomol. Exp. Appl.*, **98**: 9, 2001b.

YALÇIN, F. N.; DÖNMEZ, A. A. & STICHER O. “Phenolic, megastigmane, nucleotide, acetophenon and monoterpene glycosides from *Phlomis samis* and *P. carica*”. *Turk. J. Chem.*, **27**: 703, 2003.

ZHANG, H.; WU, S.; SHEN, Y.; MA, Y.; WU, D.; QI, S. & LUO, X. “A pentanortriterpenoid with a novel carbon skeleton and a new pregnane from *Trichilia connaroides*”. *Can. J. Chem.*, **81**: 253, 2003.