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

Isolamento e caracterização de novos limonoides em *Trichilia pallida* (Meliaceae) guiado por LC-MS/MS: Uma contribuição à quimiossistemática do gênero.

Carlos André Ferreira Moraes*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências, área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

***Bolsista CAPES**

São Carlos – SP
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Carlos André Ferreira Moraes, realizada em 27/06/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez (UFMS)

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva (UFPA)

Prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira (UFGD)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico a Deus, pelo dom da vida e por me guiar em todos os caminhos que me trouxeram até aqui. Dedico também aos meus pais, Maria do Socorro e Antônio Carlos, por todo o apoio e motivação; aos meus irmãos, irmãs, sobrinhos e sobrinhas. Estendo essa dedicação a toda a minha família, com um destaque especial à minha avó, Maria Estela (*in memoriam*).

“No essencial, a unidade; na dúvida, a liberdade; em tudo, a caridade”

Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde e por todas as bênçãos.

À Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pelos ensinamentos, pela orientação e por não medir esforços para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Produtos Naturais – Karoline, Karine, Alicia, Lulliana, Chrys, Artur, Anderson, Sean, Eduarda, Luís, Jéssica, Dorai, Danielle, Felipe, João Oiano, Evandro, Karen, Elayne, Gabriele, Dianne, entre outros – pelo conhecimento compartilhado e pelos momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Leonardo Borges, responsável pela coleta e identificação do material de estudo.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, por ter aceitado os alunos da profa. Fátima durante o período de afastamento.

Ao corpo docente, técnico e administrativo do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Aos órgãos de fomento: CNPq, FAPESP e CAPES.

Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BPC	*Base Peak Chromatogram*
C_6D_6	Benzeno Deuterado
COSY	*Homonuclear Correlation Spectroscopy*
DEPT	*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
ESI	*Electrospray ionization*
eV	Eletrovolt
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Coherence*
LC-HRMS	*Liquid Chromatography-High Resolution Mass spectrometry*
LC-MS	*Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
m/z	Razão entre a massa e a carga de um íon
MS	Espectro de massas
MS/MS	Espectro de fragmentação de um íon
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	*Solid Phase Extraction*
TPR	*Trichilia pallida Raiz*
UHPL-Q-	*Ultra-high Performance Liquid Chromatography-quadrupole*
TOF/MS	*Time-of-flight Mass Spectrometry*
δ	Deslocamento Químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura da limonina. 2
Figura 1.2 - Biossíntese simplificado dos terpenoides. 3
Figura 1.3 – Rota para a formação do IPP e DMAPP pela via do ácido mevalônico. Figura adaptada do livro Medicinal Natural Products: A biosynthetic Appoach. 3rd Edition[22]. 4
Figura 1.4 - Rota para a formação do IPP e DMAPP pela via do 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Figura adaptada do livro Medicinal Natural Products: A biosynthetic Appoach. 3rd Edition[22]. 6
Figura 1.5 - Rota de biossíntese simplificada para a formação do esqualeno. 7
Figura 1.6 – Enzimas responsáveis pela biossíntese do melianol. 10
Figura 1.7 – Enzimas responsáveis pela formação do produto B. 11
Figura 1.8 – Produto acumulado na ausência 7-acetiltransferase. 11
Figura 1.9 – Etapas reacionais e enzimas responsáveis pela biossíntese da azadirona. 13
Figura 1.10 – Ciclo catalítico para dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato. 14
Figura 1.11 – Proposta biossintética para a formação do anel furano. 15
Figura 1.12 - Estrutura representativa da classe azadirona, destacando em azul as modificações que caracteriza a classe azadirona. 16
Figura 1.13 - Estrutura representativa da classe cedrelona, destacando em azul as modificações na estrutura que caracteriza essa classe. 17
Figura 1.14 - Estrutura representativa da classe havanesina, destacando em azul as oxidações na estrutura que caracterizam essa classe. 17
Figura 1.15 - Estrutura representativa da classe trichilina, destacando em azul as modificações na estrutura que caracteriza essa classe. 18
Figura 1.16 - Estrutura representativa da classe vilasinina, destacando em azul as modificações na estrutura que caracteriza essa classe. 18

Figura 1.17 - Estrutura representativa de um limonoide A-seco, destacando em azul as modificações na estrutura que caracteriza essa classe. 19
Figura 1.18 - Estrutura representativa de um limonoide B-seco e D-seco, destacando em azul as modificações nas estruturas que caracterizam a classe.. 19
Figura 1.19 - Estruturas representativas de limonoides A,B-seco, A,D-seco, B,D-seco e A,B,D-seco destacando em azul as modificações nas estruturas que caracterizam a classe. 20
Figura 1.20 - Estrutura representativa da classe azadiractina/meliacarpina. 21
Figura 1.21 - Estrutura representativa da classe salanina. 21
Figura 1.22 - Estrutura representativa da classe nimbolinina. 22
Figura 1.23 - Estrutura representativa da classe nimbina. 22
Figura 1.24 - Estrutura representativa da classe nimbolidina. 23
Figura 1.25 - Estrutura representativa da classe 1,n-linkage. 24
Figura 1.26 - Estrutura representativa da classe mexicanolideo. 24
FigurA 1.27 - Estrutura representativa da classe fragmalina em azul é destacado o triciclo e em vermelho o grupo ortoéster. 25
Figura 1.28 - Estrutura representativa da classe polioxifragmalina destacando em azul o triciclo..... 25
Figura 1.29 - Estrutura representativa da classe trijugina destacando em azul a ligação do carbono C-11 com o C-8. 26
Figura 1.30 - Estrutura representativa da classe cipadesina destacando em azul a ligação C-10/11. 26
Figura 1.31 - Estrutura representativa de outros tipos de limonoides de rearranjo em azul são destacadas as ligações que sofreram um rearranjo. 27
Figura 1.32 - Limonoides isolados dos frutos de T. hirta por Cortez[47]. 29
Figura 1.33 - Limonoides isolados das sementes de T. elegans por Garcez[48]. ... 30
Figura 1.34 - Limonoides isolados das sementes de T. elegans e de T. catiguá por Matos[50]..... 31
Figura 1.35 - Limonoides isolados de T. catiguá por Cazal[52]. 32

Figura 1.36 - Limonoides de rearranjo isolados de folhas e galhos de T. sinensis por Xing[54]. 33
Figura 1.37 - Espirotrichilinas isoladas de T. connaroides por An[55]. 33
Figura 1.38 - Limonoides do tipo fragmalina isolados de T. connaroides por An[56]. 34
Figura 1.39 - Limonoides do tipo mexicanolido isolados de T. sinensis por Cao[57]. 34
Figura 1.40 - Porcentagem de limonoides de anéis intactos, anéis seco e anéis com rearranjo isolados no gênero Trichilia. Gráfico retirado e adaptado das informações da revisão desenvolvida por Passos[58]. 35
Figura 1.41 - Limonoides isolados de T. pallida por Simmonds[61]. 37
Figura 1.42 - Íons diagnósticos descritos para as classes trichilina, nimbina e vilasinina. Imagem retirada do artigo de Cui[72]..... 42
Figura 1.43 – Fragmentos propostos por Cui para os íons fragmentos m/z 119, m/z 147 e m/z 163. O íon m/z 83 não pertence ao furano. 42
Figura 3.1 - Imagem via satélite do município de Porte Ferreira-SP, em destaque (vermelho) o parque estadual de Porto Ferreira, local da coleta do material de estudo. Imagem extraída do Software Google Maps® em 05/01/2025. 46
Figura 3.2 - Fluxograma das extrações 47
Figura 3.3 - Representação da filtração “flash” em sílica gel. É demonstrado cada fracionamento com a respectiva massa (g) obtida para cada fração. 50
Figura 3.4 - Frações e massas obtidas após a cromatografia por adsorção em sílica gel da fração Hex-AcOEt-TPR-AcOEt. 51
Figura 3.5 - Frações e massas obtidas após a cromatografia por adsorção em sílica gel da fração AcOEt-TPR-AcOEt. 52
Figura 3.6 - Fluxograma da extração em fase sólida em cartucho de SPE-C18. 53
Figura 3.7 - Cromatograma em 215 nm da subfração B-F10-SPE03. 54
Figura 3.8 - Cromatograma em 215 nm da subfração B-F10-SPE02. 55
Figura 3.9 - Cromatograma da fração B-F8 em 215 nm. 55

Figura 3.10 - Cromatograma da fração B-F21 em 215 nm. 56
Figura 3.11 - Cromatograma da fração B-F13 em 215 nm. 57
Figura 3.12 - Cromatograma da fração B-F14 em 215 nm. 58
Figura 3.13 - Cromatograma da fração B-F15 em 215 nm. 58
Figura 3.14 - Cromatograma da fração B-F22 em 215 nm. 59
Figura 3.15 - Cromatograma da fração A-F24 em 215 nm. 60
Figura 4.1 - (A) Cromatograma do Pico Base extraído na faixa de m/z 300-1000. (B) Espectro Full MS scan extraído no tempo de retenção 10,1-10,64 minutos. (C) Ampliação do espectro de MS destacando os íons de m/z 627,3160 $(M+H)^+$, 609,3052 $(M+H-H_2O)^+$ e m/z 649,2986 $(M+Na)^+$ 63
Figura 4.2 - (A) Espectro de MS/MS do íon de m/z 627,3160 destacando os íons diagnósticos referentes à limonoides. (B) ampliação da região do espectro de MS/MS do íon m/z 627,3160 para mostrar o íon diagnóstico m/z 95,04. (C) Espectro de MS/MS do íon m/z 649,2986 destacando as perdas de 18,01 Da (H_2O), 60,02 Da (CH_3COOH) e 100,05 ($C_5H_8O_2$) 65
Figura 4.3 - Espectro de MS/MS do íon m/z 623,2817 extraído do AcOEt-TPR-AcOEt. Em vermelho alguns íons diagnósticos de limonoides. 65
Figura 4.4 - Cromatograma do pico base extraído na faixa de m/z 300-1000 da fração B-F10. Em destaque os intervalos de tempo que foram extraídos os espectros de MS 66
Figura 4.5 - (A) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo de 8,35-8,75 min da fração B-F10, a diferença de 600,2927 Da entre os íons de m/z 623,2821 e m/z 1223,5748 indica a dimerização. (B) Espectro de MS/MS do íon m/z 1223,5748. 67
Figura 4.6 - Espectro de MS/MS do íon m/z 623,2821. Destacando em vermelho os íons diagnósticos de limonoides e os valores em Da das fragmentações. 68
Figura 4.7 - (A) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo de 11,53-11,98 min da fração B-F10. (B) ampliação na faixa de m/z 500-700 evidenciando a diferença de 21,98 Da entre os íons m/z 627,3167 e m/z 649,2981. (C) espectro

de MS/MS do íon 649,2981 destacando as perdas de CH_3COOH (60,02 Da) e H_2O (18,01 Da). (D) ampliação da região de m/z 70-200 para observação dos íons diagnósticos utilizados como critérios para a presença de limonoides. 69
Figura 4.8 – (A) Cromatograma do pico base da fração B-F8 extraído na faixa de m/z 300-1000. (B) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo de 9,86-10,81 min da fração B-F8. (C) Ampliação da região de m/z 640-750 para demonstrar as diferenças de 21,98 entre os íons selecionados. 71
Figura 4.9 - (A) espectro de MS/MS do íon de m/z 665,2927. (B) Ampliação do espectro de MS/MS do íon 665,2927 na faixa de m/z 70-250 para averiguar a presença dos íons diagnósticos de limonoides. 72
Figura 4.10 - (A) Espectro de MS/MS do íon m/z 707,3033 destacando as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O). (B) Ampliação do espectro de MS/MS do íon m/z 707,3033 para observar os íons diagnósticos de limonoides. (C) Espectro de MS/MS do íon m/z 685,3209. (D) Ampliação do espectro de MS/MS do íon m/z 685,3209 para averiguar a presença dos íons diagnósticos. 73
Figura 4.11 - (A) Espectro de MS/MS do íon m/z 709,2827. (B) Espectro de MS/MS do íon m/z 687,3008 indicando algumas perdas de CO (27,98 Da), HCOOH (46,00 Da) e H_2O (18,01 Da). (C) ampliação da região de m/z 70-180 do espectro de MS/MS do íon m/z 687,3008 para a observação dos íons diagnósticos de limonoides..... 74
Figura 4.12 - (A) Cromatograma do pico base da fração B-F21 extraído na faixa de m/z 300-1000, em destaque a região que foi extraído o espectro de MS. (B) Ampliação do espectro de MS para destacar os íons de m/z 625,3010; m/z 665,2936; m/z 683,3059 e m/z 723,2990. (C) Espectro de MS/MS do íon m/z 625,3010. (D) Ampliação do espectro de MS/MS do íon m/z 625,3010 para observação dos íons diagnósticos de limonoides. 76
Figura 4.13 – (A) Espectro de MS/MS do íon m/z 665,2936 mostrando as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O). (B) ampliação

do espectro de MS/MS do íon m/z 665,2936 para a observação dos íons diagnósticos de limonoides..... 77
Figura 4.14 - (A) Cromatograma do pico base extraído na faixa de m/z 300-1000, destacando os intervalos de tempo de onde foram extraídos os espectros de MS. (B) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo 7,80-8,36. (C)Espectro de MS/MS do íon m/z 685,2824, destacando as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$), 18,01 Da (H_2O) e 27,99 Da (CO). (D) Ampliação do espectro de MS/MS do íon de m/z 685,2824 para observação dos íons diagnósticos. 78
Figura 4.15 - (A) Ampliação do espectro de MS na faixa de m/z 565-680. (B) Espectro de MS/MS do íon m/z 625,2252 destacando as perdas de H_2O (18,01 Da), CO (43,99 Da) e $C_5H_8O_2$ (100,05 Da). (C) Espectro de MS/MS do íon m/z 585,2328. (D) Ampliação do espectro de MS/MS do íon m/z 585,2328 para demonstrar os íons diagnósticos de limonoides. 80
Figura 4.16 - (A) Cromatograma do pico base da fração B-F14 extraído na faixa de m/z 300-1000, destacando o intervalo de tempo da extração do espectro de MS. (B) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo 8,02-8,41 min da fração B-F14. (C) Espectro de MS/MS do íon m/z 669,2512. (D) Espectro de MS/MS do íon m/z 647,2693 destacando o íon diagnóstico de limonoide. 82
Figura 4.17 - (A) Cromatograma do pico base da fração B-F15 extraído na faixa de m/z 300-1000, em destaque o intervalo de tempo que foi extraído o espectro de MS. (B) Espectro de MS da fração B-F15 extraído no intervalo de tempo de 9,25-9,47 min. (C) Espectro de MS/MS do íon m/z 665,2569 indicando a presença dos íons diagnósticos de limonoides e as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O). 83
Figura 4.18 - (A) Cromatograma do pico base da fração B-F22 extraído na faixa de m/z 300-1000, destacando o intervalo de tempo que foi feita a extração do espectro de MS. (B) Espectro de MS da fração B-F22 extraído no intervalo de tempo de 8,02-8,41 min. (C) Espectro de MS/MS do íon m/z 723,2983 destacando

as perdas de 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O). (D) Espectro de MS/MS do íon m/z 683,3058. (E) Ampliação do espectro de MS/MS do íon m/z 683,3058 destacando os íons diagnósticos de limonoides. 85
Figura 4.19 - (A) Cromatograma do pico base da fração A-F24 extraído na faixa de m/z 300-1000 destacando o intervalo de tempo que foi extraído o espectro de MS. (B) Espectro de MS da fração A-F24 extraído no intervalo de tempo 11,42-11,81 minutos. (C) Espectro de MS/MS do íon 665,2926 indicando as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O). (D) Ampliação do espectro de MS/MS para a observação dos íons diagnósticos de limonoides. ... 86
Figura 4.20 – Estrutura do limonoide 01. 87
Figura 4.21 - Representação do acoplamento do hidrogênio em δ_H 7,03 com os hidrogênios das metilas C-4' e C-5'. 88
Figura 4.22 - Representação da correlação (^3J) observada no mapa de contorno HMBC entre o H-12 (δ_H 6,34) com a carboxila C-1' (δ_C 166,8)..... 88
Figura 4.23 - (A) Linha em azul indica as correlações observadas no COSY, os hidrogênios H-1 (δ_H 4,86) e H-3 (δ_H 4,78) estão indicados na posição equatorial. (B) Representação das correlações observadas no mapa de contorno HMBC entre o hidrogênio H-1 com os carbonos indicados nas setas vermelhas. 89
Figura 4.24 - Representação das correlações observadas no HMBC para diferenciar as posições de cada grupo acetato, essas correlações estão indicadas nas setas vermelhas. 90
Figura 4.25 - Representação das correlações observadas no HMBC com o carbono C-4 nas setas em vermelho. A seta em azul representa a correlação observada no HMBC do carbono C-28 (δ_C 78,3) com o H-6 (δ_H 3,83)..... 91
Figura 4.26 - As linhas em azul indicam as correlações observadas no COSY. Os hidrogênios H-5 (δ_H 2,77) e H-6 (δ_H 3,83) estão indicados na posição axial devido ao valor da constante de acoplamento de 12,5 Hz. O H-7 (δ_H 3,75) está indicado na posição equatorial por apresentar uma constante de 3,0 Hz gerada do acoplamento com o H-6. 91

Figura 4.27 - Linha em azul representa as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observadas no HMBC para o C-8... 92
Figura 4.28 - Em azul é indicado as correlações observadas no COSY. As setas vermelhas em (A) representa as correlações observadas no HMBC para o carbono C-14. As setas vermelhas em (B) representas as correlações observadas no HMBC para o H-17. 93
Figura 4.29 – Estrutura do limonoide 02. 95
Figura 4.30 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 96
Figura 4.31 - Representação das correlações observadas no HMBC para o 3H-19 e 3H-30, $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 98
Figura 4.32 - Estrutura do limonoide 03. 101
Figura 4.33 -Correlação observada no HMBC do hidrogênio da posição H-12 (6,02) com o carbono acila em 168,7. 102
Figura 4.34 - Estrutura do limonoide 04. 104
Figura 4.35 - Estrutura do limonoide 05. 107
Figura 4.36 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 109
Figura 4.37 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 110
Figura 4.38 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 111
Figura 4.39 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 112
Figura 4.40 - Estrutura do limonoide 06. 114

Figura 4.41 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 115
Figura 4.42 - Estrutura do limonoide 07. 118
Figura 4.43 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC H→C. . 119
Figura 4.44 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC H→C..... 120
Figura 4.45 - A seta em vermelho indica a correlação observada no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 121
Figura 4.46 - A linha em azul representa as correlações observadas no COSY. 121
Figura 4.47 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 122
Figura 4.48 - Estrutura do limonoide 08. 125
Figura 4.49 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. A numeração dos carbonos está indicada em azul. 127
Figura 4.50 - As setas em vermelho indicam as interações observadas no ROESY-2D $^{1}H \leftrightarrow ^{1}H$. 129
Figura 4.51 - Estrutura do limonoide 09. 131
Figura 4.52 - Estrutura química do limonoide 10. 135
Figura 4.53 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 136
Figura 4.54 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 137
Figura 4.55 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. 138

Figura 4.56 - Estrutura do limonoide 11. 140
Figura 4.57 – Proposta da formação do carbono espiro. 143
Figura 4.58 – Proposta para a modificação do anel furano. 144
Figura 4.59 - As setas em vermelho indicam as interações observadas no ROESY-2D $^{1}H \leftrightarrow {}^{1}H$. 146
Figura 4.60 - Estrutura do limonoide 12. 148
Figura 4.61 - Estrutura do limonoide 13. 152
Figura 4.62– Primeira proposta de biogênese para o limonoide 01 158
Figura 4.63 – Segunda Proposta de biogênese para o limonoide 01 159
Figura 4.64 - Proposta de biogênese para o limonoide 02 e 03 160
Figura 4.65 - Proposta de biogênese para o limonoide 04 161
Figura 4.66 - Proposta de biogênese para o limonoide **05** 163
Figura 4.67 - Proposta de biogênese para o limonoide 06 e 12 165
Figura 4.68 - Proposta de biogênese para o limonoide 07 166
Figura 4.69 - Propostas de biogêneses para os limonoides 11 e 08 168
Figura 4.70 - Proposta de biogênese para o limonoide 09 169
Figura 4.71 - Proposta de biogênese para o limonoide 10 170
Figura 4.72 - Proposta de biogênese para o limonoide 13 171
Figura 4.73 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 01 172
Figura 4.74 - Proposta de fragmentação para o limonoide 01 174
Figura 4.75 - Proposta de fragmentação para o limonoide 01 175
Figura 4.76 - Proposta de fragmentação para o limonoide 01 176
Figura 4.77 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 02 177
Figura 4.78 - Proposta de fragmentação para o limonoide 02 178
Figura 4.79 - Proposta de fragmentação para o limonoide 02 178
Figura 4.80 - Proposta de fragmentação para o limonoide 02 179

Figura 4.81 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 03 180
Figura 4.82 - Proposta de fragmentação para o limonoide 03 181
Figura 4.83 - Proposta de fragmentação para o limonoide 03 182
Figura 4.84 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 04 183
Figura 4.85 - Proposta de fragmentação para o limonoide 04 184
Figura 4.86 - Proposta de fragmentação para o limonoide 04 184
Figura 4.87 - Proposta de fragmentação para o limonoide 04 185
Figura 4.88 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 05 186
Figura 4.89 - Proposta de fragmentação para o limonoide 05 187
Figura 4.90 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 06 188
Figura 4.91 - Proposta de fragmentação para o limonoide 06 189
Figura 4.92 - Proposta de fragmentação para o limonoide 06 190
Figura 4.93 - Proposta de fragmentação para o limonoide 06 191
Figura 4.94 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 07 192
Figura 4.95 - Proposta de fragmentação para o limonoide 07 193
Figura 4.96 - Proposta de fragmentação para o limonoide 07 194
Figura 4.97 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 08 195
Figura 4.98 - Proposta de fragmentação para o limonoide 08 196
Figura 4.99 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 09 197
Figura 4.100 - Proposta de fragmentação para o limonoide 09 198
Figura 4.101 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 10 199

Figura 4.102 - Proposta de fragmentação para o limonoide 10 200
Figura 4.103 - Proposta de fragmentação para o limonoide 10 201
Figura 4.104 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 11 202
Figura 4.105 - Proposta de fragmentação para o limonoide 11 203
Figura 4.106 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 12 204
Figura 4.107 - Proposta de fragmentação para o limonoide 12 205
Figura 4.108 - Proposta de fragmentação para o limonoide 12 206
Figura 4.109 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 13 207
Figura 4.110 - Proposta de fragmentação para o limonoide 13 208
Figura 4.111 - Proposta de fragmentação para o limonoide 13 208
Figura 4.112 - Proposta de fragmentação para o limonoide 13 209
Figura 4.1 - Ensaio de viabilidade celular em células B16F10 em diferentes concentrações dos limonoides 02, 03 e 04. 234
Figura 4.2 - Expressão genética quando célula B16F10 foi ensaiada na presença dos limonoides 02, 03 e 04 na concentração de 50µM para cada composto. ... 235

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Número de limonoides isolados no gênero Trichilia distribuído por espécies e continentes. Em destaque são as espécies que podem ser encontradas no Brasil 36
Tabela 3.1 - Quantidade de material vegetal utilizado para extração assistida por homogeneização via turrax, quantidade de extrato e rendimento 48
Tabela 4.1 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide 01 e RMN de ^{13}C do limonoide Munrolina A (125 MHz; $CDCl_3$)[73] 94
Tabela 4.2 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **02** e RMN de ^{13}C do limonoide Meliatoosenina S (^{13}C 100 MHz; $CDCl_3$) 100
Tabela 4.3 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **03** e RMN de ^{13}C do limonoide Meliatoosenina S (^{13}C 100 MHz; $CDCl_3$) 103
Tabela 4.4 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **04** e RMN de ^{13}C do limonoide nimbolinina B (^{13}C 75,46 MHz; $CDCl_3$) 106
Tabela 4.5 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **05** e RMN de ^{13}C do limonoide mombasol (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$) 113
Tabela 4.6 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **06** e RMN de ^{13}C do limonoide chisonimbolinin G (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$) 117
Tabela 4.7 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **07** e RMN de ^{13}C do limonoide munrolina F (^{13}C 150 MHz; piridina-d_5) 124

Tabela 4.8 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **08** 130
Tabela 4.9 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **09** e RMN de ^{13}C do limonoide trichilinina (^{13}C 25 MHz; $CDCl_3$) 134
Tabela 4.10 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **10** e RMN de ^{13}C do limonoide azadiractina (^{13}C 100 MHz; $CDCl_3$) 139
Tabela 4.11 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **11** 147
Tabela 4.12 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **12** e RMN de ^{13}C do limonoide munrolina O (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$) 150
Tabela 4.13 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **13** e RMN de ^{13}C do limonoide spirosendan (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$) 156
Tabela 4.1 - Valores de IC_{50} dos fármacos cisplatina e doxorrubicina 234

RESUMO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS LIMONOIDES EM *TRICHILIA PALLIDA* (MELIACEAE) GUIADO POR LC-MS/MS: UMA CONTRIBUIÇÃO À QUIMISSISTEMÁTICA DO GÊNERO. A família Meliaceae é amplamente reconhecida tanto pela qualidade de sua madeira quanto pela biossíntese de tetranortriterpenos (limonoides), metabólitos secundários que apresentam diversas atividades biológicas, incluindo propriedades inseticidas, bactericidas, antifúngicas e anticancerígenas. Diversos gêneros dessa família têm sido estudados devido ao potencial bioativo de seus compostos, destacando-se *Melia* L., *Toona* (Endl.) M. Roem., *Azadirachta* A. Juss. e *Trichilia* P. Browne. Este último gênero tem sido objeto de estudos fitoquímicos que demonstraram a presença das três principais classes de limonoides—anel intacto, anel seco e limonoides rearranjados. No entanto, até o momento, a ocorrência de limonoides rearranjados foi relatada apenas em espécies de *Trichilia* nativas da Ásia. No presente estudo, foi desenvolvida uma metodologia baseada no monitoramento de íons diagnósticos detectados nos espectros de fragmentação (MS/MS), com o objetivo de identificar potenciais limonoides e orientar a seleção de extratos e frações de *Trichilia pallida* para o isolamento desses metabólitos. Todos os extratos e frações foram analisados por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução (HRMS). Os espectros de MS/MS que apresentaram íons diagnósticos foram utilizados para direcionar a coleta de frações por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), monitorando a absorbância a 215 nm (baixa absorção). A metodologia empregada possibilitou o isolamento e a caracterização estrutural, por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional (1D) e bidimensional (2D), de onze limonoides e dois norlimonoides. Dentre os limonoides isolados, seis pertencem ao grupo C-seco, um ao grupo A,B-seco, um apresenta um anel intacto e três sofreram rearranjo

estrutural envolvendo os anéis C e D. Os dois norlimonoides (pentanortriterpenos) exibiram a perda do carbono na posição C-12 e modificações no anel furano, assemelhando-se à classe da azadiractina. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as espécies brasileiras de *Trichilia* apresentam uma ampla diversidade estrutural de limonoides. O isolamento e caracterização de limonoides inéditos para o gênero evidenciam que uma abordagem mais direcionada por LC-MS/MS pode revelar a riqueza estrutural desses metabólitos em espécies de *Trichilia* nativas do Brasil.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NEW LIMONOIDS FROM *TRICHILIA PALLIDA* (MELIACEAE) GUIDED BY LC–MS/MS: A CONTRIBUTION TO THE CHEMOSYSTEMATICS OF THE GENUS. The Meliaceae family is widely recognized both for the quality of its wood and for the biosynthesis of tetranortriterpenes (limonoids), secondary metabolites that exhibit various biological activities, including insecticidal, bactericidal, antifungal, and anticancer properties. Several genera within this family have been studied due to the bioactive potential of their compounds, with particular emphasis on *Melia* L., *Toona* (Endl.) M. Roem., *Azadirachta* A. Juss., and *Trichilia* P. Browne. This last genus has been the subject of phytochemical studies that have demonstrated the presence of the three main classes of limonoids—intact-ring, seco-ring, and rearranged limonoids. However, to date, the occurrence of rearranged limonoids has only been reported in *Trichilia* species native to Asia. In this study, a methodology was developed based on the monitoring of diagnostic ions detected in fragmentation spectra (MS/MS) to identify potential limonoids and guide the selection of extracts and fractions of *Trichilia pallida* for the isolation of these metabolites. All extracts and fractions were analyzed using ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with a high-resolution mass spectrometer (HRMS). The MS/MS spectra that contained diagnostic ions were used to direct the collection of fractions via high-performance liquid chromatography (HPLC), monitoring absorbance at 215 nm. The methodology employed enabled the isolation and structural characterization, through one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, of eleven limonoids and two norlimonoids. Among the isolated limonoids, six belong to the C-seco group, one to the A,B-seco group, one has an intact ring, and three underwent structural

rearrangement involving the C and D rings. The two norlimonoids (pentanortriterpenes) exhibited the loss of the carbon at position C-12 and modifications in the furan ring, resembling the azadirachtin class. The results obtained in this study suggest that Brazilian *Trichilia* species exhibit a wide structural diversity of limonoids. The isolation and characterization of previously unreported limonoids for this genus highlight that a more targeted LC-MS/MS approach can reveal the structural richness of these metabolites in *Trichilia* species native to Brazil.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 FAMÍLIA MELIACEAE 1

1.2 LIMONOIDES: ORIGEM DO NOME E BIOSSÍNTESE 2

1.3 LIMONOIDES DE ANÉIS INTACTOS 16

1.3.1 Classe Azadirona 16

1.3.2 Classe cedrelona 16

1.3.3 Classe havanensina 17

1.3.4 Classe trichilina 17

1.3.5 Classe vilasinina 18

1.4 LIMONOIDES DE ANÉIS SECO 18

1.4.1 Classe Azadiractina/Meliacarpina 21

1.4.2 Classe Salanina 21

1.4.3 Classe Nimbolinina 22

1.4.4 Classe da Nimbina 22

1.4.5 Classe Nimbolidina 23

1.5 LIMONOIDES DE REARRANJO 23

1.5.1 Grupo 1,*n-linkage* 23

1.5.2 Grupo Mexicanolideo 24

1.5.3 Grupo Fragmalina 24

1.5.4 Grupo Polioxifragmalina 25

1.5.5 Grupo trijugina 26

1.5.6 Grupo Cipadesina 26

1.5.7 Outros limonoides com rearranjo 27

1.6 OUTROS DERIVADOS DE LIMONOIDES 27

1.7 O GÊNERO *TRICHILIA* 27

1.8 Limonoides isolados no gênero *Trichilia* no Brasil 29
1.9 Limonoides isolados no gênero *Trichilia* fora do Brasil..... 32
1.10 *Trichilia pallida* 37
1.11 Uso do LC-MS/MS para direcionar o isolamento de produtos naturais..... 38
1.12 Íons diagnósticos da classe dos limonoides..... 40
2 OBJETIVO GERAL 43
2.1 Objetivos específicos..... 43
3 MATERIAIS E MÉTODOS 44
3.1 Materiais 44
3.2 Equipamentos 45
3.3 Coleta da espécie *Trichilia pallida* e preparação dos extratos..... 46
3.3.1 Coleta da espécie *Trichilia pallida*..... 46
3.3.2 Preparo dos extratos 46
3.4 Escolha e Fracionamento do Extrato AcOEt da Raiz da *Trichilia pallida* 49
3.5 Isolamento por CLAE..... 53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
4.1 Análise dos extratos de raiz da *Trichilia pallida* por LC-MS/MS 61
4.2 Análises das frações por LC-MS/MS 66
4.3 Determinação estrutural por ressonância magnética nuclear dos limonoides isolados das raízes de *Trichilia pallida*..... 87
4.3.1 Substância **01** (12-O-tigloil-munrolina A) 87
4.3.2 Substância **02** (12-desmetóxi-12-hidróxi-meliatoosenina S)..... 95
4.3.3 Substância **03** (12-desmetóxi-12-acetóxi-meliatoosenina S) 101
4.3.4 Substância **04** (2-acetóxi-nimbolinina B)..... 104
4.3.5 Substância **05** (Mombasol) 107

4.3.6 Substância **06** (12-oxi-chisonimbolinin G) 114
4.3.7 Substância **07** (Norpallidalina A)..... 118
4.3.8 Substância **08** (Pallidalina) 125
4.3.9 Substância 09 (1-acetóxitrichilinina) 131
4.3.10 Substância **10** (Norpallidalina B)..... 135
4.3.11 Substância **11** (Espiropallidalina A) 140
4.3.12 Substância **12** (Pallidalina C)..... 148
4.3.13 Substância **13** - Spirosendan 151
4.4 PROPOSTA DE BIOGÊNESE PARA OS LIMONOIDES ISOLADOS 158
4.5 PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA OS LIMONOIDES ISOLADOS 172
4.5.1 Limonoide 01 172
4.5.2 Limonoide 02 176
4.5.3 Limonoide 03 179
4.5.4 Limonoide 04 182
4.5.5 Limonoide 05 185
4.5.6 Limonoide 06 187
4.5.7 Norlimonoide 07 191
4.5.8 Limonoide 08 194
4.5.9 Limonoide 09 196
4.5.10 Norlimonoide 10 198
4.5.11 Limonoide 11..... 201
4.5.12 Limonoide 12 203
4.5.13 Limonoide 13 206
5 CONCLUSÃO 210
REFERÊNCIAS 212
CAPÍTULO 2 222
1 INTRODUÇÂO 225
1.1 O CÂNCER – UMA BREVE CONTEXTUALIZAÇÃO 225

1.2 PRODUTOS NATURAIS – FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS 226
1.3 LIMONOIDES FONTE DE ATIVIDADE ANTITUMORAL 227
2 OBJETIVO 227
3 METODOLOGIA 227
3.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (IC_{50}) 228
4 RESULTADOS 232
4.1 LINHAGEM MRC-5: PULMÃO NÃO-TUMORAL 232
4.2 LINHAGEM A549: TUMORAL DE PULMÃO 232
4.3 LINHAGEM A2780: TUMORAL DE OVÁRIO 233
4.4 LINHAGEM B16F10 (MELANOMA AGRESSIVO MURINO) 234
5 CONCLUSÃO 236
REFERÊNCIAS 237
APÊNDICE 240

CAPÍTULO 1

Análise dos extratos e frações das raízes de *Trichilia pallida*, isolamento e caracterização dos limonoides e norlimonoides.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família Meliaceae

Meliaceae é uma família lenhosa que habita as regiões dos trópicos e subtrópicos (Pantropical), pertence a ordem das Sapindales, é composta por mais de 750 espécies e 51 gêneros. [1,2] A análise filogenética do genoma de cloroplastos ratificou a divisão em duas subfamílias: Cedreloideae e Melioideae.[3] No Brasil, são encontrados onze gêneros, seis nativos (*Cabralea* A. juss., *Carapa* Aubl., *Cedrela* P. Browne, *Guarea* F. Allam. ex L., *Swietenia* Jacq., e *Trichilia* P. Browne), os outros foram introduzidos, *Aphanamixis* Blume., *Melia* L., *Toona* (Endl.) M. Roem., *Khaya* A. juss., e *Azadirachta* A. juss.[4]

As árvores pertencentes a essa família possuem alto valor econômico, por apresentar madeira de boa qualidade, exemplificado nos mognos (*Swietenia macrophylla* King.,)[5] e na madeira de canjerana (*Cabralea canjerana*), usada na construção civil e paisagismo.[6]

Na ordem Sapindales, a família Meliaceae se destaca pela síntese de limonoides, os quais possuem atividades inseticidas interessantes[7], dentre as espécies mais estudadas, a *Azadirachta indica* A. juss., conhecida popularmente como nem (ou nim), é a espécie mais predominante nos estudos direcionados aos tetranortriterpenos. Da semente do nem é extraído um óleo com alto teor de limonoides da classe azadiractina utilizado como biopesticida.

Os limonoides são marcadores quimiotaxonômicos das famílias Meliaceae e Rutaceae, sendo mais diversos e abundantes em Meliaceae, já foram descritos mais de 2500 limonoides isolados de espécies pertencentes a Meliaceae. Excelentes revisões disponíveis na literatura mostram a diversidade estrutural de limonoides já identificados[7–11]. Essa grande diversidade estrutural vem acompanhada de uma ampla atividade biológica atribuída a essa classe de metabólito, como: anti-inflamatório, antialérgico, antibacteriano, antifúngico,

anticancerígeno, e principalmente a atividade inseticida.[11,12] Essa importância farmacológica e química direcionou pesquisas para o isolamento dessa classe de metabólitos em diferentes gêneros pertencentes a família Meliaceae, porém, vale ressaltar que os estudos sobre limonoides tiveram origem em estudos com plantas pertencentes a família Rutaceae.

1.2 Limonoides: Origem do nome e biossíntese

O nome limonoide foi proposto após o isolamento da limonina, em 1841, a qual foi isolada a partir das sementes de citrus na investigação de qual ou quais compostos eram responsáveis pelo sabor amargo das frutas cítricas[13,14] (Figura 1.1).

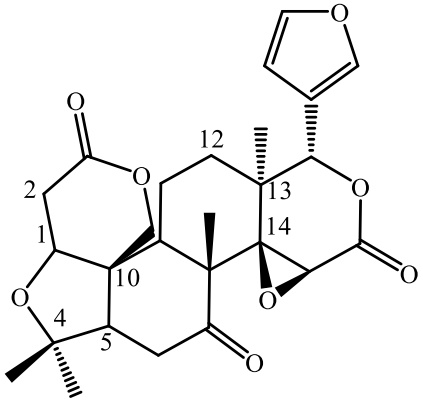


Figura 1.1 - Estrutura da limonina.

O entendimento da biossíntese dos limonoides é iniciada com a compreensão da origem dos isoprenoides ou terpenoides, os quais possuem uma ou mais unidades de isopreno.[15] A unidade precursora para os terpenoides é o difosfato de dimetilalila (DMAPP) e seu isômero difosfato de isopentenila (IPP), que por meio de uma condensação tipo cabeça-cauda originam aos metabólitos classificados como terpenoides, duas unidades C_5 formam o geranil difosfato (GPP), essa unidade C_{10} da origem aos monoterpenos, a condensação de três unidades C_5 forma o farnesil difosfato (FPP), o qual possui quinze carbonos (C_{15})

originando os sesquiterpenos. Duas unidades de FPP dão origem aos triterpenos (C_{30}), e a condensação de quatro unidades C_5 formam o geranilgeranil difosfato (C_{20}), precursor dos diterpenos (Figura 1.2). A condensação de unidades de DMAPP com o IPP podem seguir até a formação dos poliprenóis.

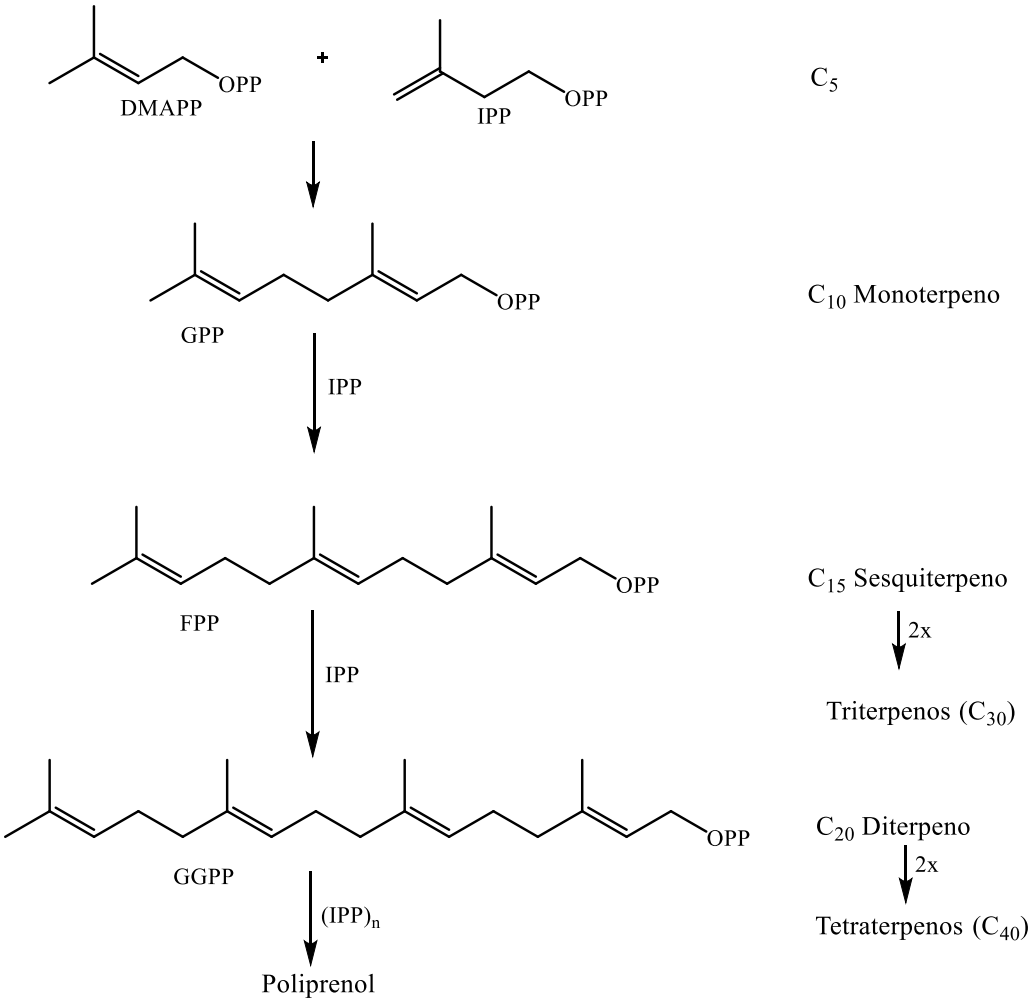


Figura 1.2 - Biossíntese simplificado dos terpenoides.

A formação do IPP e do DMAPP podem ser de duas vias metabólicas, mevalonato (MEV) e a do 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). A via do MEV foi proposta pelos estudos de Feodor Lynen e Konrad Bloch, que rendeu aos pesquisadores o prêmio Nobel de fisiologia no ano de 1964, na biossíntese do colesterol, Bloch e Lynen comprovaram que o ácido 5-difosfomevalônico é descarboxilado para difosfato de isopentenila (IPP) o qual é isomerizado para

DMAPP, a condensação com outras unidades de IPP formam o difosfato de farnesila (FPP), conseguinte, duas unidade de FPP formam o esqualeno.[16,17] A via do mevalonato é iniciada com a formação do acetoacetil-CoA a partir da união (condensação de Claisen) de duas unidades de Acetil-CoA catalisada pela enzima Acetil-CoA acetiltransferase, uma segunda condensação de Claisen ocorre no acetoacetil-CoA gerando o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). A carboxila do tioéster é reduzida para um álcool, a formação do aldeído libera o HSCoA e o ácido mevaldico é formado, o aldeído é reduzido para um álcool e tem-se a formação do ácido mevalônico (MEV). Duas fosforilações ocorrem na molécula do MEV, a primeira na hidroxila da posição C-5, a segunda fosforilação na hidroxila da posição C-3 ativando a estrutura para que ocorra uma descarboxilação no MEV eliminando gás carbônico. Após a eliminação de CO_2 é formado a molécula de IPP que sofre uma isomerização para DMAPP[17–21] (Figura 1.3).

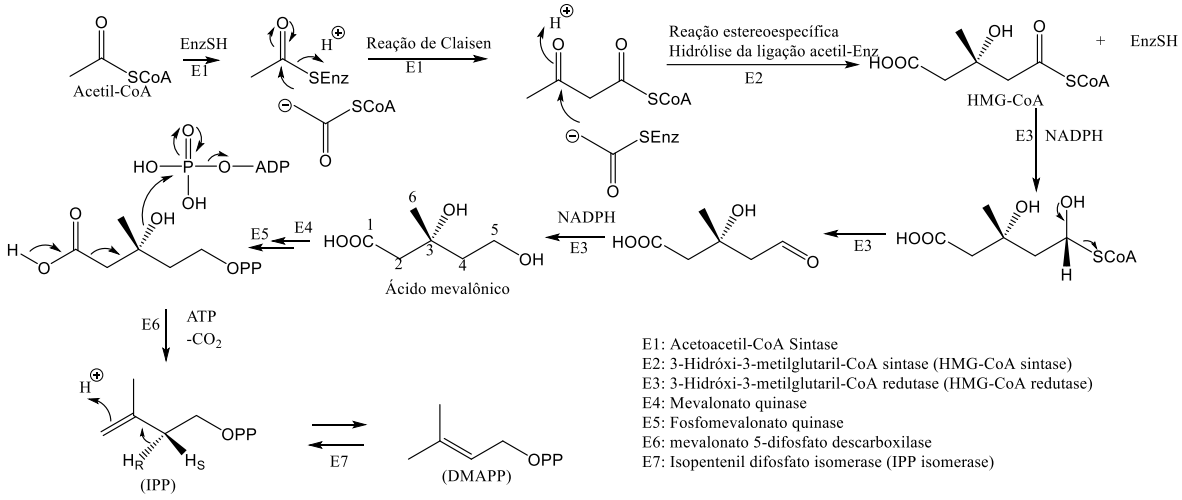


Figura 1.3 – Rota para a formação do IPP e DMAPP pela via do ácido mevalônico. Figura adaptada do livro Medicinal Natural Products: A biosynthetic Appoach. 3rd Edition[22].

Posteriormente, pesquisas mostraram incoerências na marcação isotópica de alguns terpenoides ou intermediários, abrindo a possibilidade de outras vias metabólicas para os terpenoides. Os estudos de Rohmer e Arigoni no

final da década de 80 contribuíram para a descoberta da via do MEP.[21] A via do MEP é iniciada com a condensação do D-gliceraldeído-3-fosfato (GA-3P) com uma unidade de piruvato, formando a molécula 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), essa reação ocorre com a descarboxilação do ácido pirúvico na presença da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXP sintase) a qual é dependente de tiamina fosfato (TPP), formando um derivado enamina TPP/piruvato, o qual reage com o GA-3P, conseguinte, a saída do TPP forma o DXP. Essa molécula sofre uma reação retroaldólica, posteriormente uma reação aldólica e a redução do aldeído para formar a molécula de 2-*C*-metil-D-eritritol-4fosfato (MEP), essa reação ocorre na presença da enzima DXP redutoisomerase (DXR ou IspC). O MEP é ativado pela ligação com a citidina 5'-trifosfato, intermediada pela enzima 4-difosfocitidil-2-*C*-metil-D-eritritol sintase (IspD), para que ocorra a fosforilação dependente de ATP com a ação da enzima 4-difosfocitidil-2-*C*-metil-D-eritritol quinase (IspE), formando o 4-difosfocitidil-2-*C*-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP). Subsequente, ocorre a ciclização intramolecular do CDP-MEP a 2-*C*-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP) sob ação da enzima 2-*C*-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (IspF) e a eliminação da citidina monofosfato (CMP). A enzima 4-hidroxi-3-metil-2-butenil-difosfato sintase (IspG) catalisa a abertura do MEcPP que sofre uma desidratação redutiva formando o 4-hidroxi-metil-2-butenil-1-difosfato (HMBPP), outra desidratação ocorre no HMBPP pela ação da enzima 4-hidroxi-3-metil-2-butenil-difosfato redutase (IspH) gerando o difosfato de isopentenila (IPP), o qual é isomerizado pela IPP isomerase a difosfato de dimetilalila (DMAPP)[18,21,23] (Figura 1.4).

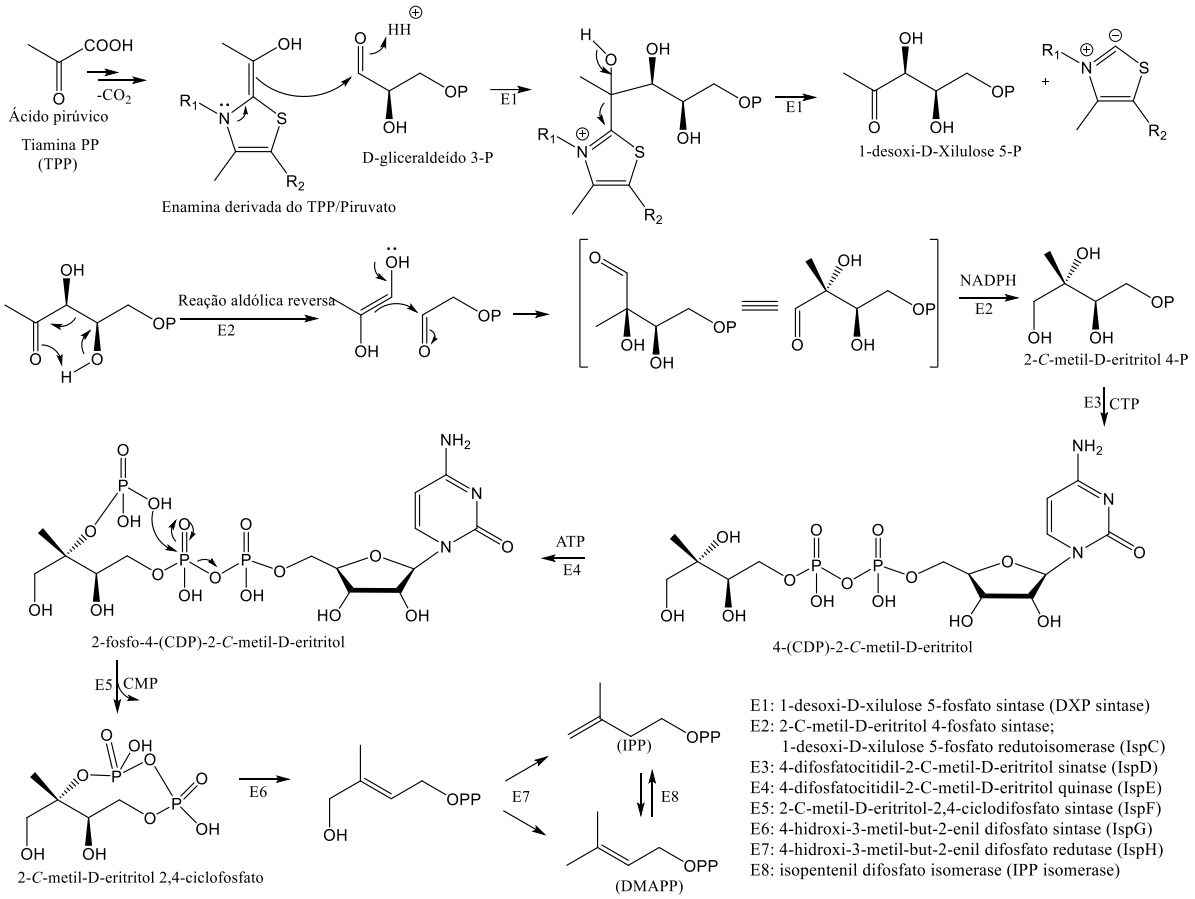


Figura 1.4 - Rota para a formação do IPP e DMAPP pela via do 2-*C*-metil-D-eritritol-4-fosfato. Figura adaptada do livro Medicinal Natural Products: A biosynthetic Appoach. 3rd Edition[22].

As duas vias de formação das unidades formadoras dos terpenoides (IPP e DMAPP) estão presentes nas plantas. Outros organismos apresentam apenas uma das vias, como por exemplo os animais e fungos possuem apenas a via do MEV e algumas bactérias possuem a via do MEP. Nas plantas, as duas vias são separadas no interior celular, no citosol ocorre a via do ácido mevalônico, dando origem aos esteroides, sesquiterpenos e triterpenos, enquanto no plastídio ocorre a via do metileritritol.[18]

Um rastreamento da biossíntese da azadiractina envolvendo marcação isotópica em *Azadirachta indica*, comprovou que a biossíntese dos limonoides segue a via do MEV, sem nenhuma observação cruzada nas vias do MEP e do MEV.[24]

A biossíntese dos limonoides pode ser iniciada pela condensação cabeça-cauda para formar o geranil difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP), o qual faz uma condensação 1-1' com outra unidade de FPP para a formação do esqualeno (Figura 1.5), que por sua vez, sofre uma oxidação pela ação da 2,3-oxidoesqualeno sintase/esqualeno epoxidase formando o 2,3-oxidoesqualeno.

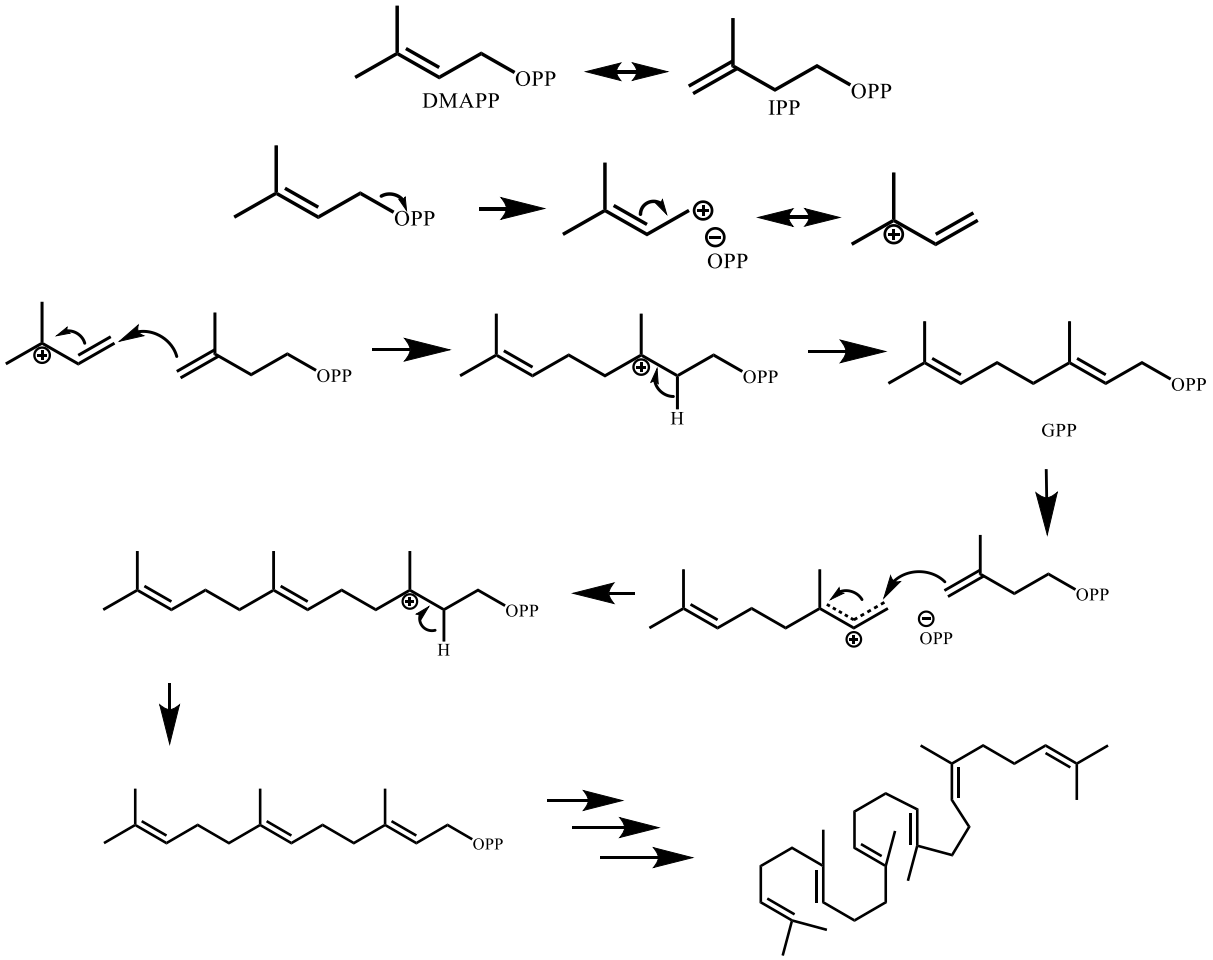


Figura 1.5 - Rota de biossíntese simplificada para a formação do esqualeno.

A enzima triterpeno sintase catalisa a ciclização do 2,3-oxidoesqualeno, as ciclizações iniciadas após a abertura do epóxido são feitas de forma concertadas até a formação do cátion protosteril, o qual sofre alguns rearranjos de hidrogênio até a formação do cátion damaril, conseguinte um rearranjo de Wagner-Meerwein transferindo a metila ligada ao C-14 para o C-8, juntamente com a formação de uma hidroxila em C-7 e a ligação dupla em C-14/15 [13,25–27]. No processo de ciclização da cadeia lateral quatro carbonos são

perdidos (C-24, C-25, C-26 e C-27) até a formação completa ou não (em algumas estruturas) do anel furano.

Os trabalhos mais recentes que descrevem a biossíntese de limonoides são de cunho molecular, relatando os genes responsáveis por fazer modificações estruturais até a formação dos limonoides, como por exemplo, no estudo de Chuang *et al.*, onde os pesquisadores descreveram as três primeiras etapas da biossíntese de quassinoides com base nos dados de transcriptoma e metaboloma da planta *Ailanthus altissima*, essas etapas são similares a biossíntese dos limonoides. Nesse estudo os pesquisadores demonstraram que as três primeiras etapas da biossíntese são catalisadas pelas enzimas oxidoesqualeno ciclase (AaOSC) e duas monoxigenases do citocromo P450 (AaCYP71CD4 e AaCYP71BQ17) levando à formação do protolimonoide melianol[28] (Figura 1.3).

Hodgson *et al*. estudaram as sequências de transcriptoma e genoma de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Citrus sinensis* para elucidar a biossíntese dos limonoides, para cada espécie foi encontrada uma OSC capaz de produzir o butirospermol, (AiOSC1 para *A. indica*, MaOSC1 para *M. azedarach* e CsOSC1 para *C. sinensis*). Os pesquisadores também identificaram enzimas do citocromo P450 coexpressas em *M. azedarach* (MaCYP71CD2 e MaCYP71BQ5) e *C. sinensis* (CsCYP71CD1 e CsCYP71BQ4), que juntas são capazes de formar o melianol a partir do tirucalla-7,24-dien-3β-ol (butirospermol).[29] Lian *et al*, realizaram um estudo similar na caracterização de um 2,3-oxidoesqualeno ciclase em *Melia toosendan* e chegaram à conclusão que a MtOSC1 cataliza o 2,3-oxidoesqualeno em butirospermol.[30]

Pandreka *et al*. pesquisaram sobre genes envolvidos na biossíntese de limonoides do nem (*azadirachta indica*). Em resumo, os pesquisadores identificaram uma esqualeno sintase (AiSQS), três esqualeno epoxidase (AiSQE1, AiSQE2 e AiSQE3), duas triterpeno sintases (AiTTS1 e AiTTS2), duas redutases do citocromo P450. A AiTTS1 recombinante expressa

heterologicamente produz o tirucalla-7,24-dien-3β-ol como único produto, ou seja, o estudo revelou a envolvimento da AiTTS1 na biossíntese de limonoides.[31]

Um estudo desenvolvido por Hodgson *et al*, em 2024, revelou uma estratégia de proteção/desproteção na biossíntese do anel furano em *M. azedarach*. A estratégia consiste em uma adição temporária de um grupo O-Acetil ao carbono C-21 do melianol pela ação da 21-*O*-acetiltransferase (MaL21AT), essa proteção estabiliza o intermediário para outras reações enzimáticas. Posteriormente, uma carboxilesterase (MaCXE) remove o grupo acetila em C-21 (desproteção) formando o anel hemiacetal, conseguinte a MaAKR (aldo-ceto redutase) converte o hemiacetal em um diol. Múltiplas reações ocorrem pela ação de uma enzima no citocromo P450s (MaCYP716D4), iniciando pela conversão do epóxido C-24/25 em uma cetona, posteriormente uma reação do tipo Baeyer-Villiger para produzir um intermediário éster, o qual sofre uma substituição nucleofílica intramolecular resultando no hemiacetal cíclico. Conseguinte, uma oxidação no hemiacetal gera uma lactona, a qual é convertida para um anel furano por meio de uma furano sintase (MaLFS). Para o produto com o anel lactônico foi sugerida uma rota de biogênese para a formação do anel furano convergente com o mecanismo geral estabelecido para dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato (2-OGDDs).[32]

O esquema representativo para o biossíntese do limonoide de anel intacto azadirona com mais detalhes é apresentado a seguir. A ciclização do 2,3-oxidosqualeno ocorre sob intermédio de enzimas oxidosqualeno ciclase formando o butirospermol, o qual sofre oxidações na cadeia lateral por enzimas do citocromo P450 dando origem a dihidroniloticina, posteriormente, outras oxidações ocorrem sob a ação de enzimas monoxigenases e ciclização intramolecular resulta no anel hemiacetal formando o protolimonoide melianol. O anel hemiacetal pode epimerizar antes da migração de metila C-30 da posição C-14 para a C-8. Para evitar a epimerização do melianol, a enzima 21-O-

acetiltransferase acetila a posição C-21 levando a formação de acetal estrutura A (Figura 1.6).

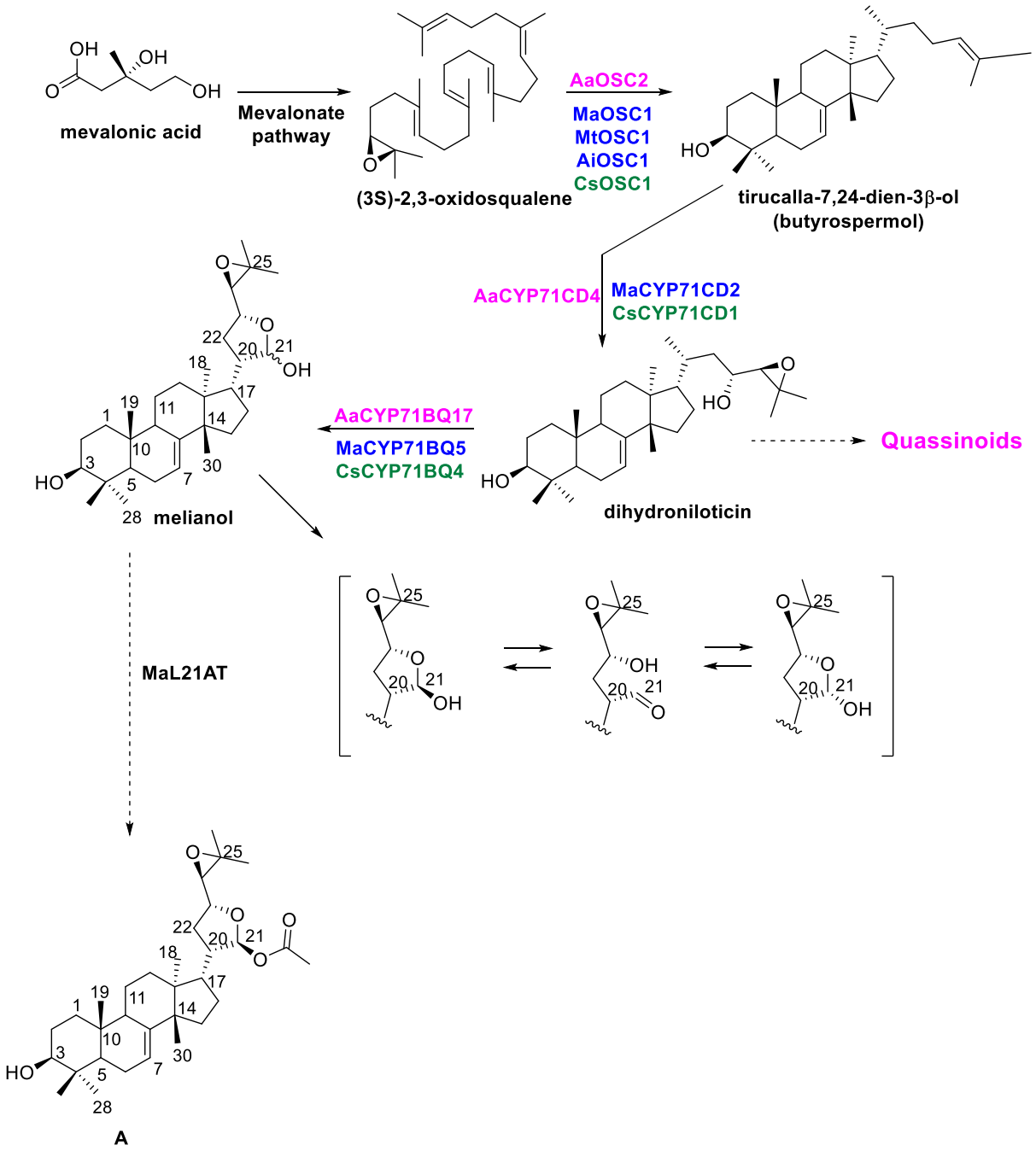


Figura 1.6 – Enzimas responsáveis pela biossíntese do melianol.

Após a formação de A, uma ação conjunta das enzimas 7,8-epoximelianol sintase (MaCYP88A108 em *M. azedarach*) leva a formação do epóxido em C-7/8 com a melianol oxido isomerases (MaMOI2) que auxilia a

migração da metila C-30 para a posição C-8 e a formação da dupla ligação em C-14 na estrutura B. Na ausência da melianol óxido isomerase (MOI), homólogos de CYP88A formam o epóxido na posição C-7/8 instável, o qual pode sofrer um rearranjo do tipo Wagner-Meerwein migrando a metila C-30 para a posição C-8 (Figura 1.7).

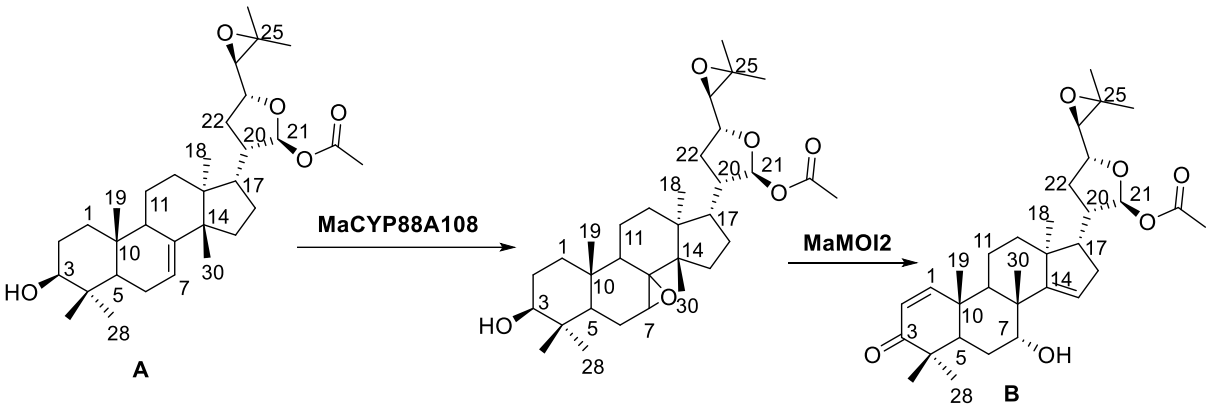


Figura 1.7 – Enzimas responsáveis pela formação do produto B.

De La Peña sugere que a O-acetilação em C-7 desempenha um papel fundamental na biossíntese dos limonoides, pois verificou que na ausência da 7-acetiltransferase ocorreu um acúmulo de uma substância análoga ao melianol, porém com o anel hemiacetal de seis membro[33] (Figura 1.8).

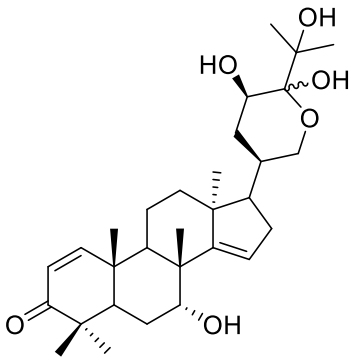


Figura 1.8 – Produto acumulado na ausência 7-acetiltransferase.

A substância B sofre uma O-acetilação na posição C-7 pela MaL7AT, conseguinte uma carboxiltransferase remove o grupo acetil da posição C-21 formando novamente o hemiacetal.

A abertura do hemiacetal juntamente com a ação da aldo-ceto redutase (MaAKR) na redução do aldeído e forma o produto diol C. A enzima MaCYP716AD4 está envolvida em algumas reações na estrutura C, primeiro na conversão do epóxido da posição C-24/25 em uma cetona na posição C-24 e na reação do tipo Baeyer-Villiger que origina um intermediário putativo que possui um oxigênio entre o carbono C-23 e C-24. Após o fechamento do anel devido a uma substituição nucleofílica intramolecular, tem-se novamente a formação de um hemiacetal, o qual sofre uma oxidação pela enzima MaCYP716AD4 dando origem a uma lactona. Conseguinte a formação do anel lactônico, a ação de dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato converte o anel lactônico ao anel furano[33] [32,33] (Figura 1.9).

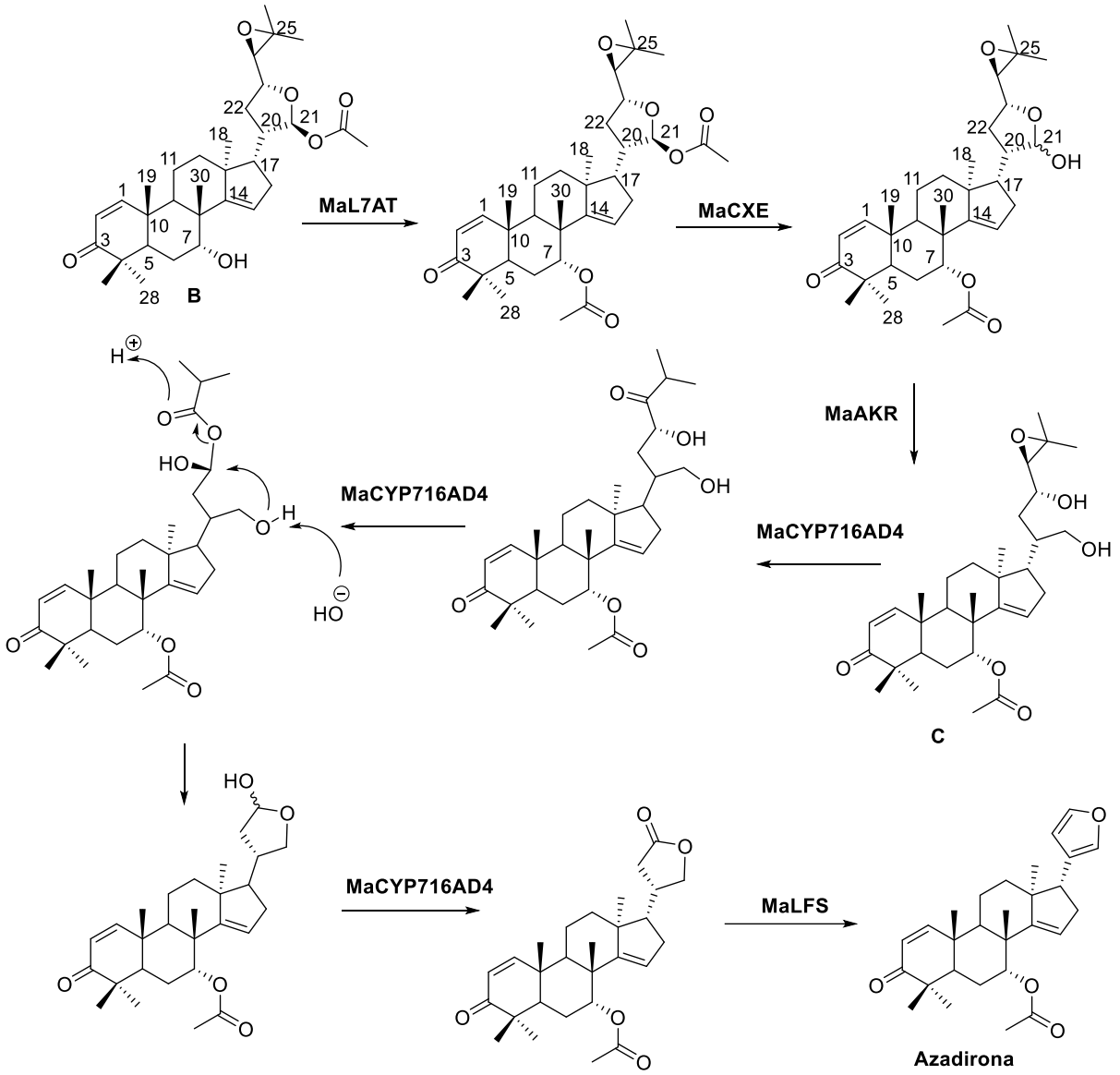


Figura 1.9 – Etapas reacionais e enzimas responsáveis pela biossíntese da azadirona.

A proposta para a formação do anel furano oriundo de anel lactônico é embasado pelo mecanismo já descrito para a dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato. O ciclo catalítico para essa enzima está demonstrado na Figura 1.10, com o ferro em seu estado de oxidação II formando um complexo octaédrico com três resíduos de aminoácidos e três moléculas de H_2O coordenadas. O 2-oxoglutarato se coordena ao centro metálico de forma bidentada e duas moléculas de H_2O são retiradas da esfera de coordenação do Fe(II). Com a saída da terceira molécula de H_2O tem-se a coordenação de uma molécula de O_2 ao centro metálico

o qual é oxidado a Fe(III) deixando um radical sob o oxigênio da molécula de O_2, o oxigênio radicalar se liga ao 2-oxoglutarato, essa ligação faz com que o centro metálico seja oxidado para Fe(IV), pois o Fe(III) vai se ligar a um dos oxigênios utilizando um dos seus elétrons do orbital $3d^6$, a oxidação anterior de Fe(II) para Fe(III) ocorre da mesma maneira, porém com a molécula de O_2. Após a formação do complexo octaédrico com uma ponte peróxido do 2-oxoglutaro com centro metálico Fe(IV) tem-se a saída de CO_2 originando a ligação dupla do Fe(IV) com o oxigênio, desse modo o centro catalítico da enzima está ativado para reagir com o substrato.[32,34–36]

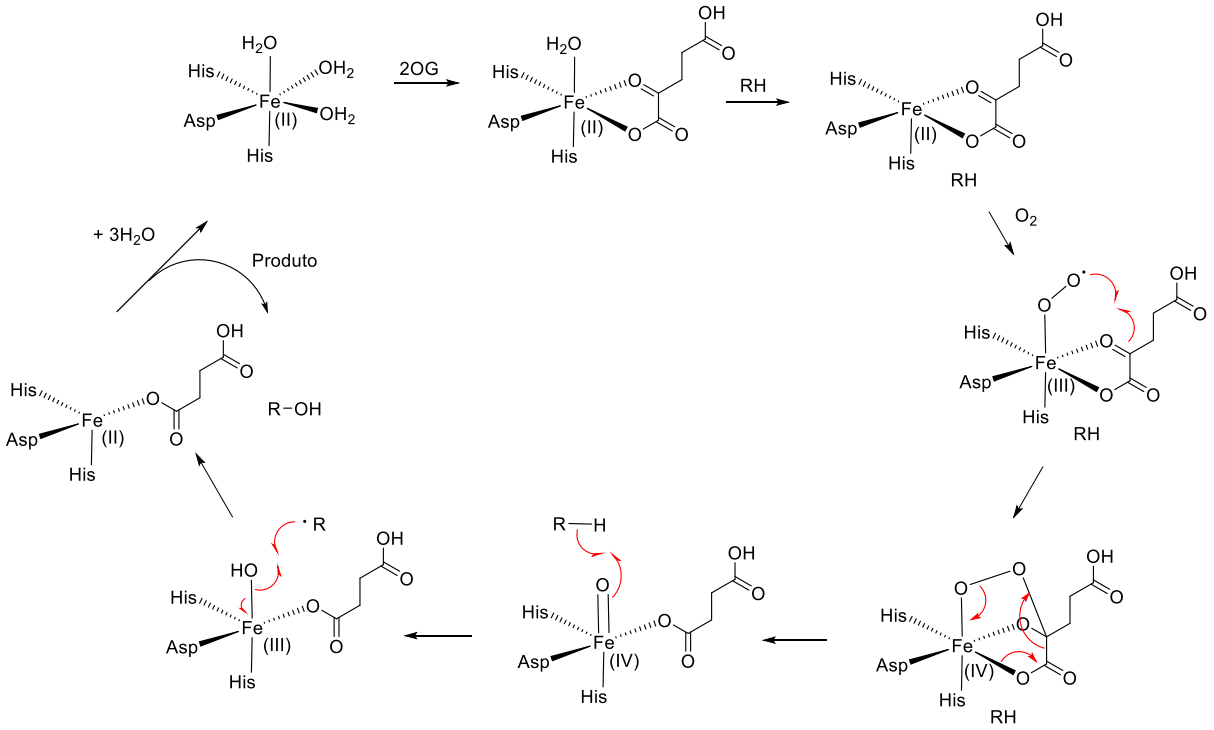


Figura 1.10 – Ciclo catalítico para dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato.

A formação do anel furano é proposta para ocorrer após a formação do anel lactônico. Inicialmente, a enzima abstrai um hidrogênio de forma radicalar da posição C-20 reduzindo o centro metálico de Fe(IV) para Fe(III). Em seguida, forma-se uma dupla ligação entre os carbonos C-20 e C-22. A enzima, que tem um OH coordenado, então abstrai um segundo hidrogênio, desta vez da posição C-22, assistindo a formação da insaturação e reduzindo o Fe(III) para Fe(II). Uma

segunda reação enzimática acontece com uma ligação ao oxigênio do carbono acila. Essa ligação possibilita que haja as formações das ligações dupla entre os carbonos C-22/23 e C-20/21. O hidrogênio da posição C-21 é abstraído por um resíduo de aminoácido, desse modo tem-se a formação do anel furano. O substrato se desprende da enzima quando outro radical hidrogênio (pode ser oriundo de um resíduo de aminoácido) faz uma ligação ao carbono C-23, isso possibilita a formação da ligação dupla entre os oxigênios e a saída de O_2, o elétron da ligação Fe-O volta para o centro metálico o qual é reduzido de Fe(III) para Fe(II).[32]

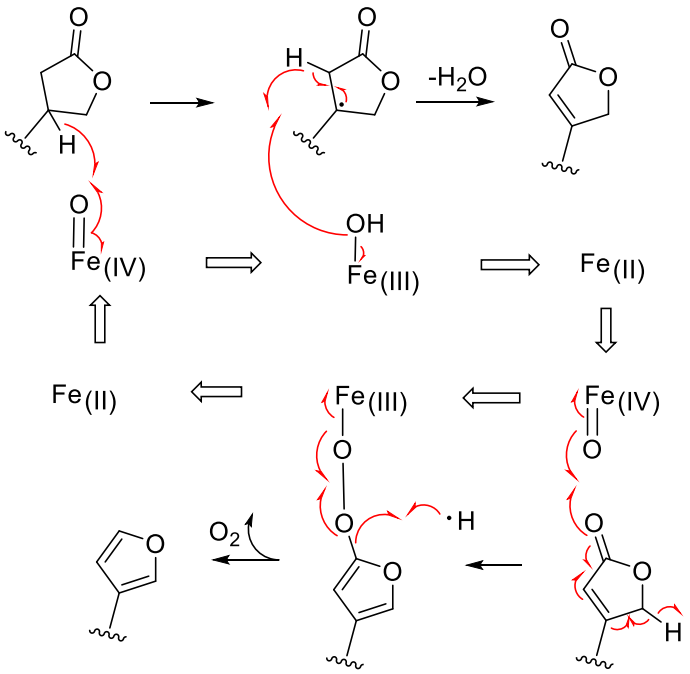


Figura 1.11 – Proposta biossintética para a formação do anel furano.

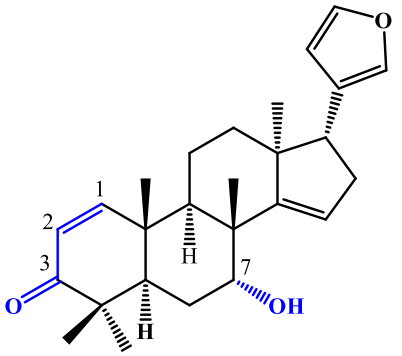
O esqueleto carbocíclico básico do limonoide possui os anéis A, B e C de seis membros e o anel D de cinco membros, as oxidações e rearranjos que acontecem a partir da estrutura básica de um limonoide subdividiram essa classe de metabólitos em limonoides de anéis intactos, limonoides de anéis *seco* e limonoides de rearranjo.

1.3 Limonoides de anéis intactos

Os limonoides de anéis intactos não possuem a clivagem de nenhuma ligação carbono-carbono, porém são classificados de acordo com as oxidações observadas em sua estrutura como: azadirona, cedrelona, havanensina, trichilina e vilasinina.

1.3.1 Classe Azadirona

A classe azadirona é caracterizada pelas oxidações nos carbonos C-1 e C-7, podendo apresentar uma carbonila α,β-insaturada no anel A (3-oxo-$\Delta^{1,2}$)[37] (Figura 1.12).

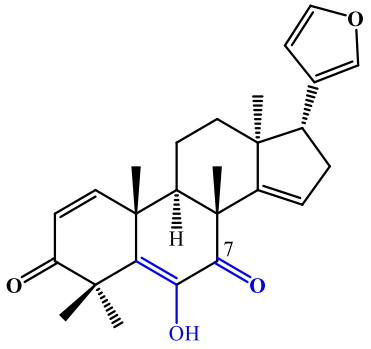


Azadirona

Figura 1.12 - Estrutura representativa da classe azadirona, destacando em azul as modificações que caracteriza a classe azadirona.

1.3.2 Classe cedrelona

Os limonoides da classe cedrelona possuem no anel B o grupo diosfenol[37] (Figura 1.13).

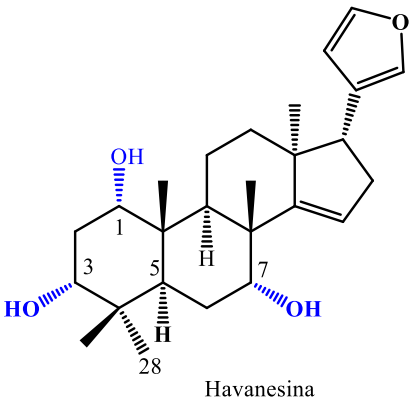


Cedrelona

Figura 1.13 - Estrutura representativa da classe cedrelona, destacando em azul as modificações na estrutura que caracteriza essa classe.

1.3.3 Classe havanensina

As estruturas de limonoides que caracterizam a classe havanensina possuem substituintes oxigenados nas posições C-1, C-3 e C-7, também pode apresentar oxidação da posição C-28, mas não é obrigatório para caracterizar a classe[37] (Figura 1.14).



Havanesina

Figura 1.14 - Estrutura representativa da classe havanensina, destacando em azul as oxidações na estrutura que caracterizam essa classe.

1.3.4 Classe trichilina

Os limonoides da classe trichilina possuem uma ponte lactol em C-19/29, ou seja, não tem mais a presença das metilas C-19 e C-29[37] (Figura 1.15).

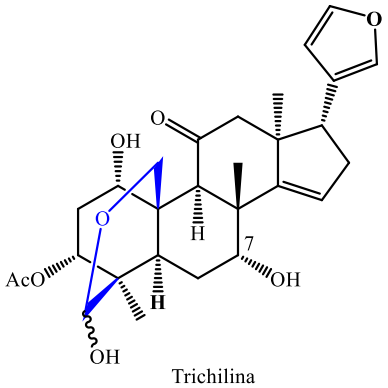


Figura 1.15 - Estrutura representativa da classe trichilina, destacando em azul as modificações na estrutura que caracteriza essa classe.

1.3.5 Classe vilasinina

A característica da classe vilasinina é a presença de uma ponte éter em C-6/28[37] (Figura 1.16).

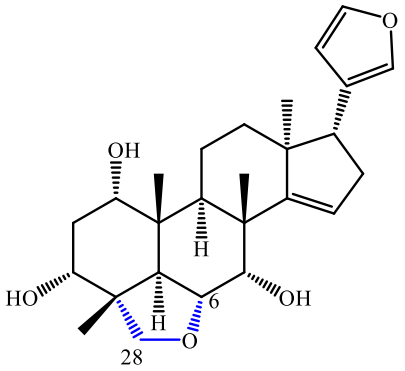
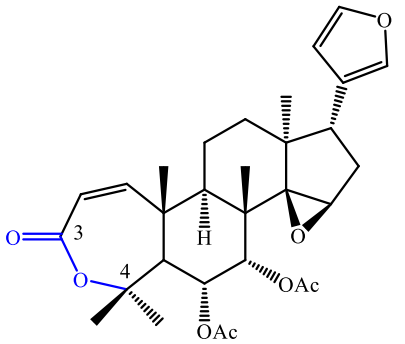


Figura 1.16 - Estrutura representativa da classe vilasinina, destacando em azul as modificações na estrutura que caracteriza essa classe.

1.4 Limonoides de anéis *seco*

A clivagem de uma ligação carbono-carbono nos anéis da estrutura básica dos limonoides recebe a nomenclatura *seco*. Os grupos foram divididos de acordo com a localização da clivagem da ligação entre carbonos.

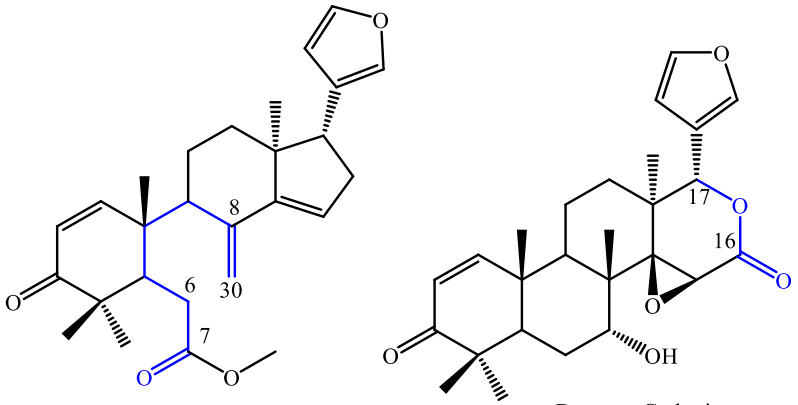
O grupo A-*seco* apresenta a quebra da ligação C-3/4,[37] a maioria dos limonoides desse grupo apresentam uma lactona, a qual pode ser α,β-insaturada, oriunda de uma oxidação do tipo Baeyer-Villiger. A formação da lactona não é um requisito obrigatório para delimitar esse grupo, basta apresentar a clivagem da ligação C-3/4 (Figura 1.17).



A-*seco* - Evadulona

Figura 1.17 - Estrutura representativa de um limonoide A-*seco*, destacando em azul as modificações na estrutura que caracteriza essa classe.

Os limonoides do tipo B-*seco* apresentam a quebra da ligação C-7/8. Esse tipo de estrutura é comum nos gêneros *Turraea* e *Toona*.[37] As estruturas do tipo D-*seco*, possuem uma expansão do anel D e a formação de uma lactona (Figura 1.18).



B-*seco* - toonafolina D-*seco* - Gedunina

Figura 1.18 - Estrutura representativa de um limonoide B-*seco* e D-*seco*, destacando em azul as modificações nas estruturas que caracterizam a classe.

Os limonoides de anéis seco, podem apresentar mais uma clivagem em anéis diferentes, por exemplo a classe prieurianina (A,B-*seco*), a qual possui as clivagens das ligações C-3/4 e C-7/8.[37] O grupo A,D-seco possui a clivagem C-3/4 e a expansão do anel D (clivagem C-16/17). Os anéis B,D-*seco* são conhecidos como andirobina e possuem a clivagem C-7/8 e C-16/17. São reportados na literatura os limonoides A,B,D-*seco*, os quais apresentam as clivagens C-3/4, C-7/8 e C-16/17[37] (Figura 1.19).

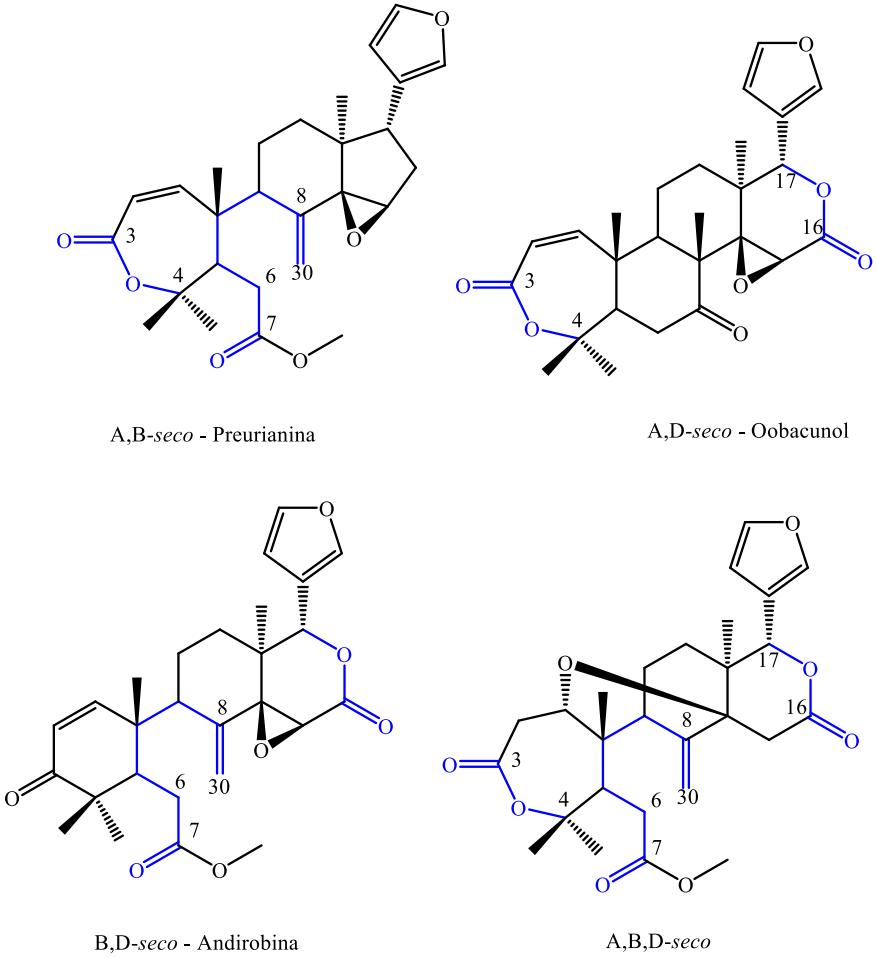
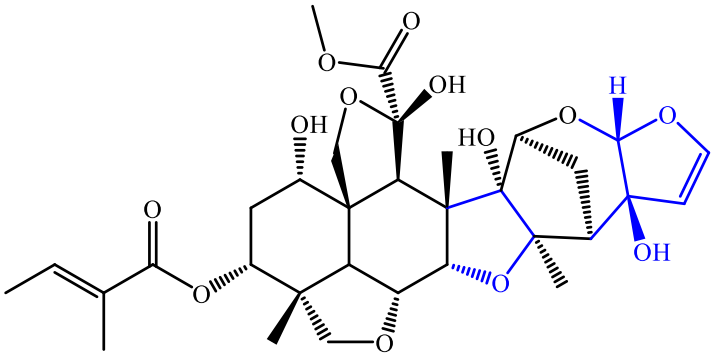


Figura 1.19 - Estruturas representativas de limonoides A,B-*seco*, A,D-*seco*, B,D-seco e A,B,D-*seco* destacando em azul as modificações nas estruturas que caracterizam a classe.

Os limonoides que possuem o anel C-*seco* apresentam uma subdivisão de acordo com as oxidações presentes na estrutura.

1.4.1 Classe Azadiractina/Meliacarpina

Essa classe foi proposta após a elucidação do limonoide encontrado no óleo da semente do nim usado como pesticida botânico, denominado de azadiractina. Podemos observar que para essa estrutura temos uma modificação do anel furano, com a presença da ponte éter em C-6/28 e C-7/13,[37] ressaltando que esta última oxidação não é obrigatória para descrever a classe (Figura 1.20).

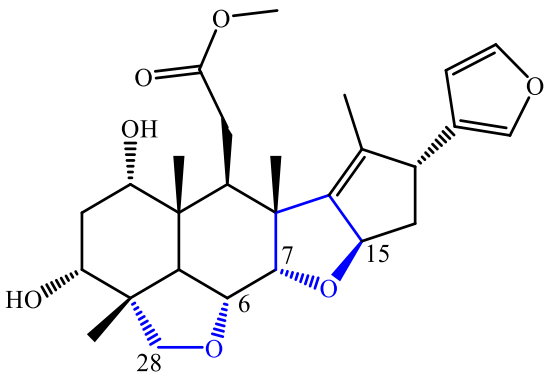


Meliacarpinina E

Figura 1.20 - Estrutura representativa da classe azadiractina/meliacarpina.

1.4.2 Classe Salanina

Os limonoides da classe salanina apresentam a ponte éter em C-6/28 e C-7/15,[37] podem conter ou não o anel furano formado, sem que haja a modificação do mesmo igual a classe da azadiractina (Figura 1.21).

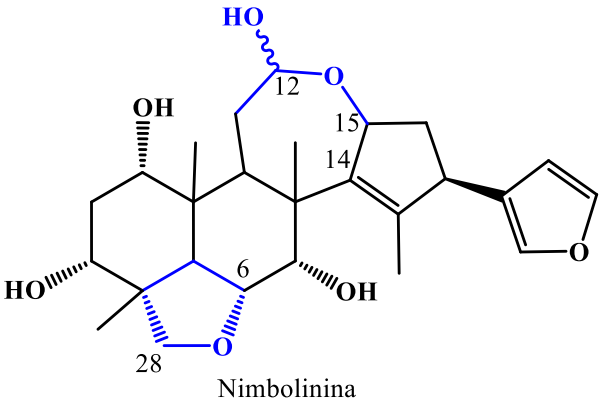


Salanina

Figura 1.21 - Estrutura representativa da classe salanina.

1.4.3 Classe Nimbolinina

As estruturas dos limonoides do tipo nimbolinina apresentam uma ponte éter em C-6/28 e C-12/15[37] (Figura 1.22). O anel C, pode conter um hemiacetal, cetal ou lactona em C-12/15.

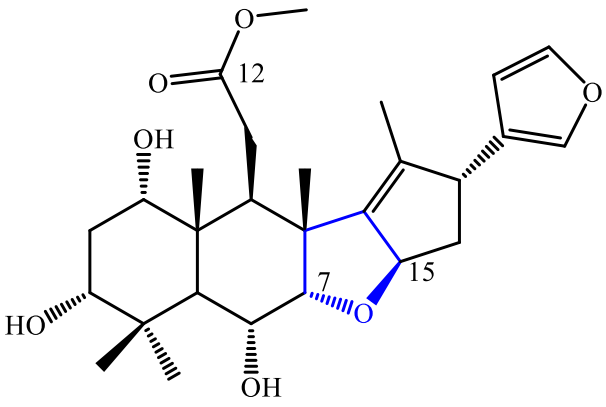


Nimbolinina

Figura 1.22 - Estrutura representativa da classe nimbolinina.

1.4.4 Classe da Nimbina

A classe nimbina não apresenta a ponte éter em C-6/28, mas apresenta a clivagem da ligação C-12/15[37] ou C-12/13, pode conter a ligação éter em C-7/15, mas não é obrigatório (Figura 1.23).



Nimbina

Figura 1.23 - Estrutura representativa da classe nimbina.

1.4.5 Classe Nimbolidina

A classe nimbolidina possui a ponte éter em C-6/28 e com a abertura do anel C,[37] podendo apresentar uma ponte éter em C-11/14, mas a maioria dos limonoides dessa classe mantém o anel C aberto (Figura 1.24).

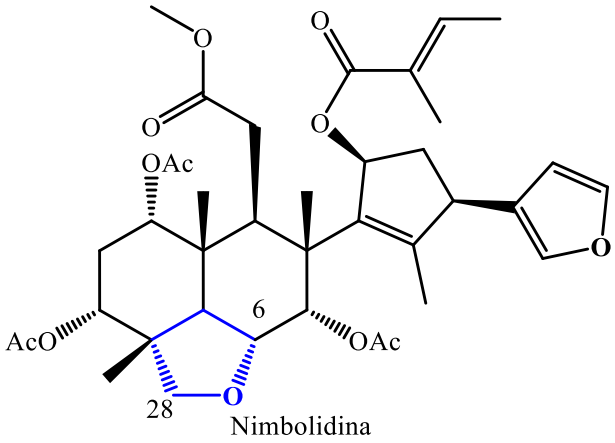


Figura 1.24 - Estrutura representativa da classe nimbolidina.

1.5 Limonoides de rearranjo

Os limonoides podem sofrer rearranjos em sua estrutura química, o que contribui para uma maior diversidade e complexidade em termos estrutural. Esses limonoides foram subdivididos em algumas classes, as quais estão apresentadas nos itens a seguir.

1.5.1 Grupo 1,n-*linkage*

Nos limonoides de anéis intactos, o carbono da posição C-1 está ligado aos carbonos C-2 e C-10, após um rearranjo de um grupo alquila o C-1 passa a ter ligação com outros carbonos na molécula,[37] como por exemplo, uma ligação C-1/5 (Figura 1.25).

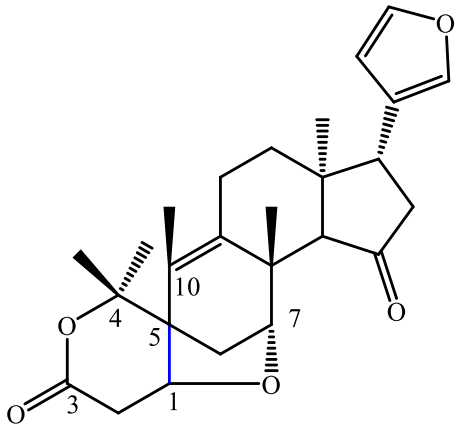


Figura 1.25 - Estrutura representativa da classe 1,n-*linkage.*

1.5.2 Grupo Mexicanolideo

O grupo mexicanolideo pode ser identificado pela presença de ligação carbono-carbono do C-2 com o C-30,[37] por isso essa classe pode ser chamada de grupo da ligação 2,30 (Figura 1.26).

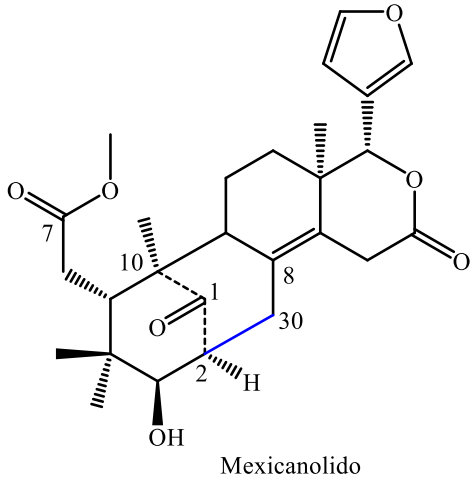


Figura 1.26 - Estrutura representativa da classe mexicanolideo.

1.5.3 Grupo Fragmalina

Os limonoides dessa classe sofrem um rearranjo que deixam os anéis A e B como triciclo[3.3.$1^{2,10}$.$1^{1,4}$]decano ou triciclo[4.2.$1^{10,30}$.$1^{1,4}$]decano,[37] esses

limonoides possuem em sua estrutura um grupo ortoéster, por isso pode ser encontradas algumas literaturas o nome ortoésteres de fragmalina (Figura 1.27).

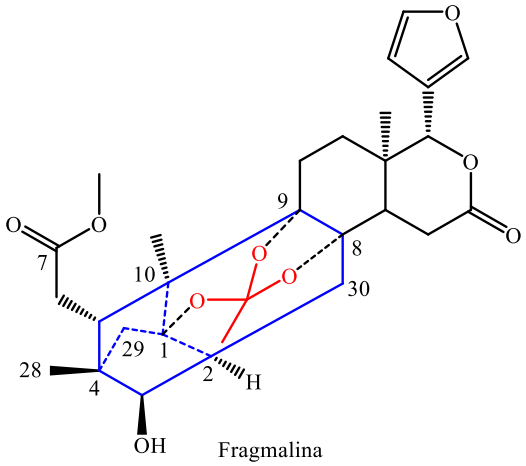


Figura 1.27 - Estrutura representativa da classe fragmalina em azul é destacado o triciclo e em vermelho o grupo ortoéster.

1.5.4 Grupo Polioxifragmalina

O grupo polioxifragmalina apresenta a mesma característica do triciclo[3.3.$1^{2,10}$.$1^{1,4}$] decano ou triciclo[4.2.$1^{10,30}$.$1^{1,4}$]decano, sem a presença do grupo ortoéster[37] (Figura 1.28).

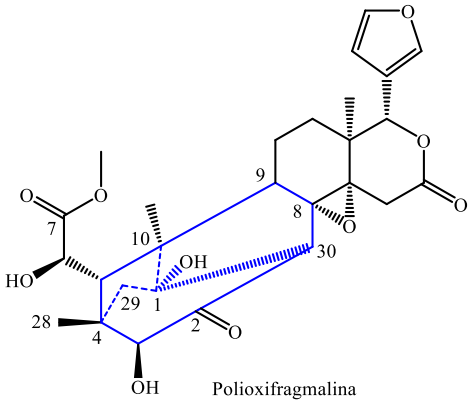


Figura 1.28 - Estrutura representativa da classe polioxifragmalina destacando em azul o triciclo.

1.5.5 Grupo trijugina

O rearranjo ocasionado nessa classe de estrutura gera uma contração do anel C e forma uma ligação entre os carbonos C-8/11.[37] Essa classe pode ser conhecida como grupo da ligação 8,11 (Figura 1.29).

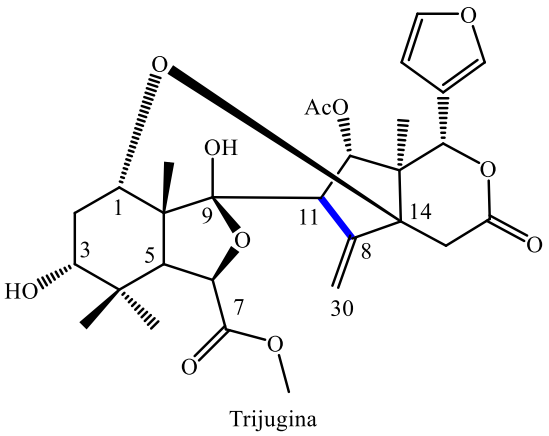


Figura 1.29 - Estrutura representativa da classe trijugina destacando em azul a ligação do carbono C-11 com o C-8.

1.5.6 Grupo Cipadesina

A classe cipadesina é conhecida pela ligação 10,11 unindo os anéis A e C por uma ligação carbono-carbono[37] (Figura 1.30).

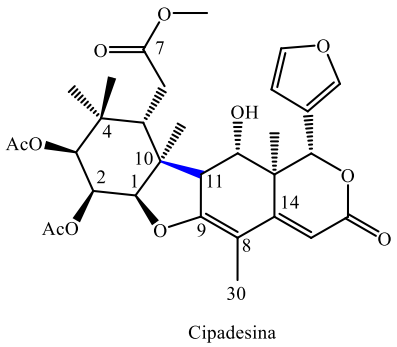


Figura 1.30 - Estrutura representativa da classe cipadesina destacando em azul a ligação C-10/11.

1.5.7 Outros limonoides com rearranjo

Os limonoides com rearranjo não se limitam apenas as classes a cima apresentadas, como por exemplo nas estruturas apresentadas abaixo ambos os limonoides são considerados de rearranjo, na estrutura a esquerda podemos perceber a ligação C-3/19 e no limonoide a direita a molécula se rearranjou de modo a formar a ligação entre os carbonos C-12/30[37] (Figura 1.31).

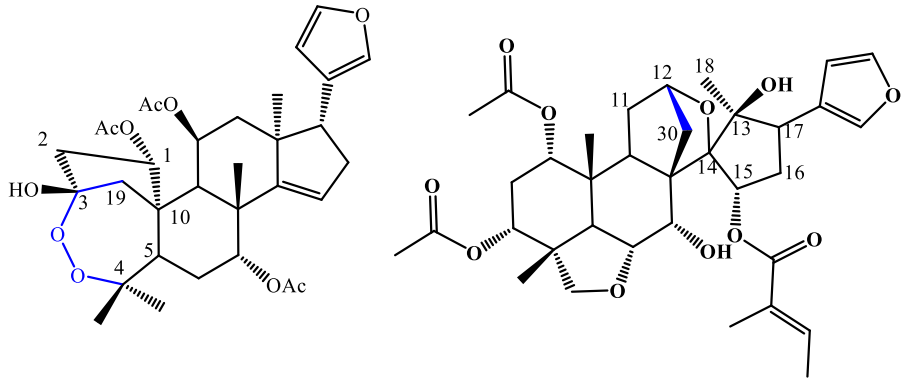


Figura 1.31 - Estrutura representativa de outros tipos de limonoides de rearranjo em azul são destacadas as ligações que sofreram um rearranjo.

1.6 Outros derivados de limonoides

Na literatura são descritos alguns pentanortriterpenos, também chamados de norlimonoides, os quais são gerados por uma degradação ou perde de um carbono de um limonoide (C_{26}), originando um derivado de limonoide que possuem em seu esqueleto básico 25 átomos de carbono.

1.7 O gênero *Trichilia*

O gênero *Trichilia* P. Browne, é classificado na subfamília Melioideae, tribo Trichilieae DC. (1824),[38] foi descrito em 1756, é composto por árvores e arbustos, as espécies desse gênero podem ser encontradas nos continentes Americano, Africano e Asiático,[39] atualmente possui mais de 80

espécies. As quais são separadas dos outros gêneros de Meliaceae na comparação de suas flores e frutos, as flores possuem o tubo estaminal parcial ou completamente fundido, com as anteras no ápice dos filamentos dos filetes ou na margem do tubo estaminal, seus frutos são capsulas loculicidas de 2-3 valvas.[40] Essas três valvas, juntamente com os três lóculos do ovário, caracterizaram o nome do gênero, *Trichilia* (do grego "Tricho").[39,41]

Esse gênero possui espécies espalhadas pelos trópicos, as quais se encontram em regiões geográficas diferentes, contribuindo para uma diversidade morfológica entre as espécies de *Trichilia*. Essa diversidade morfológica traz consigo problemas na classificação desse gênero, em sua pesquisa, De Wilde considerou que as *Trichilias* de espécies africanas eram dioicas (indivíduos masculinos e femininos separados), entretanto a espécie *T. claussenii* C.DC. é descrita como ginodioica (plantas que possuem indivíduos hermafroditas e indivíduos femininos).[2,42–44]

James J. Clarkson investigou as relações filogenéticas dentro do gênero *Trichilia* de algumas espécies africanas, para esse estudo utilizou-se sequências de região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossômico, como resultado, as análises de ITS mostraram a divisão de *Trichilia* em dois grupos. O primeiro grupo formado com espécies encontradas em florestas sazonais secas. O segundo grupo é composto por espécies encontradas em florestas úmidas, essa separação das espécies de *Trichilia* utilizadas em dois clados, corrobora para que *Trichilia* não seja monofilético.[2,45] Vale ressaltar que o autor comenta que estudos futuros serão realizados, pois a pouca amostragem utilizada não gera total confiança nos resultados apresentados.

No Brasil, o gênero *Trichilia* é o mais abundante entre os gêneros da família Meliaceae, são encontrados um totas de 53 gêneros.[4] Os estudos fitoquímicos com espécies de *Trichilia* apresentaram o isolamento e/ou identificação de monoterpenos, triterpenos tetracíclicos, cicloartano, triterpenos pentacíclicos, esteroides, cumarinas, flavonoides, lignanas glicosiladas e

limonoides, este último classificado como tetranortriterpenos altamente oxigenados.[39,46]

1.8 Limonoides isolados no gênero *Trichilia* no Brasil

Na plataforma Scopus foram utilizadas duas palavras chaves combinadas, "limonoides e *Trichilia*", um total de 84 artigos foram encontrados, a maior parte da produção científica vem da China com 25 artigos, o Brasil está na terceira posição com 11 artigos publicados de limonoides em Trichilia, sendo a primeira produção datada em 1992, no trabalho de Cortez, a qual isolou cinco limonoides do extrato diclorometano dos frutos de *T. hirta*. Todos os limonoides isolados são de anéis intactos e possuem o grupo diosfenol[47] (Figura 1.32).

Garcez (1996), trabalhou com sementes de *T. elegans*, material este coletado em Corumbá-MS, e do extrato etanólico foram isolados quatro limonoides de anéis A,D-*seco* e seis limonoides de anéis A,B,D-*seco*[48,49] (Figura 1.33).

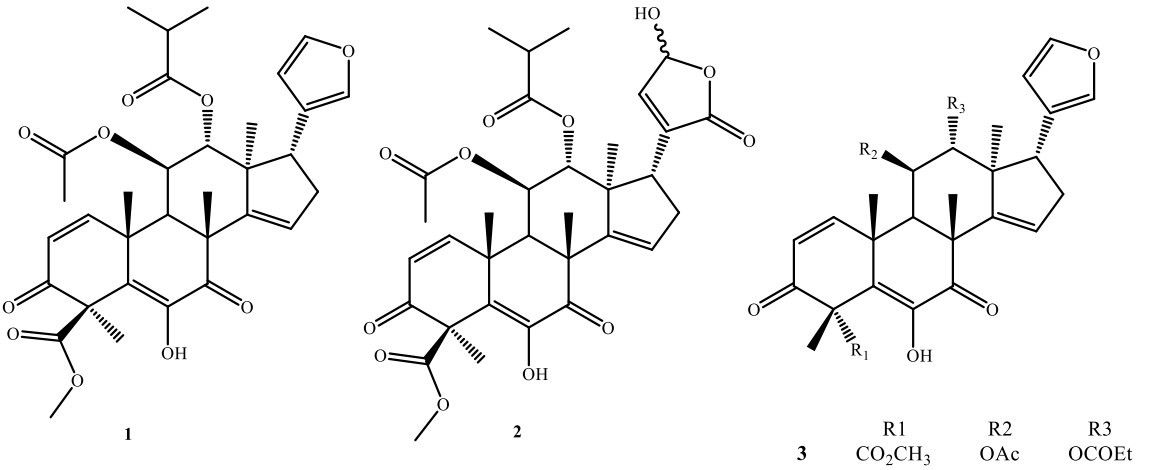


Figura 1.32 - Limonoides isolados dos frutos de *T. hirta* por Cortez[47].

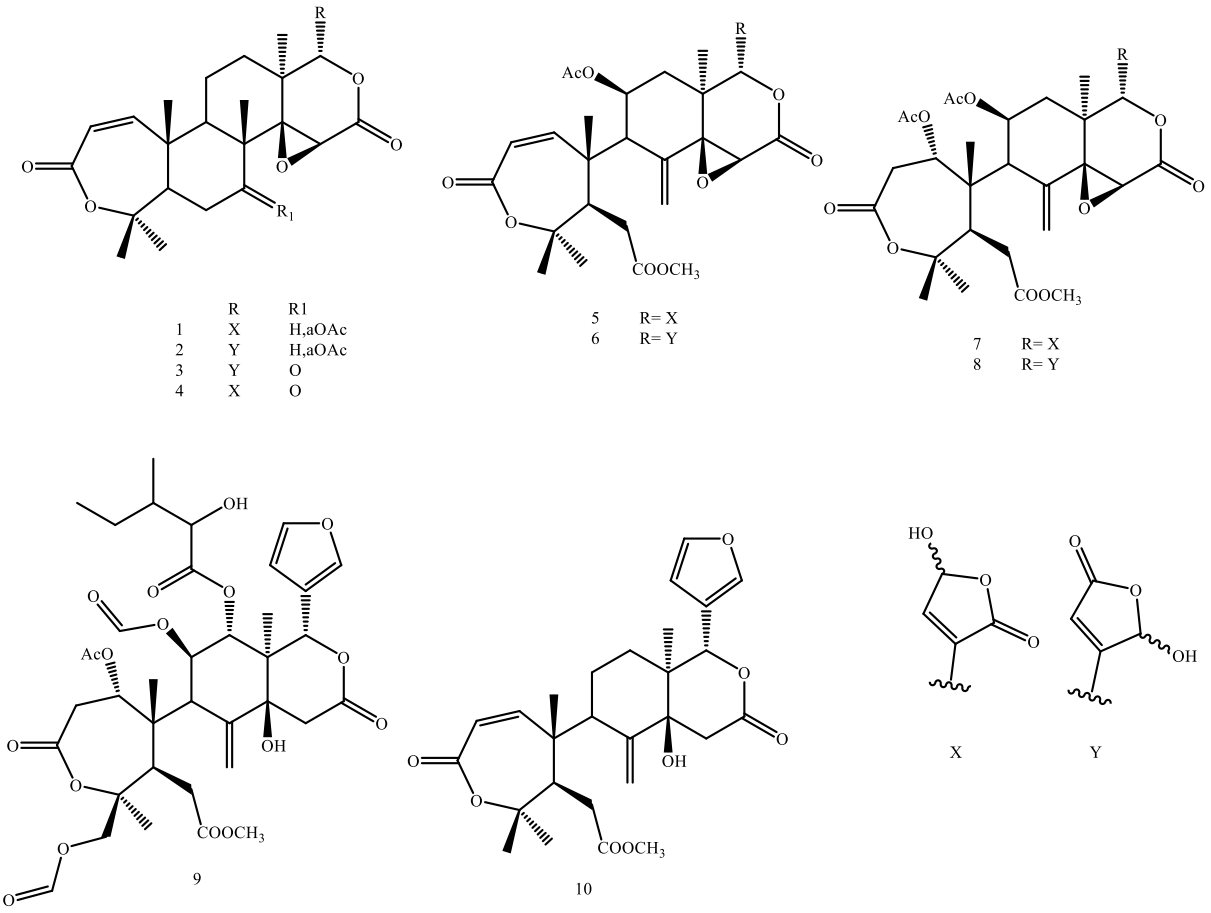


Figura 1.33 - Limonoides isolados das sementes de *T. elegans* por Garcez[48].

Na ordem cronológica dos artigos dentro da plataforma Scopus, em 2009, a pesquisa realizada por Matos apresentou o isolamento de dois limonoides, 11β-acetoxiobucanona (A,D-*seco*) de *T. elegans*. Os limonoides cedrelona (anel intacto), angolensato de metila (B,D-*seco*) e a mistura dos epímeros fotogedunina foram isolados de *T. catiguá*[50] (Figura 1.34).

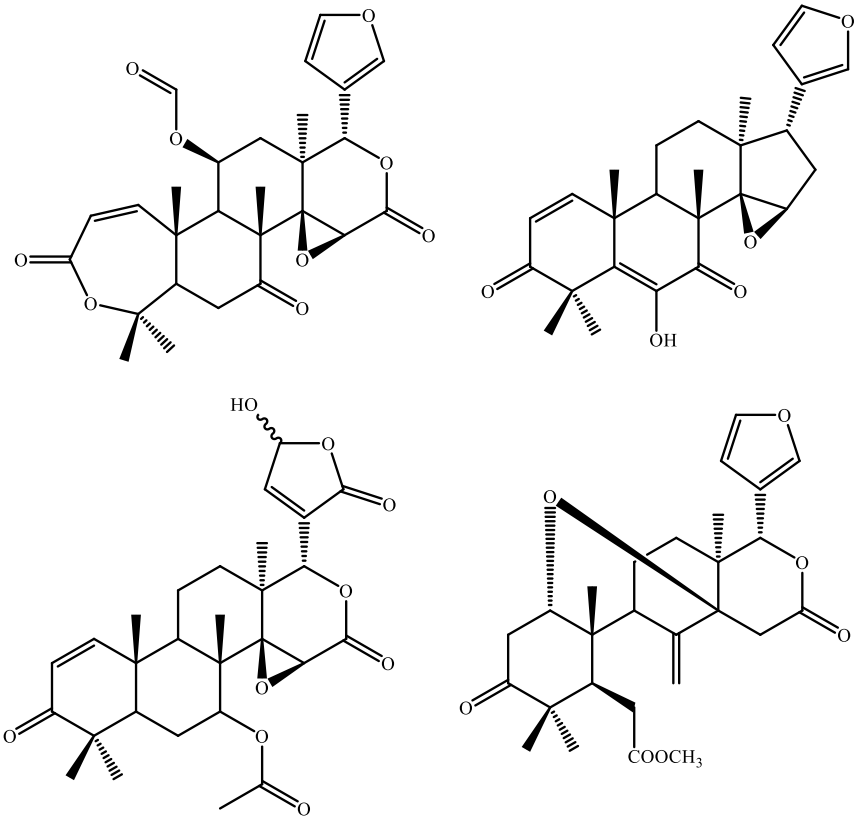


Figura 1.34 - Limonoides isolados das sementes de *T. elegans* e de *T. catiguá* por Matos[50].

Os três últimos artigos que tratam de limonoides isolados em *Trichilia* foram das autoras Fuzer (2013), Cazal (2023) e do pesquisador Passos (2023), a primeira isolou cedrelona de *T. catiguá* para testes em células tumorais, a segunda isolou três limonoides de anéis intactos, incluindo a cedrelona, na espécie *T. catiguá*[51,52] (Figura 1.35). No trabalho de Passos, foram isolados dez limonoides das sementes de *Trichilia lepidota*, todos os limonoides de anéis intactos.[53]

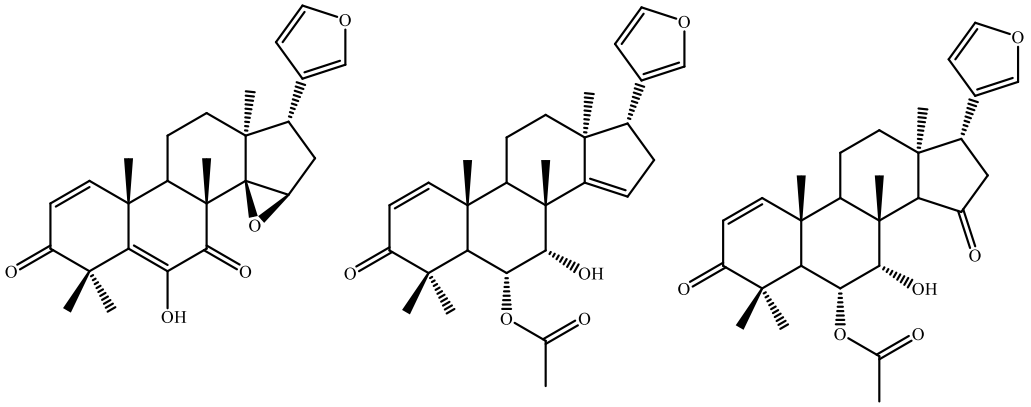


Figura 1.35 - Limonoides isolados de *T. catiguá* por Cazal[52].

1.9 Limonoides isolados no gênero *Trichilia* fora do Brasil

A China é o país que possui o maior número de publicações, na plataforma Scopus, correlacionando as palavras "limonoides e *Trichilia*" (25 artigos), porém o que chama mais atenção nas publicações são as estruturas dos limonoides isolados em *Trichilia* (*T. connaroides* e *T. sinensis*), enquanto no Brasil é observada a presença de limonoides de anéis intactos e anéis *seco* (A,D-*seco* e A,B,D-*seco*), as duas espécies asiáticas mostraram a presença dos limonoides que possuem rearranjo em suas estruturas.

Em um trabalho recente, Xing (2023) isolou um norlimonoide, o qual denominou de secotrijugina A, e isolou os limonoides secotrijugina B e secotrijugina C, das folhas e galhos de *T. sinensis*[54] (Figura 1.36).

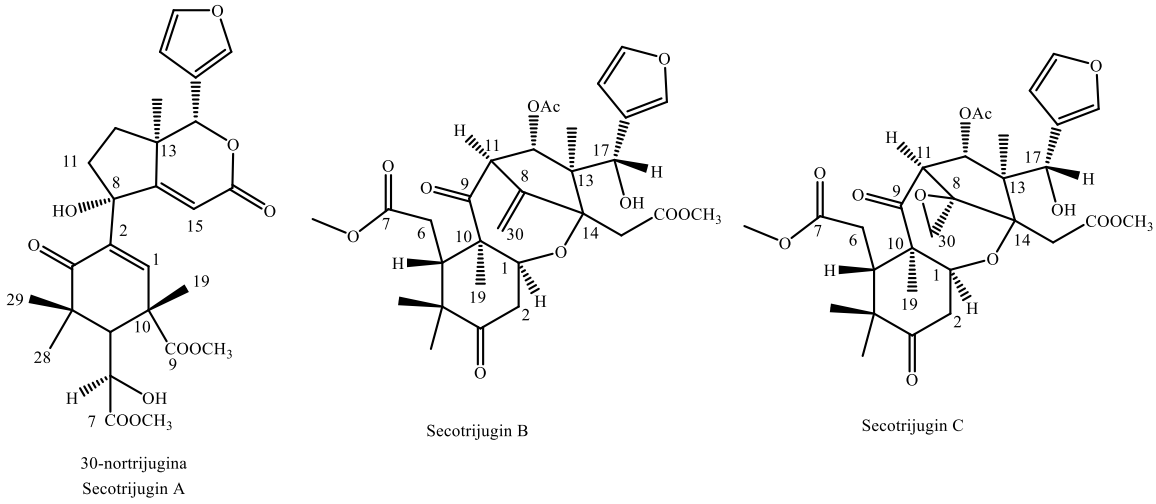


Figura 1.36 - Limonoides de rearranjo isolados de folhas e galhos de *T. sinensis* por Xing[54].

As pesquisas de An *et al*., em 2016 e 2018, com extrato etanólico dos frutos de *T. connaroides*, espécie utilizada por moradores na medicina popular chinesa para o tratamento de artrite e faringite, levou o isolamento de duas espirotrichilinas (2016)[55] (Figura 1.37) e quatro limonoides da classe fragmalina (2018)[56] (Figura 1.38). Cao *et al*. (2017) isolaram três limonoides do tipo mexicanolideo de folhas e galhos de *T. sinensis*[57] (Figura 1.39).

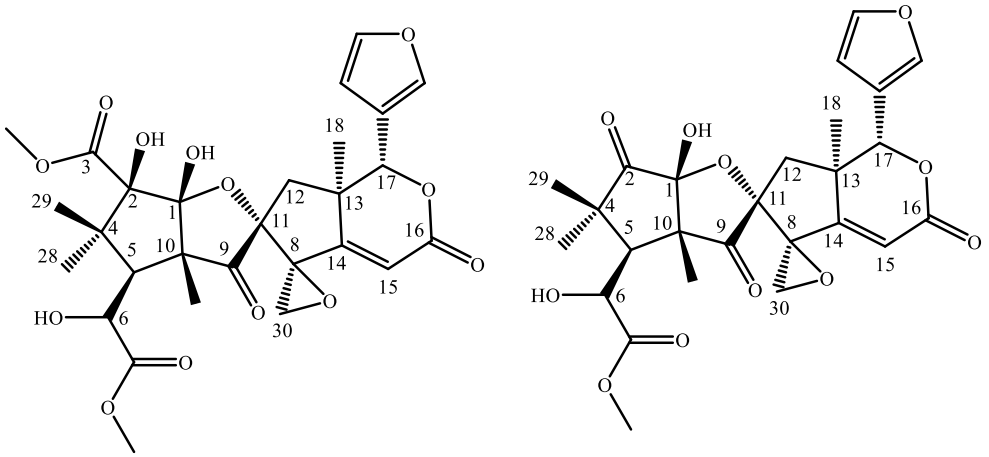


Figura 1.37 - Espirotrichilinas isoladas de *T. connaroides* por An[55].

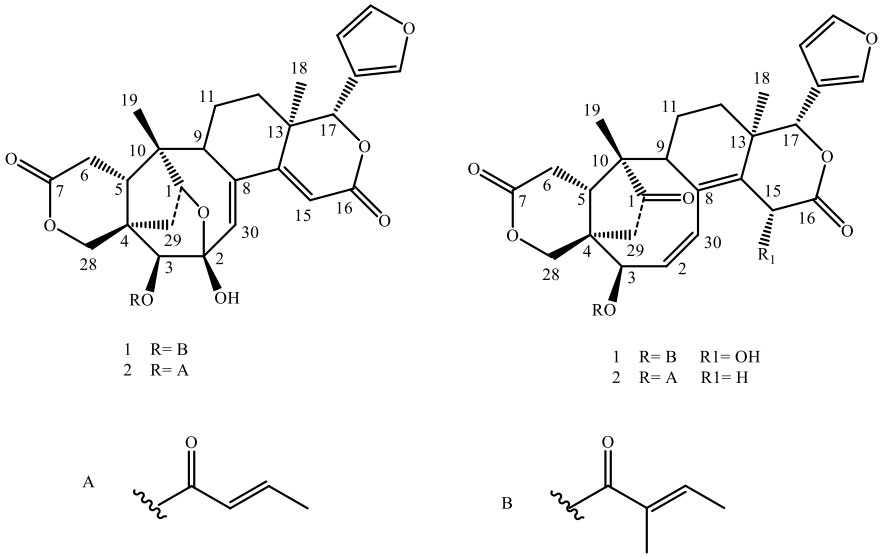


Figura 1.38 - Limonoides do tipo fragmalina isolados de *T. connaroides* por An[56].

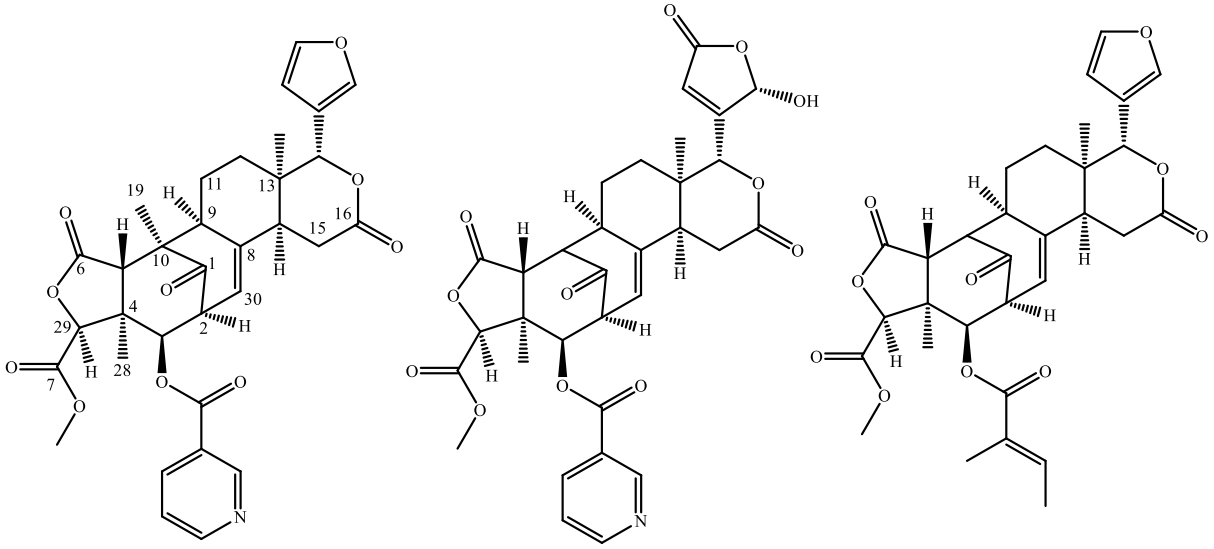


Figura 1.39 - Limonoides do tipo mexicanolideo isolados de *T. sinensis* por Cao[57].

Uma comparação direta entre os limonoides encontrados nas plantas Asiáticas com os limonoides encontrados no Brasil, é observado que as espécies *T. connaroides* e *T. sinensis* apresentam uma maior complexidade estrutural de tetranortriterpenos, pois essas espécies apresentam estruturas que sofrem rearranjo no processo de biossíntese, enquanto as espécies de *Trichilia* estudadas no Brasil não apresentaram estruturas com rearranjo.

Uma excelente revisão foi publicada em janeiro de 2021, nesse trabalho foi sumarizado um total de 227 limonoides, diferentes, isolados do

gênero *Trichilia* em 21 espécies.[58] Considerando o número de limonoides reportado por cada espécie e o trabalho mais recente sobre o isolamento de dez limonoides em *T. lepidota,* esse número sobe para 255 limonoides, dos quais 42% dos limonoides são de anéis com rearranjo, 37% com anéis intactos e 21% com anéis seco (Figura 1.40). Na tabela 1.1 podemos observar um total de 106 limonoides com rearranjo isolados das espécies asiáticas, somando apenas os limonoides reportados em espécies do continente Americano, temos um total de 82 estruturas, das quais, 52 são limonoides de anéis intactos distribuídos nas classes cedrelona, havanensina, trichilina, vilasinina e azadirona.[58]

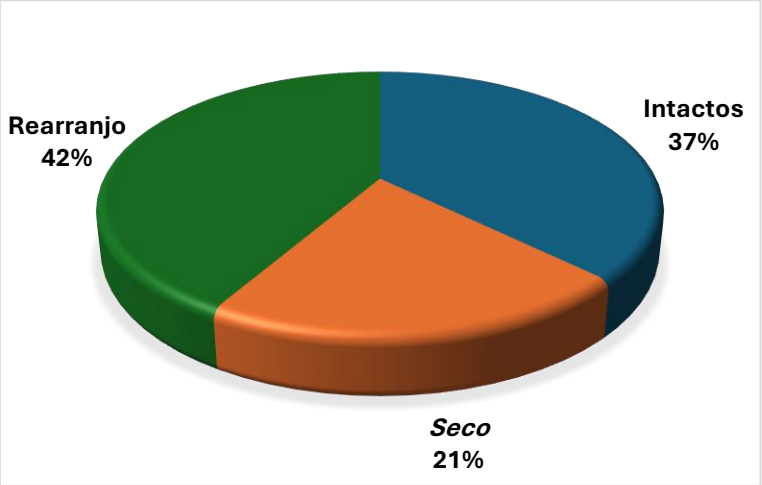


Figura 1.40 - Porcentagem de limonoides de anéis intactos, anéis seco e anéis com rearranjo isolados no gênero *Trichilia*. Gráfico retirado e adaptado das informações da revisão desenvolvida por Passos[58].

No Brasil, segundo o portal de banco de dados da flora brasileira (Reflora, administrado pelo Jardin Botânico do Rio de Janeiro), são encontradas 53 espécies de *Trichilia*, das quais, 8 espécies possuem estudos de isolamento e identificação de limonoides, as espécies que já foram relatadas no Brasil estão em destaque (Tabela 1.1).

As informações sobre os limonoides isolados de espécies de *Trichilia* encontradas no Brasil, no geral mostraram estruturas simples, pouco rearranjadas.

Esta observação nos levou a reestudar algumas espécies brasileiras, pois as informações quanto à suas classificações botânicas não justificam a ausência de limonoides mais complexos. Os estudos no Brasil ocorreram quando as infraestruturas em espectrometria ainda eram menos sensíveis, impedindo análises de compostos em pequena quantidade. Assim, selecionou-se a *Trichilia pallida* para uma nova investigação, mas usando a técnica de LC-MS/MS para garantir a busca de um perfil químico mais complexo, e não perder amostras em baixa concentração.

Tabela 1.1 - Número de limonoides isolados no gênero *Trichilia* distribuído por espécies e continentes. Em destaque são as espécies que podem ser encontradas no Brasil

Quantidade de estruturas de limonoides encontradas				
Espécies	Anéis intactos	Anel-*seco*	Rearranjo	Local
T. americana	12	-	-	América
T. catigua	1	1	-	América
T. elegans	-	9	-	América
T. estipulata	4	-	-	América
T. havanensis	14	1	-	América
T. hirta	5	-	-	América
T. hispida	-	3	-	América
T. pallida	5	1	-	América
T. rubra	-	11	-	América
T. schomburgkii	-	1	-	América
**T. lepidota*	10	-	-	América
T. trifolia	1	4	-	América
T. dregeana	-	8	-	África
T. emetica	10	4	-	África
T. gilgiana	1	-	-	África
T. heudelotti	4	1	-	África
T. monadelpha	-	2	-	África
T. prieuriana	-	2	-	África
T. rubescens	15	-	-	África
T. welwitschii	-	3	-	África
T. connaroides	-	3	52	Ásia
T. sinensis	13	-	54	Ásia

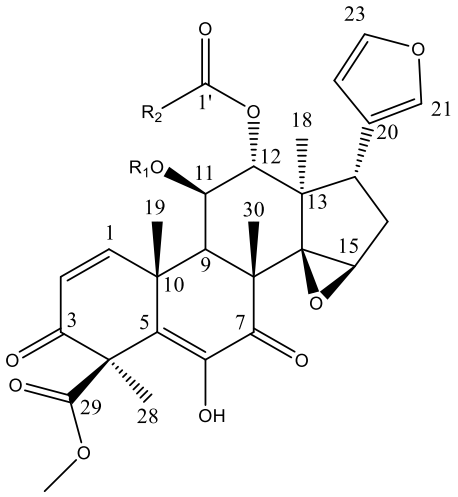
* Essa espécie foi adicionada na tabela após a publicação da revisão

1.10 *Trichilia Pallida*

A *Trichilia pallida* Sw., conhecida popularmente como baga de morcego, ou pelos sinônimos *Trichilia excelsa*, *T. weddelli* e *T. riedelli*, é uma espécie esciófita, pode medir de 4 a 8 m de altura, possui folhas compostas imparipinadas, com folíolos verdes e glabros, com uma tonalidade mais escura e brilhante na face adaxial. Seus frutos são globosos e trivalvares, as sementes globosas, e sua madeira tem uma tonalidade banca-amarelada.[4,59,60]

Tem ocorrência confirmada nas regiões norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e sul (Paraná, Santa Catarina).[4]

A espécie *T. pallida* possui reporte na literatura sobre isolamento de limonoides, Simmonds (2001) isolou cinco limonoides de anéis intactos do extrato acetona das raízes de plantas cultivadas em laboratório (condições de estufa), todos os cinco limonoides pertencentes a classe cedrelona[61] (Figura 1.41).



	R1	R2
1	Ac	CH_2CH_3
2	H	CH_2CH_3
3	Ac	$CH(CH_3)CH_3$
4	H	$CH(CH_3)CH_3$
5	Ac	$CH(CH_3)CH_2CH_3$

Figura 1.41 - Limonoides isolados de *T. pallida* por Simmonds[61].

Como essa espécie já tinha relato de limonoides de anéis intactos, o próximo passo, pensando em biossíntese, seriam os limonoides de anéis seco e rearranjo, os quais poderiam estar em baixa concentração, uma alternativa de

direcionar o isolamento de limonoides não abundantes é a utilização de técnicas mais sensíveis, por isso optou-se por guiar o isolamento dos tetranortriterpenos por cromatografia líquida e ultra eficiência, acoplada em um espectrômetro de massas de alta resolução.

1.11 Uso do LC-MS/MS para direcionar o isolamento de produtos naturais

A espectrometria de massas baseia-se na separação de íons por sua razão massa/carga (*m/z*), essa separação acontece dentro dos analisadores de massas, os mais comuns são os quadrupolos, armadilha de íon (*íontrap)*, tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*) e *orbitrap*, este último é analisador e detector de massas, com a junção de dois ou mais tipos de analisadores houve o desenvolvimento dos equipamentos híbridos, como por exemplo o Q-TOF.[62] Por meio dos equipamentos híbridos foi desenvolvida a espectrometria de massas em tandem, que possibilitou fazer filtragem de íons, os quais podem ser direcionados para uma célula de colisão para serem fragmentados, os íons fragmentos são direcionados para outro analisador de massas, resultando em um espectro de fragmentação com informações estruturais de moléculas conhecidas ou desconhecidas.[62] Os avanços tecnológicos nas fontes de ionização contribuíram significativamente para que a hifenação da cromatografia líquida com equipamentos híbridos de espectrometria de massas ocorressem, como por exemplo o desenvolvimento da fonte de ionização por eletrospray (ESI, do inglês *Electrospray ionization*), a qual é uma técnica de ionização suave, compatível com o modo reverso na CLUE (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência), útil em análises de moléculas de baixo e grande peso molecular, por exemplo, metabólitos secundário e macromoléculas, respectivamente, por essa versatilidade, a ESI é a fonte de ionização mais utilizada na cromatografia líquida

acoplada a espectrômetros de massas de alta resolução (LC-HRMS, do inglês *liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*).[62–64]

A LC-HRMS contribuiu para avanços em estudos dentro das ciências ômicas (metabolômica, proteômica, genômica, etc.), perfil químico e em pesquisas de biossíntese de produtos naturais.[65] Devido à sua sensibilidade, a espectrometria de massas de alta resolução, permite anotações de metabólitos em análises não direcionadas, comparando o espectro de fragmentação do analito desconhecido com o espectro de MS/MS de uma molécula conhecida. Essas anotações podem ser feitas por meio dos softwares de bases de dados, por exemplo a biblioteca PCDL da *Agilent tecnologis*, ou por plataformas onlines como a do GNPS (do ingês*, Global Natural Products Social Molecular Networking*).[65]

Na química orgânica de produtos naturais, um extrato de planta é uma matriz complexa, exigindo várias etapas de fracionamento até chegar a um composto isolado, e após a elucidação estrutural por ressonância magnética nuclear (RMN), a substância isolada pode não ser a de interesse, desse modo, podemos utilizar a LC-HRMS na desreplicação para eliminar extratos e frações que não possuam o perfil químico de interesse, direcionando o pesquisador para o isolamento do metabólito/classe desejado.[66]

Banco de dados com espectros de MS/MS foram criados, apesar de haver diferenças em espectros de fragmentação do mesmo analito em equipamentos diferentes, pela falta de padronização, principalmente, nos parâmetros da célula de colisão,[67] as bases de dados nos direcionam à classes de metabólitos de interesse, contudo na ausência de um "*match*" espectral, podemos utilizar os íons diagnósticos da classe desejada, essa opção é um pouco mais demorada de ser analisada, pois é assumido que alguns íons presentes nos espectros de MS/MS são da classe dos metabólitos desejada para o isolamento.[68] Neste trabalho optou-se por buscar os íons diagnósticos de limonoides em extratos

e frações de *Trichilia pallida* pela ausência de um "*match*" espectral nas bases de dados analisadas.

1.12 Íons diagnósticos da classe dos limonoides

O isolamento de novas moléculas de produtos naturais tem se tornado cada vez mais desafiador, uma vez que muitos estudos na literatura relatam a redescoberta de compostos já conhecidos. Nesse contexto, o uso de técnicas como LC-MS/MS tem se mostrado fundamental na identificação de novas classes de metabólitos. Por exemplo, no estudo de Chen *et al*., os autores construíram um banco de dados contendo informações de espectros de MS e MS/MS de meroterpenoides 5-metilcumarina, identificando íons fragmento comuns, como os de *m/z* 189,05 e *m/z* 135,04, que foram definidos como íons diagnósticos para essa classe de compostos. Ao analisarem o extrato de *Gerbera piloselloides*, os pesquisadores observaram a presença desses íons em espectros de MS/MS de moléculas ainda não descritas, sugerindo similaridade estrutural com os compostos do banco de dados. Com o monitoramento guiado por esses íons diagnósticos, o grupo conseguiu isolar treze novos meroterpenoides 5-metilcumarínicos, previamente não reportados na literatura científica.[69]

O uso de íons diagnósticos tem se mostrado uma estratégia eficaz para a detecção de compostos estruturalmente relacionados, como demonstrado no estudo de Swanson *et al*., no qual fragmentos recorrentes nos espectros de MS/MS do fentanil foram utilizados para rastrear mais de 120 análogos em matrizes biológicas. Essa abordagem analítica evidencia o potencial dos íons diagnósticos na triagem direcionada de substâncias pertencentes a uma mesma classe química.[70] No entanto, quando aplicada aos limonoides, essa estratégia torna-se desafiadora, pois a elevada diversidade estrutural desses metabólitos, que abrange desde limonoides de anel intacto até estruturas altamente rearranjadas, como as da classe mexicanolideo, tornando as análises um pouco complexas e

podem dificultar a definição de perfis de fragmentação consistentes para os limonoides.

Estudos baseados na relação da estrutura-fragmento estão disponíveis na literatura. Por exemplo, no trabalho de Mulani *et al*., foram identificados dez íons comuns nos espectros de MS/MS de trinta diferentes estruturas de limonoides referentes a derivados da azadirona, epoxiazadirona e gedunina. Os íons fragmentos comuns foram: *m/z* 109,0288; *m/z* 109,0652; *m/z* 109;1016; *m/z* 121,1015; *m/z* 135,0806; *m/z* 137,0963; *m/z* 149,0963; *m/z* 173,0962; *m/z* 175,1119 e *m/z* 213,1274.[71]

Cui *et al*. identificaram treze limonoides nos frutos de *Melia toosendan* estabelecendo os íons diagnósticos de limonoides para as classes trichilina, nimbina e vilasinina, aplicando uma voltagem alta na célula de colisão, entorno de 50 eV[72] (Figura 1.42). Ao considerar a possibilidade de um anel furando intacto, os íons diagnósticos que apresentam o fragmento do furano (Figura 1.43) são fundamentais para acompanhar/monitorar possíveis limonoides.

O trabalho de Cui é excelente para auxiliar na busca por limonoides utilizando LC-MS/MS, mas não necessariamente a estrutura que apresentar os quatro íons diagnósticos da trichilina, por exemplo, vai pertencer ao grupo das trichilinas, pois como relatado no trabalho de Mulani, pequenas modificações na estrutura geram mudanças no perfil de fragmentação.[71] Entretanto, os íons diagnósticos apresentados têm total relevância para inferir que aquele perfil de fragmentação pode ser de uma molécula da classe dos limonoides.

Os limonoides, em sua grande maioria, apresentam grupos como O-acetil e O-tigloil em sua estrutura. Por isso, juntamente com os íons diagnósticos específicas de limonoides, foi monitorado também as perdas, no espectro de MS/MS, referentes aos grupos O-acetil (60,02 Da) e O-tigloil (100,05 Da) para dar mais confiabilidade para direcionar os extratos e frações para o isolamento de limonoides.

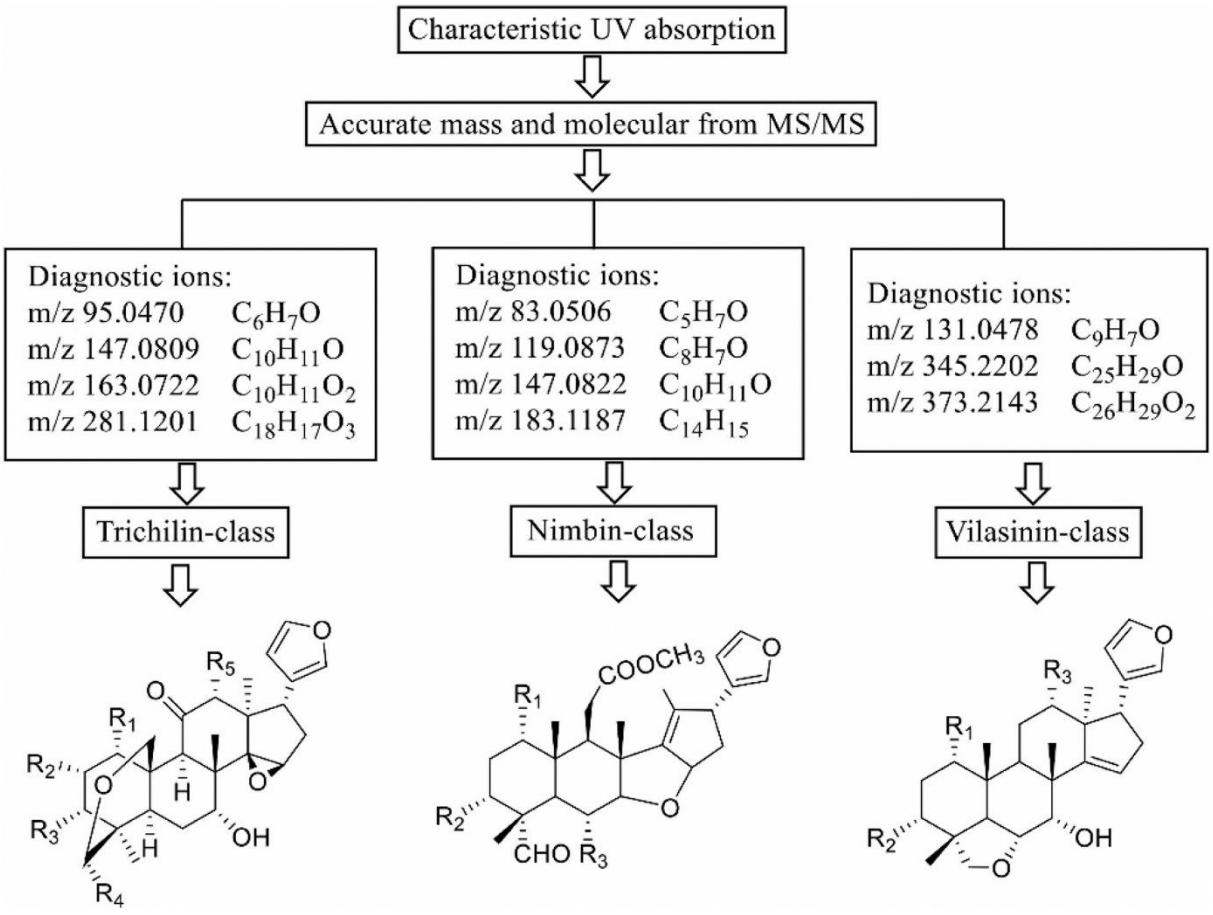


Figura 1.42 - Íons diagnósticos descritos para as classes trichilina, nimbina e vilasinina. Imagem retirada do artigo de Cui[72].

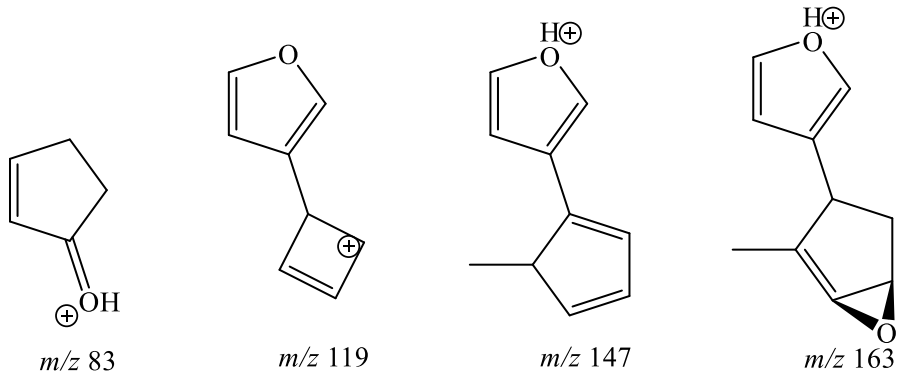


Figura 1.43 – Fragmentos propostos por Cui para os íons fragmentos m/z 119, m/z 147 e m/z 163. O íon m/z 83 não pertence ao furano.

2 OBJETIVO GERAL

- Utilizar o LC-MS/MS para confirmar a presença de classes de limonoides que possam ter estruturas mais complexas e rearranjadas, e assim contribuir com a quimiossistemática das espécies de *Trichilia* brasileiras.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver métodos analíticos por UHPLC-QTOF-MS/MS, capaz de direcionar a escolha de extratos e frações para o isolamento de limonoides;
- Desenvolver métodos analíticos por HPLC com detector de UV ou DAD monitorando o comprimento de onda (λ) de 215 nm;
- Confirmar a estrutura dos isolados por RMN 1D e 2D.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Solventes
  - Para a extração de metabólitos secundários e realização da cromatografia em coluna de bancada, os solventes foram previamente destilados no DQ-UFSCar.
  - Nas análises de RMN, utilizou-se benzeno-d_6 (deuterado).
  - Os solventes empregados na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) eram de grau HPLC das marcas Supelco e JT Baker. A água utilizada foi obtida do sistema de ultrapurificação Simplicity® da Merck Millipore.
  - Nas análises de massas de alta resolução, foram utilizados solventes de grau LC-MS da Supelco, e o ácido fórmico de grau LC-MS da marca Êxodo.
- Fase estacionária para cromatografia em coluna e coluna de vidro
  - Sílica gel de 230-400 mesh.
  - Foram utilizadas colunas de vidro de borossilicato de tamanhos variados.
- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)
  - Folhas de alumínio de sílica gel 60 F_{254}
- Reveladores
  - Câmara de UV (254 e 365 nm)
  - Vanilina sulfúrica
- Coluna para cromatografia líquida de alta eficiência
  - Gemini® 5µm C18 110Å (250 x 4,6 mm) Part No: 00G-4435-E0
  - Gemini® 5µm C18 110Å (250 x 10 mm) Part No: 00G-4435-N0
  - Synergi 4µm MAX-RP 80Å (250 x 4,6 mm) Part No: 00G-4367-E0

3.2 Equipamentos

- Espectrômetro de Ressonância Nuclear
  - Bruker Avance III – 9,4 Tesla
  - Bruker Avance III - 14,1 Tesla equipado com uma sonda criogênica TCI de 5 mm, operando na frequência de 600 MHz para o hidrogênio e 150 MHz para o Carbono-13
- Espectrômetro de massas de alta resolução
  - Agilent 6545 ESI-QTOF-MS instrument (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA)
- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC – do inglês*: Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)
  - Agilent 1290 Infinity II
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – do inglês: *High-Performance Liquid Chromatography*)
  - Agilent 1200 Series
  - Shimadzu SPD-M20A
- Rotaevaporadores
  - BÜCHI R-215, R-205 e R-200, o primeiro fica acoplado a uma bomba de vácuo V-700 e os dois últimos a uma bomba de vácuo MZ 2C NT
- Balanças
  - Modelo AY220
  - Modelo HPBG-2285Di
- Ultra turrax
  - IKA® RW 20 digital
- Estufa de secagem
  - Estufa com circulação e renovação de ar TE-394/3 (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil)

3.3 Coleta da espécie *Trichilia Pallida* e preparação dos extratos

3.3.1 Coleta da espécie *Trichilia Pallida*

A espécie estudada, *Trichilia Pallida*, foi coletada no Parque Estadual de Porto Ferreira (21°51'22.1"S, 47°26'07.4"W) no dia 23/02/2023 localizado no município de Porto Ferreira – SP (Figura 3.1). O local pertence a fazenda Santa Maria e sua área foi adquirida pelo governo de São Paulo em 1962. O responsável pela coleta e identificação da espécie foi o Prof. Dr. Leonardo Borges, professor no departamento de biologia na UFSCar, a exsicata foi depositada no SPSC herbarium.

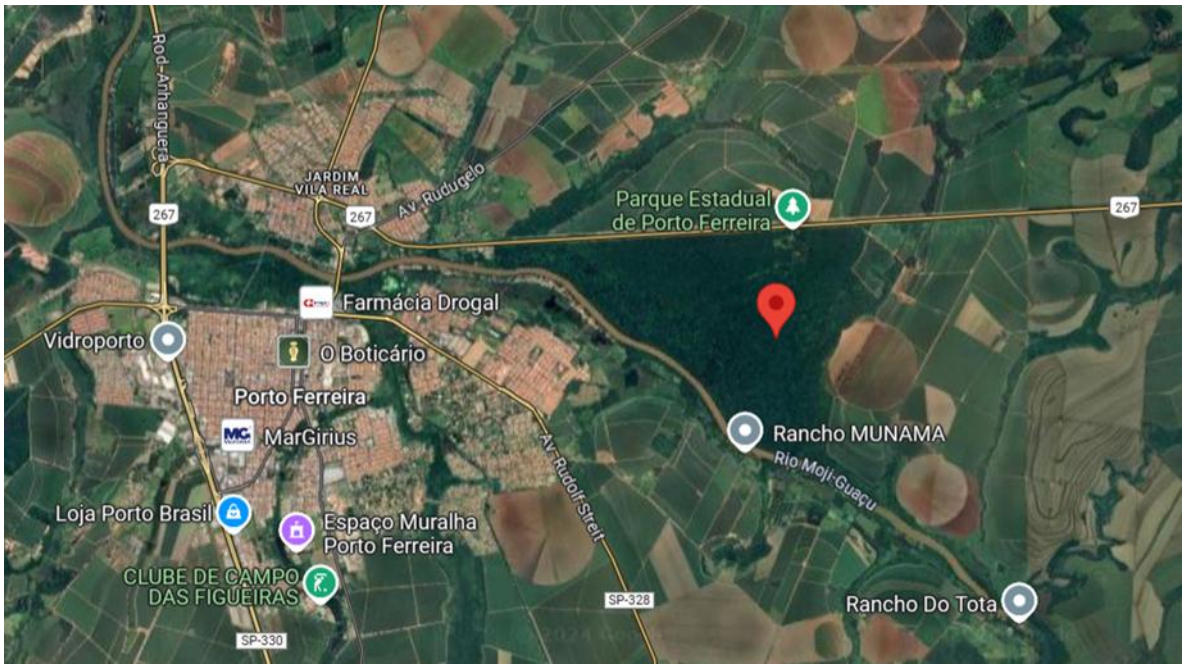


Figura 3.1 - Imagem via satélite do município de Porte Ferreira-SP, em destaque (vermelho) o parque estadual de Porto Ferreira, local da coleta do material de estudo. Imagem extraída do Software Google Maps® em 05/01/2025.

3.3.2 Preparo dos extratos

A espécie *T. Pallida* foi separada em folhas, casca do tronco, tronco e raiz. Todas as partes vegetais foram secas em estufa com circulação de ar e a

temperatura fixada a 40° C durante sete dias. Após esse período, as cascas e folhas foram trituradas em um liquidificador industrial, o tronco e a raiz foram triturados em um moinho de facas. O material seco e moído foi levado para a extração assistida por homogeneização via turrax, em ordem crescente de polaridade utilizando os solventes: Hexano, Acetato de Etila, Etanol e Etanol:H_2O (1:1) em temperatura ambiente (Figura 3.2). Cada extração tinha um tempo de duração de 12h e foi repetido duas vezes para cada solvente.

Os extratos foram concentrados sob pressão reduzida em rotaevaporadores, com o banho de aquecimento em 38° C. Esses extratos concentrados foram transferidos para recipientes adequados e armazenados em freezer vertical. O rendimento dos extratos foi calculado pela fórmula: Teor de extrato = (Massa do extrato/Massa da amostra total) x 100. (Tabela 3.1)

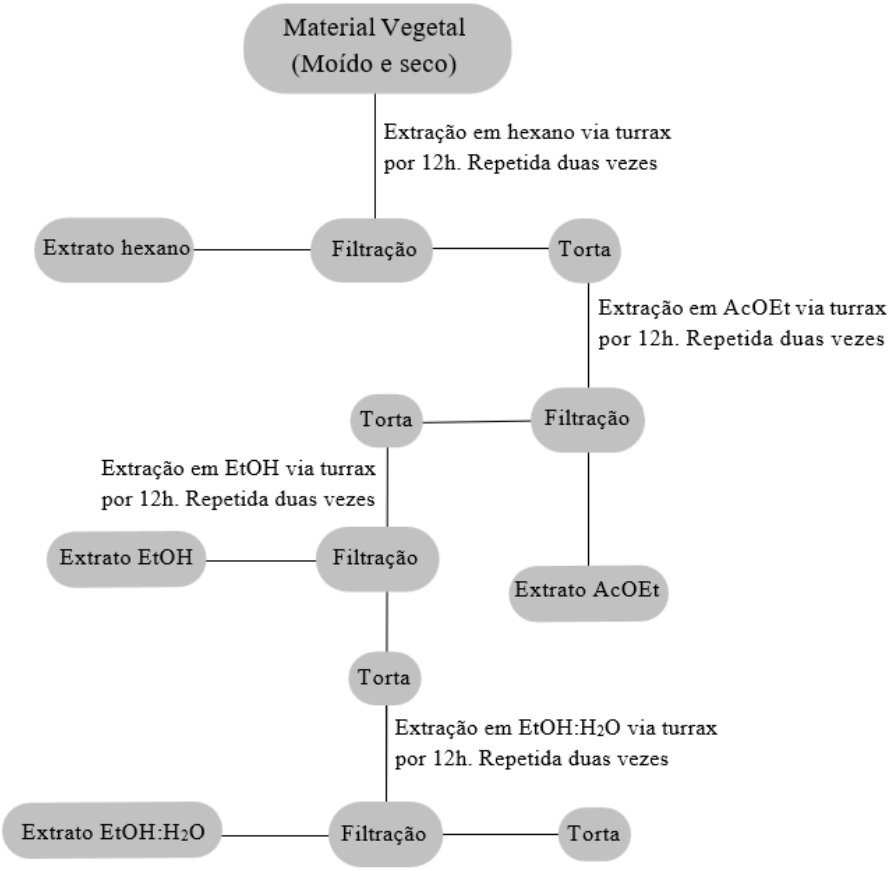


Figura 3.2 - Fluxograma das extrações.

Tabela 3.1 - Quantidade de material vegetal utilizado para extração assistida por homogeneização via turrax, quantidade de extrato e rendimento

Tronco (610 g)		Rendimento (%)
Hexano	1,54 g	0,25
AcOEt	4,7 g	0,77
Etanol	4,86 g	0,79
Etanol:Água	6,93 g	1,14
Casca do tronco (392 g)		
Hexano	9,17 g	2,34
AcOEt	9,4 g	2,40
Etanol	8,78 g	2,24
Etanol:Água	17,55 g	4,48
Folhas (500 g)		
Hexano	15,42 g	3,08
AcOEt	21,0 g	4,2
Etanol	11,53 g	2,31
Etanol:Água	27,8 g	5,56
Raíz (600 g)		
Hexano	4,96 g	0,83
AcOEt	8,16 g	1,36
Etanol	8,1 g	1,35
Etanol:Água	13,2 g	2,2

3.4 Escolha e Fracionamento do Extrato AcOEt da Raiz da *Trichilia pallida*

A revisão na literatura mostrou a utilização de raízes para o isolamento de limonoides com esqueletos complexos em algumas espécies de *Trichilia*, por esse motivo optou-se por utilizar os extratos da raiz de *T. Pallida* para o desenvolvimento da pesquisa. Foram um total de quatro extratos: Hexano, denominado **TPR-Hex**; Acetato de Etila, denominado **TPR-AcOEt**; Etanol, denominado **TPR-EtOH** e por último o extrato hidroalcóolico Etanol:Água na proporção 1:1, denominado **TPR-EtOH-H_2O**.

Os extratos foram analisados por LC-MS/MS no modo positivo de ionização, para essas análises 1 mg de cada extrato foi retirado, solubilizado em 1 mL de uma mistura de ACN:MeOH (1:1) grau LC-MS, a solução resultante foi filtrada e 20 µL foram retirados e adicionados em "*vials"* âmbar de 1500 µL, conseguinte foram adicionados mais 980 µL da solução ACN:MeOH (1:1), desse modo as soluções de cada extrato ficaram na concentração de 20 ppm.

Os parâmetros utilizados no equipamento foram otimizados para que pudesse gerar mais íons diagnósticos da classe dos limonoides e a faixa de *m/z* monitorada foi de150-1500 para o MS, e de 70-1500 para o MS/MS, com uma taxa de varredura de 3 espectros/secundo para ambos. As condições da fonte ESI foram as seguintes: tensão capilar 4000 V, nozzle 700 V, temperatura do gás 300 °C, gás de secagem 11 L min^{-1}, nebulizador 35 psi, gás de revestimento 290 °C em um fluxo de 10 L min^{-1}, fragmentador de 150 V, skimmer de 65 V. Para experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) optou-se por adquirir os espectros de MS/MS em rampa de energia de colisão. O volume de injeção foi de 3,0 µL. A fase móvel consistiu em H_2O + 0,1% de ácido fórmico (A) e ACN + 0,1% de ácido fórmico (B). A coluna cromatográfica usada foi uma Zorbax EC-C18 1,8 µm (4,6 x 50 mm). Os dados foram analisados usando o *Qualitative Navigator* B.10.000.

O método cromatográfico iniciou em 10% de B, chegou a 90% de B em 12 minutos, de 12-15 minutos em 100% de B, de 15-17 minutos foi mantido 100% de B, de 17-19 minutos 10% de B e de 19-22 minutos 10% de B.

Os extratos TPR-Hex e TPR-AcOEt após análise dos espectros de massas, apresentaram íons diagnósticos da classe dos limonoides. Foi selecionado o TPR-AcOEt para o prosseguimento do trabalho de isolamento, optou-se por fazer uma filtração "flash" em sílica gel (230-400 mesh) com cinco eluentes diferentes: Hexano, Hexano-AcOEt (1:1), AcOEt, AcOEt-MeOH (1:1) e MeOH (Figura 3.3). Todas as frações foram analisadas por LC-MS/MS.

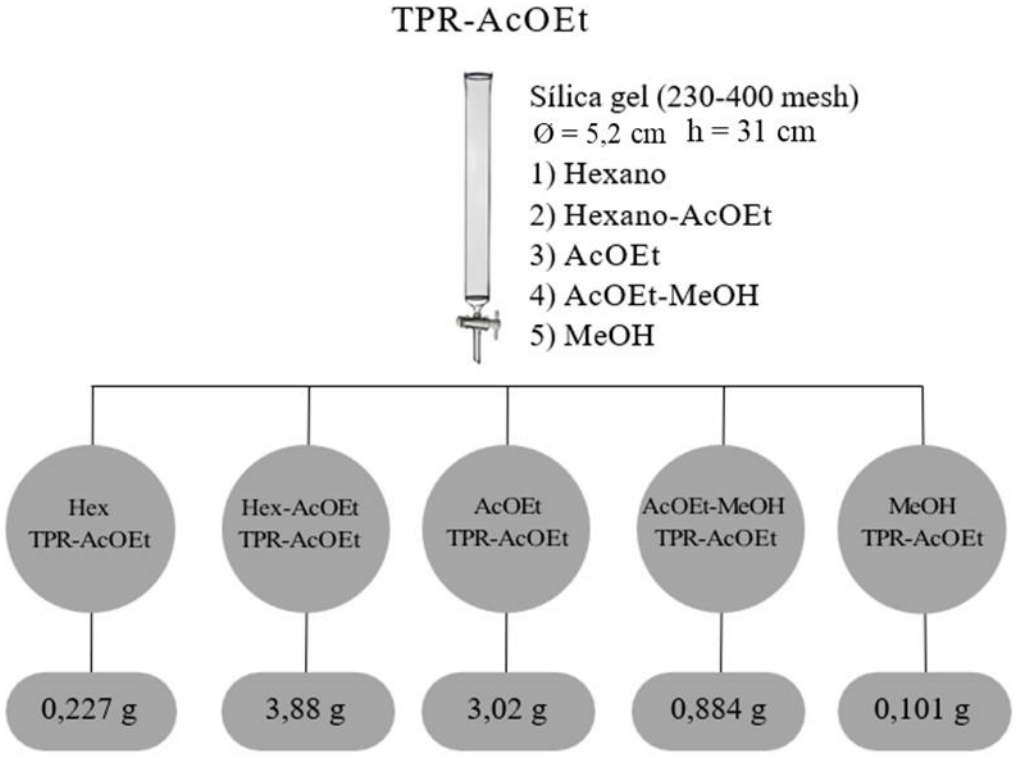


Figura 3.3 - Representação da filtração "flash" em sílica gel. É demonstrado cada fracionamento com a respectiva massa (g) obtida para cada fração.

As três primeiras frações resultante da filtração "flash" do extrato TPR-AcOEt apresentaram íons diagnósticos que poderiam ser referentes a limonoides. As frações (2) Hex-AcOEt-TPR-AcOEt e (3) AcOEt -TPR-AcOEt foram selecionadas e submetidas a cromatografia de adsorção em sílica gel (230-

400 mesh), as frações foram reunidas por similaridade na cromatografia em camada delgada (CCD), um total de 36 frações para o Hex-AcOEt-TPR-AcOEt (Figura 3.4) e 27 frações para AcOEt-TPR-AcOEt (Figura 3.5), as 63 frações foram analisadas por LC-MS/MS para direcionar em quais frações os íons de interesse estavam presentes com boas abundâncias nos espectros de MS e MS/MS.

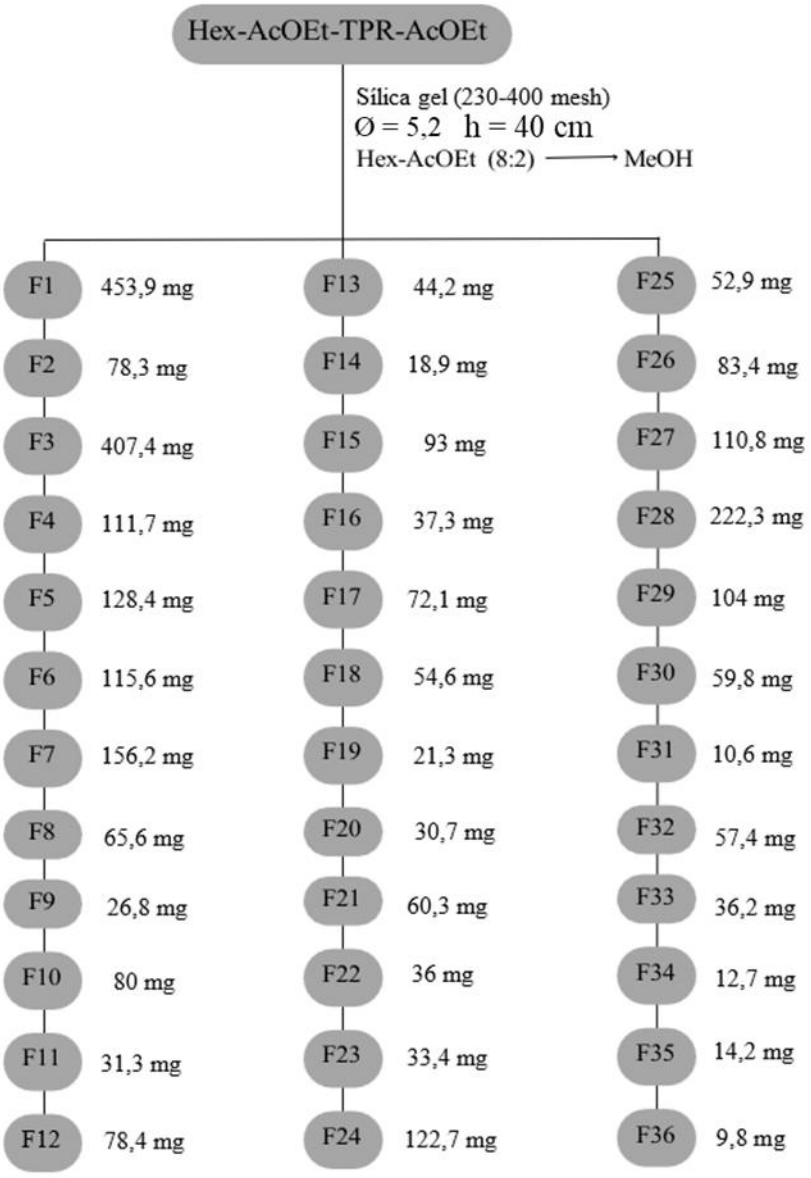


Figura 3.4 - Frações e massas obtidas após a cromatografia por adsorção em sílica gel da fração Hex-AcOEt-TPR-AcOEt.

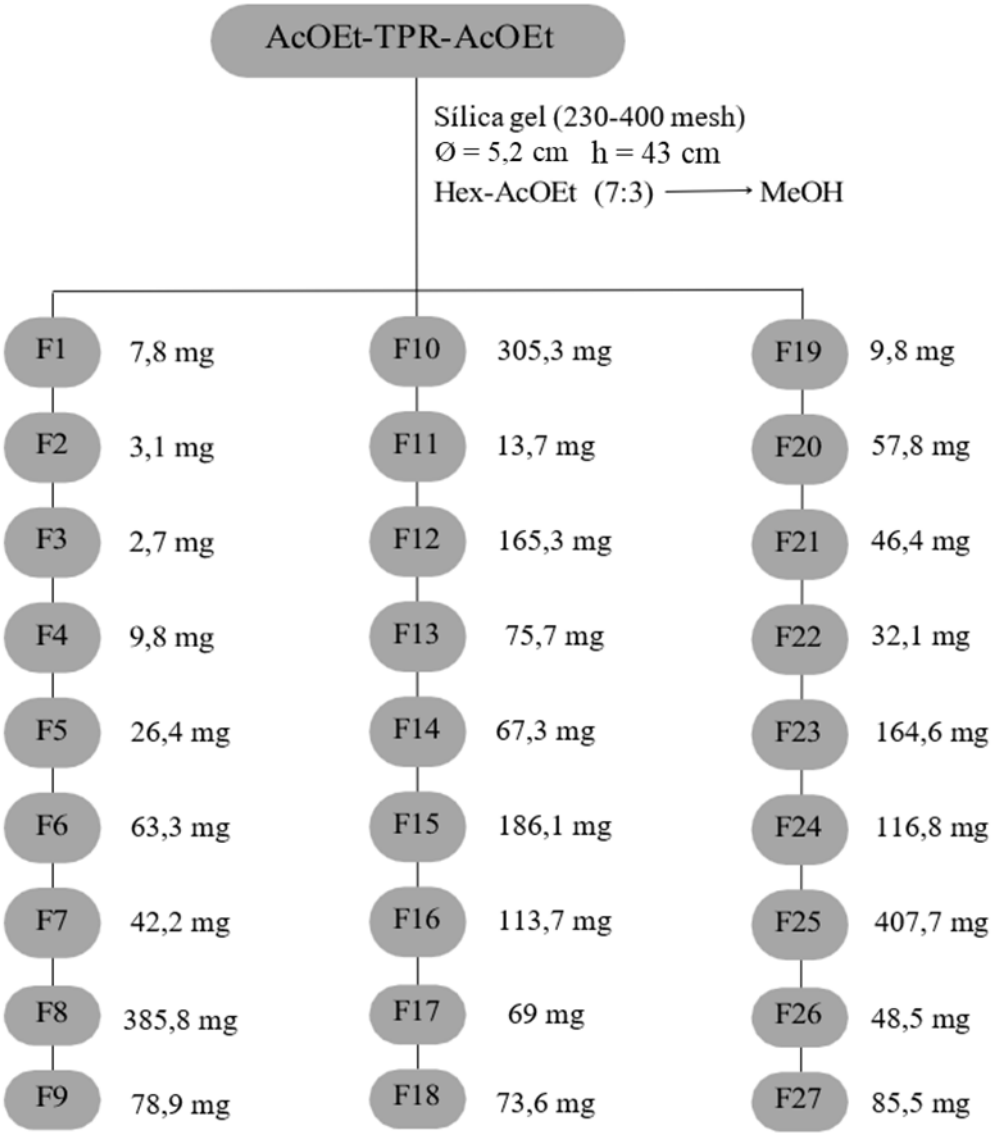


Figura 3.5 - Frações e massas obtidas após a cromatografia por adsorção em sílica gel da fração AcOEt-TPR-AcOEt.

3.5 Isolamento por CLAE

A seguir serão apresentadas as metodologias de isolamento utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência. As frações oriundas do fracionamento do sub-extrato Hex-AcOEt-TPR-AcOEt foram identificadas como A-FX, onde X é referente ao número da fração. As frações geradas do a partir do fracionamento do sub-extrato AcOEt-TPR-AcOEt foram denominadas como B-FX.

A fração B-F10 foi submetida a uma extração em fase sólida (SPE - do inglês: *Solid Phase Extraction*) em cartucho contendo 10 g de sílica C18. A amostra foi primeiramente solubilizada em 20 mL de uma solução contendo ACN:H_2O (20:80), a amostra foi centrifugada e apenas o sobrenadante foi aplicado no cartucho o qual já estava previamente ativado e condicionado de acordo com o fabricante. Dessa extração originaram-se quatro subfrações, ressaltando que a última é a limpeza do cartucho (Figura 3.6).

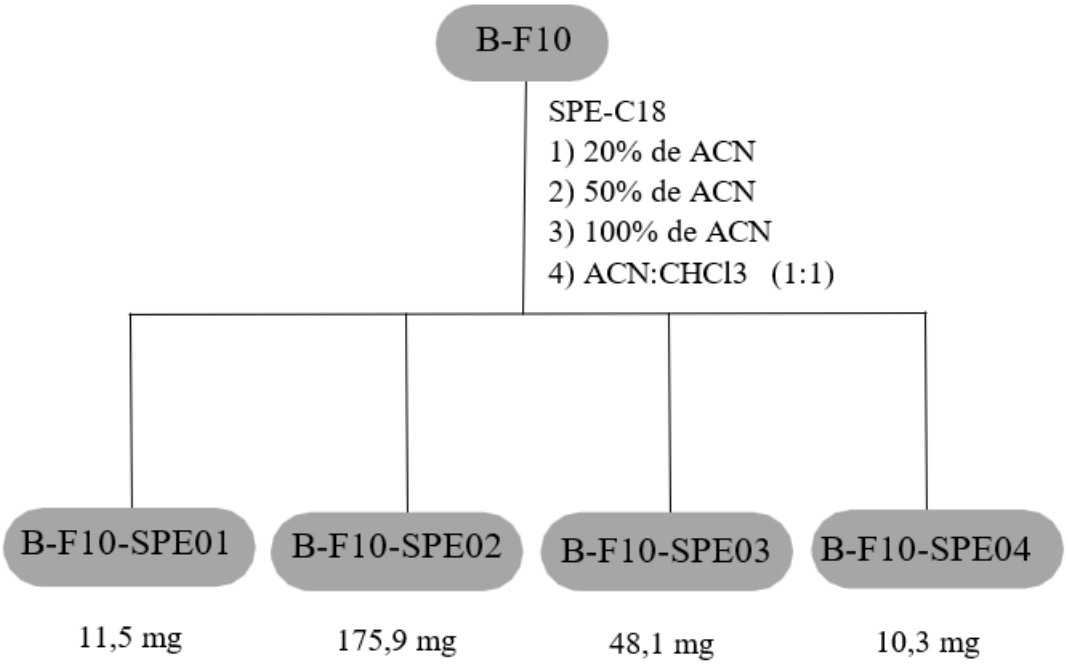


Figura 3.6 - Fluxograma da extração em fase sólida em cartucho de SPE-C18.

A subfração B-F10-SPE03 foi analisada por CLAE-UV monitorando o comprimento de onda (λ) 215 nm, (Figura 3.7) a proporção inicial da fase móvel foi de 50% de H_2O (solvente A) e 50% de ACN (solvente B), em um fluxo de 1 $mL.min^{-1}$ até 5 minutos, de 5 – 6 minutos a concentração de ACN foi aumentada para 70% e mantida até 9 minutos, de 9 – 10 minutos chegou-se a 100% de ACN, de 10 – 13 min100% de ACN, 13 – 14 min 50% de ACN e 14 – 15 min 50% de ACN. Do limonoide 01 foram isolados 2,4 mg.

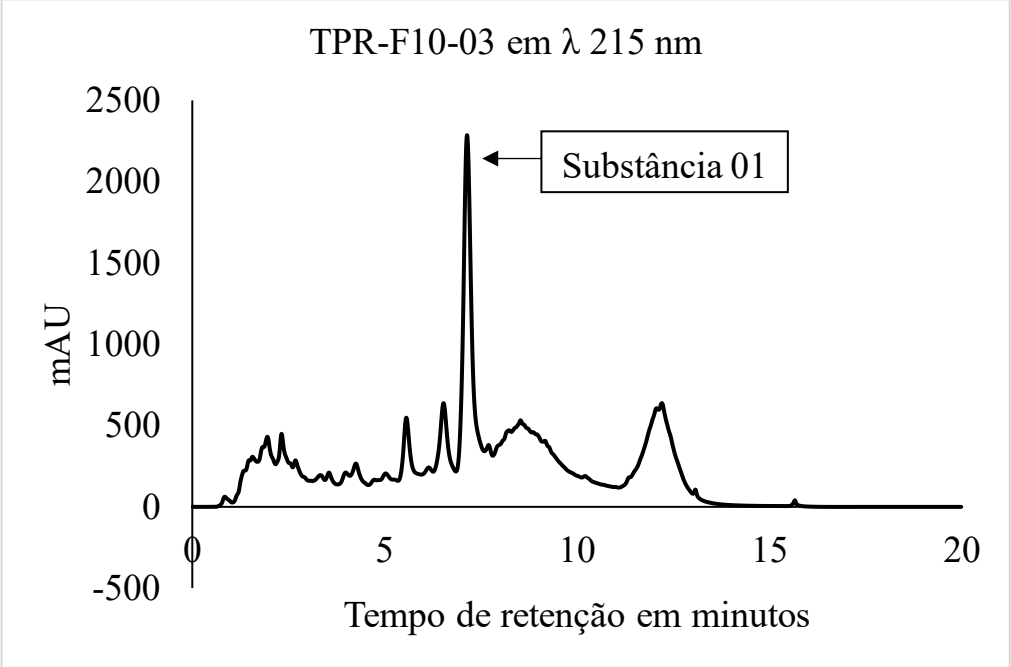


Figura 3.7 - Cromatograma em 215 nm da subfração B-F10-SPE03.

A subfração B-F10-SPE02 foi explorada por CLAE-UV no comprimento de onda (λ) 215 nm, (Figura 3.8) com a fase móvel composta de H_2O na linha A, e ACN na linha B em rampas de gradiente: 0 – 2 min 30% de ACN, 2 – 4 35% de ACN, 4 – 6 min 35% de ACN, 6 – 9 min 40% de ACN, 9 – 13 min 40% de ACN, 13 – 14 min 100% de ACN, 14 – 17 min 100% de ACN, 17 – 18 min 30% de ACN e 18 – 21 min 30% de ACN. Do limonoide 02 foram isolados 29,2 mg.

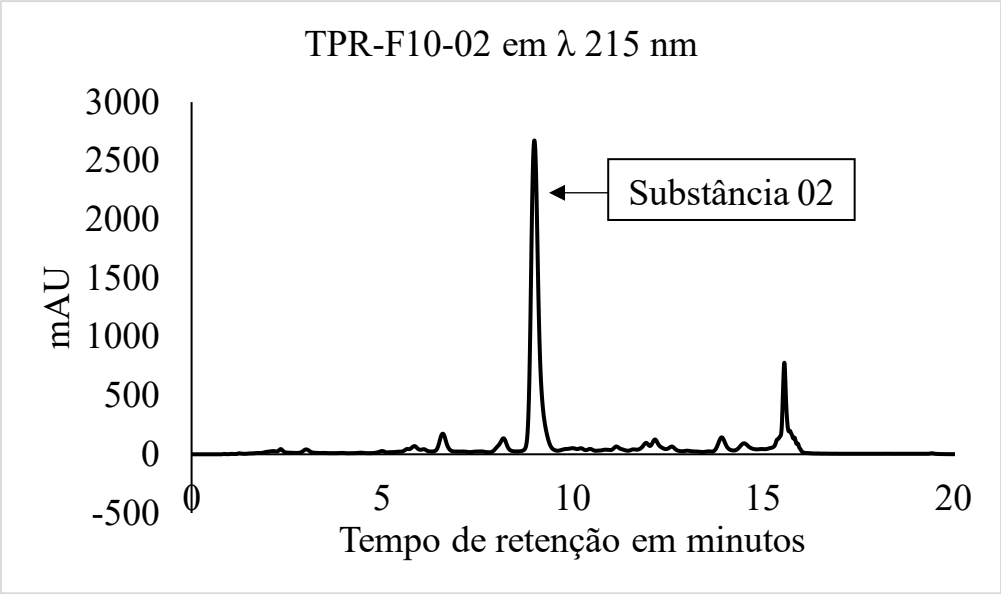


Figura 3.8 - Cromatograma em 215 nm da subfração B-F10-SPE02.

As coletas feitas na fração B-F8 foram desenvolvidas no HPLC Shimadzu semipreparativo. Optou-se pelo modo isocrático de eluição em fluxo de 2,5 $mL.min^{-1}$ com a fase móvel composto de 40% de ACN e 60% de H_2O. Na Figura 3.9 é demonstrado o cromatograma obtido. Dos limonoides 03, 04 e 05 foram isolados, respectivamente, 7,7 mg, 4,3 mg e 3,1 mg.

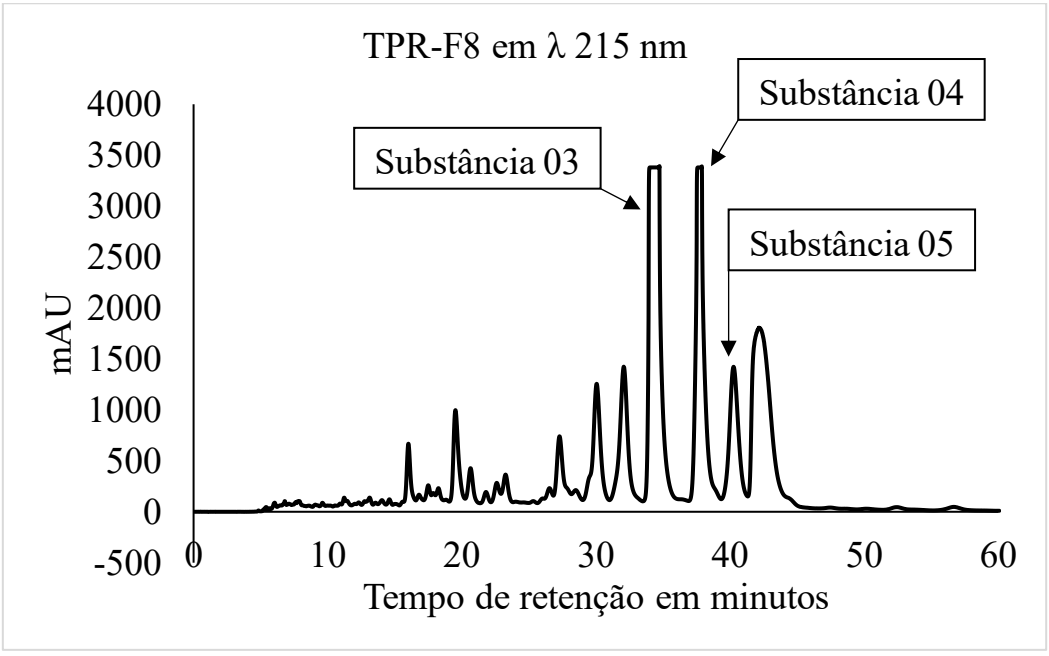


Figura 3.9 - Cromatograma da fração B-F8 em 215 nm.

O método desenvolvido para a fração B-F21 por CLAE-UV tinha a fase móvel composta por H_2O e ACN com as seguintes proporções: 0 – 13 min 32% de ACN, 13 – 14 min 100% de ACN, 14 – 17 min 100% de ACN, 17 – 18 min 32% de ACN e de 18 – 21 min 32% de ACN. No cromatograma é demonstrado qual banda cromatográfica pertence ao limonoide 06 (Figura 3.10). Do limonoide 06 foram isolados 4,9 mg.

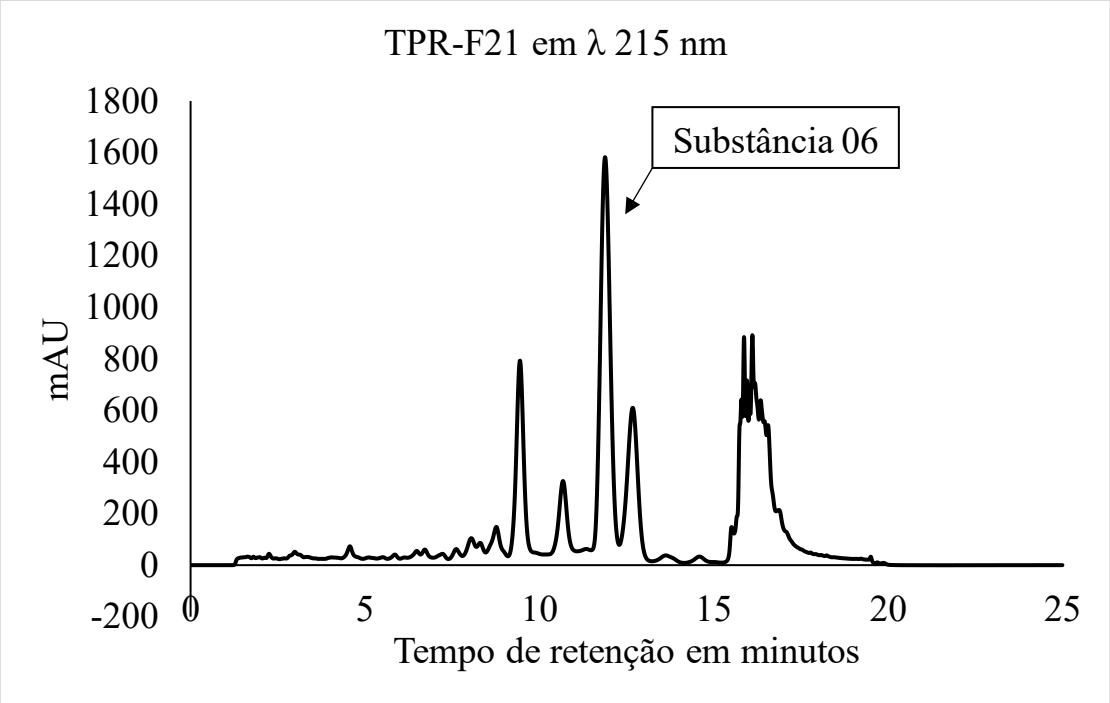


Figura 3.10 - Cromatograma da fração B-F21 em 215 nm.

A fração B-F13 foi submetida a análise por CLAE-UV, em um fluxo de 2 $mL.min^{-1}$, a fase móvel utilizada foi composta de H_2O e ACN, solventes A e B respectivamente, no modo isocrático de eluição com 50% de ACN durante 38 minutos de corrida (Figura 3.11). Dos limonoides 07, 08 e 09 foram isolados, respectivamente, 2,3 mg, 2,7 mg e 8,1 mg.

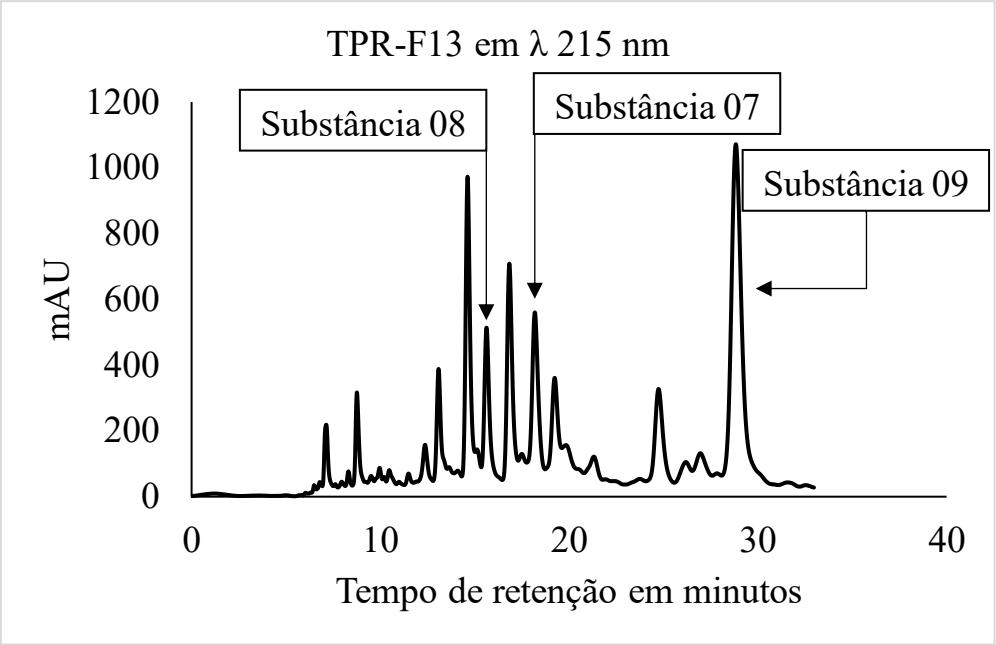


Figura 3.11 - Cromatograma da fração B-F13 em 215 nm.

A fração B-F14 foi analisada por CLAE-UV no comprimento de onda de 215 nm, com fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, com a fase móvel composta por H_2O na linha A e ACN na linha B, seguindo o gradiente que iniciou em 43% de ACN até 15 minutos, de 15 – 20 min 90% de ACN, 20 – 23 90% de ACN, 23 – 24 43% de ACN e de 24 – 30 min 43% de ACN (Figura 3.12). Do limonoide 10 foram isolados 3,0 mg.

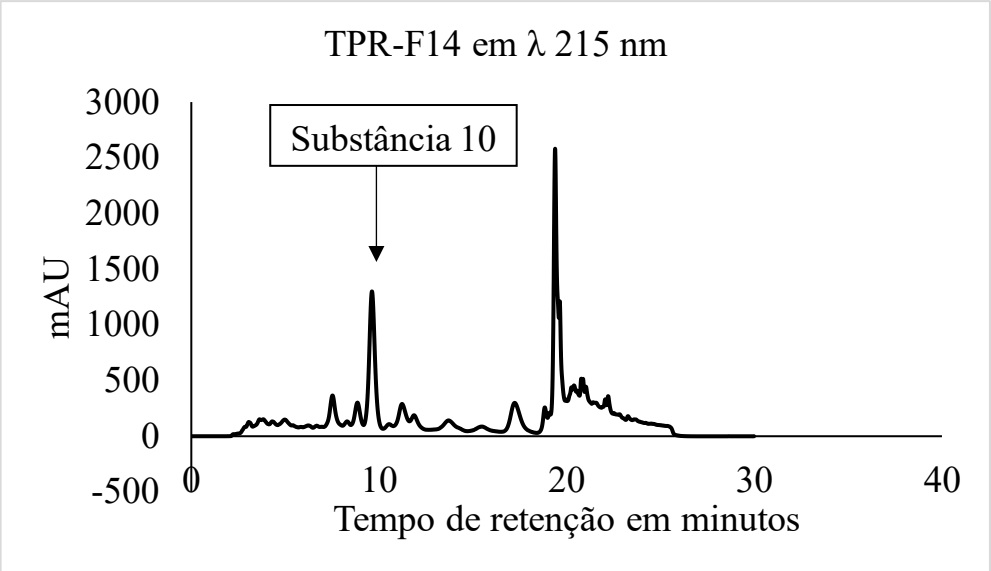


Figura 3.12 - Cromatograma da fração B-F14 em 215 nm.

A fração B-F15 foi submetida a analise por CLAE-UV com os seguintes parâmetros: fluxo de 2,5 mL.min^{-1}, fase móvel composta de H_2O e ACN. Para essa fração foi utilizado o modo isocrático de eluição, 50% de ACN (Figura 3.13). Do limonoide 11 foram isolados 3,1 mg.

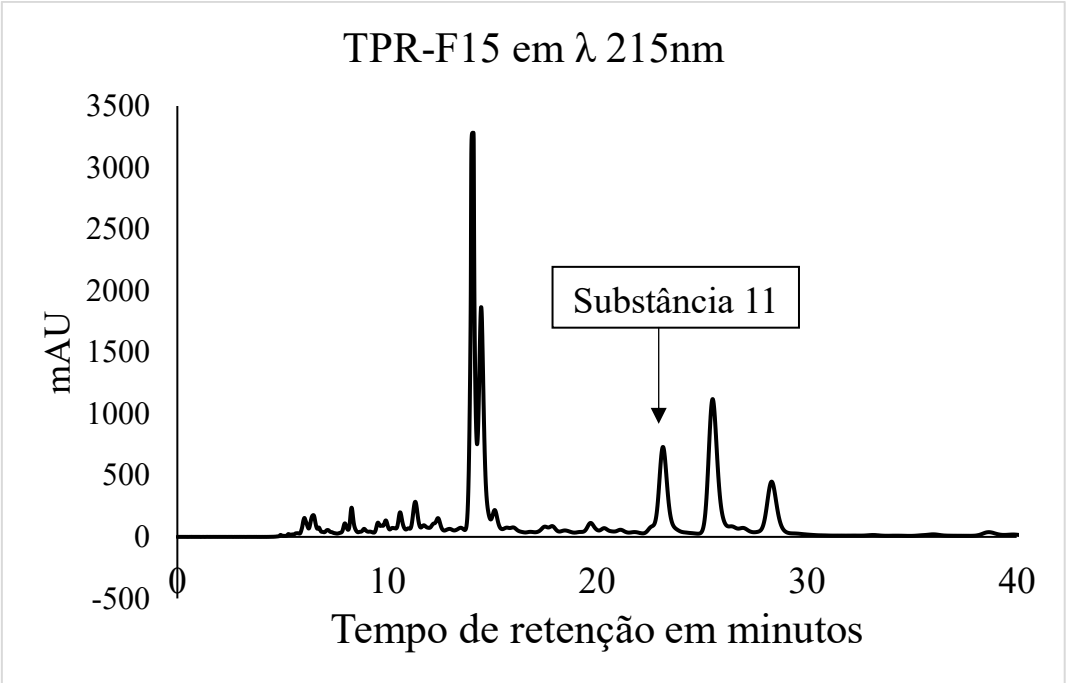


Figura 3.13 - Cromatograma da fração B-F15 em 215 nm.

A fração B-F22 foi analisada por CLAE-UV no comprimento de onda de 215 nm, com fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, com a fase móvel composta de H_2O e ACN. O gradiente iniciou em 31% de ACN até 15 minutos, de 15 – 16 min 100% de ACN, 16 – 22 100% de ACN, 22 – 23 31% de ACN e de 23 – 30 min 31% de ACN (Figura 3.14). Do limonoide 12 foram isolados 3,8 mg.

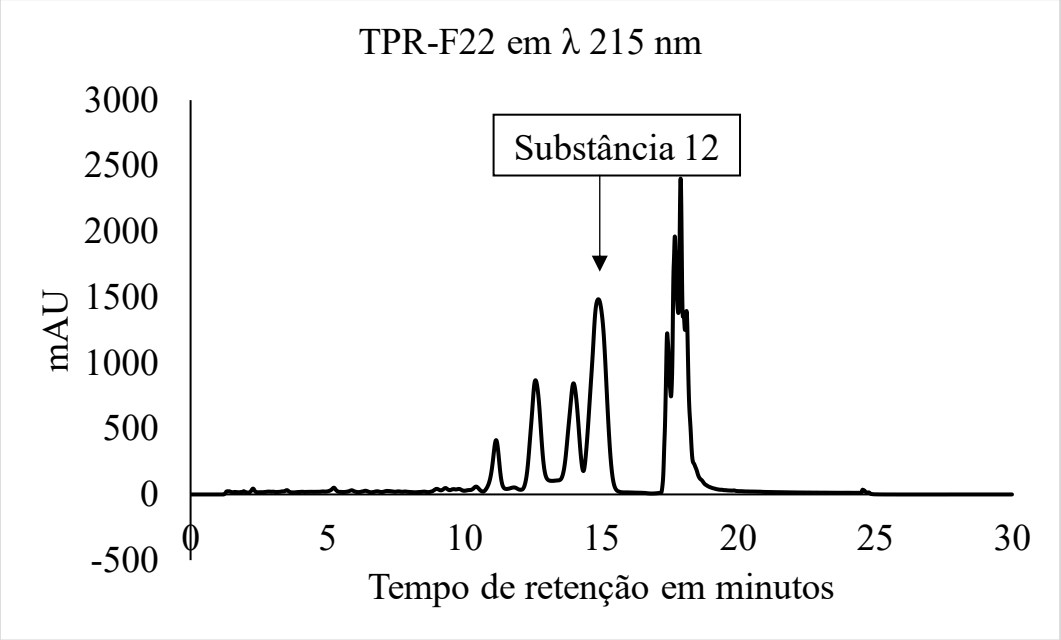


Figura 3.14 - Cromatograma da fração B-F22 em 215 nm.

A última fração a ser analisada por CLAE-UV foi a A-F24, colocar os parâmetros: fluxo de 2,5 $mL.min^{-1}$ no modo isocrático de eluição com 75% de ACN (Figura 3.15). Do limonoide 13 foram isolados 8,0 mg.

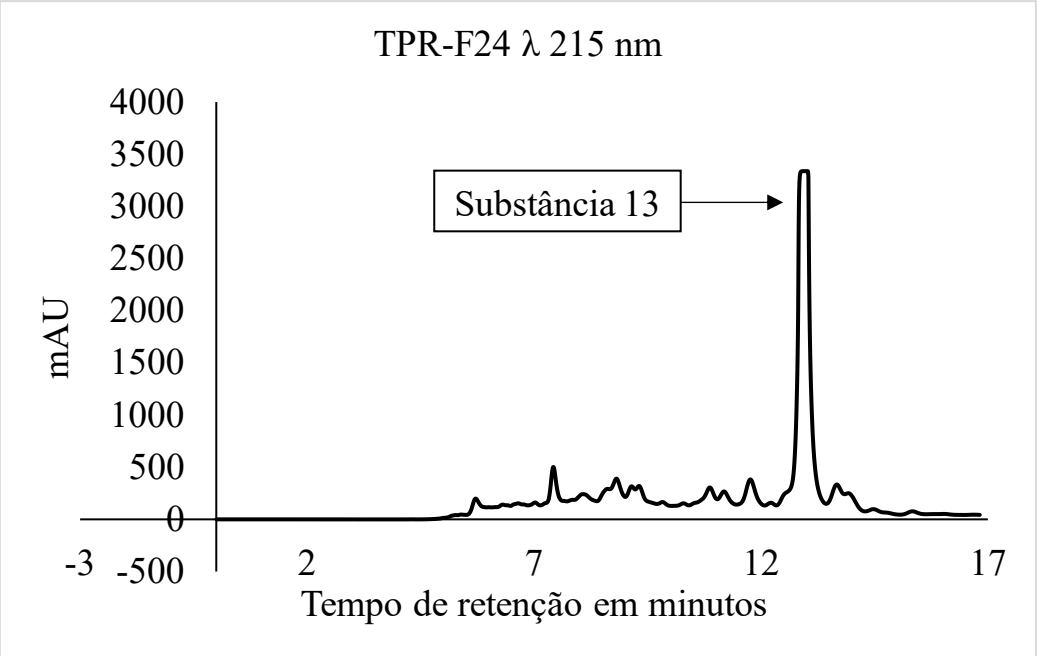


Figura 3.15 - Cromatograma da fração A-F24 em 215 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados do isolamento e caracterização de 11 limonoides e 2 norlimonoides, obtidos após o estudo com as raízes de *Trichilia pallida*. Esses metabólitos estão sendo descritos pela primeira vez no gênero *Trichilia*. O Isolamento foi guiado por LC-MS/MS e as estruturas foram caracterizadas por RMN 1D e 2D.

4.1 Análise dos extratos de raiz da *Trichilia pallida* por LC-MS/MS

A aplicação de análises por LC-MS/MS guiadas por íons diagnósticos demonstrou ser uma abordagem eficaz na seleção de frações prioritárias para o isolamento de metabólitos secundários. Essa estratégia já havia sido bem-sucedida em estudos anteriores, como o de Chen *et al*.,[69] no qual o uso de íons fragmentos específicos permitiu a identificação e o direcionamento do isolamento de novas moléculas bioativas. De forma semelhante, Cui *et al*.[72] definiram íons diagnósticos para subclasses de limonoides, possibilitando uma triagem seletiva em matrizes vegetais complexas. Considerando essas evidências, este estudo empregou o monitoramento de íons fragmentos característicos como ferramenta central na escolha de amostras promissoras, o que contribuiu para a purificação direcionada de compostos inéditos. A adoção dessa estratégia resultou em maior eficiência na prospecção química, reduzindo significativamente o número de frações a serem avaliadas por métodos convencionais de isolamento.

Os extratos TPR-Hex, TPR-AcOEt, TPR-EtOH e TPR-EtOH-H_2O foram analisados por LC-MS/MS e processados no software *MassHunter qualitative analysis* (*Navigator*) 8.00 e/ou 10.00. Nesse software é possível verificar três tipos de cromatogramas: o cromatograma de íon totais (TIC, do inglês *Total Ion Chromatogra*), o qual apresenta a soma das intensidades de todos os íons detectados em cada ponto do tempo de retenção; o cromatograma de íon

extraído (EIC, do inglês *Extracted Ion Chromatogram*) gerado a partir da seleção de um valor de *m/z* específico, resultando na extração da representação gráfica (banda cromatográfica) correspondente ao íon selecionado; e o cromatograma do pico base (BPC – do inglês: *base peak chromatogram*), que representa o íon de maior intensidade detectado na aquisição do espectro em cada no tempo de retenção. Por destacar apenas os sinais mais intensos no intervalo de *m/z* selecionado, o BPC foi utilizado para mapear as regiões com maior abundância íons, no intervalo de *m/z* 300–1000, facilitando a seleção de intervalos de tempo para posterior extração e interpretação dos espectros de massas (MS).

A extração do BPC para o extrato TPR-AcOEt apresentou uma maior distribuição de bandas cromatográficas em comparação com os demais extratos. Em cada banda cromatográfica foram extraídos os espectros de MS e os espectros de MS/MS dos íons de maior intensidade.

A extração dos espectros de MS no intervalo de tempo de 10,14 – 10,64 min apresentou o íon de *m/z* 649,2986 como mais intenso, com a ampliação do espectro de MS na faixa de *m/z* 510 - 790 foi observada uma diferença de 21,98 Da entre o íon *m/z* 649,2986 e o íon *m/z* 627,3160. Essa diferença sugere que o íon *m/z* 649,2986 corresponde a molécula cationizada $(M+Na)^+$, enquanto o íon *m/z* 627,3160 corresponde à forma protonada $(M+H)^+$. Foi observada uma diferença de 18,01 Da entre os íons de *m/z* 627,3160 e *m/z* 609,3052. Essa diferença indica que o íon de *m/z* 609,3052 é originado a partir da perda neutra de uma molécula de água (H_2O) durante o processo de ionização, resultando no íon ($M+H-H_2O$) (Figura 4.1).

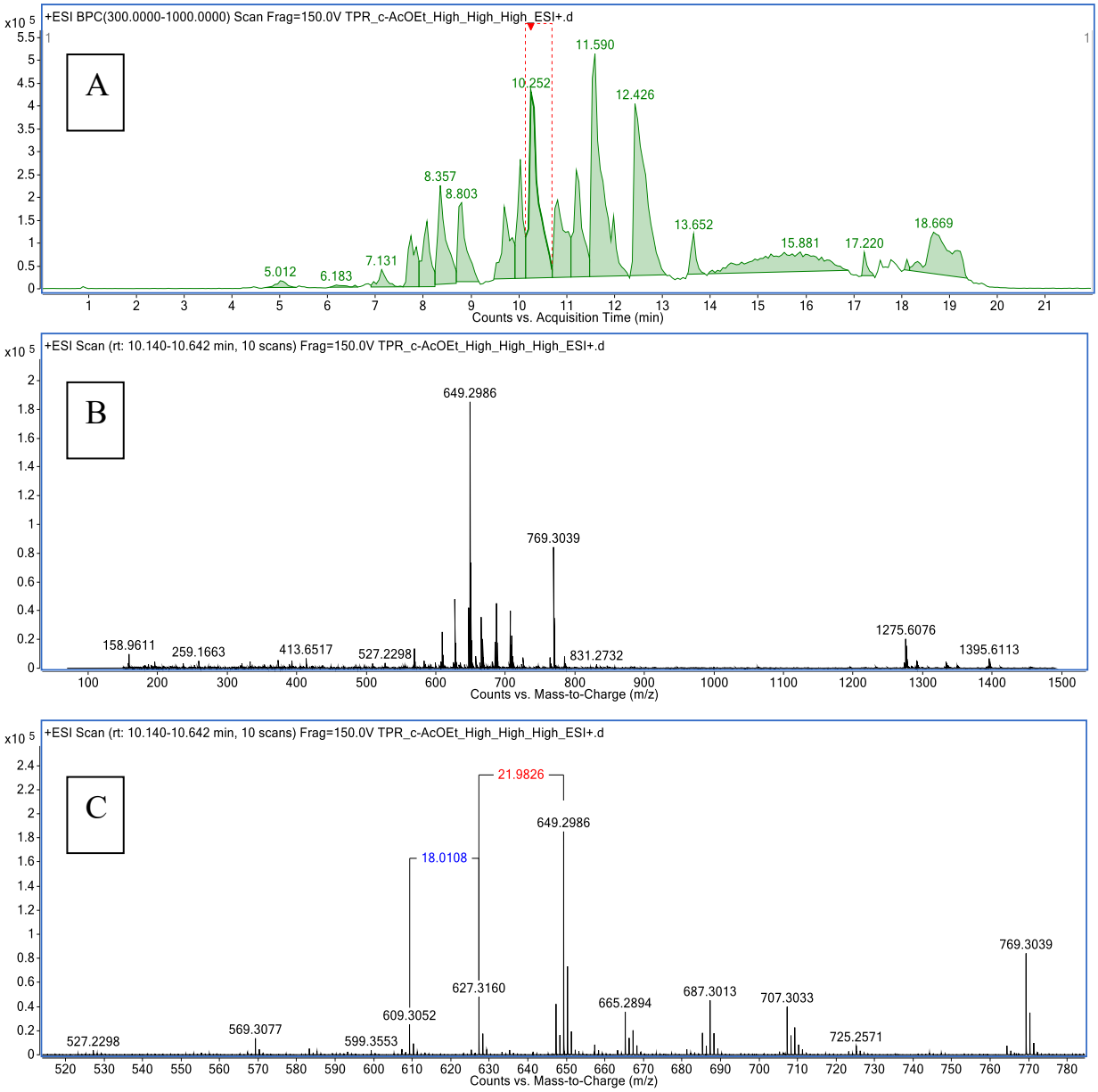
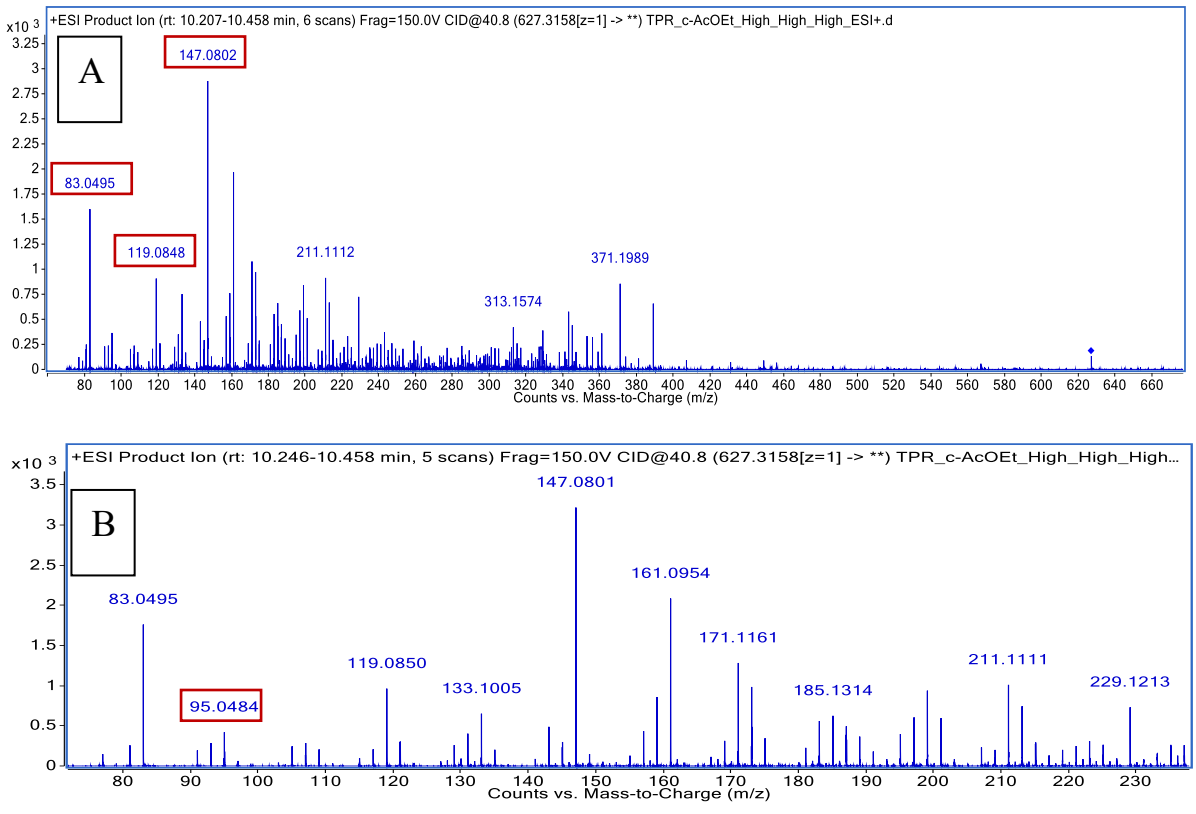


Figura 4.1 - (A) Cromatograma do Pico Base extraído na faixa de *m/z* 300-1000. (B) Espectro Full MS scan extraído no tempo de retenção 10,1-10,64 minutos. (C) Ampliação do espectro de MS destacando os íons de *m/z* 627,3160 $(M+H)^+$, 609,3052 $(M+H-H_2O)^+$ e *m/z* 649,2986 $(M+Na)^+$

O íon de *m/z* 627,3160 possui um espectro de fragmentação (MS/MS) com a presença de alguns íons diagnósticos monitorados para a presença de limonoides, com por exemplo *m/z* 147,08; *m/z* 95,04 e *m/z* 83,05 (Figura 4.2 A e B). No espectro de MS/MS do íon m/z 649,2986 foram observadas as perdas de 60,02 e 100,05 Da, indicando a presença de grupos O-acetil e O-tigloil (Figura 4.2 C). A perde de100,05 Da pode ser referente a um isômero do grupo O-tigloil, que só pode ser diferenciado nos experimentos de RMN de ^{1}H.

A presença desses íons diagnósticos nos espectros de MS/MS e as perdas de 60,02 e 100,05 Da levaram a escolha do extrato TPR-AcOEt para o fracionamento em sílica gel. Nessa primeira etapa de fracionamento foi realizada uma filtração “flash” como descrito no tópico 2.4 página 41.



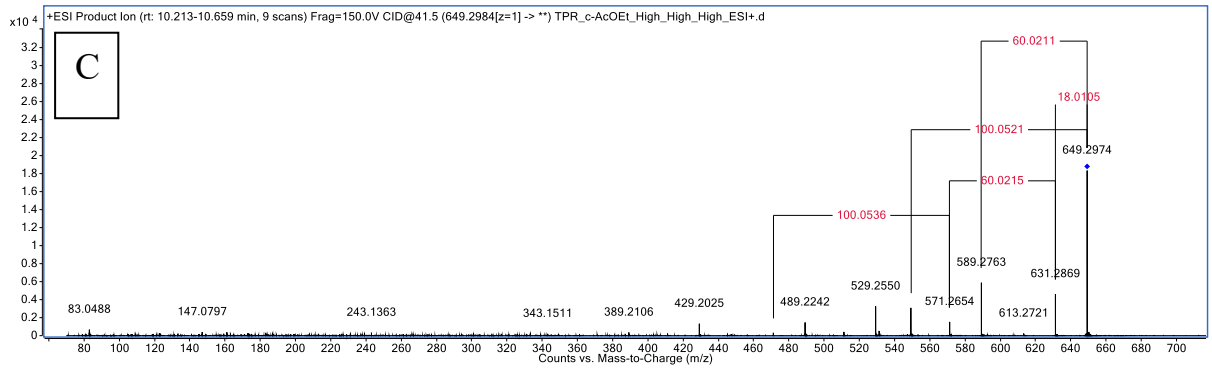


Figura 4.2 - (A) Espectro de MS/MS do íon de *m/z* 627,3160 destacando os íons diagnósticos referentes à limonoides. (B) ampliação da região do espectro de MS/MS do íon *m/z* 627,3160 para mostrar o íon diagnóstico *m/z* 95,04. (C) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 649,2986 destacando as perdas de 18,01 Da (H_2O), 60,02 Da (CH_3COOH) e 100,05 ($C_5H_8O_2$)

As cinco frações obtidas após a filtração "flash" foram analisadas por LC-MS/MS com o mesmo método utilizado para os extratos. As frações Hex-AcOEt-TPR-AcOEt e AcOEt-TPR-AcOEt continham íons que possuíam em seus espectros de MS/MS os critérios adotados para o direcionamento de possíveis limonoides, exemplificado no espectro de MS/MS do íon *m/z* 623,2817 extraído do extrato AcOEt-TPR-AcOEt, no qual podemos perceber as fragmentações oriundas de perda de H_2O (18,01 Da), CH_3COOH (60,02) e $C_5H_8O_2$ (100,05 Da), e a presença dos íons diagnósticos *m/z* 83,04 e *m/z* 147,08 (Figura 4.3).

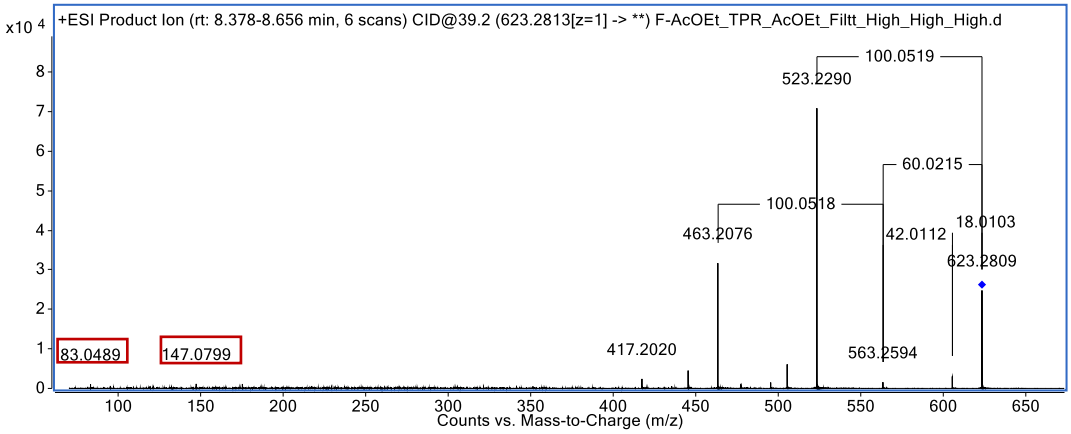


Figura 4.3 - Espectro de MS/MS do íon *m/z* 623,2817 extraído do AcOEt-TPR-AcOEt. Em vermelho alguns íons diagnósticos de limonoides.

4.2 Análises das frações por LC-MS/MS

O cromatograma do pico base na faixa de *m/z* de 300-1000 da fração B-F10 é apresentado abaixo destacando a banda cromatográfica em 8,41 min e 11,59 min (Figura 4.4).

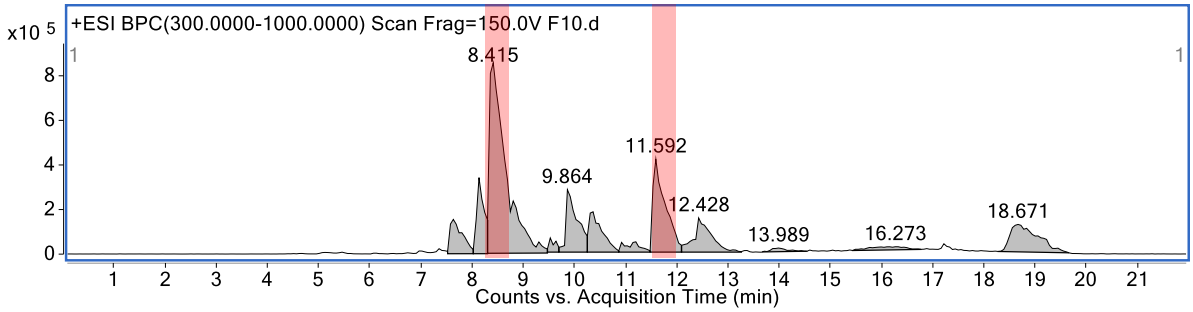


Figura 4.4 - Cromatograma do pico base extraído na faixa de *m/z* 300-1000 da fração B-F10. Em destaque os intervalos de tempo que foram extraídos os espectros de MS

A extração dos íons no intervalo de tempo entre 8,35 e 8,75 minutos da fração B-F10 revelou um espectro de massas na faixa de m/z 300–1250, no qual o íon de *m/z* 623,2821 apresentou a maior intensidade. Este íon refere-se a uma molécula sodiada $(M+Na)^+$; outra informação retirada desse espectro MS é a formação de dímeros na fonte de ionização, pois foi observada uma diferença de 600,2927 Da entre os íons de *m/z* 623,2821 e *m/z* 1223,5748. O espectro de fragmentação do íon *m/z* 1223,5748 gerou o íon base de *m/z* 623,28 (Figura 4.5). Essas informações juntamento com o mesmo tempo de retenção corroboram para a dimerização na fonte. O íon *m/z* 583,2896 é referente à perda de água $(M+H-H_2O)^+$.

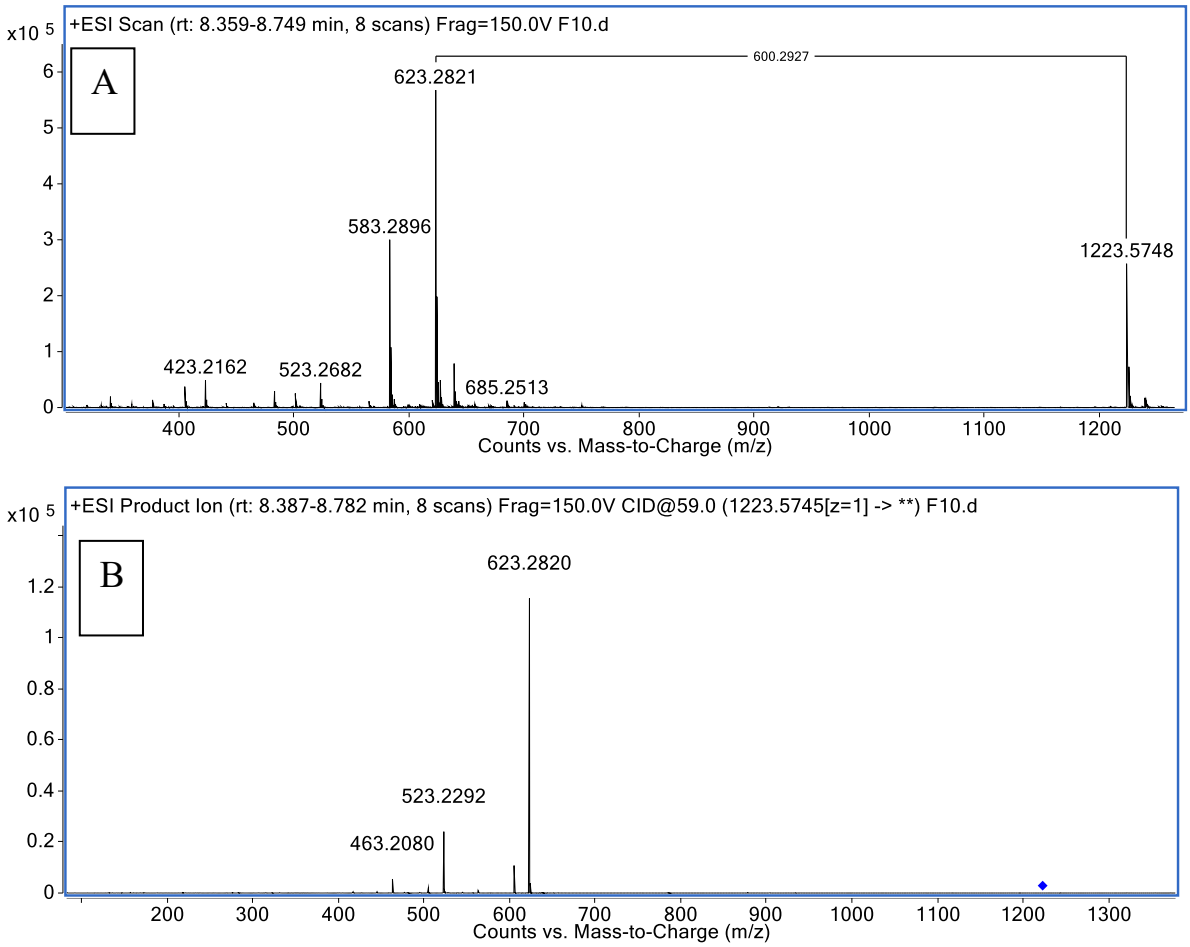


Figura 4.5 - (A) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo de 8,35-8,75 min da fração B-F10, a diferença de 600,2927 Da entre os íons de *m/z* 623,2821 e *m/z* 1223,5748 indica a dimerização. (B) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 1223,5748.

No espectro de MS/MS do íon *m/z* 623,2821 foram observadas as perdas de H_2O (18,01 Da), CH_3COOH (60,02 Da), HCOOH (46,00 Da) e $C_5H_8O_2$ (100,05 Da), em conjunto com o aparecimento dos íons diagnósticos de *m/z* 83,04 e *m/z* 147,08 (Figura 4.6). Essas informações retiradas do espectro de MS/MS do íon m/z 623,2821 seguiu os critérios adotados para possíveis limonoide.

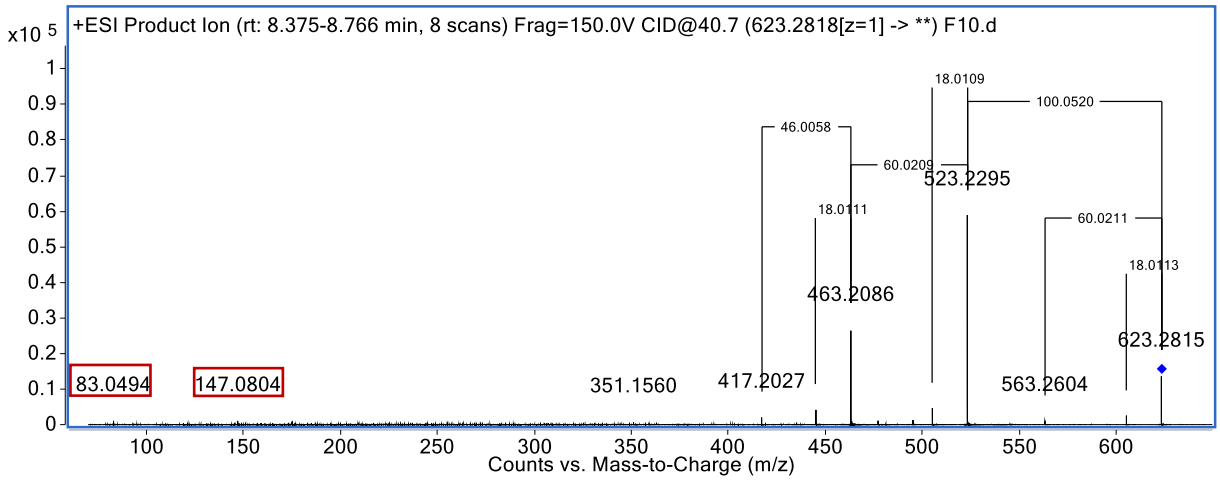


Figura 4.6 - Espectro de MS/MS do íon *m/z* 623,2821. Destacando em vermelho os íons diagnósticos de limonoides e os valores em Da das fragmentações.

O espectro de MS extraído no intervalo de tempo entre 11,53 e 11,98 minutos da fração B-F10 apresentou o íon de *m/z* 649,2981 como o de maior intensidade. Na ampliação do espectro na faixa de *m/z* 500–740, observou-se também a presença do íon de *m/z* 627,3167. A diferença de 21,98 Da entre esses dois sinais sugere que o íon de *m/z* 649,2981 corresponde ao aduto de sódio $(M+Na)^+$, enquanto o íon de *m/z* 627,3167 refere-se à forma protonada da molécula $(M+H)^+$ (Figura 4.7 A e B).

O espectro de MS/MS do íon de *m/z* 649,2981 fragmentado com energia de colisão (CID) de 41,5 eV, apresentou como íon base o fragmento de *m/z* 549,2450 resultante da perda de $C_5H_8O_2$ (100,05 Da). Também foram observadas perdas neutras de H_2O (18,01 Da) e de ácido acético (CH_3COOH, 60,02 Da). A ampliação do espectro de MS/MS na região de *m/z* 70–200 revelou a presença dos íons de *m/z* 119,08 e 147,08 (Figura 4.7). A combinação dessas informações orientou o isolamento dos limonoides 01 e 02.

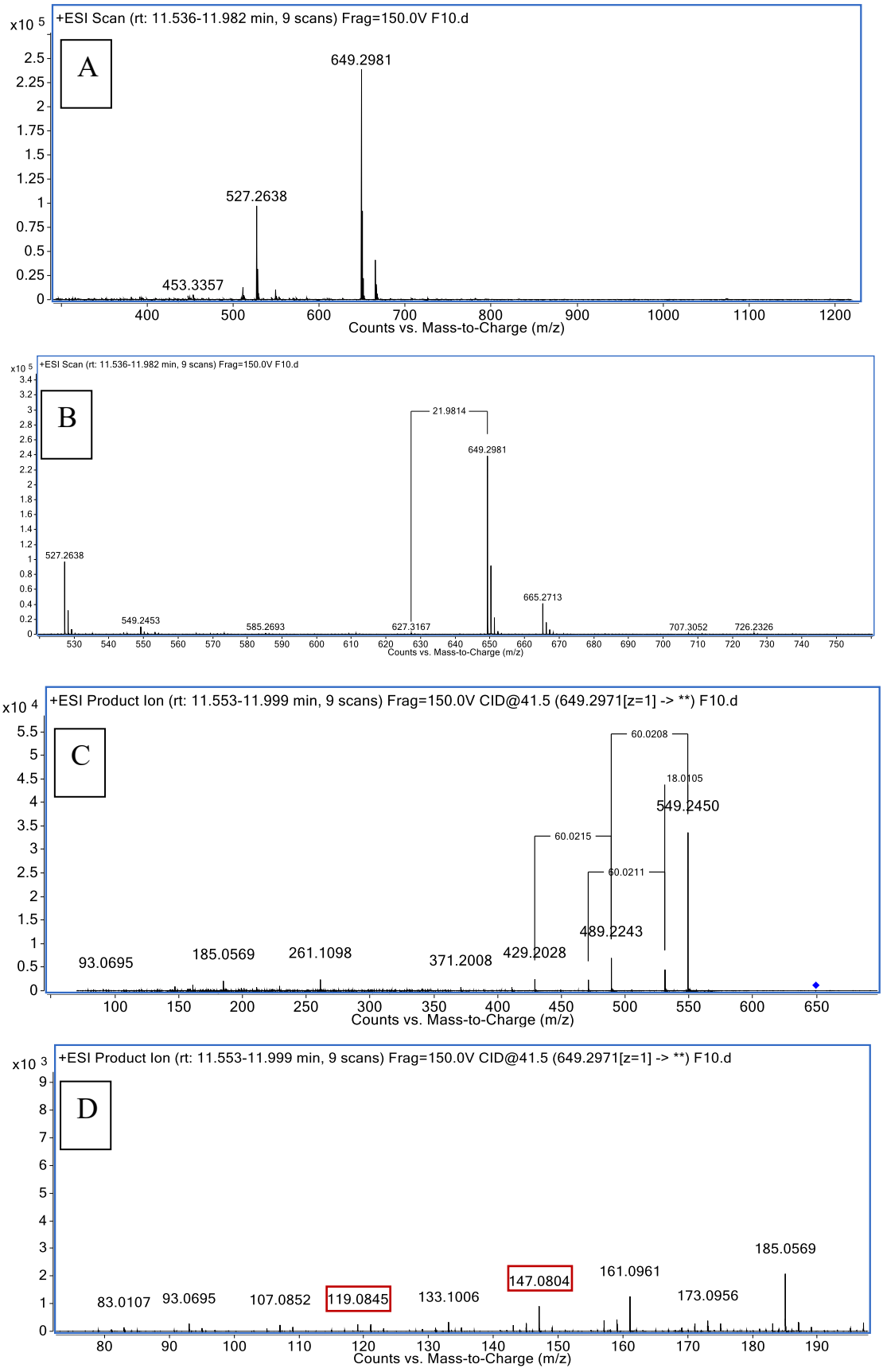
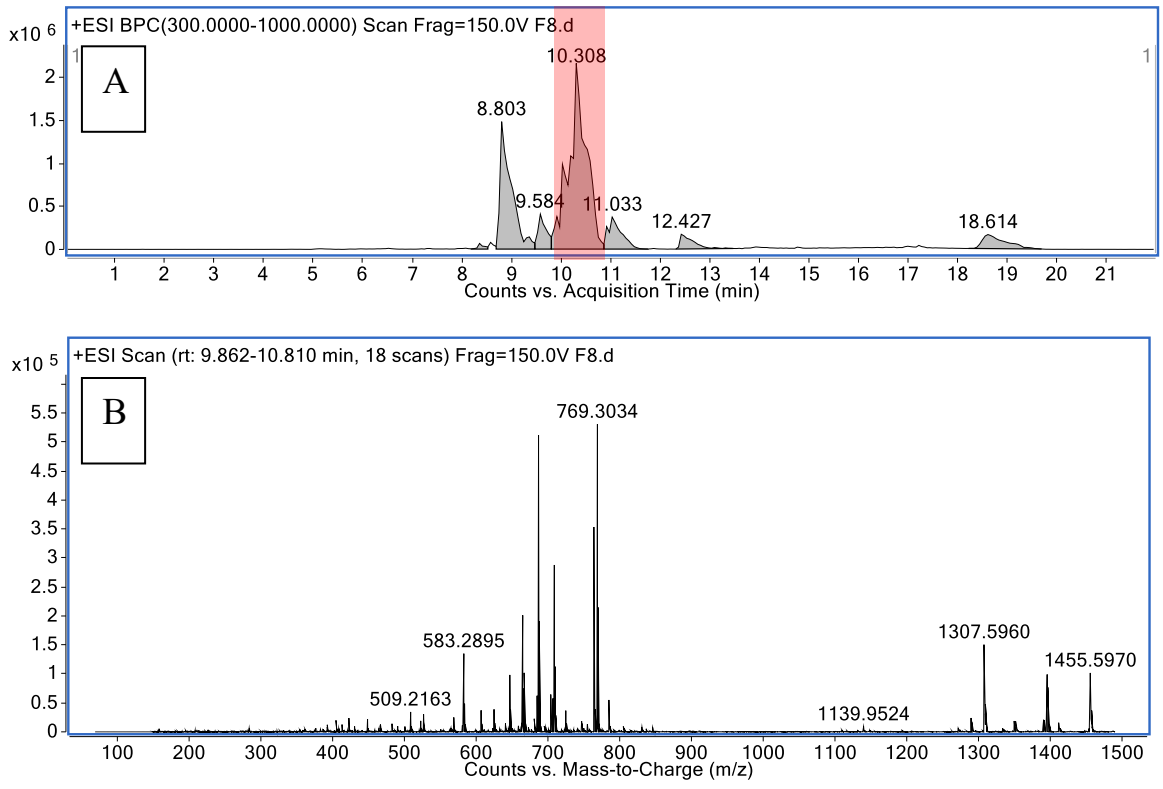


Figura 4.7 - (A) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo de 11,53-11,98 min da fração B-F10. (B) ampliação na faixa de *m/z* 500-700 evidenciando a

diferença de 21,98 Da entre os íons *m/z* 627,3167 e *m/z* 649,2981. (C) espectro de MS/MS do íon 649,2981 destacando as perdas de CH_3COOH (60,02 Da) e H_2O (18,01 Da). (D) ampliação da região de *m/z* 70-200 para observação dos íons diagnósticos utilizados como critérios para a presença de limonoides.

A extração do cromatograma de pico base na faixa de *m/z* 300–1000 da fração B-F8 revelou bandas cromatográficas entre os tempos de retenção de 8 a 13 minutos. O espectro de massas (MS) extraído no intervalo de 9,86 a 10,81 minutos mostrou a presença dos íons de *m/z* 769,3034 (de maior intensidade), 665,2927; 707,3033 e 709,2827. A diferença de 21,98 Da entre os íons de *m/z* 709,2827 e *m/z* 687,3008 indica que o primeiro corresponde a uma molécula sodiada $[M + Na]^+$, enquanto o segundo representa a molécula protonada $[M + H]^+$. A mesma diferença é observada entre os íons de *m/z* 707,3033 e *m/z* 685,3209 (Figura 4.8).



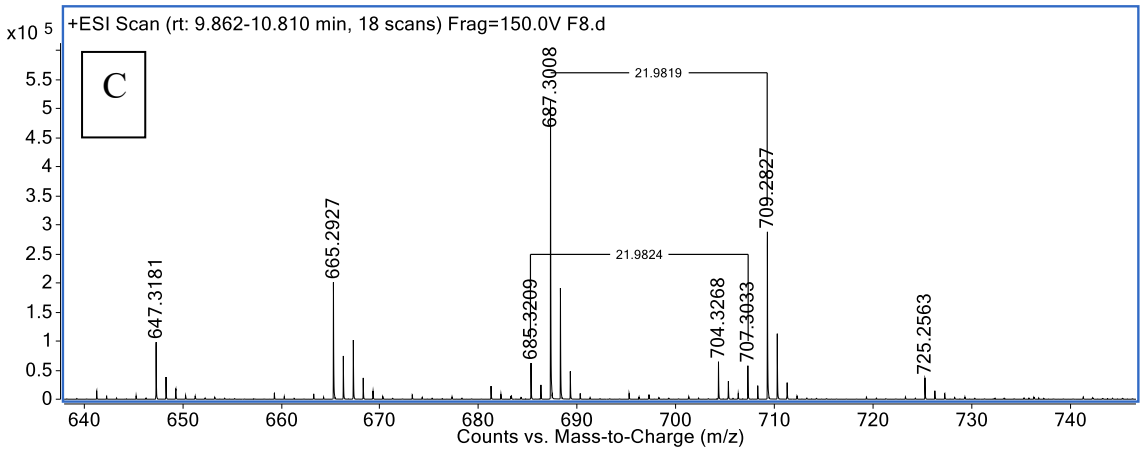
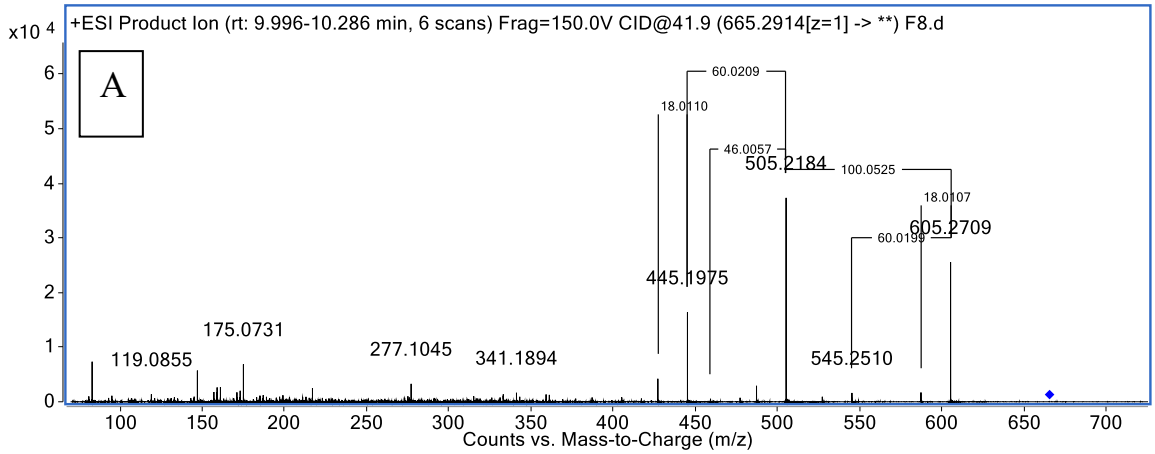


Figura 4.8 – (A) Cromatograma do pico base da fração B-F8 extraído na faixa de *m/z* 300-1000. (B) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo de 9,86-10,81 min da fração B-F8. (C) Ampliação da região de *m/z* 640-750 para demonstrar as diferenças de 21,98 entre os íons selecionados.

A extração do espectro de MS/MS do íon de *m/z* 665,2927 adquirido em 41,91 eV na cela de colisão, mostrou as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$), 18,01 Da (H_2O) e 46,00 Da (HCOOH). Na ampliação da região de *m/z* 70-250 foi observado a presença dos íons diagnósticos *m/z* 83,04; *m/z* 95,04; *m/z* 119,08 e *m/z* 147,08 (Figura 4.9).



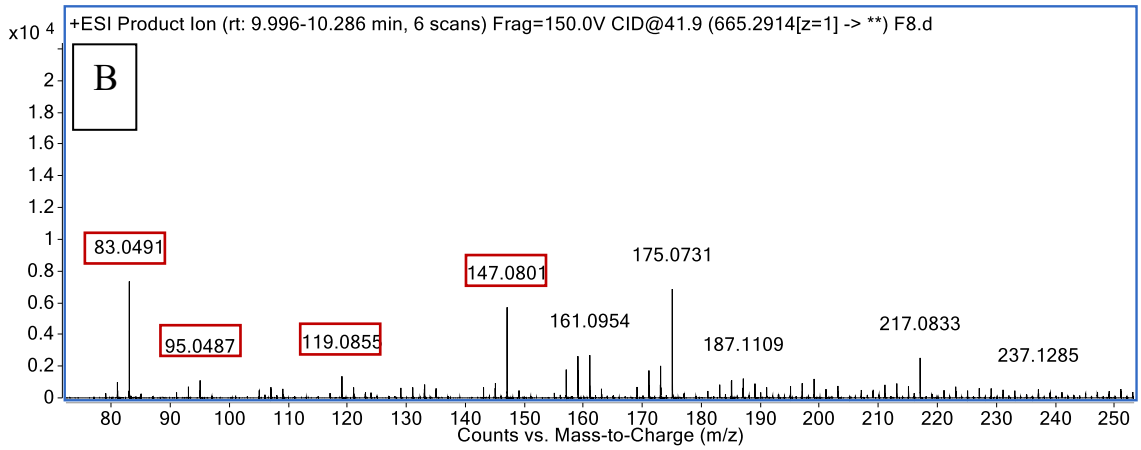
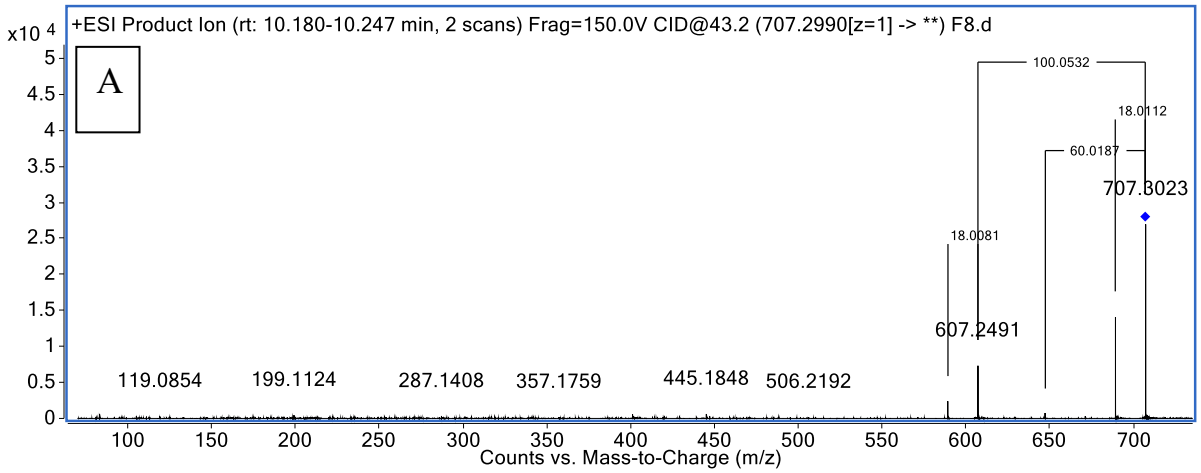


Figura 4.9 - (A) espectro de MS/MS do íon de *m/z* 665,2927. (B) Ampliação do espectro de MS/MS do íon 665,2927 na faixa de *m/z* 70-250 para averiguar a presença dos íons diagnósticos de limonoides.

O espectro de fragmentação do íon *m/z* 707,3033 foi obtido com uma energia de colisão de 43,2 eV, as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O) foram observadas. Com a ampliação da na faixa de *m/z* 70 – 200, foi confirmada a presença dos íons *m/z* 83,04; *m/z* 95,04; *m/z* 119,08 e *m/z* 147,08 (Figura 4.10 A e B).

Os íons diagnósticos foram observados com maior intensidade no espectro de MS/MS do *m/z* 685,3209 $(M+H)^+$, pois a energia de fragmentação para dissociar uma molécula protonada é menor em comparação com a mesma molécula sodiada (Figura 3.10 C e D).



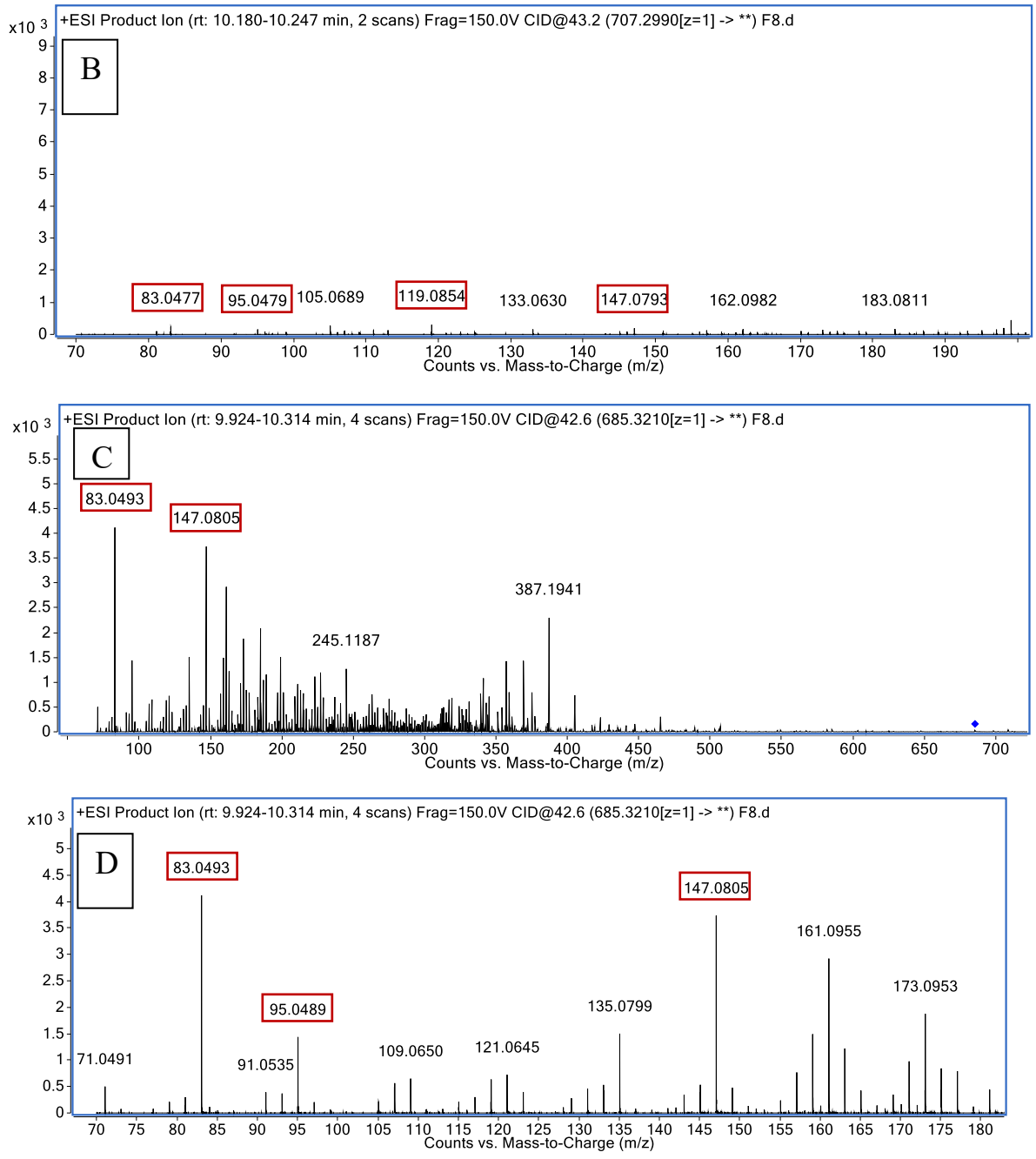


Figura 4.10 - (A) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 707,3033 destacando as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O). (B) Ampliação do espectro de MS/MS do íon *m/z* 707,3033 para observar os íons diagnósticos de limonoides. (C) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 685,3209. (D) Ampliação do espectro de MS/MS do íon *m/z* 685,3209 para averiguar a presença dos íons diagnósticos.

O íon *m/z* 709,2827 $(M+Na)^+$ apresentou um espectro de MS/MS onde os íons fragmentos eram provenientes de perdes diferentes das já

mencionadas anteriormente, como 60,02 Da e 100,05 Da, com exceção a perde de 46,00 Da (HCOOH) (Figura 3.11 A); desse modo foi verificado no íon *m/z* 687,3008 $(M+H)^+$, referente a mesma estrutura, a presença de alguns íons diagnósticos: *m/z* 95,04; *m/z* 119,08; *m/z* 147,08 e *m/z* 163,07.(Figura 4.11 B e C). O compilado dessas informações retiradas após a análise por LC-MS/MS da fração B-F8 direcionou o isolamento dos limonoides 03, 04 e 05.

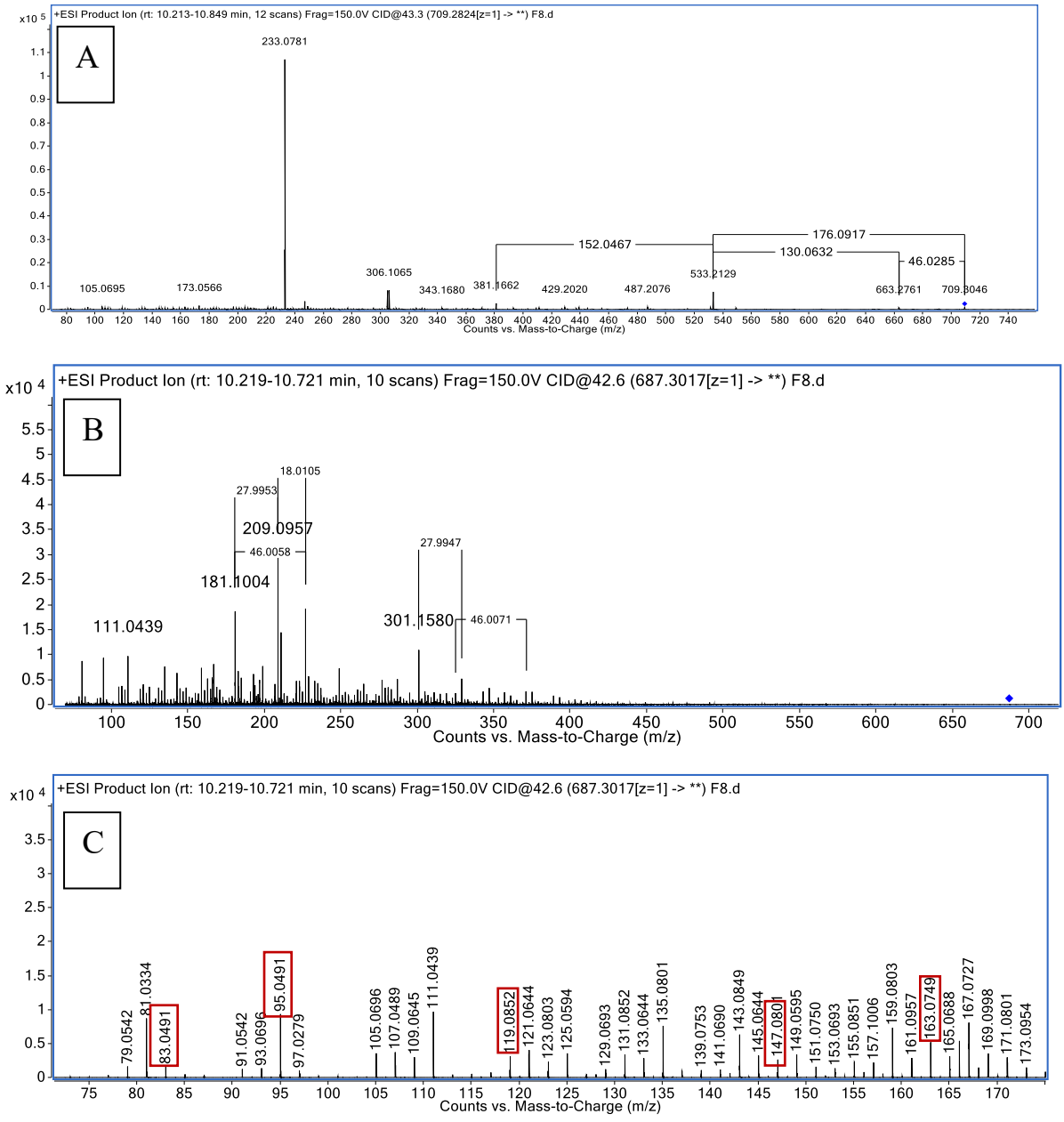
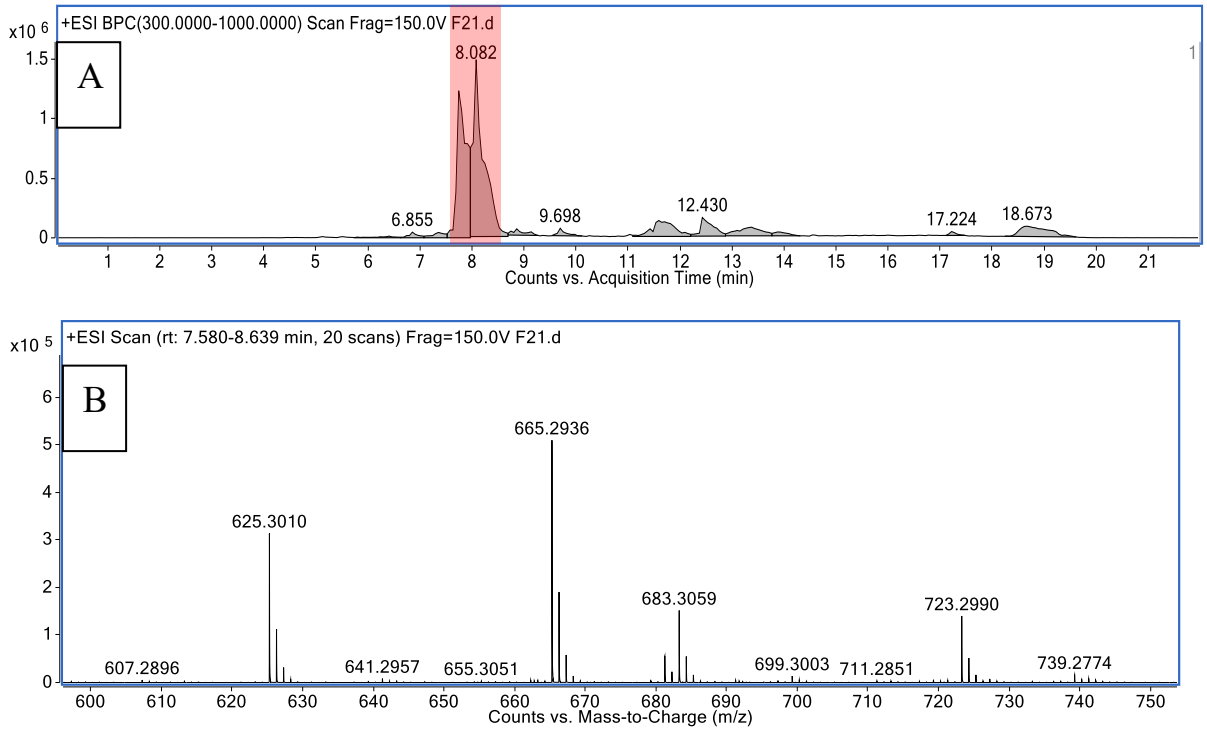


Figura 4.11 - (A) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 709,2827. (B) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 687,3008 indicando algumas perdas de CO (27,98 Da), HCOOH (46,00 Da) e H_2O (18,01 Da). (C) ampliação da região de *m/z* 70-180 do

espectro de MS/MS do íon *m/z* 687,3008 para a observação dos íons diagnósticos de limonoides.

O cromatograma do pico base da fração B-F21 foi extraído na faixa de *m/z* 300 – 1000, no intervalo de tempo 7,58 – 8,64 min foi feita a extração do espectro de MS, no qual apareceu quatro íons de interesse: *m/z* 625,3010; *m/z* 665,2936; *m/z* 683,3059 e *m/z* 723,2990 (Figura 4.12 A e B). A seguir serão apresentados apenas os resultados para os íons de *m/z* 625,3010 e *m/z* 665,2936.

A primeira investigação se deu no íon *m/z* 625,3010 com a extração do espectro de MS/MS; nesse espectro foram observados os íons diagnósticos *m/z* 83,05; *m/z* 119,08; *m/z* 147,08; *m/z* 163,07 e *m/z* 183,11 (Figura 4.12 C e D).



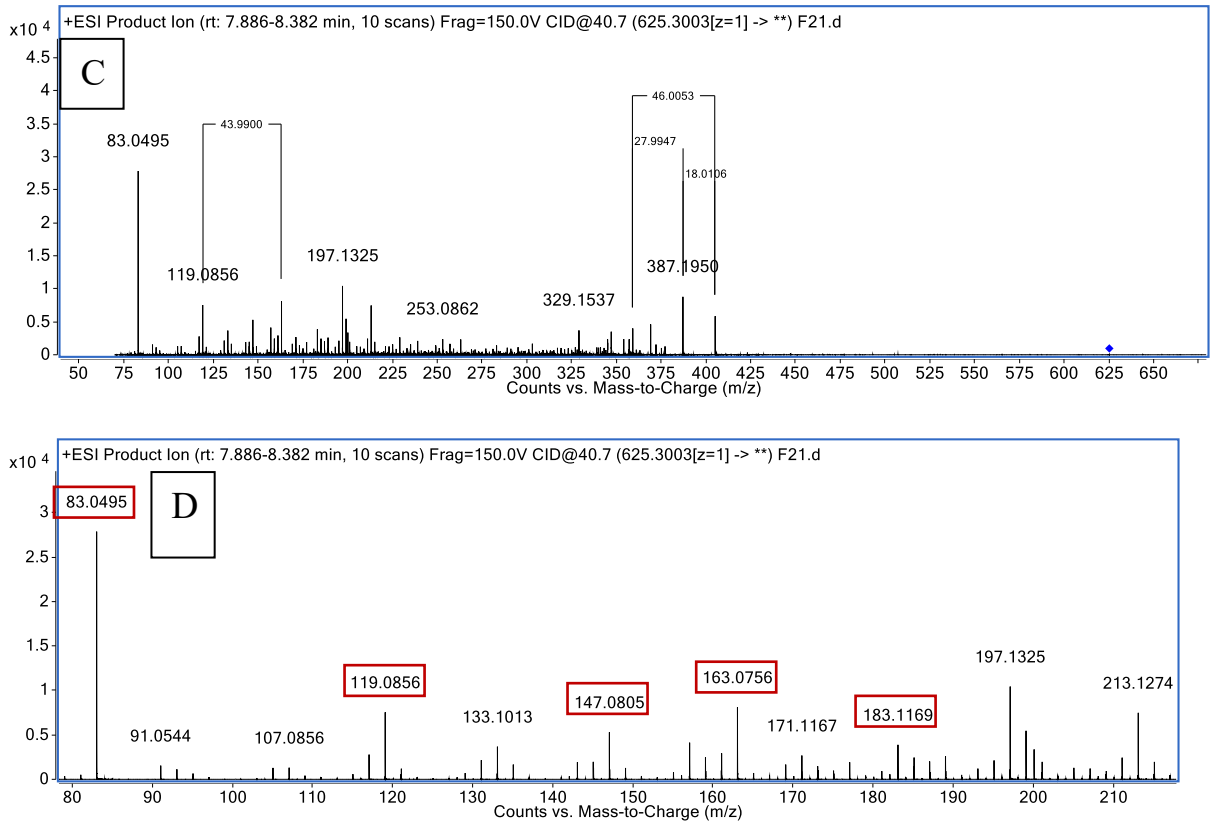


Figura 4.12 - (A) Cromatograma do pico base da fração B-F21 extraído na faixa de *m/z* 300-1000, em destaque a região que foi extraído o espectro de MS. (B) Ampliação do espectro de MS para destacar os íons de m/z 625,3010; *m/z* 665,2936; *m/z* 683,3059 e *m/z* 723,2990. (C) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 625,3010. (D) Ampliação do espectro de MS/MS do íon *m/z* 625,3010 para observação dos íons diagnósticos de limonoides.

O íon *m/z* 665,2936 apresentou um espectro de MS/MS característico de um íon formado como aduto de sódio $(M+Na)^+$. A investigação do espectro de MS/MS validou a proposta de um possível limonoide, pois mostrou as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O), juntamente ao aparecimento dos íons diagnósticos *m/z* 83,05; *m/z* 119,08 e *m/z* 163,07. (Figura 4.13). Assim, o limonoide 06 foi isolado da fração B-F21 os critérios adotados para buscar limonoides por LC-MS/MS.

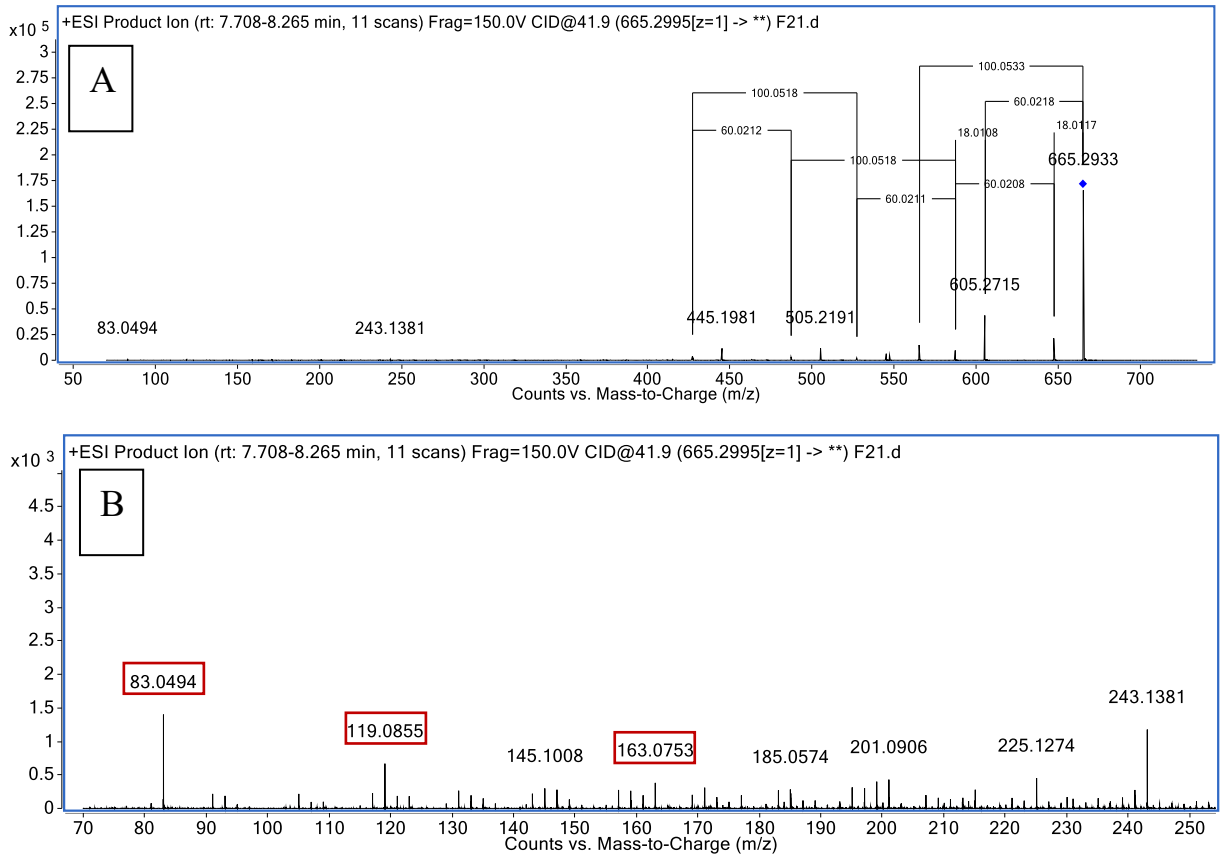


Figura 4.13 – (A) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 665,2936 mostrando as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O). (B) ampliação do espectro de MS/MS do íon *m/z* 665,2936 para a observação dos íons diagnósticos de limonoides.

O cromatograma de pico base (BPC) da fração B-F13, extraído na faixa de *m/z* 300–1000, é apresentado na Figura 4.14A, com destaque para os intervalos de tempo utilizados na extração dos espectros de massas (MS).

A análise por LC-MS/MS mostrou que na fração existiam íons com espectros de MS/MS que seguiam os critérios analisados para direcionar o isolamento dos limonoides. A extração do espectro de MS no intervalo de tempo de 7,80 – 8,36 min apresentou o íon *m/z* 685,2824 com maior intensidade (Figura 3.14 B), o espectro de fragmentação desse íon mostrou as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$), 18,01 Da (H_2O) e 27,99 Da (CO), e os íons diagnósticos: *m/z* 83,05; *m/z* 95,04; *m/z* 119,08 e *m/z* 183,11 (Figura 4.14 C e D).

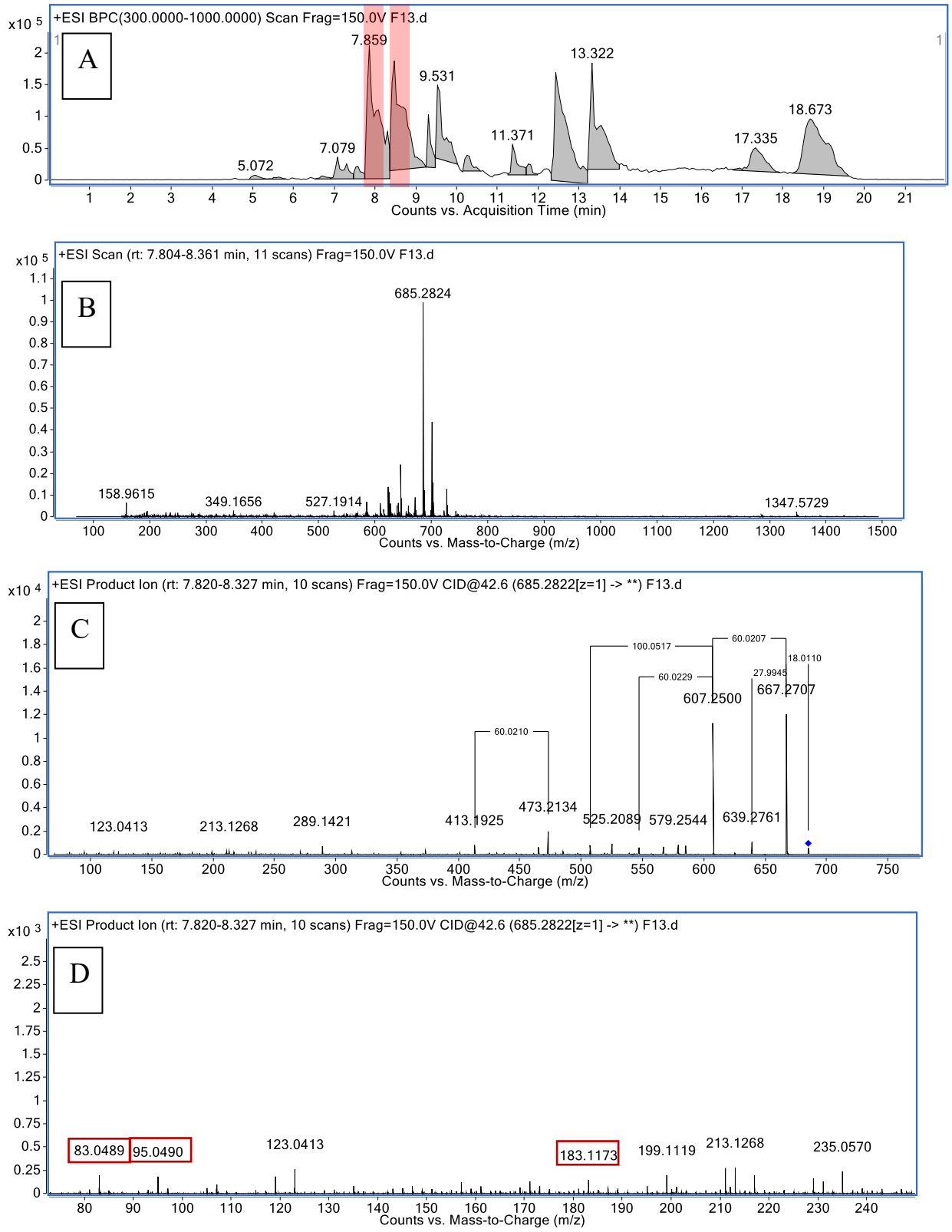


Figura 4.14 - (A) Cromatograma do pico base extraído na faixa de *m/z* 300-1000, destacando os intervalos de tempo de onde foram extraídos os espectros de MS. (B) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo 7,80-8,36. (C)Espectro de MS/MS do íon *m/z* 685,2824, destacando as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$), 18,01 Da (H_2O) e 27,99 Da (CO). (D) Ampliação do

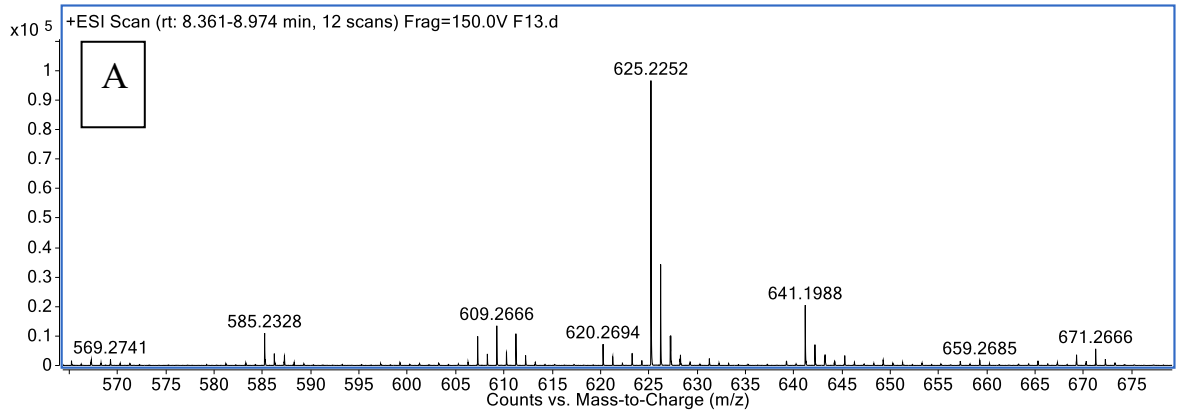
espectro de MS/MS do íon de *m/z* 685,2824 para observação dos íons diagnósticos.

A segunda extração de espectro de MS na fração B-F13 foi no intervalo de tempo 8,36 – 8,97 min, onde foi observado o íon *m/z* 625,2252 como mais intenso, esse íon apresentou um espectro de MS/MS com poucos fragmentos, porém foi possível obter algumas informações como a perda de H_2O (18,01 Da), CO (43,99 Da) e $C_5H_8O_2$ (100,05 Da) (Figura 4.15 A e B).

O íon *m/z* 625,2252 foi considerado como um aduto de sódio, devido aos poucos fragmentos observados no espectro de MS/MS com a fórmula molecular $([C_{31}H_{38}O_{12}]+Na)^+$, calculou-se de forma teórica o *m/z* 603,2436 $(M+H)^+$ considerando a fórmula $C_{31}H_{38}O_{12}$.

O íon de m/z 603,2436 não foi observado, porém a diferença do m/z 603,2436 (teórico) para o *m/z* 585,2328 (experimental) foi 18,01 Da concernente a uma perda de H_2O, por esse motivo foi considerado que o íon de *m/z* 585,2328 $(M+H-H_2O)$ e *m/z* 625,2252 $(M+Na)^+$ pertencem a mesma molécula. No espectro de MS/MS do íon *m/z* 585,2328 foi verificado a presença dos íons diagnósticos: *m/z* 83,05; *m/z* 95,04 e *m/z* 147,08 (Figura 4.15 C e D).

As análises acima com a fração B-F13 possibilitaram o isolamento dos limonoides 07, 08 e 09.



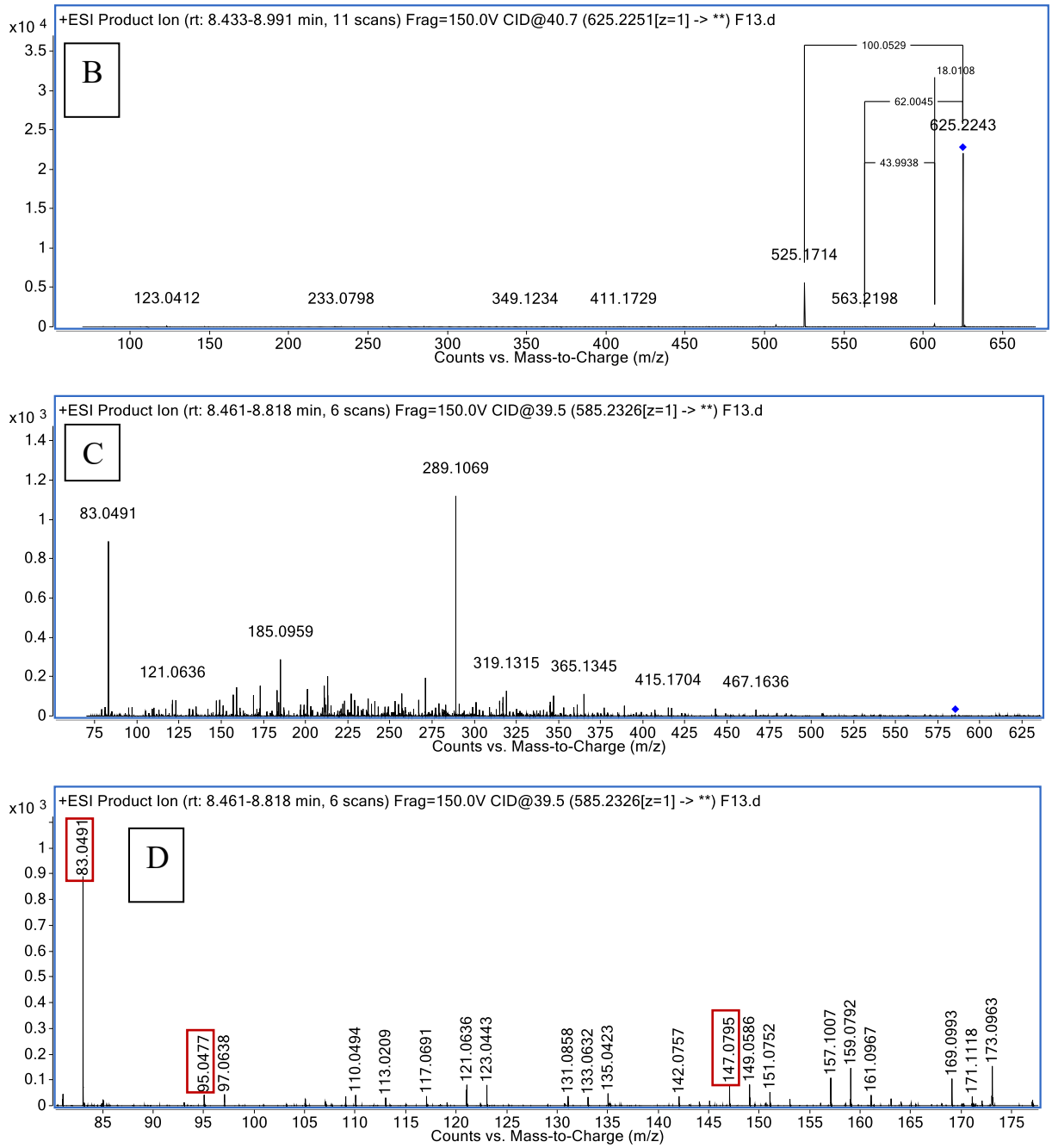
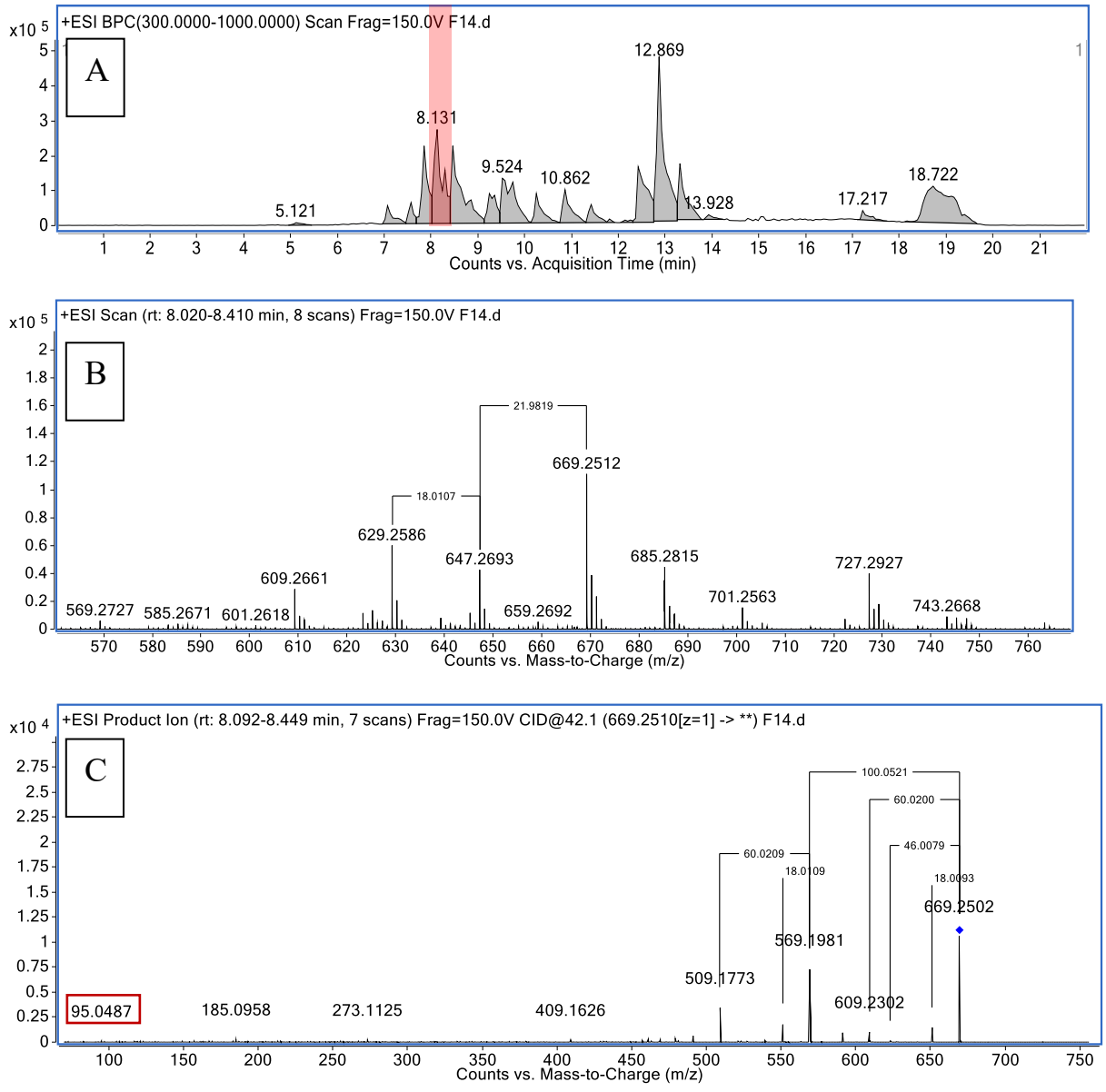


Figura 4.15 - (A) Ampliação do espectro de MS na faixa de m/z 565-680. (B) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 625,2252 destacando as perdas de H_2O (18,01 Da), CO (43,99 Da) e $C_5H_8O_2$ (100,05 Da). (C) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 585,2328. (D) Ampliação do espectro de MS/MS do íon *m/z* 585,2328 para demonstrar os íons diagnósticos de limonoides.

Na extração do espectro de MS no tempo de retenção 8,08 – 8,41 minutos da fração B-F14, foram destacados os íons *m/z* 647,2693 $(M+H)^+$, *m/z* 629,2586 $(M+H-H_2O)^+$ e *m/z* 669,2512 $(M+Na)^+$, todos referentes a mesma

molécula (Figura 3.16 A e B). No espectro de MS/MS do íon *m/z* 669,2512 foram observadas as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$), 18,01 Da (H_2O) e 46,00 Da (HCOOH) e o íon diagnóstico *m/z* 95,04 (Figura 4.16 C). O espectro de MS/MS do íon *m/z* 647,2693 $(M+H)^+$ fragmentou bastante, mas foi verificado a presença do íon diagnóstico *m/z* 83,05. Essas informações direcionaram para o isolamento do nor-limonoide 10 descrito.



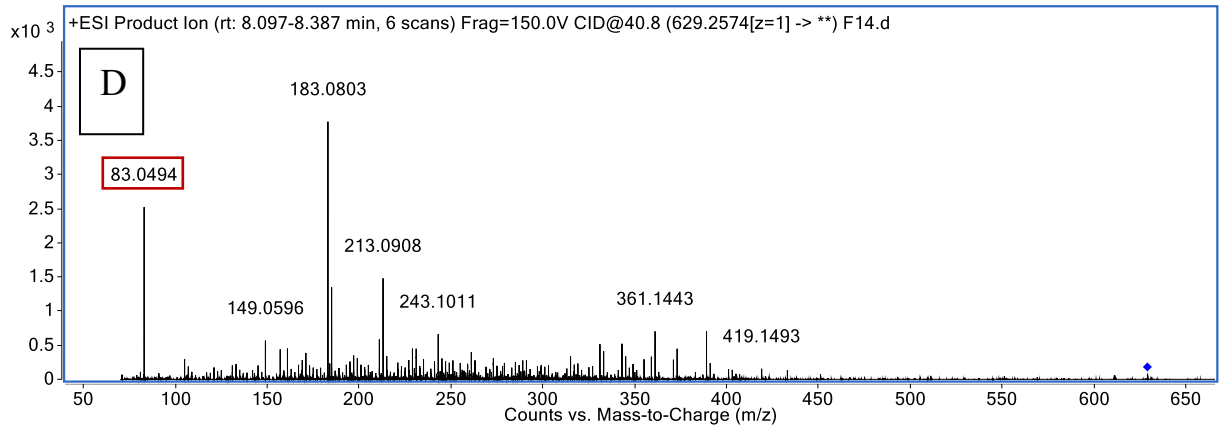
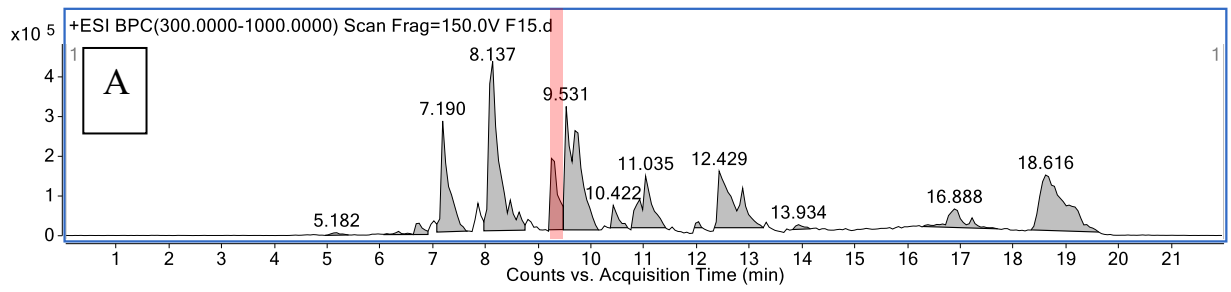


Figura 4.16 - (A) Cromatograma do pico base da fração B-F14 extraído na faixa de *m/z* 300-1000, destacando o intervalo de tempo da extração do espectro de MS. (B) Espectro de MS extraído no intervalo de tempo 8,02-8,41 min da fração B-F14. (C) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 669,2512. (D) Espectro de MS/MS do íon m/z 647,2693 destacando o íon diagnóstico de limonoide.

A extração do cromatograma do pico base da fração B-F15 na faixa de *m/z* 300-1000 está apresentado na Figura 4.17 A, nesta é destacado o intervalo de tempo 9,25 – 9,47 minutos, de onde se extraiu o espectro de MS apresentado na Figura 4.17 B; nesse espectro os íons de *m/z* 625,2644 e *m/z* 665,2569 são os que possuem maiores intensidades.

A extração dos espectros de MS/MS do íon *m/z* 665,2569 está apresentado na Figura 4.17 C, onde é observado no espectro de MS/MS do íon 665,2569 as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O), juntamente com a presença dos íons diagnósticos *m/z* 83,05 e *m/z* 147,08.

A fração B-F15 seguiu os critérios adotados para verificar a presença de limonoides, dessa fração foi isolado o limonoide 11.



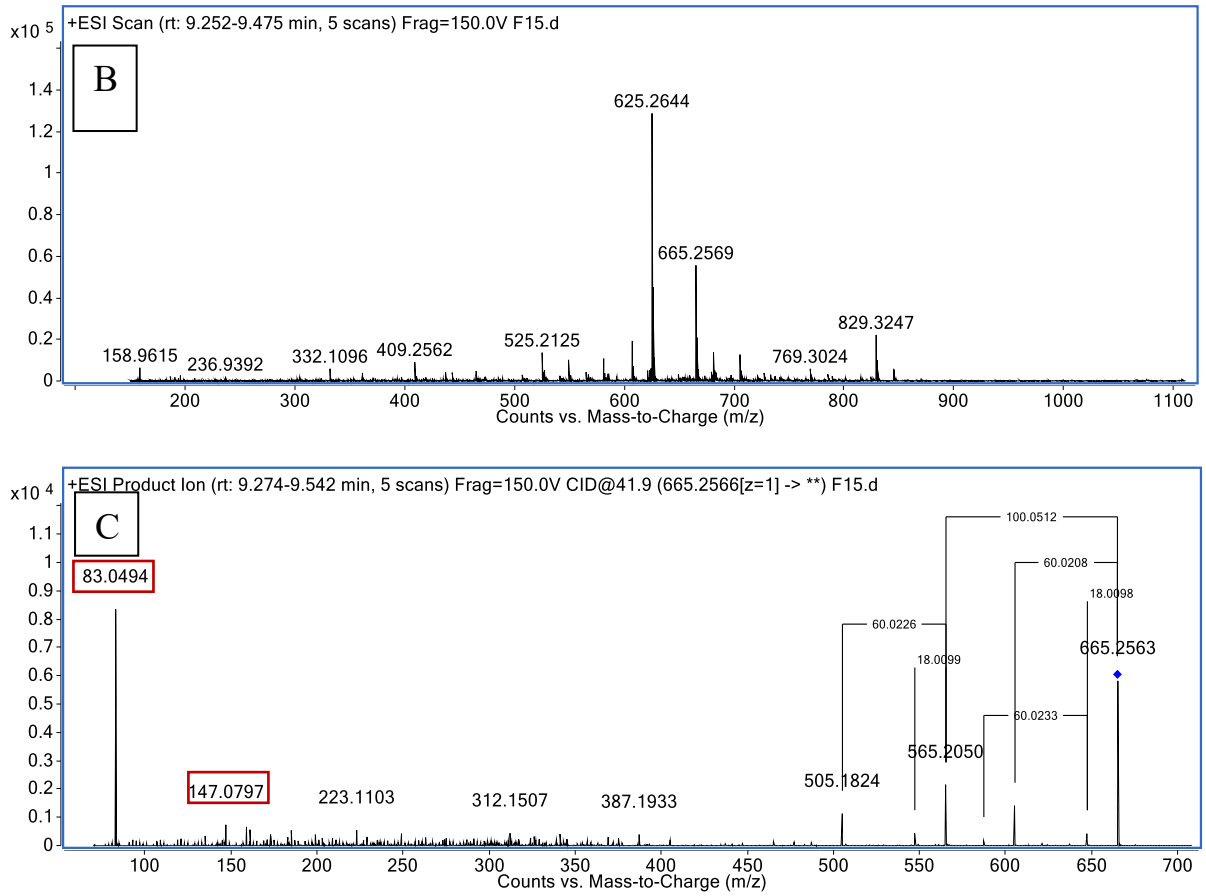
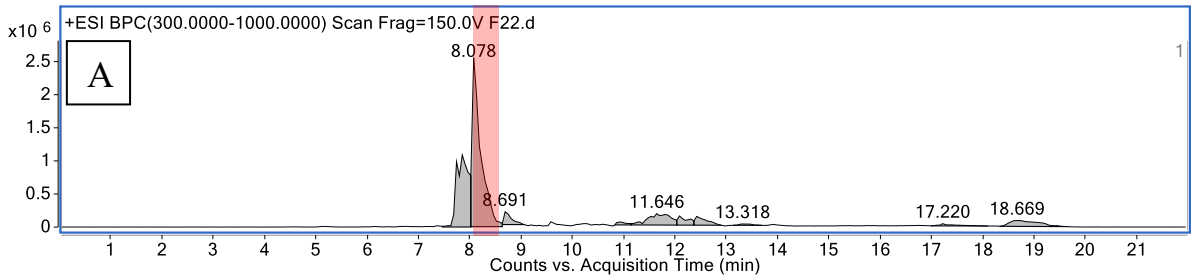
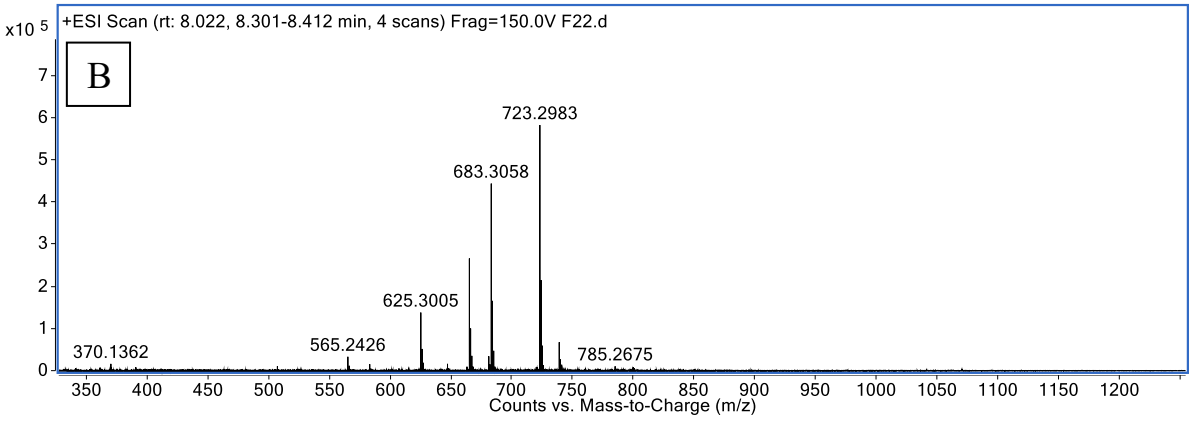


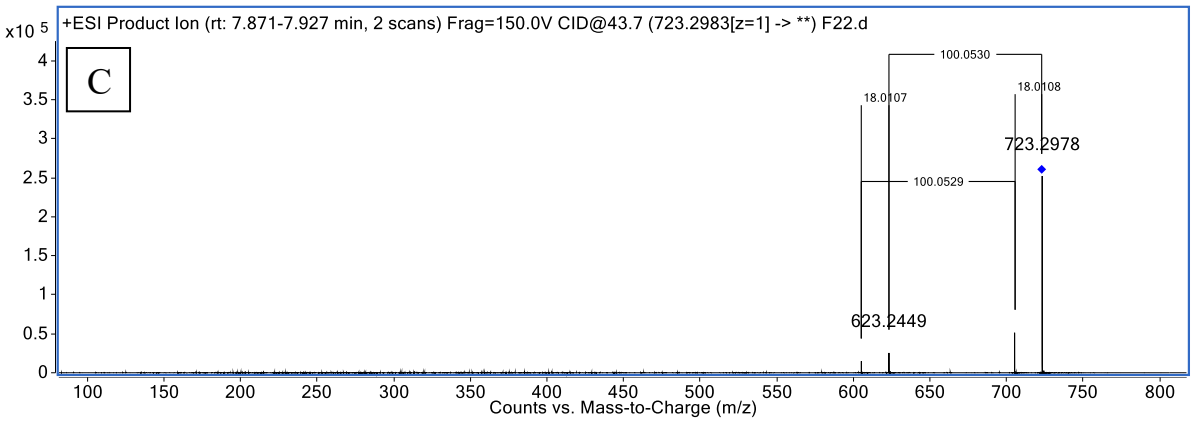
Figura 4.17 - (A) Cromatograma do pico base da fração B-F15 extraído na faixa de *m/z* 300-1000, em destaque o intervalo de tempo que foi extraído o espectro de MS. (B) Espectro de MS da fração B-F15 extraído no intervalo de tempo de 9,25-9,47 min. (C) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 665,2569 indicando a presença dos íons diagnósticos de limonoides e as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O).

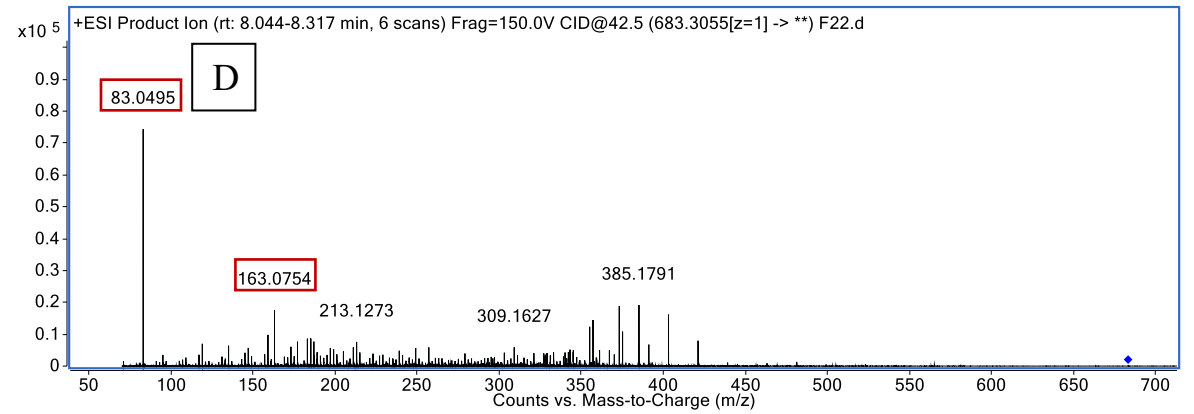
O isolamento por CLAE-UV da substância 12 deu-se a partir do estudo da fração B-F22. O cromatograma do pico base extraído na faixa de *m/z* 300-1000 mostrou praticamente uma única banda com intensidade alta no tempo de 8,07 minutos (Figura 3.18 A). A extração do espectro de MS no intervalo de 8,02 – 8,41 minutos apresentou dois íons mais intensos, o íon *m/z* 723,2983 e o íon *m/z* 683,3058 (Figura 3.18 B). O espectro de MS/MS do íon *m/z* 723,2983 apresentou duas perdas: 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O) (Figura 4.18 C). Com tudo, o espectro de fragmentação do íon *m/z* 683,3058 informa a presença

dos íons diagnósticos: *m/z* 83,05; *m/z* 95,04; *m/z* 147,08; 163,07 e *m/z* 183,11 (Figura 3.18 D e E).









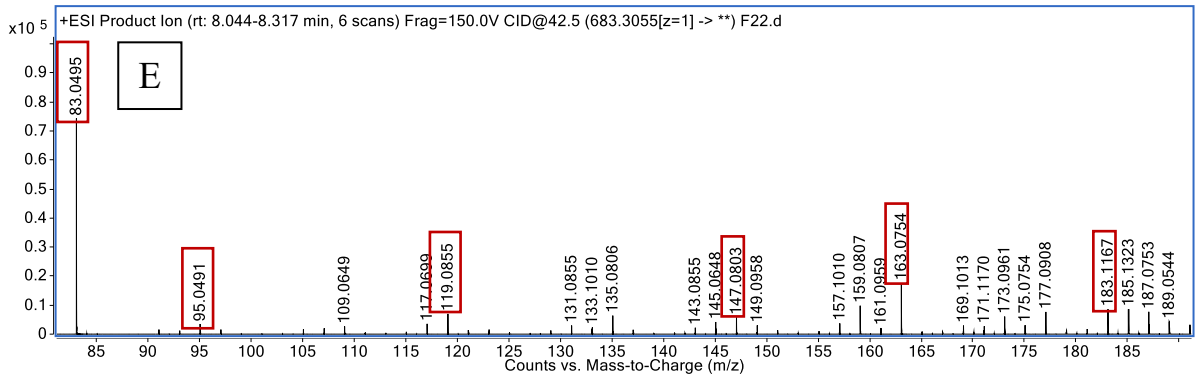
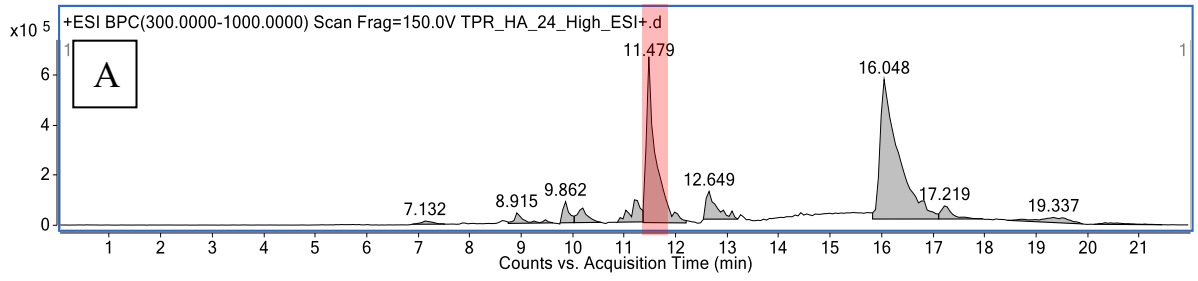


Figura 4.18 - (A) Cromatograma do pico base da fração B-F22 extraído na faixa de *m/z* 300-1000, destacando o intervalo de tempo que foi feita a extração do espectro de MS. (B) Espectro de MS da fração B-F22 extraído no intervalo de tempo de 8,02-8,41 min. (C) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 723,2983 destacando as perdas de 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O). (D) Espectro de MS/MS do íon *m/z* 683,3058. (E) Ampliação do espectro de MS/MS do íon *m/z* 683,3058 destacando os íons diagnósticos de limonoides.

O cromatograma do pico base da fração A-F24 extraído na faixa de *m/z* 300-1000 (Figura 3.19 A), apresentou duas bandas com boas intensidades em 11,48 min e 16,05 min. A extração do espectro de MS no intervalo de tempo 11,42 – 11,81 minutos mostrou a presença do íon *m/z* 665,2926 (Figura 4.19 B), o espectro de MS/MS do íon m/z 665,2926 exibiu as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O), a ampliação do espectro de fragmentação na faixa de *m/z* 80 – 180 apontou a presença dos íons diagnósticos: *m/z* 83,05; *m/z* 95,04; *m/z* 119,08; *m/z* 147,08 e *m/z* 163,07.



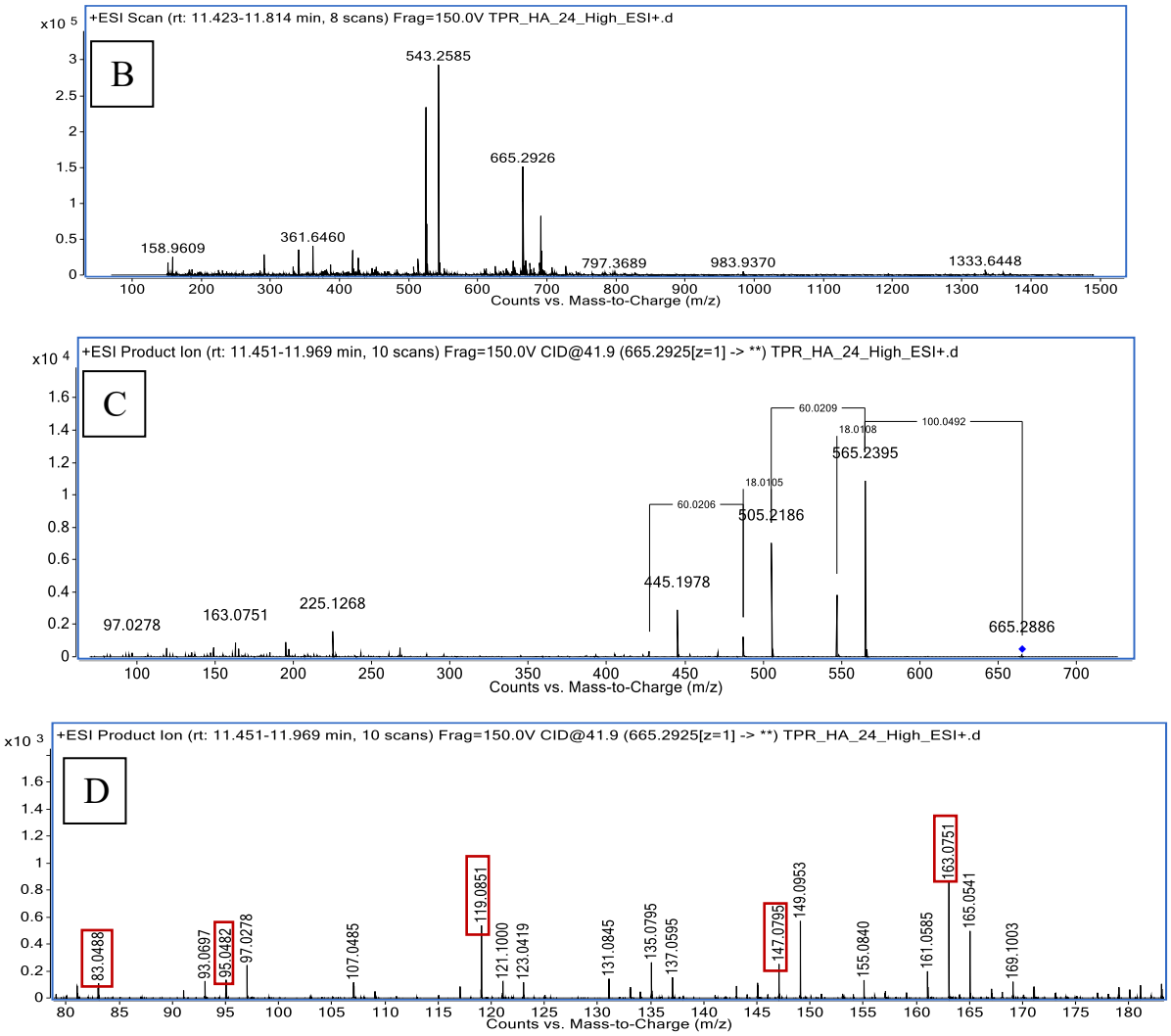


Figura 4.19 - (A) Cromatograma do pico base da fração A-F24 extraído na faixa de m/z 300-1000 destacando o intervalo de tempo que foi extraído o espectro de MS. (B) Espectro de MS da fração A-F24 extraído no intervalo de tempo 11,42-11,81 minutos. (C) Espectro de MS/MS do íon 665,2926 indicando as perdas de 60,02 Da (CH_3COOH), 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) e 18,01 Da (H_2O). (D) Ampliação do espectro de MS/MS para a observação dos íons diagnósticos de limonoides.

A escolha de todas as frações ocorreu de forma similar, explorando os espectros de MS/MS de alguns íons na busca por íons diagnósticos estabelecidos para limonoides. As perdas de 60,02 Da (CH_3COOH) e 100,05 Da ($C_5H_8O_2$) foram consideradas como substituintes no esqueleto dos limonoides. Esses resultados levaram ao isolamento de estruturas não reportadas para o gênero *Trichilia*.

4.3 Determinação estrutural por ressonância magnética nuclear dos limonoides isolados das raízes de *Trichilia pallida*

As substâncias isoladas tiveram seus esqueletos definidos como de um limonoide, inicialmente baseando-se nas análises anteriores feitas por LC-MS/MS. Porém a confirmação e elucidação estrutural dos limonoides só foi possível após os experimentos de RMN (1D e 2D), corroborando que a metodologia empregada utilizando íons diagnósticos de limonoides foi eficaz.

4.3.1 Substância **01** (12-*O*-tigloil-munrolina A)

O limonoide **01** (Figura 4.20) foi isolado da fração B-F10-SPE03 obtida após o fracionamento do extrato AcOEt da raiz de *Trichilia pallida*. As análises dos experimentos 1D e 2D realizadas por RMN confirmaram a estrutura do limonoide como um C-*seco* análogo a Munrolina A.

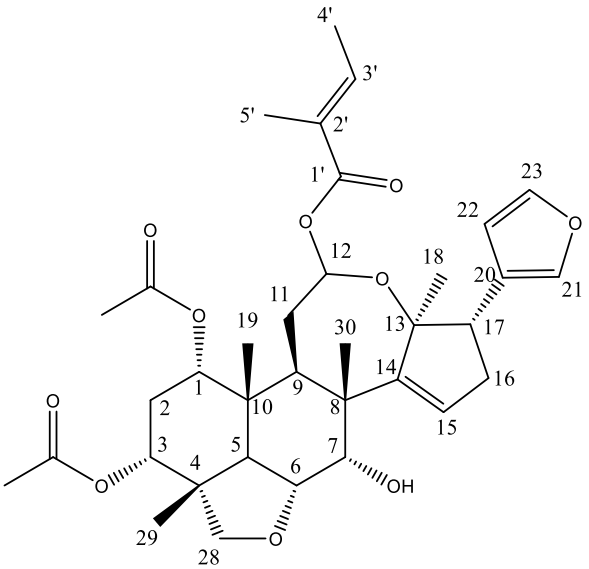


Figura 4.20 – Estrutura do limonoide 01.

O espectro de RMN de ^{1}H mostrou a presença de cinco sinais na região aromática, dos quais três são referentes aos hidrogênios do anel furano H-21, H-22 e H-23 em δ_H 7,45 (*dt*, 1,8 e 0,8 Hz, 1H), δ_H 6,50 (*dd*, *J* = 1,8 e 0,8 Hz,

1H) e 7,21 (*t*, *J* = 1,8 Hz, 1H), respectivamente. Os valores das constantes do H-22 indicam um acoplamento a ^{3}J com o H-23 (constante de 1,8 Hz) e a constante de 0,8 Hz um acoplamento a ^{4}J entre o H-22 e H-21, este último hidrogênio apresentou uma constante de 1,8 Hz, indicando um acoplamento a ^{4}J com o H-23.

O sinal em δ_H 7,03 (*qd*, *J* = 7,1 e 1,5 Hz, 1H) pertence ao hidrogênio sob ligação dupla da posição C-3' (δ_C 138,6) do grupo tigloil, esse hidrogênio acopla com os hidrogênios da posição C-4' (δ_H 1,30; δ_C 14,1) com uma constante de 7,1 Hz, e com os hidrogênios da metila alílica C-5' (δ_H 1,78; δ_C 12) com uma constante de 1,5 Hz (Figura 4.21).

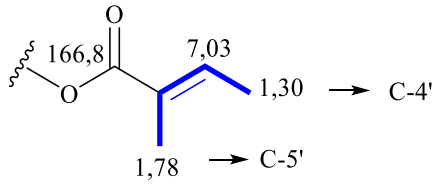


Figura 4.21 - Representação do acoplamento do hidrogênio em δ_H 7,03 com os hidrogênios das metilas C-4' e C-5'.

O carbono acila em δ_C 166,8 apresentou correlações, via HMBC, com os hidrogênios em δ_H 7,03 (H-3'), δ_H 1,30 (H-4'), δ_H 1,78 (H-5') e com o sinal em δ_H 6,34 (*dd*, *J* = 9,3 e 4,7 Hz, 1H), este sinal no HSQC está diretamente correlacionado ao carbono em δ_C 90,1 (C-12), seu deslocamento químico é justificado pela ligação com dois átomos de oxigênio. A correlação a ^{3}J do H-12 com a carboxila do grupo tigloil (δ_C 166,8) permitiu atribuiu de forma inequívoca a posição desse grupo no anel C do limonoide (Figura 4.22).

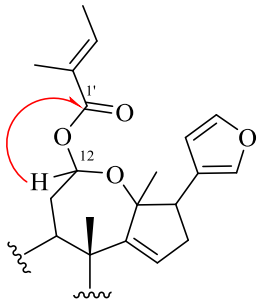


Figura 4.22 - Representação da correlação (^{3}J) observada no mapa de contorno HMBC entre o H-12 (δ_H 6,34) com a carboxila C-1' (δ_C 166,8).

O sinal em δ_H 4,86 (*t*, *J* = 3,0 Hz, 1H; δ_C 71,4), atribuído ao hidrogênio H-1, apresentou correlações no HMBC com o sinal da carboxila em δ_C 169,7 (1-OAc), com a metila em δ_C 16,2 (C-19), com o carbono não hidrogenado em δ_C 39,6 (C-10), com os carbonos ligados a oxigênios δ_C 71,7 (C-3) e δ_C 74,2 (C-6), e com o sinal em δ_C 28 (C-2) (Figura 4.23 B). No COSY foi observado que o H-1 acopla com os dois hidrogênios metilênicos, δ_H 2,03-2,13 (*m*, 2H) e δ_H 1,68 (*dt*, *J*=16,5 e 3,3 Hz, 1H), o valor de constante de 16,5 Hz refere-se ao acoplamento geminal, já a constante de 3,3 Hz indica um acoplamento equatorial/equatorial e/ou equatorial/axial entre o H-1 com os hidrogênios metilênicos vizinhos(2H-2), em primeiro momento não foi possível distinguir qual hidrogênio estava na posição axial ou equatorial. Porém, para o sinal em δ_H 4,78 (*dd*, *J* = 3,0 e 2,4 Hz, 1H) foi observada a mesma correlação no COSY os sinais em δ_H 2,03-2,13 (*m*) e δ_H 1,68 com o mesmo valor de 3,0 Hz para a constante de acoplamento, por esse motivo o sinal em δ_H 4,78 foi atribuído ao H-3, inferindo que ambos os hidrogênios (H-1 e H-3) estão nas posições equatorial do anel A. As constantes de acoplamento para o H-3 (3,0 e 2,4 Hz) nos permiti atribuir que o sinal em δ_H 1,68 pertence ao H-2b em axial acoplando com o H-3 com a constante de 3,0 Hz, enquanto o a constante de 2,4 Hz é referente ao acoplamento equatorial/equatorial do H-3 com o H-2a (Figura 4.23 A).

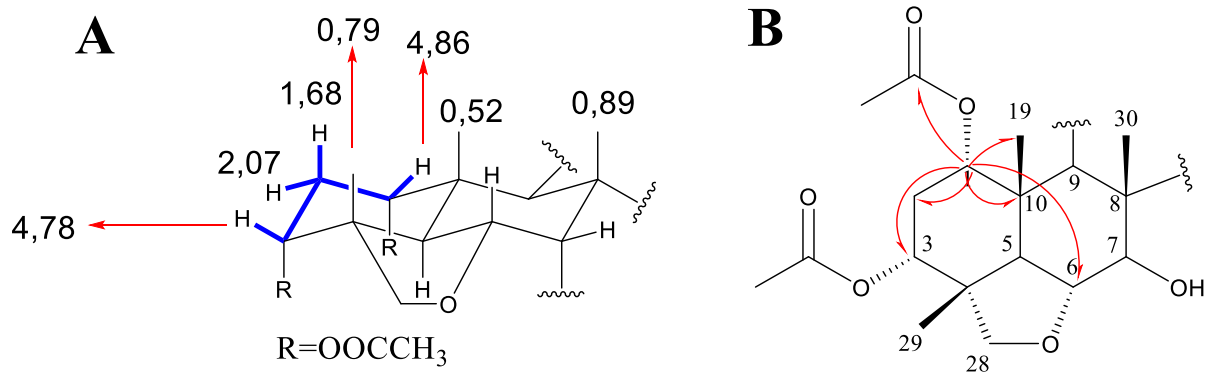


Figura 4.23 - (A) Linha em azul indica as correlações observadas no COSY, os hidrogênios H-1 (δ_H 4,86) e H-3 (δ_H 4,78) estão indicados na posição equatorial. (B) Representação das correlações observadas no mapa de contorno HMBC entre o hidrogênio H-1 com os carbonos indicados nas setas vermelhas.

A carboxila 3-OAc (δ_C 169,7) tem o mesmo deslocamento químico do carbono acila em 1-OAc, porém no mapa de contorno HMBC, os grupos acetatos foram diferenciados pela correlação a ^3J com os hidrogênios H-1 e H-3. Após separar cada grupo em suas posições na molécula, as metilas foram diferenciadas também com a análise do HMBC (Figura 4.24).

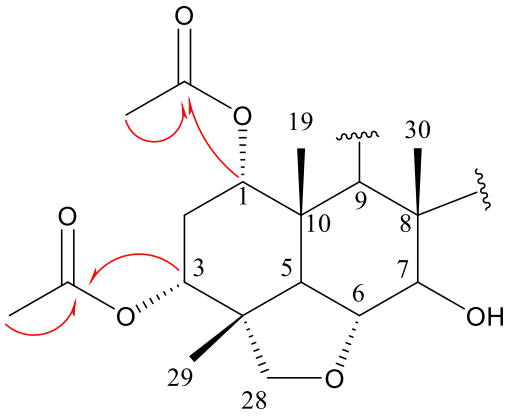


Figura 4.24 - Representação das correlações observadas no HMBC para diferenciar as posições de cada grupo acetato, essas correlações estão indicadas nas setas vermelhas.

O sinal do carbono não hidrogenado em δ_C 42,8 (C-4) apresentou correlações no HMBC com os hidrogênios em δ_H 0,79 (*sl*, 3H) da metila C-29, com os hidrogênios óxi-metilênicos em δ_H 3,52 (*d*, J = 7,5 Hz, 1H) e 3,66 (*d*, J = 7,5 Hz, 1H), ambos ligados ao carbono em δ_C 78,3 (C-28), com o H-2 (δ_H 2,03-2,13), H-3 (δ_H 4,78), com o sinal em δ_H 2,77 (*d*, J = 12,5 Hz, 1H) atribuído ao H-5, com o sinal em δ_H 3,83 (*dd*, J = 12,5; 3 Hz, 1H) e δ_H 3,75 (*d*, J = 3,0 Hz, 1H), pertencentes ao hidrogênios H-6 e H-7, respectivamente. A correlação com os sinais em δ_H 3,52 e 3,66 indica que não há mais a presença da metila C-28, nesta posição é encontrado um CH_2 ligado a um oxigênio. O sinal de carbono em δ_C 74,2 mostrou uma correlação com sinal em δ_H 3,52 (H-28b), propondo uma ponte éter nos carbonos C-6/28 (Figura 4.25).

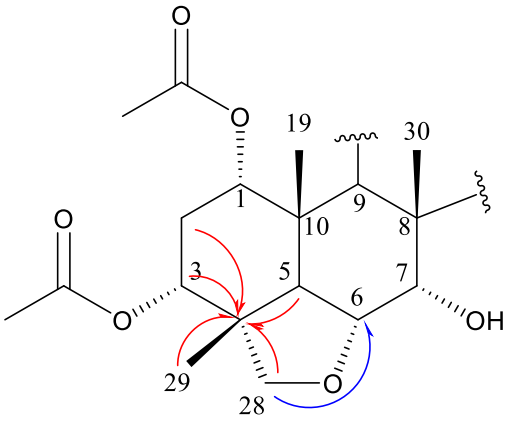


Figura 4.25 - Representação das correlações observadas no HMBC com o carbono C-4 nas setas em vermelho. A seta em azul representa a correlação observada no HMBC do carbono C-28 (δ_C 78,3) com o H-6 (δ_H 3,83).

O sinal em δ_H 3,83 (*dd*, *J* = 12,5 e 3 Hz, 1H) possui uma constate de acoplamento (12,5 Hz) sugerindo que o hidrogênio da posição H-6 esteja na posição axial e acopla com o H-5 em δ_H 2,77 (*d*, *J* = 12,5 Hz, 1H) que também está na posição axial. A outra constante de 3 Hz se origina do acoplamento axial/equatorial do H-6 com o H-7 em δ_H 3,75 (*d*, *J* = 3 Hz, 1H) (Figura 4.26).

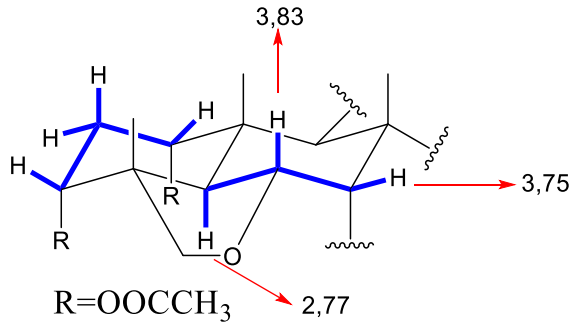


Figura 4.26 - As linhas em azul indicam as correlações observadas no COSY. Os hidrogênios H-5 (δ_H 2,77) e H-6 (δ_H 3,83) estão indicados na posição axial devido ao valor da constante de acoplamento de 12,5 Hz. O H-7 (δ_H 3,75) está indicado na posição equatorial por apresentar uma constante de 3,0 Hz gerada do acoplamento com o H-6.

O carbono quaternário C-8 (δ_C 46,7) mostrou correlações no HMBC com os hidrogênios H-7 em δ_H 3,75 (*d*, *J* = 3,0 Hz, 1H), H-9 em δ_H 3,01 (*dd*, *J* =

12,3 e 4,5 Hz, 1H), com a metila C-30 em δ_H 0,89 (s, 3H), com o hidrogênio olefínico H-15 em δ_H 5,48 (*dd*, *J* = 3,5 e 1,7 Hz, 1H) pertencente ao anel D. O C-8 também apresentou uma correlação a J^3 com os hidrogênios metilênicos da posição C-11 no anel C em δ_H 1,85 (*d*, *J* = 4,5 Hz, 1H) e 1,80 (*d*, *J* = 4,7 Hz, 1H). No mapa de contorno COSY observou-se a correlação do H-9 com os hidrogênios metilênicos ligados ao C-11, os quais também acoplam com o H-12 em δ_H 6,34 (*dd*, *J* = 9,3; 4,7 Hz, 1H) (Figura 4.27).

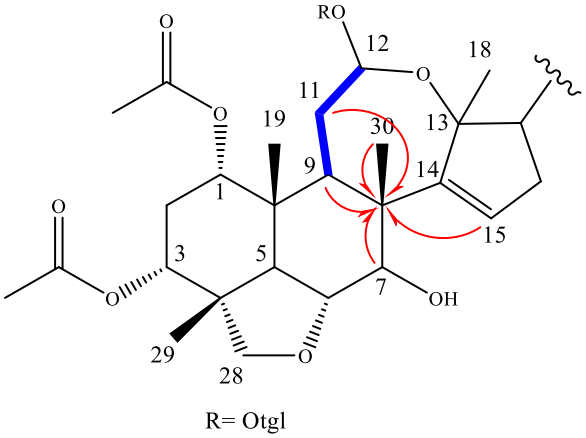


Figura 4.27 - Linha em azul representa as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observadas no HMBC para o C-8.

A análise de RMN mostrou que o limonoide 01 apresentou uma ponte éter em C-6/28 (δ_C 74,2/78,3) e outra em C-12/13 (δ_C 90,1/91,5), diferente da classe da nimbolinina em que a segunda ponte éter está localizada no C-12/15. Essa característica foi relatada em dois limonoides isolados de *Munronia unifoliolata* (Meliaceae), nos limonoides Munrolina A e B.[73]

Os sinais de carbono em δ_C 156,2 e 127, indicam uma ligação dupla no anel D em $\Delta^{14,15}$, o C-14 totalmente substituído é o mais desblindado, enquanto o sinal em δ_C 127 é hidrogenado, no HSQC podemos confirmar que este carbono está ligado ao hidrogênio em δ_H 5,48 (*dd*, *J* = 3,5; 1,7 Hz, 1H). No HMBC o C-14 apresentou correlações com os hidrogênios H-7, H-9, H-15, com as metilas 3H-30 e 3H-18 em δ_H 1,44 (*s*, 3H) e com os hidrogênios em δ_H 2,03-2,13 (*m*, 1H) e 2,31 (*ddd*, *J* = 15,2; 7,5; 3,5 Hz, 1H), ambos ligados diretamente no carbono C-16. Para esses hidrogênios metilênicos, foi averiguado no COSY, que ambos

acoplam com o hidrogênio olefínico H-15 em δ_H 5,48 (*dd*, *J* = 3,5; 1,7 Hz, 1H) e com o hidrogênio metínico H-17 em δ_H 4,32 (*dd*, *J* = 10,7; 7,5 Hz, 1H) (Figura 4.28 A).

O H-17 tem correlação no HMBC com a metila C-18 (δ_C 21,8), com o carbono não hidrogenado C-13 (δ_C 91,5), com o carbono metilênico C-16 (δ_C 32,5) e com os carbonos aromáticos do anel furano C-20 (δ_C 124,4), C-22 (δ_C 112) e C-23 (δ_C 141,1) (Figura 4.28 B).

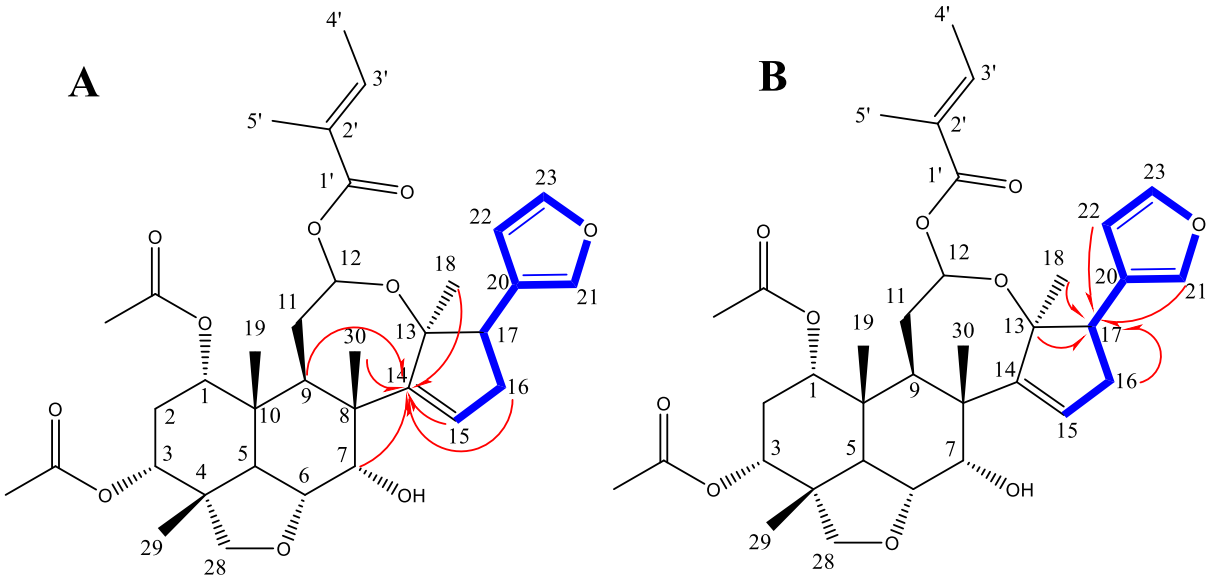


Figura 4.28 - Em azul é indicado as correlações observadas no COSY. As setas vermelhas em (A) representa as correlações observadas no HMBC para o carbono C-14. As setas vermelhas em (B) representas as correlações observadas no HMBC para o H-17.

Concluindo, os dados acima em comparação com aqueles de RMN de ^{13}C do limonoide Munrolina A (Tabela 4.1), permite confirmar a estrutura a estrutura 12-*O*-tigloil-munrolina A ao composto **1.** Experimentos de NOE serão realizados para confirmar a estereoquímica da molécula.

Tabela 4.1 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide 01 e RMN de ^{13}C do limonoide Munrolina A (125 MHz; $CDCl_3$)[73]

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[73])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	71,4	71,7	4,86 (*t*, *J* = 3,0 Hz, 1H)
2	28	28,0	2,03-2,13 (*m*, 2H) e 1,68 (*dt*, 16,5 e 3,0 Hz, 1H)
3	71,7	71,7	4,78 (*dd*, *J* = 3,0 e 2,4 Hz, 1H)
4	42,8	42,7	-
5	38,9	38,8	2,77 (*d*, *J* = 12,5 Hz, 1H)
6	74,2	74,3	3,83 (*dd*, J = 12,5, 3 Hz, 1H)
7	77,8	77,8	3,75 (*d*, *J* = 3,0 Hz, 1H)
8	46,7	46,6	-
9	34,8	34,0	3,01 (*dd*, *J* = 12,3 e 4,5 Hz, 1H)
10	39,6	39,6	-
11	31,6	26,7	1,85 (*d*, *J* = 4,5 Hz, 1H) e 1,80 (*d*, *J* = 4,7 Hz, 1H)
12	90,1	60,0	6,34 (*dd*, *J* = 9,3 e 4,7 Hz, 1H)
13	91,5	92,9	-
14	156,2	157,3	-
15	127,1	126,3	5,49 (*dd*, *J* = 3,5 e 1,7 Hz, 1H)
16	32,5	32,2	2,03-2,13 (*m*, 1H) e 2.31 (*ddd*, *J* = 15,2; 7,5 e 3,5 Hz, 1H)
17	45,2	46,7	4,32 (*dd*, *J* = 10,7 e 7,5 Hz, 1H)
18	21,8	21,3	1,44 (*s*, 3H)
19	16,2	16,3	0,52 (*s*, 3H)
20	124,4	124,0	-
21	141,1	140,0	7,45 (*dt*, *J* = 1,8 e 0,8 Hz, 1H)
22	112	111,4	6.50 (*dd*, *J* = 1,8 e 0,8 Hz, 1H)
23	142,6	142,5	7.21 (*t*, *J* = 1,8 Hz, 1H)
28	78,3	78,3	3,52 (*d*, *J* = 7,5 Hz, 1H) e 3,66 (*d*, *J* = 7,5 Hz, 1H)
29	19,7	20,0	0,79 (*sl*, 3H)
30	24,1	24,3	0,89 (*s*, 3H)
1`	166,8		-
2`	128,8		-
3`	138,6		7.03 (*qd*, *J* = 7,1 e 1,5 Hz, 1H)
4`	14,1		1.30 (*dd*, *J* = 7,1 e 1,5 Hz, 3H)
5`	12		1.78 (*t*, *J* = 1,5 Hz, 3H)
1-OAc	21,1	21,4	1,88 (*s*, 3H)
	169,7	170,4	-
3-OAc	20,5	21,3	1,52 (*s*, 3H)
	169,7	170,5	-

4.3.2 Substância **02** (12-desmetóxi-12-hidróxi-meliatoosenina S)

O limonoide **02** foi isolado da B-F10-SPE02 oriunda do fracionamento do extrato AcOEt da raiz de *Trichilia Pallida*. As análises dos espectros de RMN ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ e dos mapas de contorno HSQC, HMBC e COSY confirmaram a estrutura do limonoide da classe C-*seco* (Figura 4.29), (Tabela 4.2).

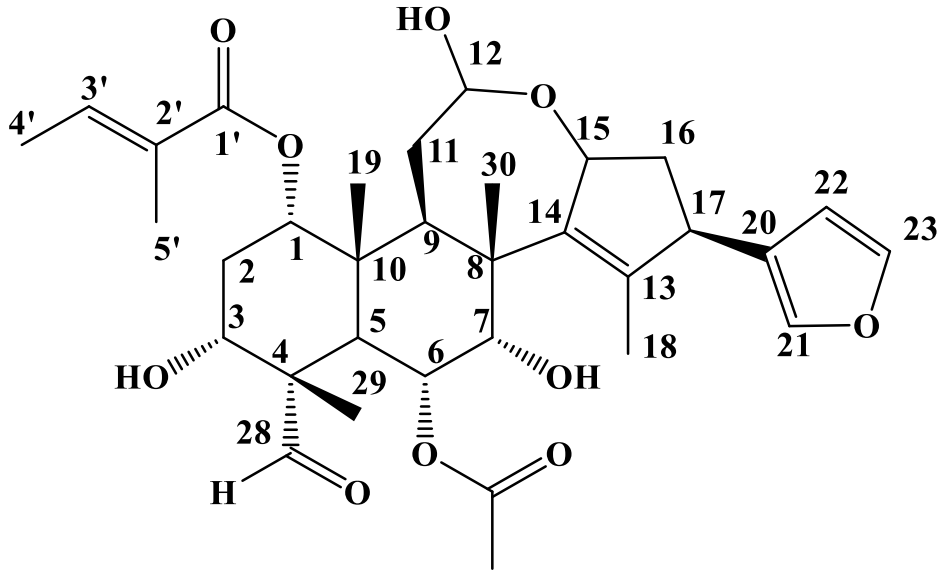


Figura 4.29 – Estrutura do limonoide 02.

O espectro de RMN ^{1}H do limonoide **02** sugeriu a presença de um grupo tigloila, este apresentou o sinal referente ao hidrogênio olefínico da posição C-3' junto do sinal residual do solvente C_6D_6, sendo possível observar somente parte da multiplicidade, porém foi possível atribuir este sinal ao hidrogênio da ligação dupla do tigloil em δ_H 7,11-7,17 (*m*, 1H). Sua multiplicidade deveria ser um quarteto de dupletos (*qd*), pois o H-3' acopla com os hidrogênios da metila C-4' e C-5', essas correlações foram observadas no mapa de contorno COSY. Os hidrogênios 3H-4' desse substituinte aparecem com uma multiplicidade de duplo dupleto com duas constantes de acoplamento 7,0 Hz e 1,3 Hz, os valores dessas constantes corroboram para que o substituinte seja um grupo tigloila. A sua

carboxila C-1' (δ_C 166,7) via HMBC correlaciona-se com os hidrogênios das metilas 3H-4' δ_H 1,40 (*dd*, *J* = 7,0 e 1,3 Hz, 3H) e 3H-5' δ_H 1,93 (*tl*, *J* = 1,3 Hz, 3H), e com o H-3' da ligação dupla. Na estrutura **01**, o grupo O-tigloila foi localizado no anel C ligado ao carbono da posição C-12, porém na estrutura **02** ele foi observado com uma correlação no HMBC entre o carbono acila C-1' com o sinal em δ_H 5,03 (*t*, *J* = 3,0 Hz, 1H), o qual foi atribuído ao hidrogênio H-1 (δ_C 73) (Figura 4.30), permitindo posicioná-lo em C-1.

Os sinais dos hidrogênios metilênicos (2H-2) em δ_H 1,65-1,72 (*m*, 1H) e δ_H 1,76-1,84, ficaram sobrepostos com sinais de metila em δ_H 1,78 (*s*, 3H) e com sinais de outros hidrogênios de CH_2 (2H-11), respectivamente, dificultando a atribuição das constantes e multiplicidades. Porém, no COSY, esses sinais (δ_H 1,71 e 1,81; δ_C 28,8) acoplam com os hidrogênios H-1 (δ_H 5,03) e com H-3 em δ_H 3,54 (*m*, 1H) (Figura 4.30). No HMBC o H-3 apresentou três correlações, uma com o sinal de um carbono ligado a oxigênio em δ_C 73 (C-1), outra com o carbono terciário em δ_C 33,9 (C-5) e por último com a metila em δ_C 14,1 (C-29). O H-3 (δ_C 75) não apresentou correlação com nenhum carbono acila, indicando a presença de um grupo -OH em C-3 (Figura 4.30).

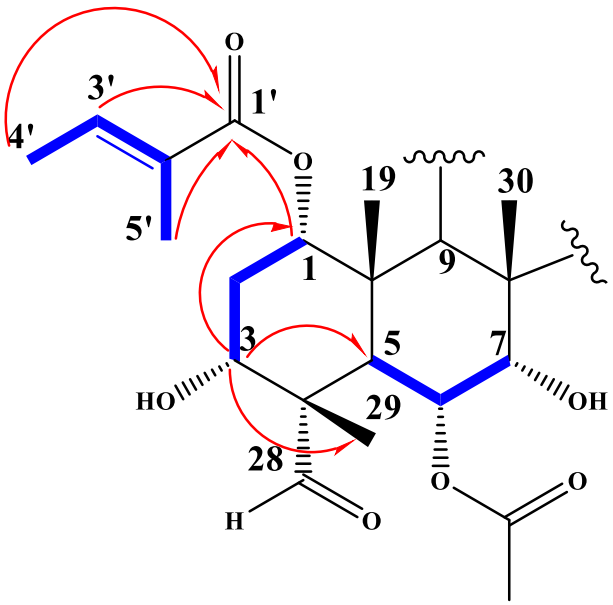


Figura 4.30 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

O sinal mais desblindado em δ_H 10,08 (*s*, 1H) pertence ao hidrogênio de um aldeído na posição C-28 (δ_C 206,8), em primeiro momento não foi possível a observação do H-28 ligado diretamente ao C-28 no mapa de contorno HSQC, contudo o DEPT135 mostrou que o carbono em δ_C 206,8 era hidrogenado e no HMBC foi visto o sinal do satélite (acoplamento a ^1J) correlacionando o C-28 ao H-28. Para o hidrogênio H-28 também foram observadas as correlações com a metila C-29 (δ_C 14,1), com o C-5 (δ_C 33,9) e com o C-4 (δ_C 49,1).

A presença do aldeído em C-28, descartou a possibilidade de uma ponte éter em C-6/28 igual a estrutura 01, entretanto, o sinal em δ_C 70,2 atribuído ao carbono da posição C-6, indicou a presença de um oxigênio devido ao seu deslocamento químico, no HSQC esse carbono está correlacionado ao sinal em δ_H 5,44 (*dd*, *J* = 12,3 e 2,3 Hz, 1H) o qual possui uma correlação com o sinal de uma carboxila em δ_C 170,3 (6-OAc), indicando que nessa posição temos um grupo O-Acetil.

Os valores das constantes de acoplamento do H-6 δ_H 5,44 (*dd*, *J* = 12,3; 2,3 Hz, 1H), H-5 δ_H 4,07 (*d*, *J* = 12,3 Hz, 1H) e H-7 δ_H 4,68 (*d*, *J* = 2,3 Hz, 1H) sugerem que entre o H-5 e H-6 tem-se um acoplamento axial/axial, e entre H-6 e H-7 um acoplamento axial/equatorial, como já foi observado no limonoide 01.

O sinal em δ_H 0,54 (*s*, 3H) é referente aos hidrogênios da metila C-19, os quais, no HMBC, possuem correlações com os sinais de carbono em δ_C 73 (C-1), δ_C 33,9 (C-5) e δ_C 36,2 (C-9). Para o sinal em δ_H 1,06 (C-30) é observada as correlações com sinais de carbonos em δ_C 36,2 (C-9), δ_C 49,3 (C-8), δ_C 73,1 (C-7) e δ_C 142,5 (C-14) (Figura 4.31).

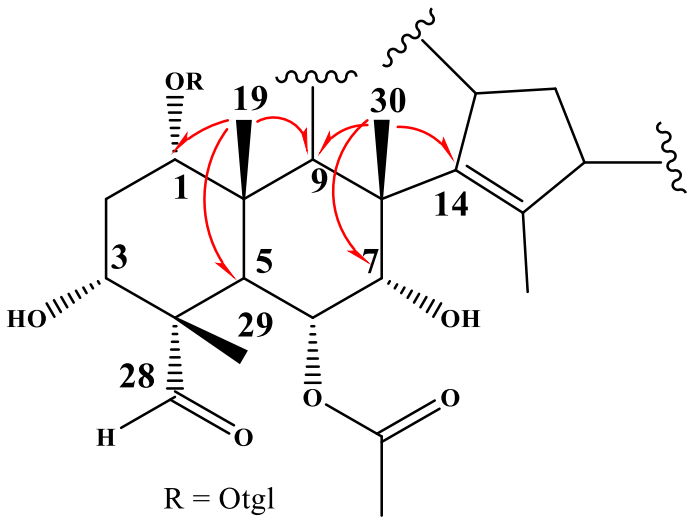


Figura 4.31 - Representação das correlações observadas no HMBC para o 3H-19 e 3H-30, $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

O sinal em δ_C 94,8 indica a presença de dois oxigênios ligados a um carbono sp^3, este sinal foi atribuído ao C-12, o qual está ligado diretamente ao hidrogênio em δ_H 4,81 (*t*, *J* = 7,5 Hz, 1H). No HMBC, o C-12 apresentou correlações com os sinais em δ_H 2,94 (*dd*, *J* = 6,1 e 2,8 Hz, 1H) atribuído ao H-9, δ_H 1,65-1,72 (*m*, 2H) referente aos hidrogênios metilênicos da posição C-11, e δ_H 5,30 (*tt*, *J* = 8,0 e 1,9 Hz, 1H) atribuído ao H-15, essa última correlação passa por um por um heteroátomo, confirmando a presença de uma ponte éter em C-12/15. Para o sinal do H-12 em δ_H 4,81 foi observado no HMBC apenas a correlação a ^{3}J com o sinal em δ_C 75,4 (C-15), confirmando um hemeacetal em C-12.

O duplo dupleto em δ_H 2,03 integrandos para dois hidrogênios é referente ao H-16 (*J* = 8,0 e 5,1 Hz), o qual acopla com o hidrogênio H-15 em δ_H 5,30 e com o sinal em δ_H 3,07 (*t*, *J* = 5,1 Hz, 1H) atribuído ao H-17. Foi observado um acoplamento fraco no COSY do H-17 com os hidrogênios da metila C-18, sob ligação dupla, em δ_H 1,56 (*d*, *J* = 1,7 Hz, 3H), justificando a sua multiplicidade com um dupleto.

Os sinais dos hidrogênios aromáticos do anel furano apareceram em 21 δ_H 6,89 (*t*, *J* = 0,8 Hz, 1H), 5,85 (*dd*, *J* = 1,9 e 0,8 Hz, 1H) e 7,09 (*t*, *J* = 1,9 Hz, 1H), os quais foram atribuídos, respectivamente, ao H-21, H-22 e H-23. É

notório que o H-21 acopla com o H-22 a ^{4}J gerando uma constante de 0,8 Hz, e o acoplamento a ^{3}J do H-22 com o H-23 gerou uma constante de 1,9 Hz. No mapa de contorno HMBC, foi observada as correlações dos hidrogênios aromáticos do anel furano H-21 e H-22 com o carbono C-17 (δ_C 44,5).

Concluindo, os dados acima em comparação com aqueles de RMN de ^{13}C do limonoide Meliatoosenina S[74] (Tabela 4.2), permitem confirmar a estrutura a estrutura 12-desmetóxi-12-hidróxi-meliatoosenina S ao composto **2**. Experimentos de NOE serão realizados para confirmar a estereoquímica da molécula.

Tabela 4.2 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **02** e RMN de ^{13}C do limonoide Meliatoosenina S (^{13}C 100 MHz; $CDCl_3$)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[74])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	73	72,1	5,03 (*t*, *J* = 3,0 Hz, 1H)
2	28,8	28,2	1,76-1,84 (*m*, 1H) e 1,65-1,72 (*m*, 1H)
3	75	75,2	3,54 (*m*, 1H)
4	49,1	48,9	-
5	33,9	33,2	4,07 (*d*, *J* = 12,3 Hz, 1H)
6	70,2	69,9	5,44 (*dd*, *J* = 12,3 e 2,3 Hz, 1H)
7	73,1	74,5	4,68 (*d*, *J* = 2,3 Hz, 1H)
8	49,3	45,4	-
9	36,2	35,3	2,94 (dd, *J* = 6,1 e 2,8 Hz, 1H)
10	42,5	42,5	-
11	29,9	31,3	1,65-1,72 (*m*, 2H)
12	94,8	97,8	4,81 (*t*, *J* = 7,5 Hz, 1H)
13	137	140,2	-
14	142,5	143,9	-
15	75,4	76,4	5,30 (*tt*, *J* = 8,0 e 1,9 Hz, 1H)
16	39	37,7	2,03 (*dd*, *J* = 8,0 e 5,1 Hz, 2H)
17	44,5	46,7	3,07 (*t*, *J* = 5,1 Hz, 1H)
18	15,9	16,1	1,56 (*d*, *J* = 1,7 Hz, 3H)
19	17,5	17,1	0,54 (*s*, 3H)
20	127,8	128,2	-
21	139,2	138,9	6,89 (*dt*, *J* = 1,9 e 0,8 Hz, 1H)
22	109,9	110,1	5,85 (*dd*, *J* = 1,9 e 0,8 Hz, 1H)
23	143,6	142,9	7,09 (*t*, *J* = 1,9 Hz, 1H)
28	206,8	207,3	10,08 (*s*, 1H)
29	14,1	13,8	0,91 (*s*, 3H)
30	20,8	21,1	1,06 (*s*, 3H)
1'	166,7	166,1	-
2'	129	128,8	-
3'	139,2	137,8	7,11-7,17 (*m*, 1H)
4'	14,4	12,2	1,40 (*dd*, *J* = 7,0 e 1,3 Hz, 3H)
5'	12,3	14,7	1,93 (*t*, *J* = 1.3 Hz, 3H)
6-OAc	20,6	20,9	1,78 (*s*, 3H)
	170,3	170,3	-

4.3.3 Substância **03** (12-desmetóxi-12-acetóxi-meliatoosenina S)

Os limonoides **03**, **04** e **05** foram isolados da fração B-F8 por CLAE-DAD utilizando um equipamento semipreparativo. Para o limonoide **03** o estudo dos espectros de RMN ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$, juntamente com os mapas de correlações (HSQC, HMBC e COSY), mostraram similaridade com o limonoide **02**, indicando a presença do o grupo O-tigloila na posição axial em C-1, das hidroxilas nos carbonos C-3 e C-7, a presença de um aldeído em C-28, e um grupo O-acetila na posição equatorial em C-6 (Figura 4.32), Tabela 4.3.

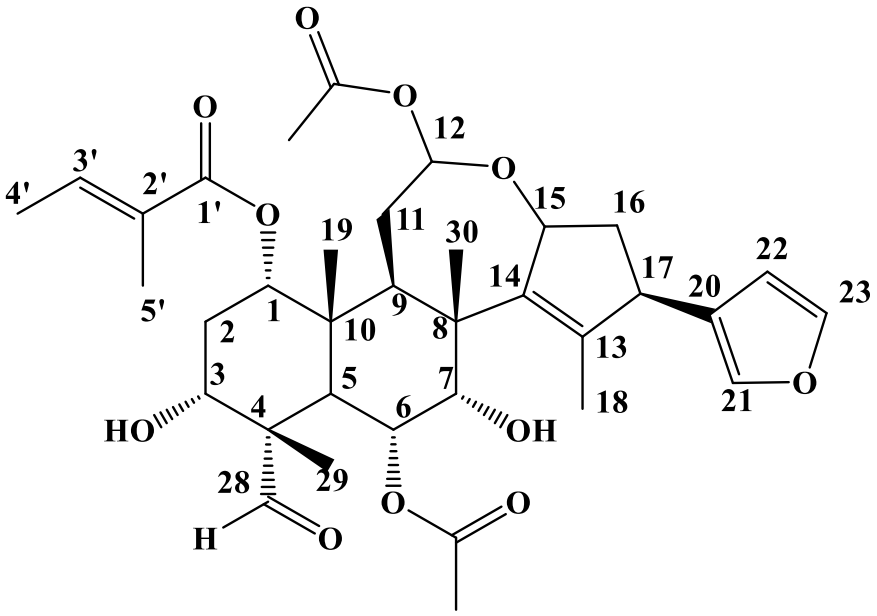


Figura 4.32 - Estrutura do limonoide 03.

A diferença encontrada nos espectros foi o sinal do hidrogênio da posição H-12, o qual aparece em δ_H 4,81 (*t*, *J* = 7,5 Hz, 1H) no limonoide **02**, já no limonoide **03** ele apareceu em δ_H 6,02 (*dd*, *J* = 10,3 e 5,0 Hz, 1H) devido ao efeito retirador de elétron do grupo O-acetil na posição C-12. Esse grupo foi confirmado observando o mapa de contorno HMBC, onde o sinal do H-12 mostrou uma

correlação com o sinal de um carbono acila em δ_C 168,7 (12-OAc), confirmando a posição C-12 estar O-acetilada (Figura 4.33).

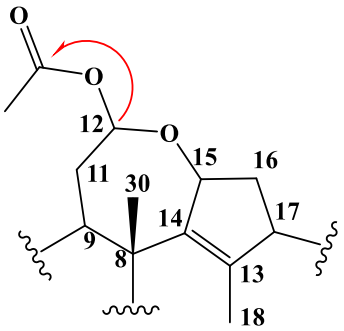


Figura 4.33 -Correlação observada no HMBC do hidrogênio da posição H-12 (6,02) com o carbono acila em 168,7.

Os hidrogênios metilênicos presentes no anel C nos dois limonoides estão vizinhos a centros estereogênicos, contudo no limonoide **03** tem-se o desdobramento mais evidenciado. A justificativa para essa maior diferença no deslocamento químico explica-se pela presença do grupo O-acetila em C-12, tornando o ambiente químico e eletrônico para os hidrogênios metilênicos mais diferentes em comparação com o limonoide **02**, sendo observados H-11a em δ_H 1,67 (*d*, *J* = 5,0 Hz, 0H) e H-11b em δ_H 1,83 (*m*, 1H). Outra diferença a ser notada no espectro de RMN ^{1}H é o dupleto em 3,01 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 2H), esse sinal refere-se a dois hidrogênios bem distantes na molécula, H-9 e H-16, os quais sofreram uma coalescência nos seus sinais. As outras correlações e discussão da estrutura já foram relatadas no limonoide **02**.

Concluindo, os dados acima em comparação com aqueles de RMN de ^{13}C do limonoide Meliatoosenina S[74] (Tabela 4.3), permitem confirmar a estrutura a estrutura 12-desmetóxi-12-acetóxi-meliatoosenina S ao composto **3**. Experimentos de NOE serão realizados para confirmar a estereoquímica da molécula.

Tabela 4.3 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **03** e RMN de ^{13}C do limonoide Meliatoosenina S (^{13}C 100 MHz; $CDCl_3$)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[74])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	72,6	72,1	5,05 (*s*, 1H)
2	28,9	28,2	1,83 (*m*, 1H) e 1,72 (*t*, 2,9 Hz, 1H)
3	75,0	75,2	3,55 (*s*, 1H)
4	49,1	48,9	-
5	34,1	33,2	4,07 (*d*, *J* = 12,1 Hz, 1H)
6	70,1	69,9	5,45 *(dd*, J = 12,1 e 2,3 Hz, 1H)
7	73,0	74,5	4,66 (*d*, *J* = 2,3 Hz, 1H)
8	49,3	45,4	-
9	36,5	35,3	3,01 (*d*, *J* = 2,9 Hz, 2H)
10	42,7	42,5	-
11	27,5	31,3	1,67 (*d*, *J* = 5,0 Hz, 1H) e 1,83 (*m*, 1H)
12	94,7	97,8	6,02 (*dd*, *J* = 10,3 e 5,0 Hz, 1H)
13	137,8	140,2	-
14	141,8	143,9	-
15	78,0	76,4	5,20 (*t*, *J* = 7,9 Hz, 1H)
16	38,7	37,7	2,04 (m, 2H)
17	44,6	46,7	3,01 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 2H)
18	15,9	16,1	1,53 (*s*, 3H)
19	17,8	17,1	0,58 (*s*, 3H)
20	128,1	128,2	-
21	139,2	138,9	6,82 (*s*, 1H)
22	109,8	110,1	5,78 (*s*, 1H)
23	143,6	142,9	7,07 (*d*, *J* = 1,7 Hz, 1H)
28	206,4	207,3	10,08 (*s*, 1H)
29	14,0	13,8	0,93 (*s*, 3H)
30	21,0	21,1	1,05 (*s*, 3H)
1`	166,3	166,1	-
2`	129,0	128,8	-
3`	139,4	137,8	7,16 (junto do sinal residual do solvente)
4`	14,4	12,2	1,39 (*d*, *J* = 7,0 Hz, 3H)
5`	12,3	14,7	2,01 (*s*, 3H)
6-OAc	20,6	20,9	1,77 (*s*, 3H)
	170,2	170,3	-
12-OAc	20,8		1,63 (*s*, 3H)
	168,7		-

4.3.4 Substância **04** (2-acetóxi-nimbolinina B)

O limonoide **04** foi isolado da fração B-F8, sua estrutura foi elucidada por RMN unidimensional e bidimensional, as atribuições dos sinais de RMN ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$ e as correlações observadas nos mapas de contorno (HSQC, HMBC e COSY) confirmaram a estrutura de um limonoide *C-seco* contendo um hemiacetal no anel C. Na estrutura é observada uma ponte éter em C-6/28 e outra em C-12/15 característica da classe nimbolinina (Figura 4.34), Tabela 4.4.

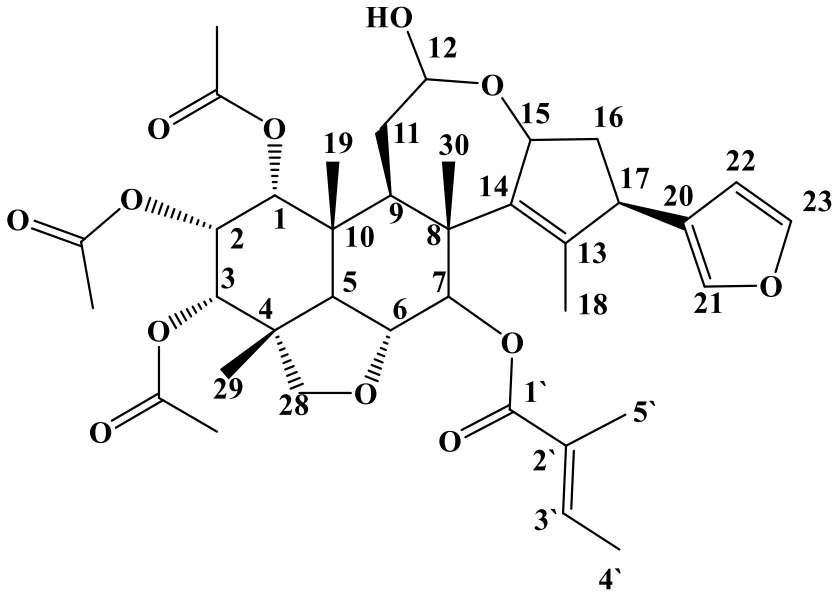


Figura 4.34 - Estrutura do limonoide 04.

No espectro de RMN $^{13}C\{^{1}H\}$ foi averiguado a presença de quatro carbonos acilas, uma em δ_C 165,7 (C-1') atribuída à carboxila do grupo O-tigloila, o qual foi posicionado ao C-7 devido a correlação observado no HMBC entre o H-7 em δ_H 5,89 (*d*, *J* = 2,8 Hz, 1H) e o C-1'deste grupo. As outras três carboxilas são de grupos O-acetilas ligadas aos carbonos C-1 (δ_C 71,8), C-2 (δ_C 68,3) e C-3 (δ_C 73,3). Suas posições foram atribuídas conforme as observações das correlações a ^{3}J no mapa de contorno HMBC, o H-1 δ_H 5,27 (*d*, *J* = 3,0 Hz, 1H) correlaciona-se com a carboxila em δ_C 169,6; o H-2 δ_H 5,59 (*t*, *J* = 3,0 Hz, 1H)

com a carboxila em δ_C 170 e o H-3 δ_H 5,30 (*d*, *J* = 3,0 Hz, 1H) com o carbono acila em δ_C 169,3. Enquanto nas estruturas **01**, **02** e **03** observou-se a presença de um carbono metilênico na posição C-2, na estrutura **04** tem-se um grupo O-acetila ligado ao C-2. O hidrogênio H-2 tem multiplicidade de tripleto com uma constate de acoplamento de 3 Hz, o que indica um acoplamento axial/equatorial ou equatorial/equatorial, mas considerando uma menor repulsão no anel de seis membros, o grupo O-Ac da posição C-2 foi colocado em equatorial, contudo, somente o experimento de NOE poderá confirmar sua correta posição em face α ou β da molécula.

No mapa de contorno HSQC foi observado que os sinais dos hidrogênios do anel furano H-21 e H-23 estão junto do sinal residual do solvente utilizado, benzeno-d_6 (C_6D_6).

Os dados acima em comparação com aqueles de RMN de ^{13}C do limonoide nimbolinina B[75] (Tabela 4.4), permitem confirmar a estrutura a estrutura 12-acetóxi-nimbolinina B ao composto **4**. Experimentos de NOE serão realizados para confirmar a estereoquímica da molécula.

Tabela 4.4 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **04** e RMN de ^{13}C do limonoide nimbolinina B (^{13}C 75,46 MHz; $CDCl_3$)

(continua)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[75])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	71,8	71,6	5,27 (*d*, *J* = 3,0 Hz, 1H)
2	68,3	28,0	5,59 (*t*, *J* = 3,0 Hz, 1H)
3	73,3	72,0	5,30 (*d*, *J* = 3,0 Hz, 1H)
4	43,3	42,8	-
5	40,7	40,5	2,92 (*d*, *J* = 12,8 Hz, 1H)
6	72,1	72,6	3,84 (*dd*, *J* = 12,8 e 2,8 Hz, 1H)
7	74,7	75,0	5,89 (*d*, *J* = 2,8 Hz, 1H)
8	45,8	45,8	-
9	36	35,8	3,12 (*d*, *J* = 9,8 Hz, 1H)
10	40,7	40,7	-
11	31,9	32,3	1,25 (*d*, *J* = 15,3 Hz, 1H) e 1,33 (*d*, J = 11,3 Hz, 1H)
12	91,4	91,6	4,88 (*s* largo, 1H)
13	143	141,0	-
14	141,5	143,6	-
15	77	77,4	5,19 (*d*, *J* = 7,9 Hz, 1H)
16	38,6	38,6	1,69 (*d*, *J* = 12,5 Hz, 1H) e 2,32 (*dt*, *J* = 14,0 e 8,9 Hz, 1H)
17	46,9	46,8	3,18 (*d*, *J* = 9,1 Hz, 1H)
18	16,4	16,1	1,75 (*s*, 1H)
19	16,4	16,2	0,69 (*s*, 1H)
20	128,9	129,0	-
21	139,5	139,3	7,16 (junto do sinal do solvente)
22	110,9	110,8	6,50 (*s*, 1H)
23	143,1	143,0	7,16 (junto do sinal do solvente)
28	77,5	78,1	3,45 (*d*, *J* = 7,4 Hz, 1H) e 3,54 (*d*, *J* = 7,7 Hz, 1H)
29	18,9	19,5	0,87 (*s*, 3H)
30	20,5	20,8	0,97 (*s*, 3H)
1'	165,7	166,5	-
2'	129,6	129,3	-
3'	136	136,7	7,08 (*d*, *J* = 7,4 Hz, 1H)
4'	14,2	14,4	1,48 (*d*, *J* = 7,0 Hz, 1H)
5'	12,3	12,2	1,92 (*s*, 3H)
1-OAc	21,4	21,0	2,02 (*s*, 3H)

Tabela 4.5 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **04** e RMN de ^{13}C do limonoide nimbolinina B (^{13}C 75,46 MHz; $CDCl_3$)

(conclusão)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[75])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
	169,6	170,6	-
2-OAc	20,6		1,88 (*s*, 3H)
	170		-
3-OAc	20,4	21,7	1,78 (*s*, 3H)
	169,3	170,1	-

4.3.5 Substância **05** (Mombasol)

O limonoide **05** foi isolado da fração B-F8 e após a identificação estrutural por RMN 1D e 2D, verificou-se que se tratava do limonoide mombasol, isolado pela primeira vez em *Turrea mombasana*. (Figura 4.35), (Tabela 4.5).

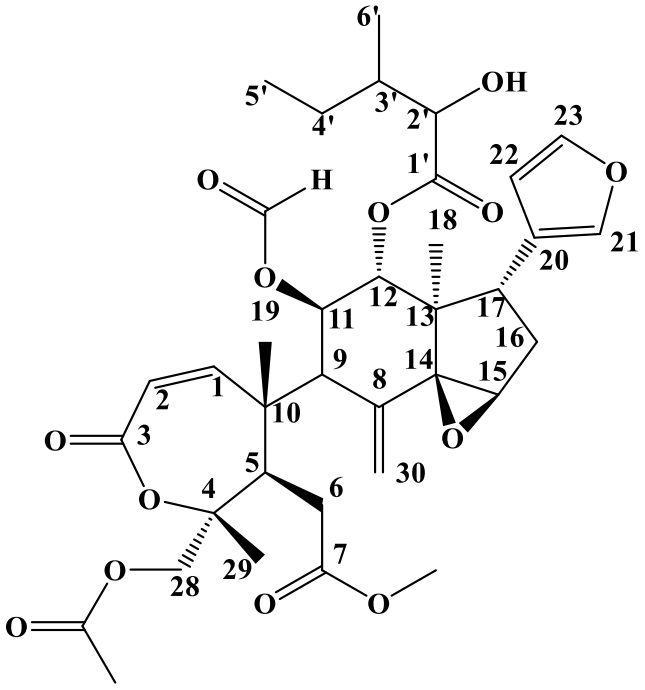


Figura 4.35 - Estrutura do limonoide 05.

O espectro de RMN ^{1}H mostrou sinais do anel furano H-21, H-22 e H-23 em δ_H 7,07 (*sl*, 1H), δ_H 5,97 (*sl*, 1H) e δ_H 7,06 (*t*, *J* = 1,7 Hz, 1H), respectivamente. A análise conjunta dos espectros RMN ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$ e do mapa de contorno HSQC, permitiu atribuir em quais carbonos os respectivos hidrogênios aromáticos estavam ligados, C-21 (δ_C 141), C-22 (δ_C 111,4) e C-23 (δ_C 143). O dupleto em δ_H 6,89 tem uma constante de acoplamento de 12,9 Hz e pertence ao hidrogênio da posição H-1, o qual acopla com o hidrogênio da posição H-2 em δ_H 6,46 (*d*, *J* = 12,9 Hz, 1H), indicando uma lactona de sete membros α,β-insaturada, e o efeito da carboxila permitindo atribuir o deslocamento mais desblindado ao H-1, e a ausência de hidrogênios em carbonos vizinhos levou a um acoplam somente vicinal na mesma face com *J* = 12,9 Hz. No mapa de contorno HMBC a carboxila C-3 (C164,5) apresentou correlações a ^{2}J e ^{3}J com os hidrogênios H-2 e H-1, respectivamente.

O sinal em δ_C 83,2 não mostrou correlação no HSQC com sinais de hidrogênio, porém no HMBC esse sinal correlacionou-se com os hidrogênios metilênicos (δ_C 63.9) em δ_H 4,77 (*d*, *J* = 11,8 Hz, 1H) e δ_H 4,14 (*d*, *J* = 11,8 Hz, 1H), um segundo metilênico (δ_C 35,0) em δ_H 2,20 (*dd*, *J* = 17,0; 9,2 Hz, 1H) e δ_H 2,08 (*d*, *J* = 17,0 Hz, 1H), com um metínico (δ_C 51) em δ_H 3,67 (m, ver tabela 05, 1H), assim como com o sinal de uma metila (δ_C 24,9) em δ_H 1,42 (*s*, 3H). Essas correlações permitiram atribuir o sinal em δ_C 83,2 ao C-4, a correlação com os hidrogênios metilênicos oxigenados em δ_H 4,77 e δ_H 4,14 ao C-28 (δ_C 63,9), e permitindo colocar neste um substituinte OR. A correlação com o sinal de uma metila (δ_C 24,9) em δ_H 1,42, indicou a presença da metila Me-29 intacta. A correlação com o sinal metínico (δ_C 51) em δ_H 3,67 (m, 1H) permiti atribuí-lo ao H-5, o qual no COSY (Material suplementar) mostrou acoplamento com os sinais de 2H-6. O grupo OR em C-28 foi definido como uma *O*-acetila ao observar uma correlação de um dos sinais do metilênico CH_2-28 em δ_H 4,77 com o sinal em δ_C 169,8 (carboxila). O sinal de metila em δ_H 1,58 (δ_C 20,1) mostrou correlação com

o sinal desta carboxila (δ_C 169,8) (material suplementar), confirmando CH_2-28 como CH_2-OAc. Todas as correlações acima estão representadas na Figura 4.36.

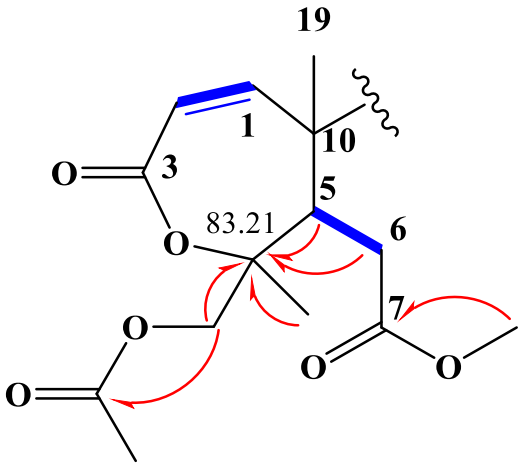


Figura 4.36 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

O sinal de um carbono acila em δ_C 173,2 mostrou correlação no HMBC com o sinal de uma metoxila em δ_H 3,40 e com os hidrogênios metilênico H-6a (δ_H 2,20) e H-6b (δ_H 2,08) e com o metínico H-5 (δ_H 3,67), indicando um limonoide B-*seco*, e permitindo definir C-7 como uma carboxila esterificada, atribuindo o sinal em δ_C 173,2 ao C-7.

Os hidrogênios da metila C-19 δ_H em 0,79 (*d*, *J* = 4,1 Hz, 3H) apresentam correlações a ^{3}J com os carbonos terciários (C-5 e C-9) e com o carbono sp^2 C-1, e a ^{2}J com o carbono quartenário C-10.

No mapa de correlação HSQC as dois simpletos em δ_H 4,41 e δ_H 4,68 estão ligados ao carbono δ_C 120,8 (C-30), os deslocamentos químicos dos hidrogênios e do carbono sugere a presença de uma dupla ligação exocíclica no anel C. Os hidrogênios geminais em C-30 apresentaram correlações a ^{2}J no HMBC com o carbono sp^2 em δ_C 136,6 (C-8), a ^{3}J com o carbono em δ_C 69,9 (C-14) e com o sinal em δ_C 53,6 (C-9) (Figura 4.37).

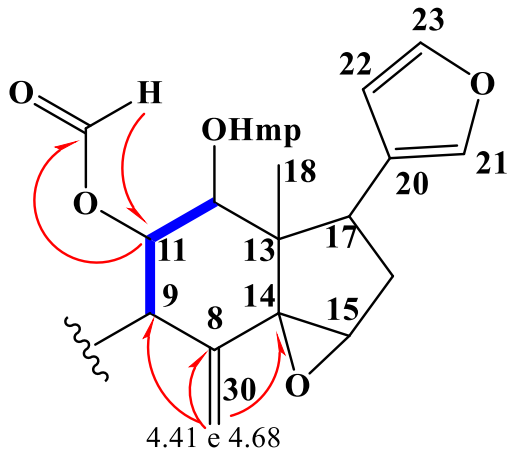


Figura 4.37 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

O sinal de hidrogênio em δ_H 2,99 (*d*, *J* = 7,1 Hz, 1H) no HSQC está correlacionado ao carbono da posição C-9 (δ_C 53,6), esse hidrogênio acopla com o sinal δ_H 5,92 (*dd*, *J* = 11,0 e 7,1 Hz, 1H), esse acoplamento foi evidenciado nos valores da constante de acoplamento 7,1 Hz e no COSY. O sinal em δ_H 5,92 foi inferido ao H-11, o qual acoplou com o sinal em δ_H 6,27 (*d*, *J* = 11,0 Hz, 1H) atribuído ao H-12, essa constante de 11 Hz indicou um acoplamento axial/axial do H-11 com o H-12.

O deslocamento químico de δ_C 69,9 para o C-11 e de δ_C 75,5 para o C-12 indica que ambos são carbonos ligados a oxigênios. Em C-11 temos um grupo fórmico, e sua atribuição veio após a análise dos mapas de correlação HMBC e HSQC, no HMBC foi observada uma correlação a ^{3}J da carboxila δ_C 160,1 com o H-11 (δ_H 5,92), no HSQC não foi observada a correlação do sinal em δ_H 8,19 (*s*, 1H) com carbono, porém no espectro de RMN $^{13}C\{^{1}H\}$ a intensidade do sinal da carboxila em δ_C 160,1 era quase o dobro em relação aos outros sinais de carbonos acilas, sugerindo que este poderia ser um carbono hidrogenado, mesmo com a ausência de um espectro de DEPT135, no mapa de contorno HMBC foi observado um acoplamento a ^{1}J (sinais do satélite) correlacionando o carbono acila em δ_C 160,1 com o hidrogênio em δ_H 8,19. Para

confirmar a presença desse grupo fórmico em C-11, foi observada no HMBC uma correlação a ^{3}J do sinal em δ_H 8,19 com o carbono C-11 (δ_C 69,9).

O carbono oxigenado C-12 está diretamente ligado ao hidrogênio em δ_H 6,27 (H-12), esse hidrogênio mostrou uma correlação no HMBC com o sinal em δ_C 175,2 (C-1'). Esse carbono acila apresentou outra correlação com o sinal em δ_H 3,64 (*d*, *J* = 2,7 Hz, 1H) referente ao H-2', no mapa de correlação COSY, o H-2' acoplou com o hidrogênio em δ_H 1,64 atribuído ao H-3', para esse sinal, no COSY, foi observada outras correlações, uma com os hidrogênios da metila C-6' em δ_H 0,83 (*m*, 3H) e com os hidrogênios metilênicos H-4' em δ_H 1,29 (*m*, 2H). O sinal da metila C-5' e da metila C-19 coalesceram em δ_H 0,79, porém foi verificado no COSY uma correlação do H-4' com os hidrogênios em δ_H 0,79, essa correlação foi atribuída sendo da metila C-5' (Figura 4.38).

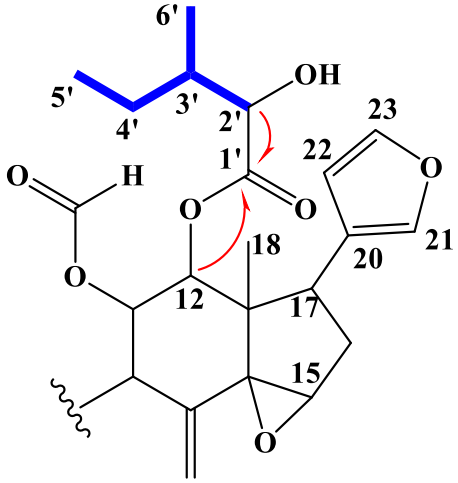


Figura 4.38 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

Os hidrogênios da metila C-18 (δ_H 0,64; δ_C 13,5) apresentaram correlações via HMBC com o carbono quaternário C-13 (δ_C 45,6), com o carbono terciário C-17 (δ_C 38,1), com o carbono secundário oxigenado C-12 (δ_C 75,5) e com o carbono do epóxido em C-14 (δ_C 69,9). O outro carbono do epóxido, C-15

(δ_C 59,5) é hidrogenado, seu hidrogênio aparece como um simpleto largo em δ_H 3,19 (*sl*, 1H) (Figura 4.39).

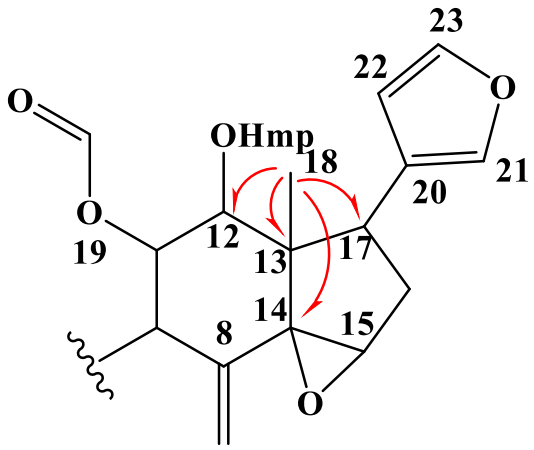


Figura 4.39 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^1H \rightarrow ^{13}C$.

Os hidrogênios metilênicos da posição C-16 são diasteroetópicos, o H-16a apareceu como um multipleto em δ_H 1,80 integrando para 1H, e o H-16b como duplo dupleto em δ_H 1,19 (J = 14,0 e 10,8 Hz, 1H), ambos possuem correlação no COSY com o H-17 em δ_H 3,05 (*dd*, J = 10,8; 7,1 Hz, 1H). No HMBC foi observado as correlações dos carbonos aromáticos do anel furano, C-20, C-21 e C-22 com o sinal do hidrogênio H-17, assim fechando toda a estrutura do limonoide **05**.

Podemos observar que há apenas uma ligação entre o anel A com o anel C e não temos o fechamento do anel B, indicando que no processo de biossíntese desse limonoide houve a clivagem da ligação carbono-carbono entre C-7 e C-8. Como os anéis C e D estão intactos, essa estrutura se caracteriza como um limonoide A,B-*seco*. Todas as discussões acima confirmaram a presença do limonoide mombasol isolado anteriormente de *Aphanamixis grandifolia* (Meliaceae)[76], a comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos aqui em benzeno

apresentaram muitas semelhanças, confirmando a estrutura definida para o limonoide **05.**

Tabela 4.6 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **05** e RMN de ^{13}C do limonoide mombasol (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$)

(Continua)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[76])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	146,4	147,4	6,89 (*d*, *J* = 12,9 Hz, 1H)
2	124	122,7	6,46 (*d*, *J* = 12,9 Hz, 1H)
3	164,5	165,4	-
4	83,2	84,0	-
5	51	50,4	3,67 (*s*, 1H)
6	35	34,7	2,08 (*d*, *J* = 17,0 Hz, 1H) e 2,20 (*dd*, *J* = 17,0 e 9,2 Hz, 1H)
7	173,2	173,1	-
8	136,6	136,1	-
9	53,6	53,2	2,99 (*d*, *J* = 7,1 Hz, 1H)
10	46,1	45,4	-
11	69,9	69,8	5,92 (*dd*, *J* = 11,0 e 7,1 Hz, 1H)
12	75,5	72,9	6,27 (*d*, *J* = 11,0 Hz, 1H)
13	45,6	46,0	-
14	69,9	70,8	-
15	59,5	59,7	3,19 (*s*, 1H)
16	34	33,8	1,19 (*dd*, *J* = 14,0 e 10,9 Hz, 1H) e 1,82 (*m*, 1H)
17	38,1	37,6	3,05 (*dd*, *J* = 10,8 e 7,1 Hz, 1H)
18	13,5	12,6	0,64 (*s*, 1H)
19	23,8	23,7	0,79 (*d*, *J* = 4,1 Hz, 3H)
20	122,3	121,7	-
21	141	140,4	7,07 (*sl*, 1H)
22	111,4	111,0	5,97 (*s*, 1H)
23	143	142,7	7,06 (*t*, *J* = 1,7 Hz, 1H)
28	63,9	24,6	4,14 (*d*, *J* = 11,8 Hz, 1H) e 4,77 (*d*, *J* = 11,8 Hz, 1H)
29	24,9	63,8	1,42 (*s*, 1H)
30	120,8	121,5	4,41 (*s*, 1H) e 4,68 (*s*, 1H)
1'	175,2	175,0	-
2'	75,6	75,2	3,64 (*d*, *J* = 2,7 Hz, 1H)

Tabela 4.7 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **05** e RMN de ^{13}C do limonoide mombasol (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$)

(Conclusão)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[76])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
3'	38,4	37,8	1,64 (*m*, 1H)
4'	22,5	26,2	1,29 (*m*, 1H)
5'	11,6	11,7	0,79 (*d*, *J* = 4,1 Hz, 3H)
6'	15,4	13,5	0,83 (*m*, 3H)
7-COO-Me	52	52,5	3,40 (*s*, 3H)
11-OOCH	160,1	159,7	8,19 (*s*, 1H)
28-OAc	20,1	20,7	1,58 (*s*, 3H)
	169,8	170,3	-

4.3.6 Substância **06** (12-oxi-chisonimbolinin G)

O limonoide **06** foi isolado da fração B-F21 e depois das análises dos espectros de RMN ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ e dos mapas de correlação HSQC, HMBC e COSY foi confirmada a estrutura de outro limonoide da classe da nimbolinina (Figura 4.40).

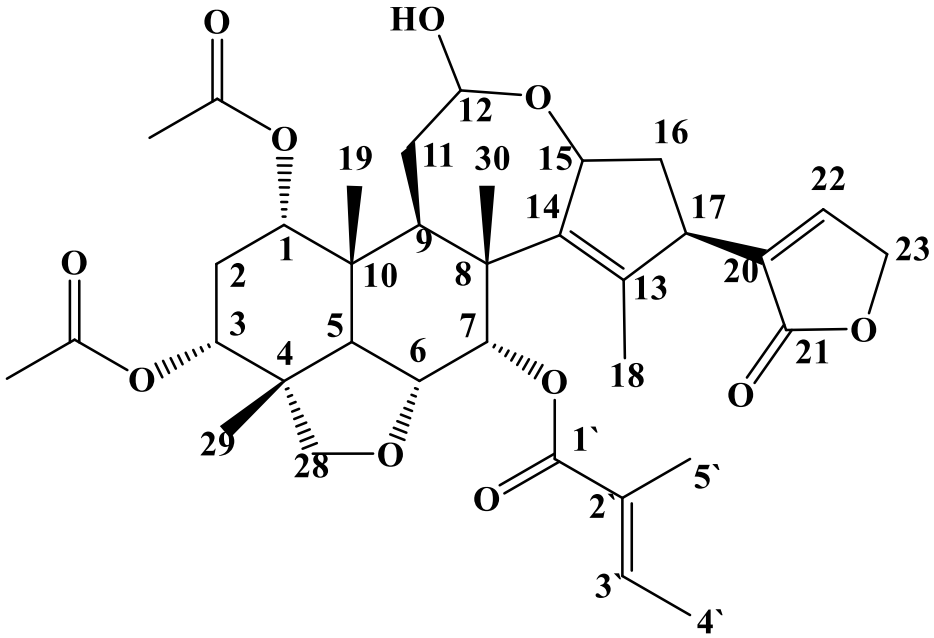


Figura 4.40 - Estrutura do limonoide 06.

A estrutura 06 possui similaridade com o limonoide 04, como por exemplo a correlação via HMBC a ^{3}J da carboxila C-1' (δ_C 165,9) do grupo tigloila com o H-7 em δ_H 5,92 (*d*, *J* = 2,7 Hz, 1H), do hidrogênio H-1 em δ_H 4,70 (*t*, *J* = 3 Hz, 1H) com carboxila em δ_C 169,7 e do hidrogênio H-3 em 4,85 (*t*, *J* = 3Hz, 1H) com o carbono acila em δ_C 169,3. Estruturalmente, o limonoide 06 possui uma ponte éter em C-6/28 com os anéis A, B e D intactos, enquanto o anel C, de sete membros, possui um hemiacetal com a ponte éter em C-12/15, o que caracteriza a classe nimbolinina.

Não foi observada a presença de um grupo O-acetil ligado ao carbono C-2 (δ_C 27,7), pois o valor do deslocamento químico referente a esse carbono indica que não há heteroátomo ligado ao mesmo. Os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos aromáticos do anel furano também não foram observados. Entretanto, observou-se que no mapa de contorno HSQC o sinal em δ_H 3,93 com integral para 3H, apresentou uma correlação com o carbono oxigenado em δ_C 72,3 (C-6) e uma outra correlação com um carbono em δ_C 69,7 (C-23), ou seja, este último carbono é referente a um -CH_2 ligado a um oxigênio. No HMBC a carboxila em δ_C 173,9 tem correlação com os hidrogênios em δ_H 3,93 do -CH_2, uma correlação com o hidrogênio sob dupla ligação em δ_H 6,55 (*t aparente*, *J* = 1,4 Hz, 1H) e com o H-17 em δ_H 3,40 (*d*, *J* = 9,3 Hz, 1H). No COSY o hidrogênio em δ_H 6,55 possui correlação com o hidrogênio em δ_H 3,93 e com H-17, alílico a ligação dupla, com a somatória dessas informações, conclui-se que se tratava de uma lactona com anel de cinco membros α,β insaturada (Figura 4.41).

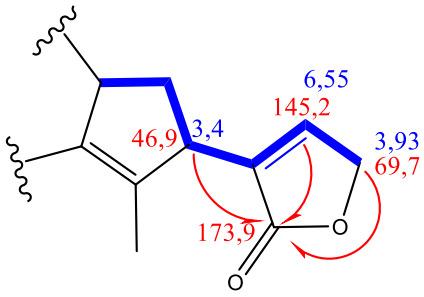


Figura 4.41 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

A diferença entre o limonoide **06** e chisonimbolinin G, isolado anteriormente de *Chisocheton paniculatus* (Meliaceae)[77], é a presença do sinal de um hemeacetal em δ_H 5,01 (δ_C 91,4), posicionado em C-12 pela análise dos experimentos de HSQC e HMBC. A comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos apresentaram muitas semelhanças com aqueles de chisonimbolinin G, confirmando a estrutura definida para o limonoide **06.**

Tabela 4.8 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **06** e RMN de ^{13}C da chisonimbolinina G (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[77])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	71,3	71,9	4,70 (*t, J* = 3 Hz, 1H)
2	27,7	27,8	2,21 (*dt, J* = 16,3 e 3 Hz, 1H) e 1,77 (*m*, 1H)
3	71,9	71,5	4,85 (*t, J* = 3Hz, 1H)
4	42,7	40,6	-
5	40,4	40,3	2,90 (*d, J* = 12,7 Hz, 1H)
6	72,3	72,2	3,93 (*m*, 3H)
7	74,6	74,2	5,92 (*d, J* = 2,7 Hz, 1H)
8	45,6	45,5	-
9	35,7	42,5	3,24 (*d, J* = 9,5 Hz, 1H)
10	40,5	42,3	-
11	32,1	27,5	1,40 (*ddd, J* = 16,1; e 13,8 e 2,2 Hz, 1H)
12	91,4	70,0	5,01 (*s* largo, 1H)
13	139,9	139,5	-
14	145,4	144,8	-
15	77,3	87,8	5,22 (*d, J* = 7,6 Hz, 1H)
16	37,6	37,8	2,29 (*dt, J* = 13,9 e 8,5 Hz, 1H) e 1,65 (*d, J* = 14,1 Hz, 1H)
17	46,9	45,8	3,40 (*d, J* = 9,3 Hz, 1H)
18	16,6	16,5	1,82 (*s*, 3H)
19	15,9	16,3	0,53 (*s*, 3H)
20	137,6	137,5	-
21	173,9	174,2	-
22	145,2	145,5	6,55 (*tl, J* = 1,4 Hz, 1H)
23	69,7	70,3	3,93 (*m*, 2H)
28	78,1	77,8	3,50 (*d, J* = 7,4 Hz, 1H) e 3,60 (*d, J* = 7,5 Hz, 1H)
29	19,0	19,0	0,81 (*s*, 3H)
30	20,8	21,1	1,15 (*s*, 3H)
1'	165,9	166,0	-
2'	129,4	128,5	-
3'	136,4	136,9	7,06 (*ddd, J* = 8,5; 7,1 e 5,7 Hz, 1H)
4'	14,2	12,0	1,48 (*d, J* = 7,3 Hz, 3H)
5'	12,3	14,4	1,89 (*s*, 3H)
1-OAc	21,6	20,9	2,02 (*d, J* = 1,0 Hz, 3H)
	169,7	169,4	-
3-OAc	20,6	21,3	1,69 (*d, J* = 1,0 Hz, 3H)
	169,3	169,7	-

4.3.7 Substância **07** (Norpallidalina A)

A substância **07**, isolado da fração B-F13, teve sua estrutura elucidada por RMN 1D e 2D, após todas as correlações serem atribuídas, chegou-se à conclusão que se tratava de um pentanortriterpeno, ou nor-limonoide, devido à ausência de um carbono, no caso da estrutura 07, o carbono da posição C-12 (Figura 4.42).

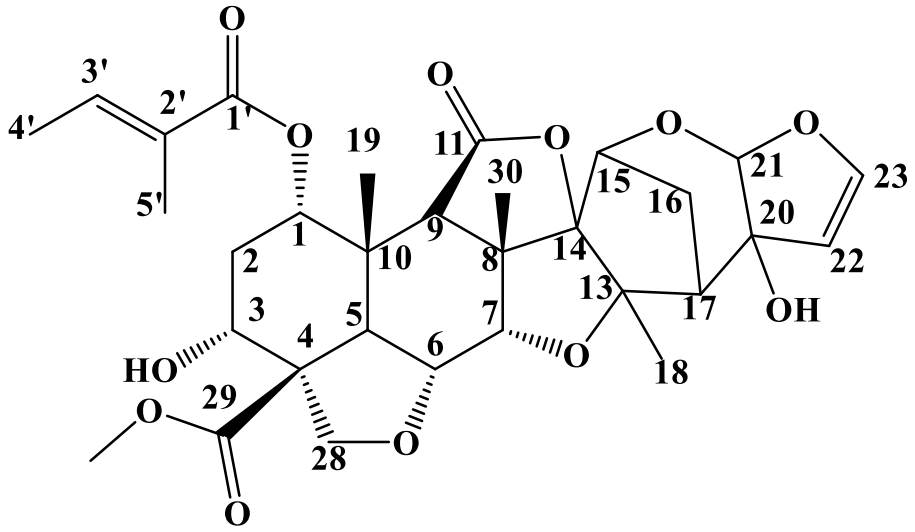


Figura 4.42 - Estrutura do limonoide 07.

No espectro de RMN ^{1}H observou-se um sinal em δ_H 6,79 com uma multiplicidade de quarteto de dupleto (*qd*) com duas constantes de acoplamento (*J*) 7,1 e 1,6 Hz, esse sinal é característico do hidrogênio sob a ligação dupla do grupo O-tigloila. As correlações do H-3' (δ_H 6,79) via HMBC com as metilas C-4' (δ_C 14,2) e C-5' (δ_C 12,5), juntamento com as correlações com o carbono *sp*^{2} C-2' (δ_C 129,7) e com a carboxila C-1' (δ_C 165,7) confirmam o grupo O-tigloila.

A correlação a ^{3}J do C-1' com o hidrogênio em δ_H 5,50 (*dd*, *J* = 3,4 e 2,5 Hz, 1H) comprovou a posição do O-tigloil em C-1 (δ_C 72,5), pois no HSQC o hidrogênio em δ_H 5,50 está diretamente ligado ao carbono C-1. O sinal do H-1 desdobra em um duplo dupleto com constantes de acoplamento de 3,4 e 2,5 Hz, confirmando o acoplamento equatorial/axial e equatorial/equatorial com os

hidrogênios metilênicos da posição C-2 (δ_C 32). Ambos os hidrogênios em C-2 desdobram em duplos tripletos, para o H-2a em δ_H 2,24 (*dt*, J = 16,6 e 3,4 Hz, 1H) e H-2b em δ_H 2,02 (*dt*, *J* = 16,6 e 2,5 Hz, 1H). No COSY é constatada a correlação desses hidrogênios metilênicos (H-2a e H-2b) com o H-3 em δ_H 4,17 (*s largo*, 1H) (Figura 4.43), (Tabela 4.7).

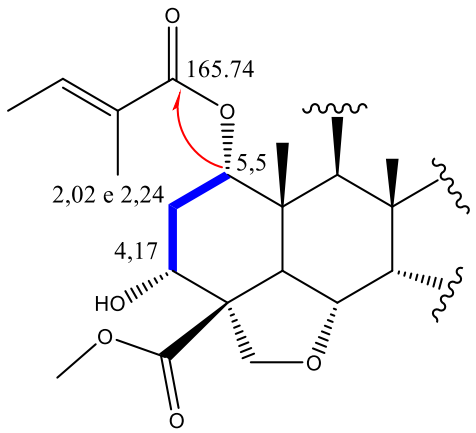


Figura 4.43 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC H→C.

O hidrogênio H-3 está diretamente ligado ao carbono em δ_C 66,1 (C-3), para o qual no mapa de contorno HMBC foram observadas as correlações com os hidrogênios H-1 (δ_H 5,50), H-2b (δ_H 2,02), H-28a em δ_H 4,22 (*d*, *J* = 8,4 Hz, 1H) e H-5 em δ_H 3,02 (*d*, *J* = 12,2 Hz, 1H) (Figura 4.44).

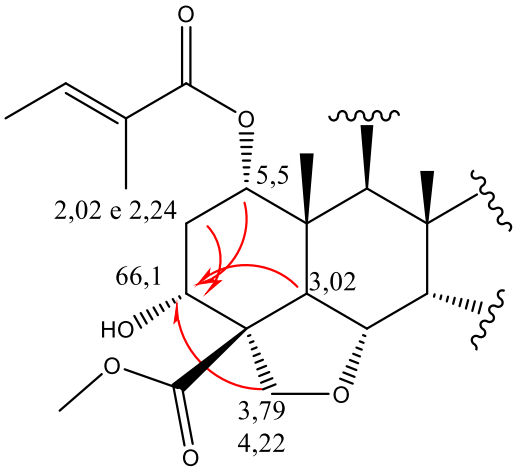


Figura 4.44 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC H→C.

O H-5 possui correlações com outros carbonos no HMBC, com o sinal da metila C-19 (δ_C 14,9), com os sinais dos carbonos quartenários C-10 (δ_C 38,2) e C-4 (δ_C 51,6), com o carbono terciário C-9 (δ_C 48,9), com ambos os carbonos da ponte éter C-6/28 (C-6 em δ_C 75,4 e C-28 em δ_C 73,5), com o carbono secundário oxigenado C-7 (δ_C 79,7) e com a carboxila do éster em C-29 (δ_C 174,3).

O hidrogênio da posição H-9 apareceu como um simpleto em δ_H 3,66 e no COSY não foi observado nenhuma correlação com hidrogênios vizinhos. Porém foi verificada um acoplamento em "W" (*W-coupling*) do H-9 com um dos hidrogênios da metila C-19 em δ_H 0,85 (*s*, 3H). A ausência de uma correlação ^{1}H-^{1}H a ^{3}J no mapa de correlação COSY para o H-9 sugeriu uma modificação no anel C. Essa modificação foi confirmada no mapa de contorno HMBC com a correlação da carboxila em δ_C 169,8 atribuída ao C-11 com o sinal do H-9 (δ_H 3,66), (Figura 4.45) confirmando que não há hidrogênios vizinhos ao H-9.

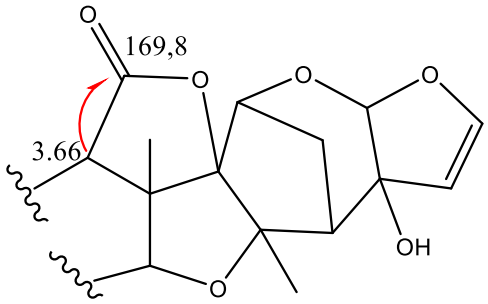


Figura 4.45 - A seta em vermelho indica a correlação observada no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

O carbono em δ_C 100,1 foi atribuído ao C-14, pois foram observadas as correlações via HMBC com os hidrogênios H-7 (δ_H 4,55), H-9 (δ_H 3,66), H-15 (δ_H 4,05), H-16a (δ_H 1,71), e com os hidrogênios das metilas C-18 (δ_H 1,34) e C-30 (δ_H 13,9). Para o carbono C-13, não foi observado a correlação com os hidrogênios da metila C-30, apenas com os hidrogênios da metila C-18, H-16a (δ_H 1,71), H-15 (δ_H 4,05), uma correlação fraca com o H-9 (δ_H 3,66) e com o H-17 (δ_H 1,80), desse modo o C-13 foi atribuído sendo o carbono em δ_C 95,6.

No mapa de correlação COSY, foi observado que os hidrogênios metilênicos H-16a (δ_H 1,71) e H-16b (δ_H 1,38) correlacionam-se com o H-15 (δ_H 4,05). Para o hidrogênio da posição H-17 (δ_H 1,80) foi observada apenas a correlação com o H-16b (δ_H 1,38) e uma correlação em "W" com o H-15 (δ_H 4,05) (Figura 4.46).

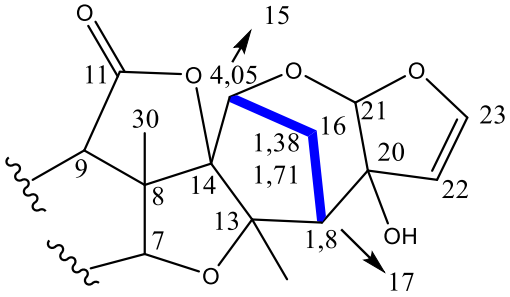


Figura 4.46 - A linha em azul representa as correlações observadas no COSY.

O carbono C-15 (δ_C 76,8) possui correlação no HMBC com os hidrogênios H-16a, H-17 e a ^{3}J, passando por um heteroátomo, com o H-21 em

δ_H 5,70 (*s*, 1H) (Figura 4.47). No HSQC, o H-21 está ligado ao carbono em δ_C 109, esse deslocamento químico sugere dois átomos de oxigênios ligados ao C-21.

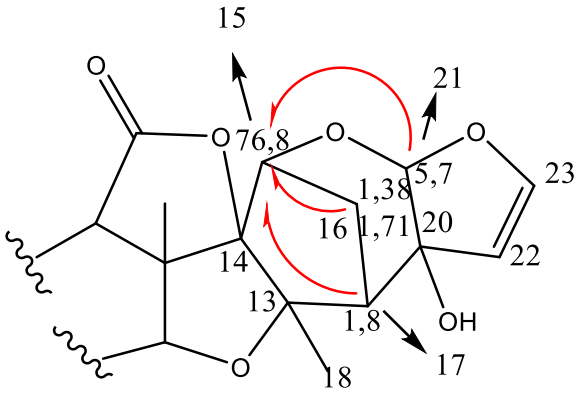


Figura 4.47 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

No mapa de contorno HMBC, o C-21 correlacionou-se a ^{3}J com os hidrogênios H-15 e H-17, os quais já tinham sido atribuídos anteriormente. Porém, outras correlações a ^{3}J foram observadas com os hidrogênios H-22 δ_H em 4,69 (*d*, *J* = 2,9 Hz, 1H) e H-23 δ_H em 6,00 (*d*, *J* = 2,9 Hz, 1H). O deslocamento químico desses hidrogênios, juntamente com seus respectivos carbonos, corrobora que há a presença de uma ligação dupla em $\Delta^{22,23}$ e que o C-23 está ligado em um oxigênio.

No mapa de contorno COSY, foi observado que o H-22 possui correlação com o H-23, esse acoplamento pode ser observado no mesmo valor da constante de acoplamento de ambos os hidrogênios.

O carbono C-20, alílico a ligação dupla, não é hidrogenado e seu sinal no espectro de RMN $^{13}C\{^{1}H\}$ aparece em δ_C 85,9, sugerindo que este esteja ligado a uma hidroxila. No HMBC o C-20 apresenta correlações com o H-16a, H-16b, H-17, e com os dois hidrogênios sob a dupla ligação, H-22 e H-23.

A estrutura do norlimonoide **07** é inédita, a comparação com o espectro de RMN de ^{13}C do limonoide Munrolina F isolado de *Munronia*

unifoliolata (Meliaceae) (Tabela 4.7)[73], serve como modelo para demonstrar as similaridades nos deslocamentos químicos dos carbonos, com exceção no deslocamento químico de C-11, o qual no modelo utilizado encontra-se em uma carbonila, em uma função cetona, e seu deslocamento químico é (δ_C) 210,9, porém o C-11 (δ_C 169,8) do norlimonoide 07 é uma carboxila de uma lactona, gerando a diferença significativa quando comparado os valos de δ_C. Outras diferenças são a ausência do carbono C-12 no norlimonoide 07 e o valor do deslocamento químico do C-14. Enquanto na munrolina F temos um grupo OH ligado ao C-14 (δ_C 93,2), na estrutura **07** ocorreu a formação da lactona, desblindando a posição C-14 (δ_C 100,1).

Tabela 4.9 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **07** e RMN de ^{13}C do limonoide munrolina F (^{13}C 150 MHz; piridina-d_5)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[73])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	72,5	73,5	5,50 (*dd, J* = 3,4 e 2,5 Hz, 1H)
2	32	29,6	2,02 (*dt, J* = 16,6 e 2,5 Hz, 1H) e 2,24 *(dt, J* = 16,6 e 3,4 Hz, 1H)
3	66,1	67,8	4,17 (*s*, 1H)
4	51,6	52,1	-
5	44,3	41,6	3,02 (*d, J* = 12,2 Hz, 1H)
6	75,4	73,3	4,57 (*dd, J* = 12,2 e 3,2 Hz, 1H)
7	79,7	81,7	4,55 (*d, J* = 3,2 Hz, 1H)
8	55,1	56,8	-
9	48,9	47,0	3,66 (*s*, 1H)
10	38,2	41,4	-
11	169,8	210,9	-
12	-	70,8	-
13	95,6	94,6	-
14	100,1	93,2	-
15	76,8	80,5	4,05 (*dt, J* = 2,8 e 1,5 Hz, 1H)
16	30,9	30,1	1,71 (*d, J* = 14,4 Hz, 1H) e 1,38 (*m*, 1H)
17	50,4	51,5	1,80 (*m*, 1H)
18	27,4	27,4	1,34 (*s*, 1H)
19	14,9	14,0	0,85 (*s*, 1H)
20	85,9	86,8	-
21	109	109,9	5,70 (*s*, 1H)
22	108,6	109,0	4,69 (*d, J* = 2,9 Hz, 1H)
23	145,8	145,9	6,00 (*d, J* = 2,9 Hz, 1H)
28	73,5	73,0	3,79 (*d, J* = 8,4 Hz, 1H) e 4,22 (*d, J* = 8,4 Hz, 1H)
29	174,3	174,4	-
30	13,9	15,7	1,22 (*s*, 1H)
1'	165,7	166,9	-
2'	129,7	129,3	-
3'	136,9	138,6	6,79 (*qd, J* = 7,1 e 1,6 Hz, 1H)
4'	14,2	14,2	1,38 (*dd, J* = 7,1 e 1.0 Hz, 1H)
5'	12,5	12,3	1,80 (*m*, 1H)
29-OMe	51,5	52,4	3,17 (*s*, 1H)

4.3.8 Substância **08** (Pallidalina)

O limonoide **08** foi isolado da fração B-F13, após investigação detalhado por RMN ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$, HSQC, HMBC, COSY e ROESY, chegou-se à elucidação estrutural de um limonoide com uma contração no anel C oriundo de um rearranjo na estrutura para formar a ligação C-C entre o C-12 e C-14 (Figura 4.48).

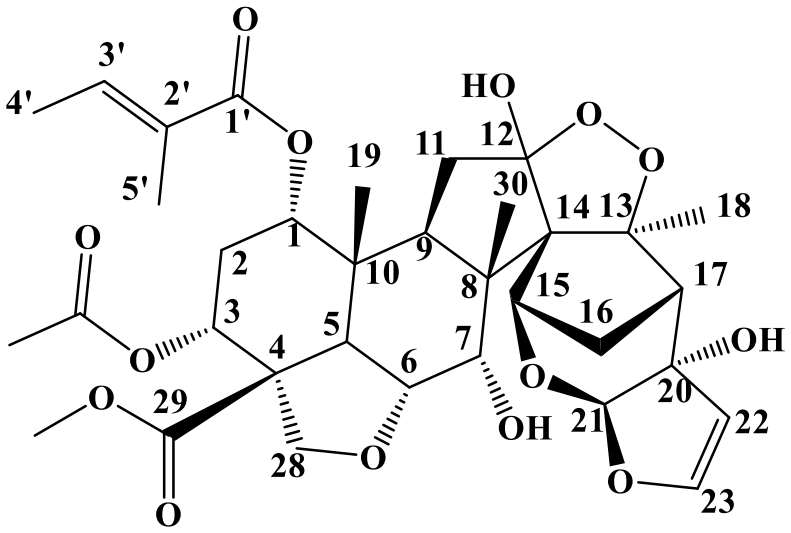


Figura 4.48 - Estrutura do limonoide 08.

O limonoide **08** tem a carboxila α,β insaturada do grupo O-tigloila em δ_C 166,1, a qual faz correlação a ^{3}J no HMBC com o H-1 em δ_H 4,89. O H-1 tem multiplicidade de duplo dupleto com duas constantes de acoplamento, 3,5 e 2,5 Hz, referente aos acoplamentos axial/equatorial e equatorial/equatorial com os hidrogênios da posição C-2. Na análise conjunta do espectro de RMN ^{1}H, ^{13}C e as correlações no HSQC, foi verificado que o sinal de um dos hidrogênios metilênicos do C-2 ficou sobreposto com os sinais dos hidrogênios da metila C-18 e H-17, todos em δ_H 2,31. Entretanto, essa sobreposição de sinais não prejudicou a elucidação da estrutura do limonoide.

No mapa de contorno COSY os hidrogênios metilênicos H-2a em δ_H 2,31 e H-2b em δ_H 2,07 correlacionam-se com os hidrogênios H-1 em δ_H 4,89 e

H-3 em δ_H 5,77. O H-3 tem correlação a ^3J no HMBC com o carbono acila em δ_C 169,4, confirmando a presença de um grupo O-acetil em C-3.

O carbono acila em δ_C 173,9 foi atribuído a posição C-29, o qual apresentou correlação no HMBC com os hidrogênios da metoxila do éster em δ_H 3,18 (*s*, 3H), com o H-3 em δ_H 5,77, H-5 em δ_H 2,75 e com os dois hidrogênios metilênicos H-28a em δ_H 3,81 e H-28b em δ_H 3,58.

As constantes de acoplamento do H-5, H-6 e H-7 corroboram para o acoplamento axial/axial entre H-5 e H-6 com a constante de 12,4 Hz, e um acoplamento axial/equatorial entre H-6 e H-7 com a constante de 3,6 Hz. O carbono da posição C-7 (δ_C 73,2) possui correlação no HMBC a ^3J com os hidrogênios da metila C-30 (δ_H 1,14), com o H-5 (δ_H 2,75) e a ^2J com o H-6 (δ_H 4,63). O carbono quartenário C-8 (δ_C 56,3) correlaciona-se a ^2J com os hidrogênios da metila C-30, H-7, H-9 e a ^3J com o hidrogênio metilênico H-11a em δ_H 1,75.

O anel A e o anel B desse limonoide estão intactos de acordo com todas as correlações observadas nos espectros de RMN 2D. Entretanto, para o anel C está sendo proposto uma contração de anel e uma ponte endoperóxido em C-12/13.

No COSY foi observado que os hidrogênios H-11a e H-11b, além do acoplamento geminal, ambos apresentam uma correlação apenas com o H-9 (δ_H 2,63), indicando que o carbono da posição C-12 não é hidrogenado. Então, buscou-se carbonos não hidrogenados no HSQC, que poderiam ter correlação no HMBC com os hidrogênios metilênicos da posição C-11, com isso foram selecionados dois carbonos, um em δ_C 116,7 e outro em δ_C 83,2. Para o carbono em δ_C 116,7 foram observadas as correlações no HMBC com os hidrogênios H-9 (δ_H 2,63), H-11a (δ_H 1,75), H-11b (δ_H 1,28), e duas correlações fracas com o H-15 (δ_H 4,67) e H-30 (δ_H 1,14). Para o carbono em δ_C 83,2 foram observadas as correlações com H-9 (δ_H 2,63), H-16b (δ_H 1,87), H-30 (δ_H 1,14), H-11a (δ_H 1,75)

e com os hidrogênios em δ_H 2,31. Com isso, conclui-se que o carbono em δ_C 116,7 é referente ao C-12 e o δ_C 83,2 é referente ao C-14. (Figura 4.49)

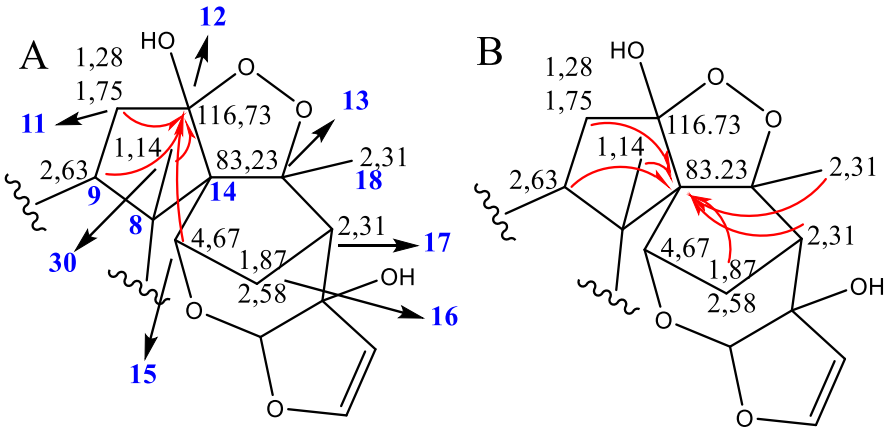


Figura 4.49 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$. A numeração dos carbonos está indicada em azul.

O sinal em δ_C 99,89 foi atribuído ao carbono da posição C-13 devido as correlações observadas no HMBC com os hidrogênios H-15 (δ_H 4,67), H-16b (δ_H 1,87), H-30 (δ_H 1,14) e com os hidrogênios em δ_H 2,31 (H-18 e H-17). Foi constatada que a metila da posição C-18 estava desblindada em comparação com as metilas da mesma posição dos limonoides anteriores. A proposta para justificar os deslocamentos químicos observados para o C-12, C-13 e C-18, é a presença de uma ponte endoperóxido em C-12/13, com uma hidroxila ligado ao C-12 e a metila C-18 ligada ao C-13.

No mapa de correlação COSY é confirmado que os hidrogênios metilênicos do C-16 possuem correlação com o H-15, o qual tem uma correlação em W com o H-17, e o H-16b tem correlação tem correlação com o H-17. O carbono C-15 correlaciona-se via HMBC com os hidrogênios H-30, H-16b, H-21 e com os hidrogênios em δ_H 2,31 (H-17 e/ou H-18).

O carbono em δ_C 82,59 foi atribuído ao C-20, ligado a uma hidroxila, este carbono possui correlação no HMBC com os hidrogênios H-21, H-17, H-16a, H-16b, H-22 e H-23. Para os carbonos insaturados C-22 e C-23 foram atribuídos

os respectivos deslocamentos químicos, δ_C 108,8 e δ_C 145,7. No HSQC é confirmado que o hidrogênio em δ_H 6,09 está ligado ao C-23 e o hidrogênio em δ_H 4,8 está ligado ao C-22, ambos os hidrogênios acoplam entre si com uma constante de 3 Hz gerando uma multiplicidade de dupleto para cada hidrogênio.

O experimento de ROESY-2D nos deu informação sobre a conformação da estrutura, devido as interações espaciais entre os núcleos de hidrogênio. Foram observadas as interações entre os hidrogênios das metilas Me-30 (δ_H 1,14) e Me-19 (δ_H 0,59) com o sinal do H-11a (δ_H 1,28). A Me-19 mostrou interação com o sinal do H-2b (δ_H 2,31), indicando que este hidrogênio está na posição axial (Figura 4.50).

A Me-30 (δ_H 1,14) apresentou interações com os sinais em do H-6 (δ_H 4,63), H-7 (δ_H 4,44) e H-15 (δ_H 4,67). Para o sinal do H-7 também foi observada uma interação espacial com o sinal do H-15 (δ_H 4,67) (Figura 4.50), essas interações sugerem uma proximidade desses núcleos e mantendo a metila na face alfa (α).

A interação forte do sinal da metila Me-18 (δ_H 2,31) com o sinal em δ_H 2,63 (H-9) indica uma proximidade desses núcleos. Uma interação fraca foi observada do sinal de Me-18 com o sinal em δ_H 5,67 (H-21), este último sinal apresentou uma interação forte com sinal do H-7 (δ_H 4,44), indicando que após a modificação do anel furano, o mesmo permanece na face alfa (α), havendo uma curta distância espacial entre os dois núcleos. O sinal do hidrogênio H-16a (δ_H 1,86) está mais próximo dos hidrogênios H-22 (δ_H 4,80) e H-23 (δ_H 6,09), pois foi observado a correlação que indica uma interação espacial entre esses hidrogênios (Figura 4.50).

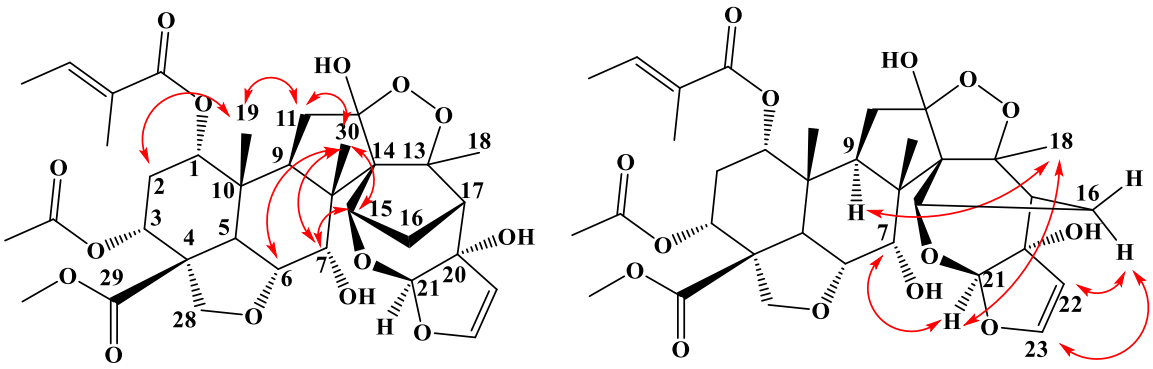


Figura 4.50 - As setas em vermelho indicam as interações observadas no ROESY-2D $^{1}H \leftrightarrow {}^{1}H$.

A falta de um modelo similar ao limonoide 08 dificultou a comparação com limonoides já descritos. Várias buscas foram feitas na literatura na tentativa de achar um limonoide que contém uma ponte endoperóxido, em um anel de cinco membros, no qual um grupo OH estaria ligado a um dos carbonos do peróxido para fazer uma comparação com os espectros de RMN de ^{13}C. Porém, analisando apenas a ponte endoperóxido, foi isolado das folhas de *Xylopia vielana* (Annonaceae) a vielanina D[78], um metabólito que contém um carbono da ponte endoperóxido ligado a um grupo OH, o deslocamento químico desse carbono em $CDCl_3$ (125 MHz) foi de 102,9 ppm, indicando que valores altos no deslocamento químico.

Tabela 4.10 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **08**

Posição (C/H)	δ_C	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	71,4	4,89 (*dd, J* = 3,5 e 2,5 Hz, 1H)
2	30,3	2,07 (*dt, J* = 16,7 e 2,5 Hz, 1H) e 2,31 (*s*, 5H)
3	67,7	5,77 (*t, J* = 3,0 Hz, 1H)
4	51,5	-
5	42,3	2,75 (*d, J* = 12,4 Hz, 1H)
6	75,6	4,63 (*dd, J* = 12,4 e 3,6 Hz, 1H)
7	73,2	4,44 (*d, J* = 3,6 Hz, 1H)
8	56,3	-
9	39,6	2,63 (*m*, 1H)
10	37,9	-
11	33,4	1,28 (*t, J* = 13,1 Hz, 1H) e 1,75 (*dd, J* = 12,6 e 6,3 Hz, 1H)
12	116,7	-
13	99,9	-
14	83,2	-
15	78,7	4,67 (*m*, 1H)
16	29	1,86 (*d ap*, 1H) e 2,58 (*m*, 1H)
17	51,7	2,31 (*s*, 5H)
18	23	2,31 (*s*, 5H)
19	14,9	0,59 (*s*, 3H)
20	82,6	-
21	110	5,67 (*s*, 1H)
22	108,8	4,80 (*d, J* = 3,0 Hz, 1H)
23	145,7	6,09 (*d, J* = 3,0 Hz, 1H)
28	73,5	3,58 (*d, J* = 8,7 Hz, 1H) e 3,81 (*d, J* = 8,6 Hz, 1H)
29	173,9	-
30	18,7	1,14 (*s,* 3H)
1'	166,1	-
2'	129,2	-
3'	137,9	7,02 (*m*, 1H)
4'	14	1,46 (*dd, J* = 7,2 e 1,3 Hz, 3H)
5'	12,3	1,84 (*t ap*, 3H)
3-OAc	20,8	1,68 (*s*, 3H)
	169,4	-
29-OMe	51,8	3,18 (*s*, 3H)

4.3.9 Substância 09 (1-acetóxitrichilinina)

O limonoide 09 foi isolado da fração B-F13, após as análises dos espectros de RMN unidimensional e bidimensional, a estrutura foi identificada como um limonoide de anéis intactos (Figura 4.51).

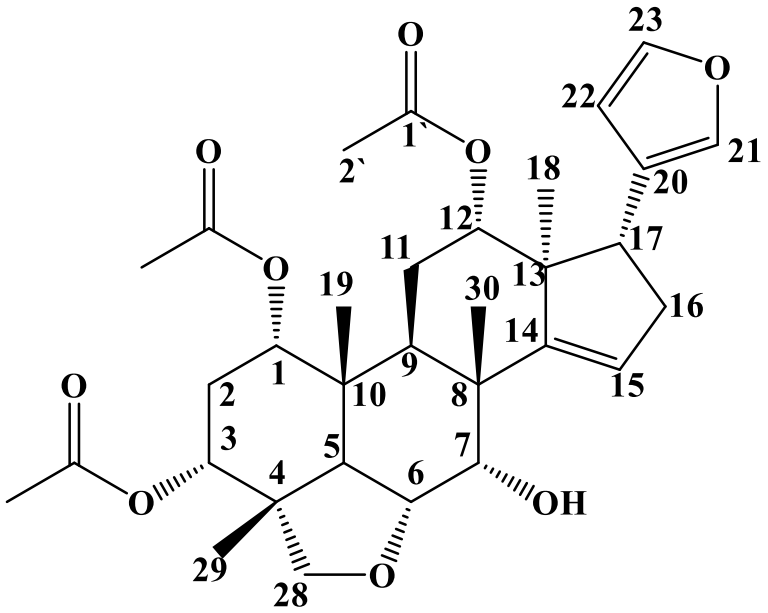


Figura 4.51 - Estrutura do limonoide 09.

O carbono da posição C-1 (δ_C 72,2) está ligado a um grupo acetil, pois foi verificado a correlação no HMBC do H-1 (δ_H 4,62) com a carboxila em δ_C 169,3. Essas mesmas correlações com carbonos acilas foram observadas para o H-3 (δ_H 4,80) e H-12 (δ_H 5,25), confirmando o substituinte O-acetila na estrutura.

Os hidrogênios metilênicos da posição C-2 desdobraram em duplos tripletos, o H-2a em δ_H 2,05 (*dt*, *J* = 16,6 e 2,6 Hz, 1H), porém um dos tripletos do H-2b ficou parcialmente junto do sinal da metila do 12-OAc, mas o outro tripleto referente ao H-2b apareceu em δ_H 1,64 com uma constante de 3,4 Hz. O H-3 desdobrou em duplo dupleto com duas constantes de acoplamento, 3,4 e 2,6 Hz, essas constantes são indicativas de um acoplamento equatorial/axial e equatorial/equatorial do H-3 com os hidrogênios metilênicos.

As correlações do carbono quartenário C-4 (δ_C 42,5) via HMBC com os hidrogênios H-29 (δ_H 0,77), H-28a (δ_H 3,72), H-28b (δ_H 3,57) e H-5 (δ_H 2,74), juntamente com a correlação do C-6 (δ_C 74,3) com o H-28a (δ_H 3,72) e H-28b (δ_H 3,57), confirmaram a presença de uma ponte éter em C-6/28.

A constante de acoplamento do H-5 com o H-6 (12,4 Hz) mostra um acoplamento axial/axial. O H-6 acopla com o H-7 com uma constante de 3 Hz, confirmando o acoplamento axial/equatorial entre eles.

Os hidrogênios da metila H-19 (δ_H 0,47) possuem correlação no HMBC com os carbonos C-1 (δ_C 72,2), C-9 (δ_C 34,6) e C-5 (δ_C 39,9), e os hidrogênios da metila H-30 (δ_H 0,80) correlacionam-se com os carbonos C-9 (δ_C 34,6), C-8 (δ_C 45,1), C-7 (δ_C 73,2) e com o C-14 (δ_C 156,9), indicando que a metila C-19 está ligada no carbono C-10 e a metila C-30 no carbono C-8.

Os hidrogênios metilênicos H-11a e H-11b apresentaram acoplamentos no COSY com os hidrogênios H-9 e H-12. O hidrogênio H-12 não apresentou outra correlação no COSY, indicando que seu outro carbono vizinho, C-13, não é hidrogenado. As correlações observadas no HMBC do H-12 com os carbonos C-18 e C-17, juntamente com as correlações do C-14 com os hidrogênios das metilas H-18 e H-30, confirmam que o anel C está intacto.

O carbono C-14 tem outras correlações observadas no HMBC com os hidrogênios H-15, H-16 e H-17. No COSY é constatada que os hidrogênios metilênicos H-16 possuem correlação com o H-15 e H-17.

O hidrogênio aromático H-21 do anel furano foi atribuído após a análise do mapa de contorno HSQC, pois seu sinal ficou junto do sinal residual do solvente (C_6D_6). O tripleto em δ_H 7,12 (*t*, *J* = 1,8 Hz, 1H) pertence ao H-23, a constante de 1,8 Hz indica um acoplamento a ^{3}J com o H-22 em δ_H 6,18 (*dd*, *J* = 1,8 e 0,9 Hz, 1H). A constante de 0,9 Hz do H-22 é devido ao acoplamento a ^{4}J do H-22 com o H-21.

O limonoide 1-Acetóxitrichilinina se diferencia daquele isolado anteriormente da casca da raiz de *Trichilia roka*, trichilinina, pela acetilação da

hidroxila em C-1[79]. A comparação dos dados de RMN de ^{13}C na Tabela 4.9, confirma a estrutura do limonoide **09.** Ao comparar os valores de deslocamento químico do ^{13}C, observou-se que os valores do C-18 e do C-30 estão significativamente diferentes, no mapa de contorno HMBC os hidrogênios da Me-30 apresentaram correlação com o carbono em δ_C 73,2 (C-7), enquanto os hidrogênios da Me-18 apresentaram correlações com os carbonos C-12 (δ_C 77,5), C-13 (δ_C 51,8) e C-17 (δ_C 50,8), corroborando para a atribuição do limonoide **09**.

Tabela 4.11 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **09** e RMN de ^{13}C do limonoide trichilinina (^{13}C 25 MHz; $CDCl_3$)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[79])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	72,2	71,8	4,62 (*t, J* = 2,8 Hz, 1H)
2	27,6	30,1	2,05 (*dt, J* = 16,6 e 2,6 Hz, 1H) e 1,64 (*t, J* = 3,4 Hz, 1H)
3	71,9	74,0	4,80 (*dd, J* = 3,4 e 2,6 Hz, 1H)
4	42,5	42,5	-
5	39,9	38,9	2,74 (*d, J* = 12,5 Hz, 1H)
6	74,3	72,5	3,93 (*dd, J* = 12,5 e 3,0 Hz, 1H)
7	73,2	78,0	4,06 (*d, J* = 3,0 Hz, 1H)
8	45,1	45,3	-
9	34,6	34,8	2,91 (*m*, 1H)
10	39,1	40,2	-
11	25,3	36,8	2,18 (*m*, 1H) e 1,27 (*dd, J* = 14,0 e 6,9 Hz, 1H)
12	77,5	77,8	5,25 (*dd, J* = 9,1 e 6,0 Hz, 1H)
13	51,8	51,7	-
14	156,9	157,6	-
15	122,9	122,6	5,34 (*dd, J* = 3,3 e 1,7 Hz, 1H)
16	36,7	36,8	2,27 (*ddd, J* = 15,8; 10,9 e 1,8 Hz, 1H) e 2,18 (*m*, 1H)
17	50,8	50,3	2,91(*m*, 1H)
18	16,2	27,1	1,23 (*s*, 1H)
19	15,1	15,5	0,47 (*s*, 1H)
20	125,1	124,6	-
21	140,7	140,2	7,16 (junto do sinal do solvente)
22	112,1	111,8	6,18 (*dd, J* = 1,8 e 0,9 Hz, 1H)
23	142,3	142,0	7,12 (*t, J* = 1,8 Hz, 1H)
28	78,2	73,6	3,57 (*d, J* = 7,5 Hz, 1H) e 3,72 (*d, J* = 7,5 Hz, 1H)
29	19,4	19,1	0,77 (*s*, 1H)
30	26,4	15,6	0,80 (*s,* 1H)
1-OAc	21,0		-
	169,3		1,67 (*s*, 1H)
3-OAc	20,5		1,85 (*s*, 1H)
	169,6		-
12-OAc	21,0		1,54 (*s*, 1H)
	170,2		-

4.3.10 Substância **10** (Norpallidalina B)

A substância **10** foi isolada da fração B-F14, sua estrutura foi elucidada por RMN ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$, HSQC, COSY e HMBC. Após finalizar as correlações no RMN 2D, verificou-se que a estrutura era de outro nor-limonoide, devido à ausência do carbono C-12 (Figura 4.52).

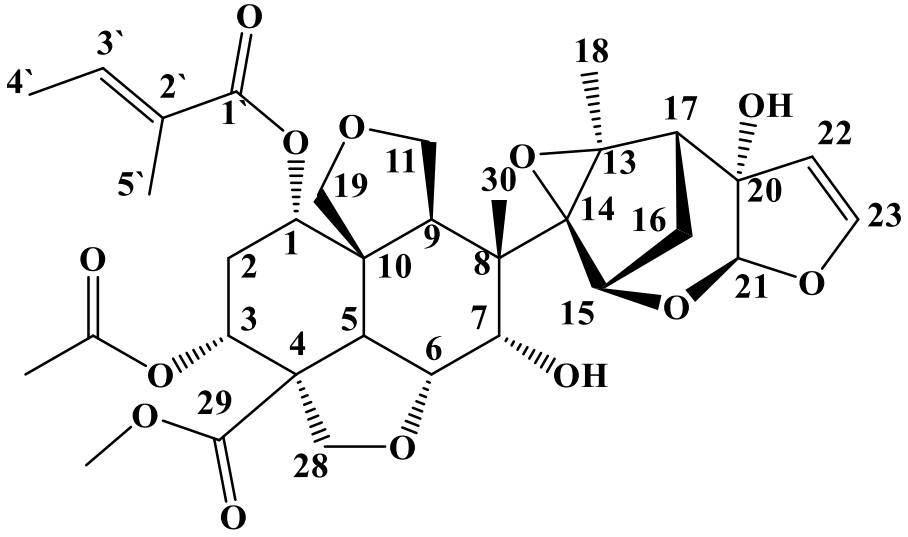


Figura 4.52 - Estrutura química do limonoide 10.

O pentanortriterpeno denominado Norpallidalina B é inédito, porém parte da sua estrutura é similar ao limonoide 08, contendo o anel A e B intacto, onde no anel A tem-se o grupo O-tigloil na posição C-1, um grupo O-acetil na posição C-3, e foi observada uma constante de 3Hz dos hidrogênios metilênicos do H-2 com os hidrogênios H-1 e H-3, devido ao acoplamento axial/equatorial e/ou equatorial/equatorial, um éster ligado na posição C-4, a ponte éter em C-6/28, uma hidroxila na posição C-7 e a metila C-30 ligada na posição C-8.

A primeira diferença encontrada nessa estrutura em relação aos outros limonoides relatados anteriormente, foram as correlações observadas no mapa de contorno HMBC do carbono C-1 com dois hidrogênios em δ_H 3,45 (*d*, *J* = 9,4 Hz, 1H) e δ_H 3,77 (*d*, *J* = 9,4 Hz, 1H), no mapa de contorno HSQC observou-

se que esses hidrogênios estão ligados diretamente ao carbono em δ_C 69,0 esse deslocamento químico é característico de carbono ligado a um oxigênio. Os carbonos das posições C-5 (δ_C 37,9) e C-10 (δ_C 50,1) também apresentaram correlações no HMBC com os hidrogênios em δ_H 3,45 e δ_H 3,77 corroborando para uma oxidação da metila C-19.

No COSY, o hidrogênio da posição H-9 δ_H 2,73 (*d*, *J* = 6,4 Hz, 1H) apresentou acoplamentos com os hidrogênios em δ_H 4,13 (*d*, *J* = 9,8 Hz, 1H) e δ_H 4,21 (*dd*, *J* = 9,8 e 6,4 Hz, 1H), ambos ligados ao carbono oxigenado em δ_C 69,1, o qual foi atribuído sendo o carbono da posição C-11. O hidrogênio em δ_H 4,13 tem correlação via HMBC com o carbono C-19 e o hidrogênio em δ_H 3,45 tem correlação com o C-11, confirmando a formação de uma ponte éter em C-11/19. (Figura 4.53)

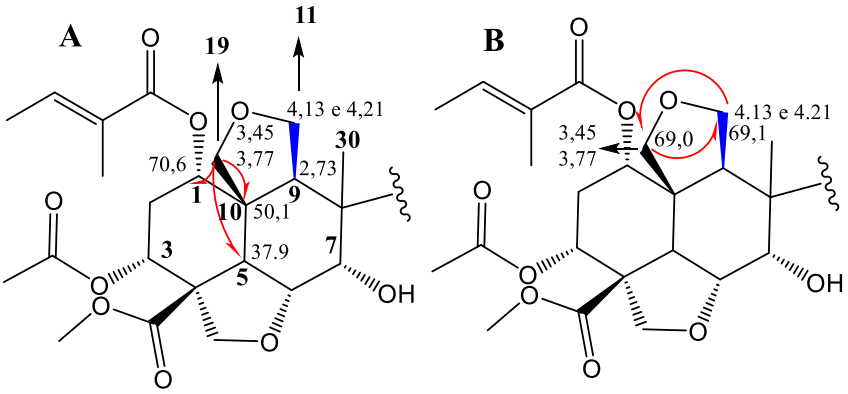


Figura 4.53 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

A continuidade da elucidação estrutural deu-se com a observação das correlações no mapa de contorno HMBC dos hidrogênios da metila 3H-30 em δ_H 1,20 (*s*, 3H), sem considerar as correlações com os carbonos do anel B. Após essa análise, percebeu-se uma correlação dos hidrogênios 3H-30 com o sinal de carbono não hidrogenado em δ_C 69,7 atribuído ao carbono da posição C-14, justificando uma correlação a ^{3}J dos hidrogênios da metila C-30 com o sinal em δ_C 69,7.

Os hidrogênios da metila em δ_H 1,86 também apresentaram uma correlação no HMBC com o C-14 e outra correlação com sinal de carbono em δ_C 66,4 atribuído ao C-13. Os valores do deslocamento químico desses carbonos juntamente com as correlações observadas no HMBC para os hidrogênios das metilas 3H-30 e 3H-18 indicaram a existência de um epóxido em C-13/14. (Figura 4.54)

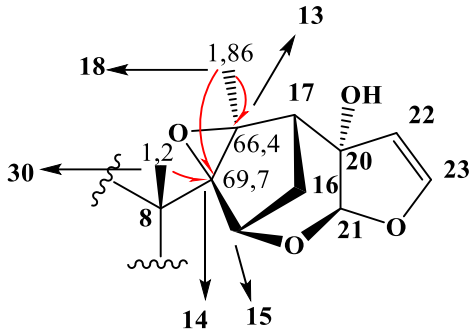


Figura 4.54 - As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

Os sinais referentes aos hidrogênios das posições H-6 e H-22 ficaram sobrepostos dificultando a observação das multiplicidades para cada sinal, porém podemos afirmar que a multiplicidade esperada para o H-6 é de um duplo dupleto com duas constantes de acoplamento de 12,4 e 2,8 Hz, enquanto para o H-22 a multiplicidade esperada seria de um dupleto com uma constante de acoplamento de 2,8 Hz. A análise do mapa de contorno HSQC permitiu atribuição que o H-6 está ligado ao carbono em δ_C 74,5 (C-6) e o outro hidrogênio ligado ao carbono em δ_C 107,8 (C-22).

No mapa de contorno HMBC foram observadas as correlações dos hidrogênios H-21, H-22, H-23, H-17, H-16a e H-16b com o carbono C-20 (δ_C 83,6). Assim como, a correlação a ^{3}J do H-21 com o C-15 e dos hidrogênios H-22 e H-23 com o C-21 (Figura 4.55).

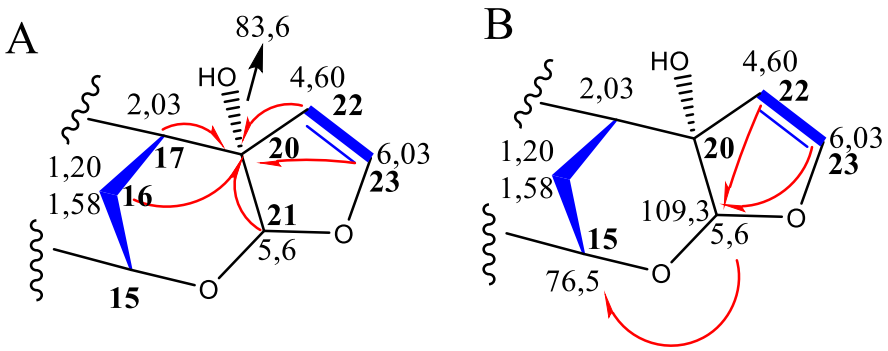


Figura 4.55 - As linhas em azul representam as correlações observadas no COSY. As setas em vermelho indicam as correlações observados no HMBC $^{1}H \rightarrow ^{13}C$.

No mapa de contorno COSY, o hidrogênio H-16a faz correlação com os hidrogênios H-15 e H-17. Observando o HMBC, o C-13 atribuído ao carbono do epóxido, faz correlação a ^{2}J com H-17 e a ^{3}J com os hidrogênios H-16b e H-15. O H-17 possui correlação a ^{3}J com o C-14, assim unindo as duas partes da molécula que foram discutidas de forma separadas.

A comparação do espectro de RMN $^{13}C\{^{1}H\}$ do norlimonoide **10** com o limonoide azadiractina[80] apresentou similaridade nos deslocamentos químicos dos carbonos, com duas diferenças: a ausência do carbono da posição C-12 e o deslocamento químico do carbono oxi-metilênico em C-11 (δ_C 69,1). A estrutura desse norlimonoide denominado norpallidalina B é inédita e experimento NOE para verificar as estereoquímicas ainda serão realizados.

Tabela 4.12 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **10** e RMN de ^{13}C do limonoide azadiractina (^{13}C 100 MHz; $CDCl_3$)

(Continua)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (Ref[80])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	70,6	70,5	5,24 (*t, J* = 3,0 Hz, 1H)
2	31	29,7	2,18 (*d, J* = 3,0 Hz, 1H)
3	67,7	66,9	5,66 (*t, J* = 3,0 Hz, 1H)
4	52,8	52,5	-
5	37,9	37,0	3,33 (*d, J* = 12,4 Hz, 1H)
6	74,5	73,7	4,60 (*m*, 1H)
7	73,7	74,7	4,67 (*d, J* = 2,8 Hz, 1H)
8	44,6	45,3	-
9	42,4	44,6	2,73 (*d, J* = 6,4 Hz, 1H)
10	50,1	50,0	-
11	69,1	104,1	4,13 (*d, J* = 9,8 Hz, 1H) e 4,21 (*dd, J* = 9,8 e 6,1 Hz, 1H)
12		171,8	
13	66,4	68,5	-
14	69,7	69,9	-
15	76,5	76,4	4,37 (*d, J* = 3,6 Hz, 1H)
16	25,5	24,9	1,58 (*dt, J* = 12,8 e 5,4 Hz, 1H) e 1,20 (*s*, 1H)
17	48,9	48,6	2,03 (*d, J* = 5,4 Hz, 1H)
18	19,3	18,3	1,86 (*s*, 1H)
19	69	69,1	3,45 (*d, J* = 9,4 Hz, 1H) e 3,77 (*d, J* = 9,4 Hz, 1H)
20	83,6	83,1	-
21	109,3	108,8	5,60 (*s*, 1H)
22	107,8	107,3	4,60 (*m*, 1H)
23	146,8	147,1	6,03 (*d, J* = 2,8 Hz, 1H)
28	73,1	73,0	3,70 (*d, J* = 8,7 Hz, 1H) e 4,00 (*d,* J = 8,7 Hz, 1H)
29	173,5	173,3	-
30	20,2	21,3	1,20 (*s*, 3H)
1'	166,4	166,2	-
2'	129,2	128,6	-
3'	137,7	137,8	7,01 (*dd, J* = 10,9 e 4,3 Hz, 1H)
4'	14,1	14,3	1,48 (*d, J* = 7,1 Hz, 3H)
5'	12,1	11,9	1,84 (*s*, 3H)

Tabela 4.13 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **10** e RMN de ^{13}C do limonoide azadiractina (^{13}C 100 MHz; $CDCl_3$)

(conclusão)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (Ref[80])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
3-OAc	20,7	20,9	1,66 (*s*, 3H)
	169,3	169,6	-
29-OMe	51,8	52,7	3,08 (*d, J* = 1,2 Hz, 3H)

4.3.11 Substância **11** (Espiropallidalina A)

O limonoide **11** foi isolado da fração B-F15 e foi elucidado por RMN 1D e 2D. Após analisar todos os espectros e mapas de contorno, foi proposta a estrutura limonoide **11**, (Figura 4.56) com os anéis A e B intactos, apresentando similaridade estrutural com o limonoide **08**, exemplificado nas correlações (COSY, HSQC e HMBC) para o H-3' do grupo tigloila na posição C-1, do grupo acetil na posição C-3, do éster ligado ao C-4, a ponte éter em C-6/28.

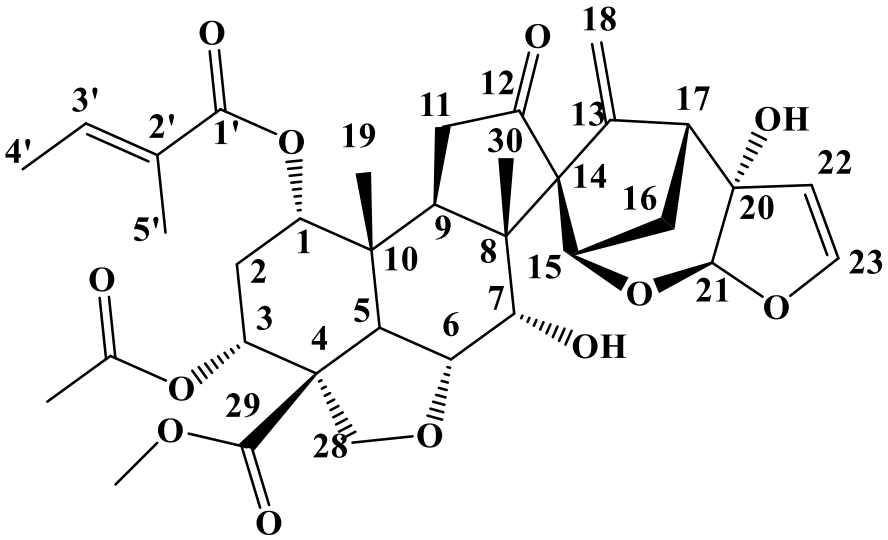


Figura 4.56 - Estrutura do limonoide 11.

As correlações atribuídas aos carbonos C-20, C-21, C-22 e C-23, também já foram exploradas na discussão do limonoide 08 e do nor-limonoide 10. A seguir serão discutidas apenas as correlações que mostram a diferença estrutural do limonoide 11 para o limonoide 08.

Os dados de RMN permitiram definir os sinais da Me-30 em δ_H 0,82 (*s*, 3H) e δ_C 18,2, assim como o H-9 em δ_H 3,38 (*dd*, *J* = 13,2 e 9,4 Hz, 1H) e seu carbono em δ_C 37.2. O sinal de H-9 em δ_H 3,38 acopla com dois sinais em δ_H 2,18 (*m*) e 1,91 (*dd*), os quais acoplam entre si no COSY, e considerando a biossíntese de triterpenos, esses hidrogênio foram atribuídos 2H-11. O sinal em δ_H 2,18 (*m*) no HSQC mostra corresponder a dois hidrogênios de carbonos distintos, δ_C 29,9, atribuído ao C-2 e δ_C 33,0 atribuído agora ao C-11 (o sinal em δ_H 1,90 mostra correlação no HSQC somente com o sinal em δ_C 33,0). Novamente considerando a biossíntese, o sinal de H-9 em axial acopla com o H-11 axial em δ_H 1,91 (*dd*) mostrando uma constate axial/axial com *J* = 13,2 Hz e com o sinal em δ_H 2,18 seria a axial/equatorial, com *J* menor, mas devido a presença de um segundo sinal em δ_H 2,18 não foi possível determiná-la.

No HMBC o sinal de H-9 em δ_H 3,38 mostrou as correlações com os sinais de carbonos em δ_C 13,6 (Me-19), 18,2 (Me-30), 33,0 (C-11), 38,6 (C-10), 42,6 (C-5), 53,3 (C-8), 72,3 (C-1) e/ou 72,5 (C-7). Estas correlações também mostram que os sinais em δ_H 3,38 e δ_C 37.2 foram corretamente atribuídos ao H-9 e C-9, respectivamente.

O sinal em δ_H 1,90 foi mais simples de se analisar devido a ele corresponder somente a um dos dois H-11 (axial), este mostrou correlações com os sinais em δ_C 37,2 (C-9), 38,6 (C-10) e 211,2. O sinal em δ_H 2,18 foi mais complexo devido a ele ser um multipleto incluindo os sinais de H-2 e H-11 equatorial, este mostrou as correlações com os sinais de carbonos em δ_C 37,2 (C-9), 38,6 (C-10), 53,3 (C-8), 211,2, 72,5 (C-7), este último seria a ^4J ou pertence somente ao sinal correspondente ao H-2 se correlacionando com C-1 em δ_C 72,3.

Os sinais em δ_H 2,18 e 1,90 se correlacionando com o sinal em δ_C 211,2 sugerindo uma carbonila em C-12, principalmente devido a estes sinais de H-11 acoplarem somente entre si e com o H-9.

O sinal da Me-30 em δ_H 0,82 (δ_C 18,2) no HMBC mostrou correlações com os sinais de carbonos atribuídos anteriormente, em δ_C 37,2 (C-9), 38,6 (C-10), 53,3 (C-8), e outras correlações que vão de δ_C 71,6 a 79,0, mas com maior área entre δ_C 71,6 a 73,2. Também foi observado correlações fracas com os sinais em δ_C 148,3 e 211,2, esta última bem mais franca. O sinal em δ_C 148,3 não mostra correlações no HSQC, indicando ser um carbono de uma ligação dupla e este sendo substituído por dois outros carbonos. Os sinais em δ_H 5,31 (*s*, 1H) e 5,10 (*s*, 1H) não mostram acoplamentos no COSY, no HSQC se correlacionam com o sinal em δ_C 115,9, e no HMBC se correlacionam com o sinal em δ_C 148,3, o que sugere uma ligação dupla exocíclica em C-13.

A presença de uma dupla exocíclica indica um rearranjo no anel C, usando uma metila. O espectro de hidrogênio mostrou sinais para 05 metilas e uma metoxila (δ_H 3,17, 3H; δ_C 51,8). As cinco metilas já foram atribuídas, δ_H 1,81 (3H; δ_C 12,1), δ_H 1,47 (3H; δ_C 14,2), ambas aos C-5' e C-4' do O-tigloil, δ_H 1,66 (3H; δ_C 20,7) à metila do grupo acetato em C-3, δ_H 0,82 (3H; δ_C 18,2) à Me-30 e δ_H 0,50 (3H; δ_C 13,6) à Me-19. Faltou o sinal de metila para a Me-18, a qual deve ter participado do rearranjo levando à ligação dupla terminal.

Os sinais de hidrogênio desta ligação dupla terminal aparecem em δ_H 5,31 (*s*, 1H) e 5,10 (*s*, 1H) e ambas se correlacionam no HSQC com o sinal em δ_C 115,9 Estes dois sinais no HMBQ mostram correlações fortes com os sinais de carbono em δ_C 148,3; 83,5; 71,6; 55,6, e mais fracas com os sinais em δ_C 211,2; 37,2; 29,8 e 18,2. As correlações fracas são com os carbonos δ_C 211,2 da carbonila em C-12, 37,2 do C-9 e 18,2 da Me-30, sugerindo correlações a J^4 ou mais. O sinal em δ_C 148,3 pode ser atribuído ao C-13 onde estaria ligado a Me-18, ou seja, o carbono sp^2 totalmente substituído da ligação dupla exocíclica. O sinal em δ_C

83,5 no HSQC não mostra correlações, indicando um carbono sp^3 oxigenado totalmente substituído. O sinal em δ_C 55,6 no HSQC mostra correlação com o sinal em δ_H 2.67 (*d*, *J* = 5,7 Hz, 1H), o qual no COSY mostra acoplamento com o sinal em δ_H 2,49 e com o sinal em δ_H 4,45, mas este último deve ser com um *J* muito pequeno, pois a área de correlação é muito pequena. Este sinal em sinal δ_H 4,45 (*d*, *J* = 1,9 Hz, 1H), o qual no HSQC mostra ser um CH-oxigenado em δ_C 79,0, no COSY acopla com os sinais em δ_H 2,49 e 2,04, este último com uma área bem menor, indicando um provável *J* muito pequeno, o que confirma o espectro de RMN ^{1}H, onde o sinal em δ_H 4,45 aparece como um dupleto com *J* pequeno. Os sinais em δ_H 2,49 (*ddd*) e 2,04 (*dd*) acoplam entre si no COSY e no HSQC se correlacionam com o sinal em δ_C 29,8.

Considerando as correlações referentes ao anel C e D, estas sugerem um rearranjo iniciando na Me-18 com a abertura de um epóxido entre C-14 e C-15, como indicado abaixo (Figura 4.57).

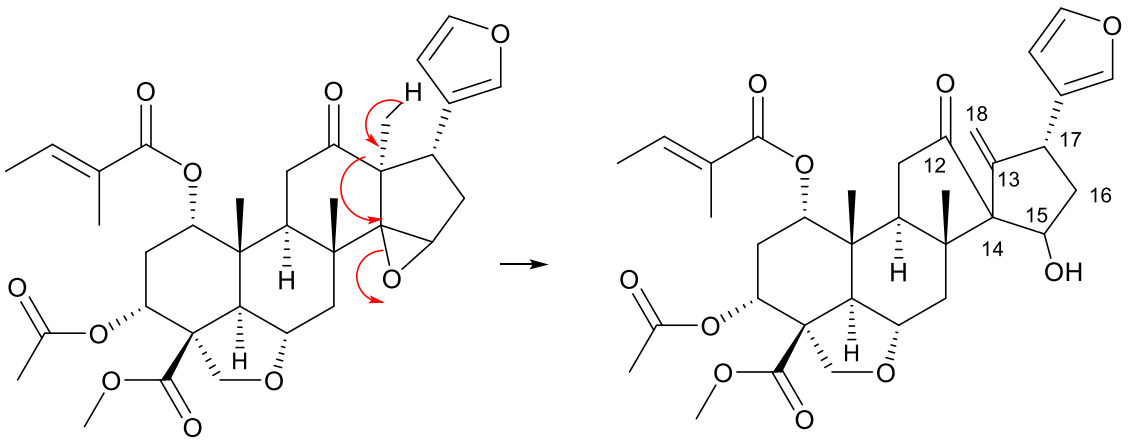


Figura 4.57 – Proposta da formação do carbono espiro.

Os anéis C e D em espiros explicam os dados espectroscópicos discutidos, CH_2-18 corresponde aos sinais δ_H 5,31 (*s*) e 5,10 (*s*) e δ_C 115,9; C-13 ao sinal em δ_C 148,3, um carbono sp^2 totalmente substituído; o CH-17 em δ_H 2,67 (*d*, *J* = 5,7 Hz, 1H; δ_C 55,6) acopla com o sinal do CH_2-16 com somente o

hidrogênio com deslocamento químico em δ_H 2,49 (*ddd*), ou seja o ângulo entre H-17 e um dos dois hidrogênios 2H-16 deve levar a um *J* zero ou próximo de zero. O sinal de 2H-16 em δ_H 2.49 (*ddd*) acopla geminal com H-16 em δ_H 2,04 (*dd*), com H-17 com um *J* = (5,7 Hz), e com o H-15 em δ_H 4,45 (*d, J* = 1,9 Hz, 1H), CH-oxigenado em δ_C 79,0. O sinal de CH-17 em δ_H 2,67 (1H), o qual no COSY mostra acoplamento com o sinal de H-15 em δ_H 4,45, com uma área de correlação muito pequena, agora a estrutura pode-se dizer ser este em W.

As correlações fortes dos sinais do CH_2-18 em δ_H 5,31 e 5,10 no HMBC com o sinal de CH-17 em δ_C 55,6, confirma a proposta para o anel D, e a correlação também forte com o sinal em δ_C 71,6, sem correlação no HSQC, permite atribuir este ao carbono espiro C-14.

O sinal de H-15 em δ_H 4,45 no HMBC se correlaciona com os sinais em δ_C 55,6 (C-17), 148,3 (C-13) e 109,6, este último sinal indicando modificações no anel furano. Este sinal em δ_C 109,6 no HSQC corresponde ao sinal em δ_H 5,64 *s* (1H), e este último no HMBC se correlaciona com os sinais em δ_C 55,6; 79,0; 83,5 e 146,3. Estas correlações sugerem o ataque da hidroxila em C-15 ao anel furano, como mostra o esquema abaixo:

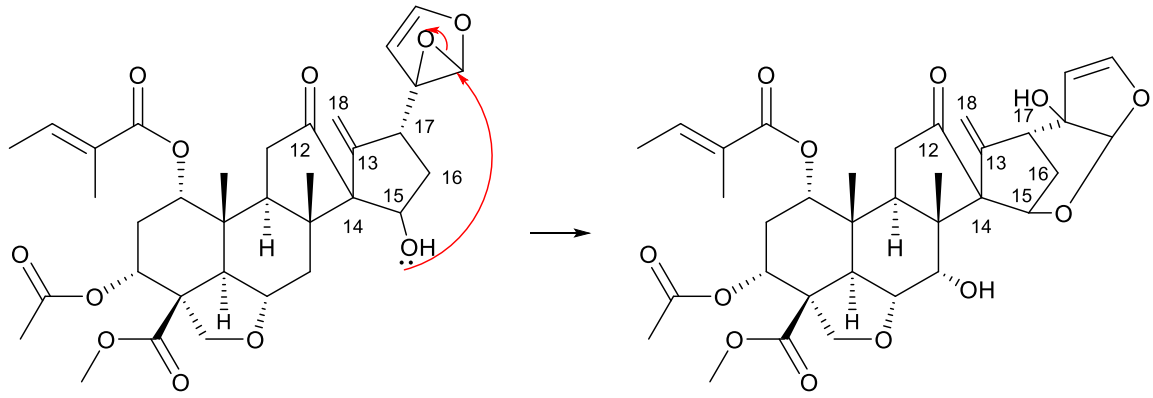


Figura 4.58 – Proposta para a modificação do anel furano.

Na literatura já foi descrito limonoides contendo um epóxido no anel furano (Pamplona *et al.*, 2018),[81] assim como com anéis em espiro e o

deslocamento químico do carbono espiro em três modelos similares variaram de δ_C 62,2 a 68,9; outros modelos na literatura também mostram deslocamentos nesta faixa (Severino *et al*., 2012; Yuan *et al*., 2012).[82,83] A presença de um oxigênio no carbono espiro leva o deslocamento químico para valores de δ_C 86.6 a 96.7 (An et al., 2016; Fan et al., 2019; Nakatani *et al*., 1999).[84–86]

As correlações do sinal em δ_H 5,64 s com os sinais em δ_C 55,6, 79,0, 83,5 e 146,3, confirmam as atribuições de δ_C 55,6 a C-17, 79,0 a C-15, e 83,5 ao C-20, justificando a proposta de biogêneses acima. A correlação com o sinal em δ_C 146,3 indica os carbonos de anel furano C-22 e C-23 intactos, sendo este último atribuído ao C-23. O sinal em δ_C 146,3 no HSQC corresponde ao sinal em δ_H 6,12 (*d, J* = 2,9 Hz, 1H) e este no COSY acopla com o sinal em δ_H 4,77 (*d, J* = 2,9 Hz, 1H; δ_C 107,1), permitindo atribuí-lo ao H-22 e C-22, a correlação deles com o sinal em δ_C 83,5 confirmam a hidroxila em C-20.

Na determinação espacial entre os núcleos de hidrogênio foi utilizado o experimento ROESY-2D (*Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*). Esse experimento foi fundamental para elucidar a conformação do limonoide. As metilas Me-30 e Me-19 apresentaram interações com o hidrogênio em δ_H 1,91 (H-11a), essas correlações observadas indicam que o hidrogênio em δ_H 1,91 está na face beta(β) do limonoide. A interação da Me-19 com o sinal em δ_H 2,28 (H-2) corrobora para que esse hidrogênio esteja na posição axial. Considerando a biossíntese dos triterpenos, o hidrogênio da posição H-9 (δ_H 3,38) se encontra na alfa (α), para esse sinal foi observada uma interação com o sinal em δ_H 5,10 (H-18a), indicando uma proximidade entre os dois núcleos. O sinal do H-18a também mostrou uma interação com o sinal em δ_H 2,18, o qual foi atribuído ao hidrogênio da posição H-11b (Figura 4.59).

Ao analisar o sinal 2,67 (H-17) constatou-se a interação com o sinal do H-18b (δ_H 5,31), com sinal do H-22 e com os sinais dos hidrogênios

metilênicos da posição H-16, confirmando os núcleos de hidrogênio vizinhos ao H-17 (Figura 4.59).

O sinal do H-21 (δ_H 5,64) apresentou uma interação com hidrogênio da posição H-7 (δ_H 4,43), essa interação foi fundamental para mostrar a conformação da molécula. Para confirmar a conformação, o hidrogênio da posição H-15 (δ_H 4,45) deveria apresentar uma correlação com o sinal da Me-30 (δ_H 0,82), essa interação foi confirmada no mapa de correlação ROESY-2D (Figura 4.59).

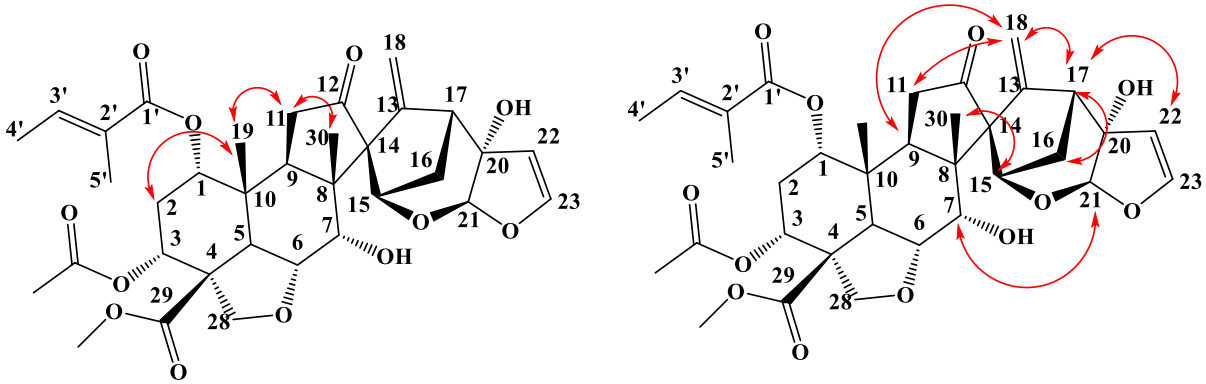


Figura 4.59 - As setas em vermelho indicam as interações observadas no ROESY-2D $^1H \leftrightarrow ^1H$.

Estruturas de limonoides espirociclicos já foram descritas na literatura, como por exemplo as espirotrichilinas isoladas de *Trichilia connaroides*[87], essas estruturas apresentam o carbono espiro unindo os anéis B e C, e são estruturas mais rearranjadas. O limonoide **11** possui o carbono espiro entre os anéis C e D, um modelo similar não foi encontrado na literatura, tornando a estrutura inédita, por esse motivo foi denominada de espiropallidalina A.

Tabela 4.14 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **11**

Posição (C/H)	δ_C	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	72,3	4,75 (*t, J* = 3,0 Hz, 1H)
2	29,9	2,18 (*m*, 1H) e 2,28 (*dt, J* = 16,8 e 3,0 Hz, 1H)
3	67,8	5,77 (*t, J* = 3,0 Hz, 1H)
4	51,4	-
5	42,6	2,91 (*d, J* = 12,2 Hz, 1H)
6	75,5	4,61 (*dd, J* = 12,2 e 3,2 Hz, 1H)
7	72,5	4,43 (*d, J* = 3,2 Hz, 1H)
8	53,3	-
9	37,2	3,38 (*dd, J* = 13,2 e 9,4 Hz, 1H)
10	38,6	-
11	33	1,91 (*dd, J* = 18,9 e 13,2 Hz, 1H) e 2,18(*m*, 1H)
12	211,2	-
13	148,3	-
14	71,6	-
15	79	4,45 (*d, J* = 1,9 Hz, 1H)
16	29,8	2,04 (*dd, J* = 13,1 e 1,3 Hz, 1H) e 2,49 (*ddd, J* = 13,1; 5,7 e 3,3 Hz, 1H)
17	55,6	2,67 (*d, J* = 5,7 Hz, 1H)
18	115,9	5,10 (*s,* 1H) e 5,31 (*s*, 1H)
19	13,6	0,50 (*s*, 3H)
20	83,5	-
21	109,6	5,64 (*s*, 1H)
22	107,1	4,77 (*d, J* = 2,9 Hz, 1H)
23	146,3	6,12 (*d, J* = 2,9 Hz, 1H)
28	73,2	3,64 (*d, J* = 8,7 Hz, 1H) e 3,85 (*d, J* = 8,7 Hz, 1H)
29	174	-
30	18,2	0,82 (*s*, 3H)
1'	165,9	-
2'	129,2	-
3'	138,3	7,1 (*qd, J* = 7,1 e 1,5 Hz, 1H)
4'	14,2	1,47 (*dd, J* = 7,1 e 1,5 Hz, 3H)
5'	12,1	1,81 (*d, J* = 1,5 Hz, 3H)
3-OAc	20,7	1,66 (*s*, 3H)
	169,4	-
29-OMe	51,8	3,17 (*s*, 3H)

4.3.12 Substância **12** (Pallidalina C)

O limonoide **12** foi isolado da fração B-F22, seus espectros de RMN ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$, e as correlações no mapa de contorno mostraram similaridade estrutural com o limonoide **04**, com uma única diferença estrutural, enquanto no limonoide **04** o anel furano está intacto, no limonoide 12 este é uma lactona α,β insaturada, por isso será discutido apenas as correlações referentes ao carbono C-17, C-20, C-21, C-22 e C-23 (Figura 4.60).

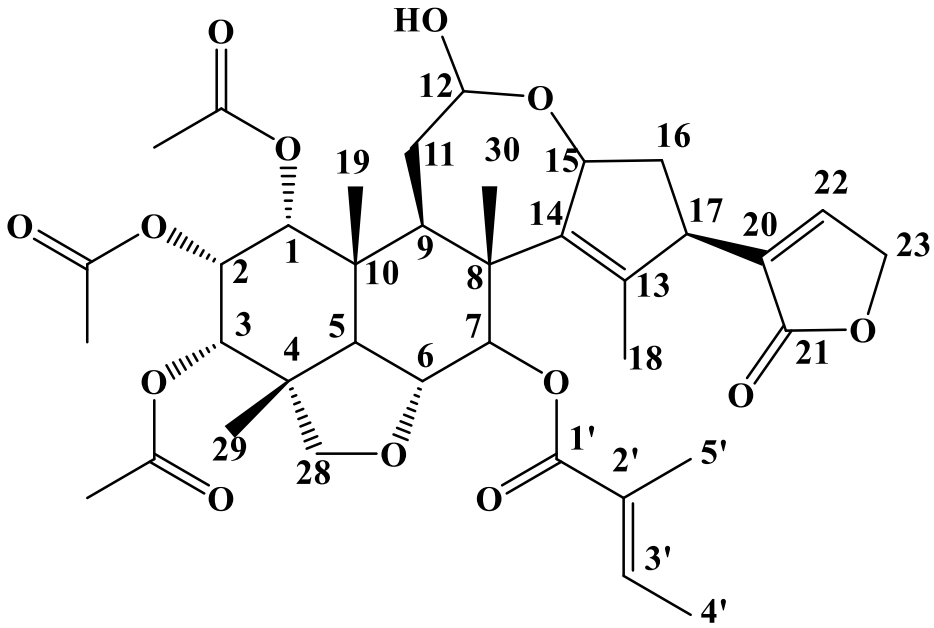


Figura 4.60 - Estrutura do limonoide 12.

O carbono em δ_C 137,5 no HSQC não apresentou correlação com hidrogênio, ou seja, é um carbono em ligação dupla totalmente substituído, este carbono no mapa de contorno HMBC mostrou correlações com os hidrogênios do anel D, H-15, 2H-16 e H-17, por isso o carbono em δ_C 137,5 foi atribuído ao C-20, este carbono também possui outras correlações com os hidrogênios em δ_H 6,54 (*dd*, *J* = 1,7 e 1,1 Hz, 1H), 3,91 (*dt*, *J* = 17,8 e 1,7 Hz, 1H) e 3,99 (*dt*, *J* = 17,6 e 1,1 Hz, 1H), esses hidrogênios acoplam entre si, como pode ser observado na

constante de acoplamento geminal de 17,6 Hz entre os dois hidrogênios (δ_H 3,99 e 3,92) os quais estão ligados ao carbono em δ_C 69,8. A constante de 1,1 Hz é referente ao acoplamento do δ_H 6,54 com o 3,99 em ângulo pequeno entre os dois hidrogênios. O sinal do δ_H 3,91 ficou junto do sinal do H-6 (δ_H 3,89), porém é perceptível no espectro de RMN ^{1}H o duplo tripleto referente ao δ_H 3,91 e o duplo dupleto do H-6 e por isso o "*peak picking*" foi adicionado de forma manual e as constantes foram calculadas separadamente para cada multiplicidade, ou seja, primeiramente ocorreu a seleção dos sinais do triplo tripleto para o cálculo das constantes de 17,8 e 1,7 Hz, depois o "*peak picking*" do sinal δ_H 3,91 foi desmarcado para que o duplo dupleto pudesse ser selecionado e as contantes de 12,7 e 2,9 Hz pudessem ser calculadas.

No COSY é confirmado o acoplamento do δ_H 6,54 com os hidrogênios em δ_H 3,91 e 3,99. Foi observado no mapa de contorno HMBC que o carbono em δ_C 173,9 correlacionou-se com os hidrogênios H-17, δ_H 6,54, 3,91 e 3,99. Todas essas correlações corroboraram para confirmar a presença de uma lactona α,β insaturada. Os sinais de carbono em δ_C 137,5, 173,9, 145,3 e 69,8, foram atribuídos, respectivamente, as posições C-20, C-21, C-22 C-23.

Os limonoides Munrolina O e Munrolina P, isolados de *Munronia unifoliolata*[73], são os que mais se assemelham à estrutura do composto 12. A estrutura da Munrolina O apresenta um grupo O-tigloila na posição C-1, um substituinte O-acetila em C-3 e um grupo metoxila em C-12, formando um cetal no anel C. Em contraste, o limonoide 12 possui uma função orgânica hemiacetal no anel C, um grupo O-tigloila em C-7 e grupos O-acetila nas posições C-1, C-2 e C-3, caracterizando-se como uma estrutura inédita, aqui descrita pela primeira vez.

Tabela 4.15 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **12** e RMN de ^{13}C do limonoide munrolina O (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$)

(Continua)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[73])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	71,7	71,0	5,28 (*d, J* = 3,0 Hz, 1H)
2	68,3	27,8	5,59 (*t, J* = 3,0 Hz, 1H)
3	73,2	71,7	5,30 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H)
4	43,3	42,9	-
5	40,7	38,7	2,94 (*d, J* = 12,7 Hz, 1H)
6	72	74,1	3,90 (*dd, J* = 12,7 e 2,9 Hz, 1H)
7	74,4	73,5	5,88 (*d, J* = 2,9 Hz, 1H)
8	45,9	46,1	-
9	36,1	35,0	3,16 (*d, J* = 9,8 Hz, 1H)
10	40,7	40,8	-
11	32,1	31,6	1,32 (*m*, 1H) e 1,38 (*m*, 1H)
12	91,2	98,2	4,97 (*d, J* = 2,8 Hz, 1H)
13	140	138,2	-
14	145,1	146,7	-
15	77,1	77,1	5,20 (*d, J* = 7,6 Hz, 1H)
16	37,6	37,2	1,63 (*m*, 1H) e 2,27 (*ddd, J* = 13,9; 9,4 e 7,7 Hz, 1H)
17	46,9	46,6	3,39 (*d, J* = 9,2 Hz, 1H)
18	16,6	16,4	1,78 (*s*, 1H)
19	16,4	16,3	0,76 (*s*, 1H)
20	137,5	137,7	-
21	173,9	174,7	-
22	145,3	146,0	6,54 (*dd, J* = 1,7 e 1,1 Hz, 1H)
23	69,8	70,4	3,91 (*dt, J* = 17,8 e 1,7 Hz, 1H) e 3,99 (*dt, J* = 17,6 e 1,1 Hz, 1H)
28	77,5	78,2	3,46 (*d, J* = 7,5 Hz, 1H) e 3,54 (*d, J* = 7,5 Hz, 1H)
29	18,9	19,8	0,90 (*d, J* = 1,0 Hz, 1H)
30	20,7	21,0	1,07 (*s*, 1H)
1'	165,9	166,9	-
2'	129,4	129,5	-
3'	136,5	136,8	7,06 (*dddd, J* = 8,7; 7,2; 5,7 e 1,6 Hz, 1H)
4'	14,2	14,4	1,49 (*dd, J* = 7,1 e 1,3 Hz, 1H)
5'	12,3	12,1	1,89 (*s*, 3H)
1-OAc	20,6	-	1,89 (*s*, 3H)

Tabela 4.16 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz; C_6D_6) do limonoide **12** e RMN de ^{13}C do limonoide munrolina O (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$)

(Conclusão)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (ref[73])	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
	170,1	-	-
2-OAc	21,5	-	2,10 (*s*, 3H)
	170,1	-	-
3-OAc	20,4	21,0	1,79 (*s*, 3H)
	169,4	170,4	-
12-OMe (ref)	-	54,1	-

4.3.13 Substância **13** - Spirosendan

O limonoide **13** foi isolado da fração A-F24, o espectro de RMN ^{1}H mostrou a presença de sete metilas, das quais duas pertencem ao grupo O-tigloila e duas aos grupos O-acetila, restando apenas três metilas para serem atribuídas na estrutura, e levando em consideração a biossíntese de limonoides, teríamos que ter na estrutura cinco metilas (C-18, C-19, C-28, C-29 e C-30), essas informações sugeriram uma modificação em duas metilas.

Após a identificação estrutural realizada por RMN 1D e 2D chegou-se ao limonoide spirosendan isolado pela primeira vez de *Melia toosendan* (Figura 4.61).

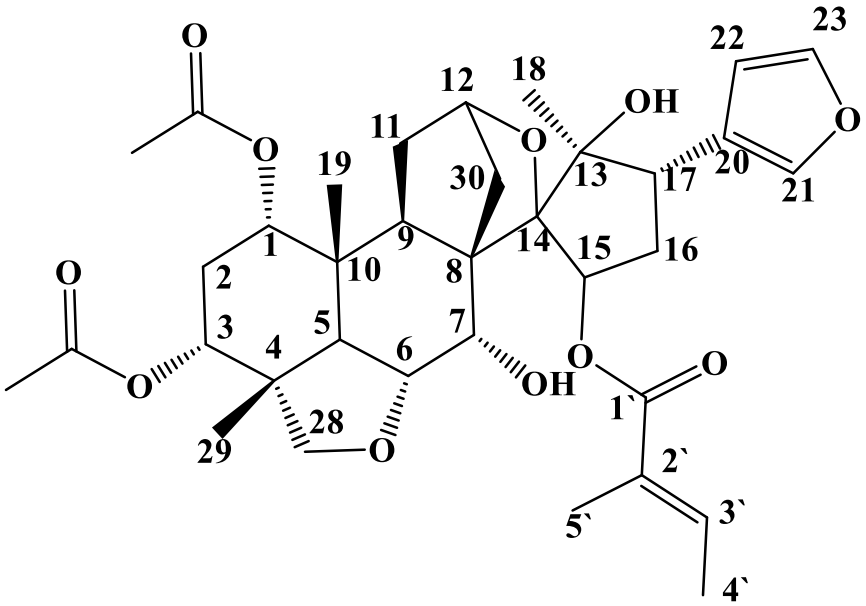


Figura 4.61 - Estrutura do limonoide 13.

As metilas do grupo acetato foram atribuídas com as correlações analisadas no HMBC, os carbonos em δ_C 169,7 e 169,6 apresentara correlações fortes na região de 169 – 170,5 com os hidrogênios em δ_H 2,02 e 1,64, com a ampliação da região que mostra essas correlações, é perceptível que o sinal de carbono em δ_C 169,7 se correlaciona com os hidrogênios em δ_H 2,02, pois o centro do sinal que indica a correlação está um pouco mais abaixo, e o carbono em δ_C correlaciona-se com o sinal em δ_H 1,64. Para distinguir as posições que os grupos acetatos estavam ligados, foi observada a ampliação que mostrava as correlações com os tripletos em δ_H 4,66 e 4,71. Apesar de uma sobreposição parcial dessas correlações, foi considerado que a pequena inclinação do sinal da correlação indicava que o carbono em δ_C 169,7 está para o 4,66 e o carbono em δ_C 169,6 está correlacionando-se com o hidrogênio em δ_H 4,71.

No HSQC foi observada uma correlação do carbono em δ_C 137,8 com um hidrogênio na região de δ_H 7,1 – 7,18 (foi considerado junto do sinal residual do solvente), no COSY, o sinal desse hidrogênio acoplou com sinais

de duas metilas em δ_H 1,46 (*dd*, *J* = 7,1 e 1,3 Hz, 3H) e 1,90 (*sl*, 3H), e as metilas acoplaram entre si, sugerindo um acoplamento alílico.

O hidrogênio ligado ao carbono em δ_C 137,8 mostrou correlações no HMBC com sinais de duas metilas vinílicas em δ_C 12,3 (δ_H 1,90) e 14,3 (δ_H 1,46), e um sinal de carboxila em δ_C 166,9 indicam a presença de um grupo tigloila, o qual é confirmado no HMBC com as correlações dos sinais de hidrogênio das duas metilas (δ_H 1,90 e 1,46) com os sinais de carbonos em δ_C 166,9 (C-1'), 129,7 (C-2') e 137,8 (C-3'). As metilas em δ_C 14,3 e 12,3, foram atribuídas aos carbonos C-4' e C-5', respectivamente. A posição em que o grupo tigloila está ligado será apresentada mais à frente.

O carbono não hidrogenado em δ_C 42,8 apresentou correlações no HMBC com o H-3, com a metila C-29 (δ_H 0,76; δ_C 20,2), com os hidrogênios oxi-metilênicos δ_H 3,41 e 3,56 (C-28), com o sinal em δ_H 2,02 (1H-2) e com o hidrogênio em δ_H 2,58, este último ligado ao carbono em δ_C 38,9 atribuído a posição C-5, o qual apresentou uma correlação a ^{3}J com os hidrogênios da metila C-19 (δ_H 0,36; δ_C 16,3). Esse conjunto de informações nos mostra que as metilas C-19 e C-29 estão ligadas aos carbonos C-10 e C-4, respectivamente, e tem-se a formação da ponte éter em C-6/28, indicando que a modificação na estrutura pode ser na metila C-18 ou na metila C-30.

Os anéis A e B desse limonoide são exatamente iguais aos anéis A e B dos limonoides **01**, **06** e **09**, apresentando as mesmas correlações nos mapas de contorno (COSY, HSQC e HMBC), nessas estruturas foram observadas, principalmente, as correlações no HMBC do carbono C-9 com os hidrogênios das metilas C-19 e C-30. Então, para o limonoide 13, buscaram-se essas correlações, porém foi observado que o carbono da

posição C-9 (δ_C 35,9) mostrou apenas uma correlação com hidrogênios de metila, os quais estão ligados a metila C-19 (δ_H 0,36; δ_C 16,3). Essa informação indica que na posição C-30 não há a presença de uma metila, e que possivelmente esse seja o local da modificação estrutural. Buscaram-se as outras correlações no HMBC do C-9, essas são com os hidrogênios em δ_H 2,58 (H-5), δ_H 4,50 (H-7), com sinais ainda não atribuídos em δ_H 1,31 (*ddd*, *J* = 13,9, 5,3 e 2,4 Hz, 1H), δ_H 4,04 (*s*, 1H) e com o multipleto em δ_H 1,69.

No HSQC o C-9 está ligado no hidrogênio em δ_H 3,07, então buscou-se no COSY quais hidrogênios tinham acoplamento com o H-9, e observou-se que os sinais em δ_H 1,31e 1,46 acoplavam com H-9. No sinal em δ_H 1,46 houve a sobreposição dos sinais da metila C-4' com um hidrogênio metilênico, apesar da sobreposição desses sinais dificultar a observação da multiplicidade, no HSQC podemos observar que os sinais em δ_H 1,31e 1,46 estão ligados aos carbono em δ_C 33,7, o qual foi atribuído sendo da posição C-11, devido o acoplamento dos hidrogênios com o H-9.

Com os hidrogênios da posição 2H-11 atribuídos de forma inequívoca, ainda analisando o COSY, foi observado um acoplamento entre os sinais em δ_H 1,31 e 4,04, conferido a posição C-12 o hidrogênio em δ_H 4,04 e o carbono ligado a um oxigênio em δ_C 76,4. Outro acoplamento foi constatado para o H-12 (δ_H 4,04) com o multipleto em δ_H 1,69 e com o sinal em δ_H 1,00 (*d*, *J* = 10.3 Hz, 1H), ou seja, um CH_2 vizinho. No HSQC, dois carbonos de CH_2 (δ_C 32,6 e δ_C 42,5) possuem correlação com o δ_H 1,69, entretanto, apenas o sinal em δ_C 42,5 apresenta correlação com ambos os hidrogênios em δ_H 1,69 e 1,00, sugerindo um rearranjo na molécula e formando uma ligação do C-12 com o C-30. Para confirmar esse rearranjo,

podemos observar no HMBC correlações a ^{2}J do carbono C-8 (δ_C 60,1) com os sinais do 2H-30 (δ_H 1,69 e 1,00) e uma correlação a ^{3}J com H-12 (δ_H 4,04).

O sinal de um carbono não hidrogenado em δ_C 96,6 apresentou correlações no HMBC com os hidrogênios H-9, H-12, H-30 (δ_H 1,00) e com os sinais em δ_H 1,58, 2,35 e 5,77. Devido as três primeiras correlações optou-se por colocar o sinal em δ_C 96,6 na posição C-14, e para justificar o deslocamento químico (δ_C) foi proposto um carbono espiro ligado a um oxigênio, formando uma ponte éter em C-12/14, essa sugestão é suportada por uma correlação no HMBC a ^{3}J do C-14 com o H-12.

Na análise do HSQC o carbono em δ_C 80,7 está correlacionado com o sinal em δ_H 5,77 (*t*, *J* = 8 Hz, 1H), porém o carbono em δ_C 81,6 não apresentou nenhuma correlação com hidrogênio, sugerindo que as posições C-13 e C-15 pertencem os respectivos carbonos em δ_C 81,6 e 80,7.

O hidrogênio H-15 (δ_H 5,77), no COSY, acoplou com os hidrogênios em δ_H 1,68 e 2,35 (*ddd*, *J* = 12,6; 8,0 e 6.9 Hz, 1H), e no HMBC correlacionou-se com a carboxila do grupo tigloila, indicando que este grupo está ligado ao carbono C-15 e que na posição C-16 tem-se a presença de um CH_2, visto que os hidrogênios em δ_H 1,68 e 2,35 estão correlacionados ao carbono em δ_C 32,6 no mapa de contorno HSQC.

Os hidrogênios em 2H-16 (δ_H 1,68 e 2,35) acoplam entre si, com o H-15 e com o sinal em δ_H 2,91(*dd*, *J* = 12,9 e 6,9 Hz, 1H), o qual apresenta um acoplamento alílico com o H-12 do anel furano, este sinal em δ_H 2,91 foi atribuído para a posição H-17. A ausência de outro acoplamento a ^{3}J de ^{1}H-^{1}H para o H-17, corrobora para que a posição C-13 seja não hidrogenada.

No mapa de contorno HSQC os hidrogênios da metila C-18 apresentaram correlação com o sinal de carbono em δ_C 20,7. No mapa de contorno

HMBC o sinal do 3H-18 mostrou correlações com os carbonos C-13 (δ_C 81,6), C-14 (δ_C 96,6) e C-17 (δ_C 45,3).

Os sinais do anel furano já foram bastante explorados nas outras estruturas anteriores, juntamente com correlações observadas nos mapas de contorno. No limonoide 13 os sinais do furano aparecem em: C-20 (δ_C 124,2) não hidrogenado, C-21 (δ_C 140; δ_H 7,12), C-22 (δ_C 111,5; δ_H 6,45) e C-23 (δ_C 142,7; δ_H 7,19).

Concluindo, os dados acima em comparação com aqueles de RMN de ^{13}C do limonoide spirosendan (Tabela 4.13) permitem confirmar a estrutura do limonoide **13**.

Tabela 4.17 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **13** e RMN de ^{13}C do limonoide spirosendan (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$)

(Continua)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (Ref)	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
1	71,7	72,2	4,66 (*t, J* = 3,0 Hz, 1H)
2	28	28,4	1,58 (*dt, J* = 16,5 e 3,0 Hz, 0H) e 2,02 (junto dos sinais de duas metilas)
3	71,5	71,8	4,71 (*t, J* = 3,0 Hz, 1H)
4	42,8	43,0	-
5	38,9	39,4	2,58 (*d, J* = 12,4 Hz, 1H)
6	74,5	74,9	3,51 (*dd, J* = 12,4 e 4,0 Hz, 1H)
7	67,2	67,3	4,50 (*d, J* = 4,0 Hz, 1H)
8	60,1	60,3	-
9	35,9	35,9	3,07 (sinal do OH está atrapalhando a multiplicidade)
10	39,3	39,3	-
11	33,7	34,0	1,31 (*ddd, J* = 13,9; 5,3 e 2,4 Hz, 1H) e 1,49 – 1,34 (*m*, 1H)
12	76,4	76,6	4,04 (*sl*, 1H)
13	81,6	81,6	-
14	96,6	96,7	-
15	80,7	80,7	5,77 (*t, J* = 8 Hz, 1H)

Tabela 4.18 - Dados de RMN de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ (^{1}H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz; C_6D_6) do limonoide **13** e RMN de ^{13}C do limonoide spirosendan (^{13}C 125 MHz; $CDCl_3$)

(Conclusão)

Posição (C/H)	δ_C	δ_C (Ref)	δ_H (multiplicidade, *J* Hz, integral)
16	32,6	32,6	1,69 – 1,65 (*m*, 1H) e 2,35 (*ddd, J* = 12,6; 8,0 e 6,9 Hz, 1H)
17	45,3	45,2	2,91 (*dd, J* = 12,9 e 6,9 Hz, 1H)
18	20,7	20,7	1,58 (*s*, 1H)
19	16,3	16,9	0,36 (*s*, 1H)
20	124,2	123,9	-
21	140	142,7	7,12 (*d, J* = 1,8 Hz, 1H)
22	111,5	111,4	6,45 (*dd, J* = 1,8 e 0,9 Hz, 1H)
23	142,7	139,9	7,19 (*t, J* = 1,8 Hz, 1H)
28	78,7	79,1	3,41 (*d, J* = 7,2 Hz, 1H) e 3,56 (*d, J* = 7,2 Hz, 1H)
29	20,2	20,8	0,76 (*s,* 1H)
30	42,5	42,6	1,00 (*d, J* = 10,3 Hz, 1H) e 1,71 (*d, J* = 7,8 Hz, 1H)
Tigloil			
1'	166,9	167,6	-
2'	129,7	129,3	-
3'	137,8	138,5	7,12 (junto do sinal do H-C21)
4'	14,3	15,0	1,46 (*dd, J* = 7,1 e 1,3 Hz, 1H)
5'	12,3	12,5	1,90 (*s*, 1H)
1-OAc	21,5		2,02 (*s*, 1H)
	169,7		-
3-OAc	20,6		1,64 (*s*, 1H)
	169,6		-

4.4 Proposta de biogênese para os limonoides isolados

O limonoide de anel intacto da classe havanensina possui oxidações nas posições C-1, C-3 e C-7, para a proposta de biogênese da estrutura 01 tem-se a O-acetilação nas posições C-1 e C-3, conseguinte duas oxidações na posição C-12, a primeiro leva a formação de um álcool e depois forma-se a carbonila. Após a formação da carbonila uma oxidação do tipo Baeyer-Villiger leva a gera o anel lactônico de 7 membros, a carboxila do éster cíclico é reduzida dando origem ao hemiacetal, posteriormente uma tigloilação leva ao limonoide C-*seco* 01 (Figura 4.62).

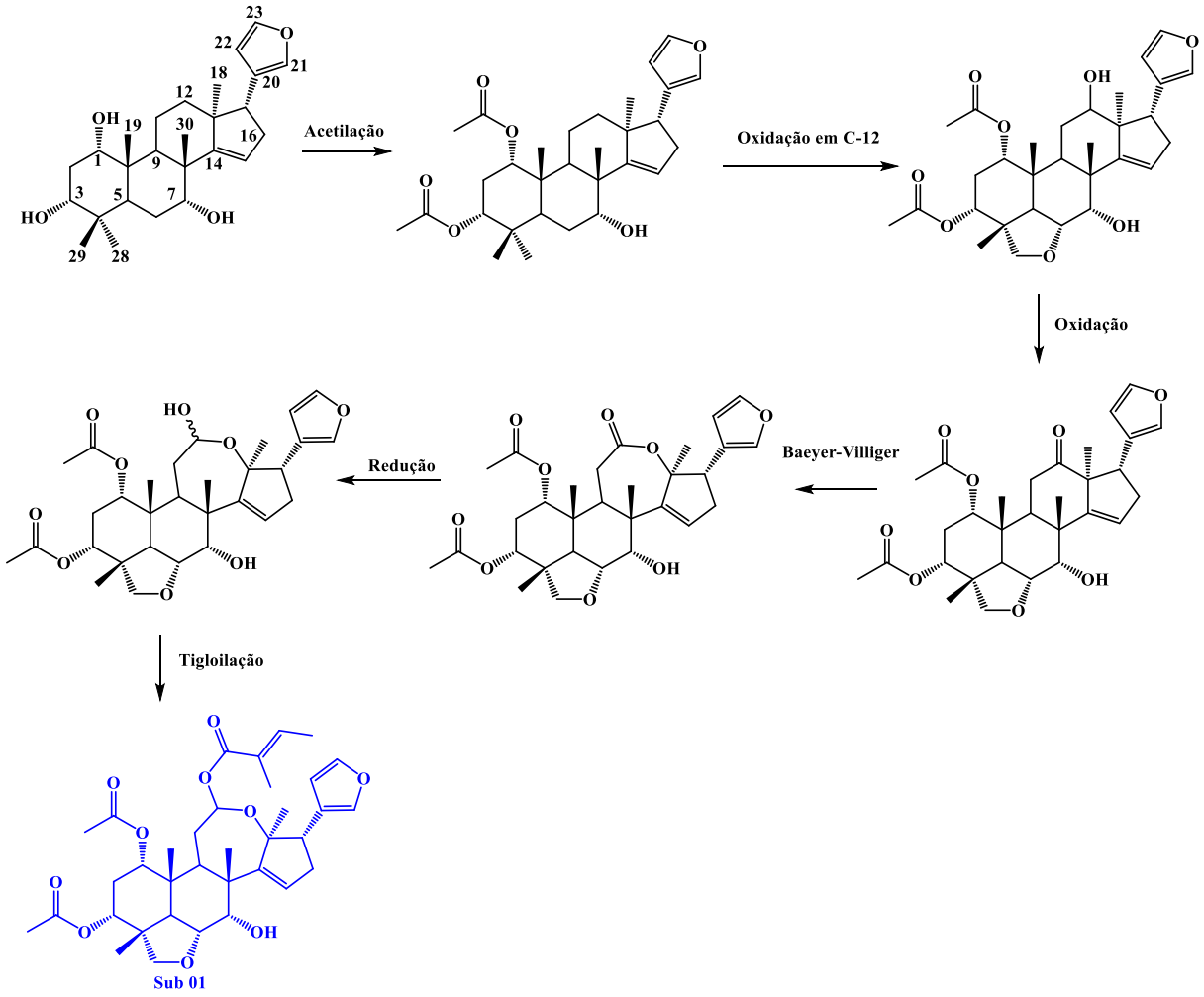


Figura 4.62– Primeira proposta de biogênese para o limonoide 01

A segunda proposta para biogênese do limonoide 01 não passa por uma oxidação do tipo Baeyer-Villiger, de modo a evitar uma redução da carboxila da lactona. Para contornar a redução, foi proposto uma oxidação em C-12 levando a formação da hidroxila e a oxidação da ligação dupla no anel D levando a formação do epóxido.

A proposta é inicia com a abertura do epóxido assistida com a abertura do anel C, formando uma ligação dupla em C-13 e o aldeído em C-12. É sugerida uma hidratação da dupla ligação no anel D, a hidroxila em C-13 faz um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do aldeído, levando ao fechamento do anel e a formação do hemiacetal, que posteriormente leva a formação do tigloil na posição C-12, originando o limonoide 01 (Figura 4.63).

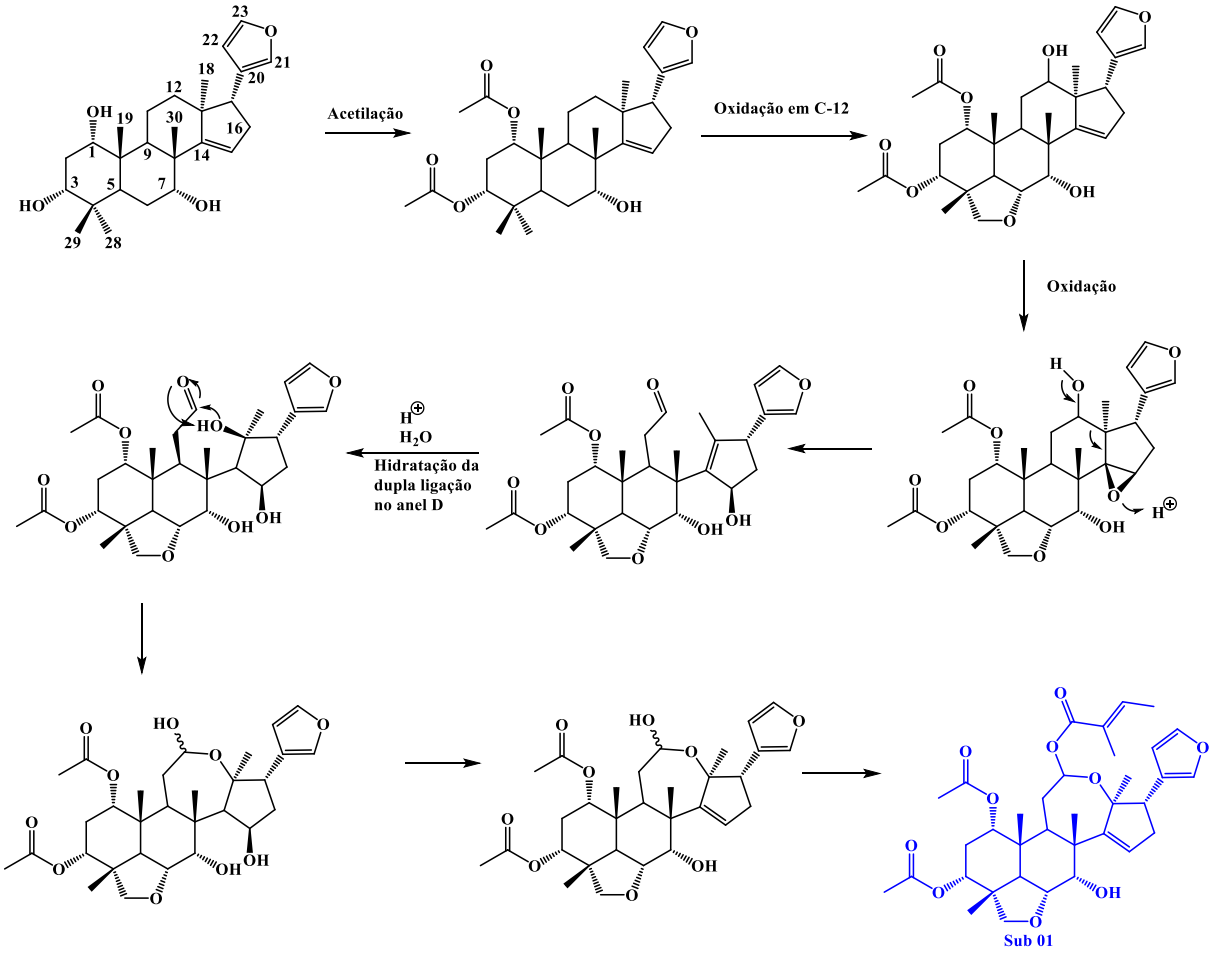


Figura 4.63 – Segunda Proposta de biogênese para o limonoide 01

A diferença entre os limonoide **02** e **03** é a presença de um grupo O-Acetila na posição C-12 na estrutura 03. Para ambos é necessária uma hidroxila em C-12 e o epóxido em C-14, após a abertura do epóxido, conseguinte a clivagem da ligação carbono-carbono no anel C, acontece um giro no eixo da ligação C-8/14 e o fechamento do anel de 7 membros como resultado de um ataque nucleofílico da hidroxila ao carbono acila do aldeído. Uma oxidação ocorre na posição C-6 e outra em C-28, uma segunda oxidação em C-28 leva a formação do aldeído e uma O-Acetilação ocorre em C-6 levando a formação do limonoide **02**, nessa estrutura uma O-Acetilação ocorre em C-12 para formar o limonoide **03** (Figura 4.64).

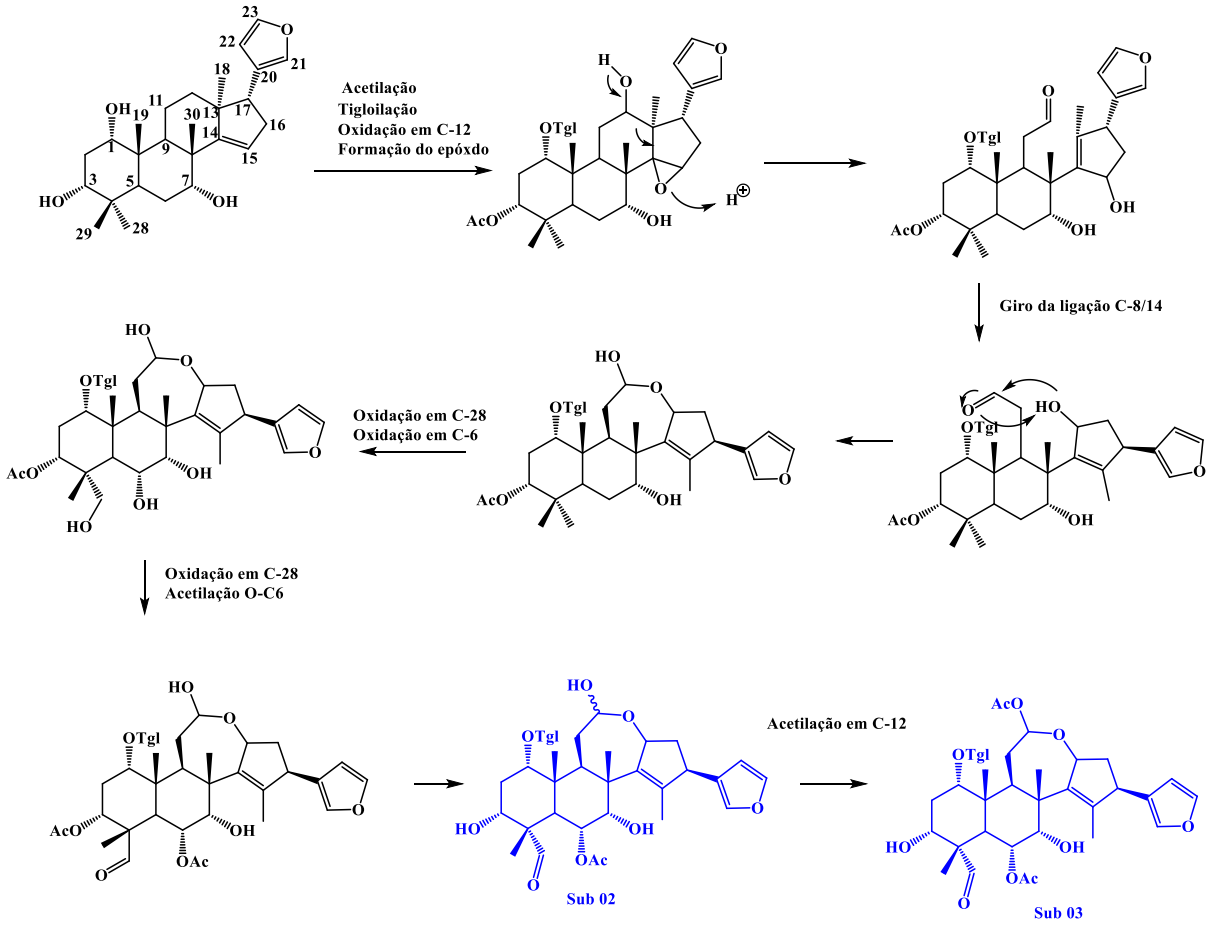


Figura 4.64 - Proposta de biogênese para o limonoide 02 e 03

Para o limonoide **04**, inicialmente foi proposto a O-Acetilação em C-1 e C-3, posteriormente a oxidação em C-12 e a formação do epóxido em C-13,

após a abertura do epóxido assistida com a abertura do anel C, ocorre o giro da ligação simples C-8/14 e o fechamento do anel C dando origem ao hemiacetal. Uma oxidação em C-2 leva a formação de um álcool, conseguinte uma O-Acetilação na hidroxila em C-2, na última etapa ocorre a O-Tigloilação em C-7 formando o limonoide **04** (Figura 4.65).

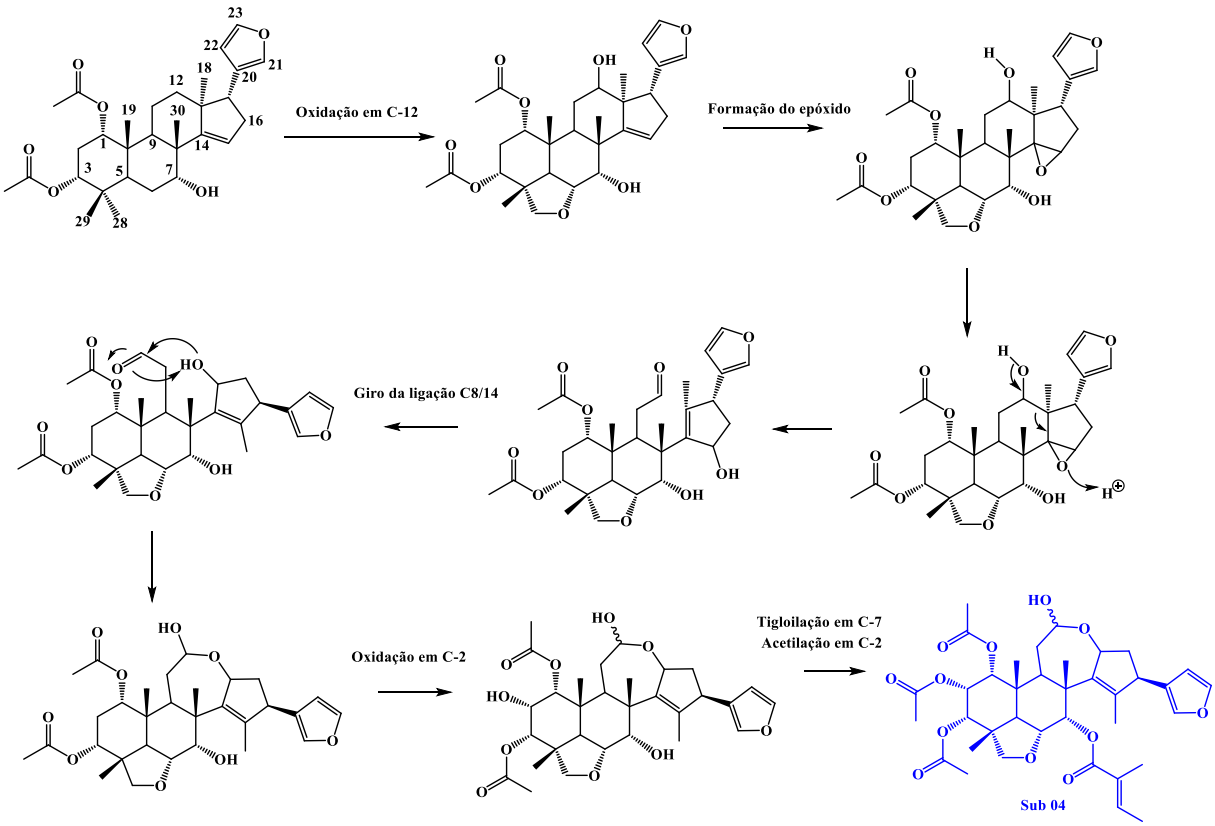


Figura 4.65 - Proposta de biogênese para o limonoide 04

A proposta de biogênese para o limonoide 05 é iniciado com o limonoide da classe azadirona, com a presença da carbonila α,β-insaturada no anel A, uma oxidação do tipo Baeyer-Villiger acontece no anel A, levando a formação da lactona. Uma oxidação ocorre na posição C-7 formando uma cetona, outra oxidação ocorre em C-29 originando um álcool, o qual sofre uma O-Acetilação. Uma segunda oxidação do tipo Baeyer-Villiger ocorre no anel B, a lactona do anel B é hidrolisada formando um ácido carboxílico em C-7 e um álcool em C-8. Ocorre uma eliminação de H_2O e a dupla exocíclica em C-8 é formada. O ácido

carboxílico é esterificado, conseguinte ocorrem oxidações nas posições C-11 e C-12.

Na posição C-11 é encontrado um substituinte fórmico, vale ressaltar que nenhum aditivo ácido foi utilizado nas etapas de fracionamento e análises e coletas por cromatografia líquida em fase reversa. Na posição C-12 tem-se a presença do substituinte 2-hidroxi-3-metilpentonoil (Hmp) (Figura 4.66).

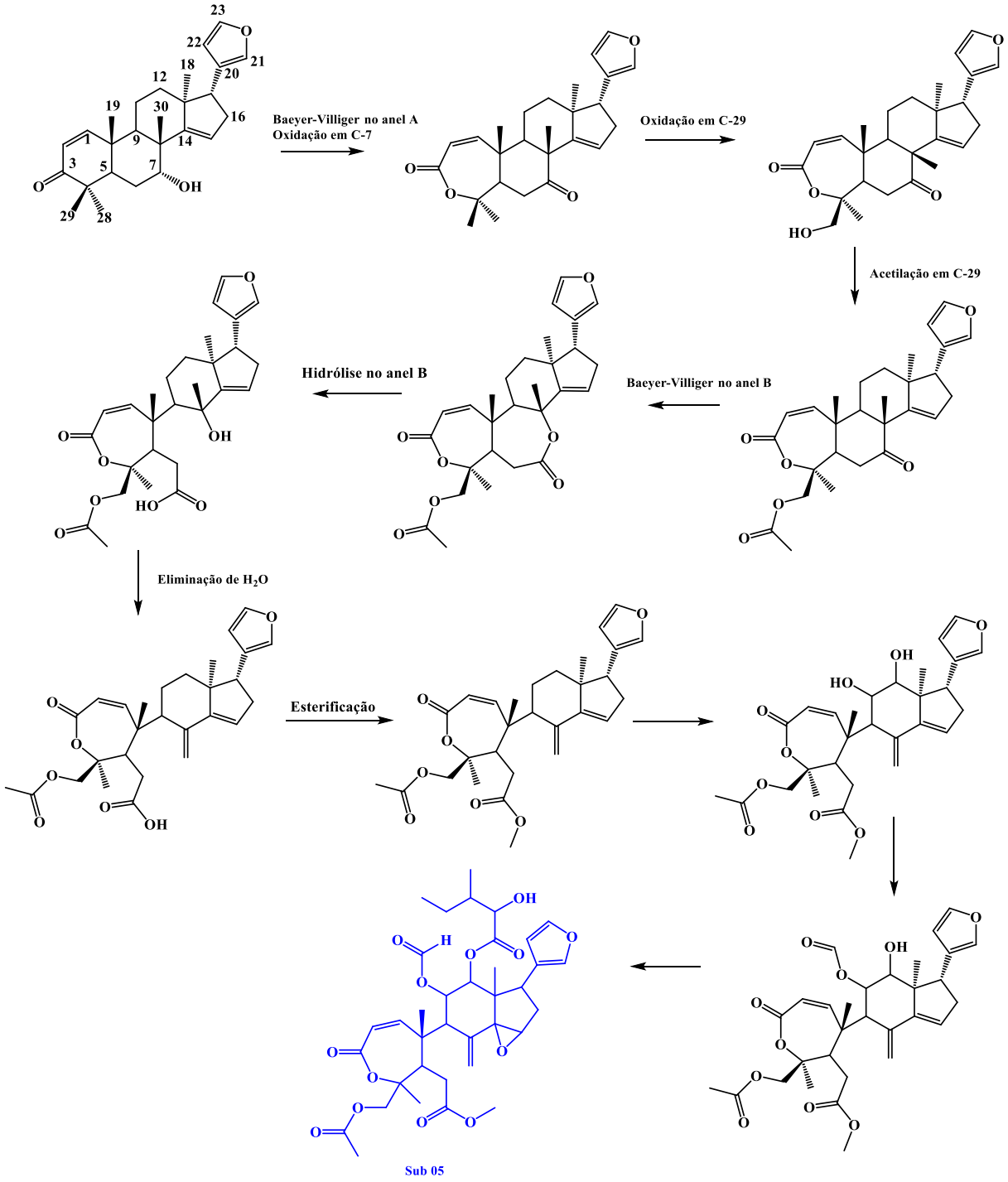


Figura 4.66 - Proposta de biogênese para o limonoide **05**

Os limonoide 06 e 12 são similares, com uma única diferença em C-2, enquanto no limonoide 06 tem-se a presença de um carbono metileno, no limonoide 12 na posição C-2 encontra-se um grupo O-Acetila.

Os dois limonoides não possuem o anel furano formado, entretanto a proposta é iniciada com um limonoide da classe da havanesina, ocorrendo uma O-Acetilação nas posições C-1 e C-3, O-Tigloilação em C-7, a formação do epóxido no anel D e a oxidação em C-12. A clivagem da ligação carbono-carbono no anel C é assistida pela abertura do epóxido no anel D. O giro no eixo da ligação C-8/14 possibilita que a hidroxila em C-15 faça um ataque nucleofílico ao carbono do aldeído levando a formação do hemiacetal. Posteriormente, a posição C-6 é oxidada e O-Acetilada.

A posição C-28 é oxidada, após a protonação do grupo O-Acetila em C-6, temos a saída desse grupo e o fechamento do anel originando a ponte éter em C-6/28, formando o limonoide **06**. Após a oxidação da posição C-2 ocorre uma O-Acetilação na mesma posição para formar o limonoide **12** (Figura 4.67).

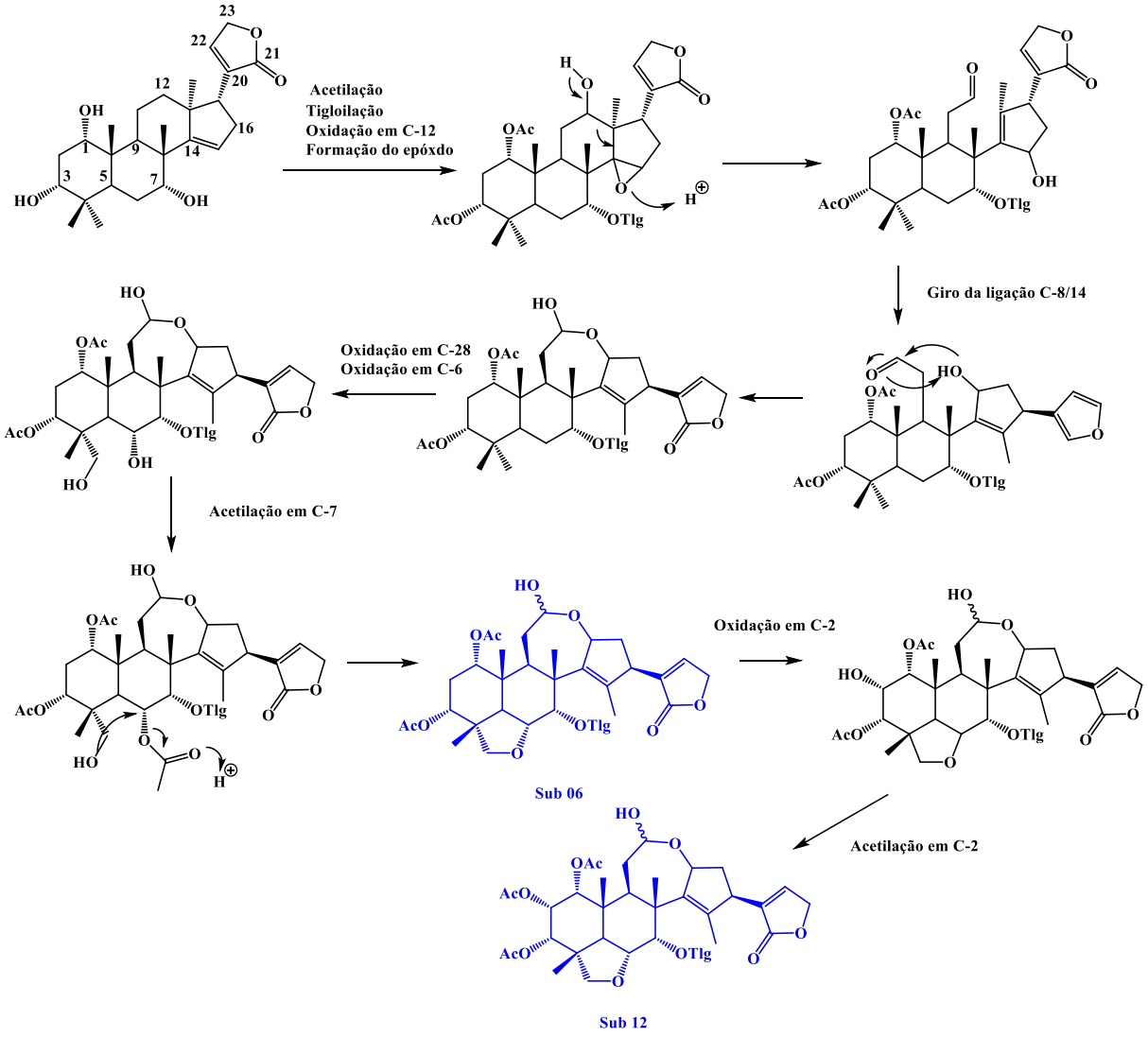


Figura 4.67 - Proposta de biogênese para o limonoide 06 e 12

A proposta de biogênese do norlimonoide 07 é iniciada de um precursor da classe vilasinina com os substituintes O-Tigloila em C-1 e O-Acetila em C-3. Na posição C-29 sucessivas oxidações ocorrem até a formação de um ácido carboxílico o qual é esterificado. A posição C-12 é oxidada e um epóxido é formado no anel D.

A clivagem da ligação carbono-carbono do anel C assistida pela abertura do epóxido no anel D geram um aldeído em C-12 e um álcool em C-15. Um epóxido é formado na posição C-20/21, a abertura desse epóxido possibilita o fechamento do anel entre a hidroxila em C-15 e o carbono C-21. Uma oxidação ocorre na ligação dupla em C-13 originando outro epóxido.

Na estrutura putativa do limonoide formado ocorre uma oxidação em C-11, conseguinte uma descarboxilação eliminando o carbono da posição C-12 em forma de CO_2, originando uma estrutura de um pentanortriterpeno. Duas oxidações ocorrem em C-11 levando a formação de um ácido carboxílico.

A abertura do epóxido em C-13/14 possibilitou o fechamento intramolecular do anel C, formando um éter entre o C-7 e o C-13. Uma esterificação ocorre com o ataque dos pares de elétrons da hidroxila em C-14 ao carbono da carboxila C-11, como resultado tem-se a formação do norlimonoide **07**. (Figura 4.68)

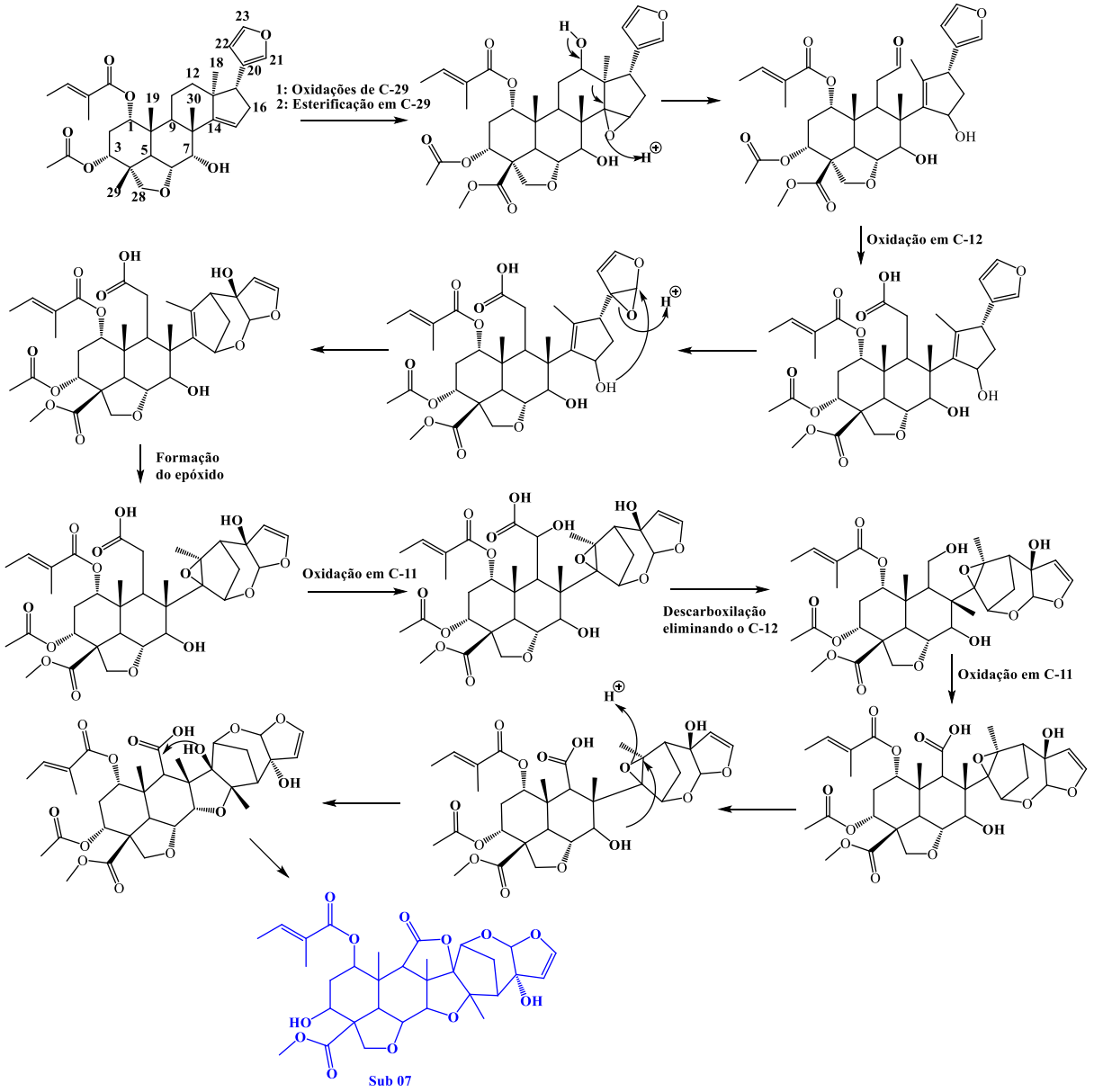


Figura 4.68 - Proposta de biogênese para o limonoide 07

A proposta de biogênese para os limonoide **08** e **11**, os quais sofrem um rearranjo na molécula formando a ligação C-12/14, tem início na estrutura de um limonoide de anel intacto da classe vilasinina, para ambas estruturas, tem-se um grupo O-Tigloila em C-1 e um grupo O-Acetila em C-3. Duas oxidações ocorrem em C-12, primeiro a formação do álcool, conseguinte a formação da cetona. O rearranjo acontece com a abertura do anel D seguido de um rearranjo do tipo Wagner-Meerwein para formar a ligação C-12/14, com a saída de um H^+ da metila C-18 a dupla ligação exocíclica é formada.

Um epóxido é formado no anel furando para que o mesmo seja modificado por meio de um fechamento de anel intramolecular ocasionado pela formação da ligação entre o oxigênio da hidroxila C-15 com o carbono C-21, após o fechamento do anel tem-se a formação do limonoide **11**.

Os dados de ressonância nuclear obtidos para o limonoide **08** suportam a hipótese da ponte endoperóxido presente na molécula. A proposta de biogênese, a partir do limonoide **11**, a enzima abstrai um hidrogênio de algum resíduo de aminoácido, conseguinte a ligação dupla exocíclica abstrai o hidrogênio de forma radicalar formando um radical no carbono C-13, em seguida tem-se a formação da ligação com o peróxido coordenado ao Fe(III). Um hidrogênio é abstraído de outro resíduo de aminoácido, o qual se liga ao peróxido liberando o centro metálico, por fim ocorre o fechamento intramolecular do peróxido na carbonila em C-12, formando a ponte endoperóxido (Figura 4.69).

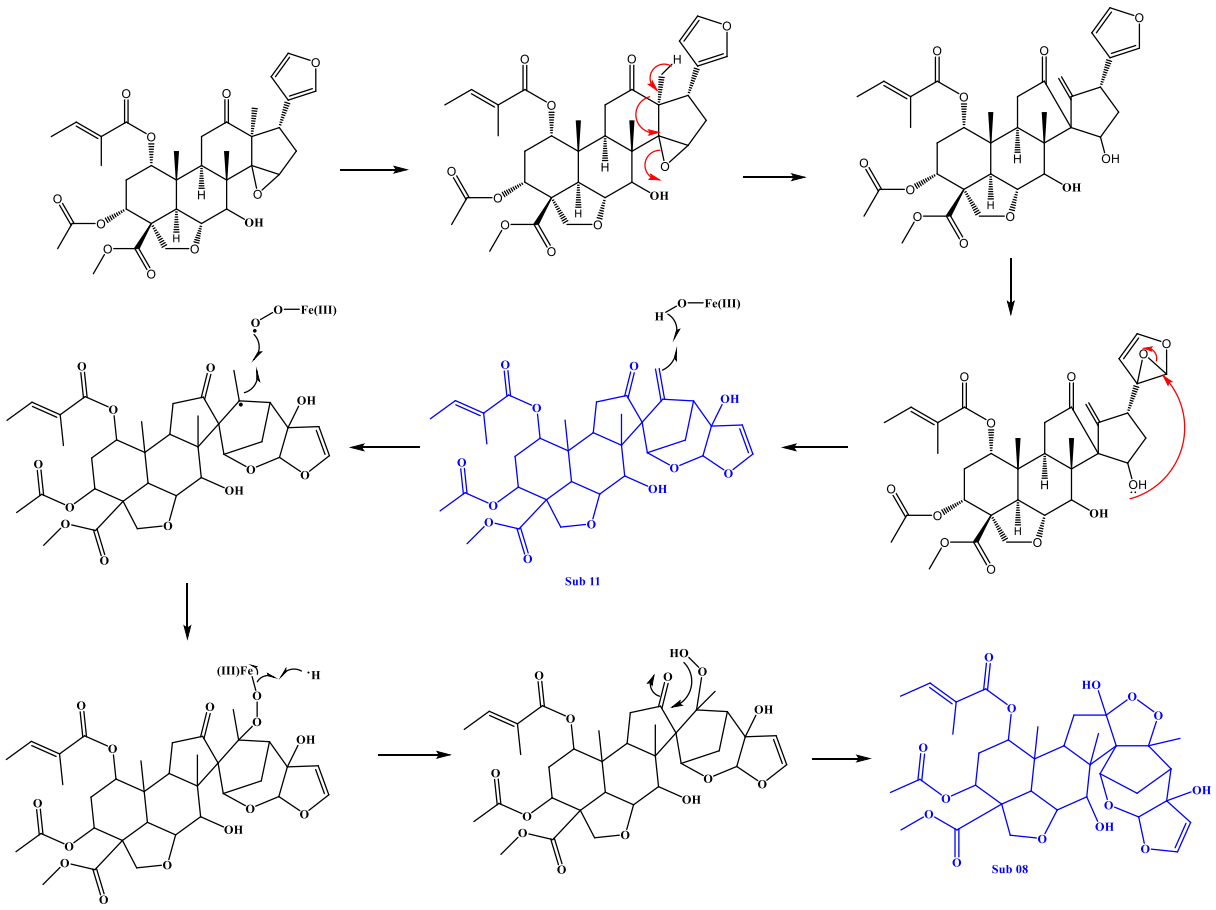


Figura 4.69 - Propostas de biogêneses para os limonoides 11 e 08

O limonoide **09** é da classe de anel intacto vilasinina, essa classe é originada a partir da havanesina. Uma O-Acetilação ocorre em C-1 e outra em C-3, a posição C-6 é oxidada e depois O-Acetilada, enquanto a posição C-28 é oxidada.

A protonação do grupo O-Acetil em C-6 faz com que haja a saído de CH_3COOH assistida com o fechamento do anel formando a ponte éter em C-6/28 (proposta descrita na biogênese do limonoide **06**). O carbono da posição C-12 é oxidado para um álcool e depois essa posição é O-Acetilada dando origem a limonoide **09** (Figura 4.70).

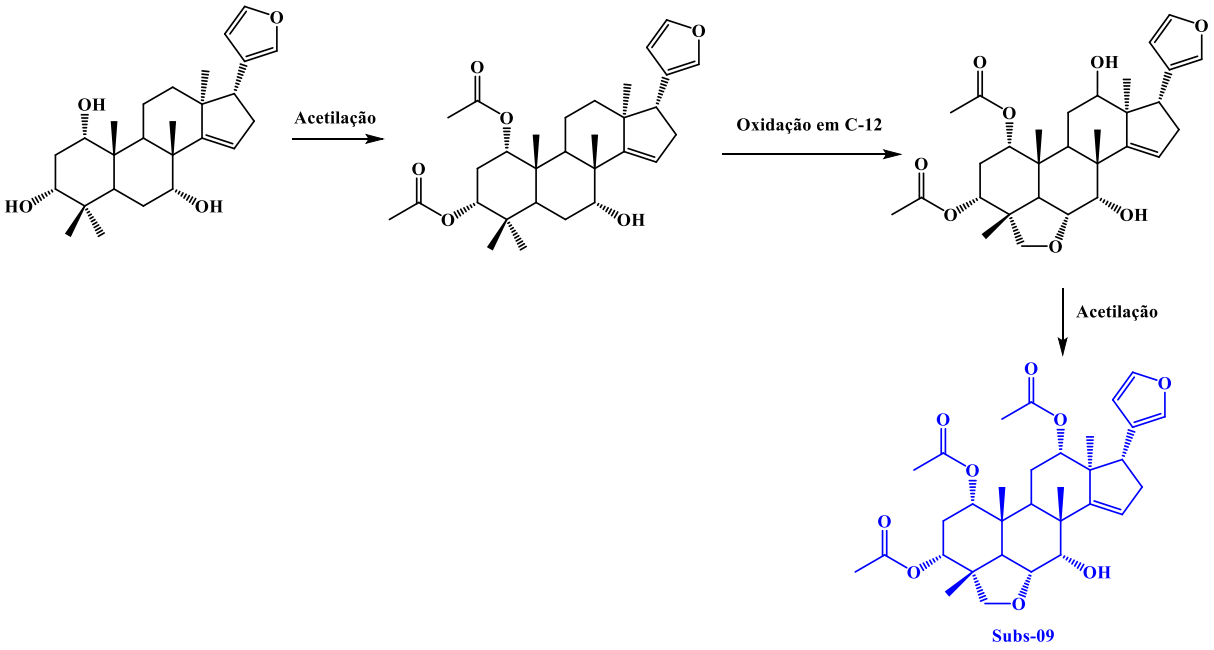


Figura 4.70 - Proposta de biogênese para o limonoide 09

O norlimonoide **10** tem sua origem de biogênese proposta em um limonoide da classe vilasinina com um grupo O-Tigloila em C-1 e O-Acetila em C-3, a posição C-29 é oxidada até a formação de um ácido carboxílico, o qual é esterificado. A oxidação em C-12 e a formação do epóxido em C-14/15 são etapas fundamentais para a abertura do anel C do limonoide, como já demonstrado anteriormente.

A modificação do anel furano é iniciada com a formação de um epóxido em C-20/21, o fechamento do anel intramolecular ocasionado pelo ataque dos pares de elétrons da hidroxila em C-15 ao carbono C-21 é assistido pela abertura do epóxido em C-20/21.

A epoxidação da ligação dupla em C-13/14, a oxidação em C-11 e a formação do ácido carboxílico em C-12, seguem o mesmo caminho de biogênese do norlimonoide **07**, até a descarboxilação em C-12, formando a estrutura putativa de um pentanortriterpeno, contudo, no norlimonoide **10** ocorre uma O-Acetilação em C-11 e a oxidação da metila C-30.

O grupo O-Acetila em C-11 é protonado facilitando a saída do mesmo, ocorrendo um fechamento de anel intramolecular formando a ponte éter em C-11/30, desse modo dando origem ao nortriterpeno **10** (Figura 4.71).

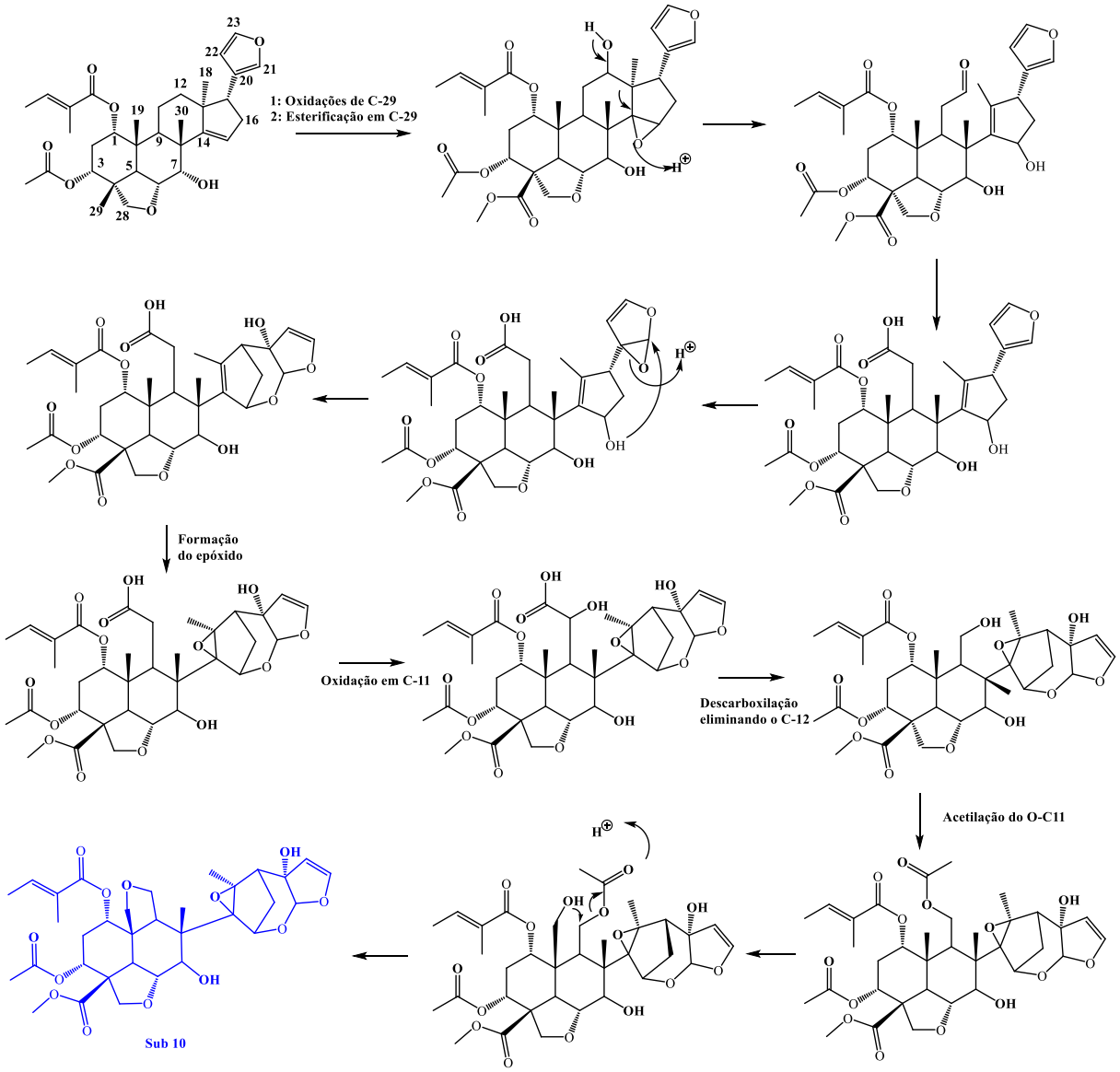


Figura 4.71 - Proposta de biogênese para o limonoide 10

O limonoide 13 possui em sua estrutura um rearranjo que forma a ligação entre o C-12 e o C-30, o precursor pode ser descrito sendo um limonoide da classe havanesina ou da classe vilasinina. Para o início da proposta de biogênese nos carbonos das posições C-1 e C-3 são encontrados grupos O-Acetila.

A abertura do anel C acontece devido a presença da hidroxila em C-12 e do epóxido em C-14/15, etapas similares as biogêneses anteriores. Após a abertura do anel C, um hidrogênio da metila C-30 é retirado de forma radicalar pela ação enzimática. O radical formado faz uma nova ligação com o carbono carbonílico do aldeído em C-12 deixando um radical no oxigênio. O oxigênio radicalar se liga ao carbono C-14, o qual está sob ligação dupla, após formar a ligação o radical que ficaria sob o carbono C-13 faz uma ligação com uma hidroxila ligada ao ferro, um substituinte O-Tigloila é ligado a hidroxila da posição C-15 dando origem ao limonoide **13** (Figura 4.72).

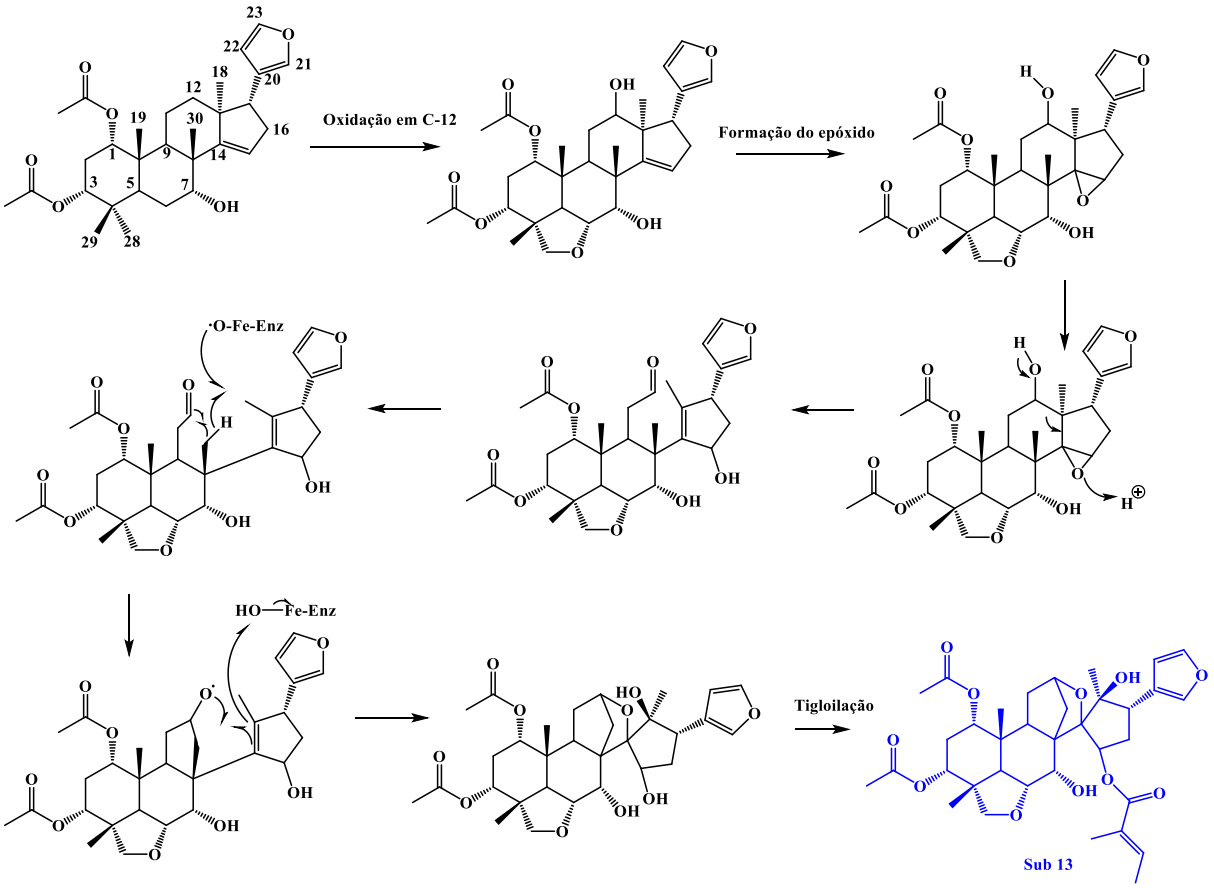


Figura 4.72 - Proposta de biogênese para o limonoide 13

4.5 Proposta de fragmentação para os limonoides isolados

4.5.1 Limonoide 01

As análises por LC-MS/MS direcionaram as escolhas das frações do extrato AcOEt da raiz de *T. pallida* que continham um teor significativo de limonoide, os quais puderam ser isolados. Para entender um pouco mais sobre os tetranortriterpenos isolados durante essa pesquisa, foram propostos alguns mecanismos de fragmentações para os 13 metabólitos aqui descritos.

Os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos no modo positivo de ionização. Para o limonoide 01, o qual tem fórmula molecular $C_{35}H_{46}O_{10}$, foi observado o íon de *m/z* 649,2980 referente a molécula sodiada $[M+Na]^+$ com um erro de 1,38 ppm. (Figura 4.73)

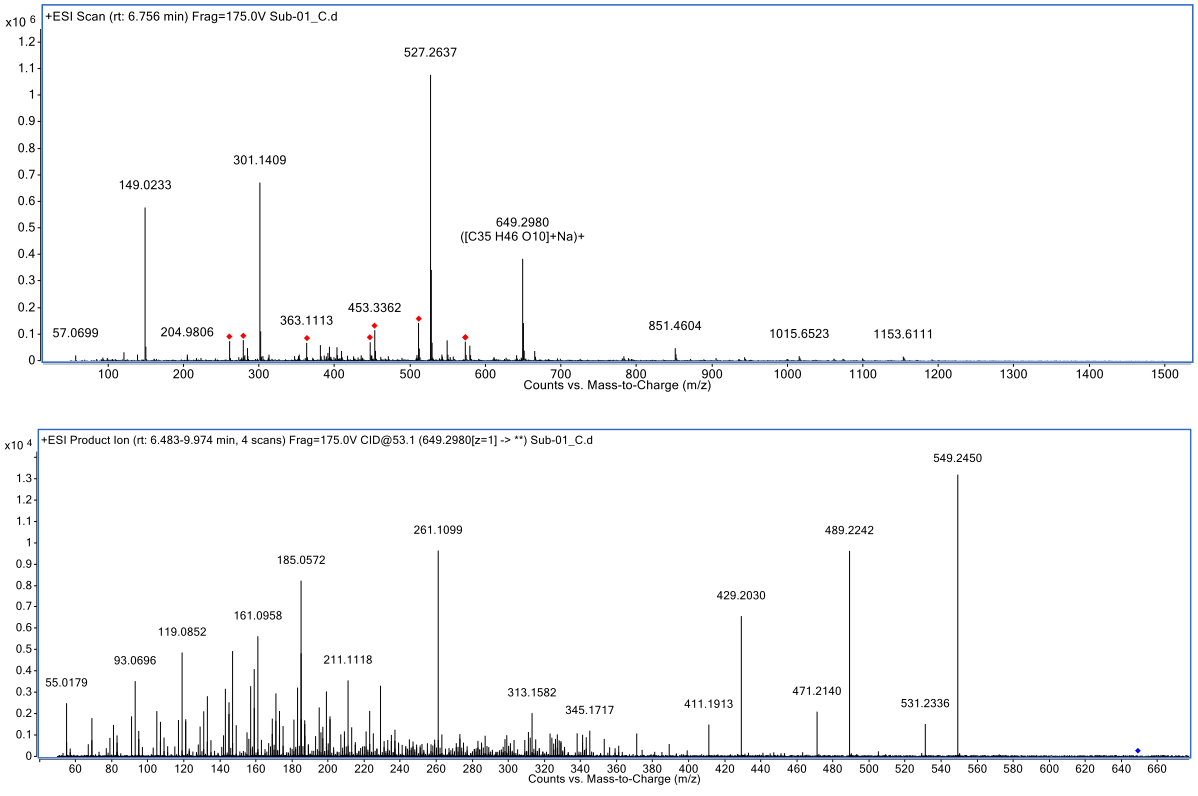


Figura 4.73 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 01

A fragmentação do íon molecular *m/z* 649,2980 em 53,1 eV gerou o íon base de *m/z* 549 [M+Na-ácido tíglico]$^+$, sucessivas perdas neutras ocorrem para formar os íons fragmentos *m/z* 531 [M+Na-ácido tíglico-H_2O]$^+$, *m/z* 471 [M+Na-ácido tíglico-H_2O-AcOH]$^+$ e *m/z* 429 [M+Na-ácido tíglico-H_2O-AcOH-CH_2CO]$^+$. A fragmentação do íon *m/z* 549 gerou o íon fragmento *m/z* 489 [M+Na-ácido tíglico-AcOH]$^+$. (Figura 4.74)

O íon precursor de *m/z* 649 pode sofrer uma fragmentação que lembra uma Retro-Dials-Alder (RDA) no anel C dando origem ao íon fragmento *m/z* 185 [M+Na-$C_{25}H_{36}O_8$]$^+$. (Figura 4.72)

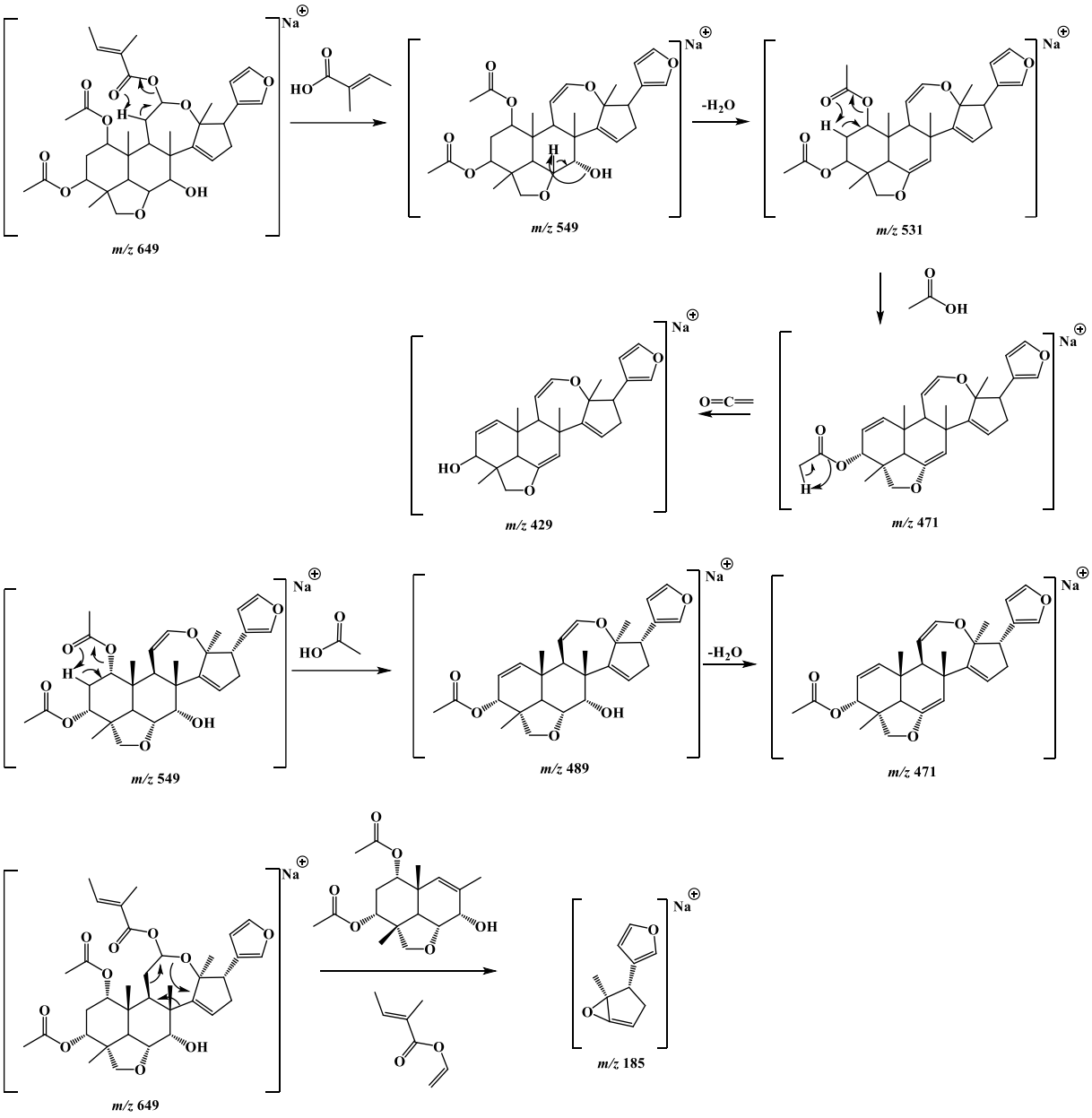


Figura 4.74 - Proposta de fragmentação para o limonoide 01

Atribuiu-se uma perda neutra de H_2O ao íon de *m/z* 429 para formar o íon fragmento *m/z* 411 [M+Na-ácido tíglico-2H_2O-AcOH-CH_2CO]. Para o íon fragmento *m/z* 489 foi proposto uma fragmentação similar a uma RDA no anel C, conseguinte outro RDA no que seria o anel B do limonoide para formar o íon fragmento *m/z* 261 [M+Na-ácido tíglico-AcOH-$C_{15}H_{16}O_2$]$^+$. Foi proposta uma fragmentação com migração de carga no íon fragmento *m/z* 471 perdendo o grupo acetato coordenado ao centro metálico Na(I). O grupo acetato possui uma carga

negativa e o sódio uma carga positiva, ou seja, tem-se uma perda neutra deixando um carbocátion na molécula. Uma RDA ocorre no anel B formando o íon fragmento *m/z* 161 $[M\text{-}Na\text{-}C_{17}H_{19}O_4]^+$. (Figura 4.75)

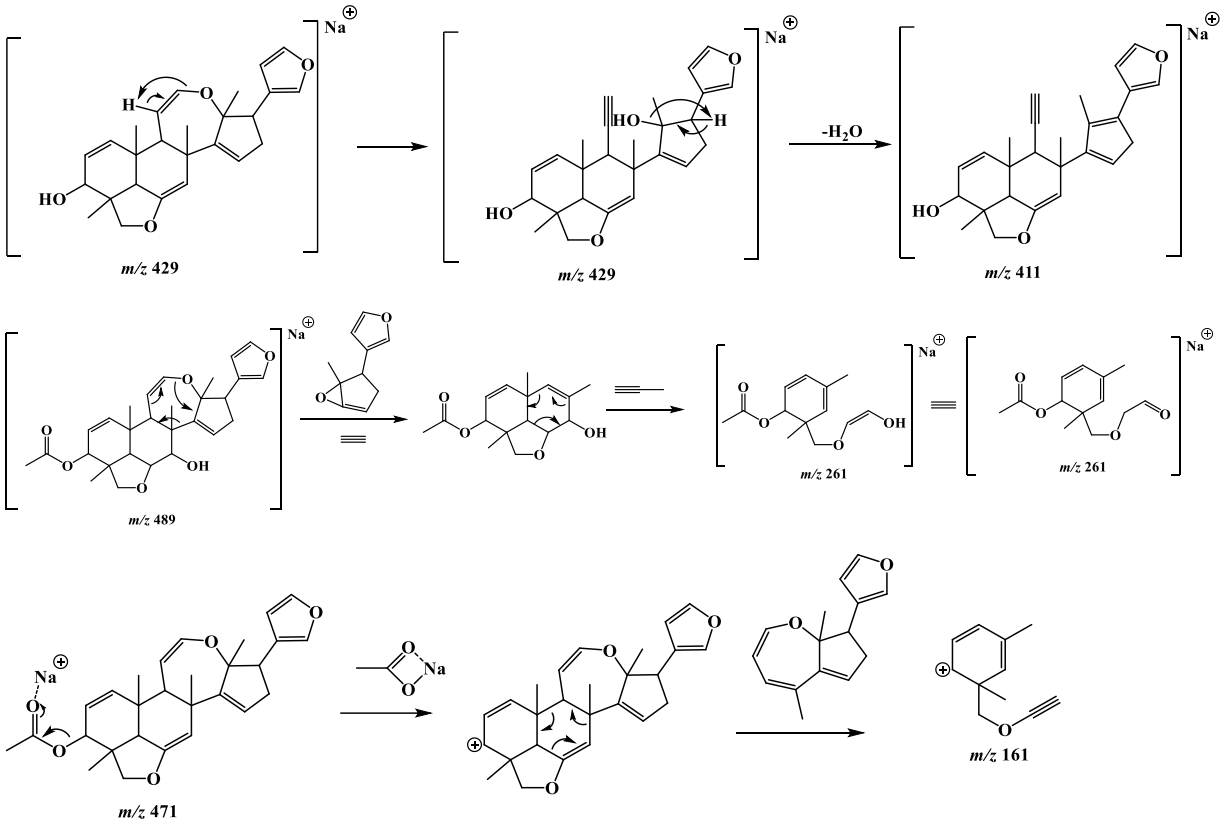


Figura 4.75 - Proposta de fragmentação para o limonoide 01

No espectro de MS/MS do íon *m/z* 649,2980 referente ao limonoide 01 foram observados dois íons diagnósticos, *m/z* 147 e *m/z* 119, a proposta para a formação desses íons passa por uma fragmentação com migração de carga no íon fragmento *m/z* 471, perdendo CH_3COONa, o carbocátion formado migra até o anel D, concomitante a uma isomerização da ligação dupla e a perda de metano. A formação do enol gera o íon fragmento de *m/z* 147, entretanto foi considerado a tautomerização do enol para cetona, conseguinte a conjugação do carbocátion com a ligação dupla, favorecendo a perde de -CO e formando o íon fragmento de *m/z* 119. (Figura 4.76)

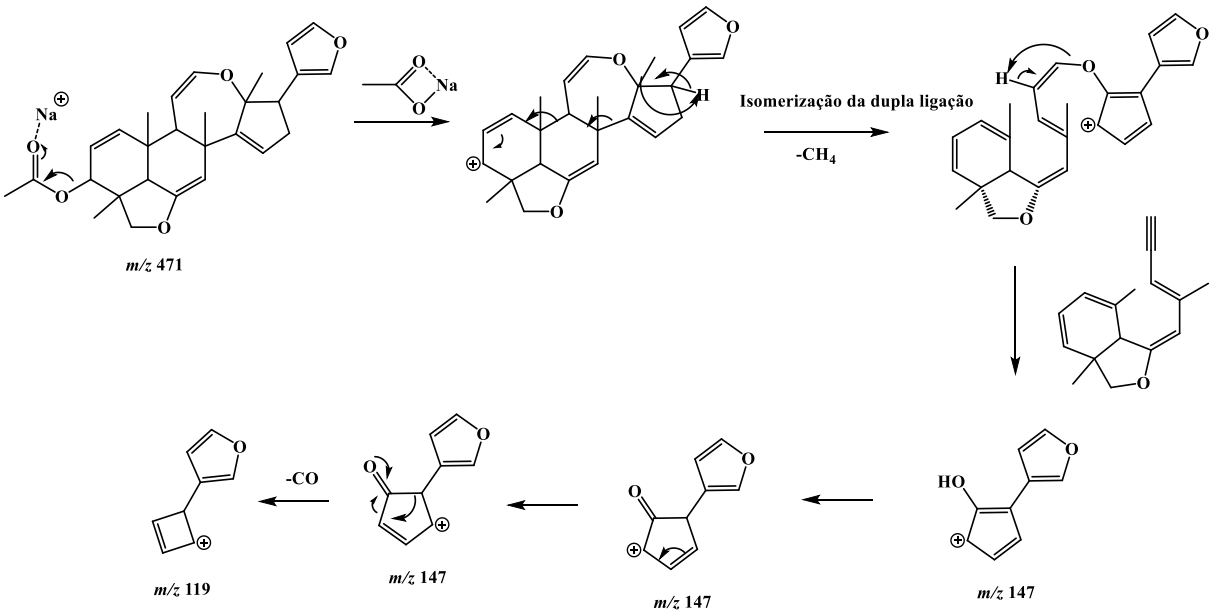


Figura 4.76 - Proposta de fragmentação para o limonoide 01

4.5.2 Limonoide 02

O limonoide 02 apresentou o íon molecular referente ao aduto de sódio de *m/z* 623,2832 $[M+Na]^+$ com um erro de 1,12 ppm considerando a fórmula molecular de $C_{33}H_{44}O_{10}$. O íon m/z 623,2832 foi fragmentado na célula de colisão e seu espectro de MS/MS é apresentado na (Figura 4.77), os íons fragmentos não tiveram uma alta intensidade, porém foi possível propor alguns mecanismos de fragmentação.

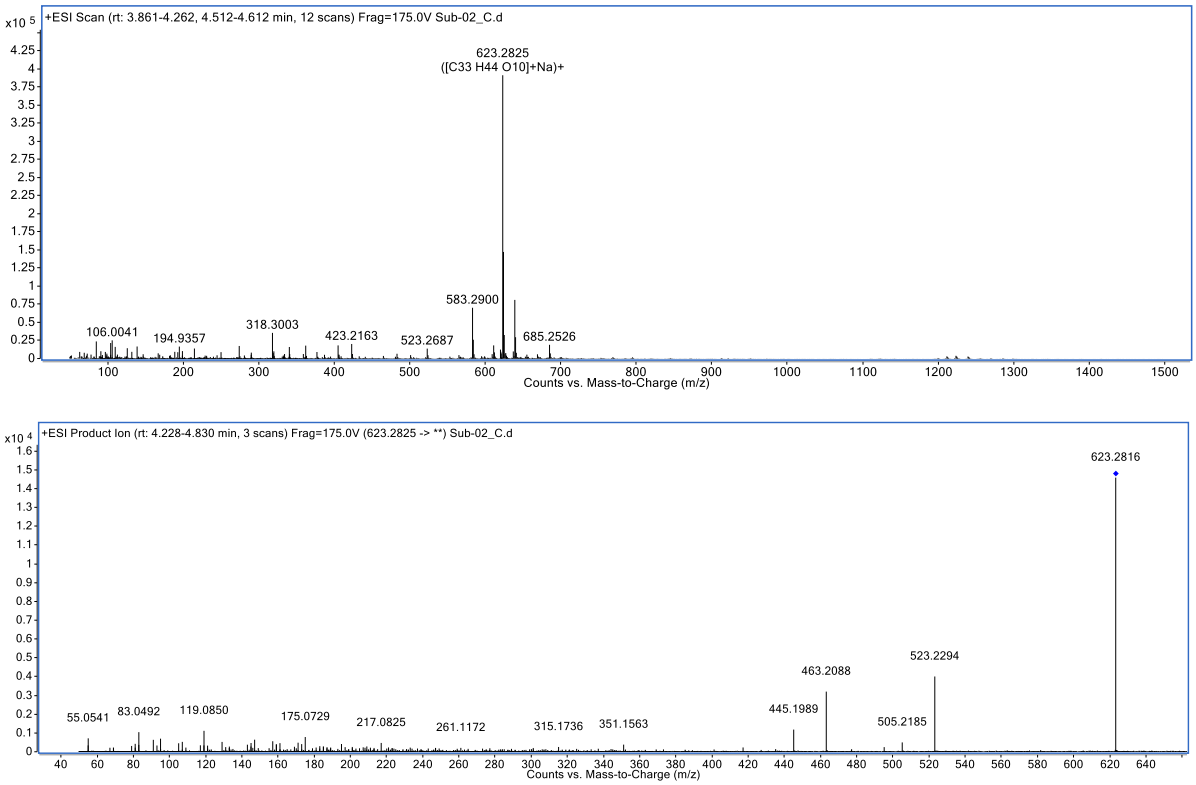


Figura 4.77 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 02

A perda neutra de ácido tíglico forma íon fragmento *m/z* 523 [M+Na-ácido tíglico]$^+$, do qual há uma eliminação de H_2O originando o íon fragmento *m/z* 505 [M+Na-ácido tíglico-H_2O]$^+$. O substituinte equivalente ao ácido acético é eliminado para formar o íon fragmento *m/z* 445 [M+Na-ácido tíglico-H_2O-CH_3COOH]$^+$. O íon fragmento *m/z* 463 [M+Na-ácido tíglico-CH_3COOH]$^+$ pode ser formado após a eliminação de CH_3COOH (60,02 Da) do íon *m/z* 523. (Figura 4.78)

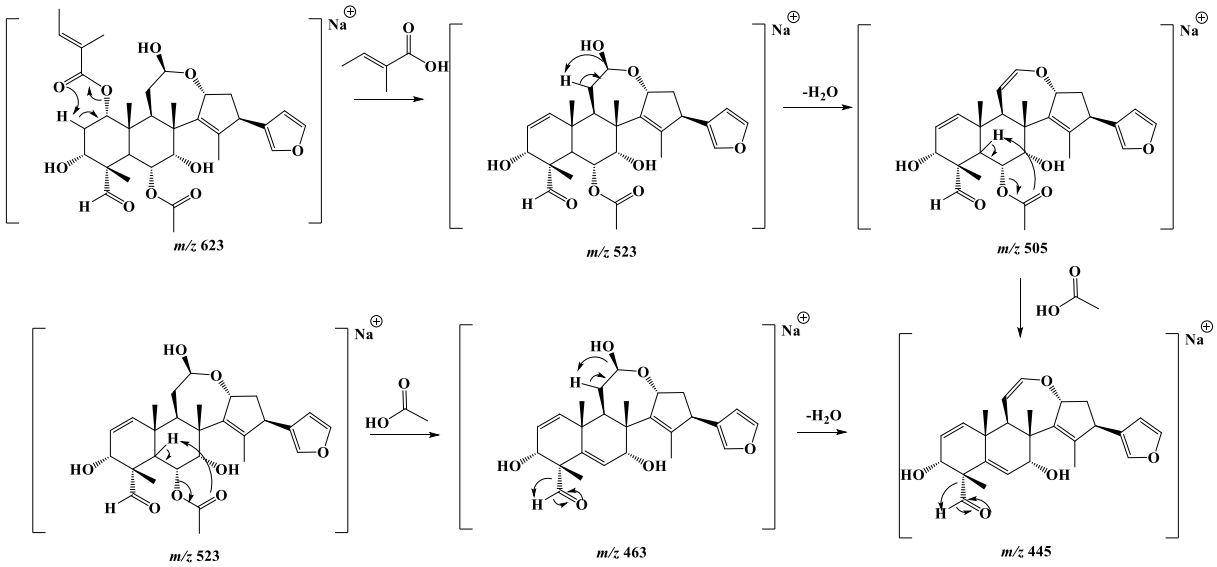


Figura 4.78 - Proposta de fragmentação para o limonoide 02

A formação do íon fragmento *m/z* 261 tem início na saída do grupo O-acetil da posição C-6 na forma de ácido acético formando a ligação dupla em C-5/C-6, uma RDA acontece no anel B, duas eliminações de -CO acontecem até a formação do íon fragmento *m/z* 261. (Figura 4.79)

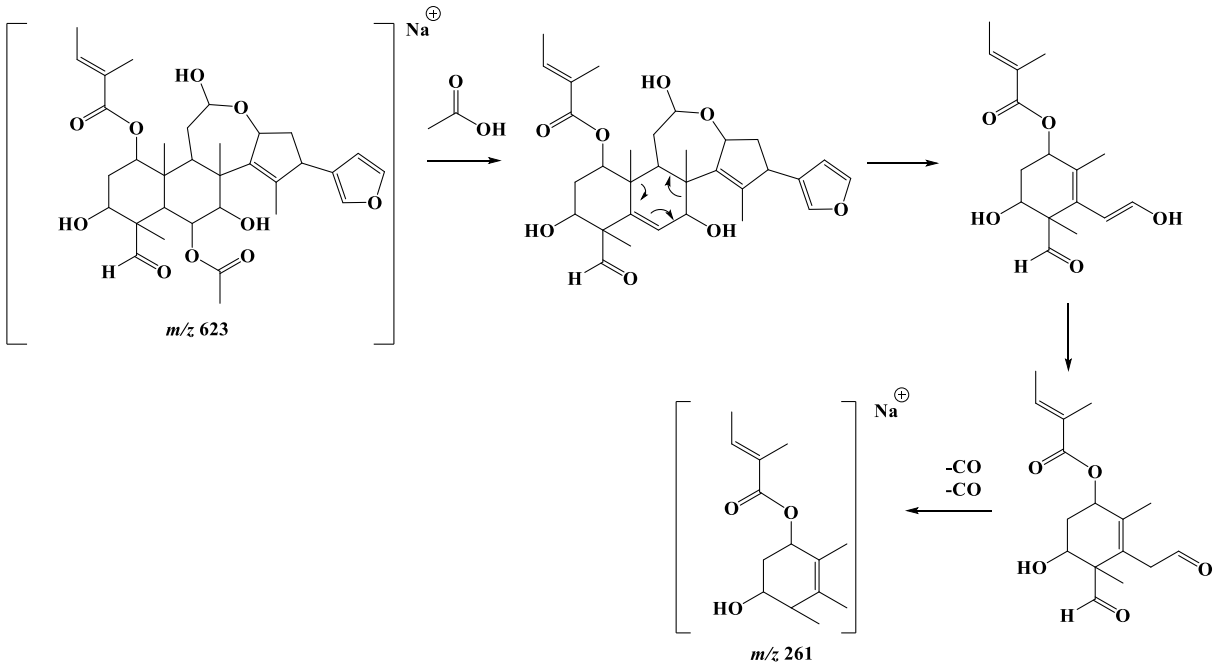


Figura 4.79 - Proposta de fragmentação para o limonoide 02

O mecanismo de fragmentação que origina os íons fragmentos *m/z* 147 e *m/z* 119 tem início com uma fragmentação com migração de carga deixando um carbocátion na molécula, essa carga migra até o anel D, conseguinte uma fragmentação semelhante a RDA ocorre no anel C formando o íon fragmento *m/z* 147, no qual ocorre uma eliminação de CO para formar o íon fragmento *m/z* 119. (Figura 4.80)

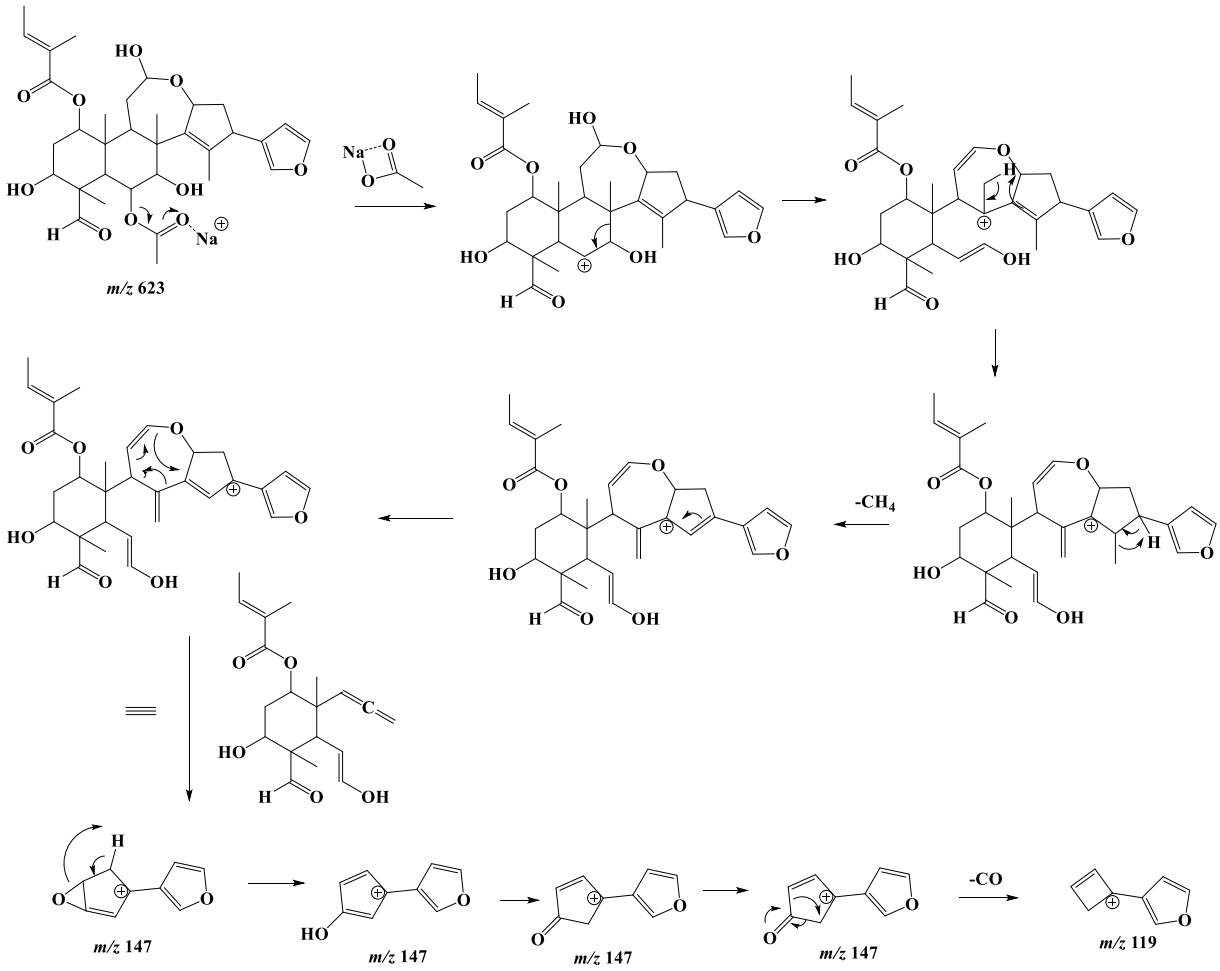


Figura 4.80 - Proposta de fragmentação para o limonoide 02

4.5.3 Limonoide 03

O limonoide 03 possui fórmula molecular de $C_{35}H_{46}O_{11}$, no espectro de MS no modo positivo de ionização foi observado o íon molecular *m/z* 665,2937 referente ao limonoide sodiado $[M+Na]^+$ com um erro de massa de 0,15 ppm

(Figura 4.81). Esse íon foi fragmentado na célula de colisão gerando alguns íons fragmentos oriundos de sucessivas perdas neutras.

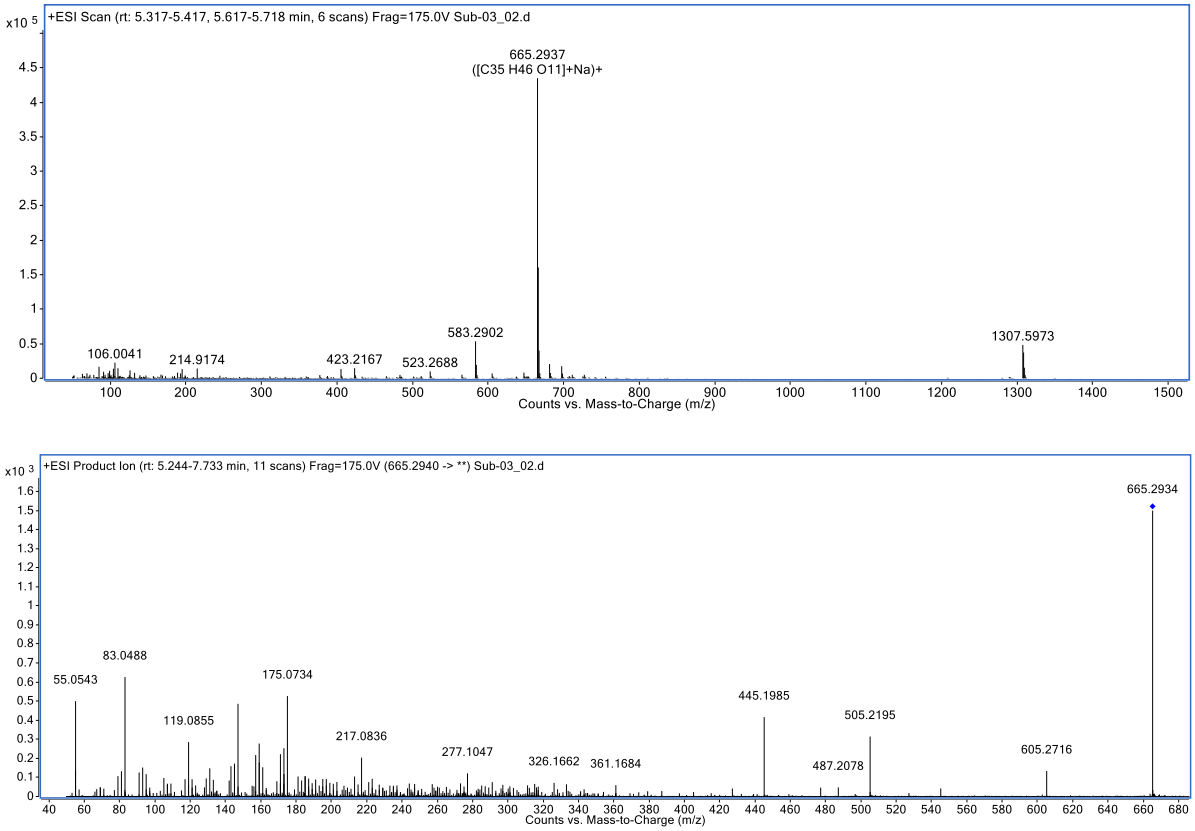


Figura 4.81 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 03

O íon precursor *m/z* 665 $[M+Na]^+$ tem a perda de 60,02 Da, valor em massa condizente para a eliminação de ácido acético, com isso tem-se a formação do íon fragmento *m/z* 605 $[M+Na-CH_3COOH]^+$, uma segunda eliminação de ácido acético ocorre para originar o íon fragmento *m/z* 545 $[M+Na-2CH_3COOH]^+$, com a saída de ácido tíglico é formado íon fragmento m/z 445 $[M+Na-2CH_3COOH$-ácido tíglico$]^+$ (Figura 4.82).

A fragmentação do íon *m/z* 605 eliminando apenas o ácido tíglico dar origem ao íon fragmento *m/z* 505, o qual fragmenta eliminando ácido acético para formar o íon fragmento *m/z* 445 (Figura 4.82).

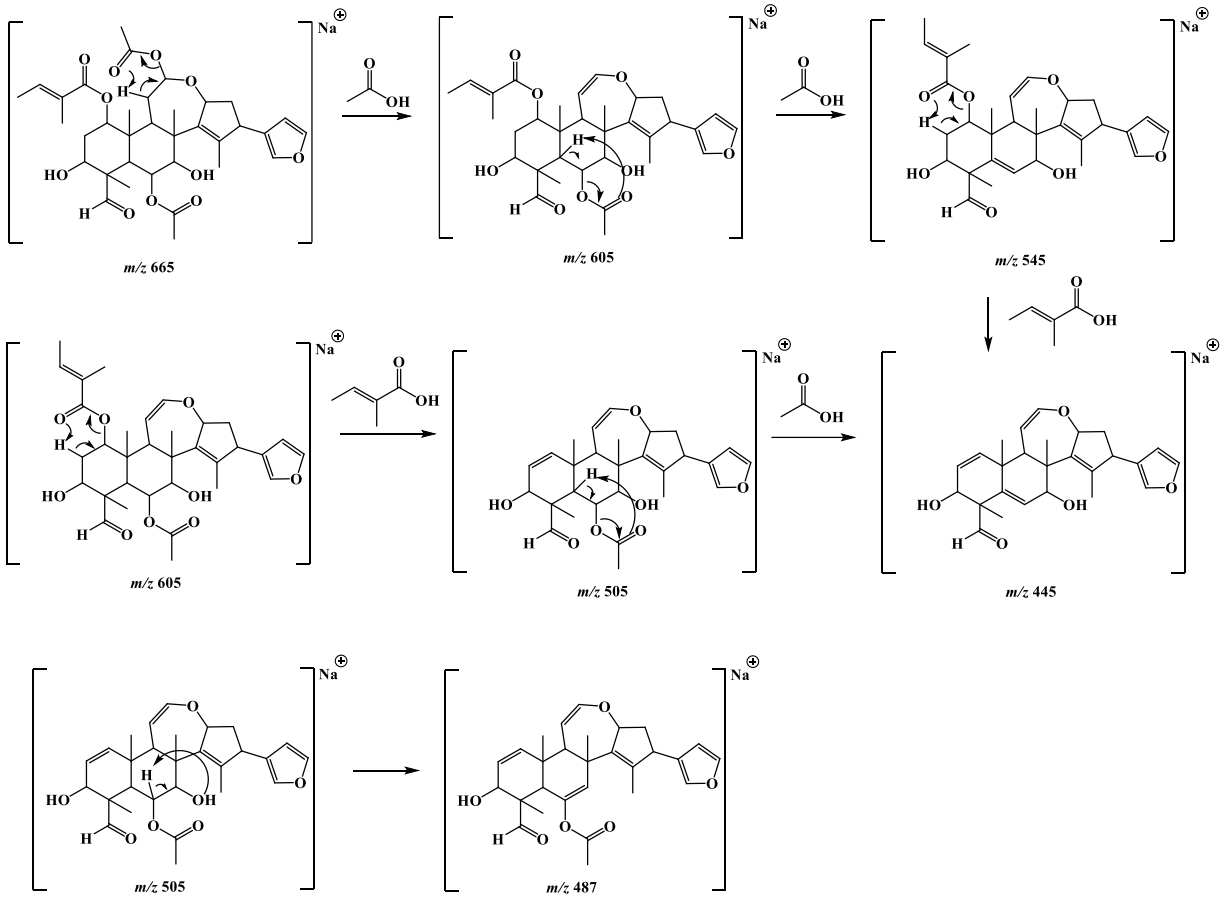


Figura 4.82 - Proposta de fragmentação para o limonoide 03

A proposta de fragmentação para a formação dos íons fragmentos *m/z* 147 e *m/z* 119 é iniciada com uma fragmentação com migração de carga no íon *m/z* 505, foi sugerida uma migração da carga até o anel D concomitante a uma eliminação de metano, a fragmentação de tipo RDA ocorre no anel C para formar o íon fragmento *m/z* 147 e com eliminação de CO tem-se a formação do íon fragmento *m/z* 119 (Figura 4.83).

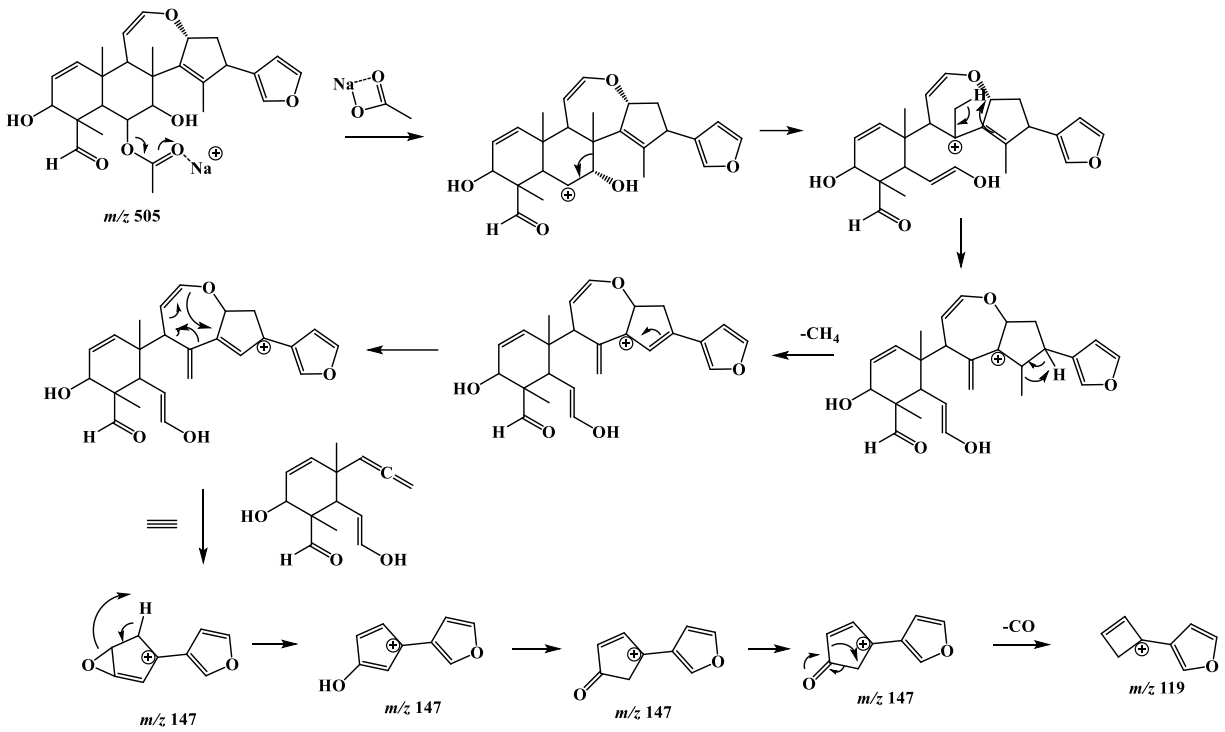


Figura 4.83 - Proposta de fragmentação para o limonoide 03

4.5.4 Limonoide 04

O limonoide 04 apresentou o íon molecular referente a molécula sodiada com valor de *m/z* 707,3037 $[M+Na]^+$ com um erro de 0,85 ppm considerando a fórmula molecular de $C_{35}H_{46}O_{11}$. O espectro de MS/MS está apresentado na (Figura 4.84), para alguns íons fragmentos presentes foi proposto o mecanismo de fragmentação.

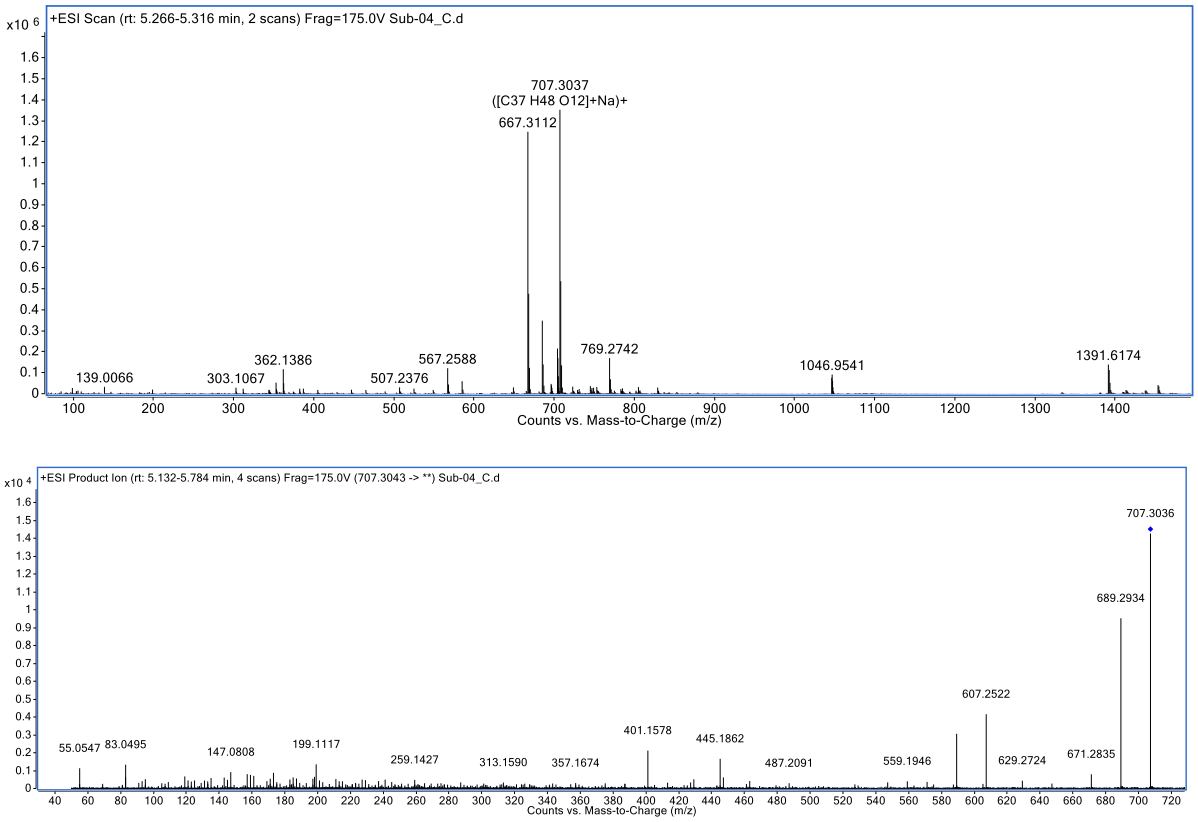


Figura 4.84 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 04

A eliminação de H_2O do íon precursor m/z 707 $[M+Na]^+$ gera o íon fragmento m/z 689 $[M+Na-H_2O]^+$ e uma perda de ácido acético forma o íon fragmento m/z 629 $[M+Na-H_2O$-ácido acético$]^+$. A saída de ácido tíglico do íon precursor m/z 707 ocasiona a formação do íon fragmento 607, do qual uma fragmentação de H_2O acarreta no íon fragmento m/z 589. (Figura 4.85)

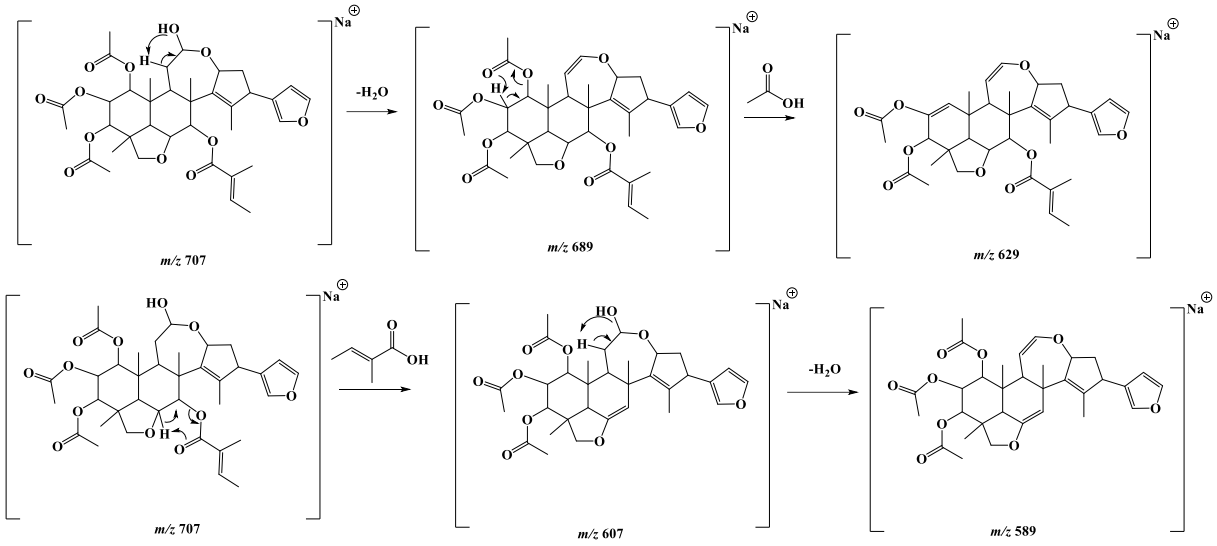


Figura 4.85 - Proposta de fragmentação para o limonoide 04

A abertura do anel hemiacetal no íon *m/z* 707 possibilita que após a fragmentação da porção da molécula que se refere ao anel D e anel furano haja o aparecimento do íon fragmento *m/z* 445, desse íon foi sugerido a formação do *m/z* 401, íon fragmento gerado após a perde de CH_3COH. Uma segunda proposta para a formação do íon *m/z* 401 é sugerido com uma fragmentação do tipo RDA no anel C, conseguinte a fragmentação de ácido tíglico. (Figura 4.86)

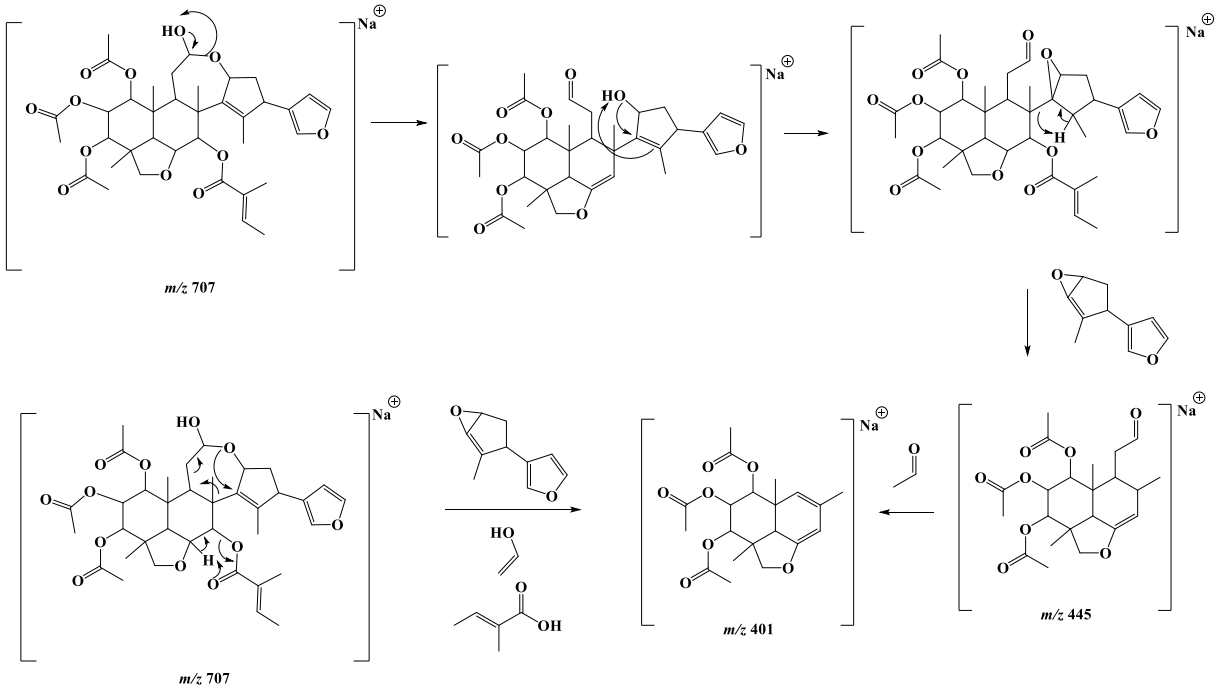


Figura 4.86 - Proposta de fragmentação para o limonoide 04

O mecanismo proposto para a formação do íon fragmento *m/z* 147 e *m/z* 119 tem que se considerada a fragmentação com a migração de carga, porém para esse limonoide tem-se o tiglato coordenado ao Na(I), a perda desse fragmento neutro possibilita outras migrações de carga. Após uma eliminação de CH_4 e uma fragmentação do tipo RDA o íon fragmento *m/z* 147 é gerado, desse íon uma eliminação de CO acontece para a formação do íon fragmento *m/z* 119 (Figura 4.87).

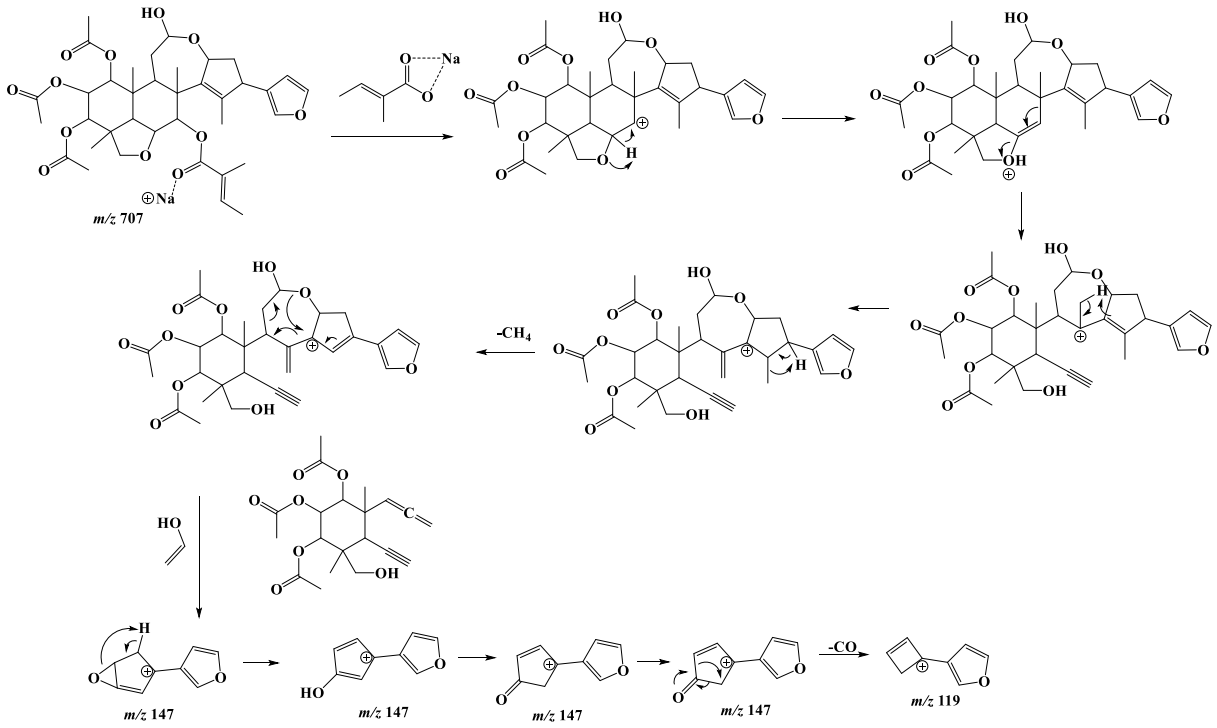


Figura 4.87 - Proposta de fragmentação para o limonoide 04

4.5.5 Limonoide 05

O limonoide 05 possui fórmula molecular de $C_{36}H_{46}O_{13}$, no espectro de MS foi observado o íon molecular de *m/z* 709,2835 referente a molécula sodiada $[M+Na]^+$ (Figura 4.88). O espectro de MS/MS para esse limonoide A,B-*seco* apresentou poucos íons fragmentos.

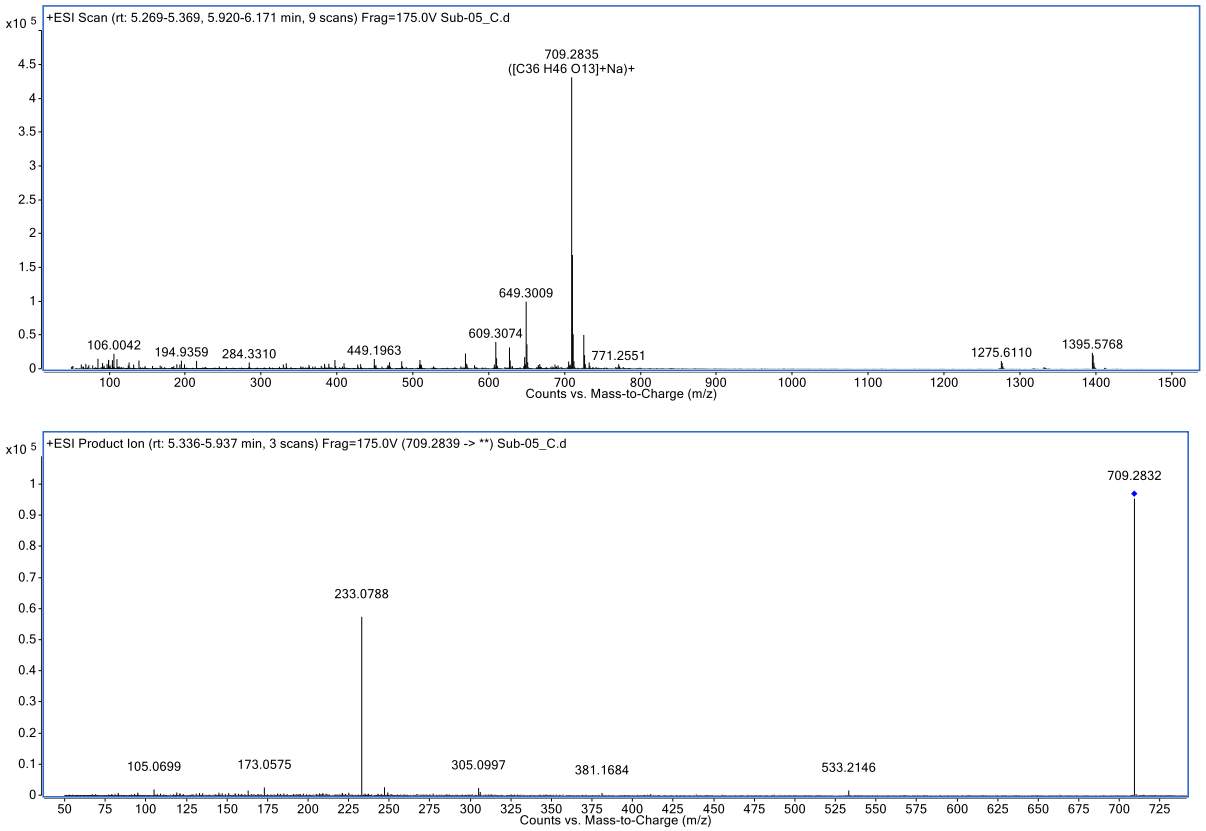


Figura 4.88 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 05

O íon precursor *m/z* 709 tem perda de CO e do ácido 2-hidroxi-3-metilpentonoico para gerar o íon fragmento *m/z* 533, a fragmentação que leva a saída dos anéis C, D e furano acarreta no aparecimento do íon fragmento *m/z* 305, desse íon pode ser eliminado formaldeído e CO para formar o íon fragmento m/z 247, conseguinte uma perde referente ao metanoato de metila leva o aparecimento do íon fragmento m/z 173. (Figura 4.89)

Uma segunda proposta para a formação do íon fragmento *m/z* 173 foi sugerida, com a eliminação de CO e CH_3CHO do íon *m/z* 305, formando o íon *m/z* 233, esse íon é fragmentado dando origem ao íon fragmento *m/z* 173, porém, desse íon ocorre uma RDA e o íon fragmento *m/z* 105 é originado (Figura 4.89).

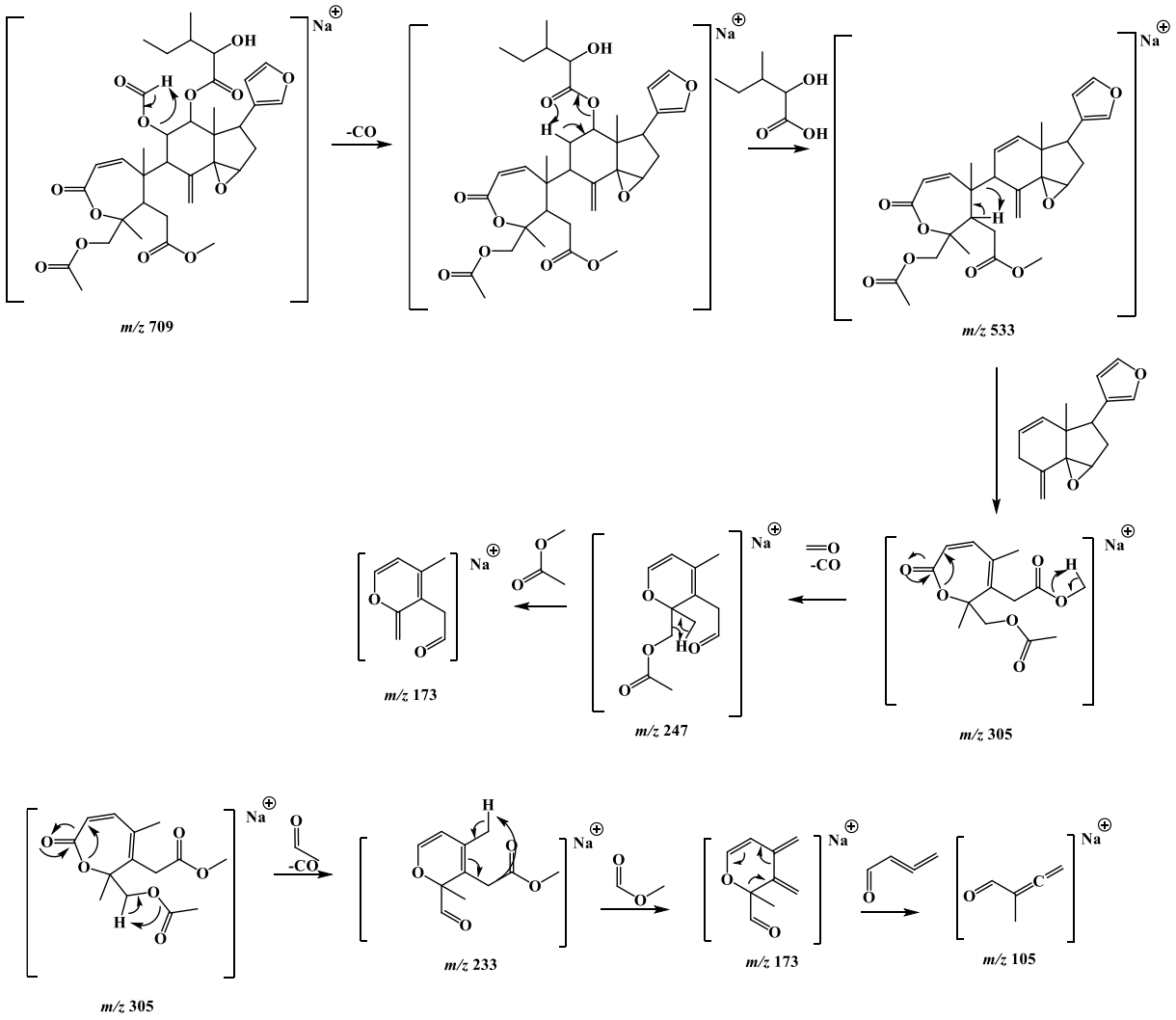


Figura 4.89 - Proposta de fragmentação para o limonoide 05

4.5.6 Limonoide 06

O íon molecular de *m/z* 665,2942 foi observado no espectro de MS do limonoide 06, esse íon aparece como um aduto de sódio e foi atribuído a molécula 12-oxi-chisonimbolinina G, o erro de massa de 0,60 ppm foi calculado para a fórmula molecular $C_{35}H_{46}O_{11}$ (Figura 4.90).

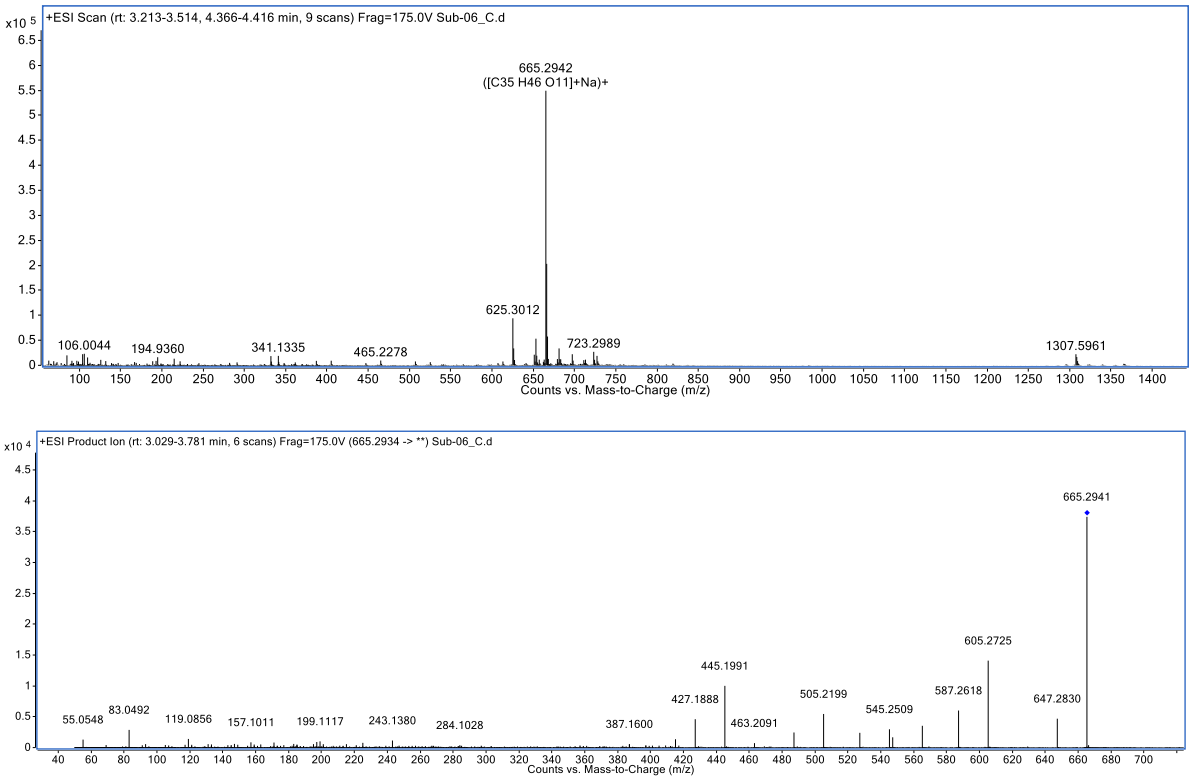


Figura 4.90 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 06

No espectro de MS/MS do íon molecular *m/z* 665 foram observadas perdas neutras que são condizentes com ácido acético (60,02 Da), ácido tíglico (100,05 Da), ceteno (42,01 Da) e H_2O (18,01 Da). O foi proposto o mecanismo de fragmentação para essas perdas, o íon fragmento de *m/z* 647 é formado após uma eliminação de H_2O do íon precursor *m/z* 665, a fragmentação de uma unidade de ácido acético do íon *m/z* 647 leva a formação do íon fragmento *m/z* 587, com a saída de ceteno tem-se a formação do íon fragmento *m/z* 545, uma segunda eliminação de H_2O gera o íon fragmento *m/z* 527 e com a saída de ácido tíglico o íon fragmento *m/z* 427 é formado. Do íon fragmento *m/z* 545 foi proposto a saída de ácido tíglico para formar o íon fragmento *m/z* 445 (Figura 4.91).

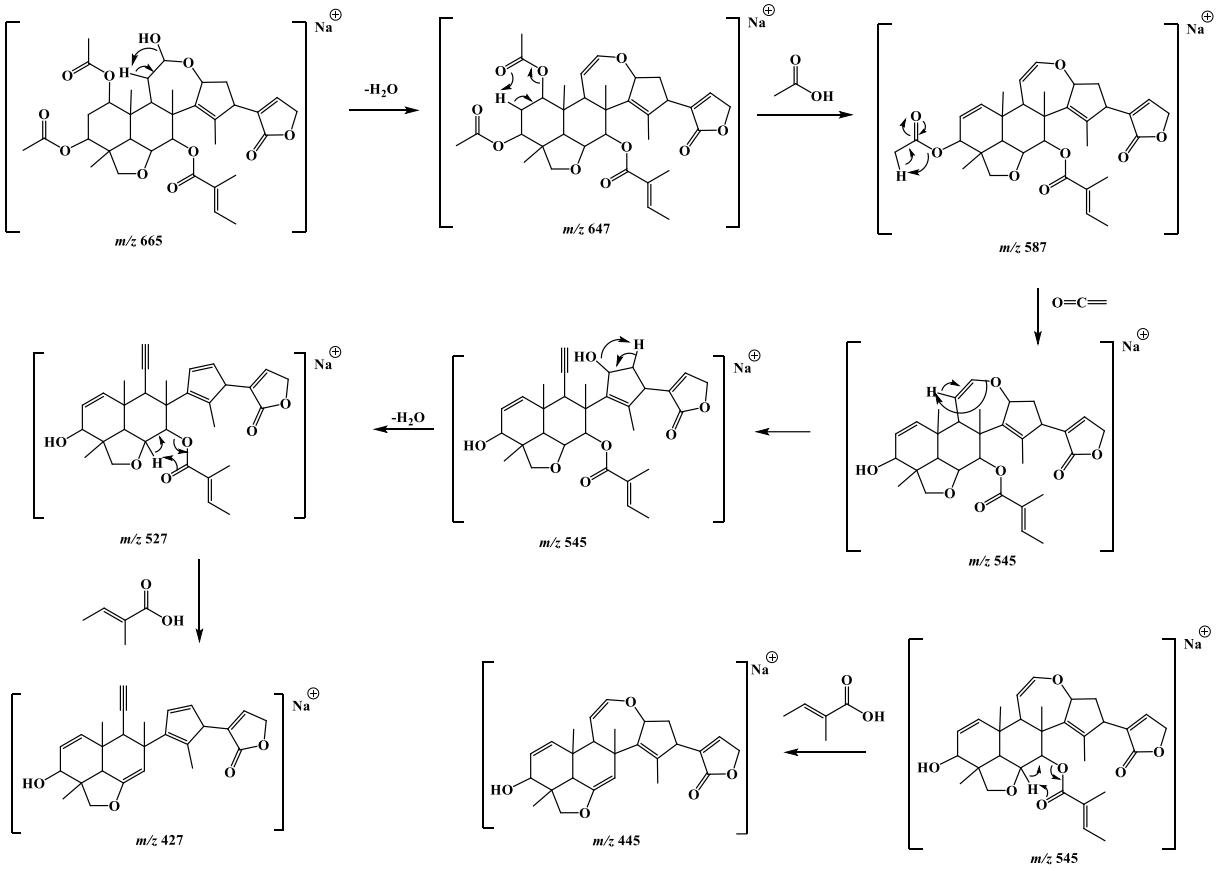


Figura 4.91 - Proposta de fragmentação para o limonoide 06

A formação do íon fragmento *m/z* 605 foi sugerida vindo da perda de ácido acético do íon *m/z* 665, com a eliminação de ácido tíglico do íon fragmento *m/z* 605 tem-se a aparecimento do íon fragmento *m/z* 505, desse íon uma eliminação de H_2O acontece para dar origem ao íon fragmento *m/z* 487, depois da saída de uma unidade de ceteno o íon fragmento *m/z* 445 pode ser formado. Do íon *m/z* 665 pode ocorrer primeiro a eliminação de ácido tíglico para originar o íon fragmento *m/z* 565, o qual após uma eliminação de ácido acético pode formar o íon fragmento *m/z* 505 (Figura 4.92).

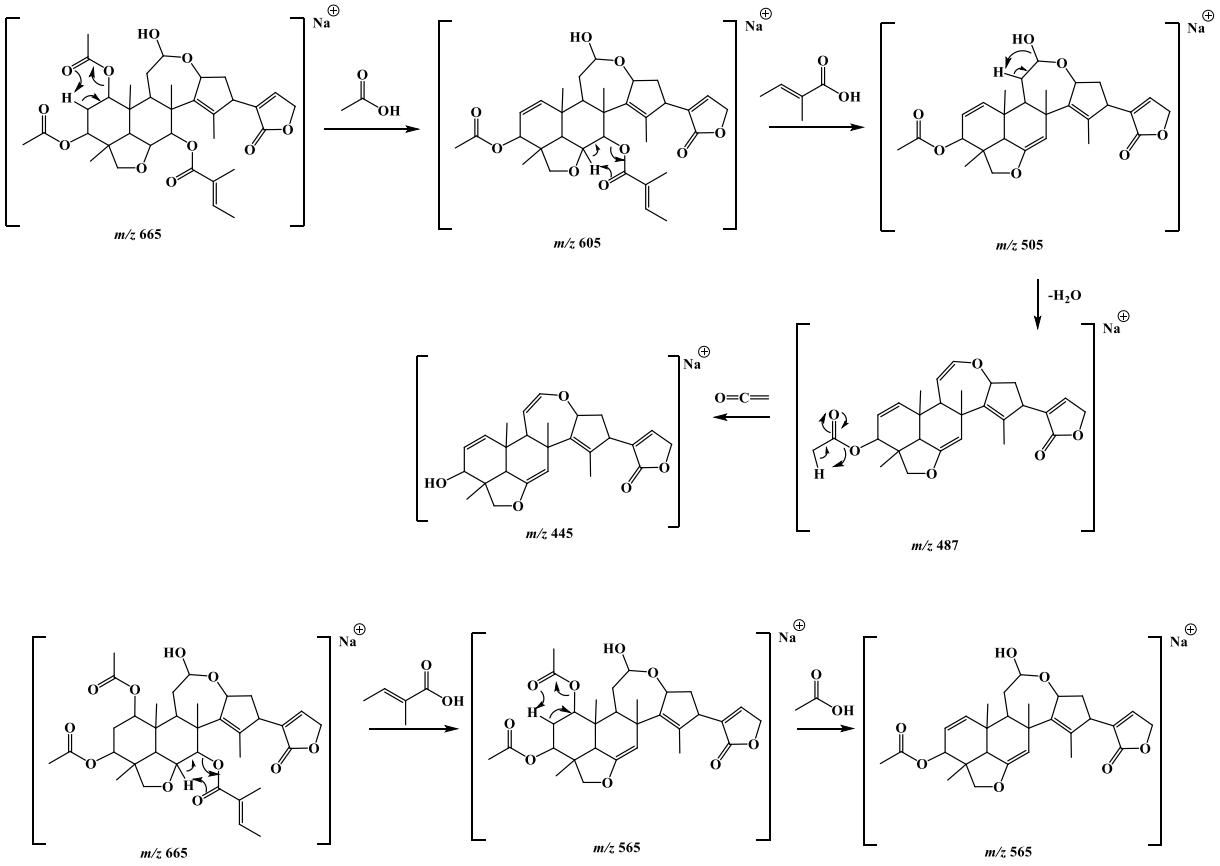


Figura 4.92 - Proposta de fragmentação para o limonoide 06

O limonoide 06 não tem a presença do anel furano, porém foi observado um íon diagnóstico de *m/z* 119 no espectro de MS/MS, a proposta de fragmentação que gera esse íon é iniciada com uma fragmentação com migração de carga eliminando o complexo tiglato coordenado ao centro metálico Na(I), outras migrações de carga acontecem na molécula para que se possa eliminar CH_4 levando a formação da dupla ligação no anel D na posição C-13. Uma fragmentação que lembra uma RDA acontece no anel C e uma eliminação de CO_2 leva a formação do íon fragmento *m/z* 119 (Figura 4.93).

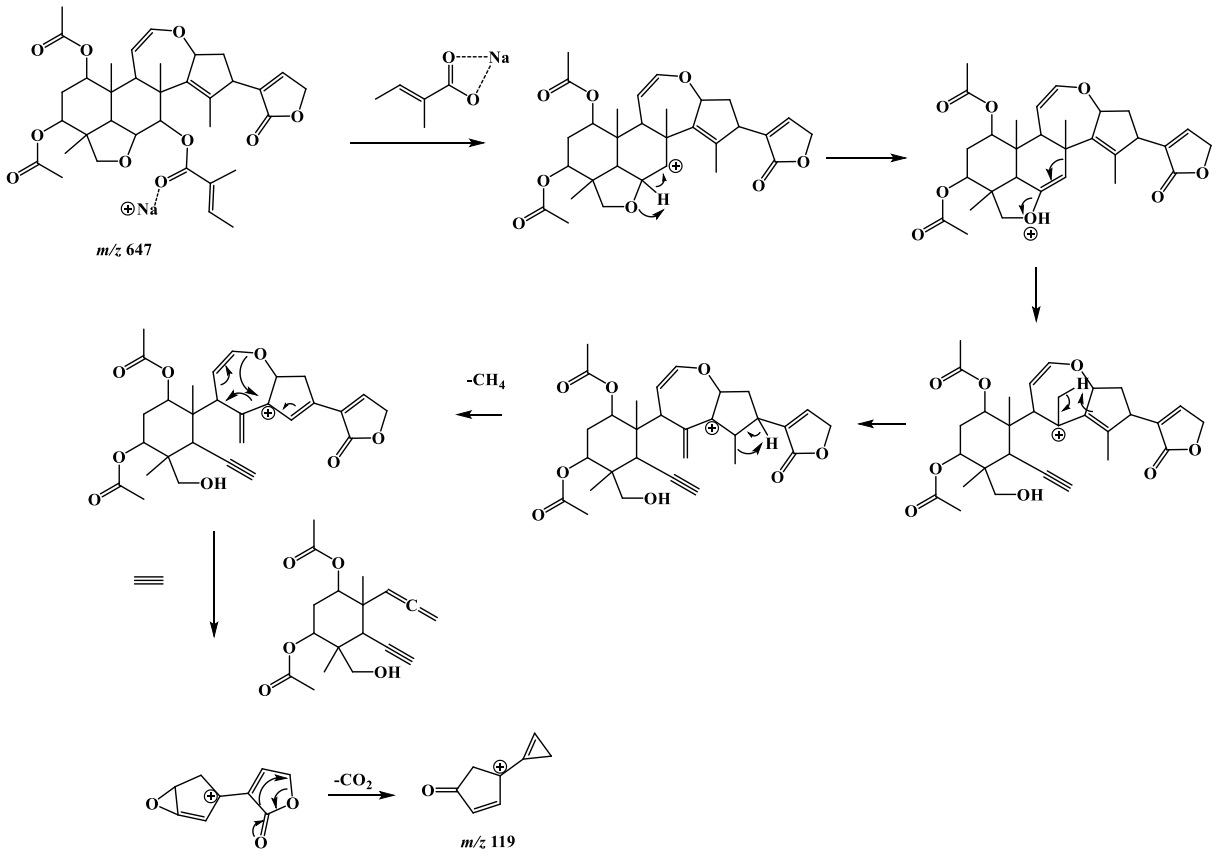


Figura 4.93 - Proposta de fragmentação para o limonoide 06

4.5.7 Norlimonoide 07

O norlimonoide 07 possui fórmula molecular $C_{31}H_{38}O_{12}$, no espectro de MS foi observado o íon molecular *m/z* 625,2267 $[M+Na]^+$ com um desvia de massa de 0,96 ppm (Figura 4.94).

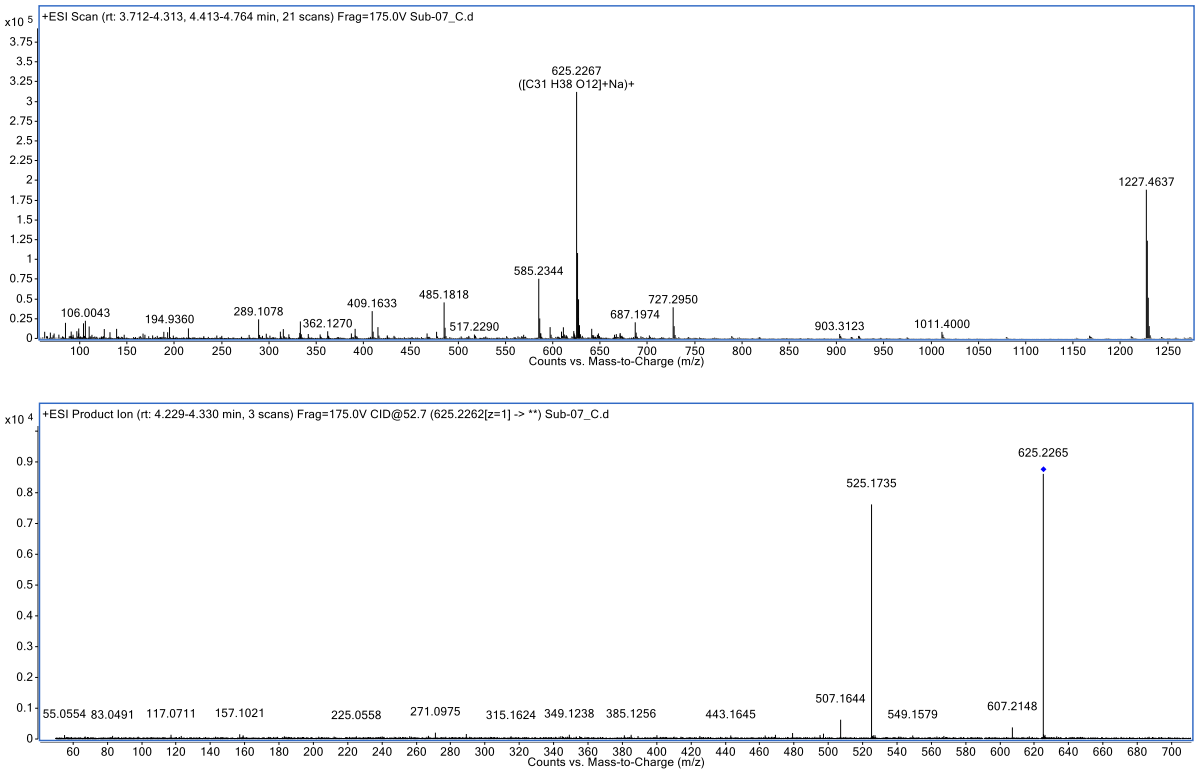


Figura 4.94 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 07

O mecanismo de fragmentação proposto após a análise do espectro de MS/MS mostrou a saída de ácido tíglico do íon precursor *m/z* 625 para formar o íon fragmento *m/z* 525, do qual uma eliminação de H_2O leva a formação do íon fragmento *m/z* 507. Algumas migrações de hidrogênio são propostas para abrir a ponte éter C-7/C-13, levar a formação de um ácido carboxílico e eliminar a porção da molécula que se refere aos anéis D e furano. Uma descarboxilação acontece eliminando CO_2 para formar o íon fragmento *m/z* 225 (Figura 4.95).

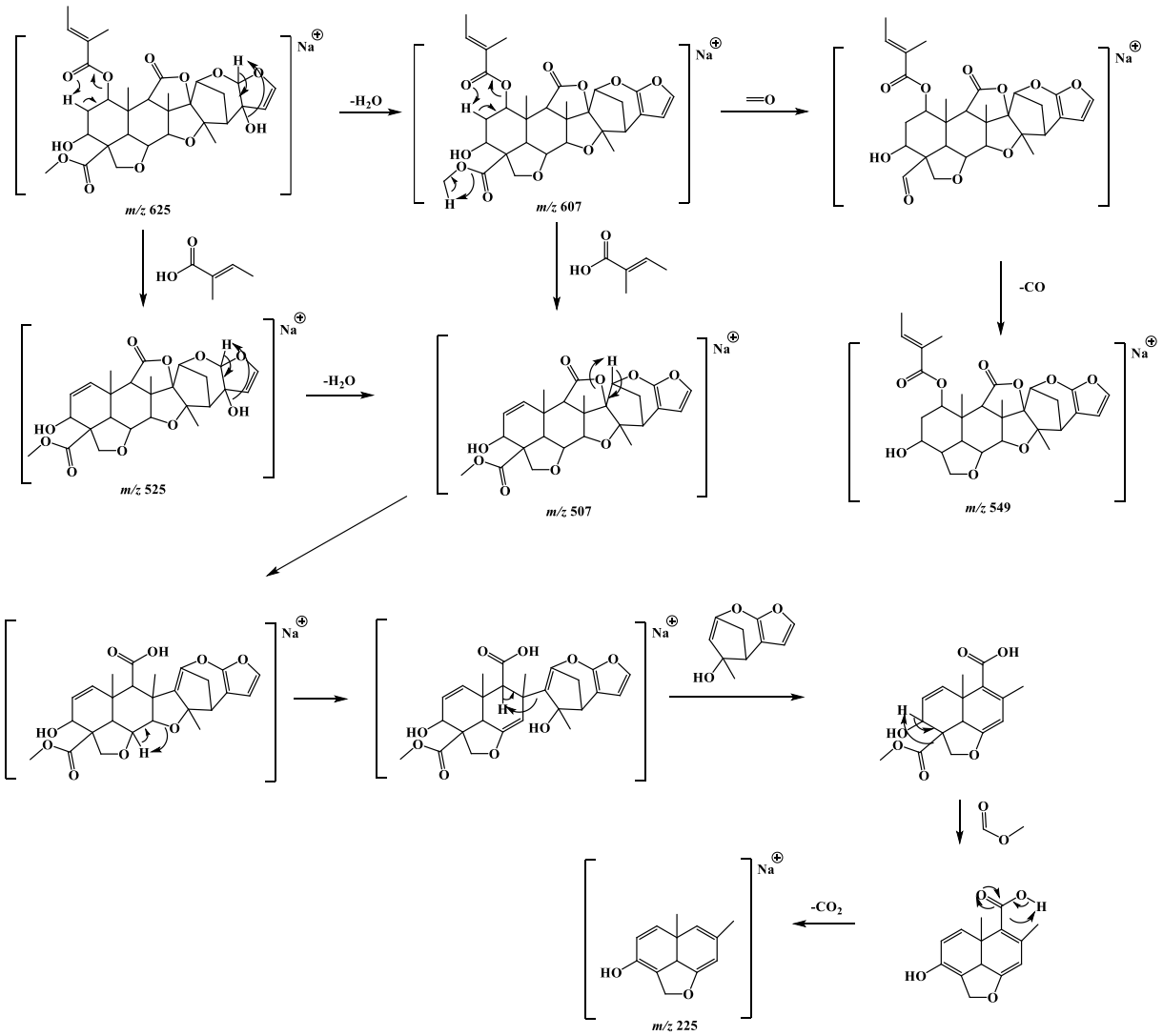


Figura 4.95 - Proposta de fragmentação para o limonoide 07

Uma segunda proposta de fragmentação para gerar o íon fragmento *m/z* 225 é sugerida a partir do íon fragmento *m/z* 507 com algumas migrações de hidrogênio e eliminação da porção da molécula referente ao anel D e anel furano. Após a descarboxilação, foi proposto uma eliminação de MeOH para gerar o íon fragmento *m/z* 271, desse íon são sugeridas as perdas de metano e formaldeído para gerar o íon fragmento *m/z* 225 (Figura 4.96).

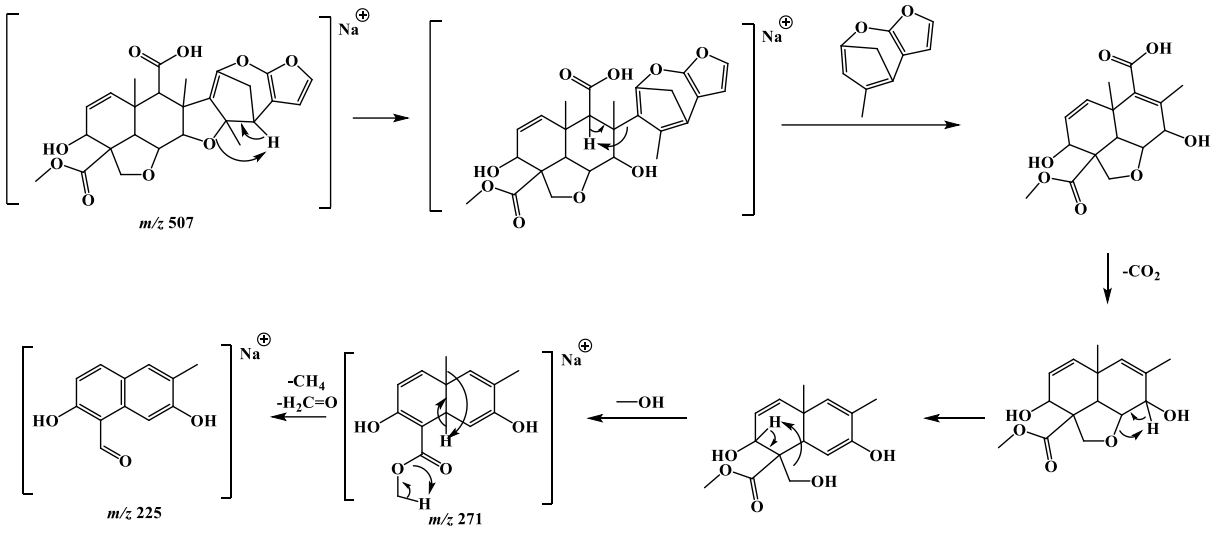


Figura 4.96 - Proposta de fragmentação para o limonoide 07

4.5.8 Limonoide 08

O limonoide denominado de pallidalina possui fórmula molecular de $C_{34}H_{44}O_{14}$, o erro calculado considerando o aduto de sódio *m/z* 699,2649 $[M+Na]^+$ foi de 2,86 ppm (Figura 4.97). A rota de fragmentação foi proposta para cinco íons fragmentos, com a eliminação de ácido tíglico o íon fragmento *m/z* 599 é formado, após a eliminação de H_2O tem-se a formação do íon fragmento *m/z* 581. Após a abertura do anel da ponte endoperóxido ocorre a eliminação do da porção da molécula referente ao anel D e furano dando origem ao íon fragmento *m/z* 405 (Figura 4.96). O éster do íon *m/z* 405 é eliminado originando o íon fragmento *m/z* 345, conseguinte uma eliminação de H_2O e uma perda de ceteno o íon fragmento *m/z* 285 é formado (Figura 4.98).

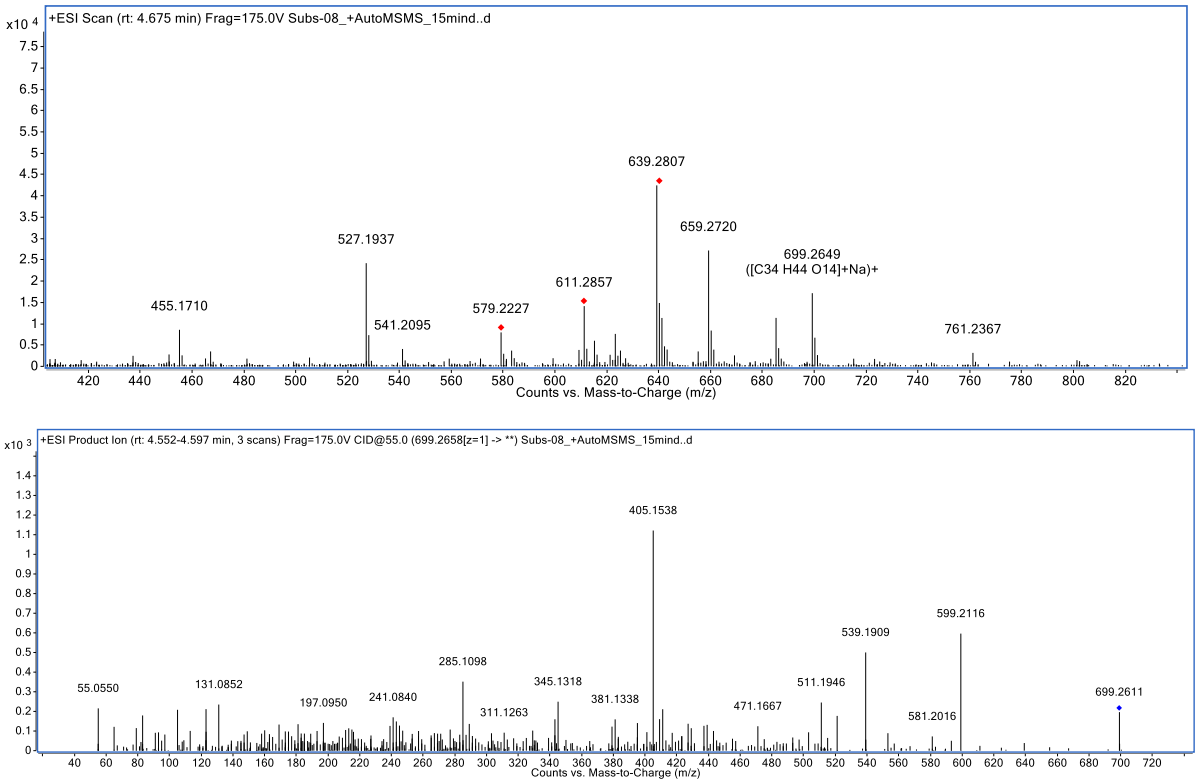


Figura 4.97 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 08

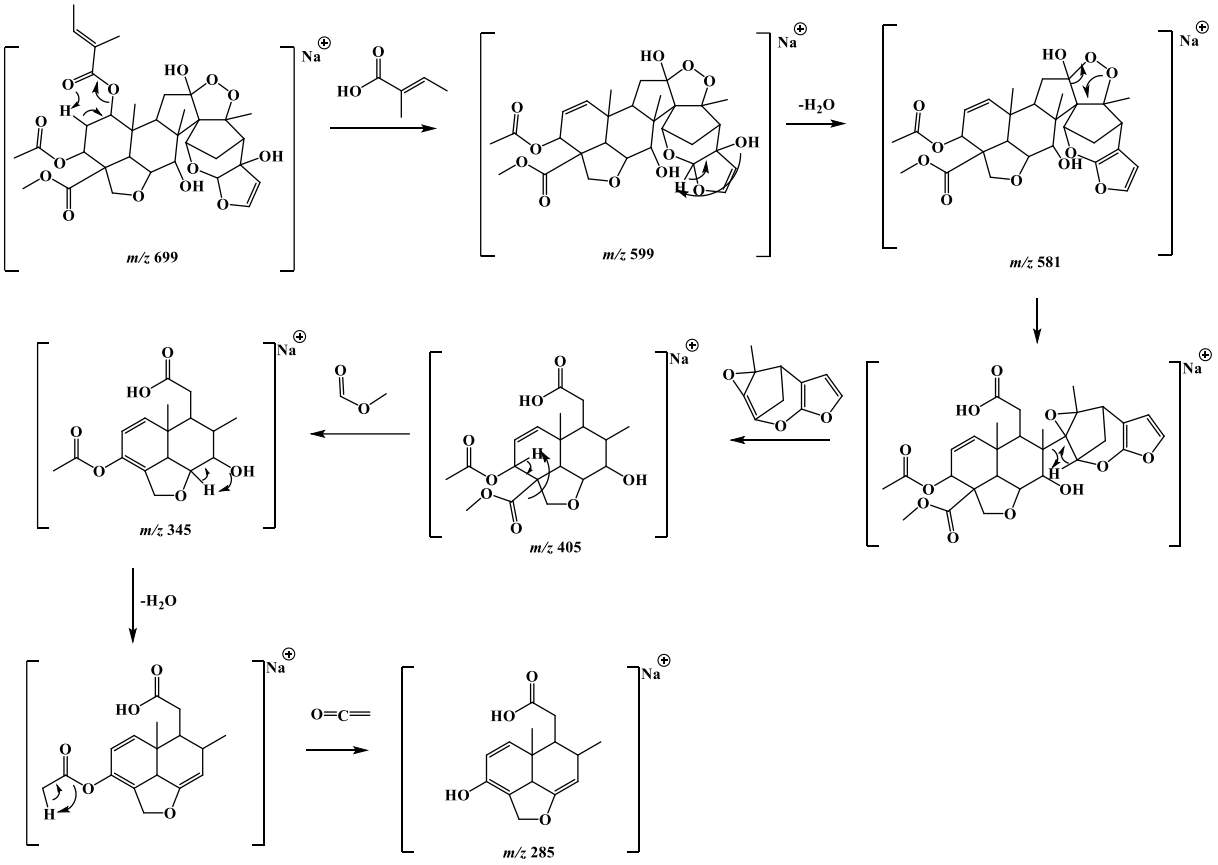


Figura 4.98 - Proposta de fragmentação para o limonoide 08

4.5.9 Limonoide 09

O íon molecular *m/z* 593,2745 $[M+Na]^+$ pertence ao limonoide 1-acetóxitrichilinina, cuja fórmula molecular corresponde a $C_{32}H_{42}O_9$, o erro calculado baseado nessa fórmula foi de 3,03 ppm (Figura 4.99).

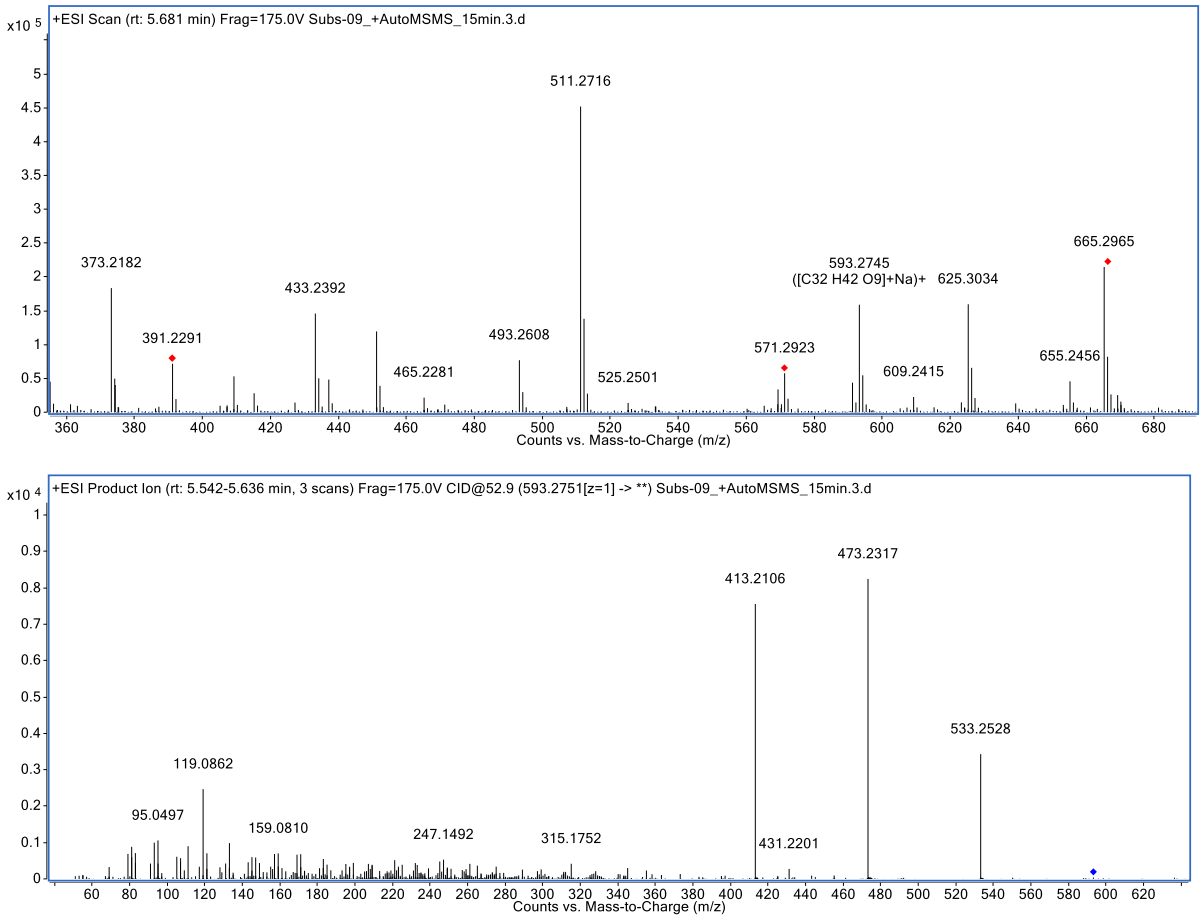


Figura 4.99 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 09

No espectro de MS/MS o íon fragmento *m/z* 533 provem da perda de ácido acético, uma segunda eliminação de CH_3COOH acontece resultando no íon fragmento *m/z* 473, do qual é sugerido uma eliminação de ceteno para originar o íon fragmento *m/z* 431, conseguinte uma perda de H_2O leva a formação do íon fragmento *m/z* 413 (Figura 4.100).

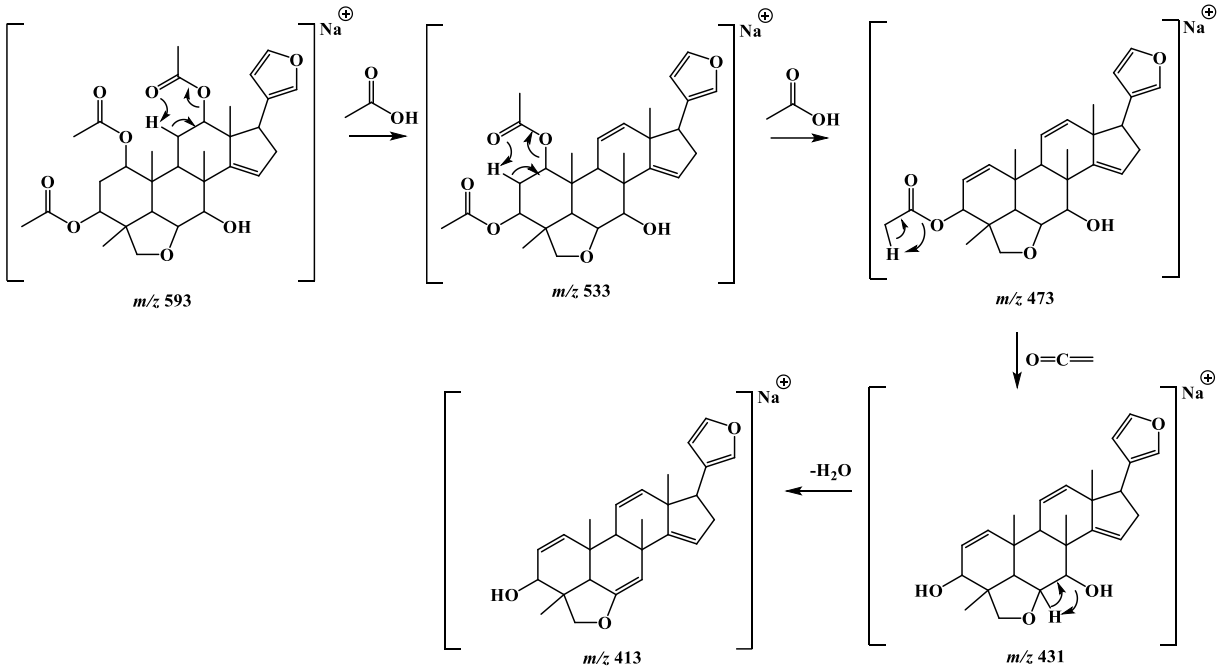


Figura 4.100 - Proposta de fragmentação para o limonoide 09

4.5.10 Norlimonoide 10

O espectro de MS para o norpallidalina B apresentou o íon molecular *m/z* 669,2527 concernente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ para a fórmula molecular $C_{33}H_{42}O_{13}$ com um desvio de massa igual a 0,60 ppm. Os íons fragmentos gerados na fragmentação do íon precursor *m/z* 669,2527 estão apresentados no espectro de MS/MS (Figura 4.101).

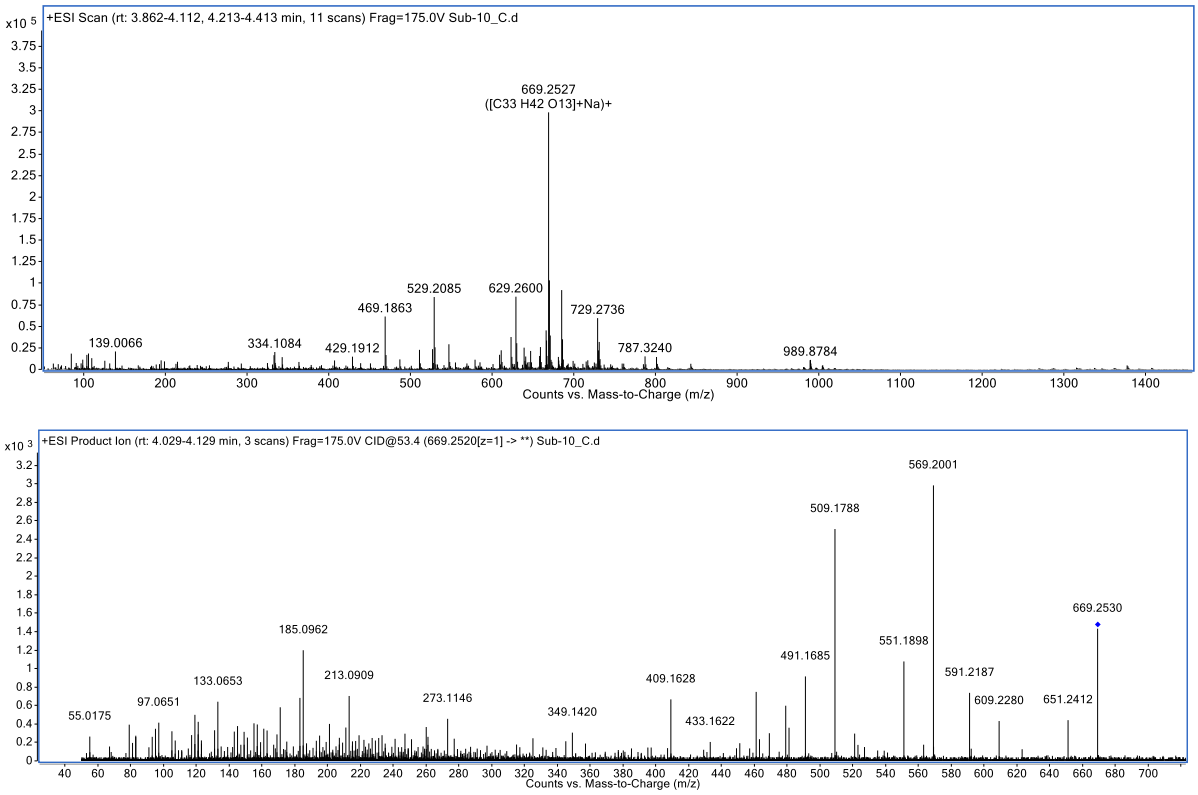


Figura 4.101 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 10

Os íons fragmentos *m/z* 569, *m/z* 609 e *m/z* 651 são gerados a partir do íon precursor *m/z* 669, com as respectivas perdas de ácido tíglico, a unidade CH_3OOCH e H_2O. Do fragmento *m/z* 651 foi atribuída uma perda de ceteno que também leva a formação do íon fragmento *m/z* 609, este íon fragmenta eliminando H_2O ocasionando o aparecimento do íon fragmento *m/z* 591 e após a uma eliminação de ácido tíglico o íon fragmento *m/z* 491 é formado (Figura 4.102).

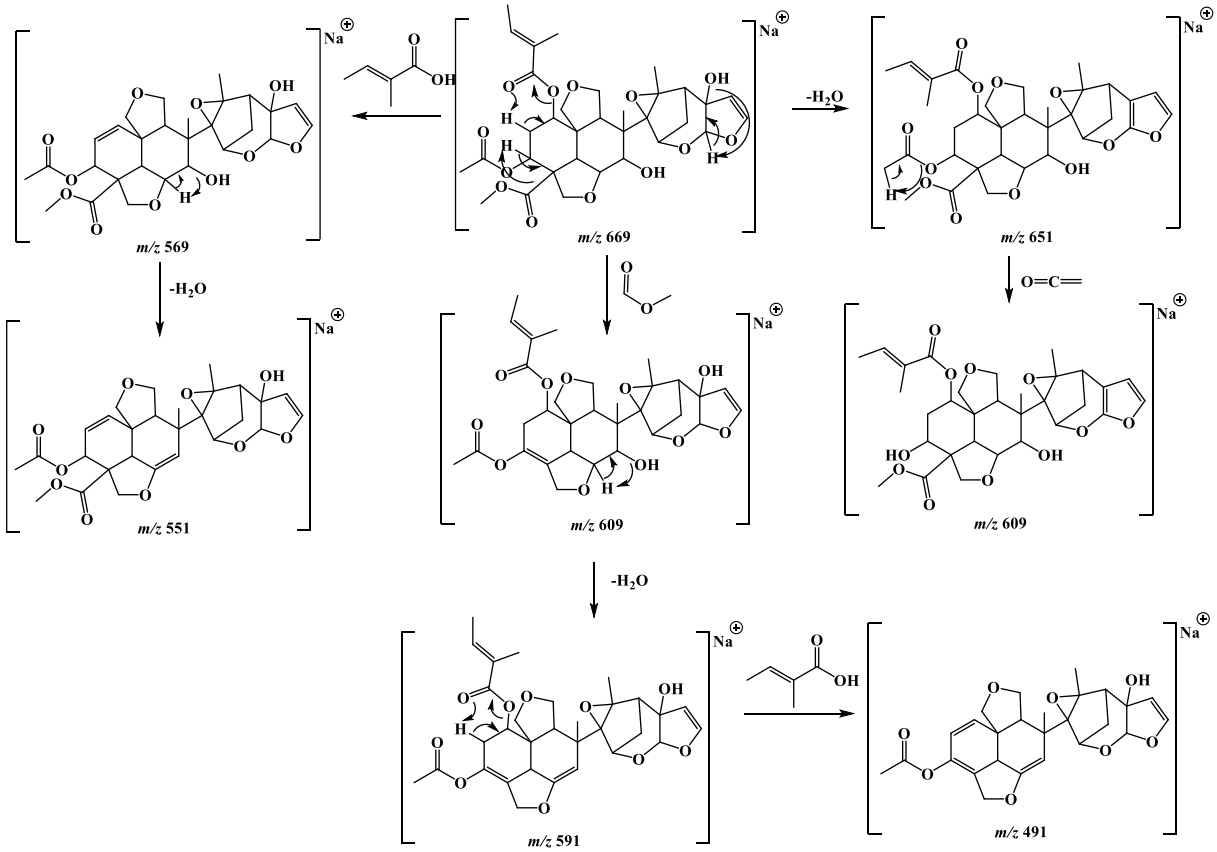


Figura 4.102 - Proposta de fragmentação para o limonoide 10

Um mecanismo com migração de carga foi sugerido no íon fragmento *m/z* 591, primeiramente a eliminação do complexo tiglota coordenado ao Na(I) gera um carbocátion na molécula, depois a fragmentação da proção que contém o anel D leva a formação do íon fragmento *m/z* 273, foi sugerido uma migração de carga para ocorrer a primeira eliminação de formaldeído, conseguinte uma segunda perda de formaldeído ocorre para gerar o íon fragmento *m/z* 213, por fim, uma eliminação de CO leva a formação do íon fragmento *m/z* 185 (Figura 4.103).

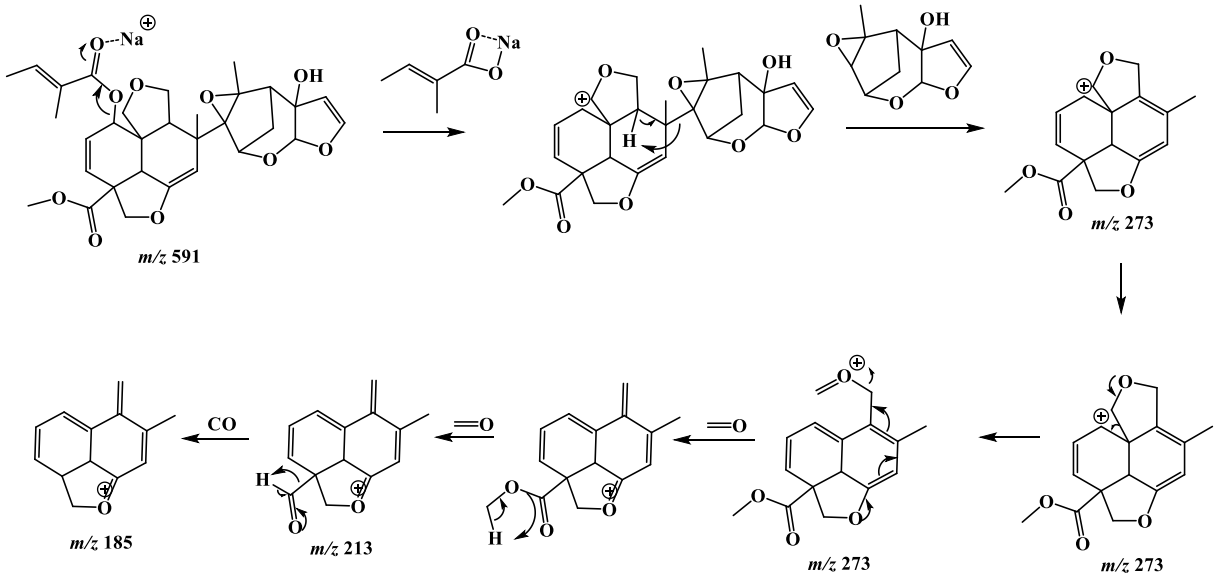


Figura 4.103 - Proposta de fragmentação para o limonoide 10

4.5.11 Limonoide 11

O limonoide espiropallidalina A foi analisado no modo positivo de ionização, o íon molecular *m/z* 665,2574 $[M+Na]^+$ foi condizente para a fórmula molecular de $C_{33}H_{42}O_{13}$ (Figura 4.104). O mecanismo de fragmentação proposto para esse íon possui perdas de H_2O, CH_3COOH e ácido tíglico.

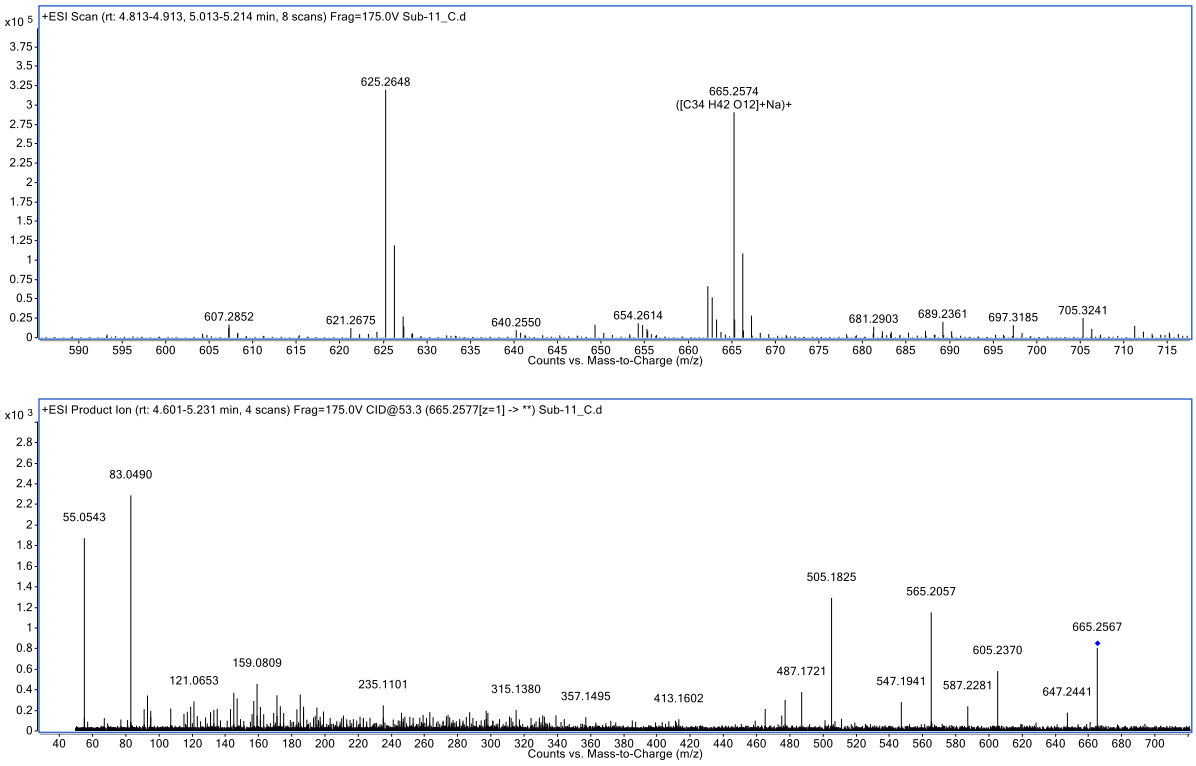


Figura 4.104 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 11

Os íons fragmentos *m/z* 647, *m/z* 605 e *m/z* 565 são resultantes das respectivas perdas de H_2O, CH_3COOH e ácido tíglico. Para o íon fragmento *m/z* 647 a fragmentação da unidade do ácido tíglico leva ao íon fragmento *m/z* 547. Uma fragmentação de referente a 18,01 Da (H_2O) do íon fragmento *m/z* 605 forma o íon fragmento *m/z* 587 (Figura 4.105).

Após a formação do íon fragmento *m/z* 565, um fragmento concernente com a fórmula CH_3OOCH é perdido para gerar o íon *m/z* 505, em seguida, uma eliminação de H_2O é proposta para originar o íon fragmento *m/z* 487. Vale ressaltar que um dos íons diagnósticos monitorado para possíveis limonoide, *m/z* 83 pode ser referente a um substituinte devido a fragmentação do ácido tíglico mantendo a carga no oxigênio (Figura 4.105).

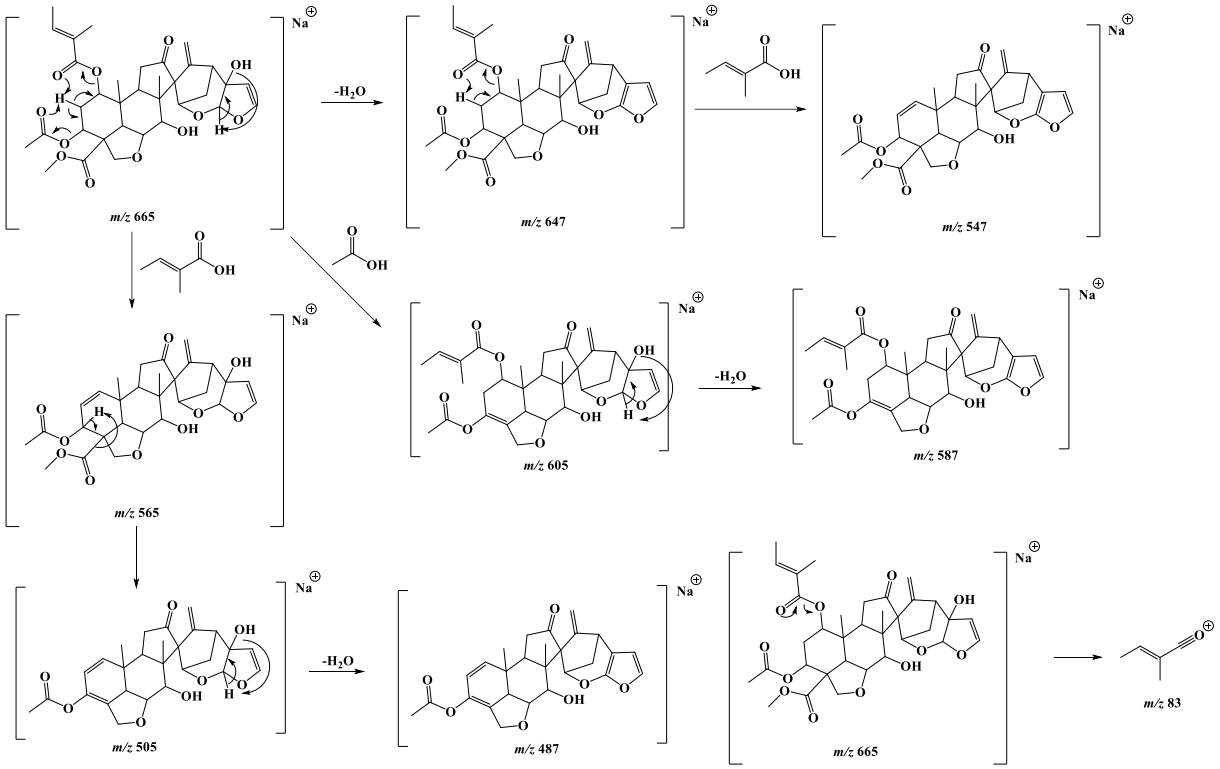


Figura 4.105 - Proposta de fragmentação para o limonoide 11

4.5.12 Limonoide 12

O íon molecular *m/z* 723,2994 $[M+Na]^+$ foi atribuído ao limonoide 12, cuja fórmula molecular é $C_{37}H_{48}O_{13}$ e o desvio de massa foi de 0,14 ppm. O íon precursor *m/z* 723,2994 foi fragmentado para obter mais informações da estrutura do limonoide (Figura 4.106).

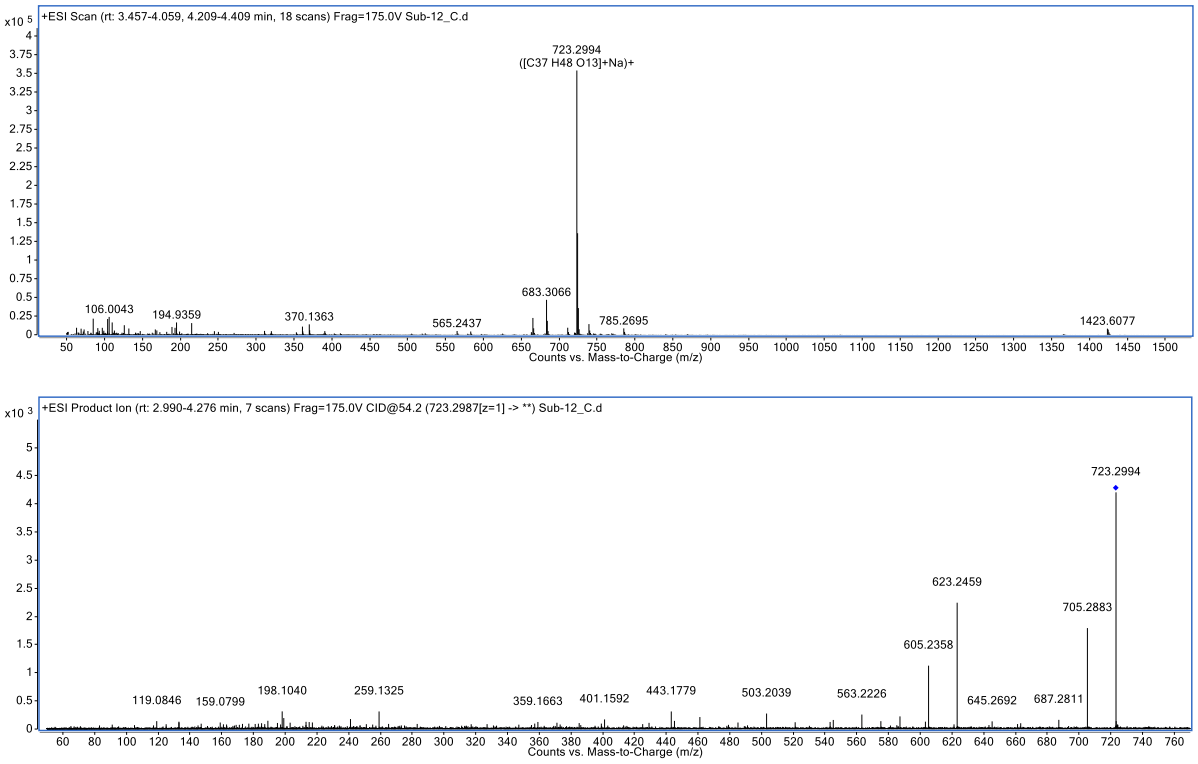


Figura 4.106 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 12

O íon fragmento *m/z* 705 é formado após uma perde de H_2O, com a abertura do anel C uma segunda eliminação de H_2O leva a formação do íon fragmento *m/z* 687. A perda de ácido tíglico do íon *m/z* 723 e do íon fragmento *m/z* 705 é proposta para originar os respectivos íons fragmentos, *m/z* 623 e *m/z* 605 (Figura 4.107).

A eliminação de uma unidade de ácido acético do íon fragmento *m/z* 623 ocasiona a formação do íon fragmento *m/z* 563, conseguinte uma perda de H_2O concomitante a eliminação de ceteno tem-se a formação do íon fragmento *m/z* 503. Um rearranjo de hidrogênio favorece a eliminação de H_2O, em seguida a saída ceteno leva a formação do íon fragmento *m/z* 443 (Figura 4.107).

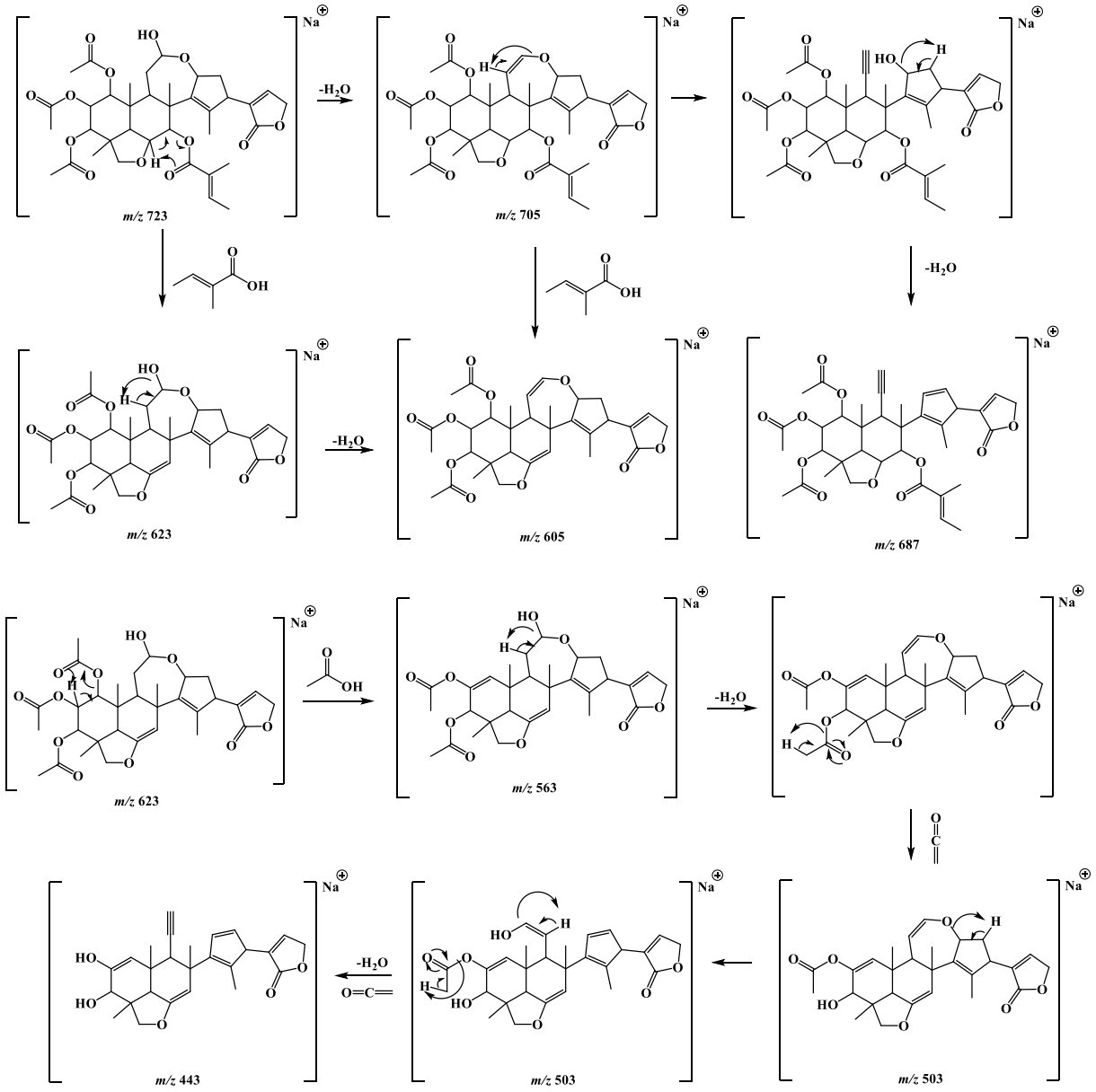


Figura 4.107 - Proposta de fragmentação para o limonoide 12

O mecanismo proposto para a formação do íon fragmento *m/z* 119 passa por algumas migrações de carga, a saída do grupo tiglato coordenado ao sódio gera uma carbocátion na molécula, essa carga é transferida para o oxigênio da ponte éter C-6/C-28, favorecendo a abertura do anel migrando a carga para a posição C-8. A formação da ligação dupla e a abstração do hidrogênio da metila C-30 transfere a carga para o anel D, tem-se uma perda de metano, uma fragmentação do tipo RDA acontece no anel C e com a saída de CO_2 o íon fragmento *m/z* 119 é formado (Figura 4.108).

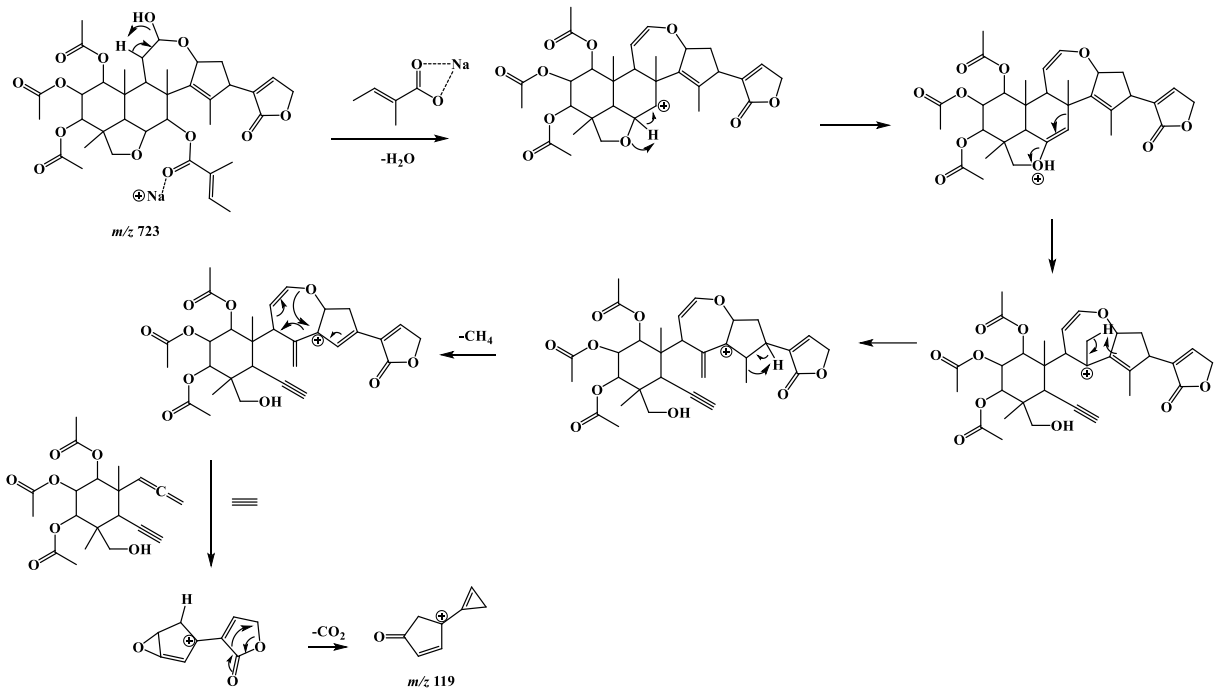


Figura 4.108 - Proposta de fragmentação para o limonoide 12

4.5.13 Limonoide 13

O íon molecular *m/z* 665,2937 $[M+Na]^+$ foi observado para o limonoide 13, denominado spirosendan. O desvio de massa calculado foi de 0,15 ppm considerando a fórmula molecular $C_{35}H_{46}O_{11}$. Esse íon molecular foi selecionado e fragmentado na célula de colisão e o espectro de MS/MS está apresentado na Figura 4.109.

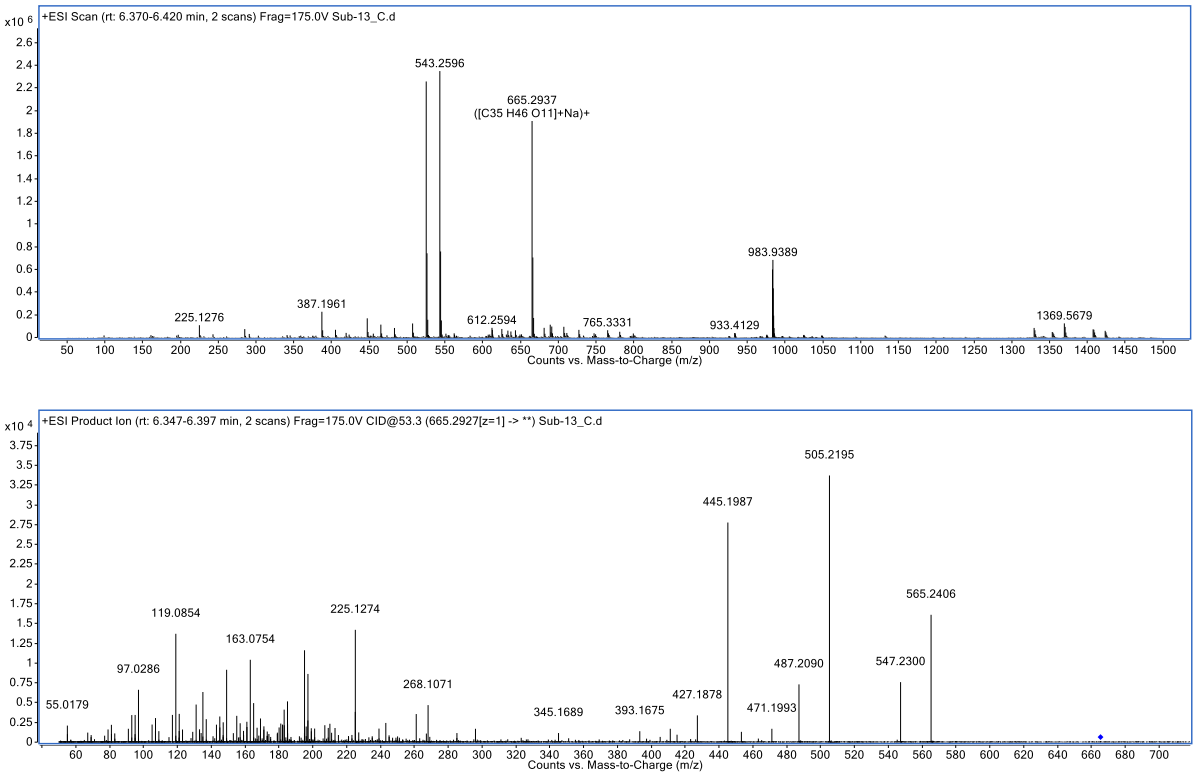


Figura 4.109 - Espectros de MS (superior) e MS/MS (inferior) do limonoide 13

A eliminação de uma unidade referente ao ácido tíglico do íon precursor *m/z* 665 leva a formação do íon fragmento *m/z* 565, no qual ocorre uma perda de H_2O ocasionando o íon fragmento *m/z* 547, deste íon pode ser originado íon fragmento *m/z* 487 após a saída de ácido acético (Figura 4.110).

O íon fragmento *m/z* 565 fragmenta perdendo CH_3COOH formando íon fragmento *m/z* 505, em seguida, uma perda de H_2O leva a formação do íon fragmento *m/z* 487. Após a saída de uma unidade de ceteno e H_2O, tem-se a formação dos respectivos íons fragmentos, *m/z* 445 e *m/z* 427 (Figura 4.110).

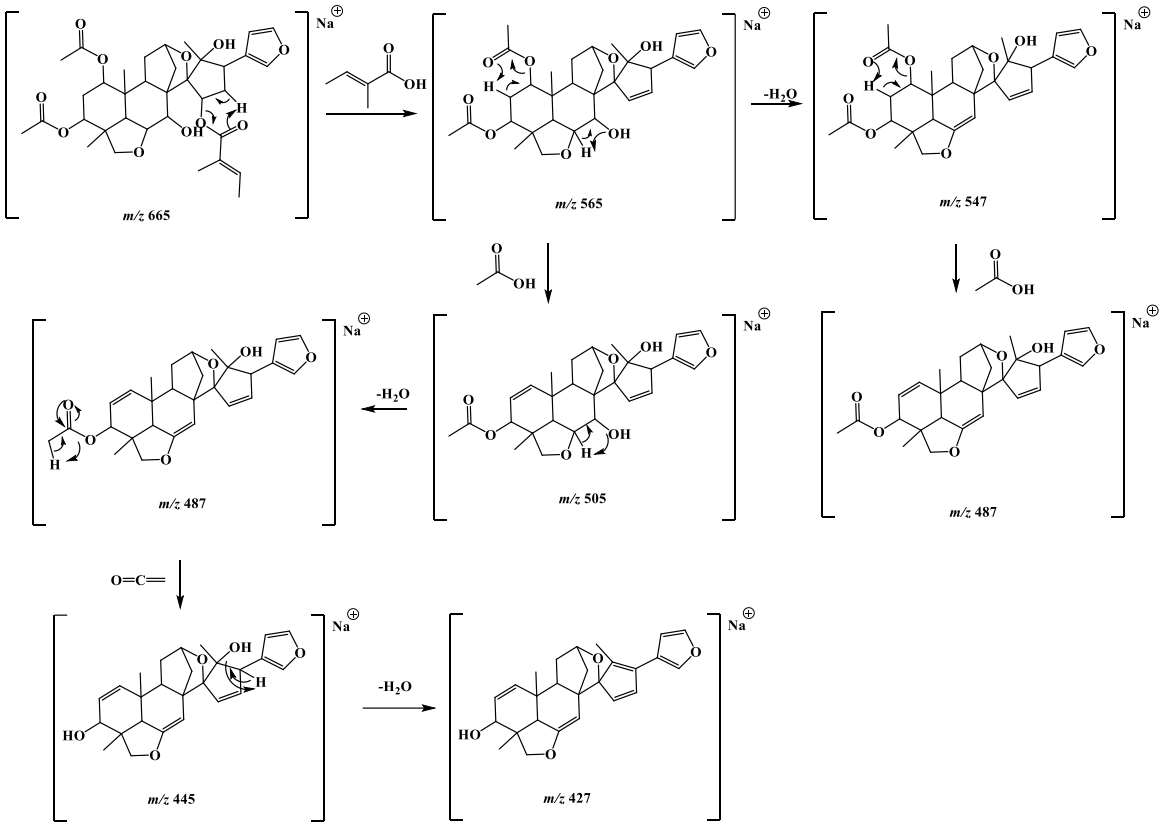


Figura 4.110 - Proposta de fragmentação para o limonoide 13

O íon fragmento *m/z* 487 pode fragmentar de formas diferentes para formar os íons fragmentos *m/z* 471 e *m/z* 427. O mecanismo que leva ao íon m/z 471 passa pela perde de uma unidade CH_4, o enol formado para ser tautomerizado para cetona. A proposta do íon fragmento *m/z* 427 passa por uma eliminação conjunta de H_2O e ceteno (Figura 4.111).

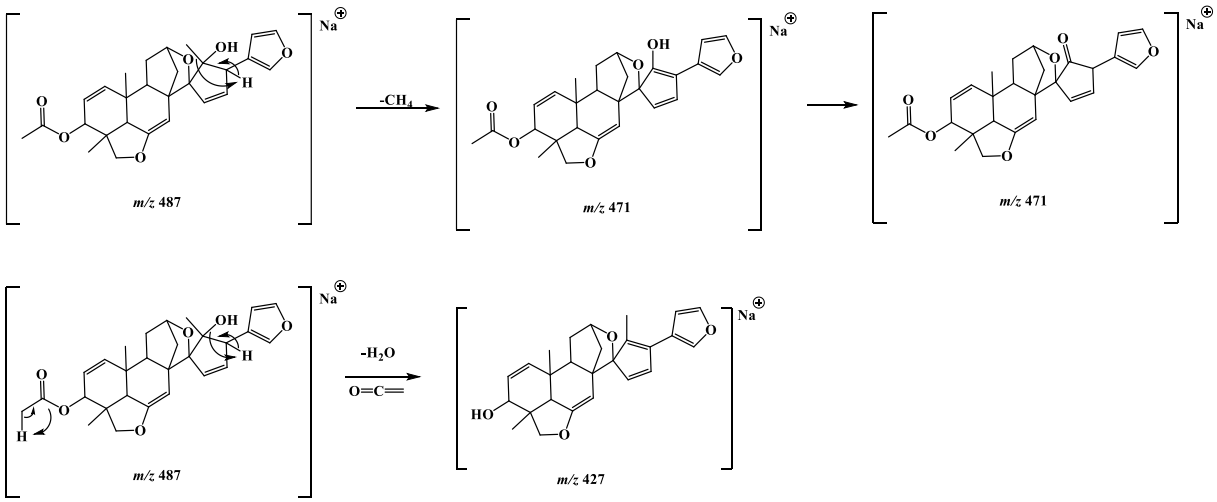


Figura 4.111 - Proposta de fragmentação para o limonoide 13

Os íons fragmentos *m/z* 163, *m/z* 135 e *m/z* 119 são gerados após o íon precursor *m/z* 665 sofrer um rearranjo de hidrogênio, conseguinte uma eliminação da porção da molécula que continha os anéis A, B e C do limonoide. Duas perdas acontecem logo em seguida para formar o íon *m/z* 163, as perdas de H_2O e uma fragmentação com migração de carga deixando o carbocátion na molécula. O enol formado é tautomerizado para cetona facilitando a eliminação de CO originando o íon fragmento *m/z* 135, por fim uma eliminação de CH_4 leva a formação do íon fragmento *m/z* 119 (Figura 4.112).

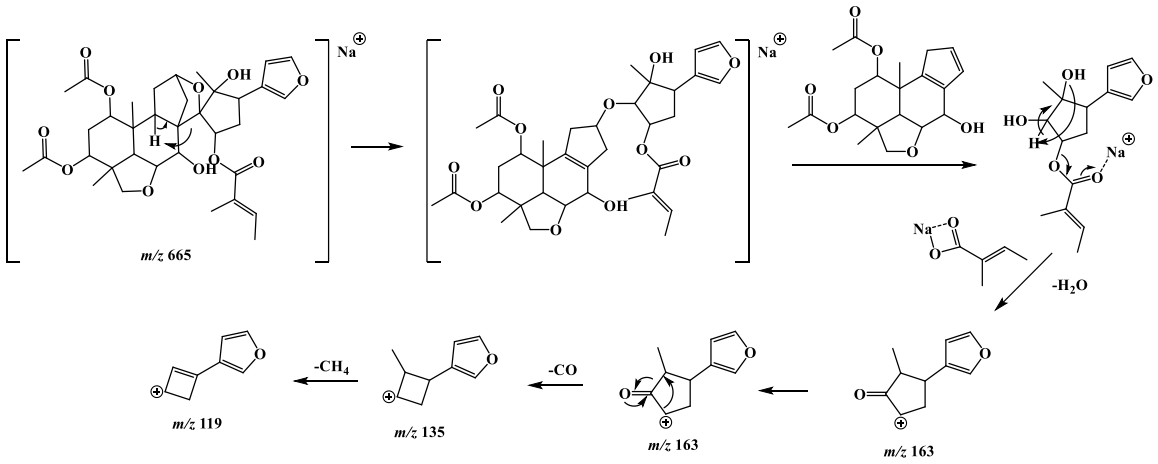


Figura 4.112 - Proposta de fragmentação para o limonoide 13

5 CONCLUSÃO

A aplicação da espectrometria de massas, em especial a análise por LC-MS/MS, mostrou-se fundamental para o direcionamento do isolamento de limonoides inéditos. A identificação de íons diagnósticos específicos, derivados das fragmentações características de diferentes subclasses de limonoides, permitiu a triagem eficiente de extratos complexos e a priorização de frações contendo compostos com perfis estruturais diferenciados. Essa abordagem guiada possibilitou a seleção racional das frações para purificação, otimizando tempo e recursos, além de contribuir diretamente para a ampliação do conhecimento sobre a diversidade química da espécie *Trichilia pallida*. Assim, o uso estratégico de dados espectrométricos não apenas fortalece o processo de descoberta de produtos naturais, mas também abre caminho para a elucidação de novas estruturas bioativas com potencial farmacológico.

Em nosso estudo, além dos limonoides inéditos, foram isolados dois norlimonoides ainda não reportados na literatura, evidenciando que as espécies do gênero *Trichilia* encontradas no Brasil podem conter estruturas diversas, exemplificadas principalmente no isolamento dos limonoides **Pallidalina** e **Espiropallidalina A**.

Em nossa pesquisa, a maioria dos limonoides isolados foram da classe *C-seco*, limonoides característicos de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica*, e mais recente isolados de *Munronia unifoliolata* no trabalho de Sun *et al*, (2021)[88] . Um indicativo que esses limonoides podem ser encontrados em outros gêneros de Meliaceae.

Esses resultados destacam a necessidade de um reestudo fitoquímico mais amplo dentro do grupo, utilizando abordagens modernas de metabolômica e espectrometria de massas.

A aplicação sistemática de ferramentas analíticas guiadas por íons diagnósticos poderá revelar novas subclasses de limonoides, ampliar o

conhecimento sobre padrões biossintéticos e contribuir significativamente para o entendimento da quimiodiversidade da família Meliaceae.

REFERÊNCIAS

1. Pennington TD, Styles BT. *A Generic Monograph of the Meliaceae*.
2. Gama RL, Muellner-Riehl AN, Demarco D, Pirani JR. Evolution of reproductive traits in the mahagony family (Meliaceae). *J Syst Evol*. 2021;59(1):21-43. doi:10.1111/jse.12572
3. Cui G, Li Y, Yi X, et al. Meliaceae genomes provide insights into wood development and limonoids biosynthesis. *Plant Biotechnol J*. 2023;21(3):574-590. doi:10.1111/pbi.13973
4. Flores TB. Meliaceae in Flora e Fungo do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. February 19, 2025. Accessed March 6, 2025. https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB10011
5. Blundell AG, Rodan BD. Mahogany and CITES: moving beyond the veneer of legality. *Oryx*. 2003;37(01). doi:10.1017/S0030605303000164
6. Aimi SC. *Tecnologia de Sementes e Crescimento Inicial de Mudas de Cabralea Canjerana (Vell.) Mart.* UFMS; 2014.
7. Fernandes da Silva MF das G, da Silva Pinto L, Amaral JC, Fernandes da Silva D, Rossi Forim M, Fernandes JB. Nortriterpenes, chromones, anthraquinones, and their chemosystematics significance in Meliaceae, Rutaceae, and Simaroubaceae (Sapindales). *Revista Brasileira de Botanica*. 2022;45(1):15-40. doi:10.1007/s40415-021-00733-9
8. Di YT, Hao XJ. *The Advances in the Limonoid Chemistry of the Meliaceae Family*. Vol 15.; 2011.
9. Luo J, Sun Y, Li Q, Kong L. Research progress of meliaceous limonoids from 2011 to 2021. *Nat Prod Rep*. 2022;39(6):1325-1365. doi:10.1039/d2np00015f
10. Paritala V, Chiruvella KK, Thammineni C, Ghanta RG, Mohammed A. Phytochemicals and antimicrobial potentials of mahogany family. *Revista*

Brasileira de Farmacognosia. 2015;25(1):61-83. doi:10.1016/j.bjp.2014.11.009

11. Zhang Y, Xu H. Recent progress in the chemistry and biology of limonoids. *RSC Adv*. 2017;7(56):35191-35220. doi:10.1039/c7ra04715k
12. Braga TM, Rocha L, Chung TY, et al. Biological activities of gedunin—A limonoid from the Meliaceae family. *Molecules*. 2020;25(3). doi:10.3390/molecules25030493
13. Hilmayanti E, Nurlelasari, Supratman U, Kabayama K, Shimoyama A, Fukase K. Limonoids with anti-inflammatory activity: A review. *Phytochemistry*. 2022;204. doi:10.1016/j.phytochem.2022.113469
14. Sandjo LP, Kuete V. Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa. In: *Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry*. Elsevier Inc.; 2013:135-202. doi:10.1016/B978-0-12-405927-6.00004-7
15. Weraduwage SM, Rasulov B, Sahu A, Niinemets Ü, Sharkey TD. Isoprene measurements to assess plant hydrocarbon emissions and the methylerythritol pathway. In: ; 2022:211-237. doi:10.1016/bs.mie.2022.07.020
16. Zetterström R. The 1964 Nobel Prize for the discovery of the biosynthesis of cholesterol. *Acta Paediatr*. 2009;98(7):1223-1227. doi:10.1111/j.1651-2227.2009.01282.x
17. Chang W chen, Song H, Liu H wen, Liu P. Current development in isoprenoid precursor biosynthesis and regulation. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17(4):571-579. doi:10.1016/j.cbpa.2013.06.020
18. Maeda HA. Harnessing evolutionary diversification of primary metabolism for plant synthetic biology. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(45):16549-16566. doi:10.1074/jbc.REV119.006132
19. Bochar DA, Freisen Jona, Stauffacher C V., Rodwell VW. Biosynthesis of Mevalonic Acid from Acetyl-CoA. In: *Comprehensive Natural Products*

Chemistry. Elsevier; 1999:15-44. doi:10.1016/B978-0-08-091283-7.00035-7

20. Chand J, Panda SR, Jain S, et al. Phytochemistry and polypharmacology of cleome species: A comprehensive Ethnopharmacological review of the medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2022;282:114600. doi:10.1016/j.jep.2021.114600
21. Frank A, Groll M. The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chem Rev*. 2017;117(8):5675-5703. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00537
22. Dewick PM. *Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach*. Wiley, A John Wiley and Sons, Ltd., Publication; 2009.
23. Amaral JC. *Alteração No Metaboloma e Na Expressão Gênica Na via Da Biossíntese de Piranocumarinas Em Citrus Sinensis x Citrus Limonia Em Resposta Ao Huanglongbing*. Universidade Federal de São Carlos; 2023.
24. Aarthy T, Mulani FA, Pandreka A, et al. Tracing the biosynthetic origin of limonoids and their functional groups through stable isotope labeling and inhibition in neem tree (Azadirachta indica) cell suspension. *BMC Plant Biol*. 2018;18(1):230. doi:10.1186/s12870-018-1447-6
25. Mulani FA, Nandikol SS, Thulasiram H V. *Chemistry and Biology of Novel Meliaceae Limonoids*.
26. Pandreka A, Chaya PS, Kumar A, et al. Limonoid biosynthesis 3: Functional characterization of crucial genes involved in neem limonoid biosynthesis. *Phytochemistry*. 2021;184. doi:10.1016/j.phytochem.2021.112669
27. Aarthy T, Mulani FA, Pandreka A, et al. Tracing the biosynthetic origin of limonoids and their functional groups through stable isotope labeling and inhibition in neem tree (Azadirachta indica) cell suspension. *BMC Plant Biol*. 2018;18(1). doi:10.1186/s12870-018-1447-6
28. Chuang L, Liu S, Biedermann D, Franke J. Identification of early quassinoid biosynthesis in the invasive tree of heaven (Ailanthus altissima) confirms

evolutionary origin from protolimonoids. *Front Plant Sci*. 2022;13. doi:10.3389/fpls.2022.958138

29. Hodgson H, De La Peña R, Stephenson MJ, et al. Identification of key enzymes responsible for protolimonoid biosynthesis in plants: Opening the door to azadirachtin production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(34):17096-17104. doi:10.1073/pnas.1906083116
30. Lian X, Zhang X, Wang F, Wang X, Xue Z, Qi X. Characterization of a 2,3-oxidosqualene cyclase in the toosendanin biosynthetic pathway of *Melia toosendan*. *Physiol Plant*. 2020;170(4):528-536. doi:10.1111/ppl.13189
31. Pandreka A, Chaya PS, Kumar A, et al. Limonoid biosynthesis 3: Functional characterization of crucial genes involved in neem limonoid biosynthesis. *Phytochemistry*. 2021;184:112669. doi:10.1016/j.phytochem.2021.112669
32. Hodgson H, Stephenson MJ, Kikuchi S, et al. Plants Utilize a Protection/Deprotection Strategy in Limonoid Biosynthesis: A "Missing Link" Carboxylesterase Boosts Yields and Provides Insights into Furan Formation. *J Am Chem Soc*. 2024;146(43):29305-29310. doi:10.1021/jacs.4c11213
33. De La Peña R, Hodgson H, Liu JCT, et al. Complex scaffold remodeling in plant triterpene biosynthesis. *Science (1979)*. 2023;379(6630):361-368. doi:10.1126/science.adf1017
34. Kawai Y, Ono E, Mizutani M. Evolution and diversity of the 2–oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*. 2014;78(2):328-343. doi:10.1111/tpj.12479
35. Farrow SC, Facchini PJ. Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Front Plant Sci*. 2014;5. doi:10.3389/fpls.2014.00524
36. Smith-Díaz CC, Das AB, Jurkowski TP, Hore TA, Vissers MCM. Exploring the Ascorbate Requirement of the 2-Oxoglutarate-Dependent

Dioxygenases. *J Med Chem*. 2025;68(3):2219-2237. doi:10.1021/acs.jmedchem.4c02342

37. Tan QG, Luo XD. Meliaceous limonoids: Chemistry and biological activities. *Chem Rev*. 2011;111(11):7437-7522. doi:10.1021/cr9004023
38. Mabberley DJ. *Flowering Plants. Eudicots*. Vol X. (Kubitzki K, ed.). Springer Berlin Heidelberg; 2011. doi:10.1007/978-3-642-14397-7
39. Curcino Vieira IJ, da Silva Terra W, dos Santos Gonçalves M, Braz-Filho R. Secondary Metabolites of the Genus Trichilia: Contribution to the Chemistry of Meliaceae Family. *Am J Analyt Chem*. 2014;05(02):91-121. doi:10.4236/ajac.2014.52014
40. PENNINGTON TD, CLARKSON JJ. Preface to "A revision of American Trichilia (Meliaceae)." *Phytotaxa*. 2016;259(1):4. doi:10.11646/phytotaxa.259.1.3
41. Heads M. Biogeography and ecology in a pantropical family, the Meliaceae. *Gardens' Bulletin Singapore*. 2019;71:335-461. doi:10.26492/gbs71(suppl)
42. De Wilde J. *A REVISION OF THE SPECIES OF TRICHILIA P. BROWNE (MELIACEAE) ON THE AFRICAN CONTINENT*.; 1968.
43. Touzet P. Mitochondrial Genome Evolution and Gynodioecy. In: ; 2012:71-98. doi:10.1016/B978-0-12-394279-1.00004-1
44. Ohya I, Nanami S, Itoh A. Dioecious plants are more precocious than cosexual plants: A comparative study of relative sizes at the onset of sexual reproduction in woody species. *Ecol Evol*. 2017;7(15):5660-5668. doi:10.1002/ece3.3117
45. CLARKSON JJ, PENNINGTON TD, CHASE MW, et al. PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN TRICHILIA (MELIACEAE) BASED ON RIBOSOMAL ITS SEQUENCES. *Phytotaxa*. 2016;259(1):6. doi:10.11646/phytotaxa.259.1.4

46. Rodríguez B, Caballero C, Ortego F, Castañera P. A new tetranortriterpenoid from Trichilia havanensis. *J Nat Prod*. 2003;66(3):452-454. doi:10.1021/np0204646
47. Cortez DAG, Vieira PC, Fernandes JB, da Silva GFGF, Ferreira AG. Limonoids from Trichilia hirta. *Phytochemistry*. 1992;31(2):625-628. doi:10.1016/0031-9422(92)90048-U
48. Garcez FR, Garcez WS, Tsutsumi MT, Roque NF. *LIMONOIDS FROM TRICHILIA ELEGANS SSP. ELEGANS*. Vol 45.; 1997.
49. Garcez FR, Garcez WS, Roque NF, Castellano EE, Zukerman-Schpector J. 7β-Oxygenated limonoids from Trichilia elegans ssp. elegans. *Phytochemistry*. 2000;55(7):733-740. doi:10.1016/S0031-9422(00)00287-9
50. Matos AP, Nebo L, Vieira PC, Fernandes JB, Silva MF das GF d, Rodrigues RR. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de Trichilia elegans E T. catigua (Meliaceae). *Quim Nova*. 2009;32(6):1553-1556. doi:10.1590/S0100-40422009000600037
51. Fuzer A, Filho J, Becceneri A, et al. Effects of Limonoid Cedrelone on MDA-MB-231 Breast Tumor Cells in vitro. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(10):1645-1653. doi:10.2174/18715206113139990314
52. Cazal CM, Matos AP, Domingues V de C, et al. Limonoids and insecticidal activity on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) of *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2023;78(5-6):229-233. doi:10.1515/znc-2022-0202
53. de Souza Passos M, Nogueira TSR, da Silva Robaina RR, et al. Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of limonoids isolated from Trichilia lepidota subsp. schumanniana (Harms) T.D.Penn. *Phytochemistry*. 2023;214:113818. doi:10.1016/j.phytochem.2023.113818

54. Xing H, Song Z, Guo R, et al. Secotrijugins A−D, four highly oxidized and rearranged limonoids from Trichilia sinensis and their anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*. 2023;205:113502. doi:10.1016/j.phytochem.2022.113502
55. An FL, Luo J, Li RJ, et al. Spirotrichilins A and B: Two Rearranged Spirocyclic Limonoids from *Trichilia connaroides*. *Org Lett*. 2016;18(8):1924-1927. doi:10.1021/acs.orglett.6b00738
56. An FL, Sun DM, Wang XB, et al. Trichiconlides C F, four new limonoids with 1,2-seco phragmalin-type carbon skeleton from the fruits of Trichilia connaroides. *Fitoterapia*. 2018;125:72-77. doi:10.1016/j.fitote.2017.12.023
57. Cao DH, Liao SG, Yang L, et al. Trichiliasinenoids A–C, three 6,7-secomexicanolide limonoids with a 7,29-linkage from Trichilia sinensis. *Tetrahedron Lett*. 2017;58(33):3283-3286. doi:10.1016/j.tetlet.2017.07.029
58. Passos MS, Nogueira TSR, Azevedo O de A, et al. Limonoids from the genus Trichilia and biological activities: review. *Phytochemistry Reviews*. 2021;20(5):1055-1086. doi:10.1007/s11101-020-09737-x
59. Flores TB, Souza VC, Coelho RLG. Flora do Espírito Santo: Meliaceae. *Rodriguésia*. 2017;68(5):1693-1723. doi:10.1590/2175-7860201768512
60. WFO. WFO (2025): Trichilia pallida Sw. 2025. Accessed March 6, 2025. https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000455741
61. Simmonds MSJ, Stevenson PC, Porter EA, Veitch NC. Insect antifeedant activity of three new tetranortriterpenoids from Trichilia pallida. *J Nat Prod*. 2001;64(8):1117-1120. doi:10.1021/np010197o
62. Thomas SN, French D, Jannetto PJ, Rappold BA, Clarke WA. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nature Reviews Methods Primers*. 2022;2(1):96. doi:10.1038/s43586-022-00175-x
63. Mass spectrometry using electrospray ionization. *Nature Reviews Methods Primers*. 2023;3(1):24. doi:10.1038/s43586-023-00219-w

64. Holčapek M, Jirásko R, Lísa M. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *J Chromatogr A*. 2012;1259:3-15. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.072
65. Jouaneh TMM, Rosario ME, Li Y, Leibovitz E, Bertin MJ. Incorporating LC–MS/MS Analysis and the Dereplication of Natural Product Samples into an Upper-Division Undergraduate Laboratory Course. *J Chem Educ*. 2022;99(7):2636-2642. doi:10.1021/acs.jchemed.1c01212
66. Ito T, Masubuchi M. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. *J Antibiot (Tokyo)*. 2014;67(5):353-360. doi:10.1038/ja.2014.12
67. Bazsó FL, Ozohanics O, Schlosser G, Ludányi K, Vékey K, Drahos L. Quantitative Comparison of Tandem Mass Spectra Obtained on Various Instruments. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2016;27(8):1357-1365. doi:10.1007/s13361-016-1408-y
68. Chen S lin, Gao H, Zhao C xu, Zhang T, Zou Z mei. LC–MS coupled with diagnostic ion strategy facilitated the discovery of 5-methylcoumarin meroterpenoids from Gerbera piloselloides. *Phytochemistry*. 2025;229:114296. doi:10.1016/j.phytochem.2024.114296
69. Chen S lin, Gao H, Zhao C xu, Zhang T, Zou Z mei. LC–MS coupled with diagnostic ion strategy facilitated the discovery of 5-methylcoumarin meroterpenoids from Gerbera piloselloides. *Phytochemistry*. 2025;229:114296. doi:10.1016/j.phytochem.2024.114296
70. Swanson KD, Shaner RL, Krajewski LC, Bragg WA, Johnson RC, Hamelin EI. Use of Diagnostic Ions for the Detection of Fentanyl Analogs in Human Matrices by LC–QTOF. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2021;32(12):2852-2859. doi:10.1021/jasms.1c00267
71. Mulani FA, Nandikol SS, Haldar S, Thulasiram H V. Accurate Identification of Bioactive Meliaceae Limonoids by UHPLC–MS/MS Based Structure–

Fragment Relationships (SFRs). *ACS Omega*. 2021;6(40):26454-26476. doi:10.1021/acsomega.1c03697

72. Cui Z, Li Y, Zhao M, et al. MS diagnostic model and rapid distinguishing of bioactive limonoids in fruits of *Melia toosendan* using solid-phase extraction coupled with LC–MS/MS. *Phytochemical Analysis*. 2021;32(3):308-317. doi:10.1002/pca.2977
73. Sun Y, Li Q, Sun Y, et al. Limonoids with Diverse Oxidation Patterns of C-12 Indicating a Complete Ring C- *seco* Biogenetic Pathway from *Munronia unifoliolata*. *J Nat Prod*. 2021;84(8):2352-2365. doi:10.1021/acs.jnatprod.1c00519
74. Zhang Y, Tang CP, Ke CQ, Li XQ, Xie H, Ye Y. Limonoids from the fruits of Melia toosendan. *Phytochemistry*. 2012;73:106-113. doi:10.1016/j.phytochem.2011.10.001
75. Kraus W, Bokel M. Neue Tetranortriterpenoide aus Melia azedarach Linn. (Meliaceae). *Chem Ber*. 1981;114(1):267-275. doi:10.1002/cber.19811140129
76. Zhang Y, Wang JS, Luo J, Kong LY. *Novel Nortriterpenoids from Aphanamixis Grandifolia*. Vol 59.; 2011.
77. Yang MH, Wang JS, Luo JG, Wang XB, Kong LY. Tetranortriterpenoids from *Chisocheton paniculatus*. *J Nat Prod*. 2009;72(11):2014-2018. doi:10.1021/np900485t
78. Kamperdick C, Phuong NM, Adam G, Van Sung T. Guaiane dimers from Xylopia vielana. *Phytochemistry*. 2003;64(4):811-816. doi:10.1016/j.phytochem.2003.08.003
79. Mizukawa K, Hase T. *TRICHILININ, A N E W HEXACYCLIC LIMONOID FROM TRICHILIA ROKA t t*. Vol 26.; 1987.
80. Forim MR, da Silva MF das GF, Cass QB, Fernandes JB, Vieira PC. Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in Brazilian seeds and oil of Azadirachta indica: application to quality control

and marketing. *Analytical Methods*. 2010;2(7):860. doi:10.1039/c0ay00008f

81. Pamplona S, Arruda M, Castro K, et al. Phragmalin Limonoids from Swietenia macrophylla and Their Antifeedant Assay against Mahogany Predator. *J Braz Chem Soc*. Published online 2018. doi:10.21577/0103-5053.20180033
82. Severino VGP, Braga PAC, da Silva MF das GF, et al. Cyclopropane- and spirolimonoids and related compounds from Hortia oreadica. *Phytochemistry*. 2012;76:52-59. doi:10.1016/j.phytochem.2011.12.016
83. Yuan C, Zhang Y, Tang G, et al. Senegalensions A–C, Three Limonoids from *Khaya senegalensis*. *Chem Asian J*. 2012;7(9):2024-2027. doi:10.1002/asia.201200320
84. Nakatani M, Shimokoro M, Zhou JB, et al. Limonoids from Melia toosendan. *Phytochemistry*. 1999;52(4):709-714. doi:10.1016/S0031-9422(99)00332-5
85. An FL, Luo J, Li RJ, et al. Spirotrichilins A and B: Two Rearranged Spirocyclic Limonoids from *Trichilia connaroides*. *Org Lett*. 2016;18(8):1924-1927. doi:10.1021/acs.orglett.6b00738
86. Fan X, Lin P, Lu X, Zi J. A new spiro-type limonoid from Azadirachta indica A. Juss. *Tetrahedron Lett*. 2019;60(16):1158-1160. doi:10.1016/j.tetlet.2019.03.050
87. An FL, Luo J, Li RJ, et al. Spirotrichilins A and B: Two Rearranged Spirocyclic Limonoids from *Trichilia connaroides*. *Org Lett*. 2016;18(8):1924-1927. doi:10.1021/acs.orglett.6b00738
88. Sun Y, Li Q, Sun Y, et al. Limonoids with Diverse Oxidation Patterns of C-12 Indicating a Complete Ring C- *seco* Biogenetic Pathway from *Munronia unifoliolata*. *J Nat Prod*. 2021;84(8):2352-2365. doi:10.1021/acs.jnatprod.1c00519

CAPÍTULO 2

Testes biológicos em células tumorais

RESUMO

Este capítulo aborda a importância dos produtos naturais na descoberta de novos compostos bioativos, destacando os limonoides, os quais são amplamente distribuídos em espécies vegetais das famílias Rutaceae e Meliaceae, esses tetranortriterpenos são reconhecidos por suas propriedades citotóxicas. O câncer, sendo uma das principais causas de mortalidade global, demanda novas abordagens terapêuticas com maior seletividade e menos efeitos colaterais. Nesse contexto, os limonoides foram avaliados quanto à sua atividade frente a diferentes linhagens celulares tumorais. Foram realizados ensaios de viabilidade celular por MTT utilizando as linhagens MRC-5 (não-tumoral), A549 (câncer de pulmão), A2780 (câncer de ovário) e B16F10 (melanoma murino). Os limonoides 02 e 09 apresentaram atividades citotóxicas relevantes, sendo o limonoide 09 o mais promissor, especialmente frente à linhagem A2780, com um índice de seletividade (IS) superior a 1, indicando maior toxicidade seletiva para células tumorais. Além disso, em células de melanoma B16F10, os limonoides 02, 03 e 04 mostraram efeito inibitório, com destaque para o limonoide 03, que induziu a expressão do gene Caspase-3, sugerindo envolvimento em apoptose. Já o limonoide 02 aumentou a expressão de HIF-1α, relacionado à resposta celular à hipóxia. Os resultados destacam o potencial dos limonoides como candidatos a agentes antitumorais, sendo moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos oncológicos.

ABSTRACT

This chapter addresses the importance of natural products in the discovery of new bioactive compounds, highlighting limonoids, which are widely distributed in plant species of the Rutaceae and Meliaceae families. These tetranortriterpenoids are recognized for their cytotoxic properties. Cancer, being one of the leading causes of global mortality, demands new therapeutic approaches with greater selectivity and fewer side effects. In this context, limonoids were evaluated for their activity against different tumor cell lines. Cell viability assays using the MTT method were performed with the MRC-5 (non-tumoral), A549 (lung cancer), A2780 (ovarian cancer), and B16F10 (murine melanoma) cell lines. Limonoids 02 and 09 exhibited relevant cytotoxic activities, with limonoid 09 being the most promising, especially against the A2780 cell line, showing a selectivity index (SI) greater than 1, indicating higher selective toxicity toward tumor cells. Additionally, in B16F10 melanoma cells, limonoids 02, 03, and 04 showed inhibitory effects, with limonoid 03 standing out by inducing the expression of the Caspase-3 gene, suggesting involvement in apoptosis. Limonoid 02, in turn, increased the expression of HIF-1α, related to the cellular response to hypoxia. The results highlight the potential of limonoids as antitumor candidates and promising molecules for the development of new anticancer drugs.

1 INTRODUÇÂO

1.1 O câncer – uma breve contextualização

O termo genérico “câncer” refere-se a um conjunto de doenças que possuem a característica de criar células anormais, as quais crescem de forma desordenada, podendo invadir outras partes do corpo humano, esse processo é denominado de metástase.[1]

O câncer, afeta de forma severa a população mundial, sendo a primeira ou segunda causa de mortes antes dos 70 anos na maioria dos países, caracterizando-o como o principal problema de saúde pública no mundo.[2] Em 2020 a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC – do inglês - *International Agency for Research on Cancer*), relatou a ocorrência de 19,3 milhões de casos de câncer.[2]

A célula duplica o DNA para iniciar a divisão celular, esse DNA pode ser danificado por agentes mutagênicos de origem interna ou externa, esses danos são reparados pelo próprio organismo, entretanto, quando se tem uma falha na reparação desses danos uma pequena fração pode ser convertida em mutações permanentes ao DNA, o qual é replicado dando origem a células mutantes. A proliferação desregulada dessas células faz com haja um acumulo celular, no tecido ou órgão, dando origem ao tumor.[3] Além da pré-disposição hereditária, existem fatores de risco que atuam como aceleradores dessas mutações, como o uso de tabaco, consumo de álcool, má alimentação, poluição do ar, etc.[1]

Nas abordagens terapêuticas utilizadas para o tratamento de pessoas com câncer se destacam a cirurgia, radioterapia e quimioterapia.[4] As duas últimas são os tratamentos mais frequentes.[5] Com uma função de inibir a proliferação celular e a multiplicação tumoral, a quimioterapia ganha destaque, pois a utilização de agentes quimioterápicos eliminas as células que se multiplicam de forma mais acelerada, de modo a combater a células cancerígenas, entretanto, a quimioterapia causa muitos efeitos colaterais, como náusea, fadiga, interfere na

condição física e psicológica.[5] Buscar substâncias químicas que sejam potencialmente ativas contra as células tumorais e que causem menos efeitos colaterais é de suma importância.

1.2 Produtos Naturais – Fonte de moléculas bioativas

A utilização de produtos naturais como fonte de medicamento é feita pela humanidade desde tempos imemoriais, ao longo da história esses metabólitos extraídos de fontes naturais têm contribuído de forma significativa para a farmacoterapia, pois seu uso na medicina tradicional fornece informações sobre a segurança e eficácia. Somado a isso, a complexidade e variedade estrutural desses metabólitos torna a natureza uma excelente fonte de buscar por moléculas bioativas.[6,7]

As plantas são utilizadas como uma alternativa para o tratamento do câncer, mais de 3000 plantas já foram relatadas possuindo atividade anticancerígena.[8] Dentro do segmento oncológico, antes de 1980, 53% dos fármacos eram de origem natural ou derivados, após essa data esse número caiu para 33,5%, contudo esse valor sobe para que 65% quando considerado os fármacos miméticos ou sintéticos baseados em moléculas naturais.[9] O Paclitaxel, por exemplo, é um medicamento aprovado pelo FDA para o tratamento de vários tipos de câncer, foi isolado da casca e das agulhas de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) em 1971, e a morfina, utilizada para a sedação e aliviar a dor, foi isolado de *Papaver somniferum*.[10–12] Antes da descoberta do antibiótico penicilina do fungo *Penicillium chrysogenum*, doenças bacterianas como pneumonia e a meningite eram doenças devastadoras[13,14]

A natureza é uma fonte inesgotável de moléculas candidatas à agentes terapêuticos, dentre a grande diversidade estrutural, os limonoides se destacam por apresentarem estruturas moleculares complexas, podendo conter substituintes periféricos que aumentam a sua capacidade de interagir com os alvos biológicos.[15]

1.3 Limonoides fonte de atividade antitumoral

Excelentes trabalhos na literatura com limonoides de anéis intactos, anéis *secos* e com rearranjo, frente a células tumorais, demonstram o potencial biológico dos tetranortriterpenos como anticancerígenos. Alguns limonoides, isolados de *Walsura robusta*, derivados da cedrelona mostraram citotoxicidade contra as linhas tumorais HL-60, SMMC-7721, A549, MCF-7 e SW480, variando o IC_{50} de 0,4 – 17, μM.[16] Outros limonoides da classe nimbina (*C-seco*) extraídos de sementes de *Azadirachta indica*, apresentaram atividade inibitória em linhagem tumoral de mama (MDA-MB-231) com um IC_{50} de 21,5 μM.[17] Os limonoides da classe nimbolinina isolados das cascas e frutos de *Melia toosendan* exibiram atividade citotóxica contra as linhas A-549, MCF-7, HL-60, SMMC-7721 e SW480 com IC_{50} de 21,5–31,8 μM.[15,18,19] Os limonoides da classe fragmalina isolados de *Chukrasia tabularis* demonstraram efeitos citotóxicos em linhagens de células de câncer de mama (MCF-7).[15,20]

Uma pequena fração de exemplos de limonoides com atividade citotóxica foi demonstrada acima, mostrando que a natureza e as diversas estruturas de limonoides podem servir como moléculas candidatas ou inspiradoras para novos fármacos.

2 OBJETIVO

Avaliar o potencial citotóxico de limonoides isolados frente a diferentes linhagens tumorais e entender possíveis mecanismos moleculares associados à sua atividade biológica.

3 METODOLOGIA

Os testes biológicos frente as células tumorais foram desenvolvidas por outros grupos de pesquisas, ainda são resultados preliminares, mas que mostram a importância de buscar nos produtos naturais moléculas que sejam

ativas frente aos alvos biológicos de interesse. Os limonoides são descritos contendo excelentes atividades inseticida, contudo, nesse estudo o alvo foi direcionado às células tumorais.

As metodologias e resultados serão apresentados de acordo com os grupos que desenvolveram os ensaios biológicos. O primeiro ensaio foi desenvolvido pela Dra. Karine Zanotti (UFSCar) e o segundo ensaio pelo Dr. Alan Ochioni (UFRJ).

3.1 Ensaio de Viabilidade Celular (IC_{50})

A determinação da atividade citotóxica dos limonoide 02 e 09 foi realizada nas linhagens celulares MRC-5 (não-tumoral de pulmão), A549 (tumoral de pulmão) e A2780 (tumoral de ovário) por meio do método colorimétrico utilizando brometo de 3-(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) como reagente de viabilidade celular. Este método consiste na redução do sal de MTT de coloração amarela em cristais roxos de Formazan através da ação de enzimas presentes em células viáveis (vivas). O número de células viáveis é proporcional ao número de cristais formados, permitindo sua quantificação.[21]

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de $1,5x10^4$ células/poço, em 150 µL de meio de cultura, sendo o meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) para as linhagens MRC-5 e A549 e Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para a linhagem A2780, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS).

Após 24 h de incubação sob as condições de 5% de CO_2 a 37°C, as células foram tratadas com 0,75 µL das soluções das amostras solubilizadas em DMSO em oito concentrações diferentes (de 100 a 0,78 µg/mL e de 400 a 3,13 µg/mL), sendo realizadas 6 réplicas de cada concentração. As células também foram tratadas separadamente com o controle contendo apenas DMSO. Após o

tratamento com as amostras, as placas foram novamente mantidas na incubadora sob as mesmas condições (5% de CO_2 a 37°C) por 48 h. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de uma solução de MTT (1 mg/mL) em cada poço e as placas foram incubadas por mais 4 h. Após este período, a solução de cada poço foi cuidadosamente descartada e foram adicionados 100 µL de isopropanol por poço a fim de solubilizar os cristais de Formazan formados.

A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 540 nm com o auxílio de um espectrofotômetro de microplaca (Epoch). Os valores de IC_{50}, desvio padrão (SD) e R^2 foram calculado utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 e a viabilidade celular (% células vivas) foi obtida utilizando Excel através do seguinte cálculo:

$$\%\ \text{Viabilidade} = \frac{\text{Média da absorbância do composto}}{\text{Média da absorbância do controle}}\ \text{x}\ 100$$

O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da fórmula:

$$\text{IS} = \frac{\text{IC}_{50}\ \text{linhagem não tumoral}}{\text{IC}_{50}\ \text{linhagem tumoral}}$$

Segundo ensaio de viabilidade celular em células B16F10 (melanoma agressivo murino).

O segundo protocolo de viabilidade celular utilizou:

- Células B16-F10
- Meio de cultura (DMEM com 10% de FBS + antibióticos)
- Reagente MTT
- Placa de 96 poços
- Estufa a 37 ºC com 5% de CO_2

A metodologia de viabilidade celular por MTT ocorreu nas seguintes etapas:

1) Preparação das células

- Semear as células B16-F10 em placas de 96 poços a uma densidade de 5.000–10.000 células/poço, em 100 µL de meio de cultura.

- Incubar a 37 °C com 5% CO_2 por 24 horas para aderência.

2) Tratamento

- Após aderência, tratar com o(s) composto(s) de interesse diluído(s) em meio (volume final 100 µL/poço).

- Incluir controles:

- Controle negativo (sem tratamento)

- Células foram incubadas com os compostos limonoides sub 02, 03 e 04 por

3) Adição de MTT

- Adicionar 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) a cada poço (concentração final: 0,5 mg/mL).

- Incubar por 3–4 h a 37 °C, protegido da luz. As células vivas reduzirão MTT a cristais roxos de formazan.

4) Dissolução dos cristais de formazan

- Remover cuidadosamente o meio (sem perturbar os cristais).

- Adicionar 100 µL de DMSO por poço para solubilizar o formazan.

- Opcional: agitar suavemente por 10–15 minutos em agitador a temperatura ambiente.

5) Leitura

- Medir a absorbância a 570 nm (com correção em 630 nm se disponível).

- O valor do branco deve ser subtraído de todas as leituras.

No experimento de qPCR a concentração utilizada dos limonoides foi de 50μM pelo tempo de 24h. O método de análise foi a quantificação relativa ou CT comparativo.

Os parâmetros de ciclagem de temperatura e programa de amplificação seguiu as seguintes etapas:

1) Ativação da polimerase (se Hot Start):
- 95 ºC por 2-5 minutos.

2) Ciclagem (40 ciclos):
- Desnaturação: 95 ºC por 15 segundos
- Anelamento/Extensão: 60 ºC por 30 segundos (ajustável conforme Tm do primer)

3) Curva de dissociação (melting curve):
- 65-95 ºC com aumento gradual (0,5 a cada 5-10 segundos)
- Verificar a especificidade da amplificação (sem dímeros ou produtos inesperados)

Para quantificação relativa foi utilizado o método ΔΔCT ou 2^(-ΔΔCT) (comparativo de CT), o qual é usado para comparar a expressão relativa de genes entre duas condições (Controle vs. Tratado), normalizando por um gene de referência (housekeeping).

1) CT (Threshold Cycle): ciclo em que a fluorescência ultrapassa o limiar
2) ΔCT = CT do gene alvo – CT do gene referência (Exemplo de houseKeeping: GAPDH, β-actina)
3) ΔΔCT = ΔCT da amostra tratada – ΔCT da amostra controle
4) Razão de expressão relativa = 2^(- ΔΔCT)

Durante o ensaio foram utilizadas unicamente células de melanoma agressivo de murino (camundongos). O controle para o ensaio são células de melanoma viáveis e sem contato com os compostos avaliados.

4 RESULTADOS

A discussão dos resultados será apresentada na ordem dos testes biológicos.

4.1 Linhagem MRC-5: pulmão não-tumoral

O limonoide 09, a partir das concentrações testadas de 100 a 0,78 µg/mL, apresentou valor de IC_{50} = 34,70 ± 0,29 e R^2 = 0,958 ± 0,02. A partir do cálculo de viabilidade celular, na concentração máxima de 100 µg/mL, a amostra apresentou 32,95% de células vivas, inibindo o crescimento celular em 67,05%, já nas concentrações menores, não houve inibição celular maior do que 50%, mostrando que a amostra não apresenta citotoxicidade para células saudáveis nas demais concentrações testadas.

O limonoide 02, a partir das concentrações testadas de 100 a 0,78 µg/mL, apresentou valor de IC_{50} = 60,59 ± 0,81 e R^2 = 0,992 ± 0,001. A partir do cálculo de viabilidade celular, na concentração máxima de 100 µg/mL, a amostra apresentou apenas 21,84% de células vivas, inibindo o crescimento celular em 78,16%, já nas concentrações menores, não houve inibição celular maior do que 50%, mostrando que a amostra não apresenta citotoxicidade para células saudáveis nas demais concentrações testadas.

4.2 Linhagem A549: tumoral de pulmão

O limonoide 09, a partir das concentrações testadas de 400 a 3,13 µg/mL, apresentou valor de IC_{50} = 57,64 ± 0,27 e R^2 = 0,953 ± 0,02. A partir do cálculo de viabilidade celular, na concentração máxima de 400 µg/mL, a amostra

apresentou apenas 30,63% de células vivas, inibindo o crescimento celular em 69,37%. A partir dos valores de IC_{50} da linhagem não-tumoral MRC-5, foi calculado o índice de seletividade desta amostra, IS = 0,60 (IS < 1, não tem seletividade para as células tumorais).

O limonoide 02, a partir das concentrações testadas de 400 a 3,13 µg/mL, apresentou valor de IC_{50} = 199,75 ± 0,64 e R^2 = 0,994 ± 0,003. A partir do cálculo de viabilidade celular, na concentração máxima de 400 µg/mL, a amostra apresentou apenas 20,15% de células vivas, inibindo o crescimento celular em 79,85%. A partir dos valores de IC_{50} da linhagem não-tumoral MRC-5, foi calculado o índice de seletividade desta amostra, IS = 0,30 (IS < 1, não tem seletividade para as células tumorais).

4.3 Linhagem A2780: tumoral de ovário

O limonoide 09, a partir das concentrações testadas de 100 a 0,78 µg/mL, apresentou valor de IC_{50} = 21,86 ± 0,84 e R^2 = 0,964 ± 0,01. A partir do cálculo de viabilidade celular, na concentração máxima de 100 µg/mL, a amostra apresentou apenas 28,95% de células vivas, inibindo o crescimento celular em 71,05%. A partir dos valores de IC_{50} da linhagem não-tumoral MRC-5, foi calculado o índice de seletividade desta amostra, IS = 1,59 (IS próximo a 2 apresenta seletividade para as células tumorais).

O limonoide 02, a partir das concentrações testadas de 400 a 3,13 µg/mL, apresentou valor de IC_{50} = 128,60 ± 0,85 e R^2 = 0,943 ± 0,02. A partir do cálculo de viabilidade celular, na concentração máxima de 400 µg/mL, a amostra apresentou apenas 18,37% de células vivas, inibindo o crescimento celular em 81,63%. A partir dos valores de IC_{50} da linhagem não-tumoral MRC-5, foi calculado o índice de seletividade desta amostra, IS = 0,47 (IS < 1, não tem seletividade para as células tumorais).

Uma comparação com fármacos já utilizados, cisplatina e doxorrubicina (Tabela 4.1), o limonoide 09 apresentou um IC_{50} mais elevado do que os fármacos, porém observou-se para esse limonoide uma seletividade para células tumorais de ovário, indicando que esse tetranortriterpeno pode ser usado como modelo para futuras testes biológicos.

Tabela 4.1 - Valores de IC_{50} dos fármacos cisplatina e doxorrubicina

	IC_{50} µg/mL (± DP)			índice de seletividade (IS)	
Fármacos comerciais	**MRC5 (saudável)**	**A549 (pulmão)**	**A2780 (ovário)**	**A549**	**A2780**
cisplatina	5.72 ± 0.57	4.32 ± 1.40	3.51 ± 0.30	1,32	1,63
doxorrubicina	13.19 ± 1.209	2.21 ± 0.154	-	5,97	-

4.4 Linhagem B16F10 (melanoma agressivo murino)

No segundo ensaio de viabilidade celular desenvolvido para células B16F10 (melanoma agressivo murino), foram testados os limonoides 02, 03 e 04. Esse limonoides são todos da classe *C-seco*, da subclasse nimbolinina. Em um teste preliminar que as três estruturas apresentaram atividades significativas nas concentrações de 50 – 200 µM quando comparadas com o controle.

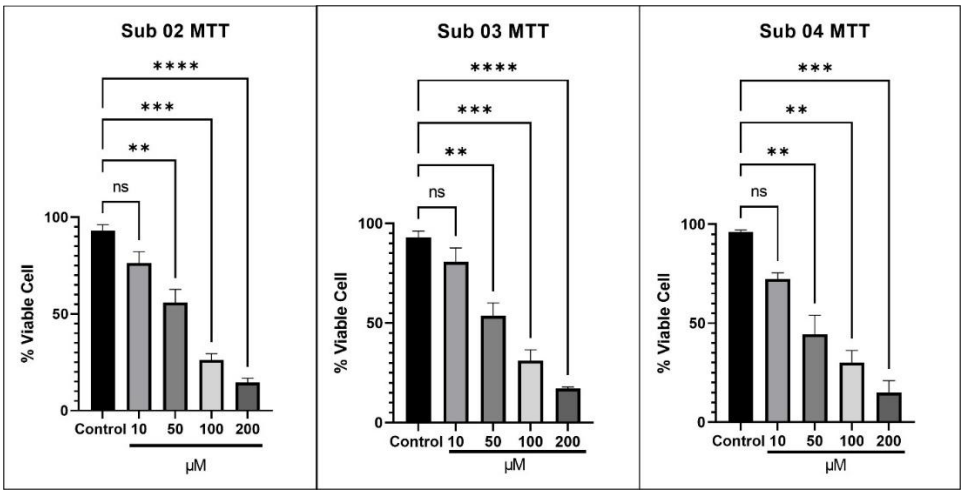


Figura 4.1 - Ensaio de viabilidade celular em células B16F10 em diferentes concentrações dos limonoides 02, 03 e 04.

O ensaio de expressão do RNA dos genes *Caspase3*, *Angiopt* e *HIF-1α*, mostrou um resultado significativo para o limonoide 03 comparado ao controle para a caspase 3, essa proteína desempenha um papel fundamental no processo de apoptose, sendo uma caspase efetora o aumento da expressão do seu gene pode sugerir que o processo de morte desencadeado pelo tratamento com o composto sub 03 pode estar ligado a promoção de apoptose nas células. Em relação ao gene *Angiopt* ligado a angiogênese os compostos não alteraram sua expressão, indicando à princípio que os compostos não interferem com fatores ligados a criação de novos vasos sanguíneos e metástase. Por fim, a expressão do RNA do gene HIF-1α é estatisticamente significativo quando tratado com o limonoide 02, esse resultado sugere que esse tetranortriterpeno induziu um aumento de HIF-1a, o que está relacionado a uma resposta da célula à hipóxia, baixa concentração de oxigênio.

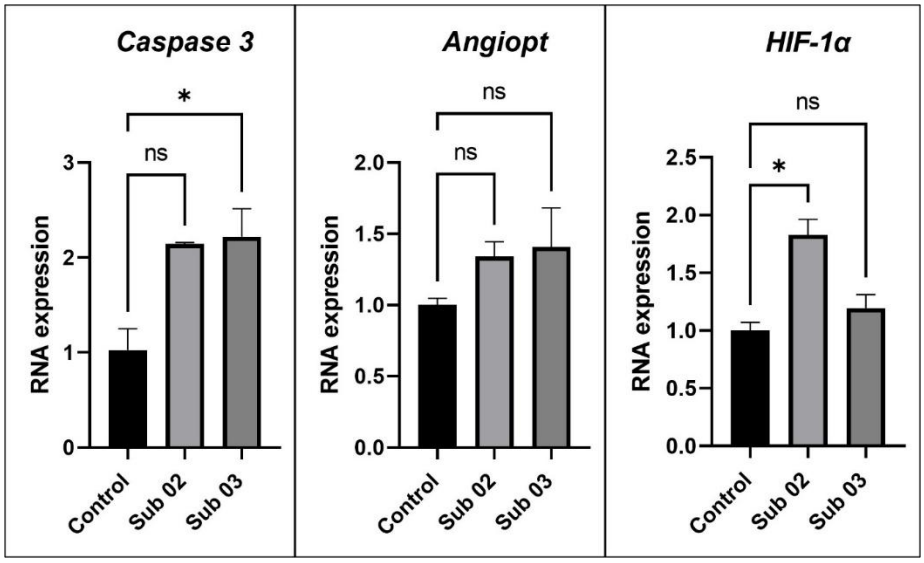


Figura 4.2 - Expressão genética quando célula B16F10 foi ensaiada na presença dos limonoides 02, 03 e 04 na concentração de 50µM para cada composto.

5 CONCLUSÃO

Os resultados acima são preliminares, porém são satisfatórios em demonstrar que os esforços demandados para o isolamento e a caracterização de metabólitos secundários, em especial os limonoides, contribuíram para a identificação de compostos promissores à atividade anticancerígena.

A compreensão estrutural desses metabólitos pode levar a ideias de possíveis fármacos no combate não apenas do câncer, mais de outros doenças humanas e na agricultura. Embora o isolamento e a caracterização de novos metabólitos sejam desafiadores, a natureza ainda é a maior fonte de moléculas bioativas, e cabe ao químico de produtos naturais se esforçar na busca de novos metabólitos eficazes a doenças e pragas agrícolas.

REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Câncer. February 3, 2025. Accessed May 31, 2025. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer
2. *Ministério Da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes Da Silva Ministério Da Saúde Instituto Nacional de Câncer*.; 2023.
3. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-724. doi:10.1038/nature07943
4. Instituto Nacional de Câncer - INCA. Tratamento do câncer. July 5, 2022. Accessed June 10, 2025. https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento
5. Silveira FM, Wysocki AD, Mendez RDR, et al. Impacto do tratamento quimioterápico na qualidade de vida de pacientes oncológicos. *Acta Paulista de Enfermagem*. 2021;34. doi:10.37689/acta-ape/2021AO00583
6. Viegas C, Da V, Bolzani S, Barreiro EJ. *OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA*. Vol 29.; 2006.
7. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(3):200-216. doi:10.1038/s41573-020-00114-z
8. Seca A, Pinto D. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):263. doi:10.3390/ijms19010263
9. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020;83(3):770-803. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285
10. Brook K, Bennett J, Desai SP. The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. *J Anesth Hist*. 2017;3(2):50-55. doi:10.1016/j.janh.2017.02.001

11. Brook K, Bennett J, Desai SP. The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. *J Anesth Hist*. 2017;3(2):50-55. doi:10.1016/j.janh.2017.02.001
12. Li Z, Chen K, Rose P, Zhu YZ. Natural products in drug discovery and development: Synthesis and medicinal perspective of leonurine. *Front Chem*. 2022;10. doi:10.3389/fchem.2022.1036329
13. Fleming A. *ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZ?1E*.
14. Moore BS, Newman DJ. The Extraordinary Benefit of Nature's Chemistry to Health, Society, and the Economy. *J Nat Prod*. Published online June 12, 2025. doi:10.1021/acs.jnatprod.5c00554
15. Wang Q, Kou B, Wang J, et al. Limonoids and semisynthetic derivatives as anticancer agents: Recent research progress and future perspectives. *Bioorg Chem*. 2025;161:108520. doi:10.1016/j.bioorg.2025.108520
16. Hou L, Mei CX, Yuan CM, et al. Five new limonoids isolated from Walsura robusta. *Nat Prod Bioprospect*. 2023;13(1):7. doi:10.1007/s13659-023-00371-6
17. Lin P, Fan X, Lu X, Xia G, Zi J. Four limonoids from Bacillus subtilis-fermented neem seeds and their cytotoxic activity. *Fitoterapia*. 2019;135:73-78. doi:10.1016/j.fitote.2019.04.004
18. Zhang Q, Zhang YG, Li QS, Min ZD. Two New Nimbolinin-Type Limonoids from the Fruits of *Melia toosendan*. *Helv Chim Acta*. 2016;99(6):462-465. doi:10.1002/hlca.201500516
19. ZHANG Q, ZHENG QH, SANG YS, SUNG HHY, MIN ZD. New limonoids isolated from the bark of Melia toosendan. *Chin J Nat Med*. 2018;16(12):946-950. doi:10.1016/S1875-5364(18)30136-5
20. Luo J, Wang JS, Wang XB, Luo JG, Kong LY. Phragmalin-Type Limonoid Orthoesters from Chukrasia tabularis var. velutina. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2011;59(2):225-230. doi:10.1248/cpb.59.225

21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4

APÊNDICE – Espectros 1D e 2D obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) com ampliações e correlações que levaram a caracterização dos limonoides e norlimonoides apresentados na tese.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PPGQ - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Isolamento e caracterização de novos limonoides em *Trichilia pallida* (Meliaceae) guiado por LC-MS/MS: Uma contribuição à quimiossistemática do gênero.

Volume II

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

***Bolsista CAPES**

São Carlos – SP

2025

Lista de Figuras

Figura 1 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T). 255

Figura 2 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 01 em C_6D_6 (9,4 T). .. 256

Figura 3 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 01 em C_6D_6 (9,4 T). 257

Figura 4 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 01 em C_6D_6 (9,4 T). 258

Figura 5 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T), as áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 259

Figura 6 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T). 260

Figura 7 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T). 261

Figura 8 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T). 262

Figura 9 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T). 263

Figura 10 - Mapa de contorno COSY do limonoide 01 em C_6D_6 (9,4 T). 264

Figura 11 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 266

Figura 12 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 267

Figura 13 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 268

Figura 14 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 269

Figura 15 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 270

Figura 16 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). AS áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 271

Figura 17 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 272

Figura 18 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 273

Figura 19 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 274

Figura 20 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 275

Figura 21 - Mapa de contorno COSY do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 276

Figura 22 - Espectro de RMN de DEPT 135 do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). 277

Figura 23 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 279

Figura 24 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 280

Figura 25 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 281

Figura 26 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 282

Figura 27 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 283

Figura 28 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 284

Figura 29 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 285

Figura 30 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 286

Figura 31 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 287

Figura 32 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 288

Figura 33 - Mapa de contorno COSY do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). 289

Figura 34 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 291

Figura 35 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 292

Figura 36 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 293

Figura 37 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 294

Figura 38 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 295

Figura 39 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 296

Figura 40 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 297

Figura 41 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 298

Figura 42 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 299

Figura 43 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 300

Figura 44 - Mapa de contorno COSY do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). 301

Figura 45 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 303

Figura 46 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 304

Figura 47 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 305

Figura 48 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 306

Figura 49 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 307

Figura 50 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T), as áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 308

Figura 51 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 309

Figura 52 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 310

Figura 53 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 311

Figura 54 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 312

Figura 55 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 313

Figura 56 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 314

Figura 57 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T). 315

Figura 58 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T). 317

Figura 59 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T). 318

Figura 60 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T). 319

Figura 61 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T). 320

Figura 62 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T). 321

Figura 63 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 322

Figura 64 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T). 323

Figura 65 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T). 324

Figura 66 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T). 325

Figura 67 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T). 326

Figura 68 - Mapa de contorno COSY do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T). 327

Figura 69 - Mapa de contorno COSY do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T). 329

Figura 70 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T). 330

Figura 71 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T). 331

Figura 72 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T). 332

Figura 73 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T). 333

Figura 74 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1), as áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 334

Figura 75 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T). 335

Figura 76 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T). 336

Figura 77 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T). 337

Figura 78 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T). 338

Figura 79 - Mapa de contorno COSY do limonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T). 339

Figura 80 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 341

Figura 81 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 342

Figura 82 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 343

Figura 83 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 344

Figura 84 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 345

Figura 85 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T), as áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 346

Figura 86 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 347

Figura 87 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 348

Figura 88 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 349

Figura 89 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 350

Figura 90 - Mapa de contorno COSY do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). 351

Figura 91 - Mapa de contorno ROESY do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T). ... 352

Figura 92 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 354

Figura 93 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 355

Figura 94 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 356

Figura 95 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 357

Figura 96 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 358

Figura 97 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 359

Figura 98 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 360

Figura 99 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 361

Figura 100 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 362

Figura 101 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 363

Figura 102 - Mapa de contorno COSY do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). 364

Figura 103 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). 366

Figura 104 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). 367

Figura 105 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). ... 368

Figura 106 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). 369

Figura 107 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). 370

Figura 108 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 371

Figura 109 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). 372

Figura 110 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). 373

Figura 111 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). 374

Figura 112 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). 375

Figura 113 - Mapa de contorno COSY do limonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T)..... 376

Figura 114 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 11 em C_6D_6 (9,4 T). 378

Figura 115 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 11 em C_6D_6 (9,4 T). 379

Figura 116 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 11 em C_6D_6 (9,4 T)..... 380

Figura 117 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 11 em C_6D_6 (9,4 T). 381

Figura 118 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 11 em C_6D_6 (9,4 T). 382

Figura 119 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 383

Figura 120 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T). 384

Figura 121 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T). 385

Figura 122 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T). 386

Figura 123 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T). 387

Figura 124 - Mapa de contorno COSY do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T)..... 388

Figura 125 - Mapa de contorno ROESY do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T). . 389

Figura 126 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). 391

Figura 127 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). 392

Figura 128 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). ... 393

Figura 129 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). 394

Figura 130 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). 395

Figura 131 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). As ampliações estão demonstradas nas páginas seguintes. 396

Figura 132 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). 397

Figura 133 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). 398

Figura 134 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). 399

Figura 135 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). 400

Figura 136 - Mapa de contorno COSY do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). ... 401

Figura 137 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 403

Figura 138 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 404

Figura 139 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 405

Figura 140 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 406

Figura 141 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 407

Figura 142 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes. 408

Figura 143 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 409

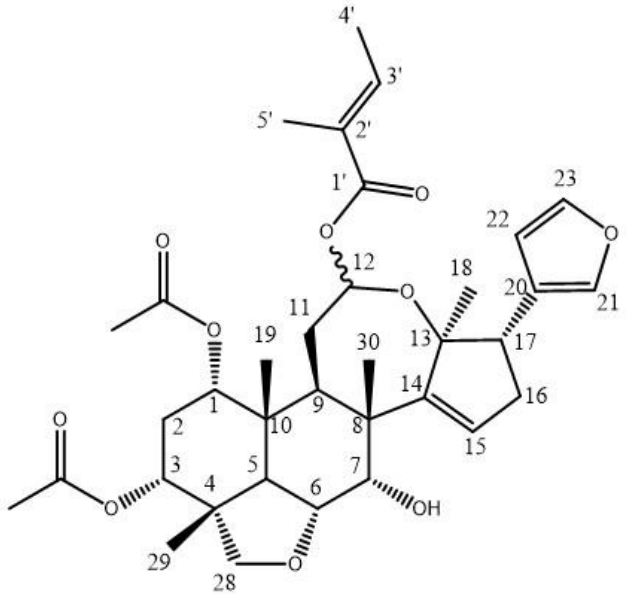
Figura 144 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 410

Figura 145 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 411

Figura 146 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 412

Figura 147 - Mapa de contorno COSY do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). 413

Limonoide 01 - 12-óxitigloil-munrolina A



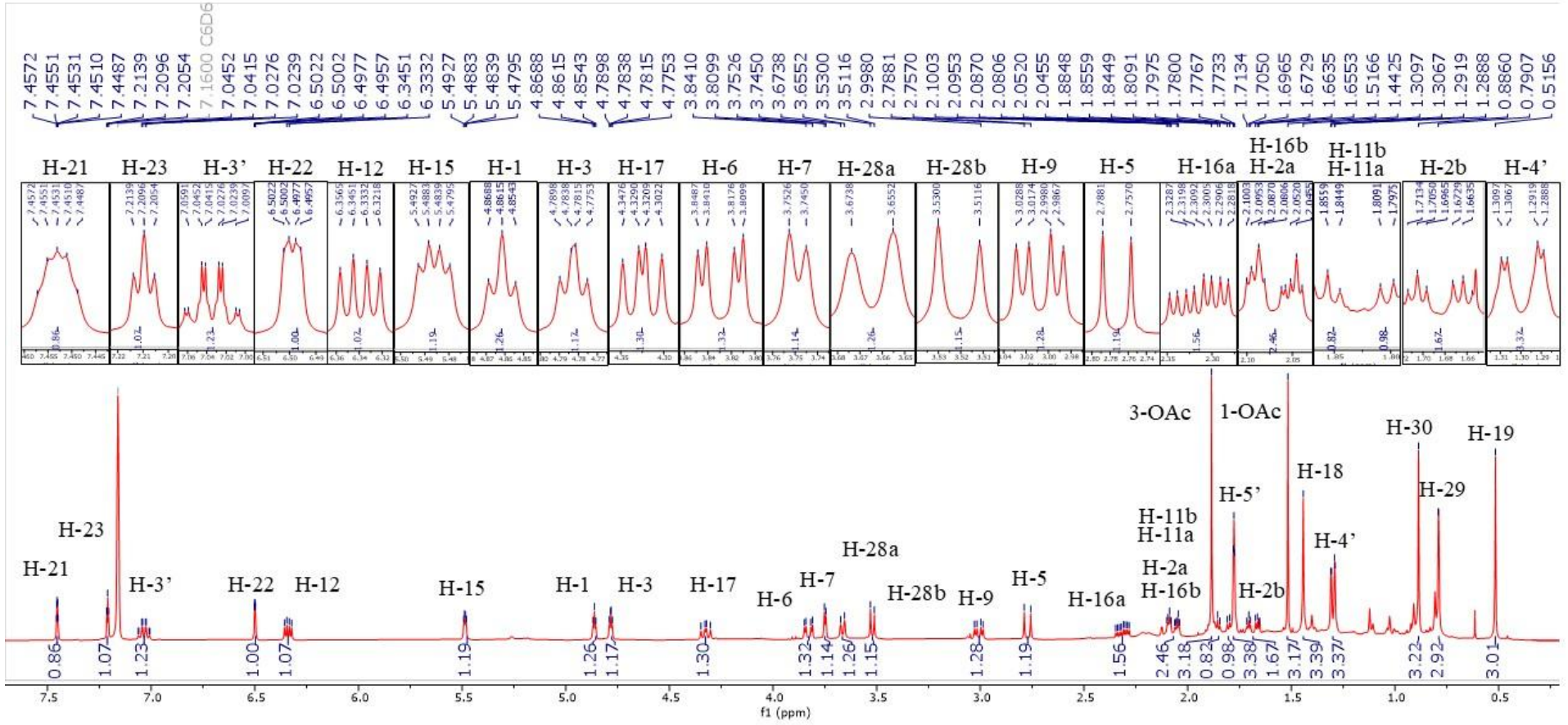


Figura 1 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 01 em C_6D_6 (9,4 T).

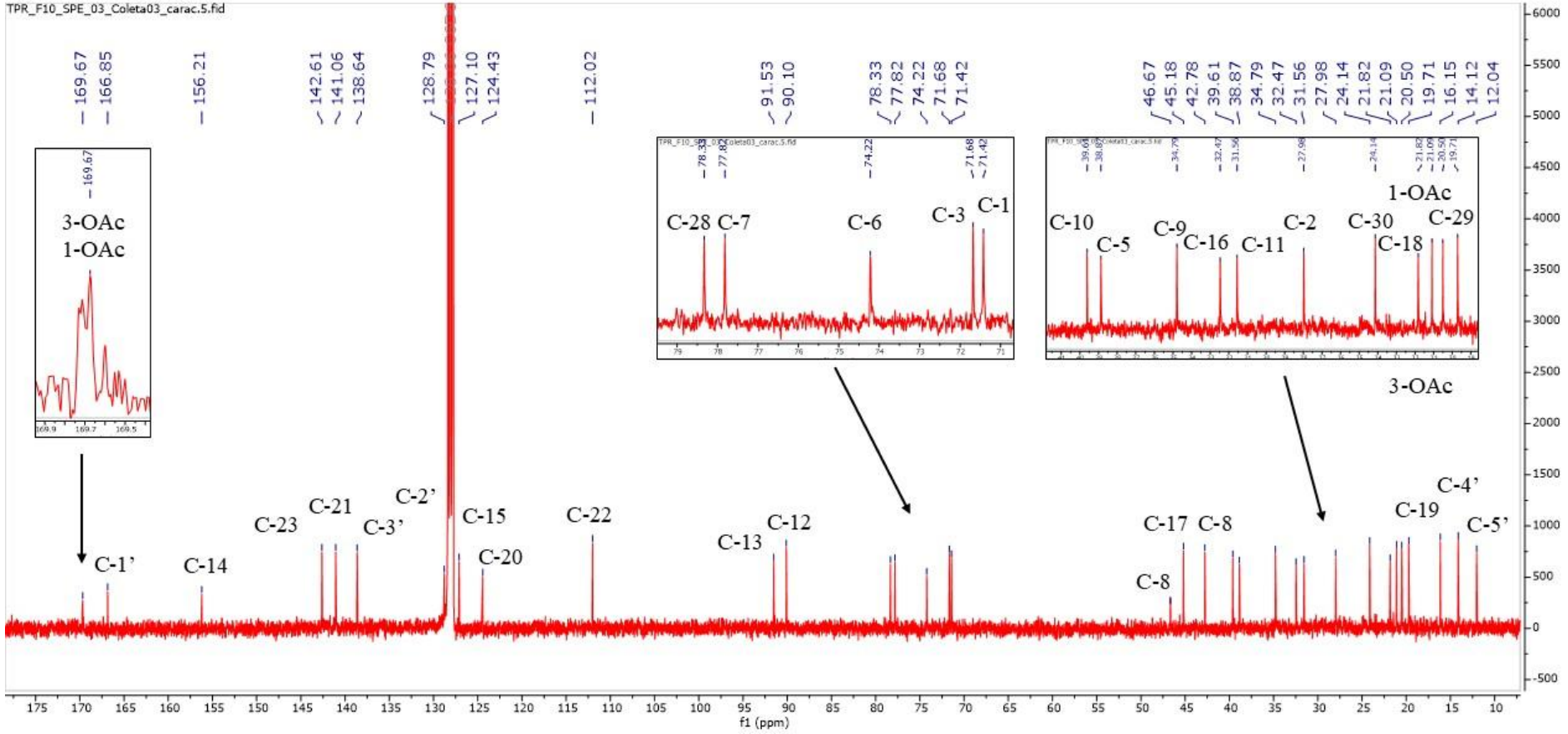


Figura 2 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 01 em C_6D_6 (9,4 T).

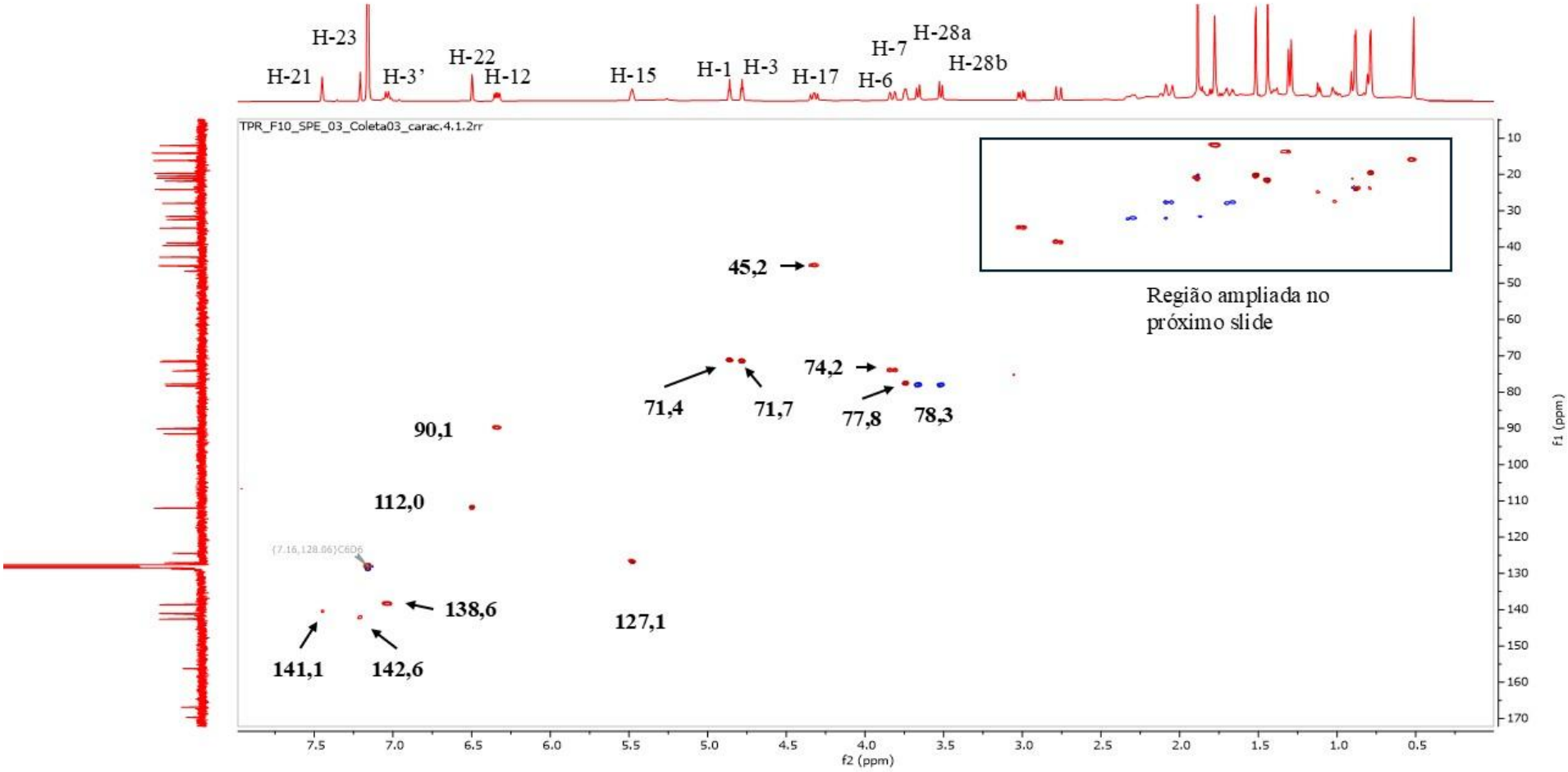


Figura 3 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 01 em C_6D_6 (9,4 T).

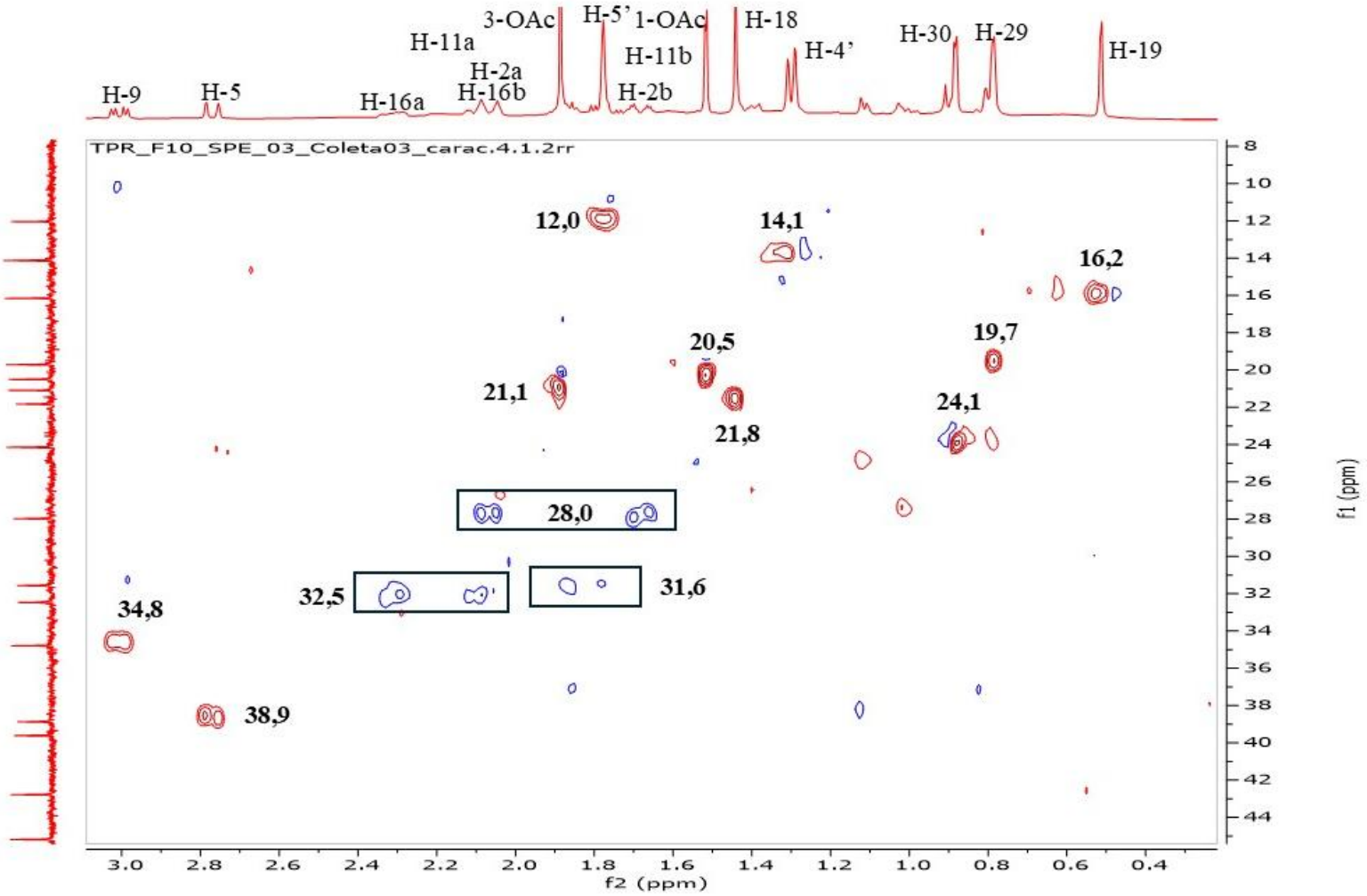


Figura 4 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 01 em C_6D_6 (9,4 T).

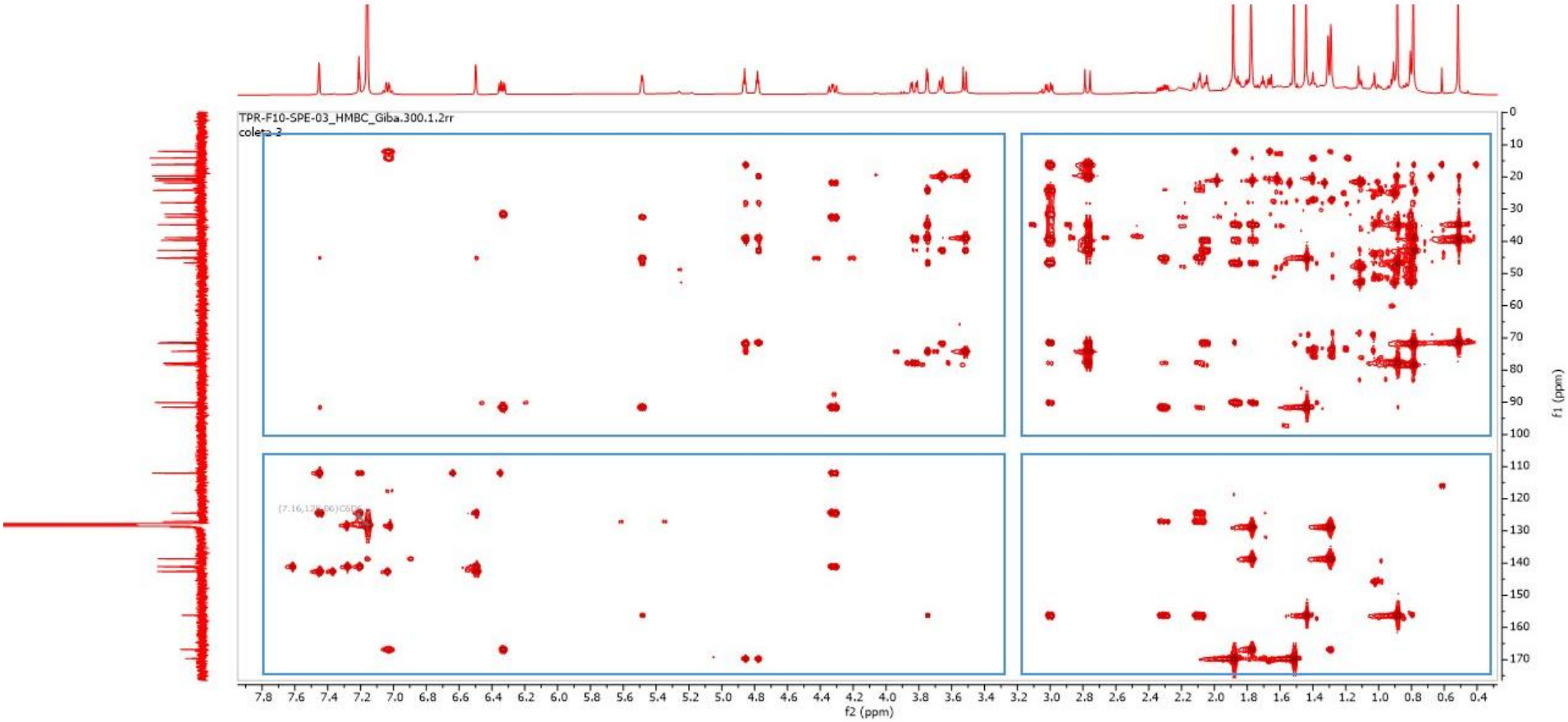


Figura 5 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T), as áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

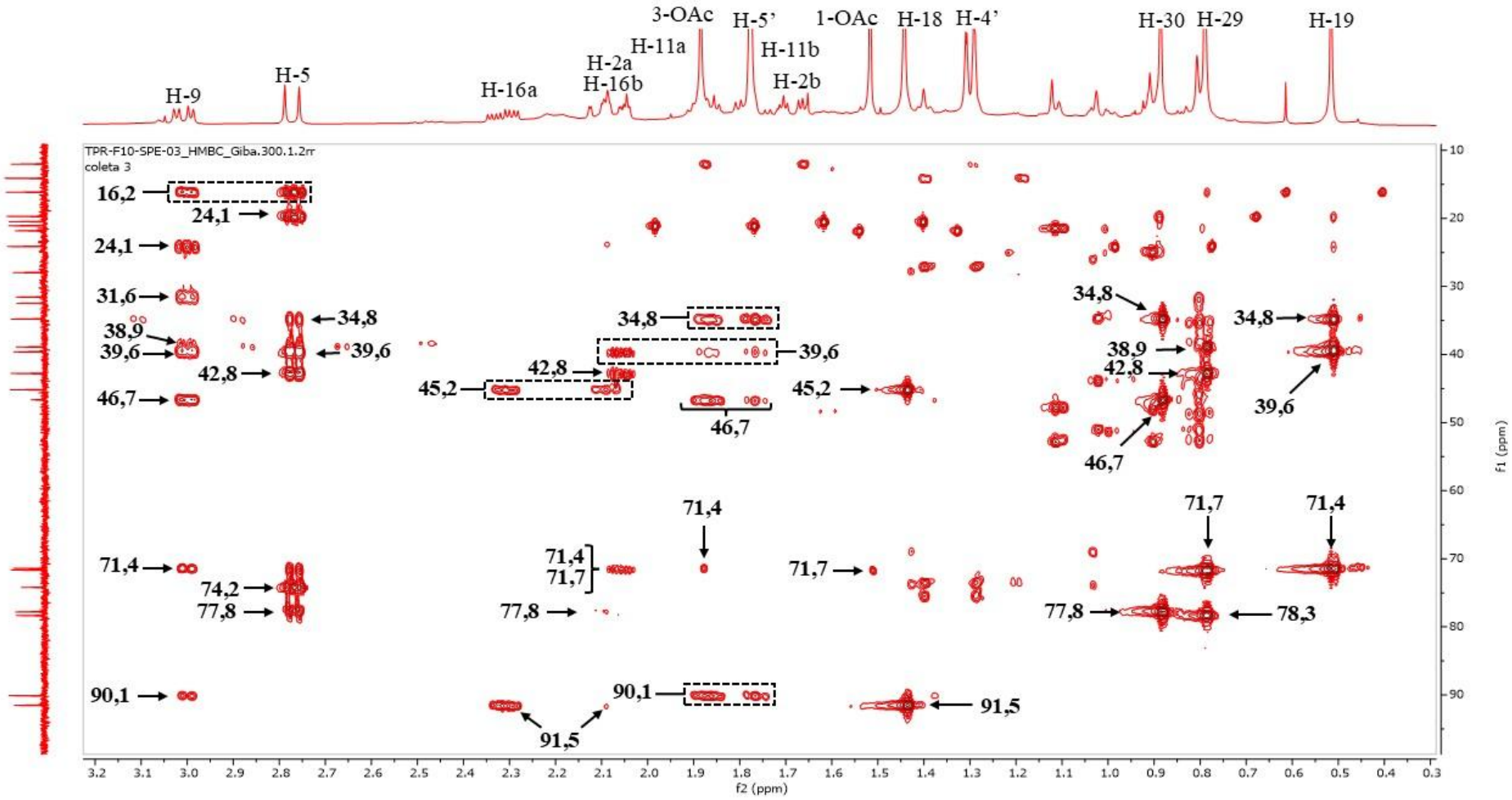


Figura 6 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T).

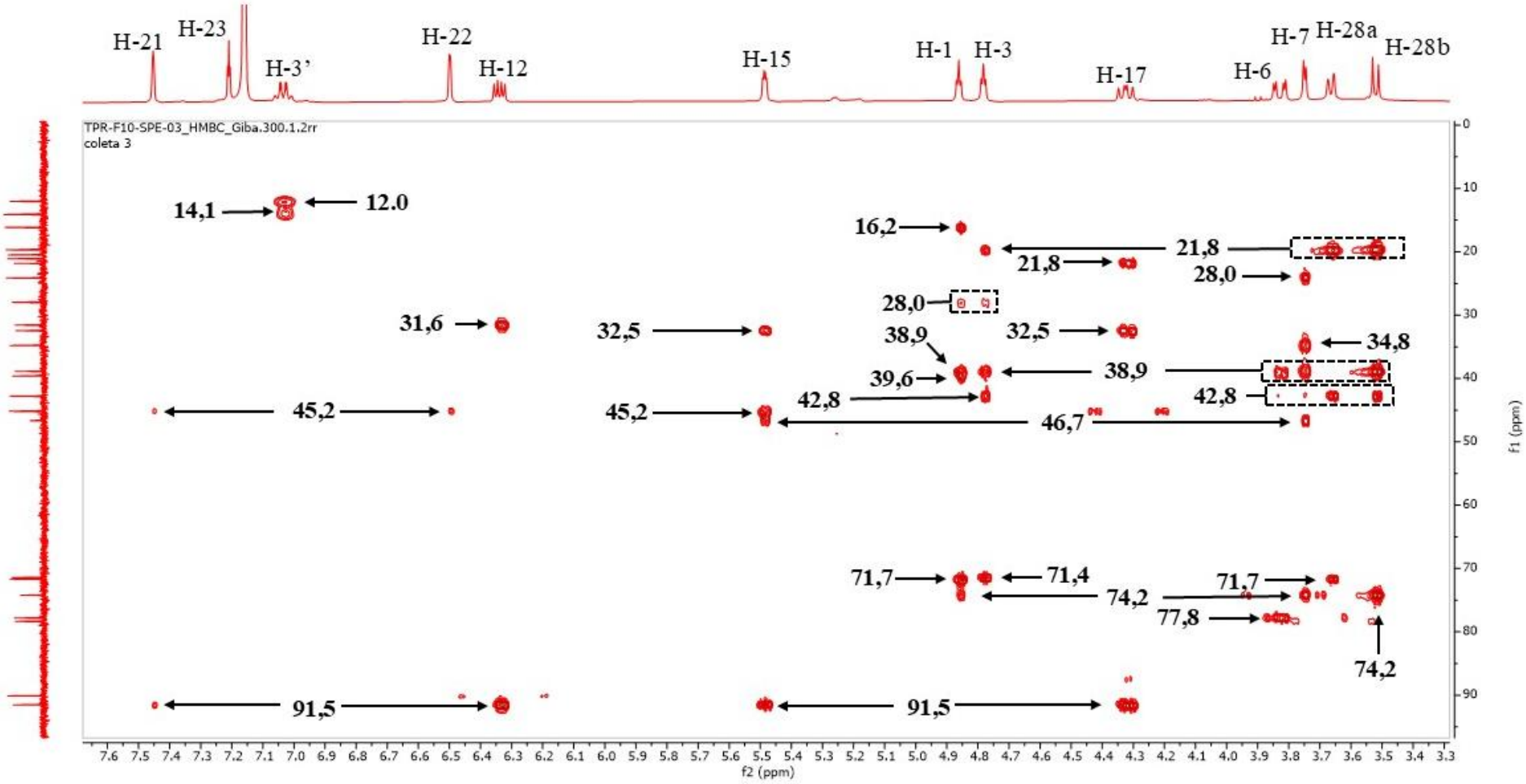


Figura 7 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T).

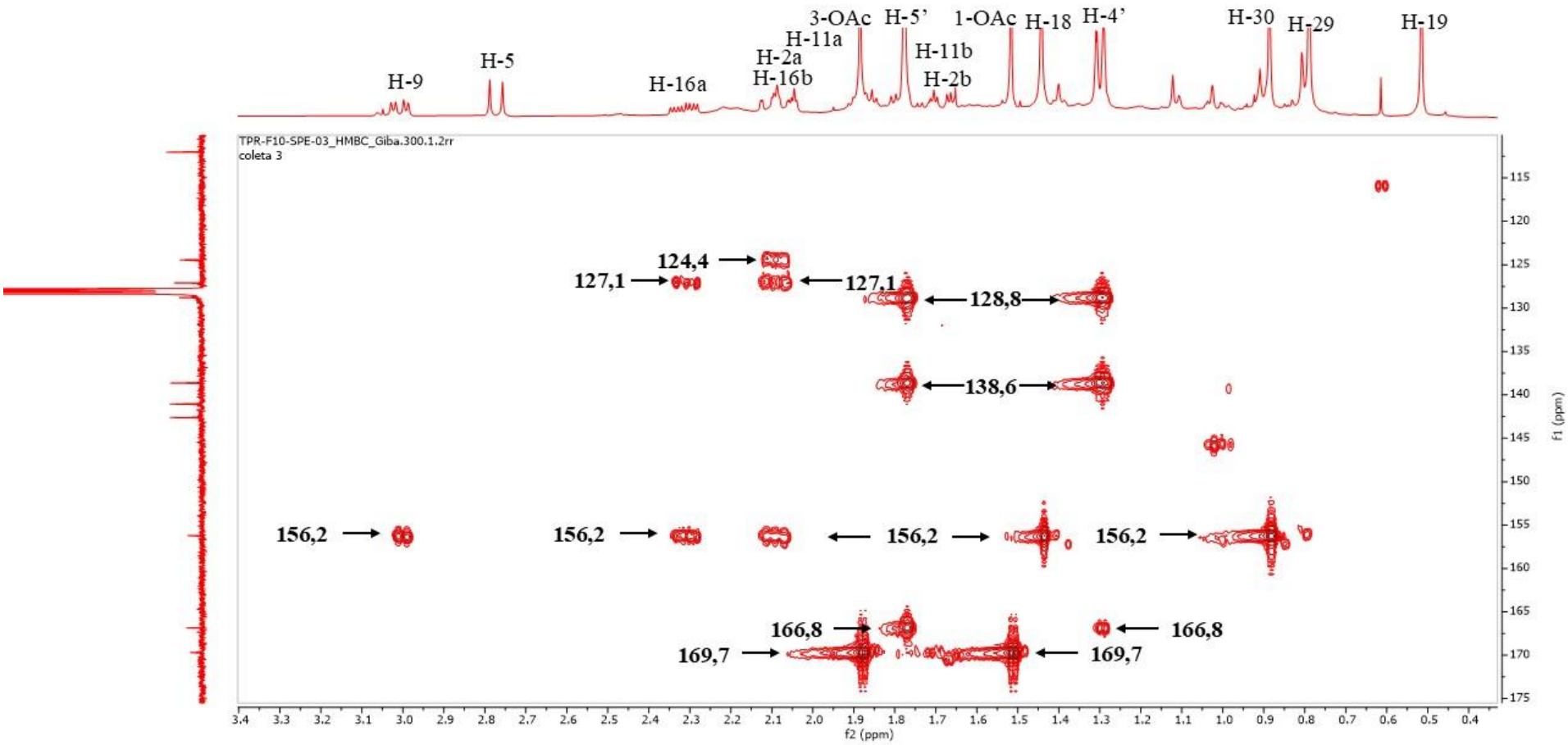


Figura 8 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T).

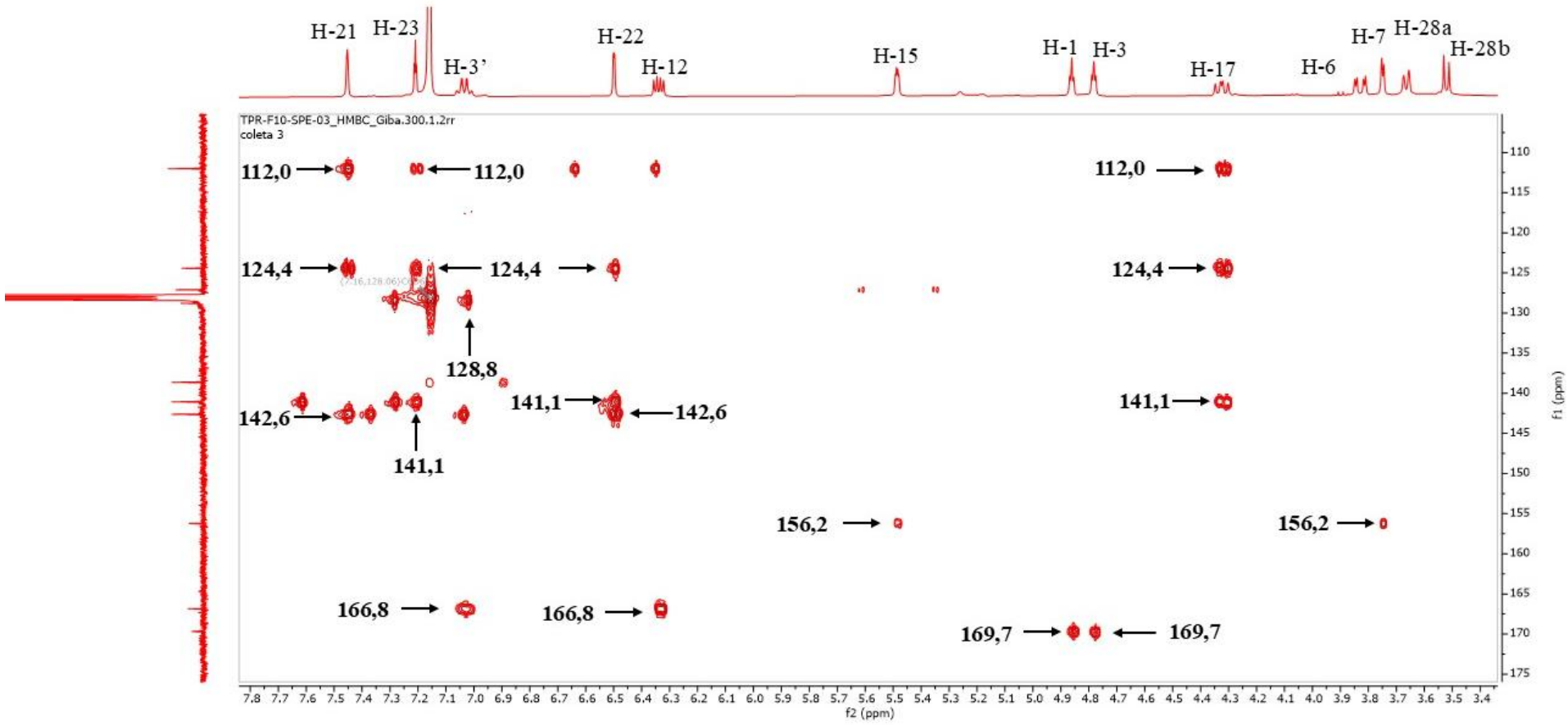


Figura 9 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 01 em C_6D_6 (14,1 T).

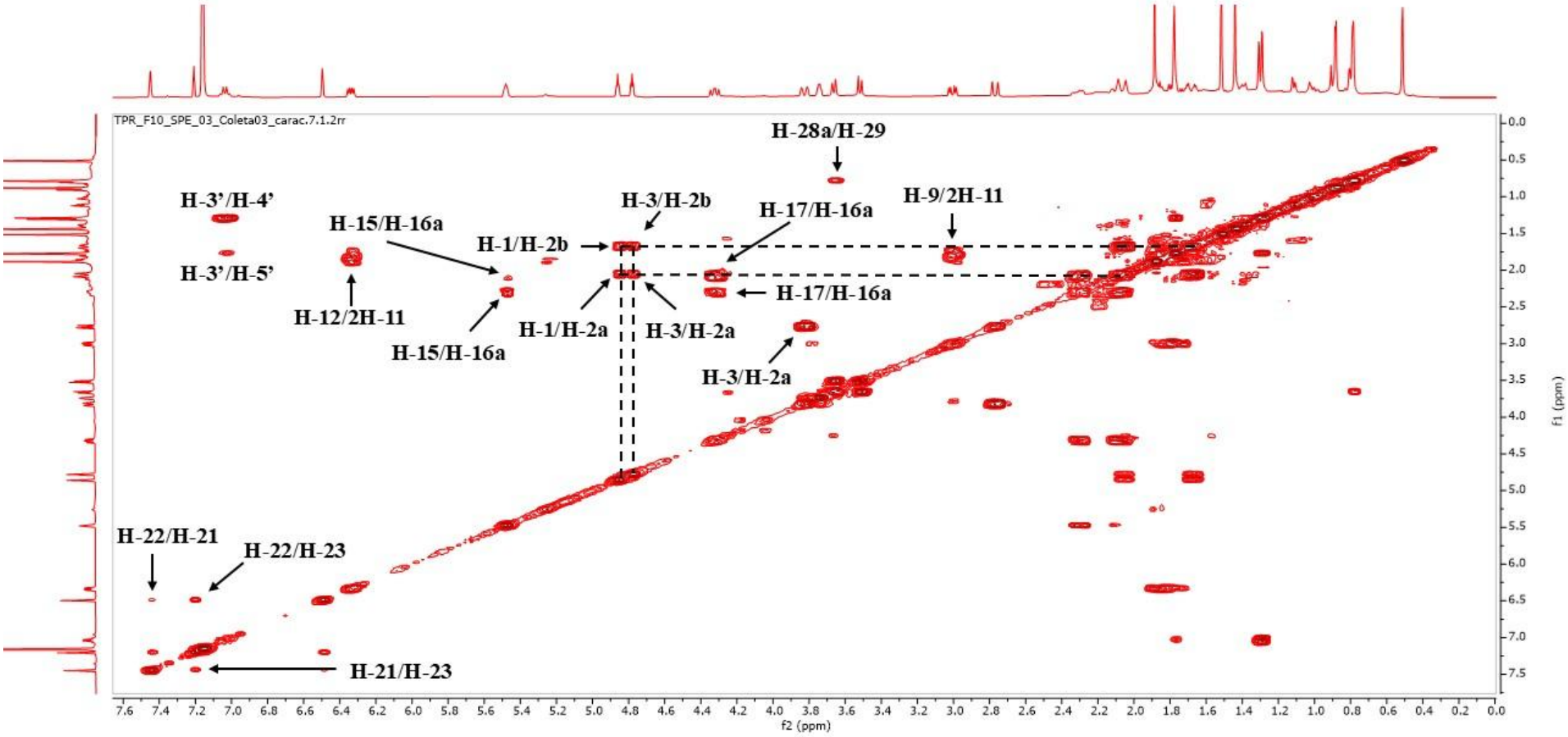
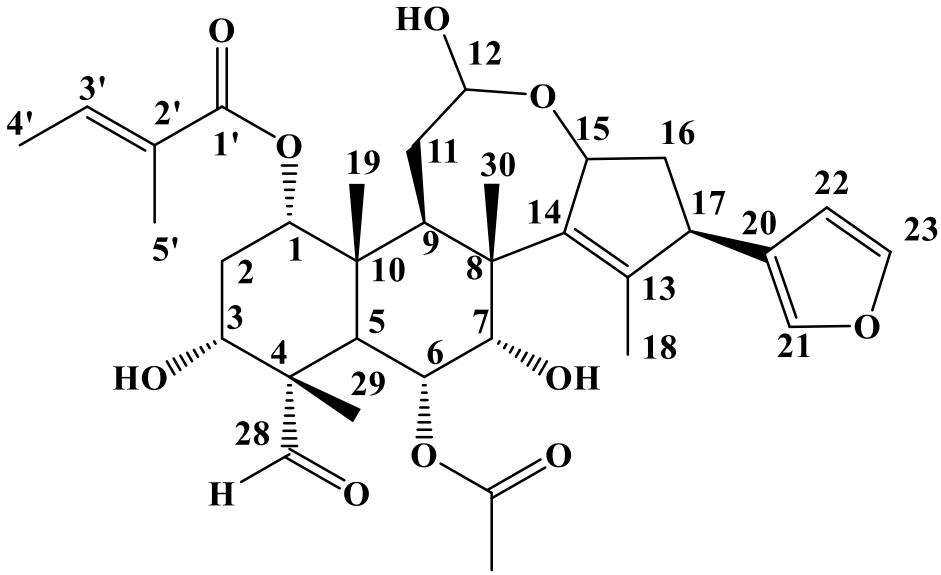


Figura 10 - Mapa de contorno COSY do limonoide 01 em C_6D_6 (9,4 T).

Limonoide 02 – 12-desmetóxi-12-hidróxi-meliatoosenina S



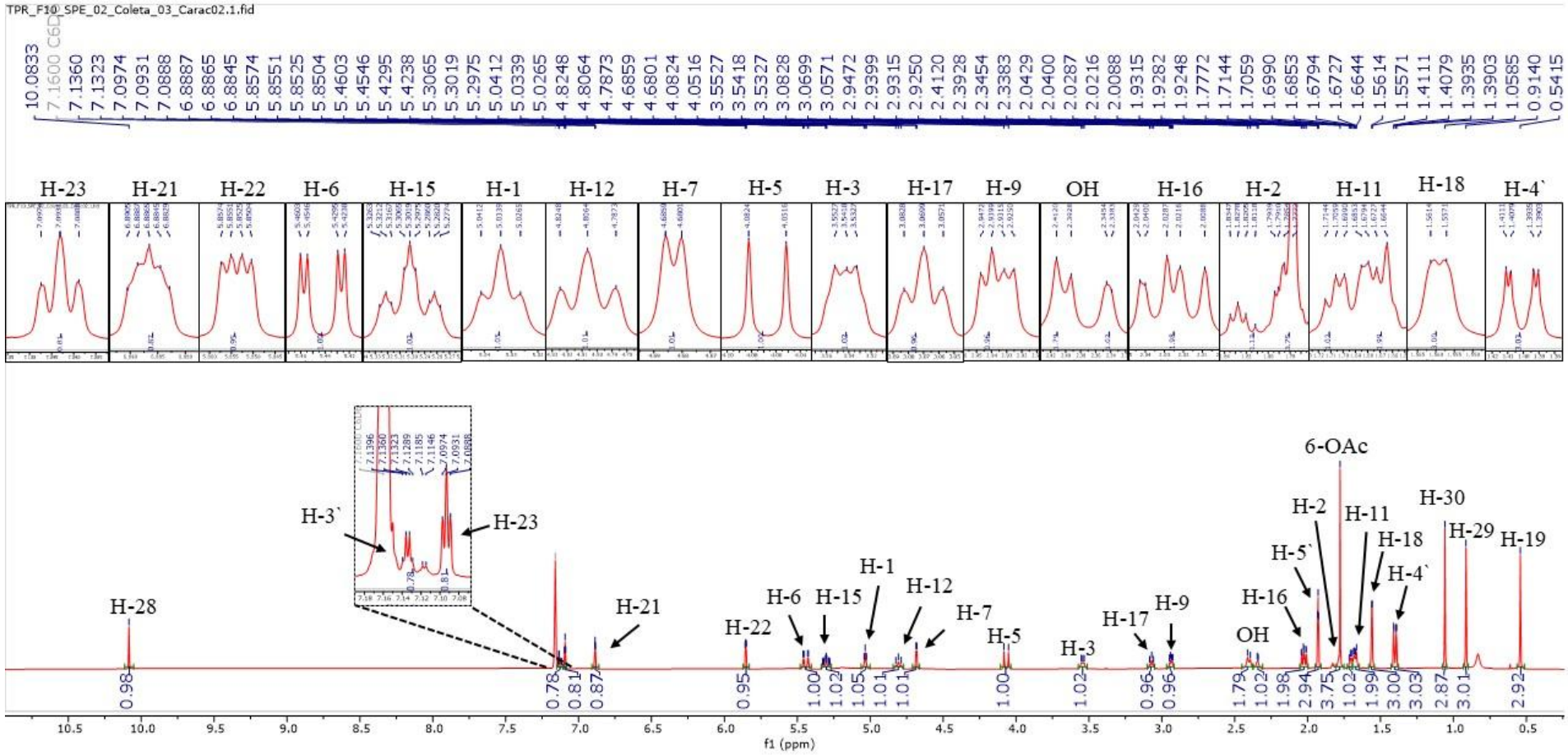


Figura 11 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

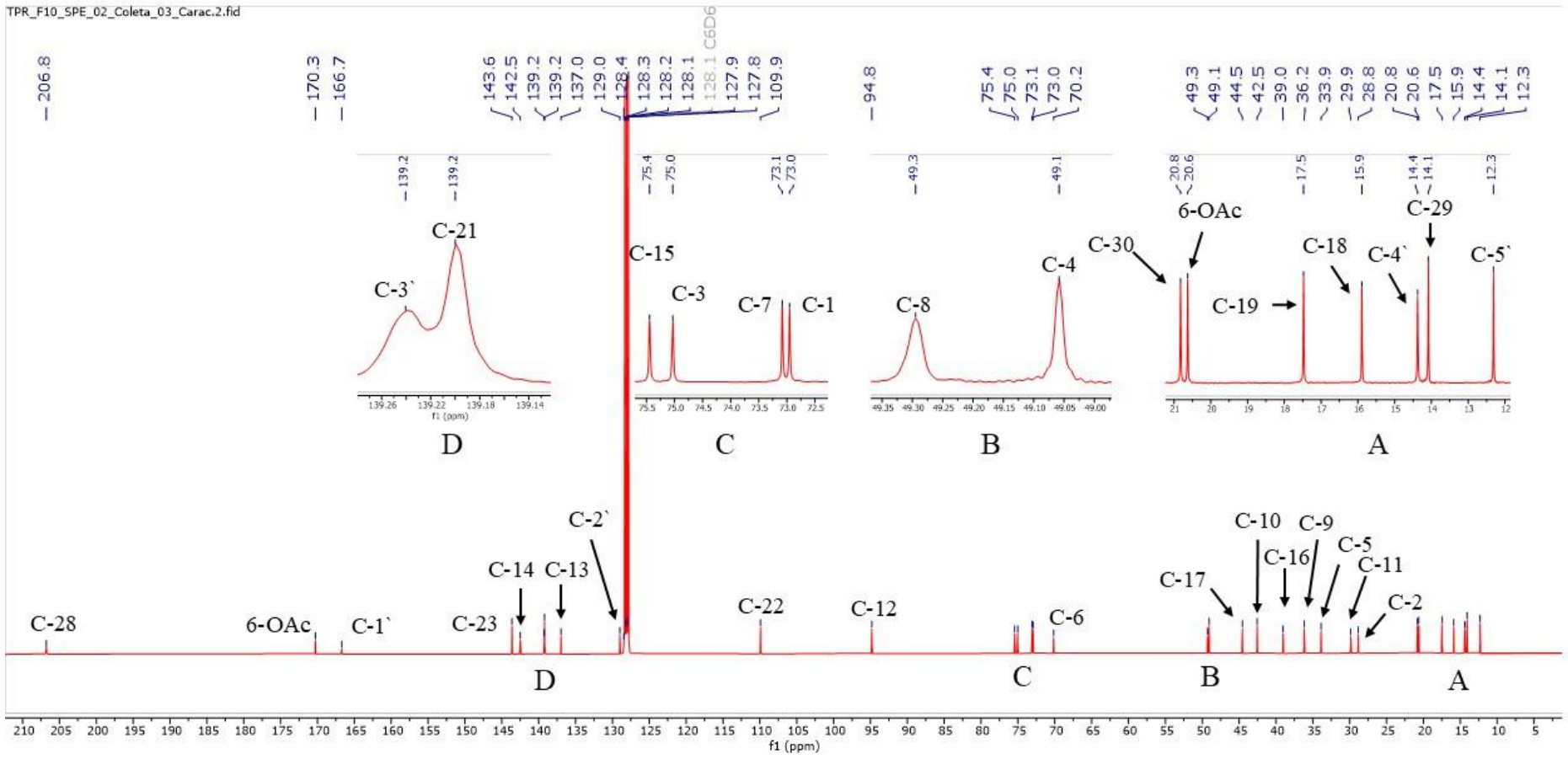


Figura 12 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

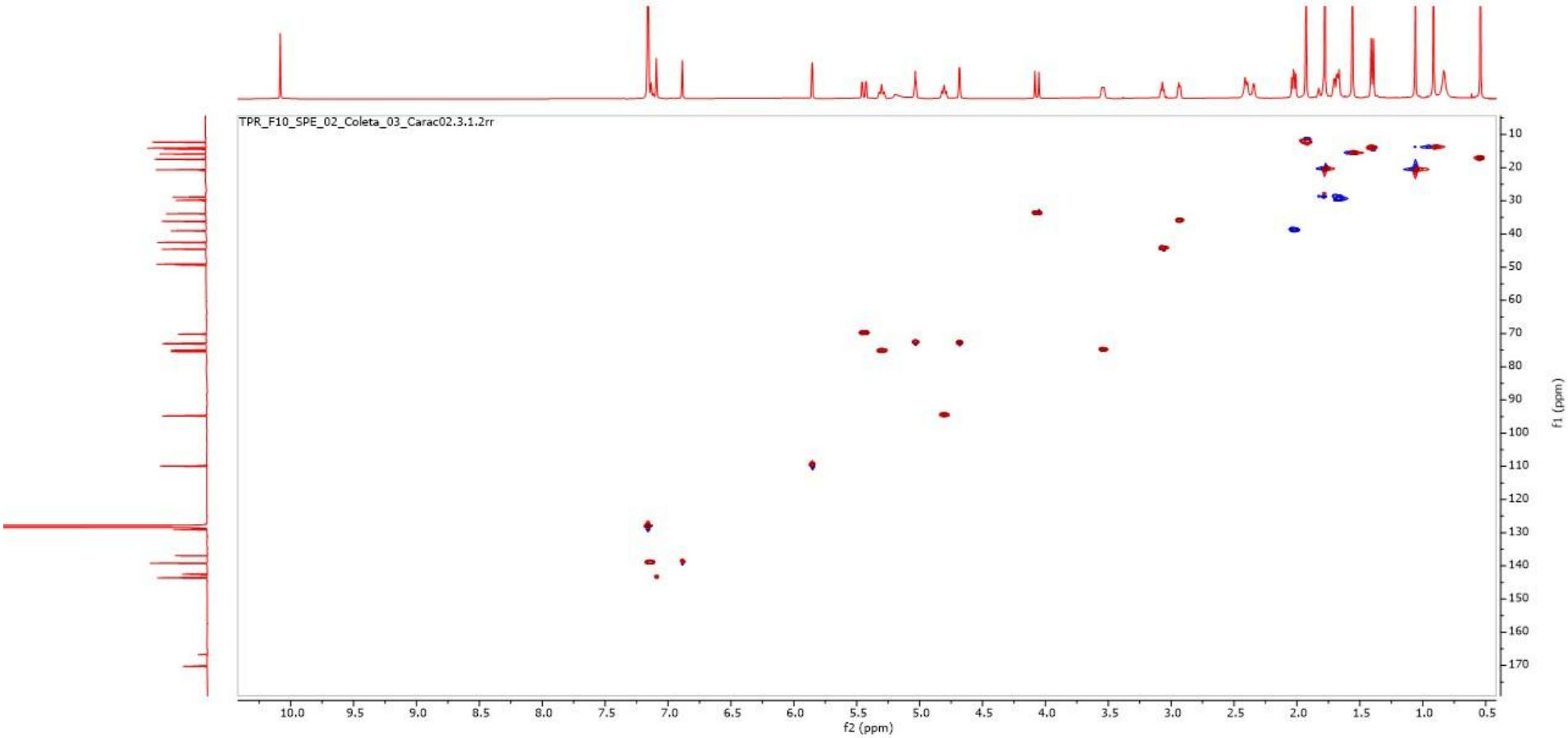


Figura 13 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

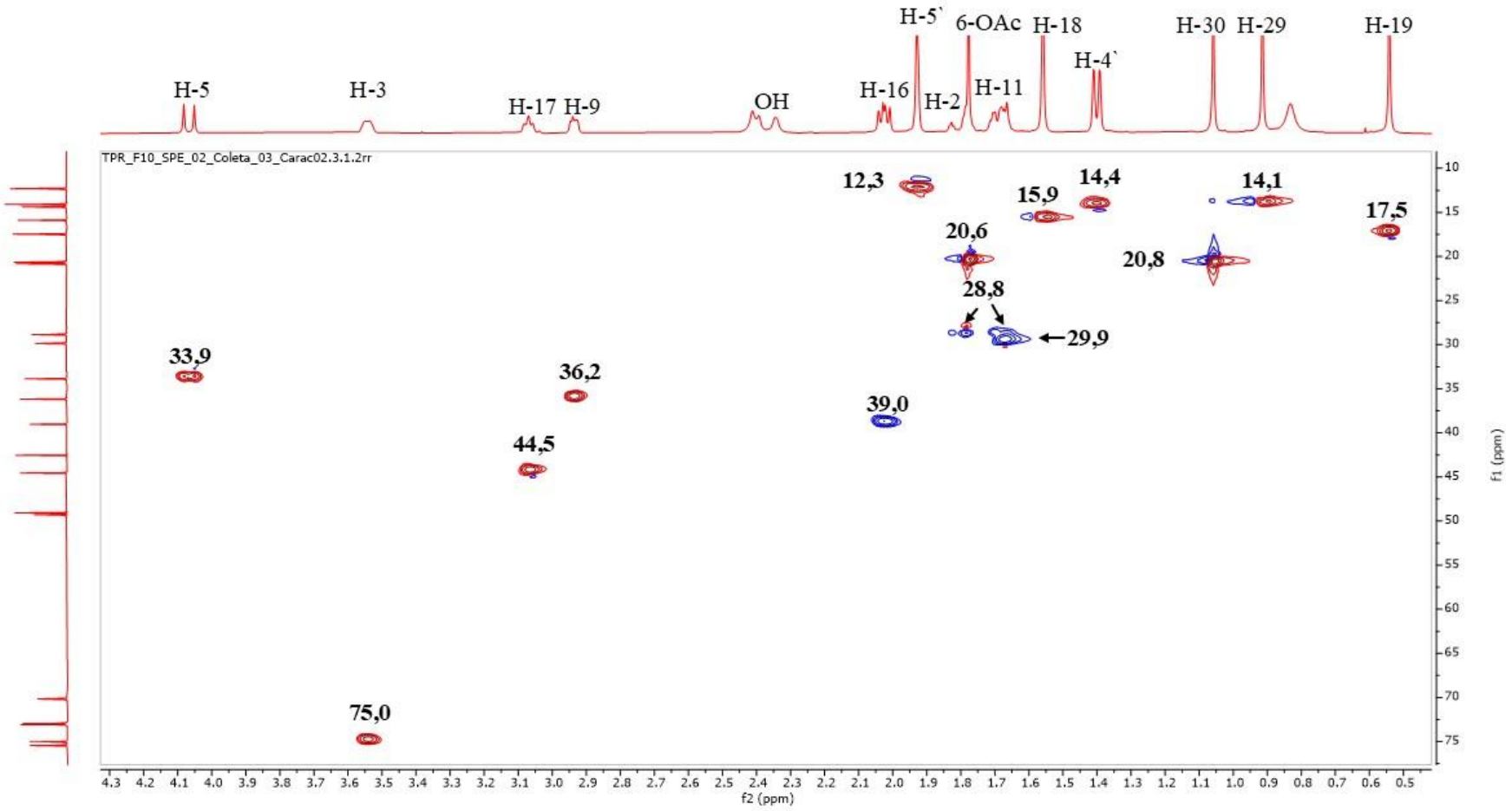


Figura 14 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

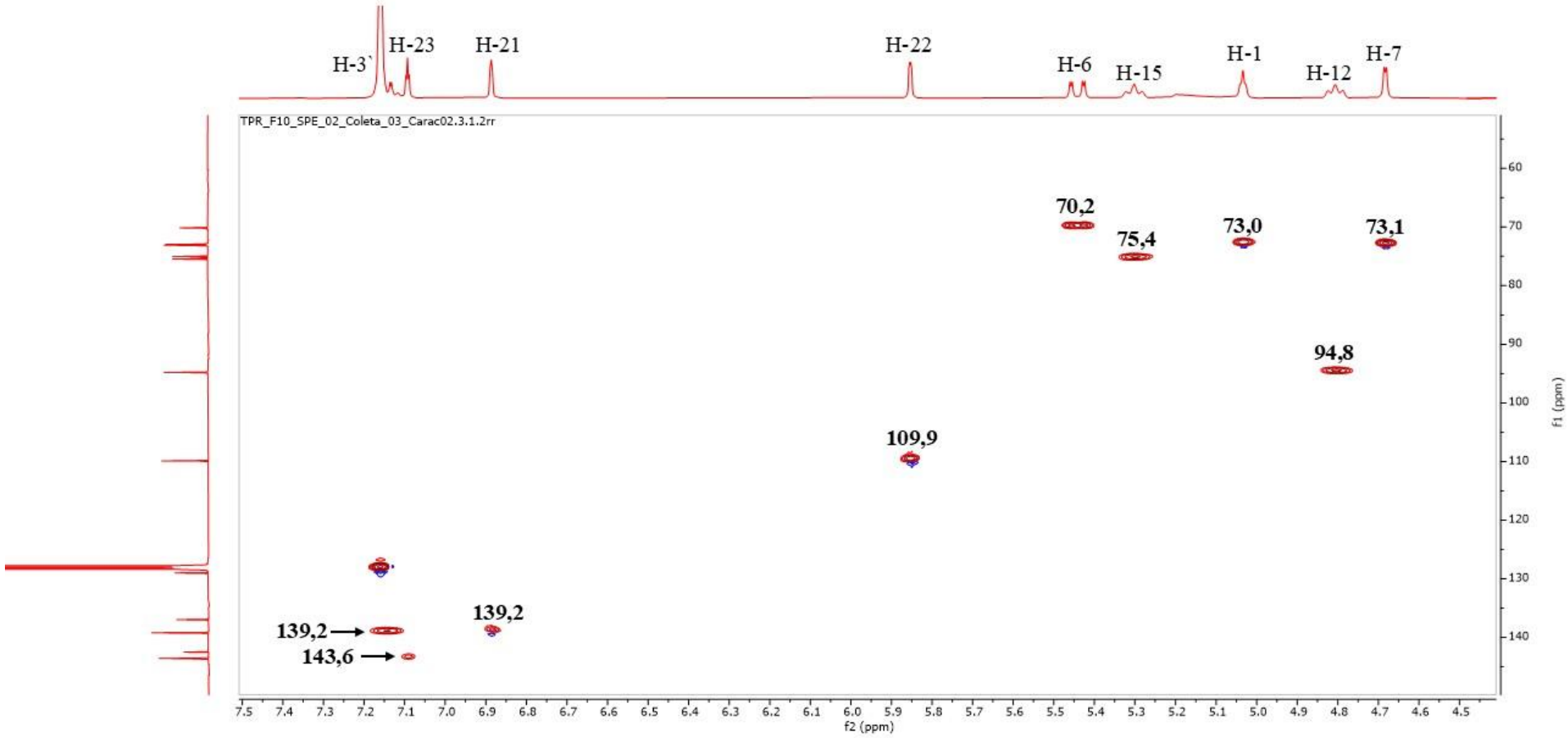


Figura 15 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

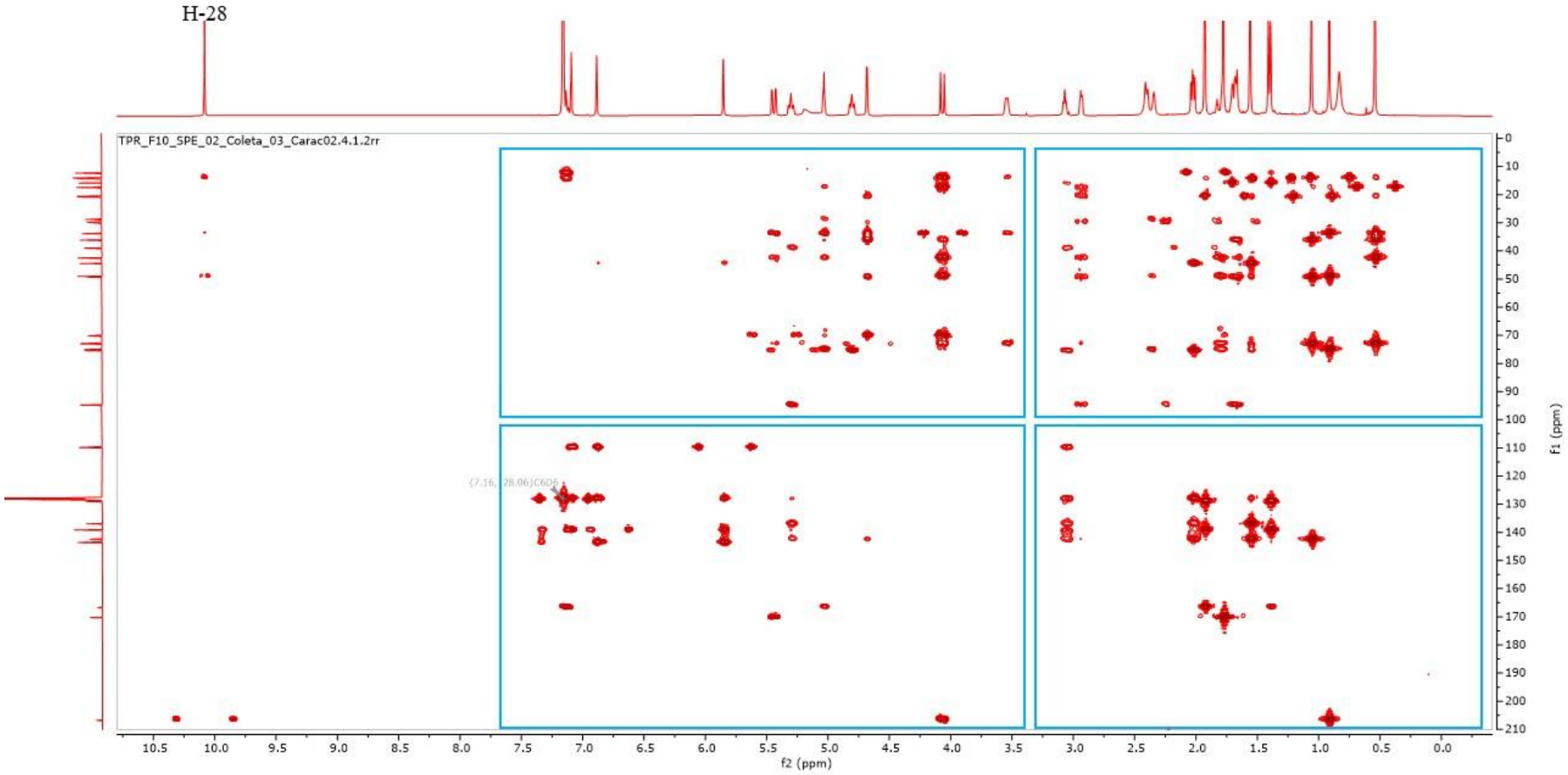


Figura 16 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T). AS áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

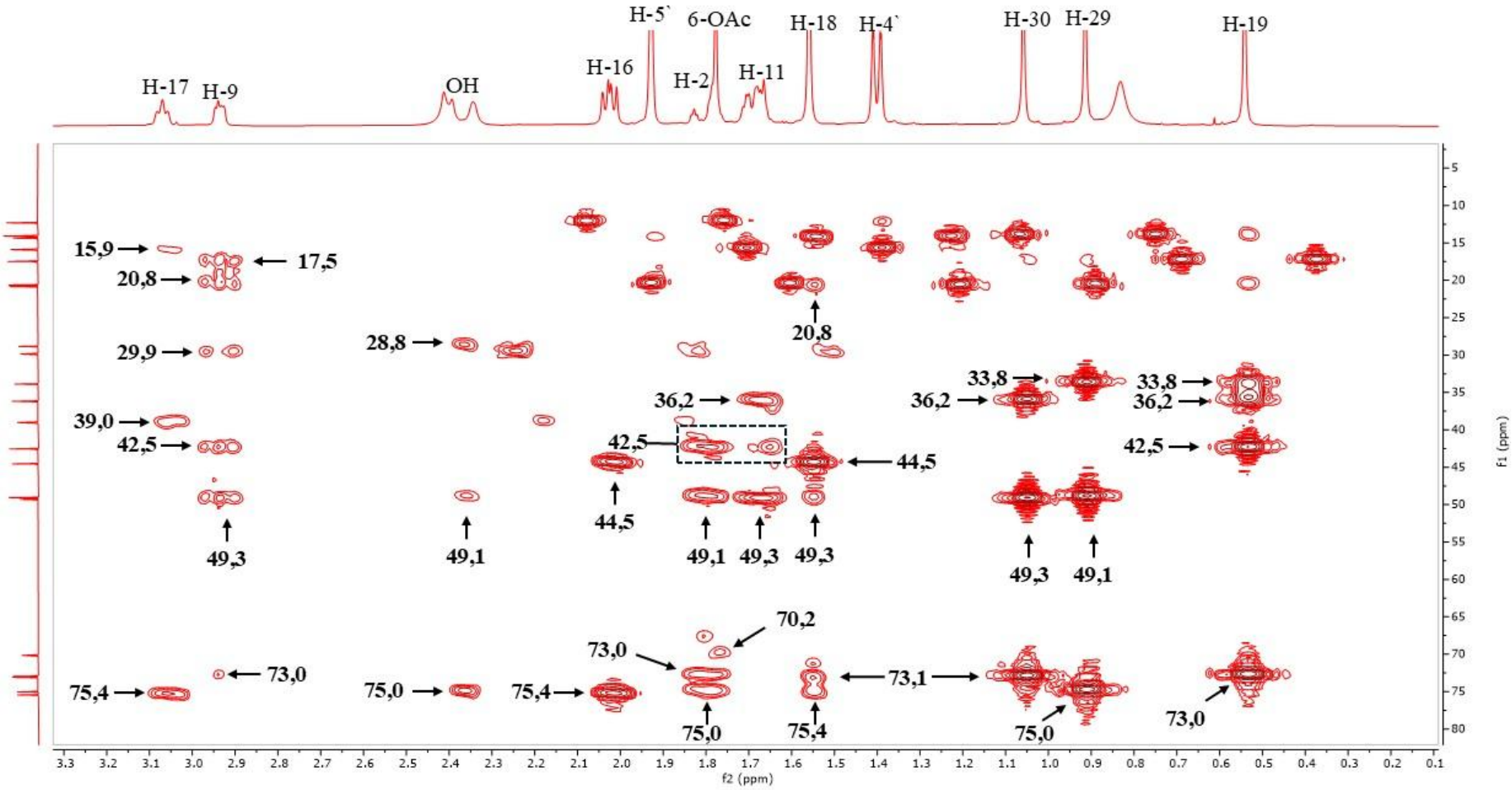


Figura 17 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

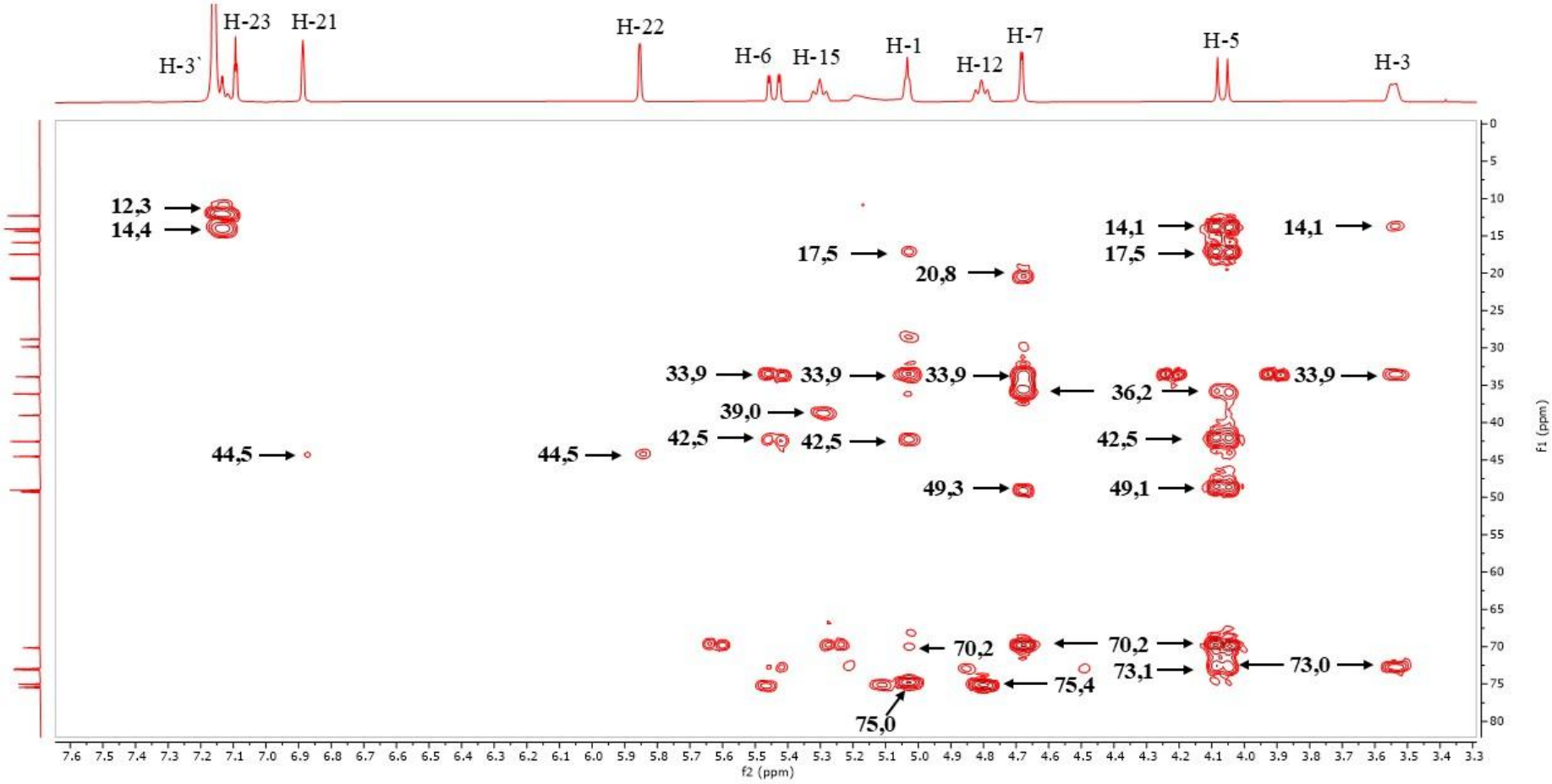


Figura 18 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

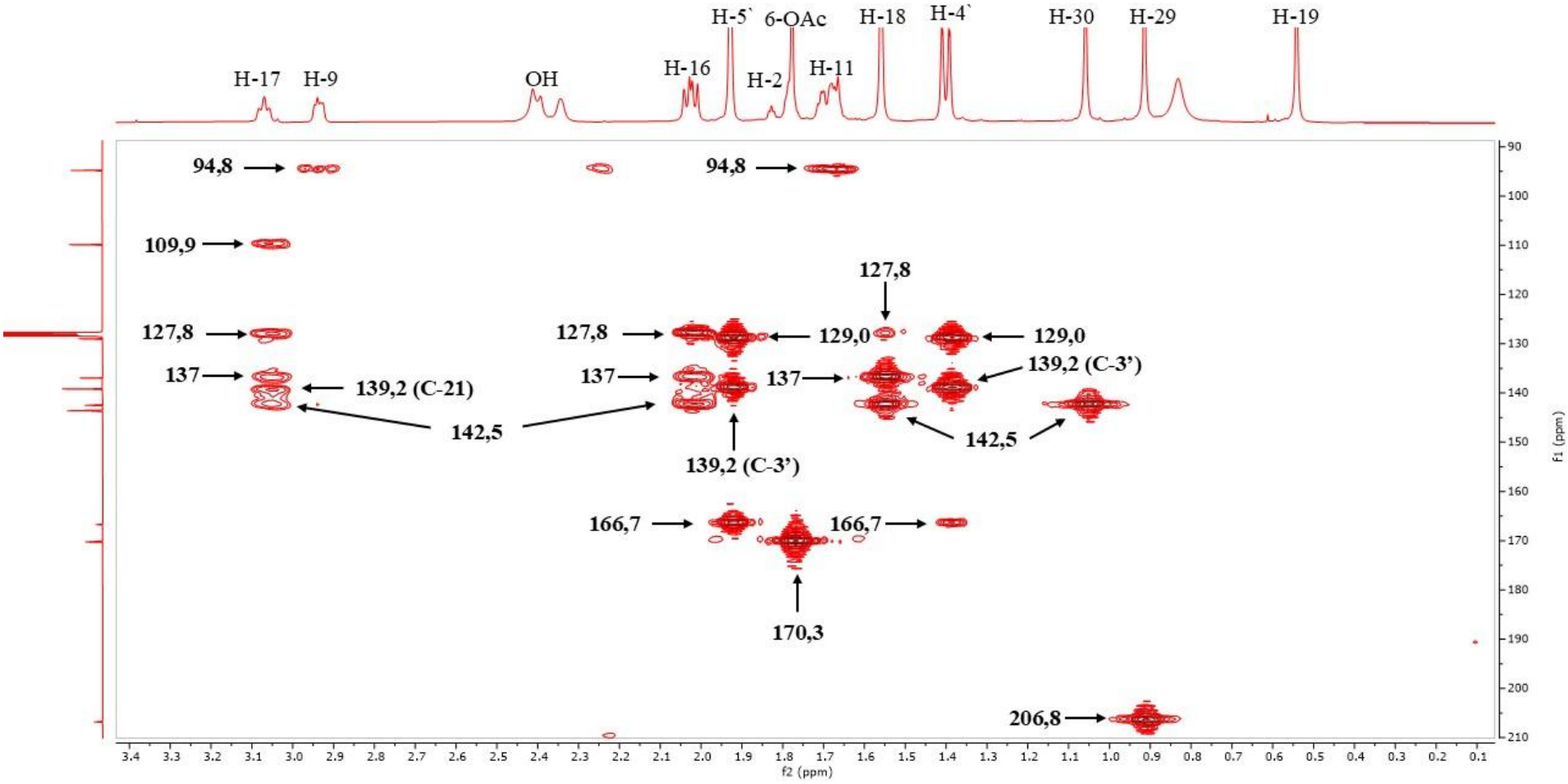


Figura 19 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

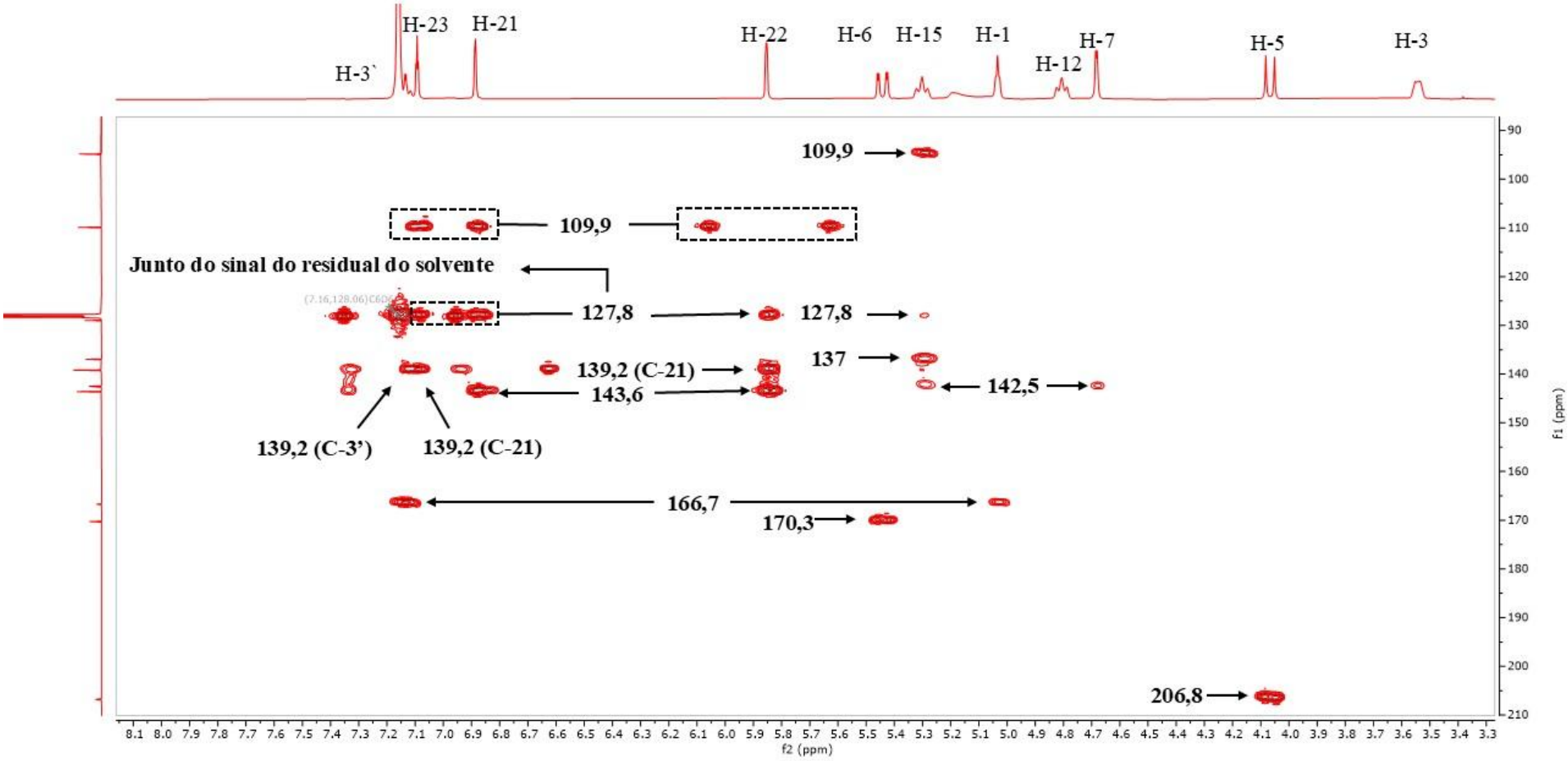


Figura 20 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

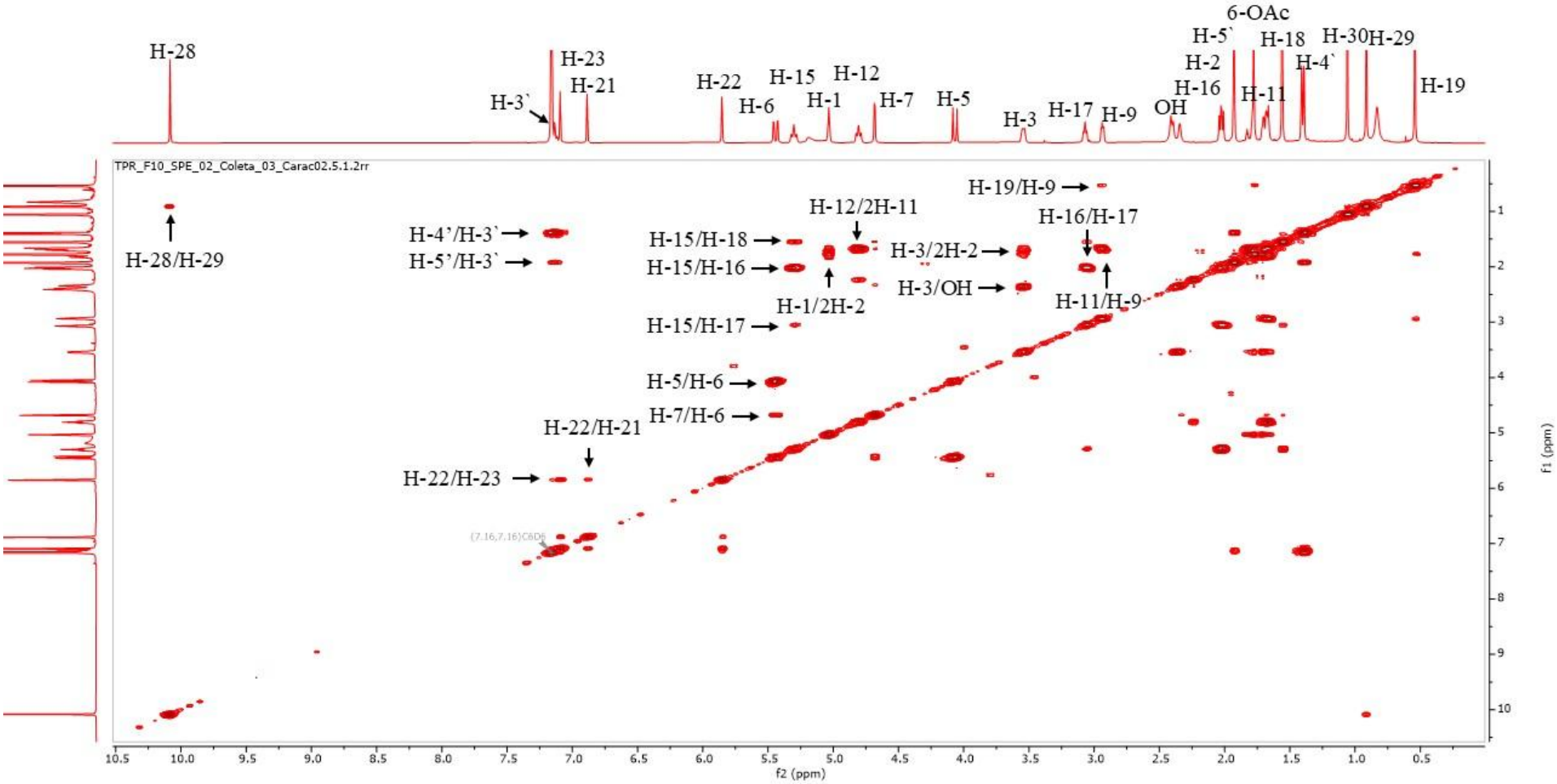


Figura 21 - Mapa de contorno COSY do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

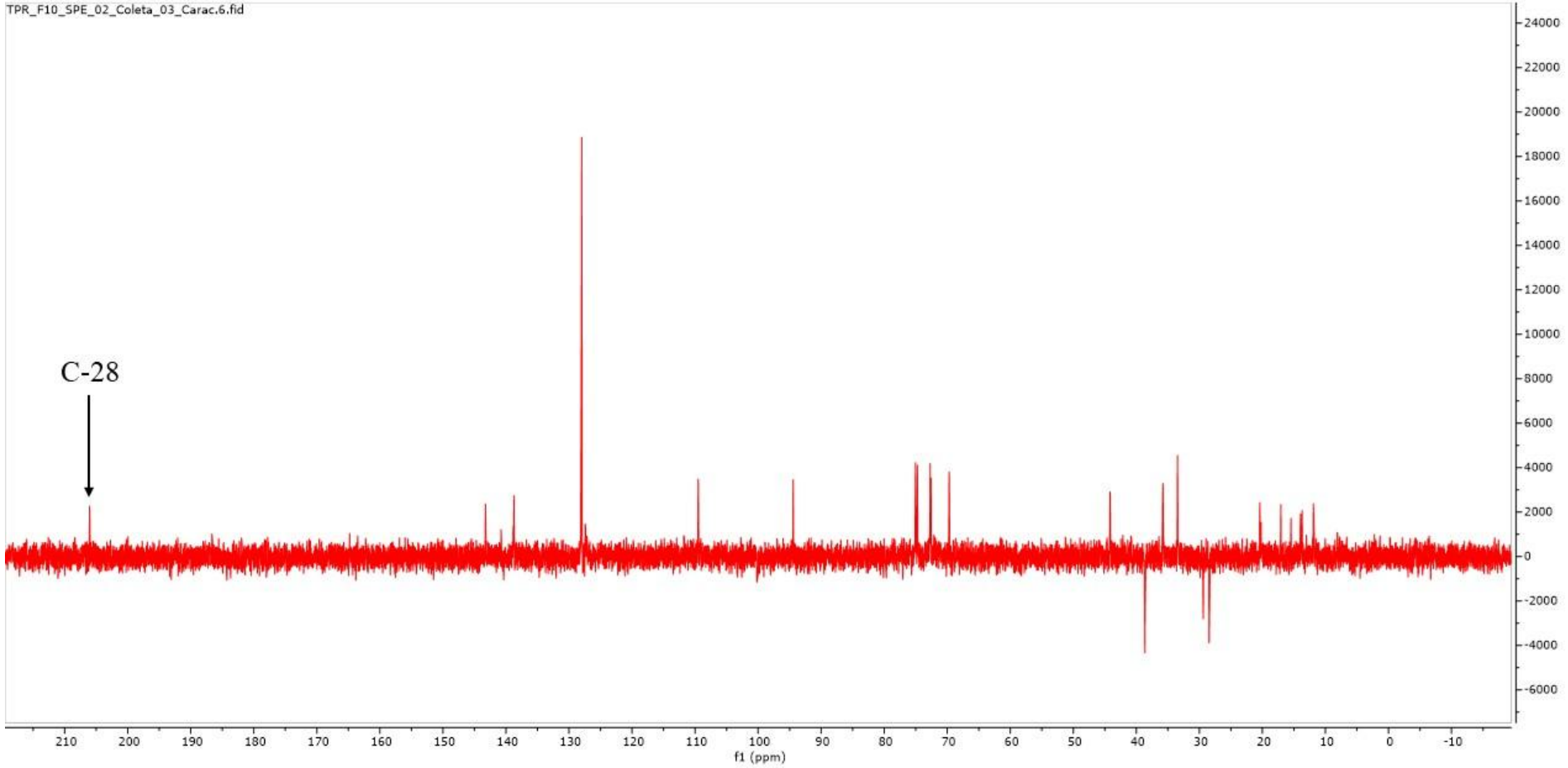
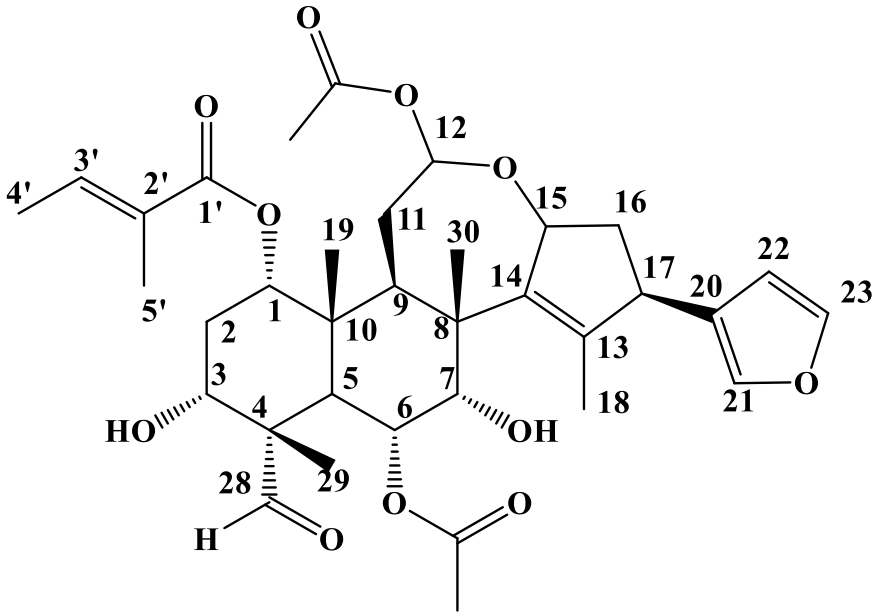


Figura 22 - Espectro de RMN de DEPT 135 do limonoide 02 em C_6D_6 (9,4 T).

Limonoide 03 - 12-desmetóxi-12-acetóxi-meliatoosenina S



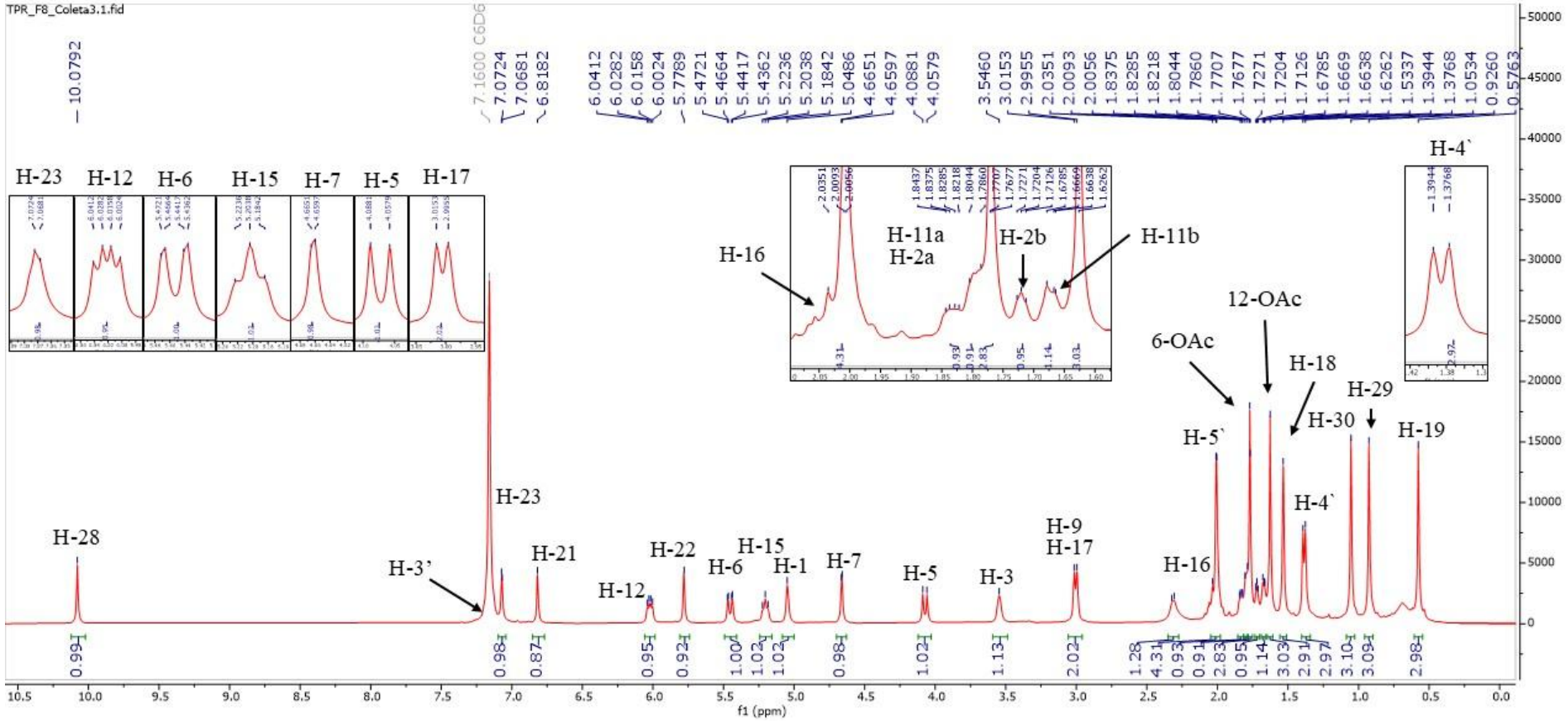


Figura 23 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

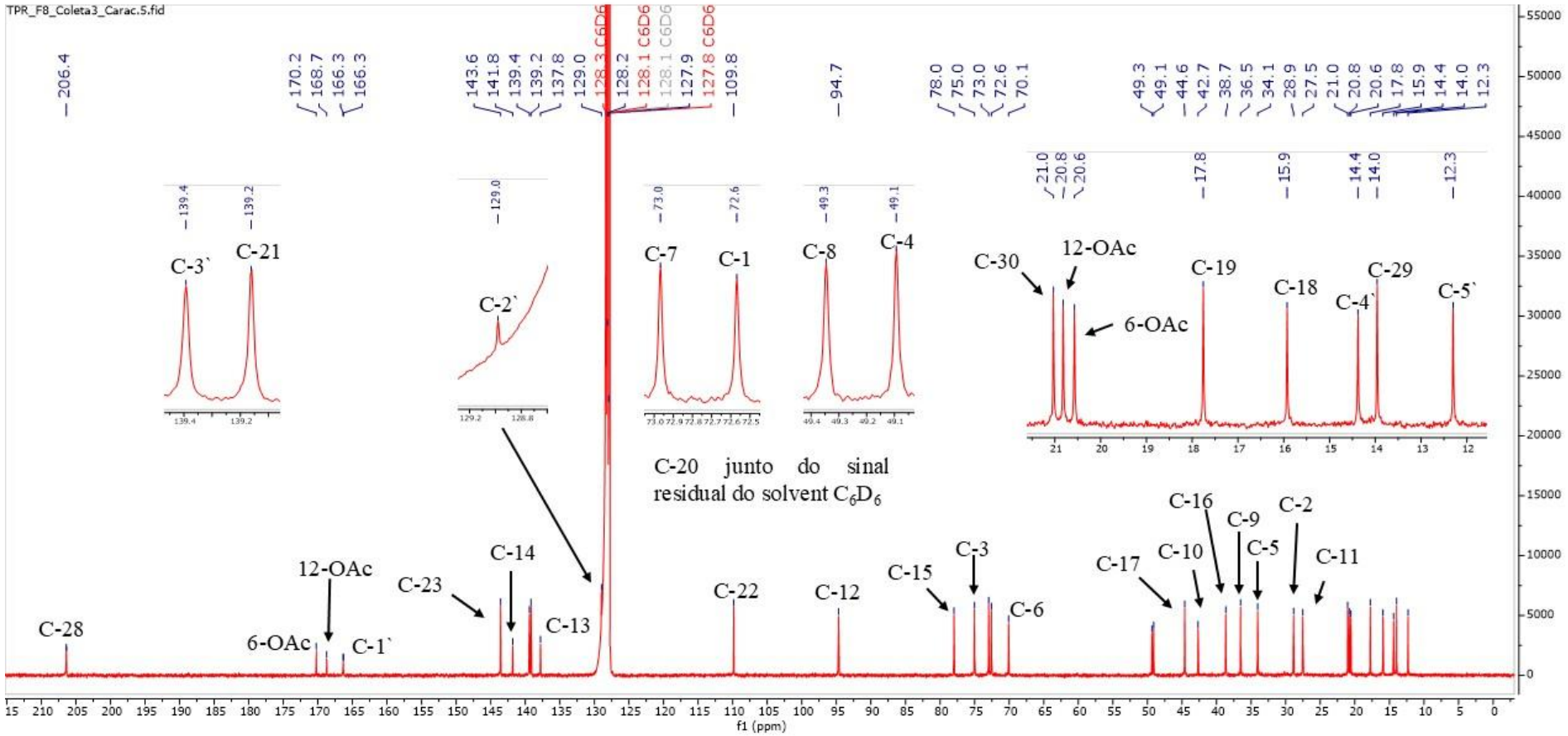


Figura 24 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

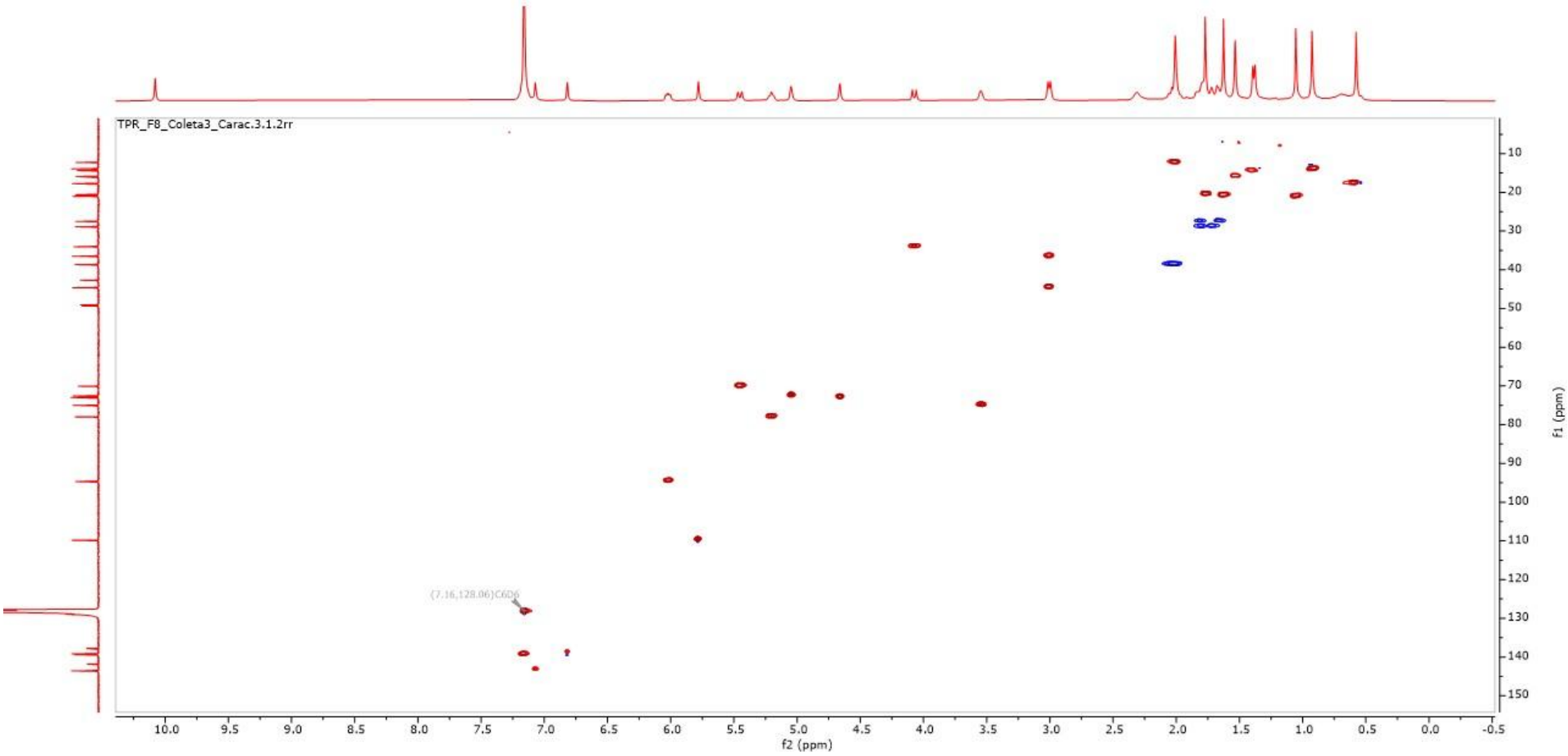


Figura 25 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

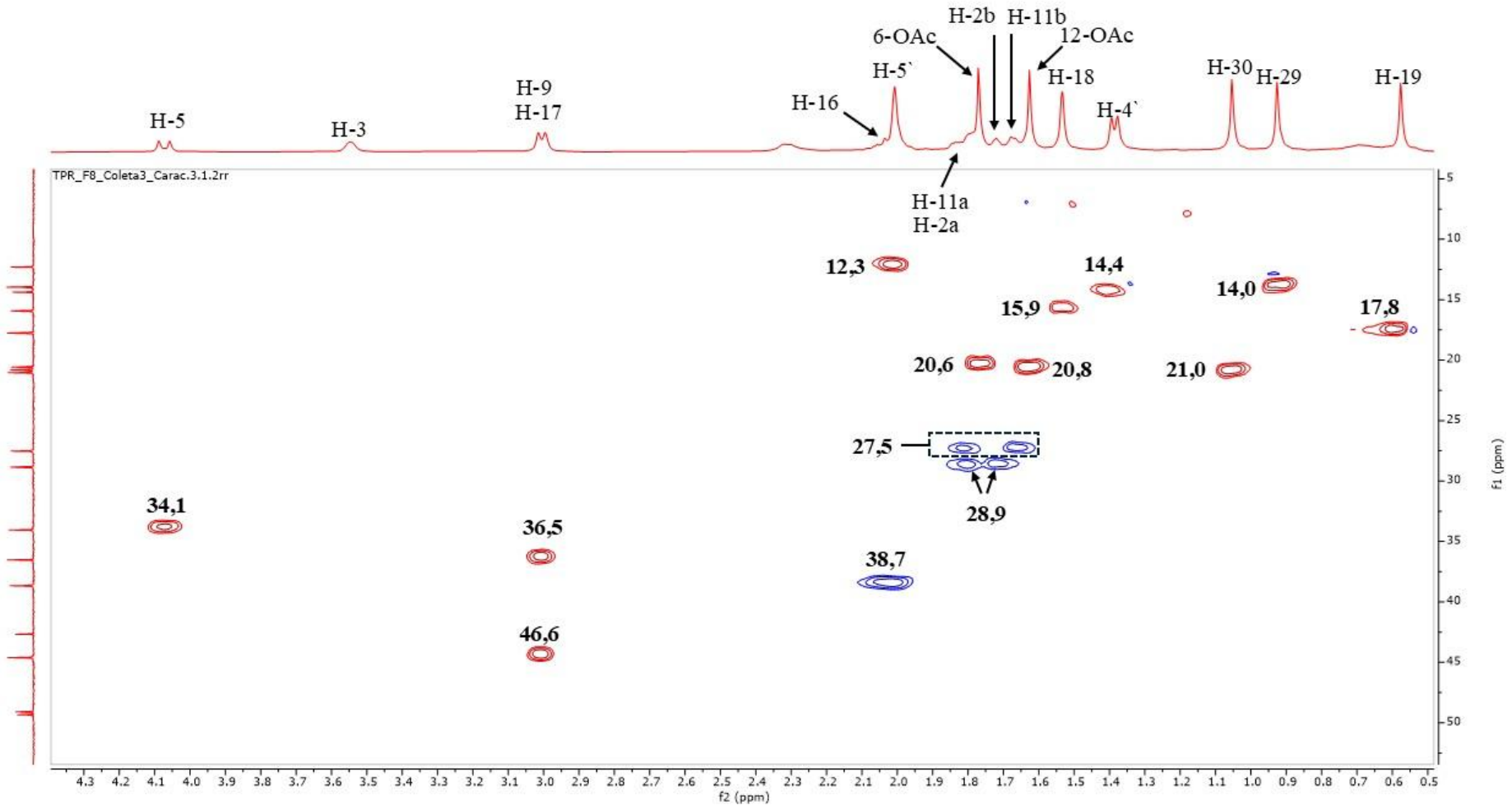


Figura 26 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

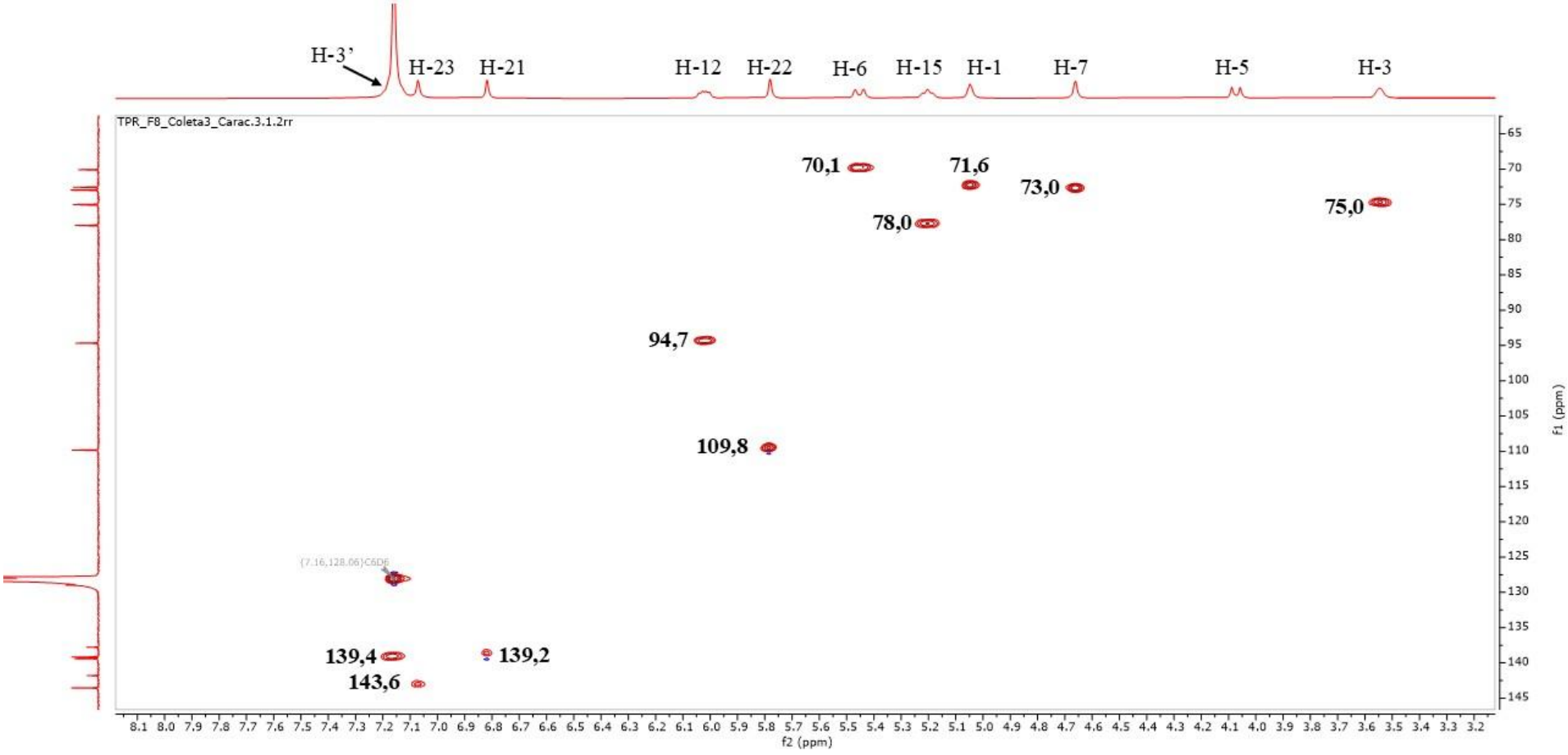


Figura 27 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

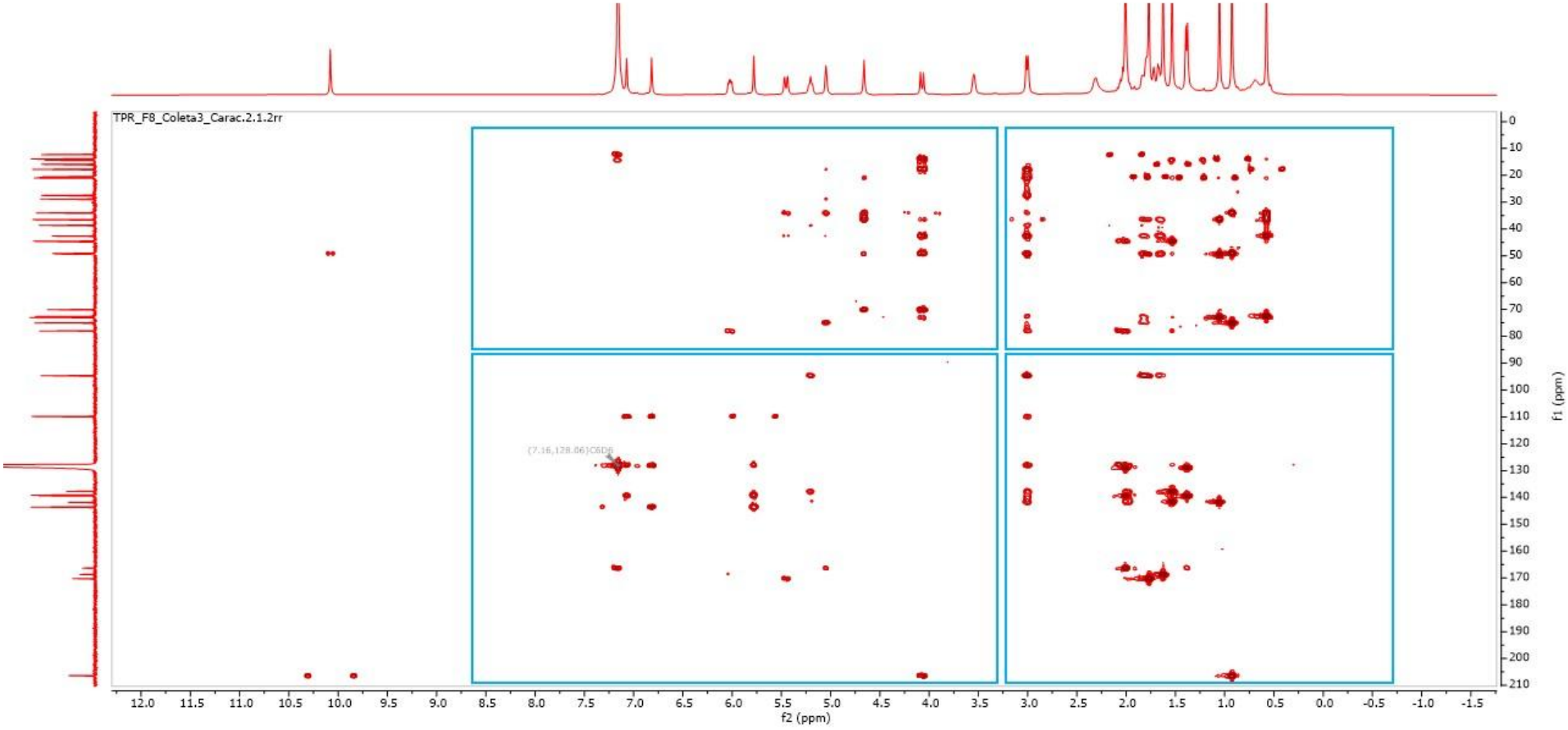


Figura 28 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

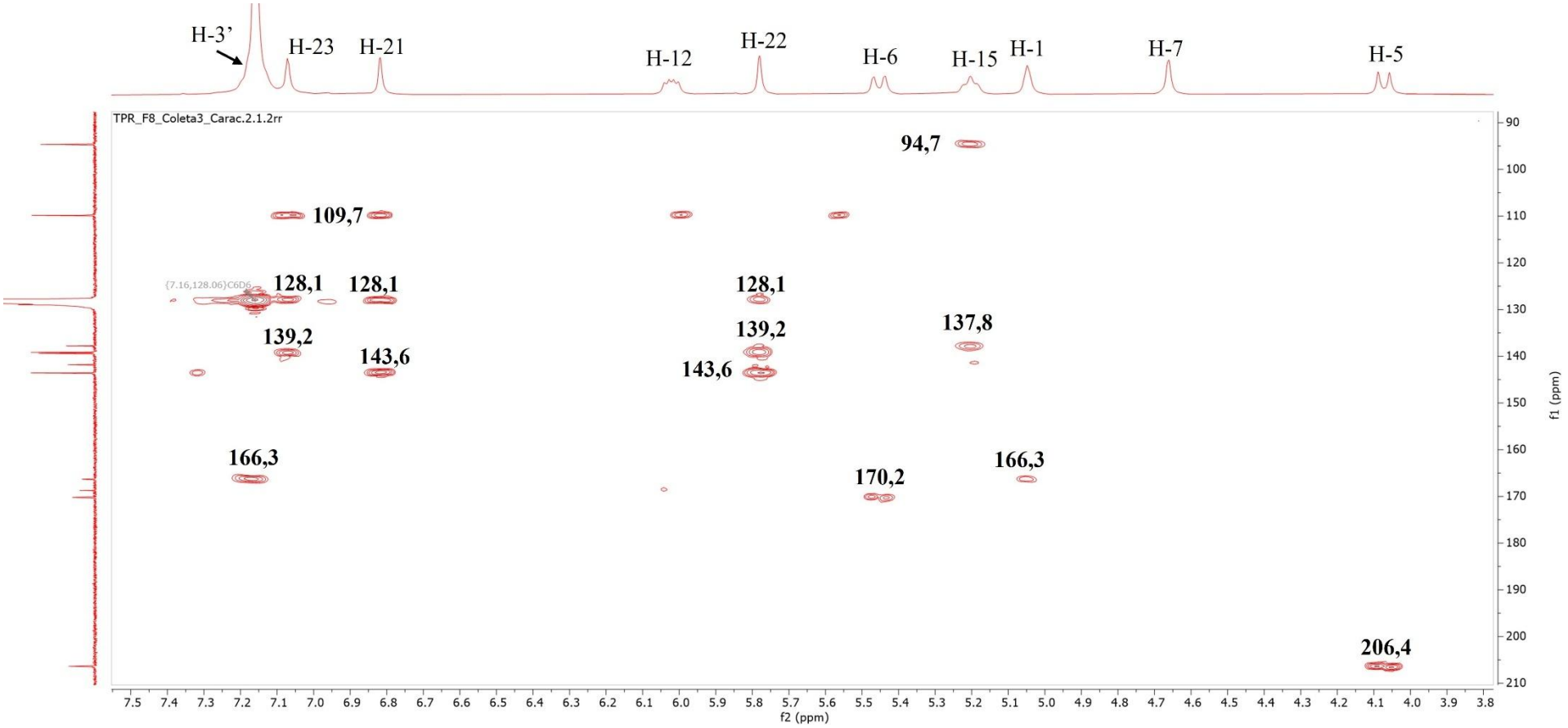


Figura 29 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

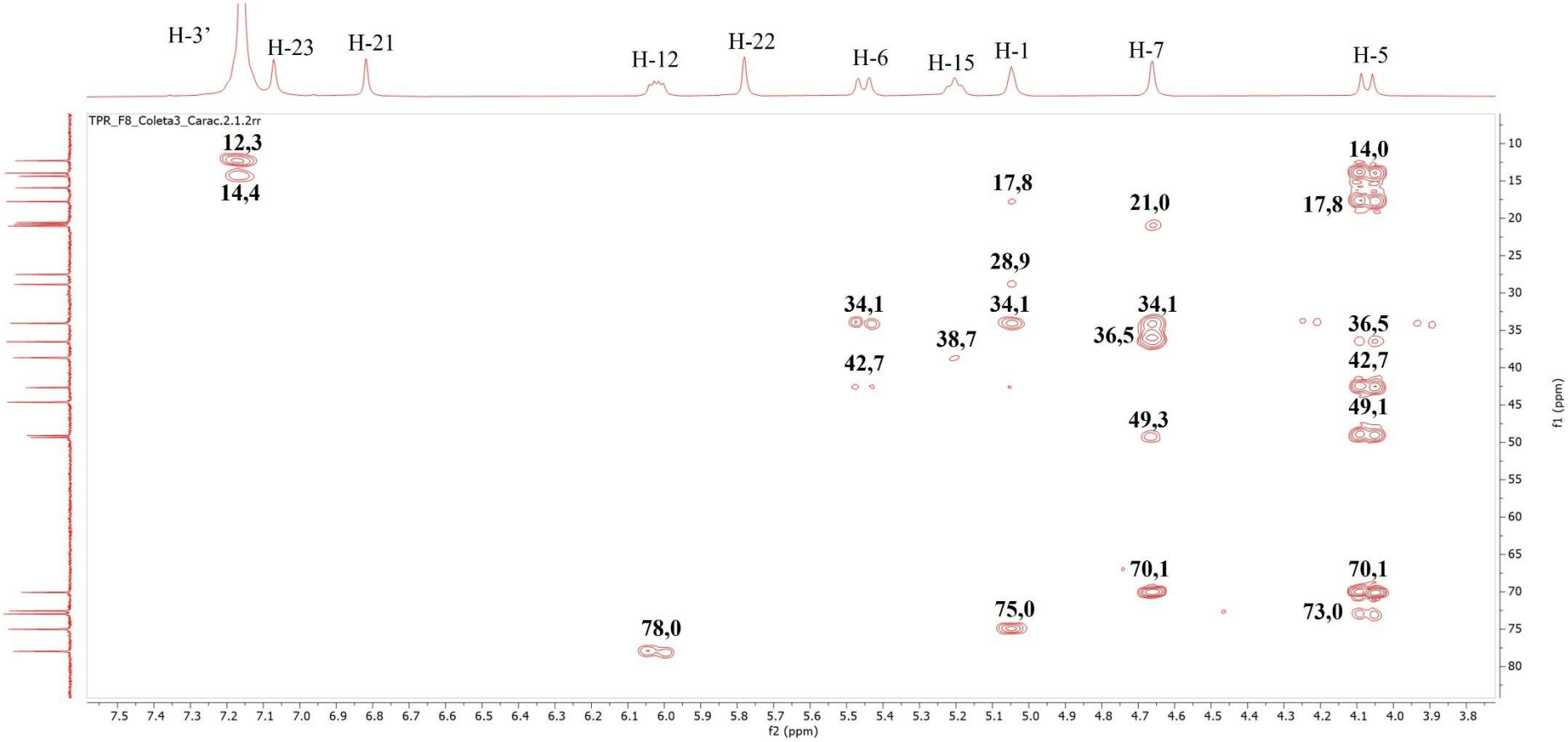


Figura 30 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

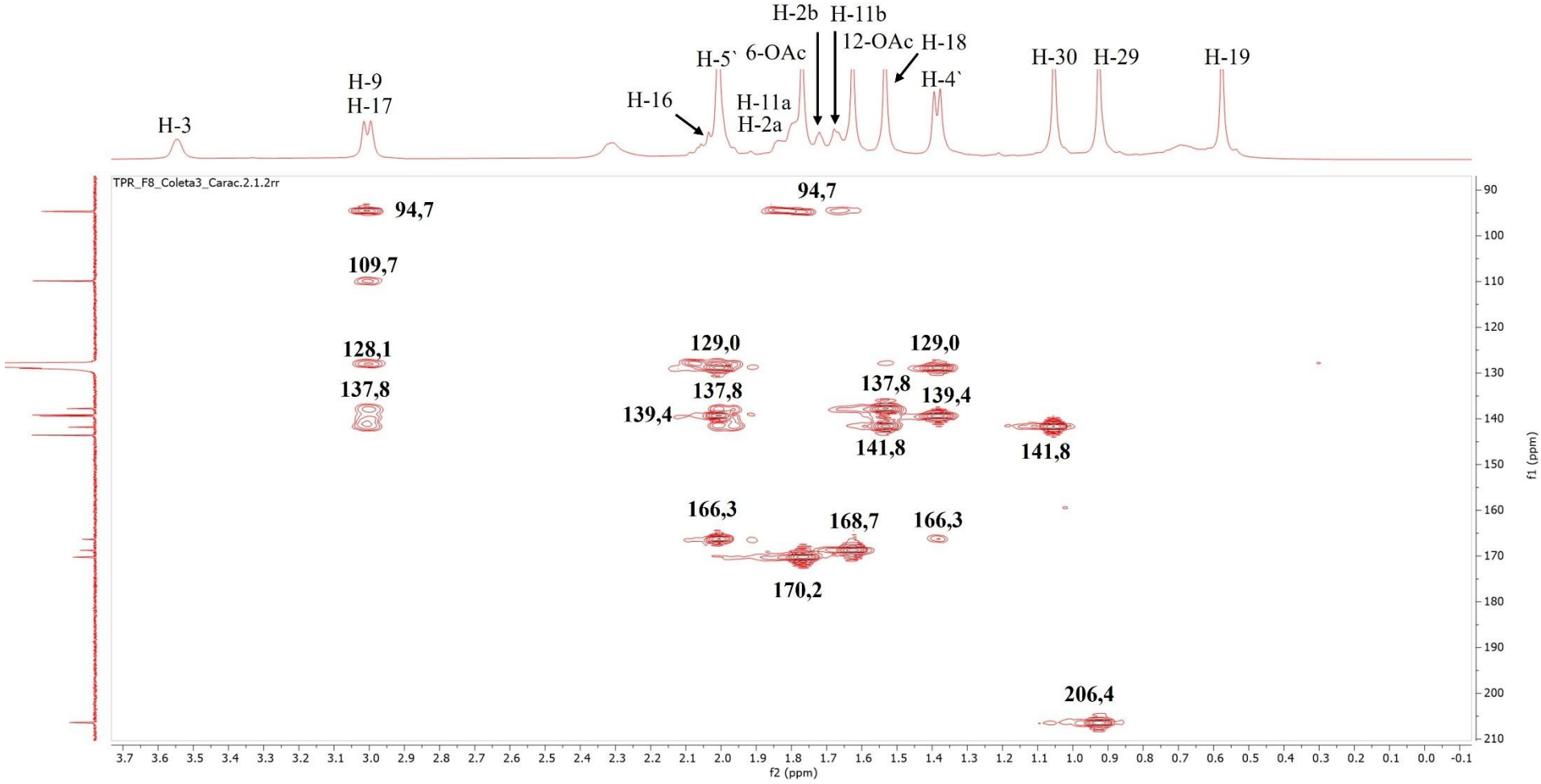


Figura 31 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

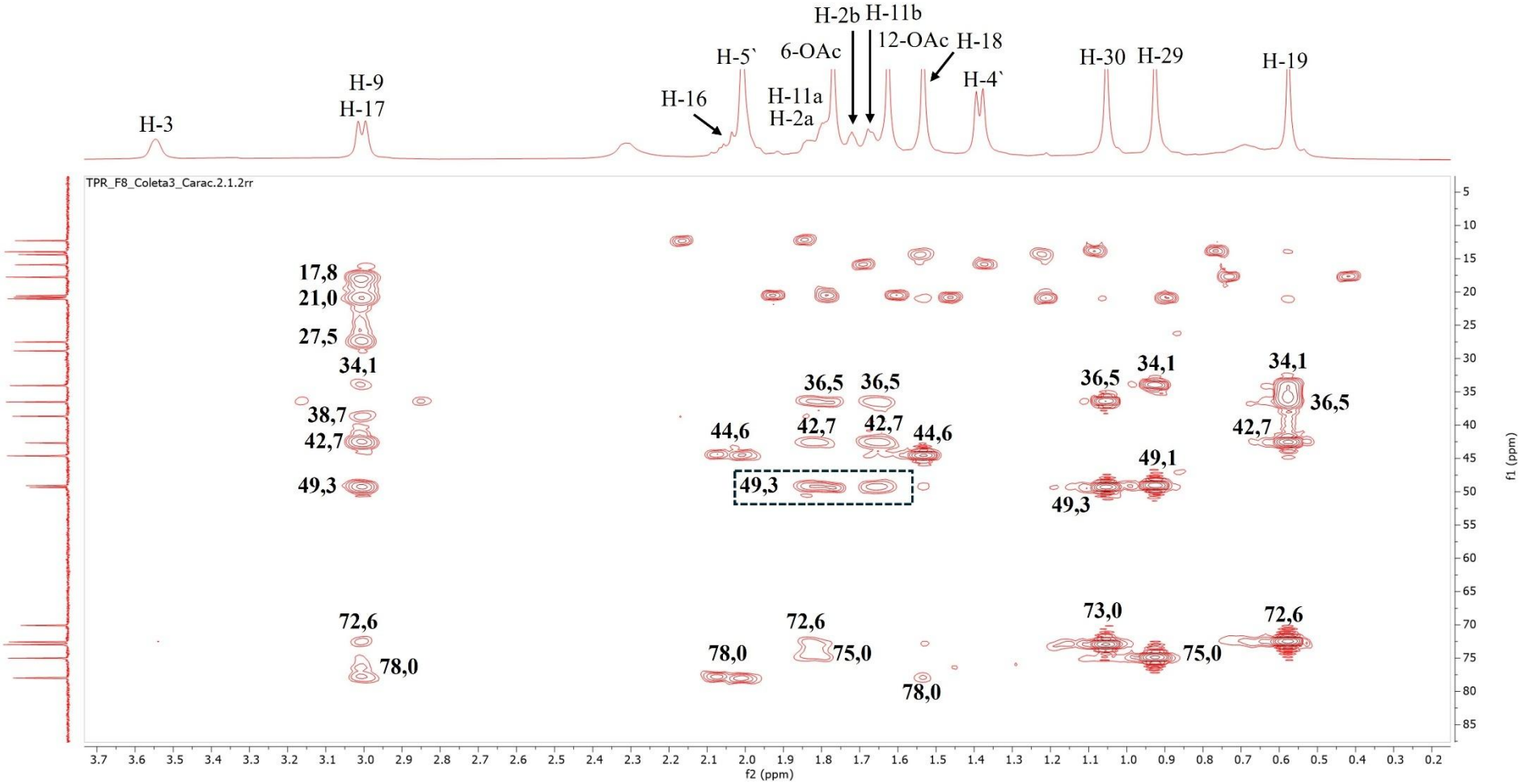


Figura 32 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

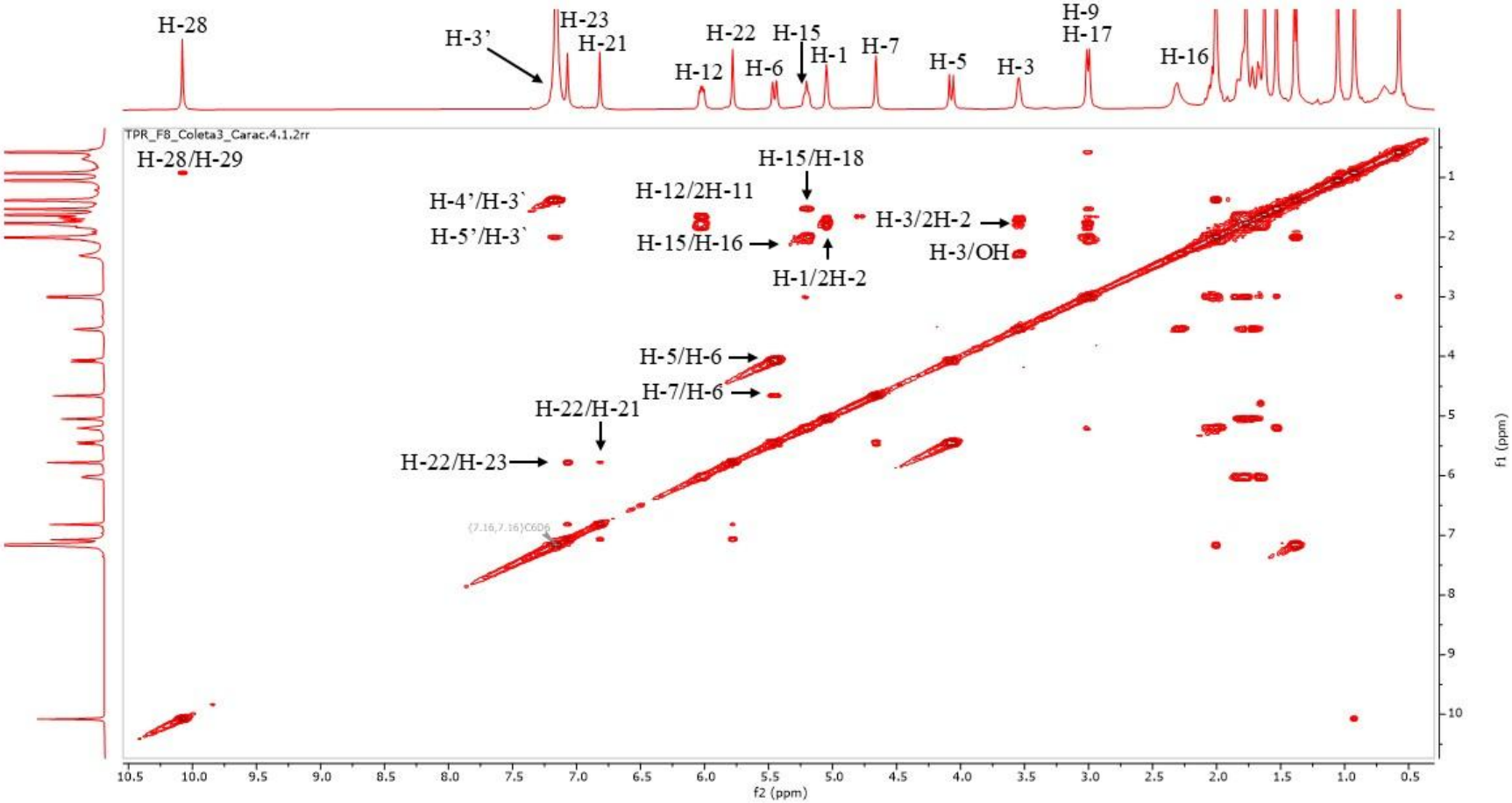
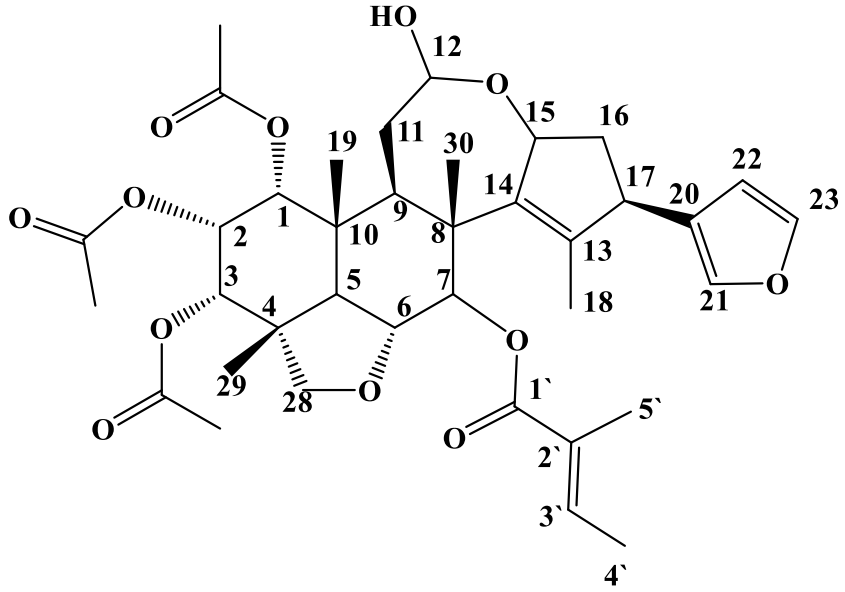


Figura 33 - Mapa de contorno COSY do limonoide 03 em C_6D_6 (9,4 T).

Limonoide 04 – 2-acetóxi-nimbolinina B



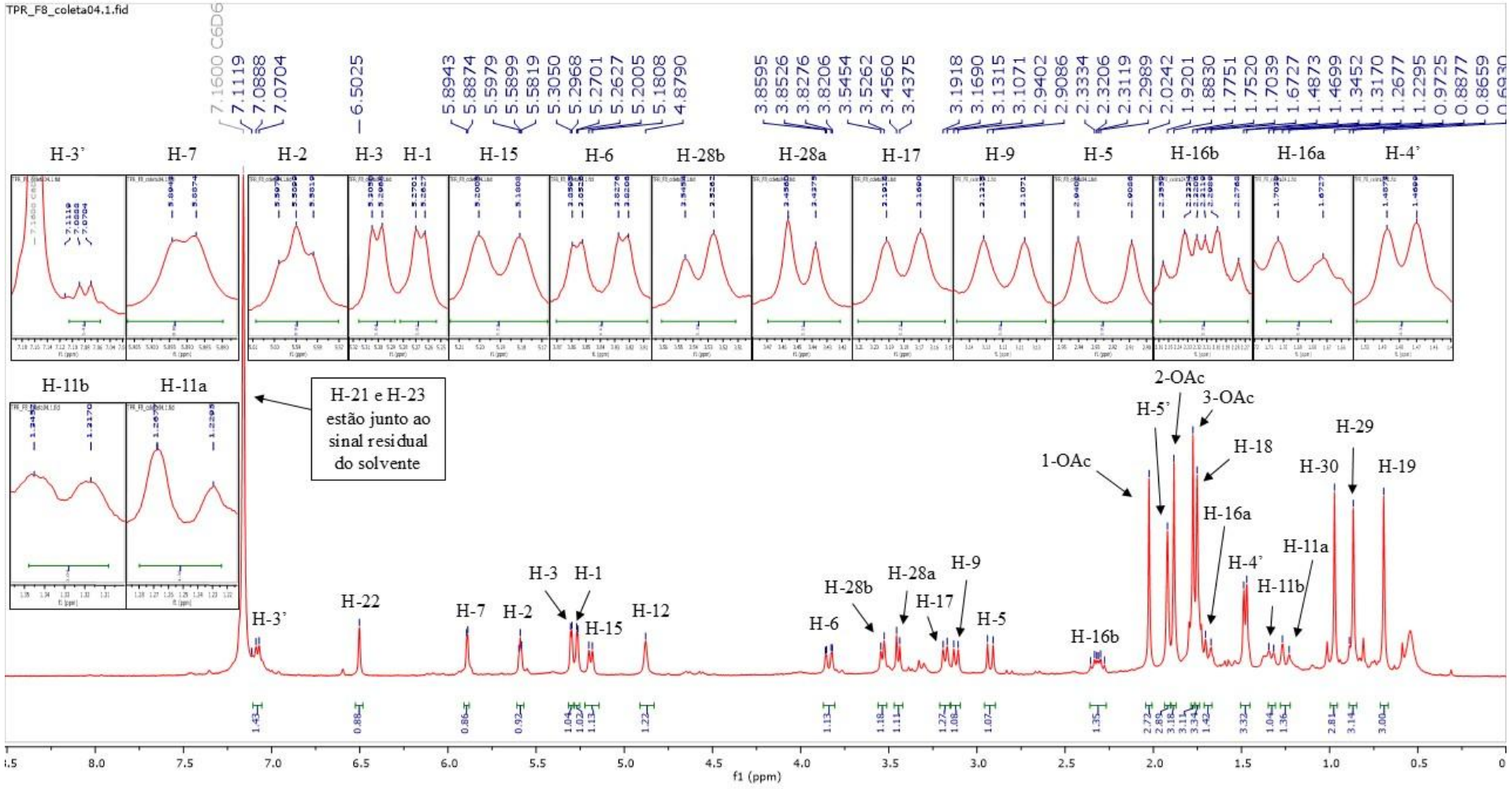


Figura 34 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

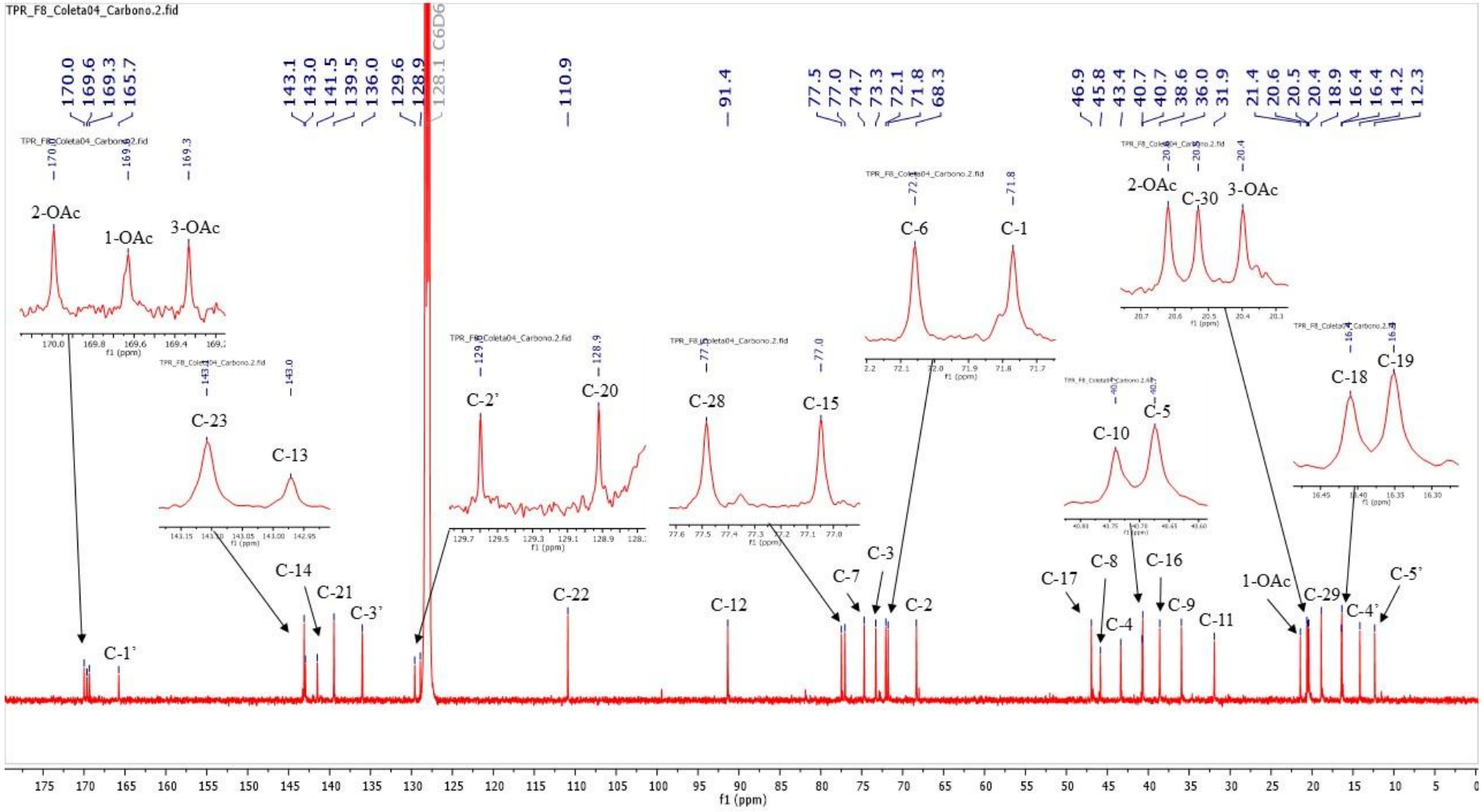


Figura 35 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

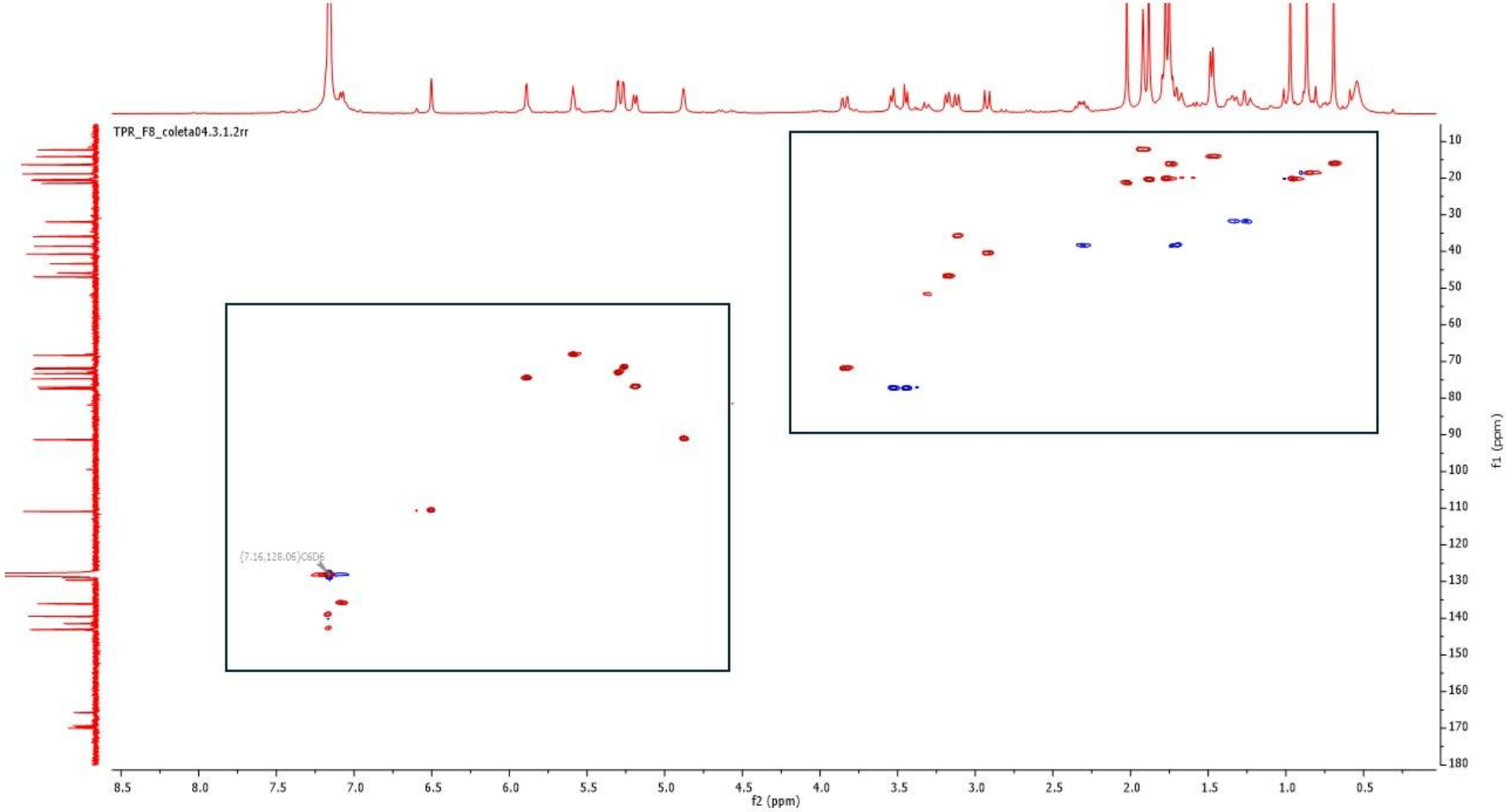


Figura 36 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

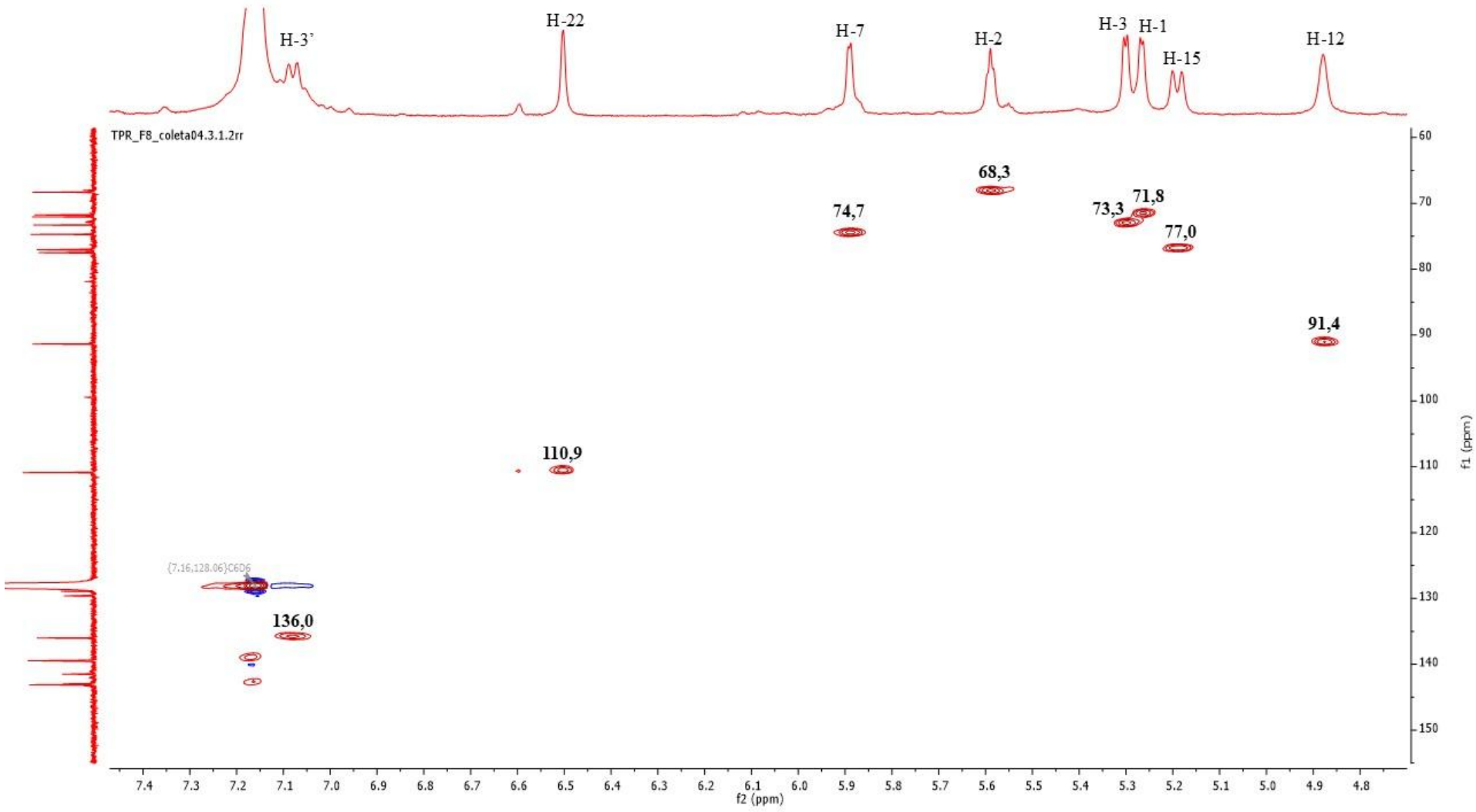


Figura 37 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

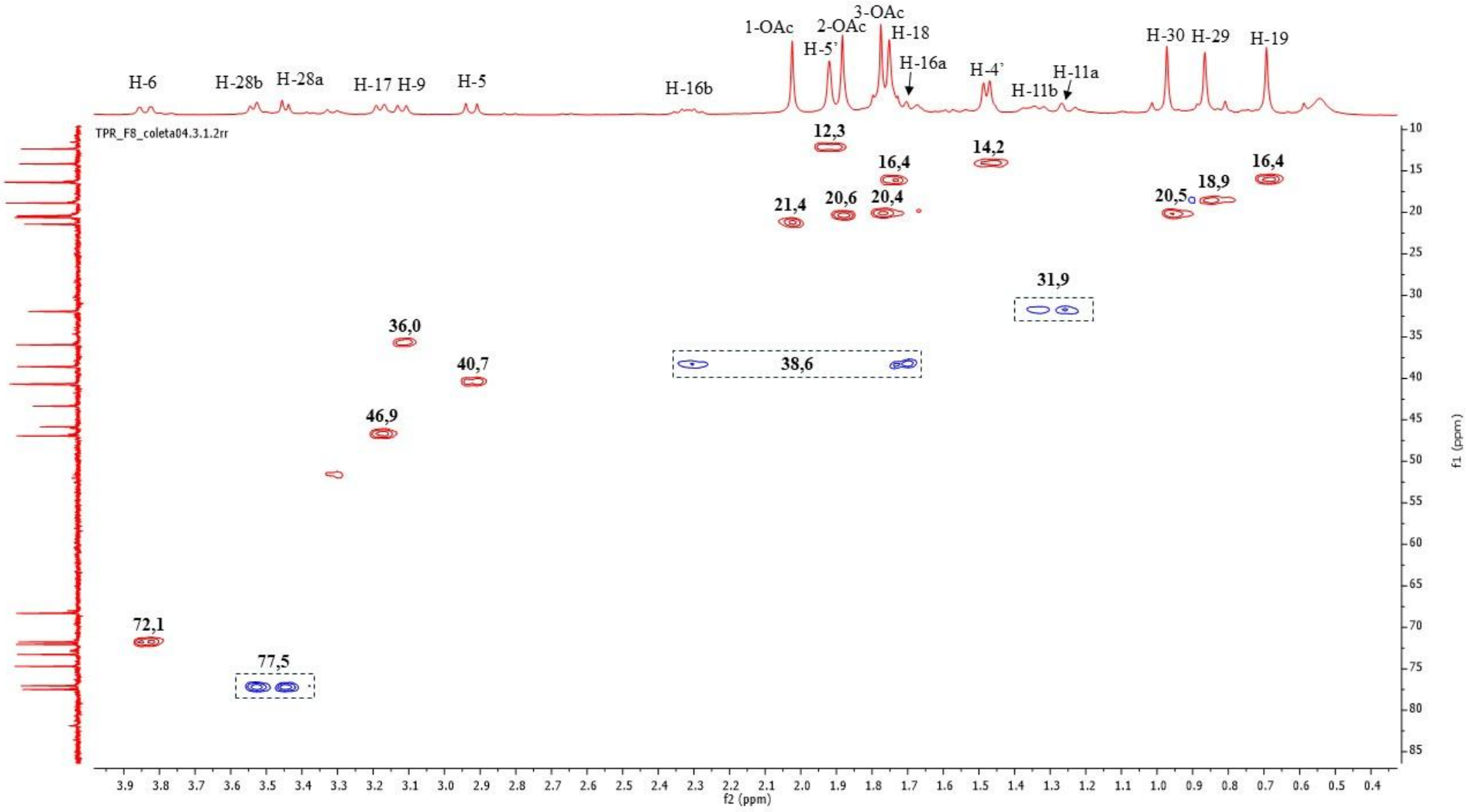


Figura 38 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

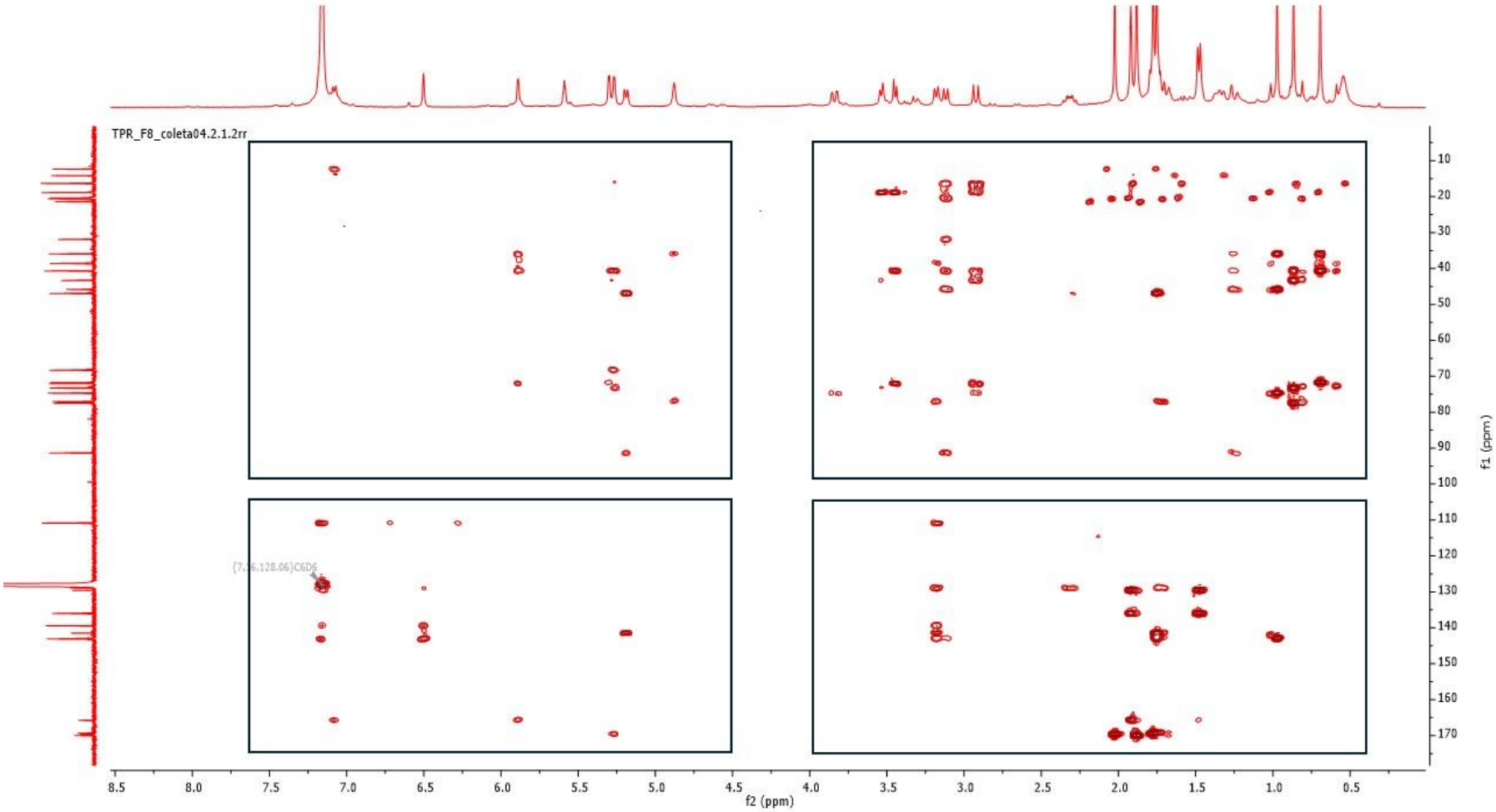


Figura 39 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

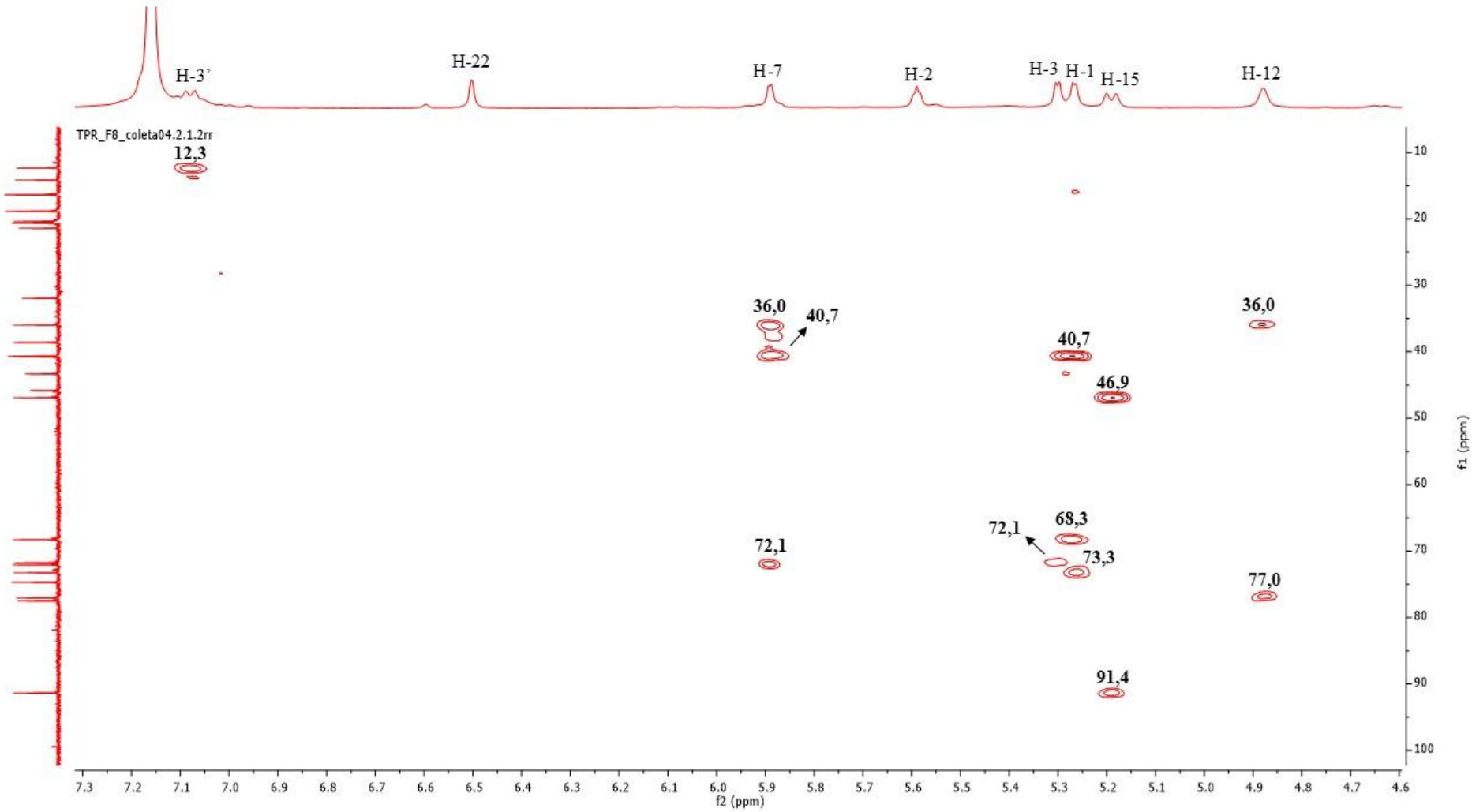


Figura 40 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

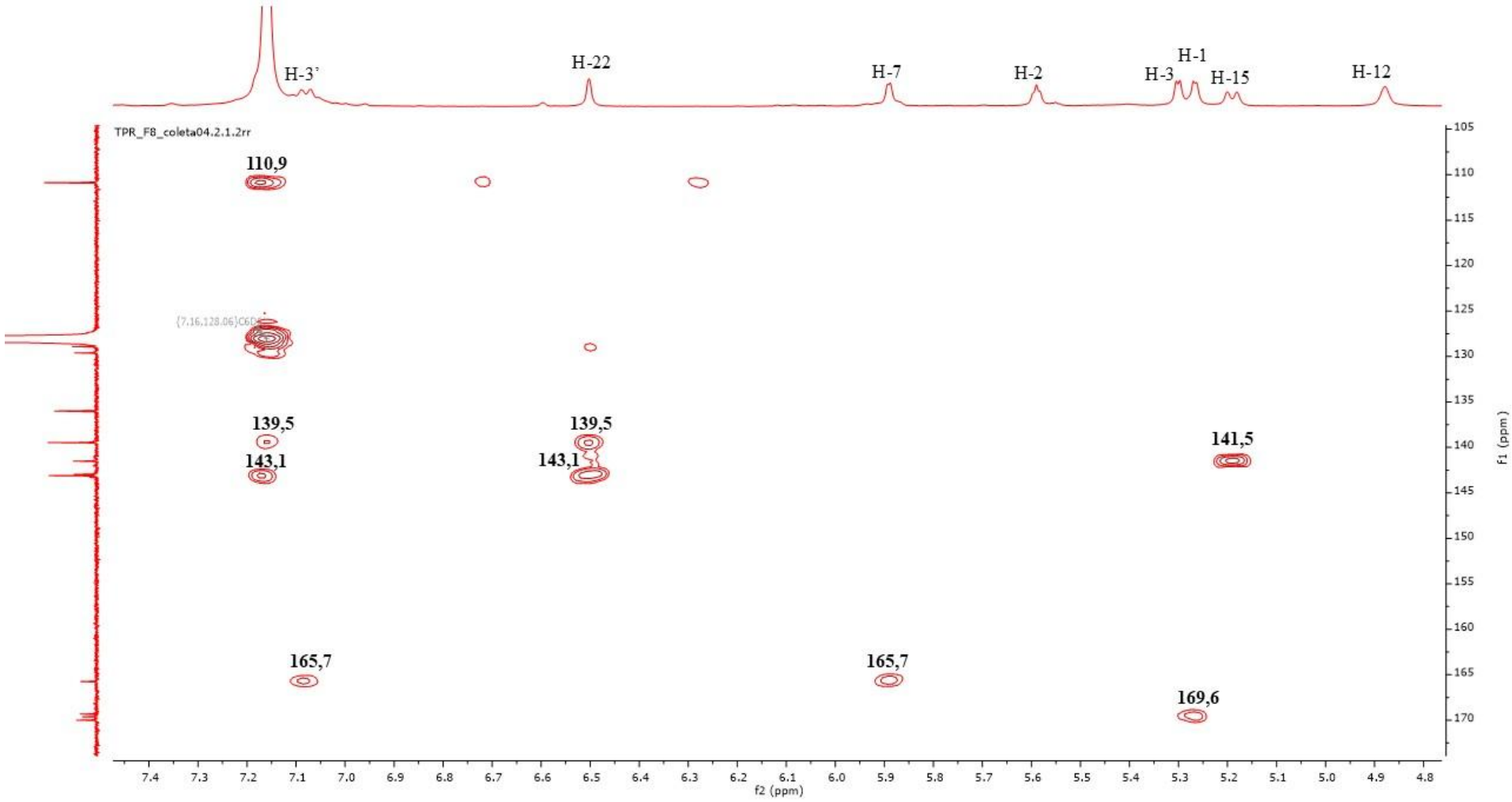


Figura 41 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

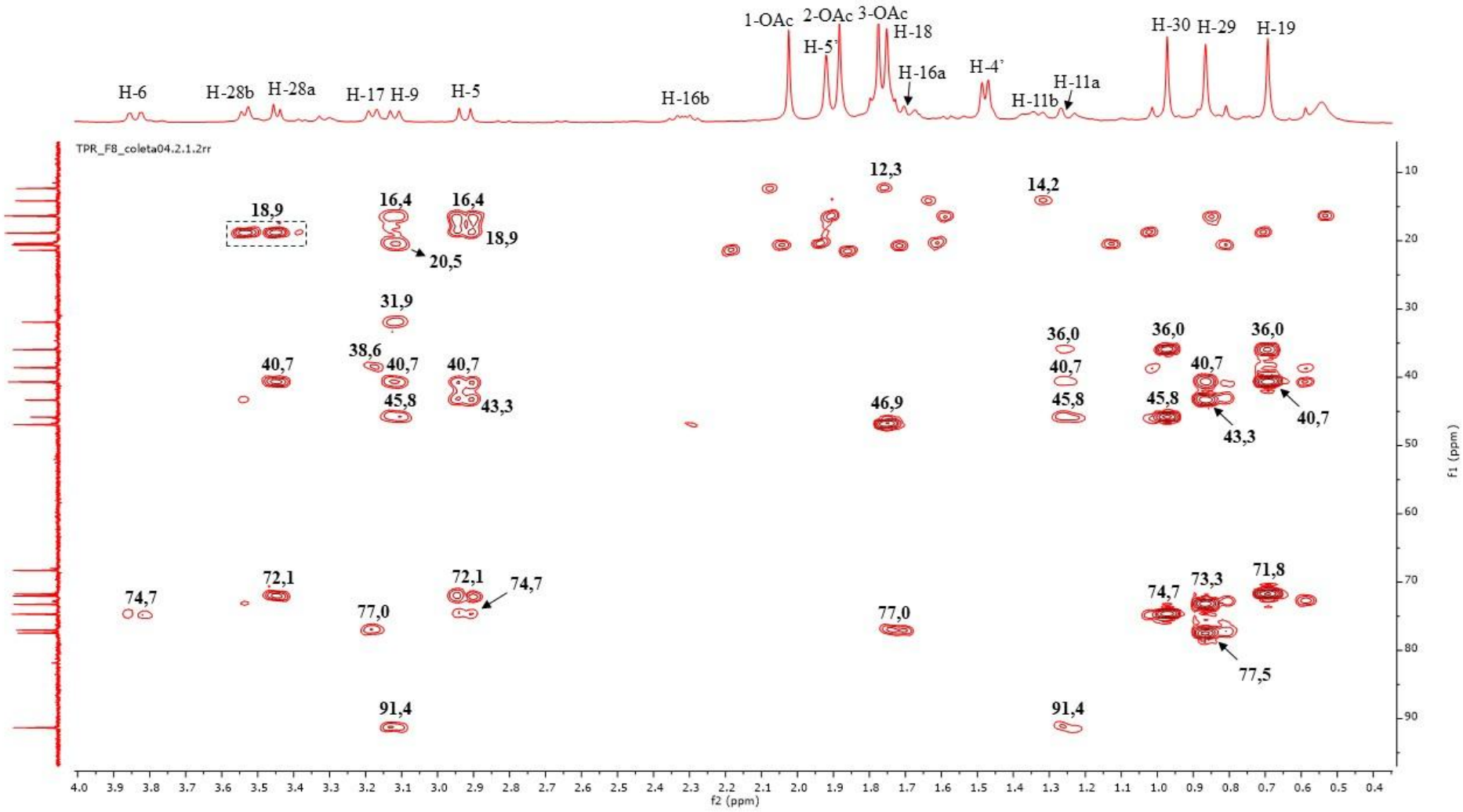


Figura 42 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

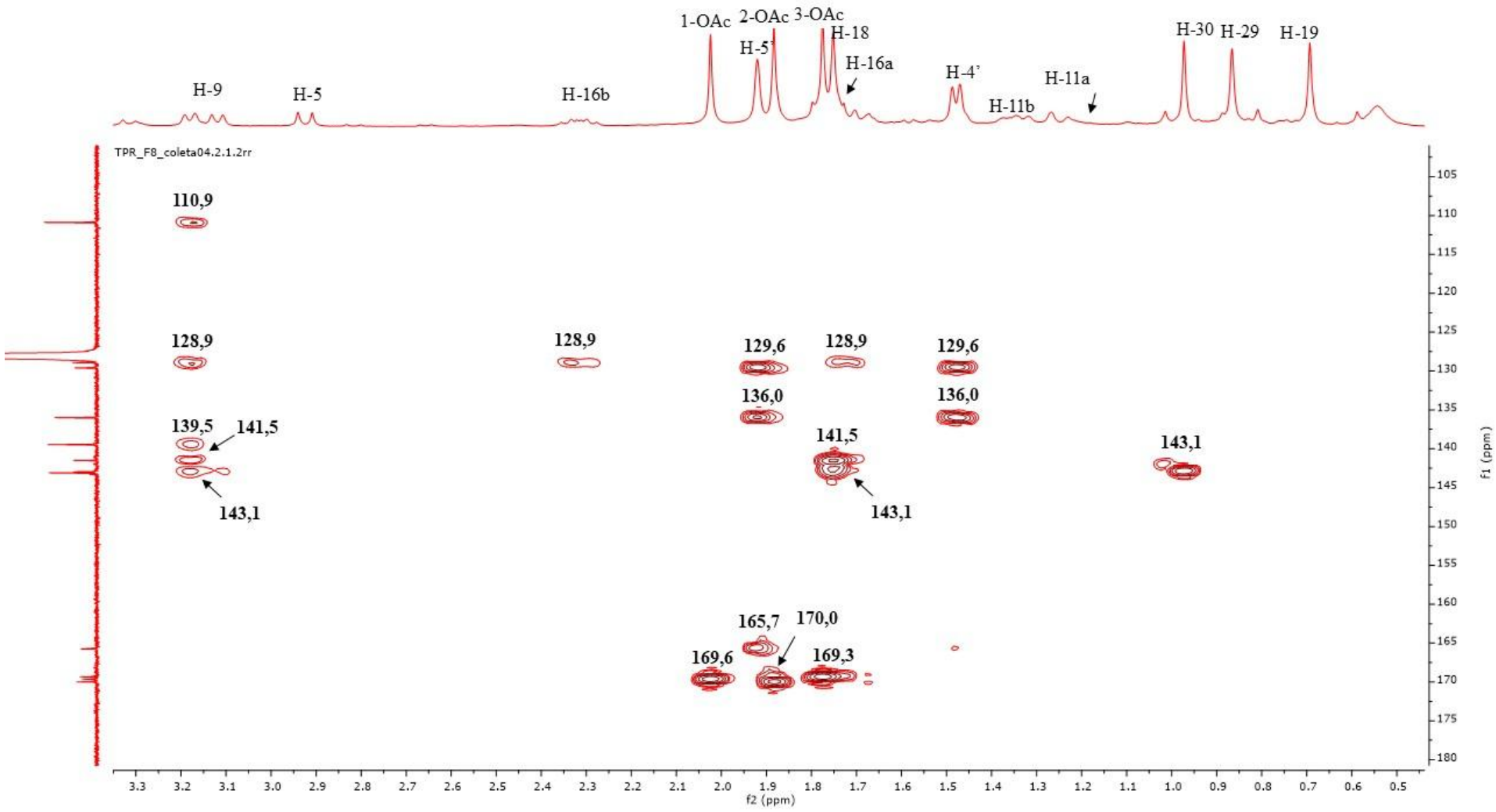


Figura 43 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

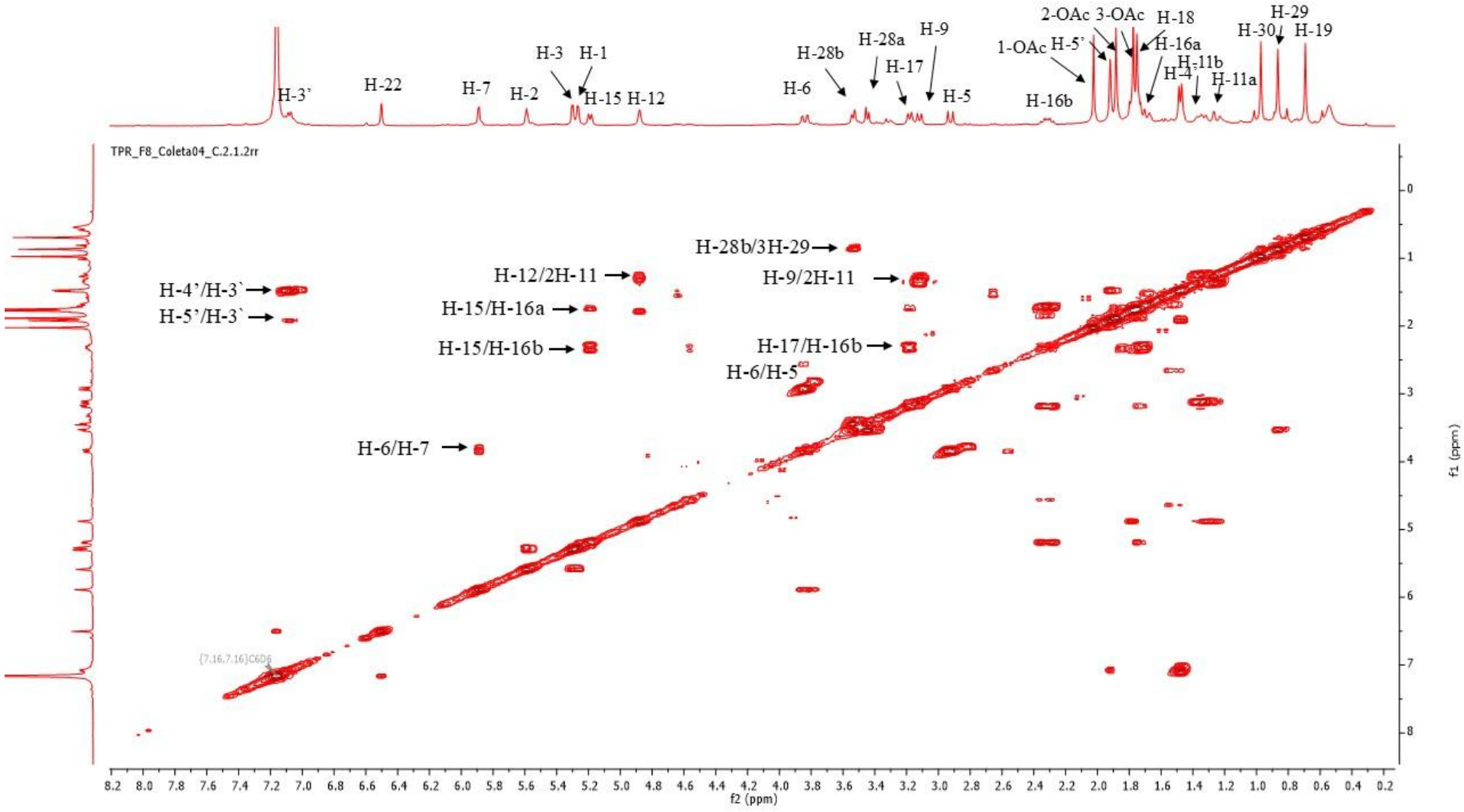
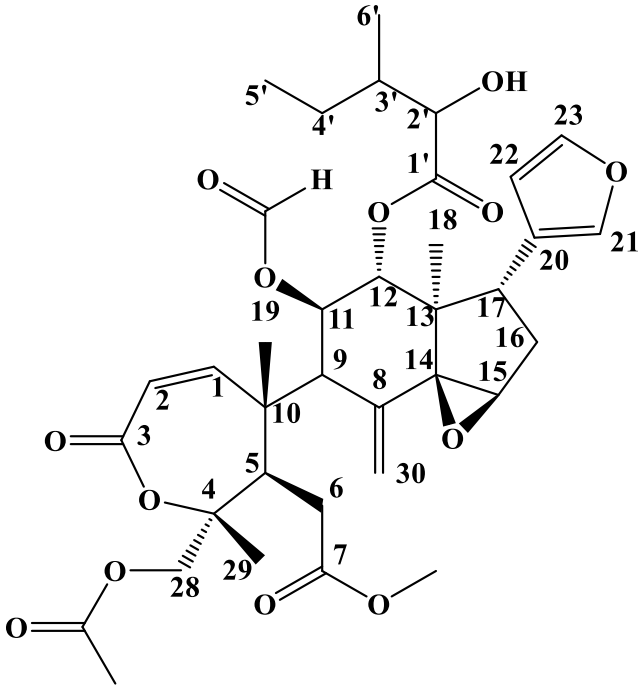


Figura 44 - Mapa de contorno COSY do limonoide 04 em C_6D_6 (9,4 T).

Substância 05 – Mombasol



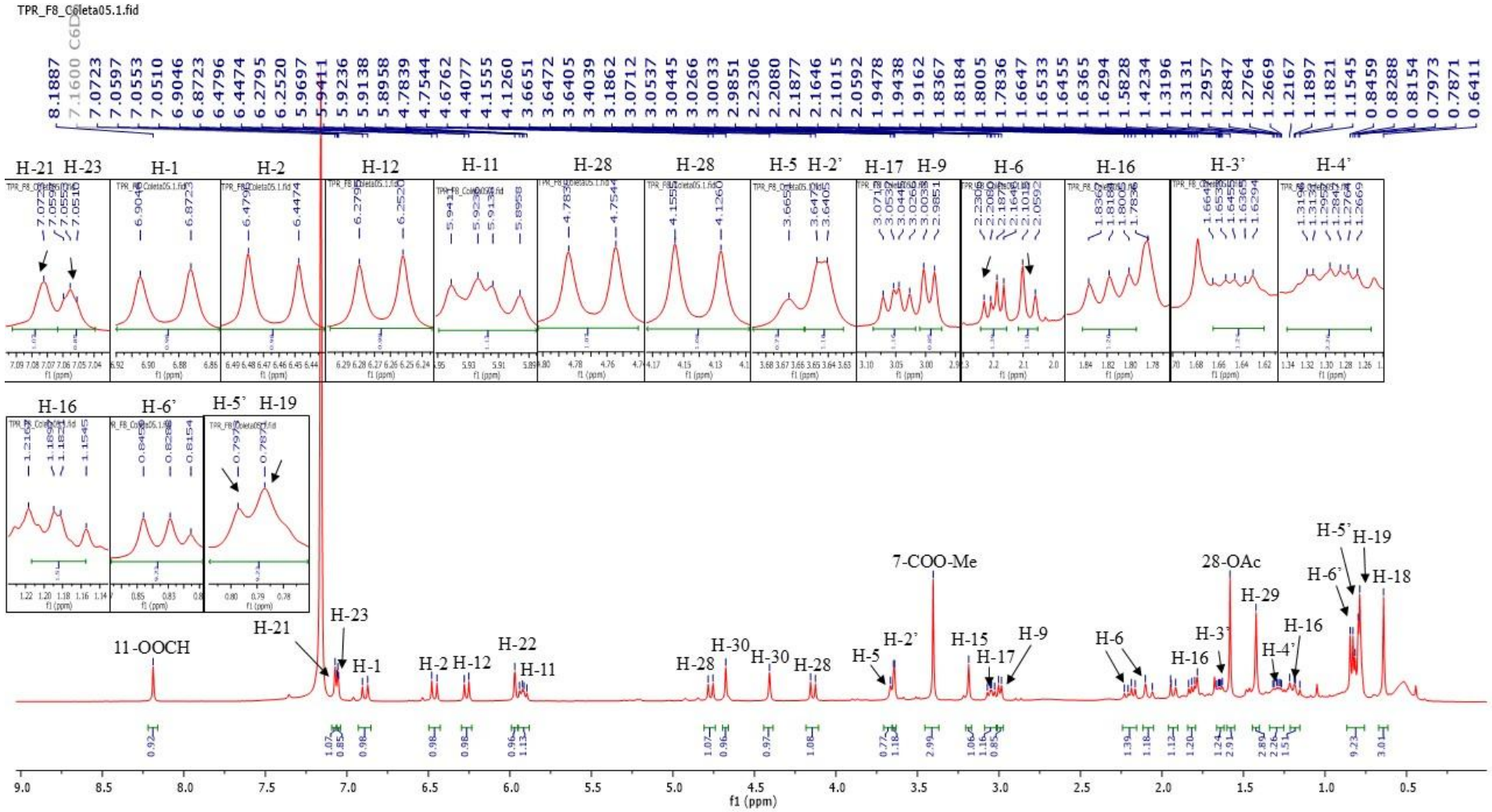


Figura 45 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

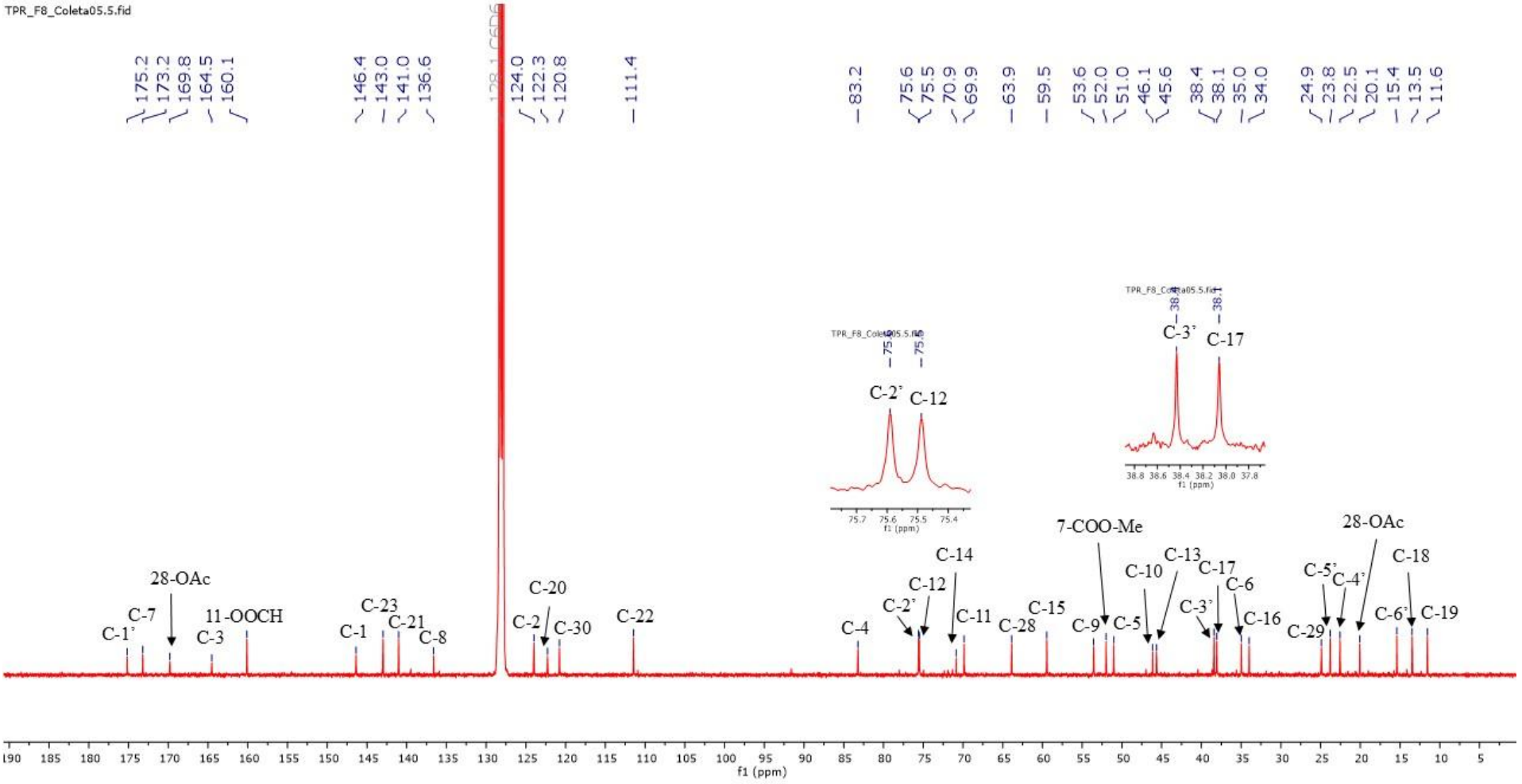


Figura 46 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

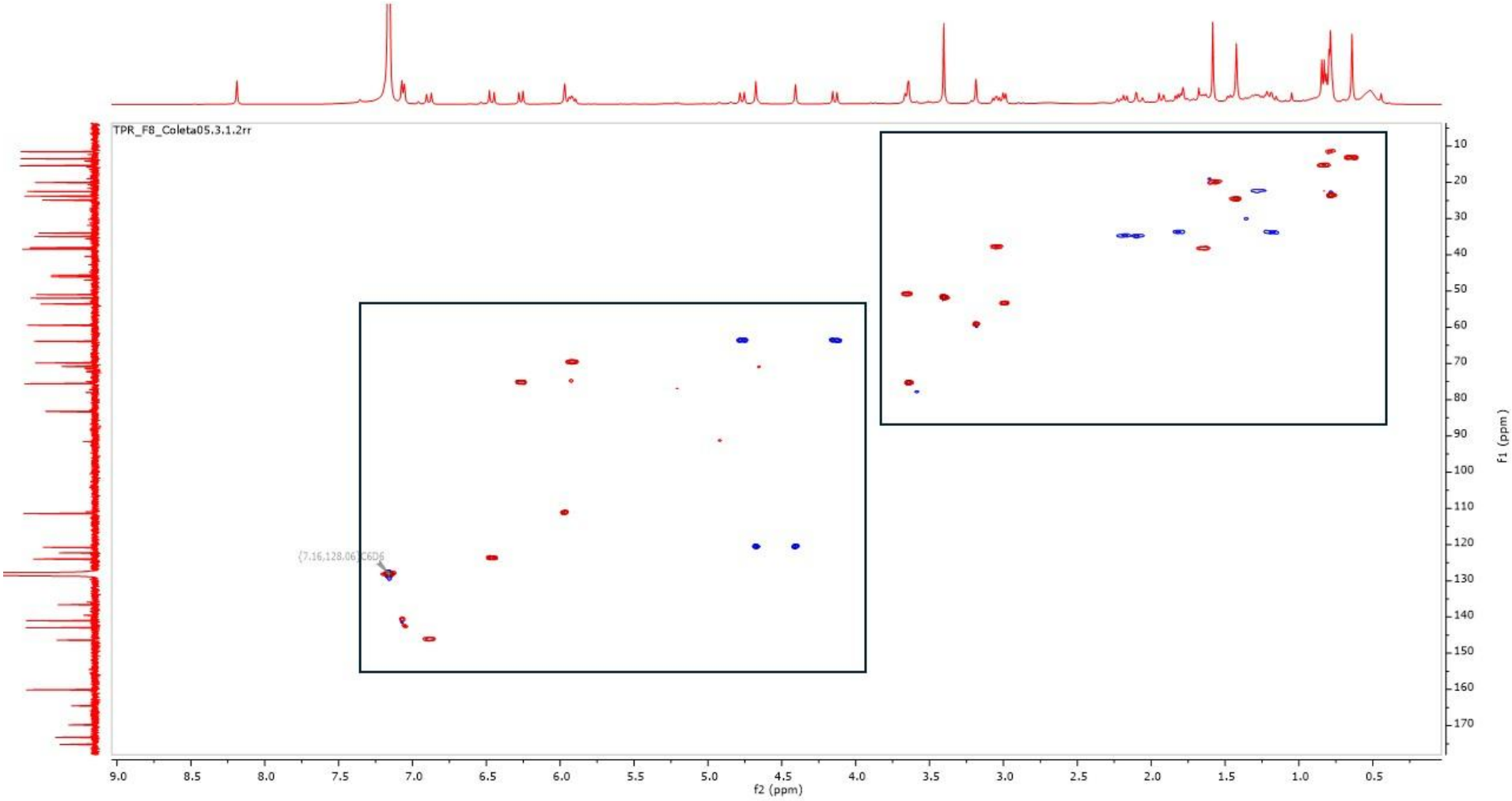


Figura 47 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

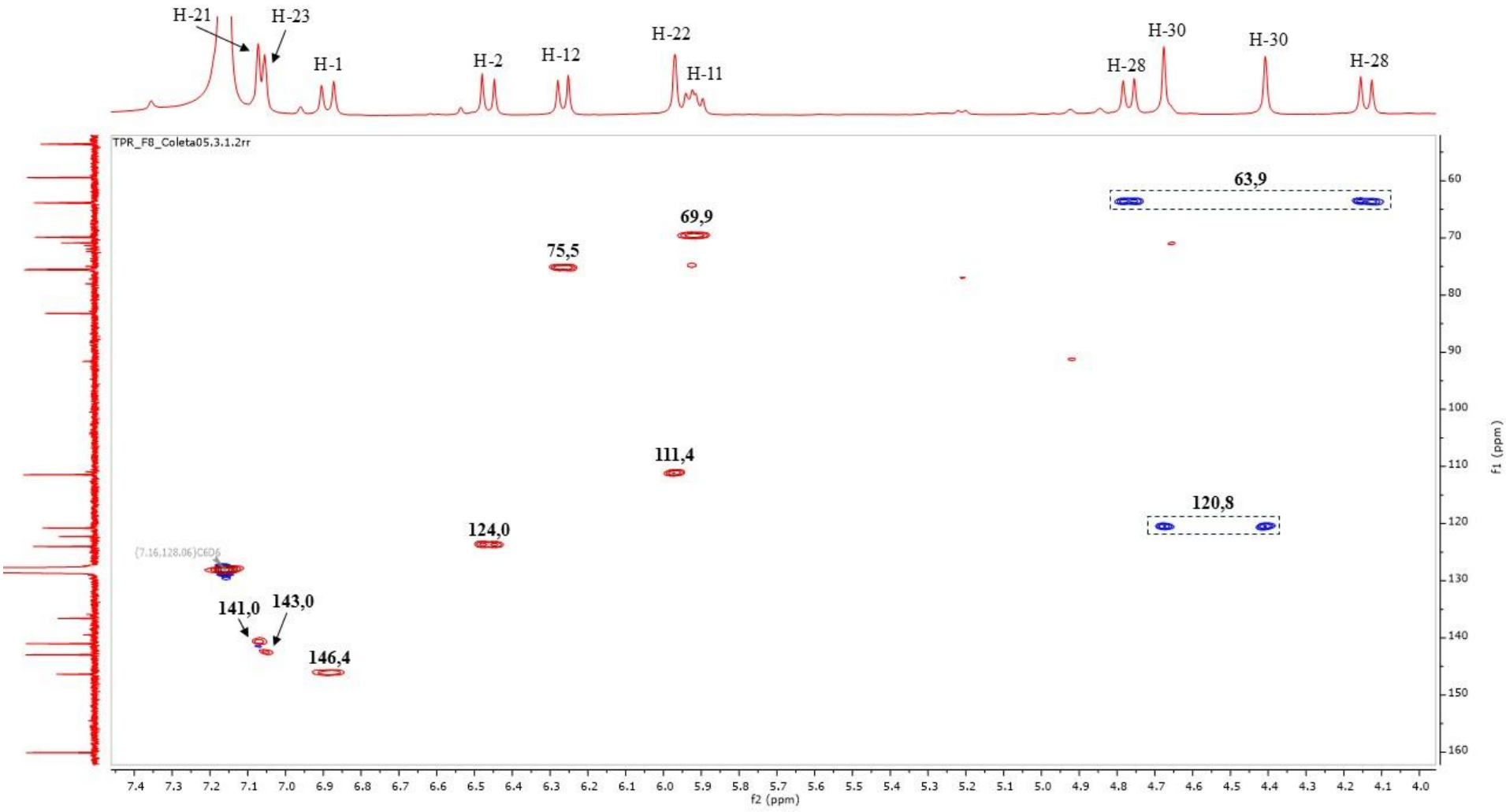


Figura 48 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

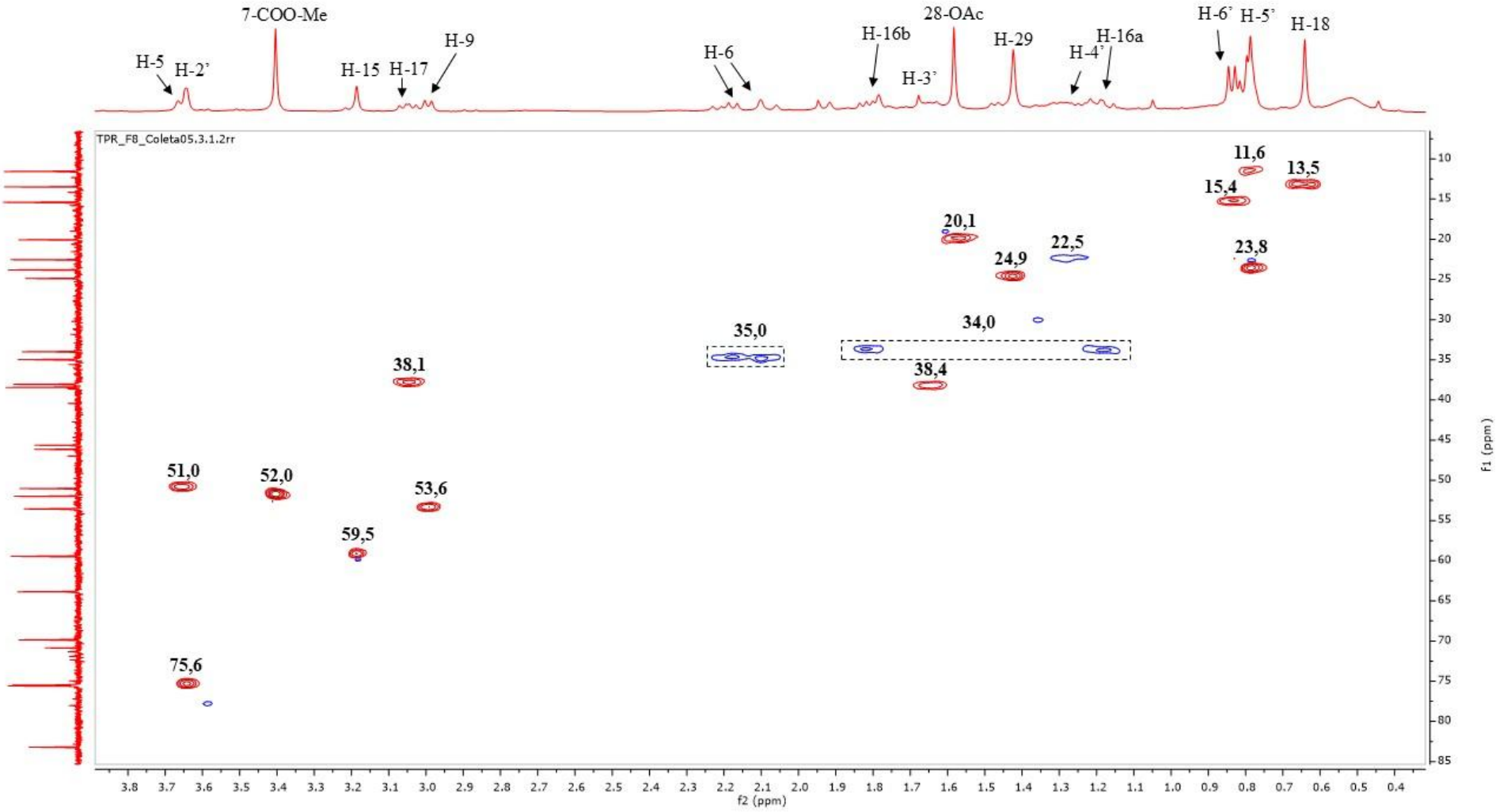


Figura 49 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

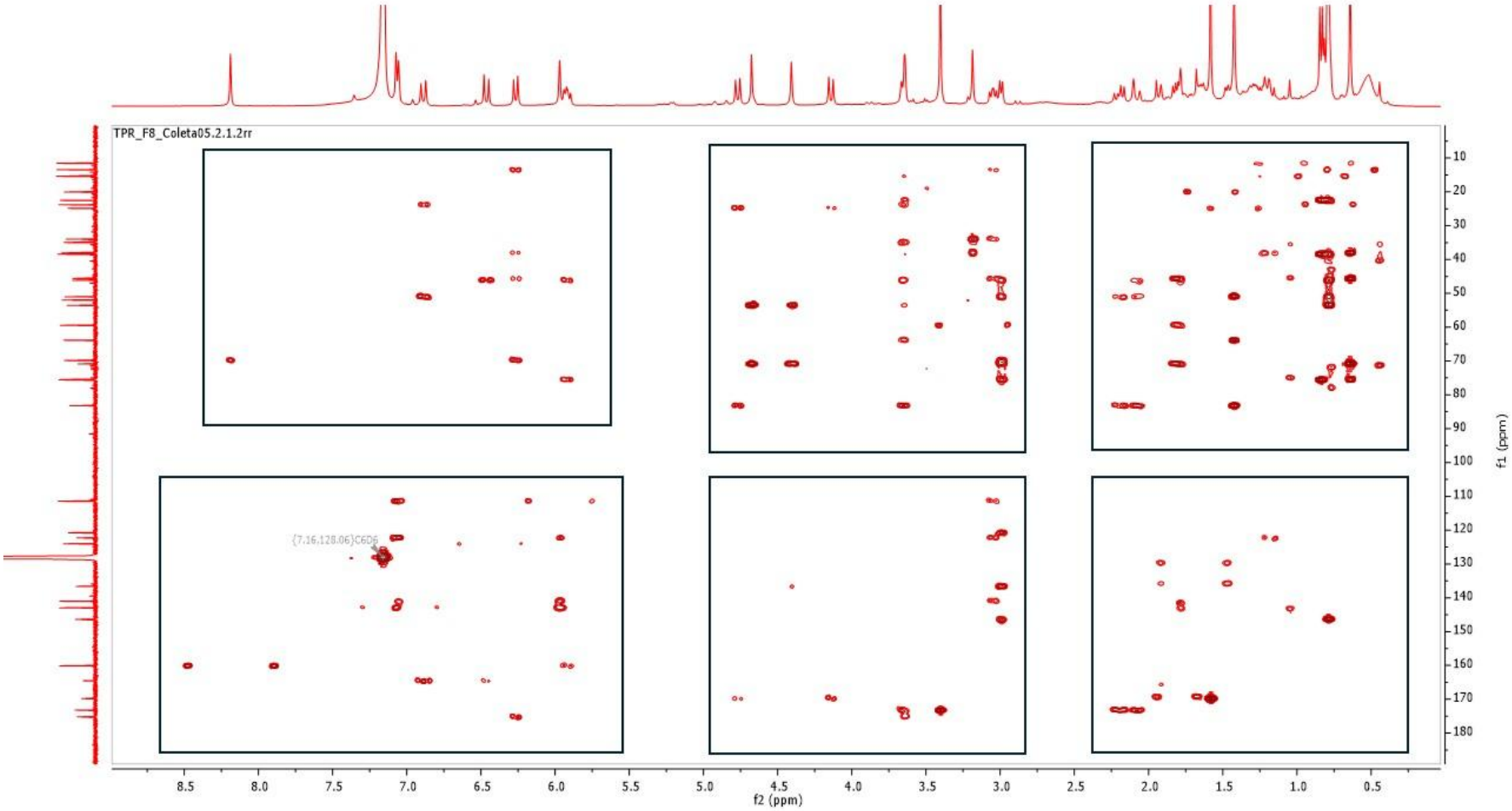


Figura 50 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T), as áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

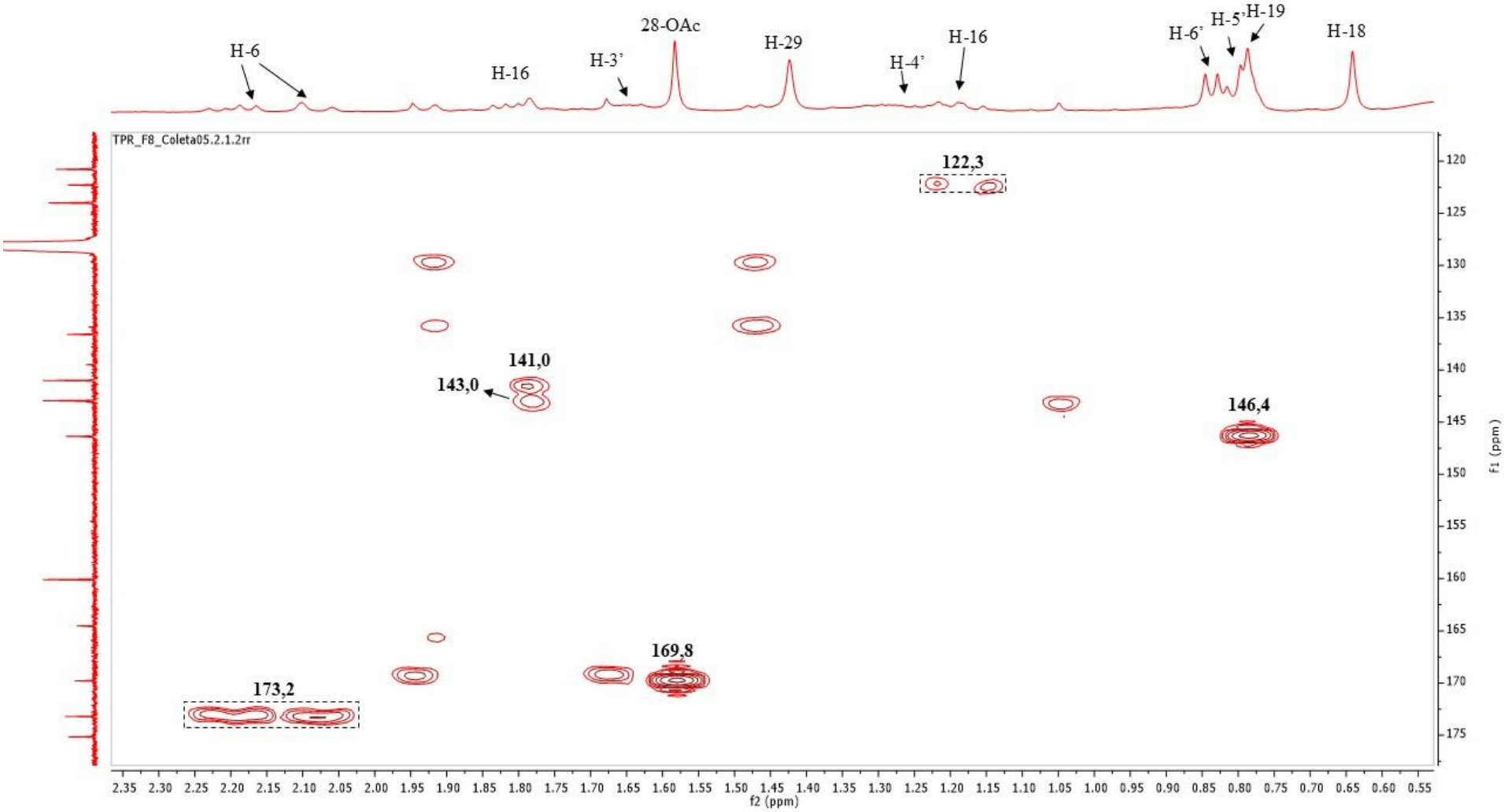


Figura 51 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

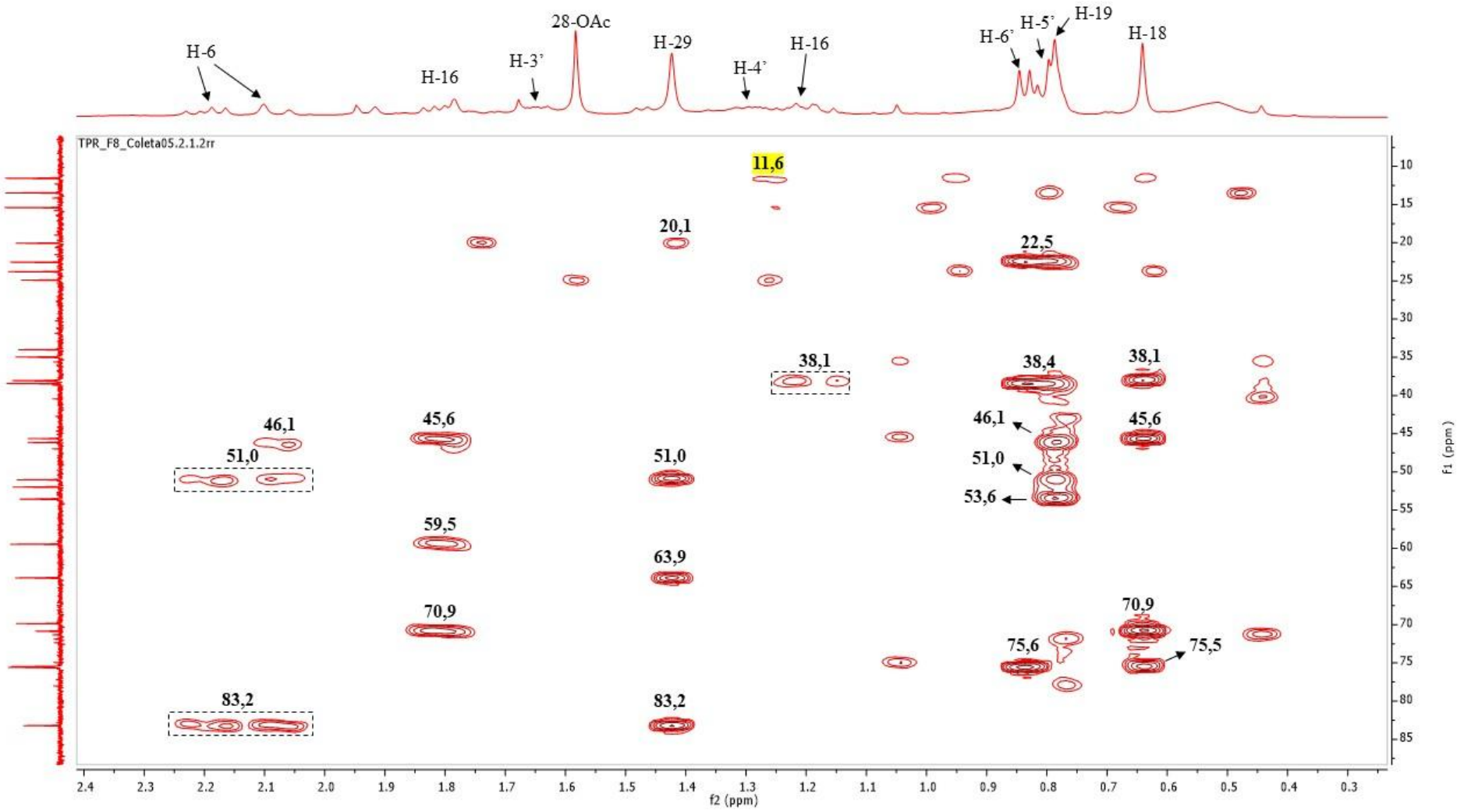


Figura 52 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

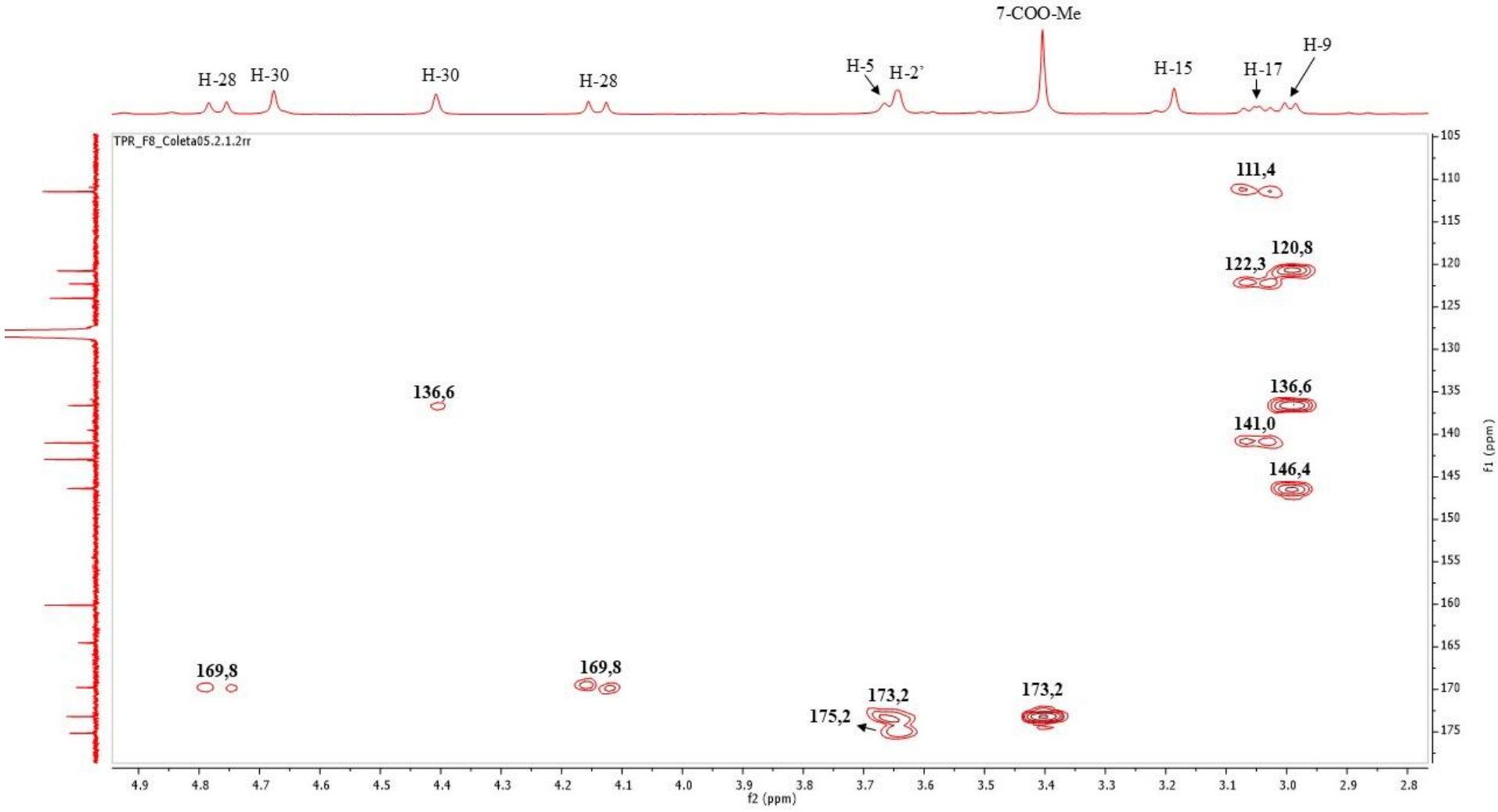


Figura 53 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

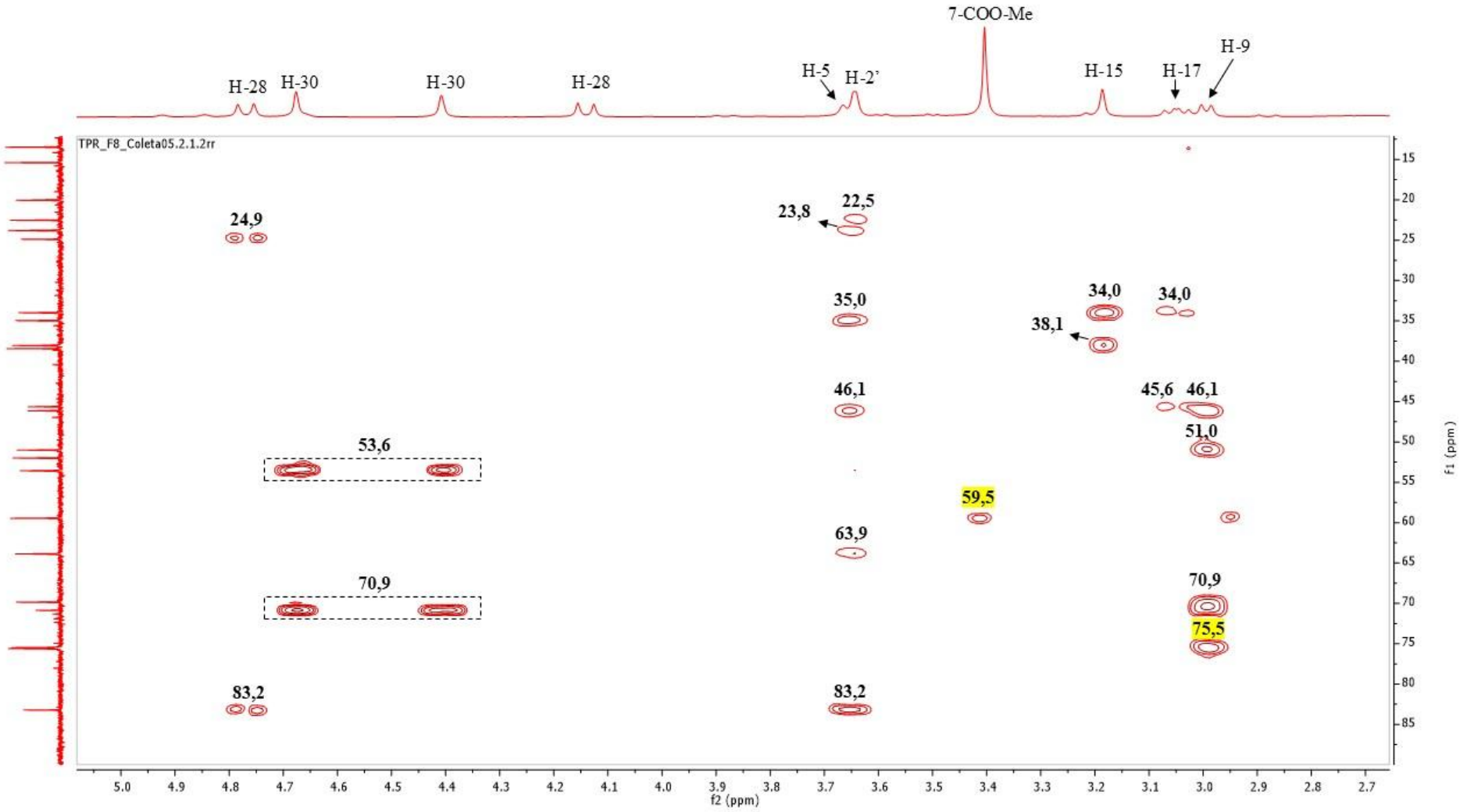


Figura 54 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

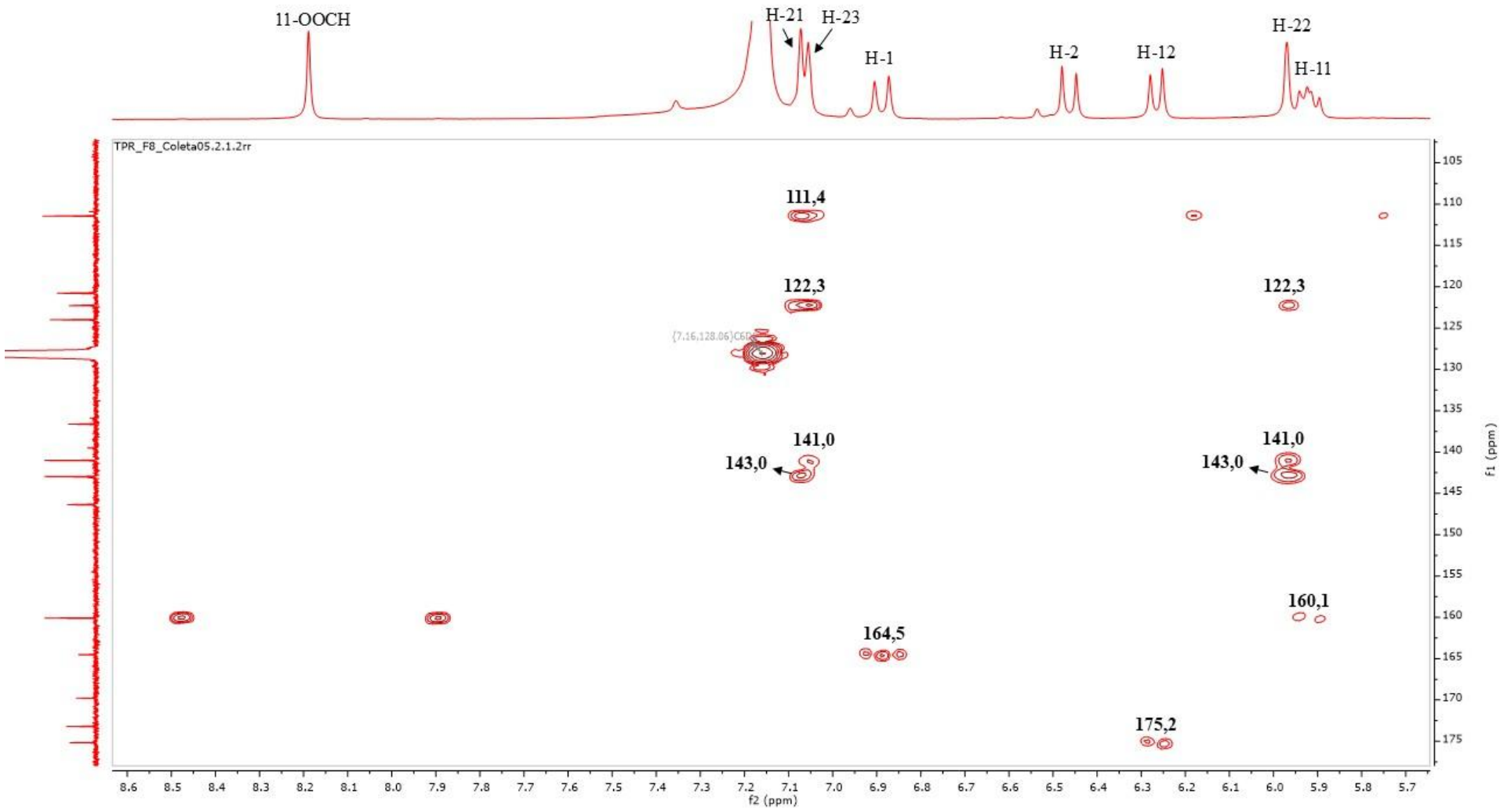


Figura 55 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

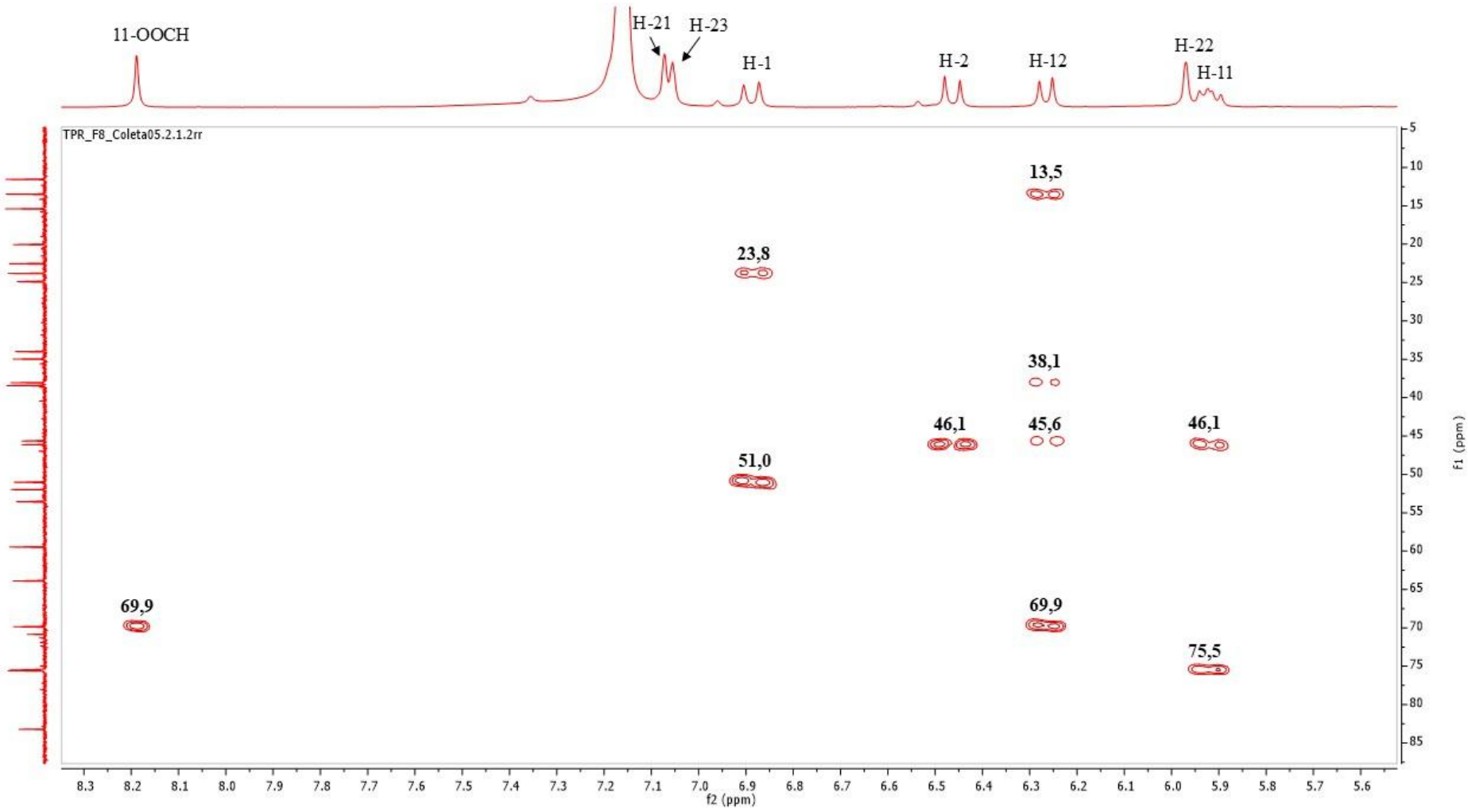


Figura 56 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

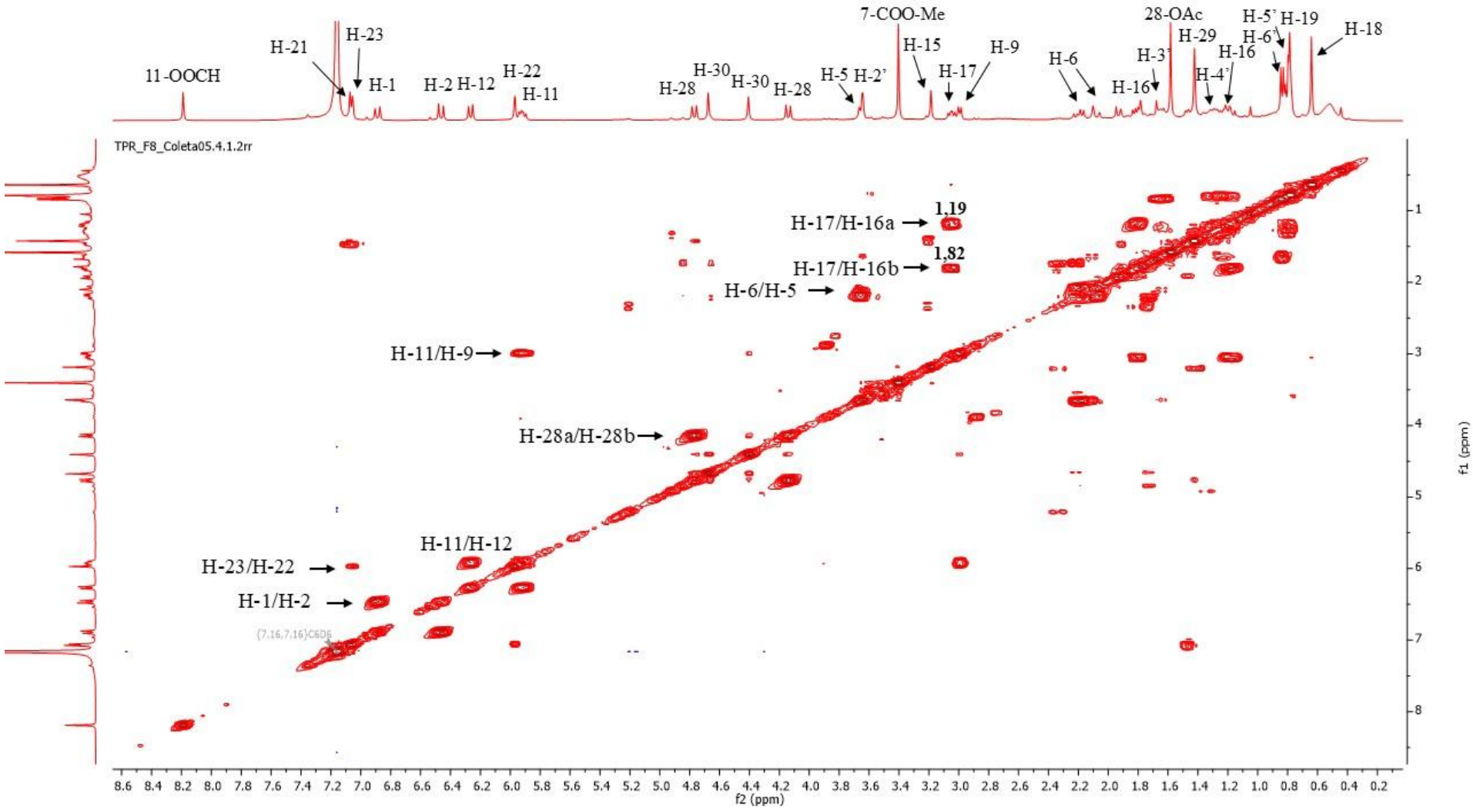
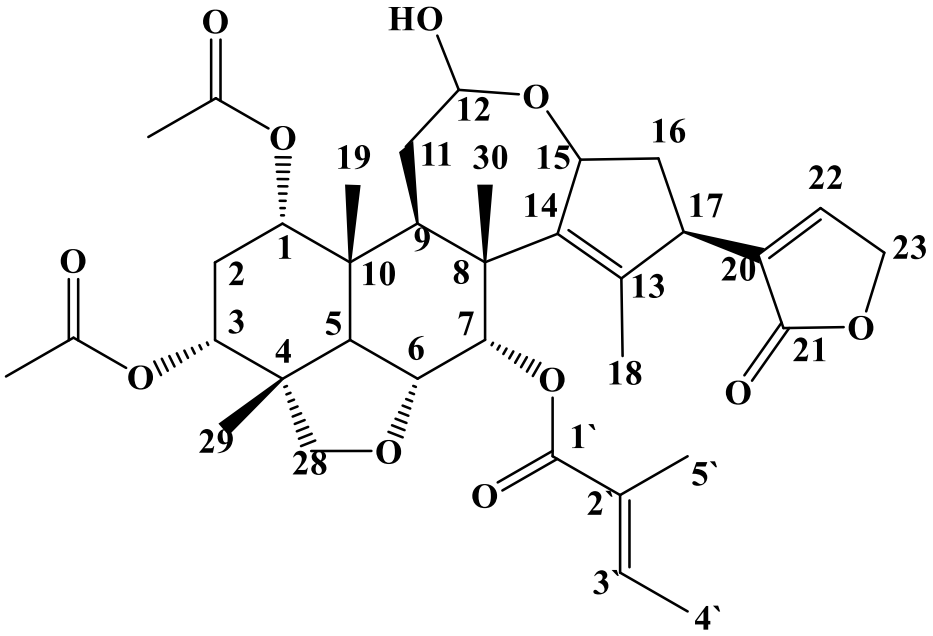


Figura 57 - Ampliação do mapa de contorno COSY do limonoide 05 em C_6D_6 (9,4 T).

Substância 06 – 12-oxi- chisonimbolinin G



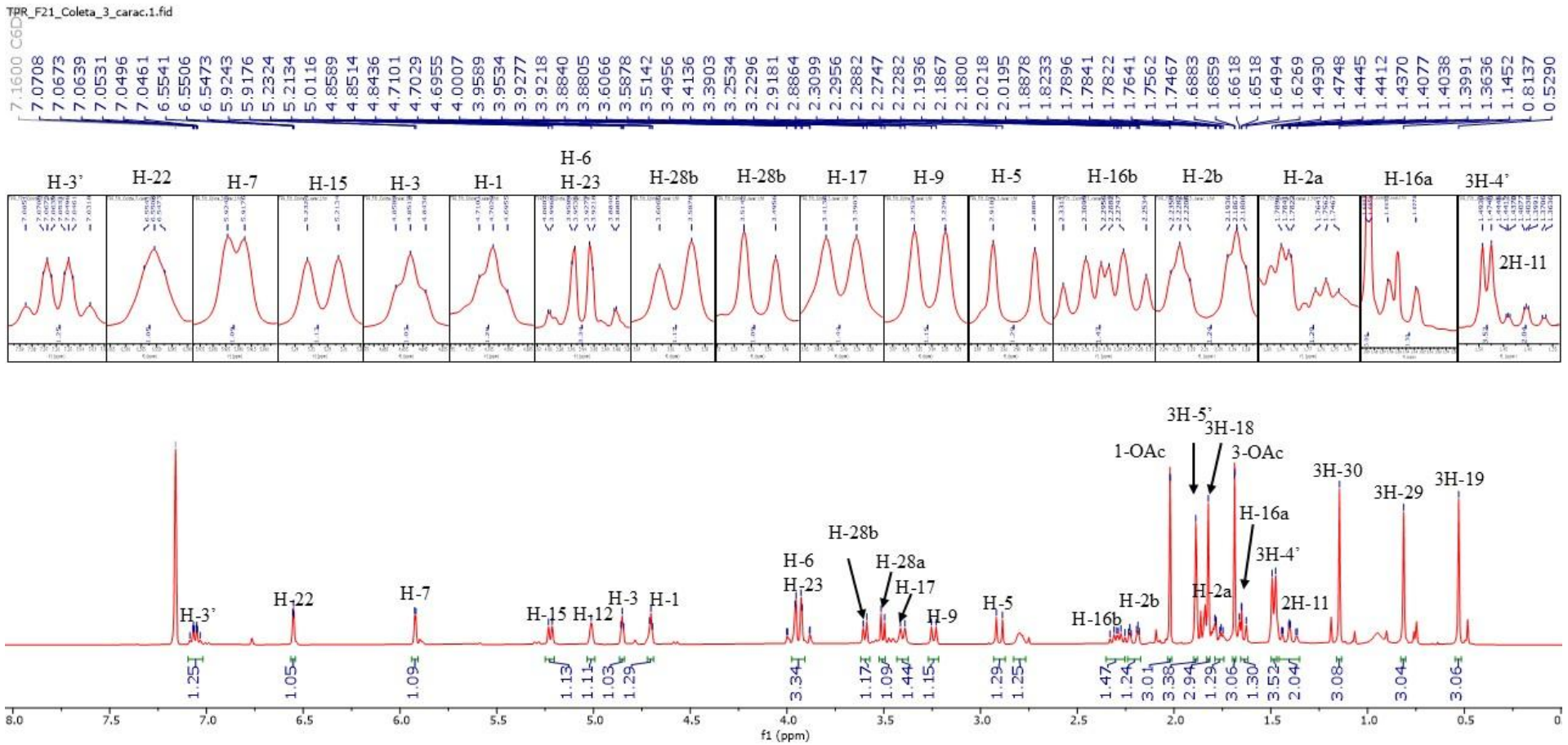


Figura 58 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T).

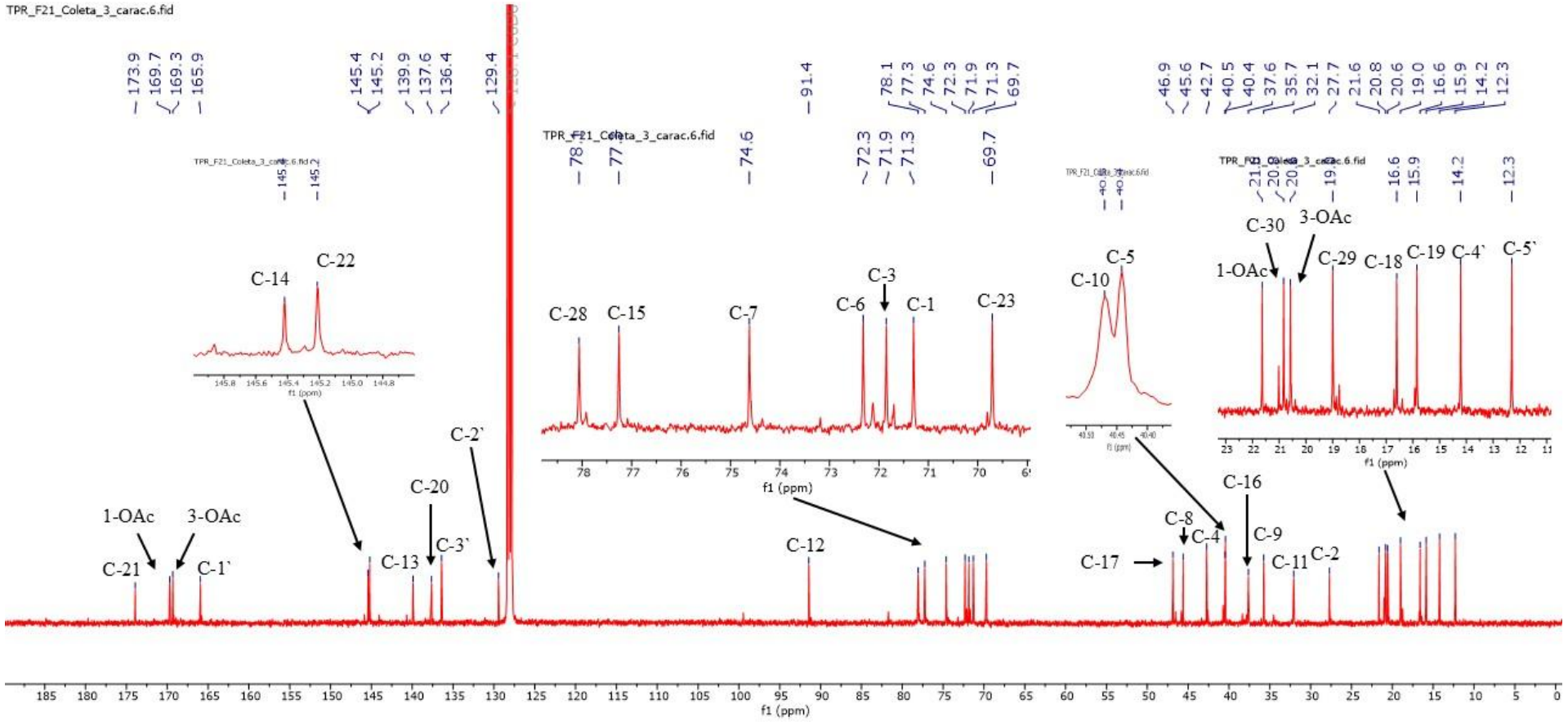


Figura 59 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T).

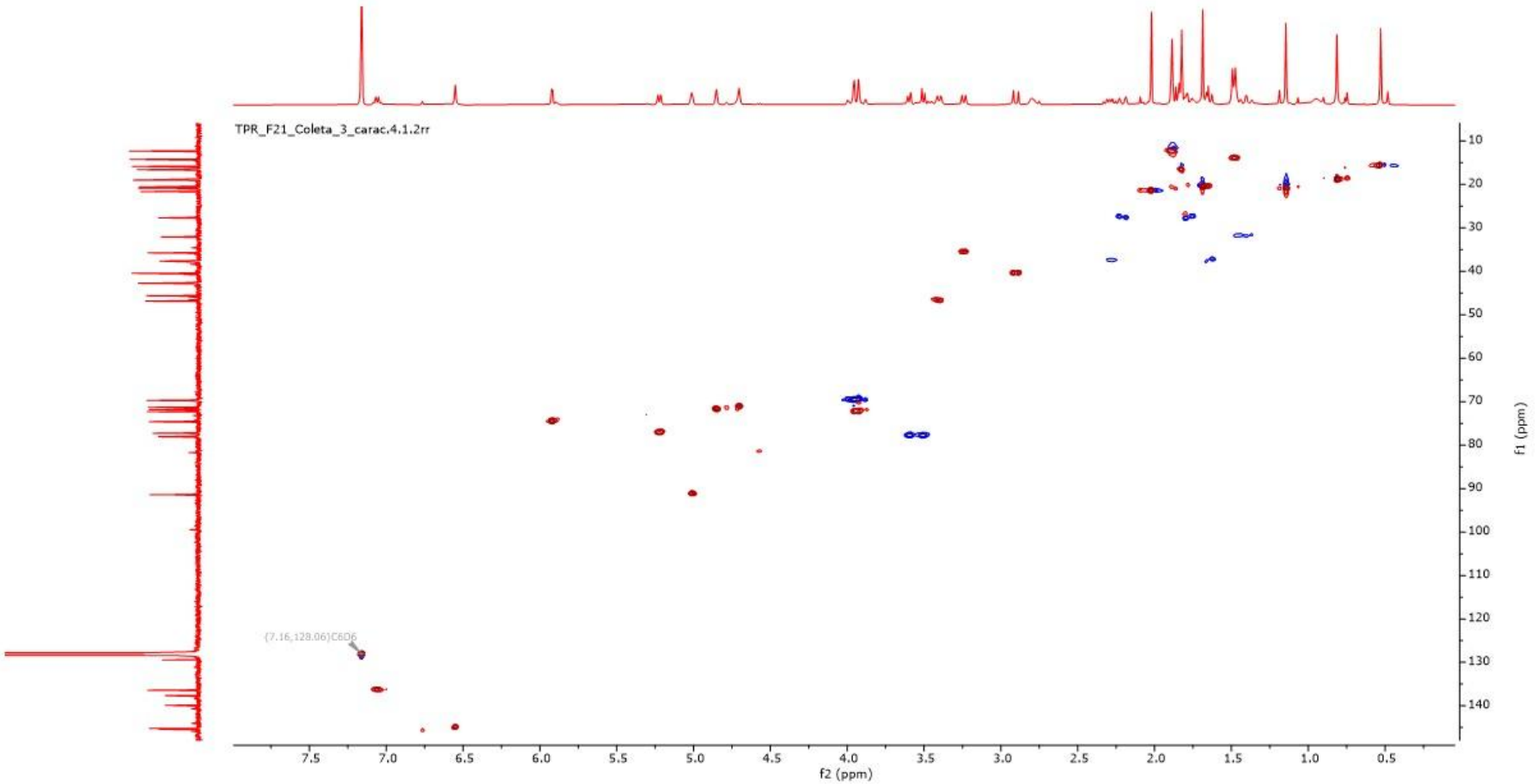


Figura 60 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T).

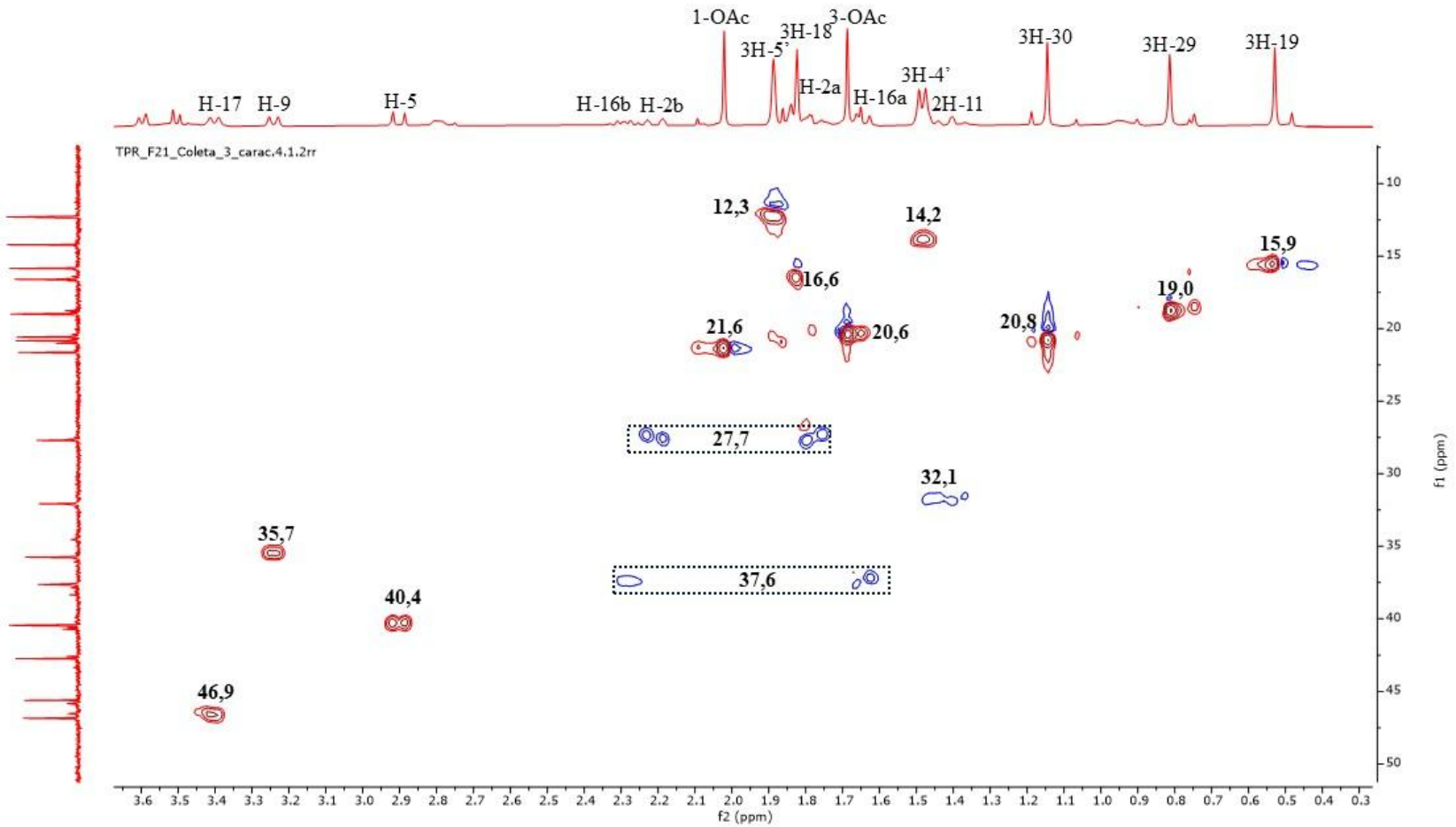


Figura 61 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T).

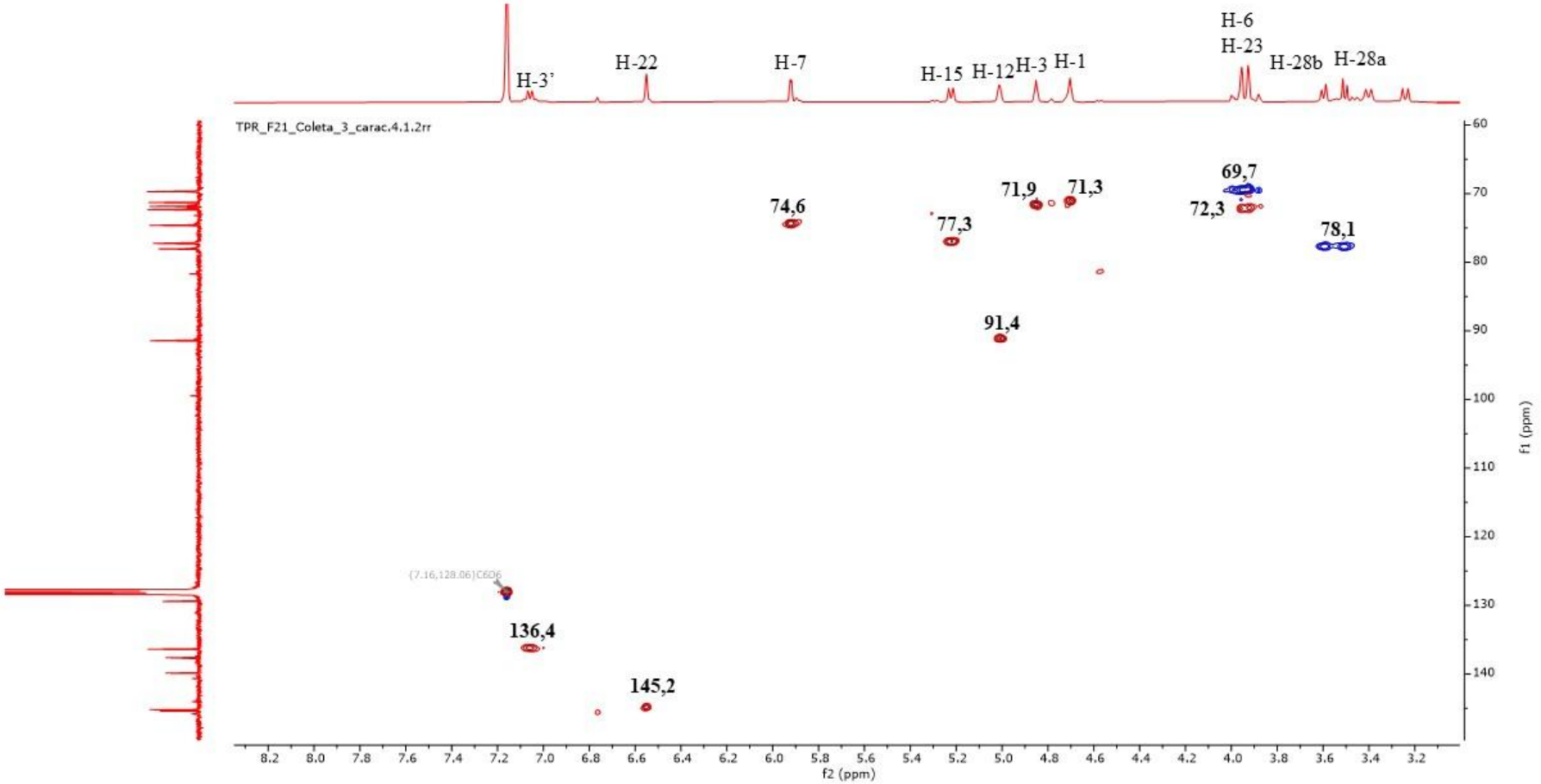


Figura 62 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T).

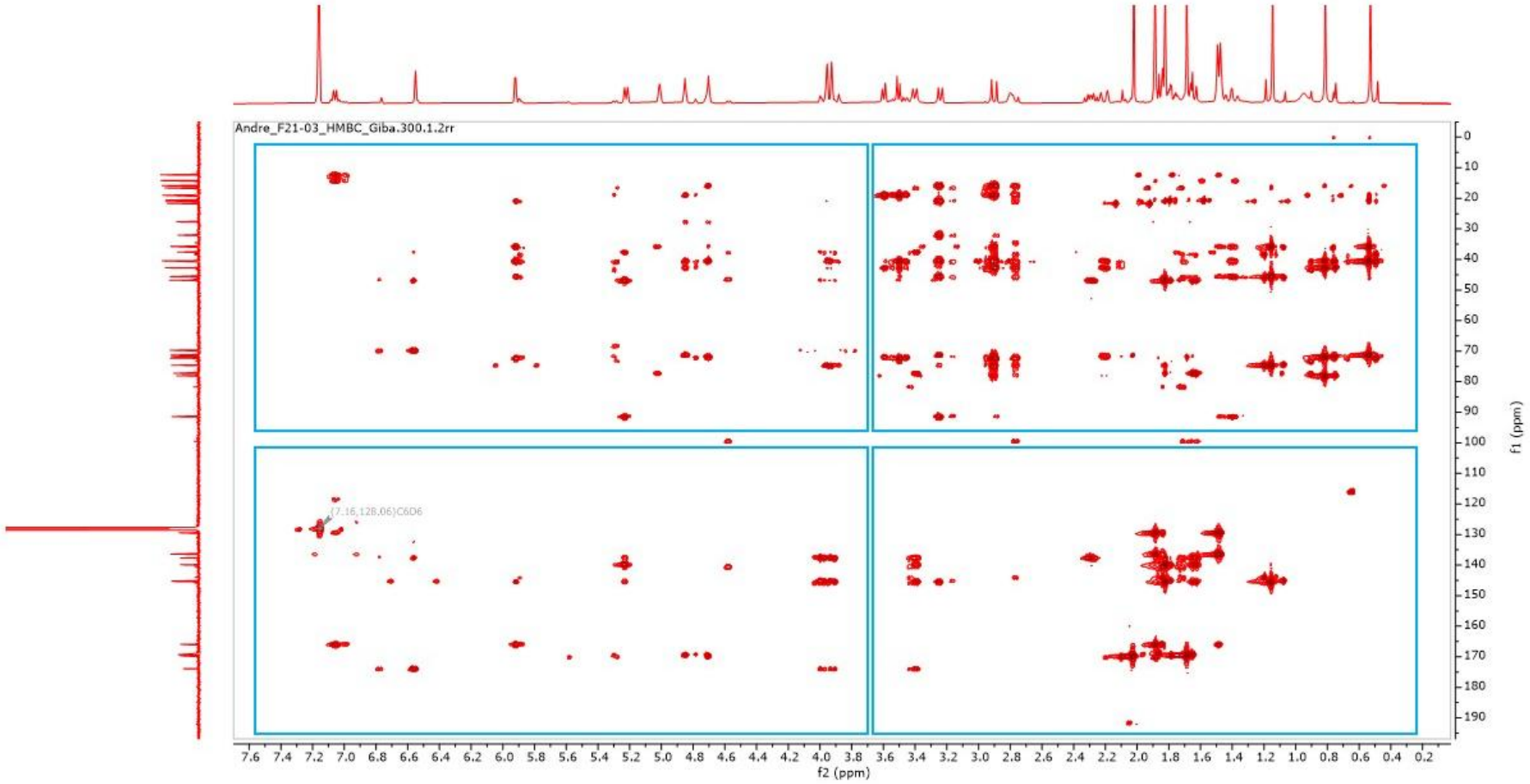


Figura 63 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

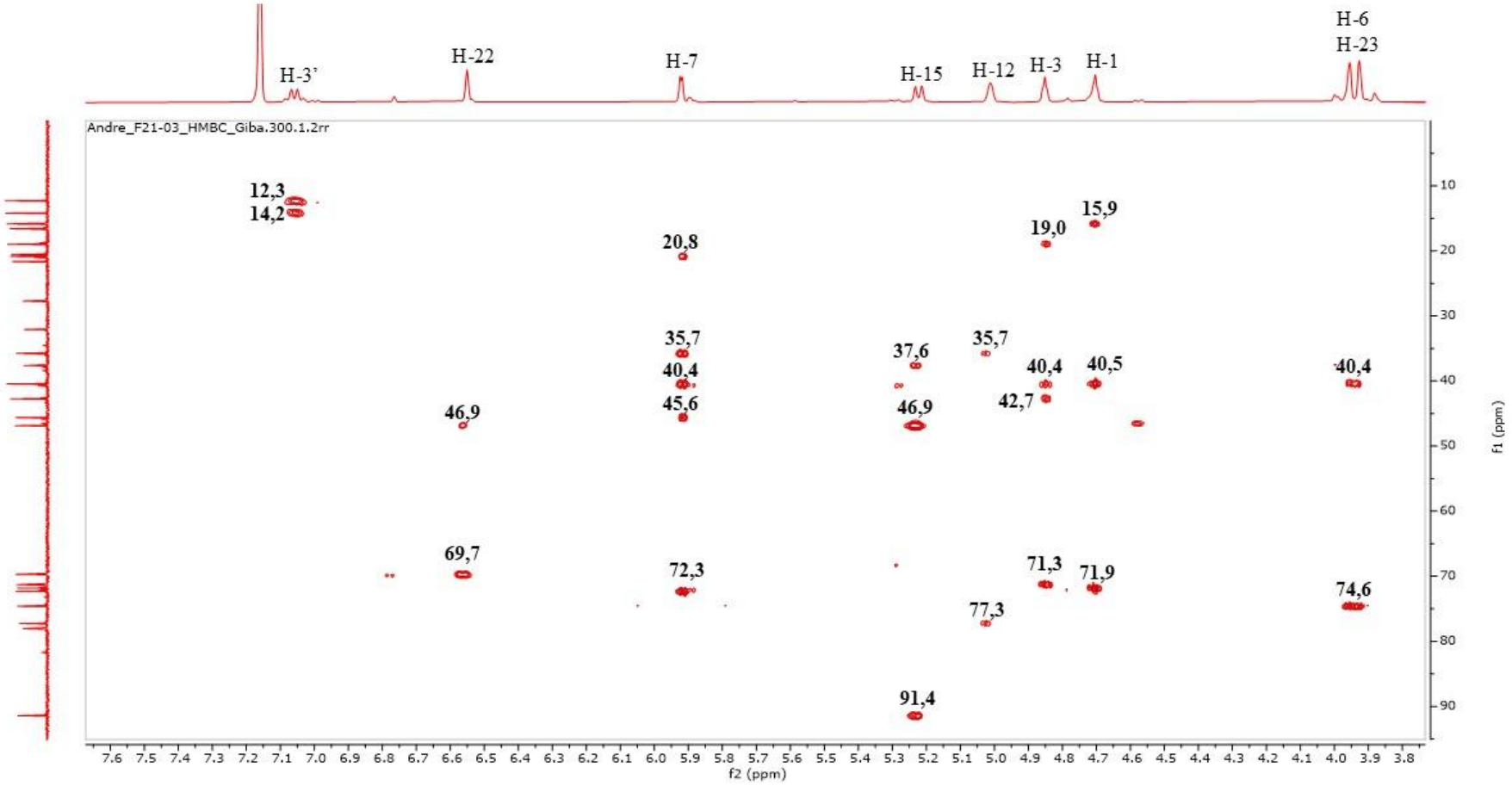


Figura 64 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T).

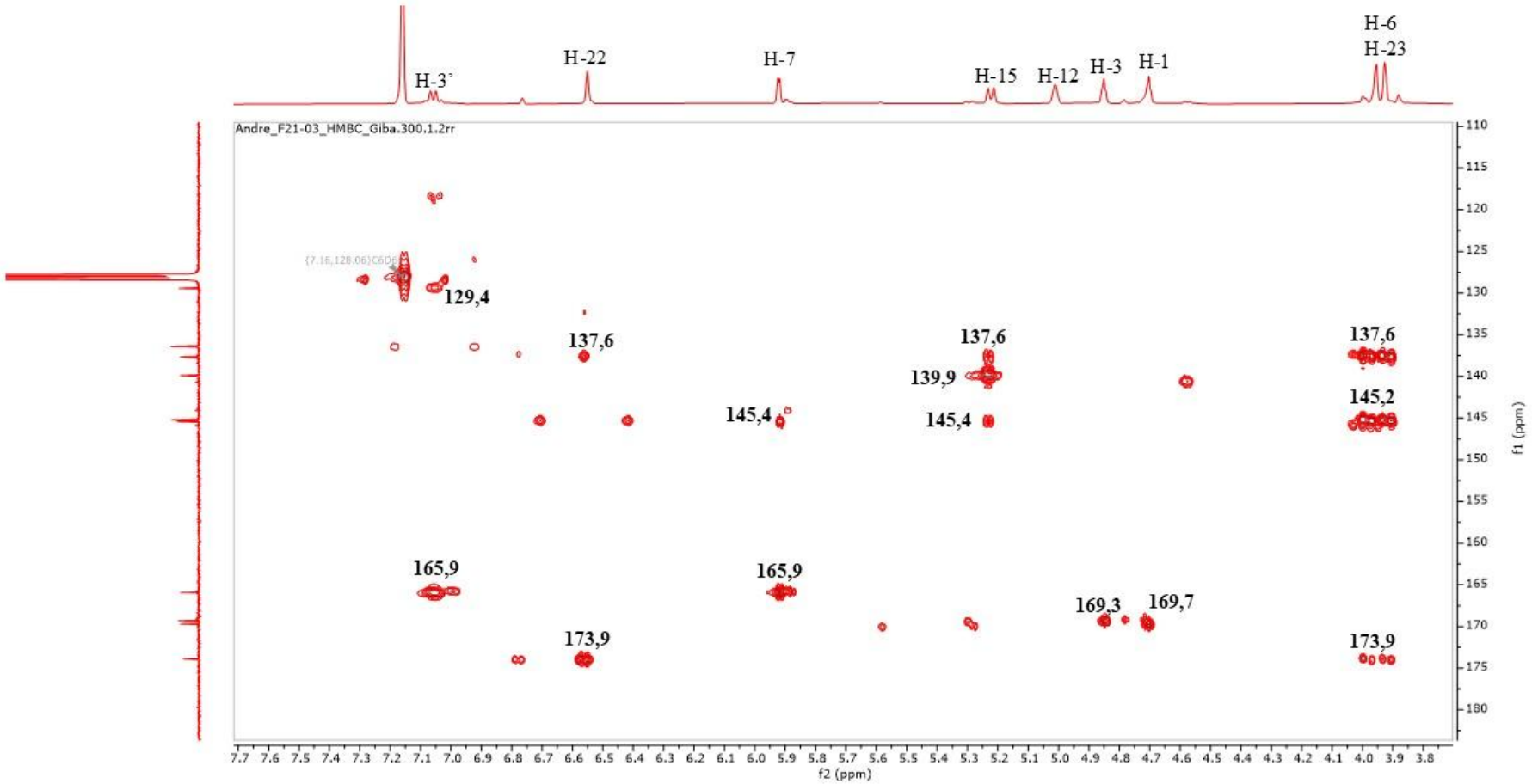


Figura 65 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T).

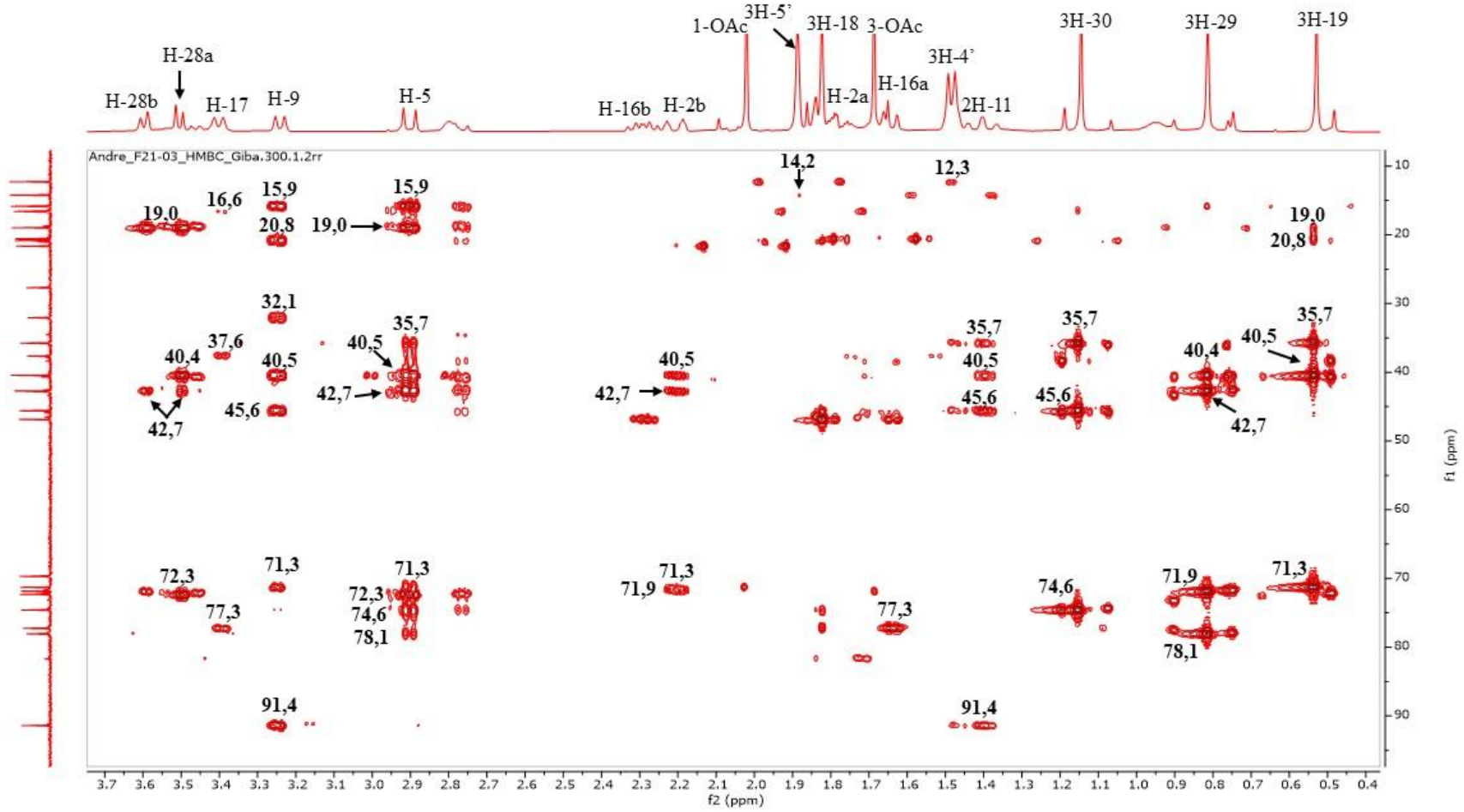


Figura 66 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T).

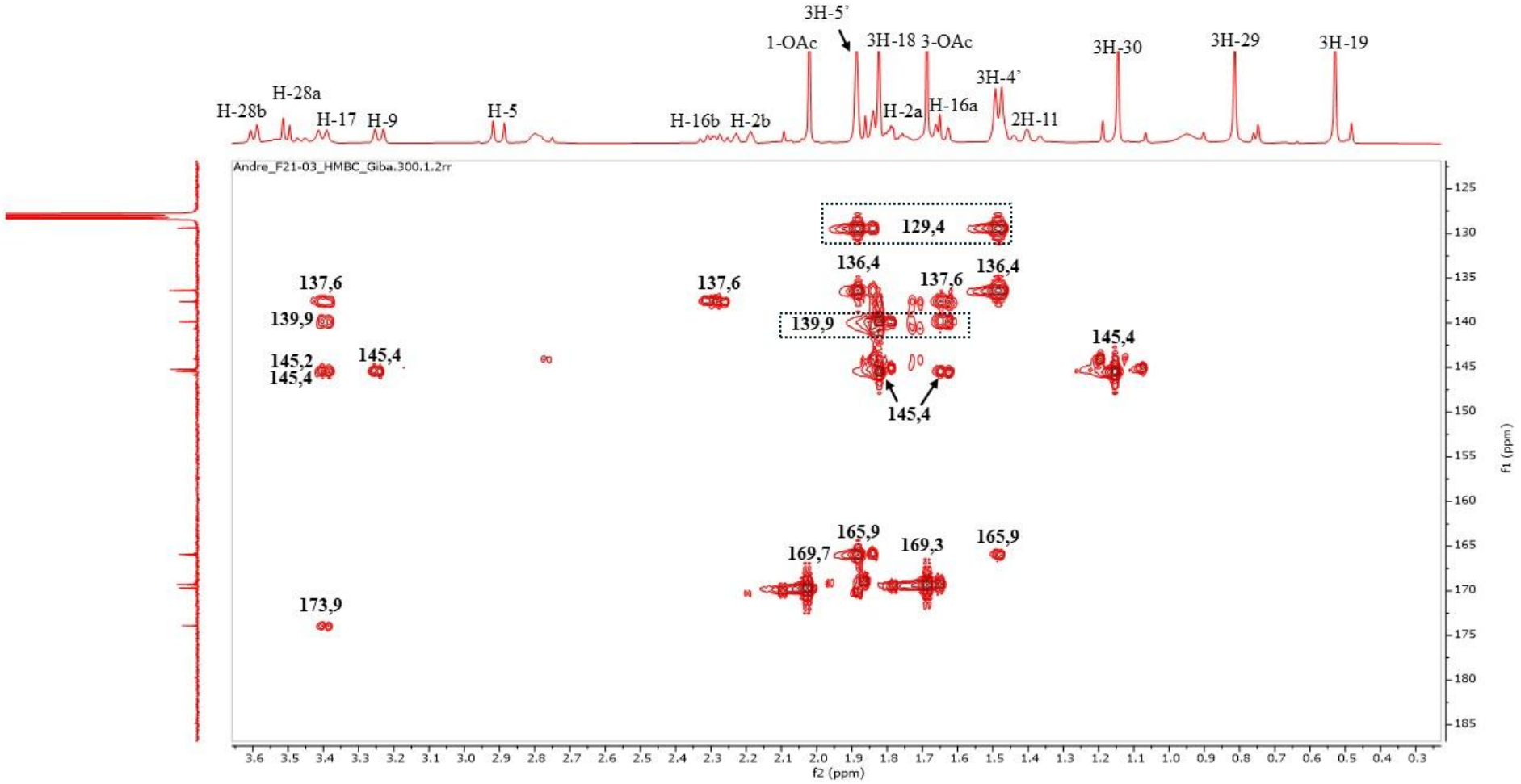


Figura 67 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 06 em C_6D_6 (14,1 T).

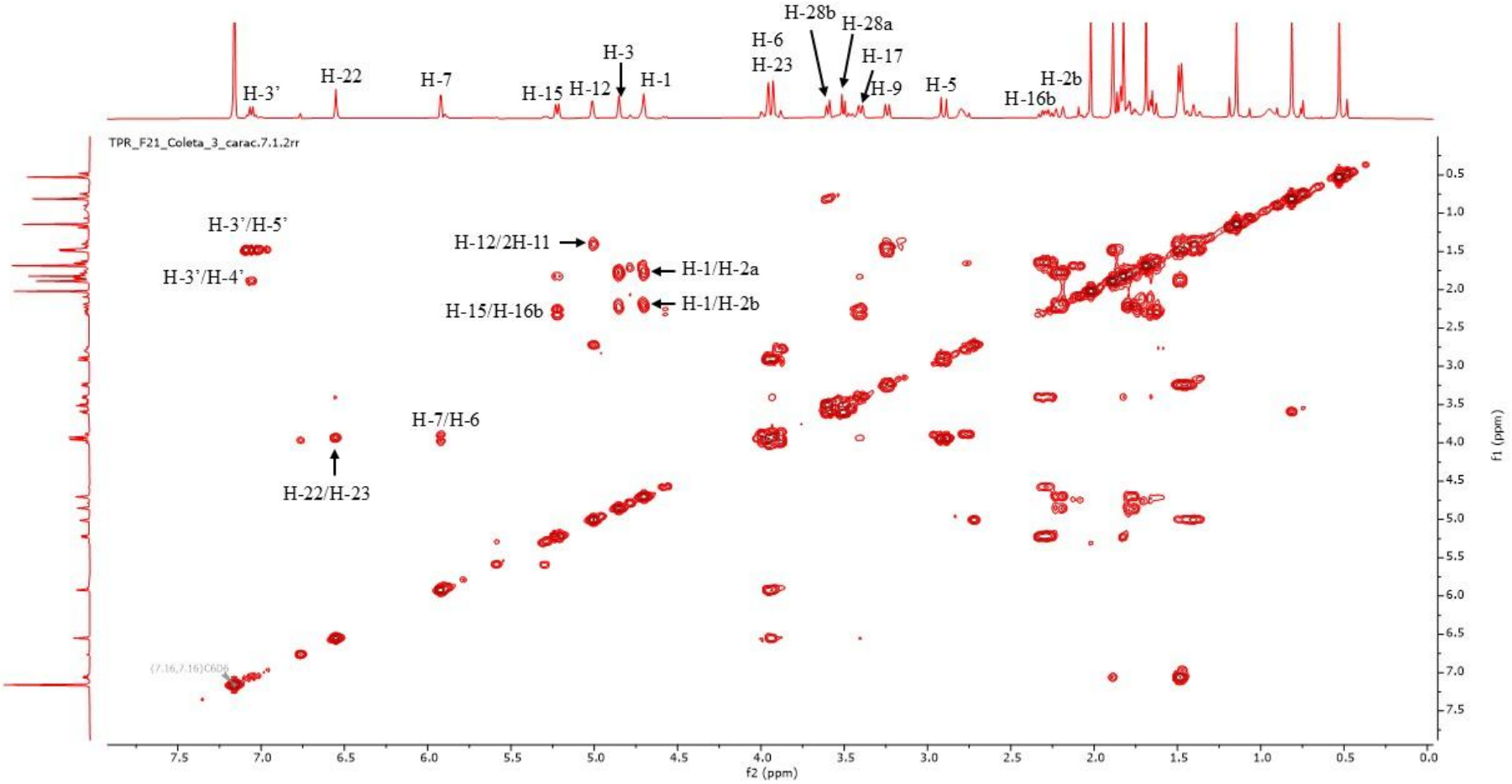
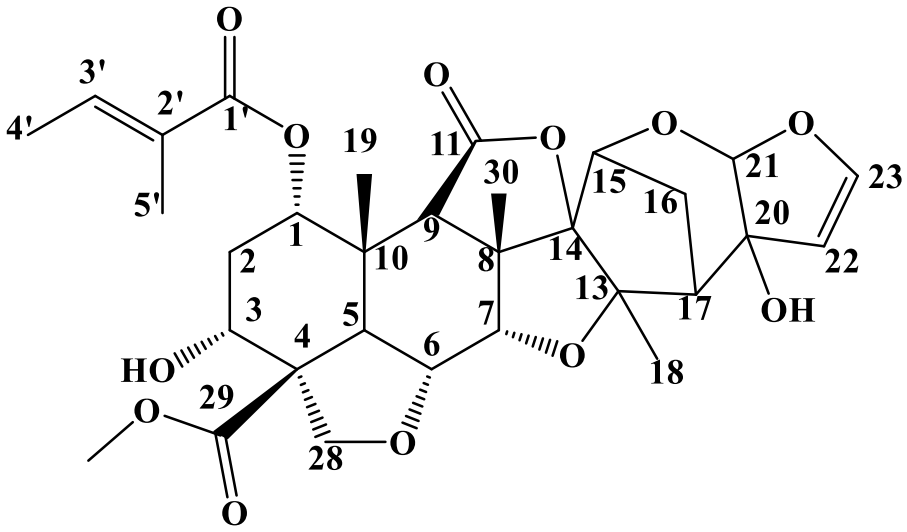


Figura 68 - Mapa de contorno COSY do limonoide 06 em C_6D_6 (9,4 T).

Substância 07 – Norpallidalina A



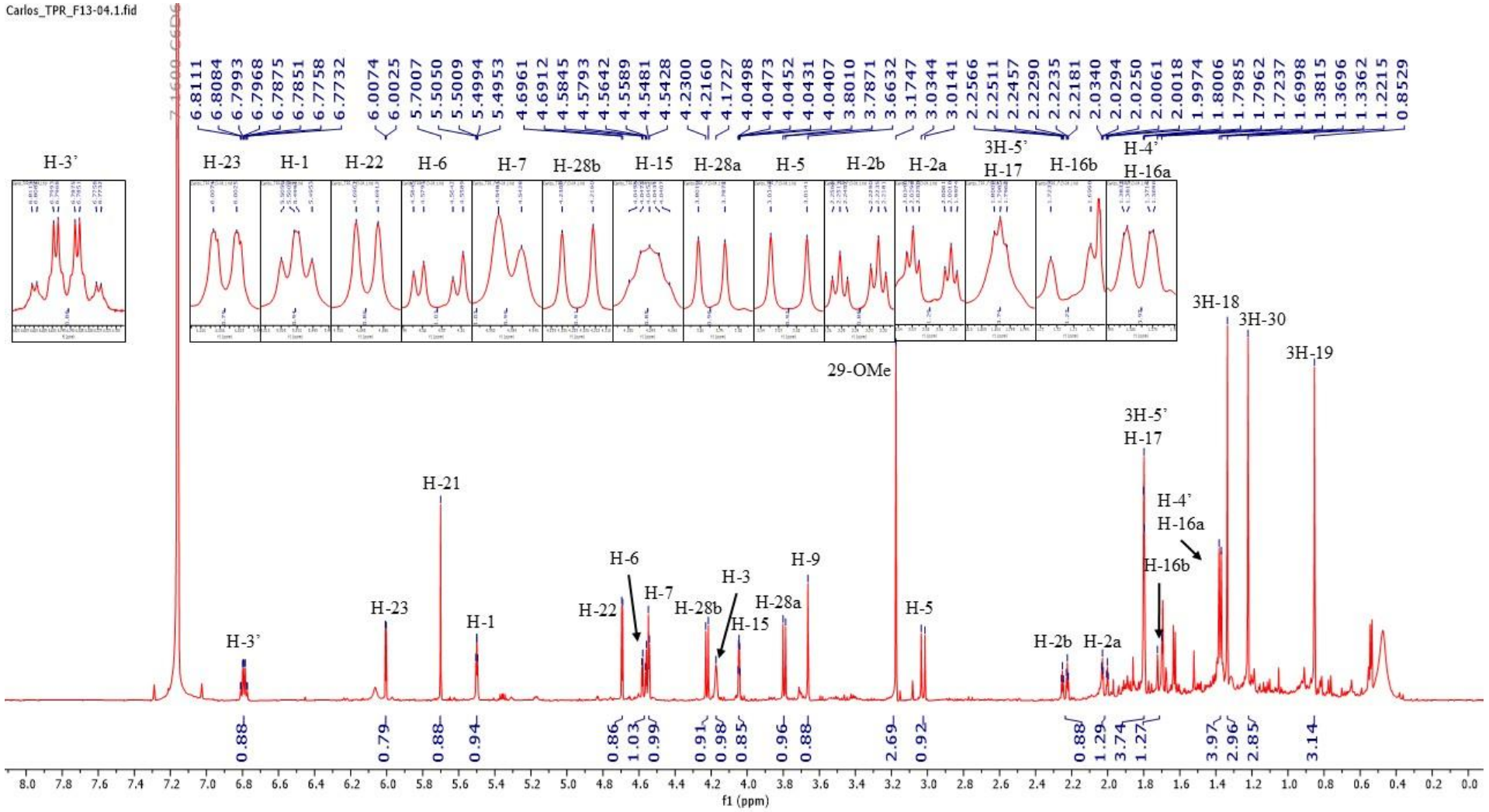


Figura 69 – Espectro de RMN de ^{1}H do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

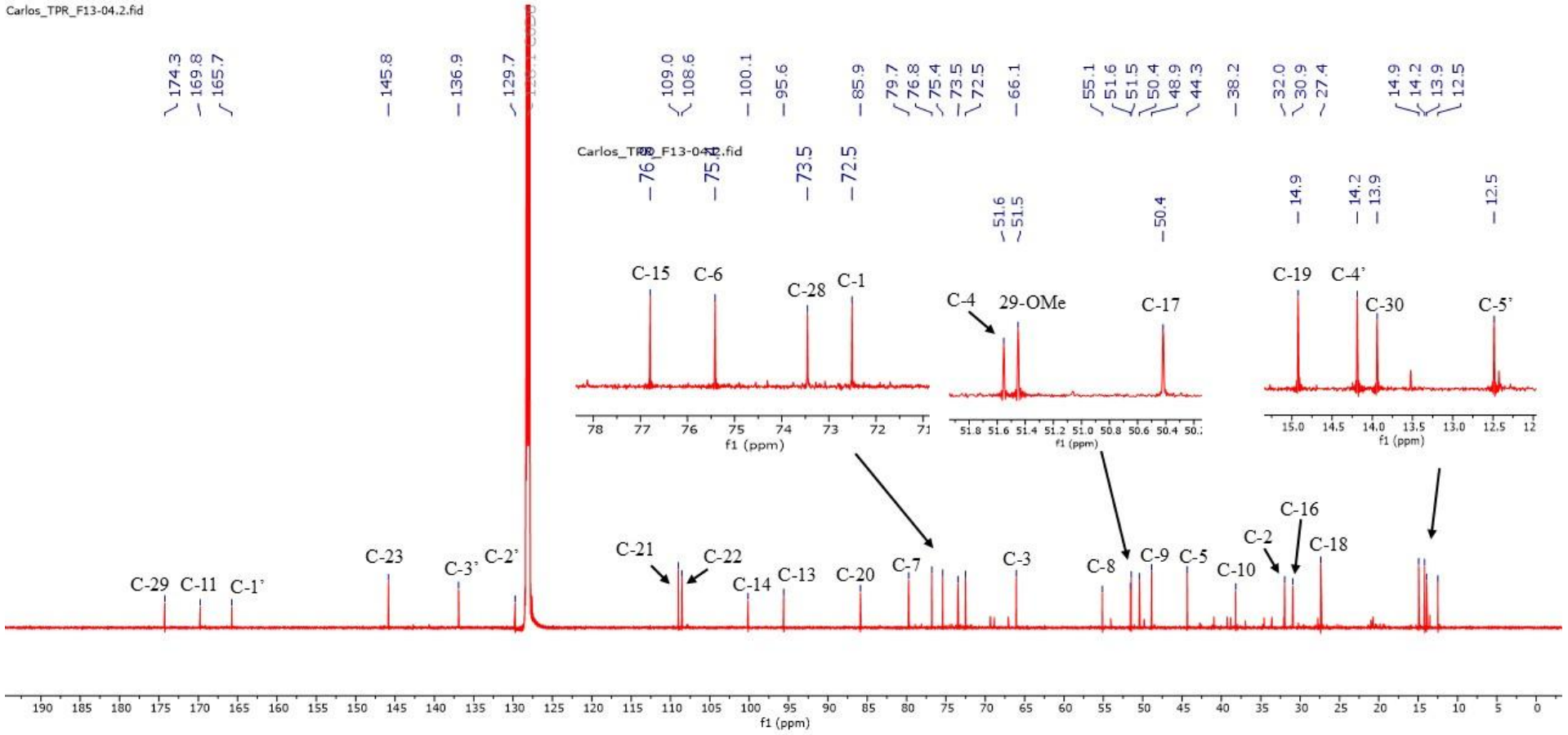


Figura 70 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

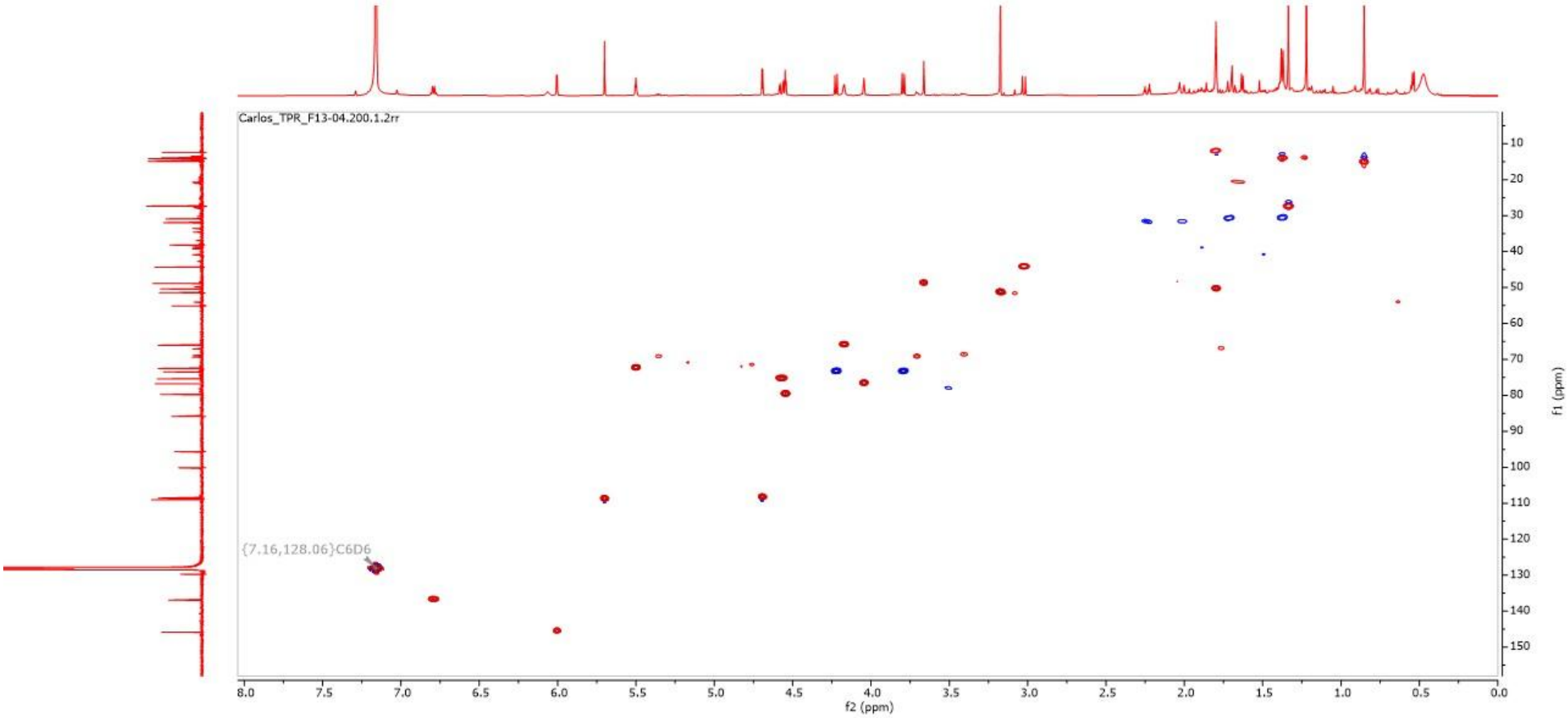


Figura 71 - Mapa de contorno HSQC do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

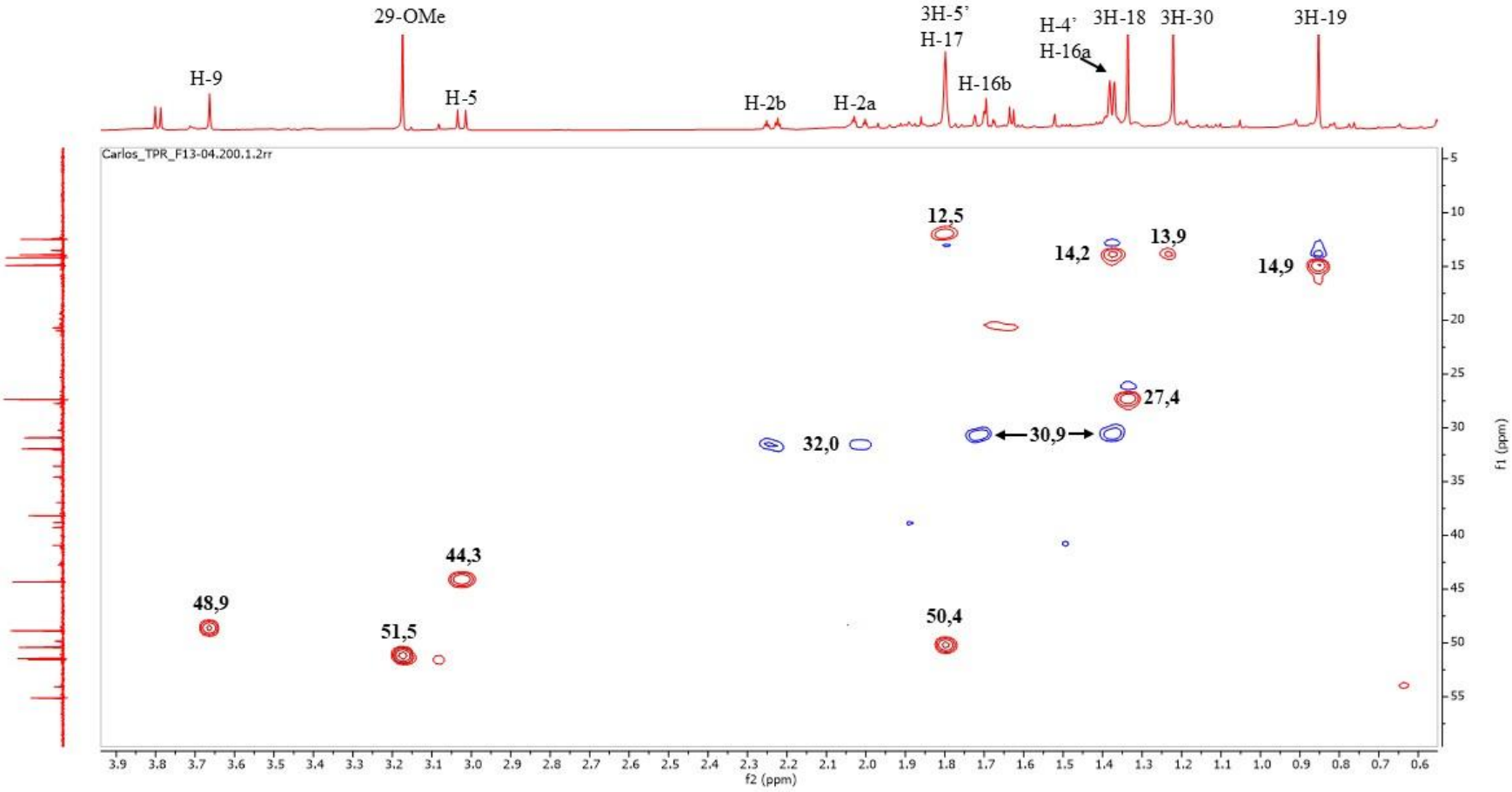


Figura 72 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

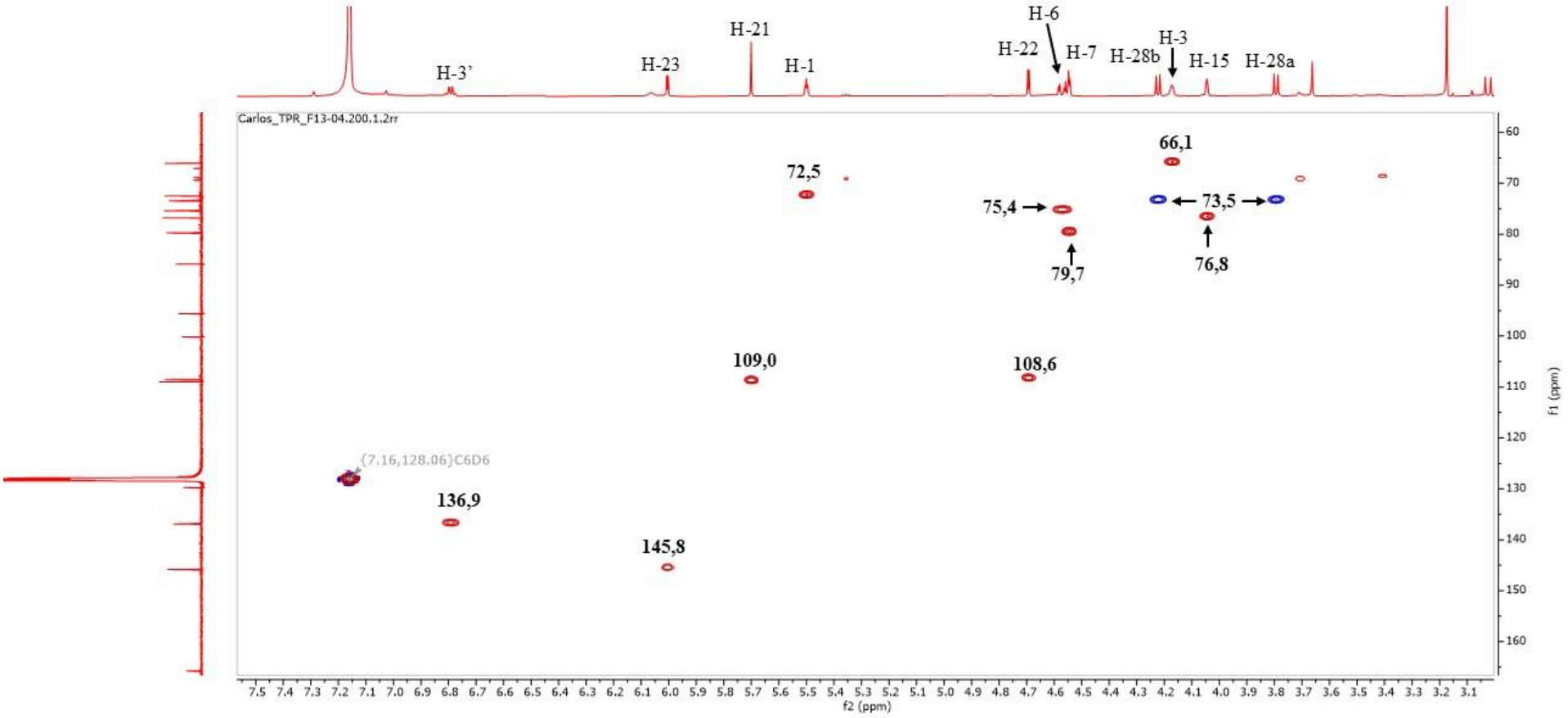


Figura 73 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

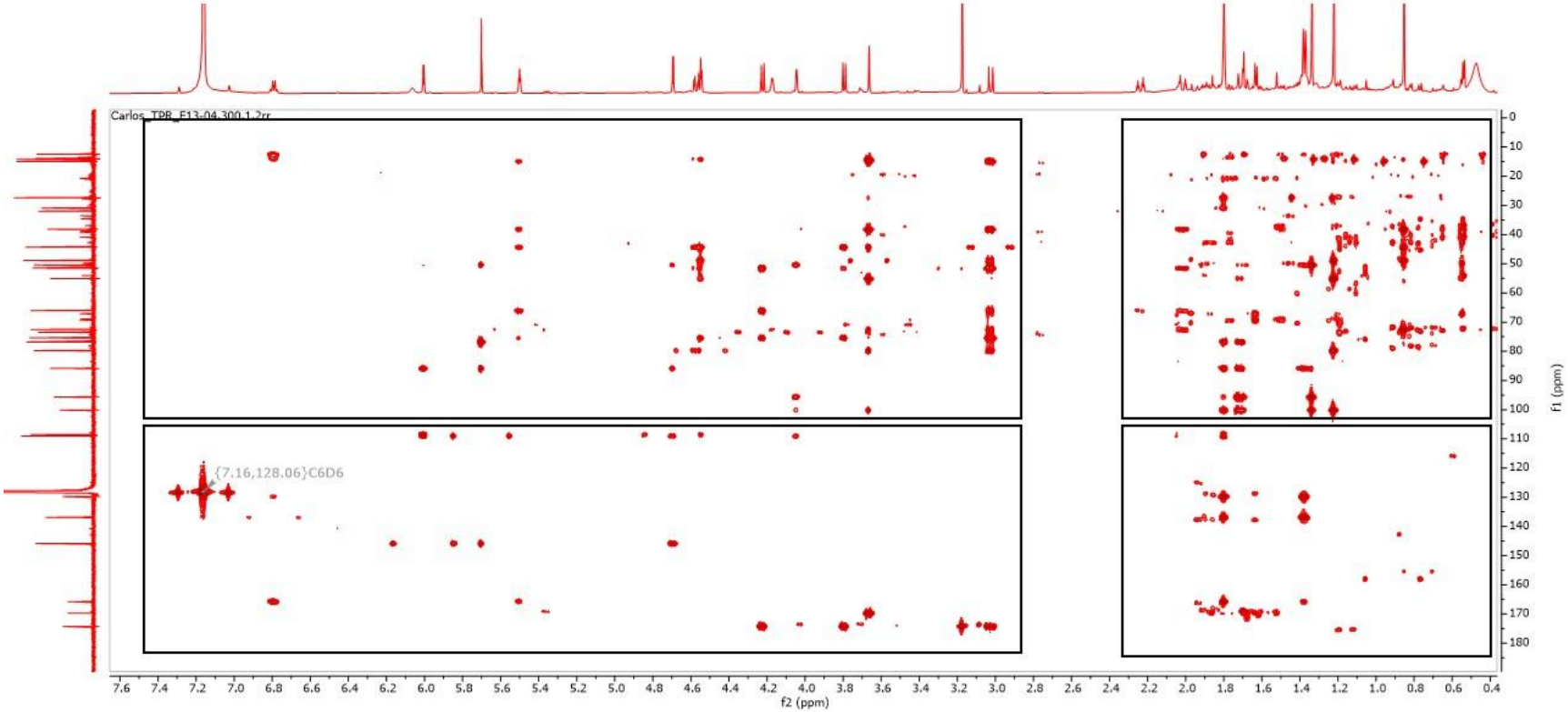


Figura 74 - Mapa de contorno HMBC do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1), as áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

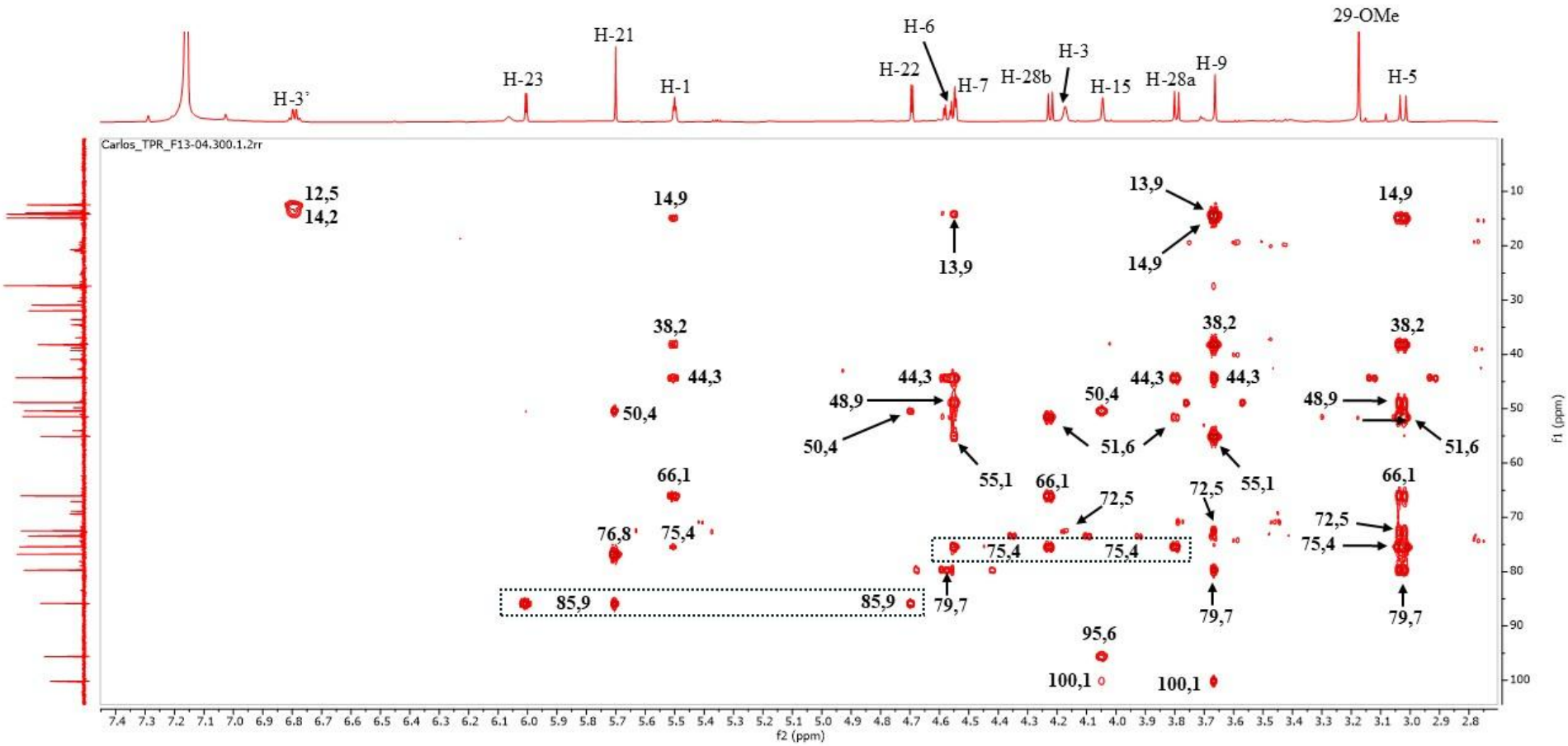


Figura 75 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

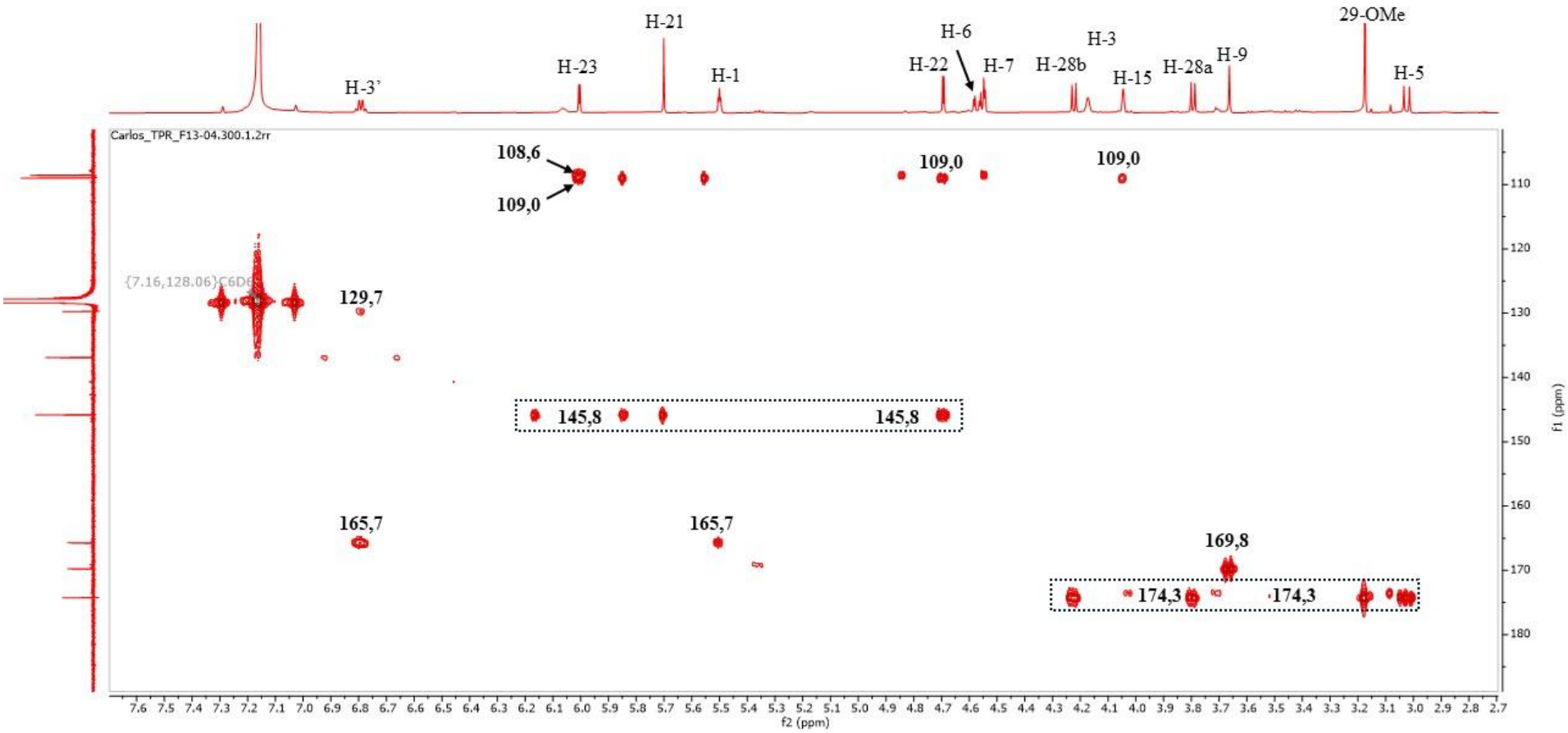


Figura 76 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

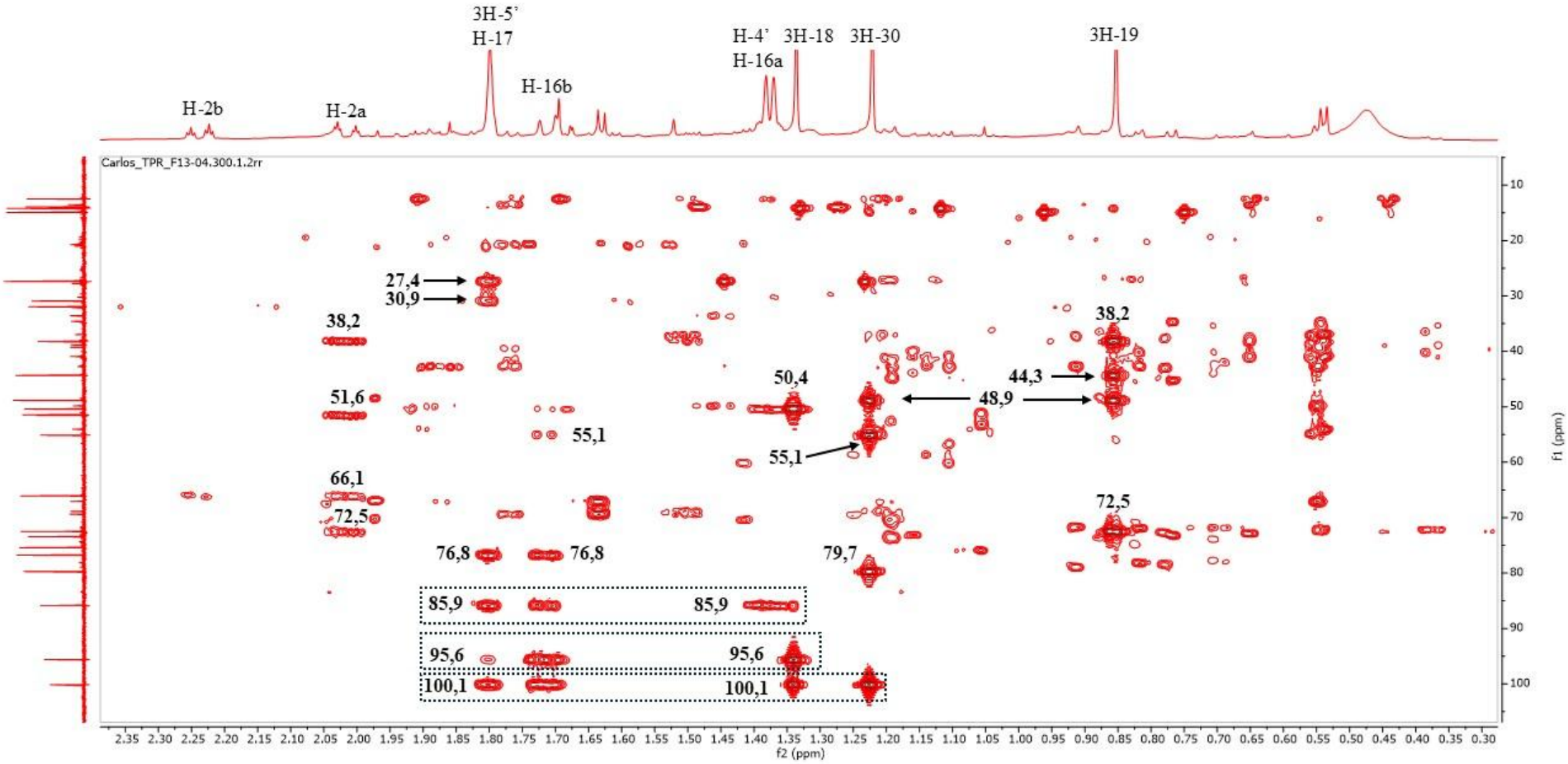


Figura 77 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

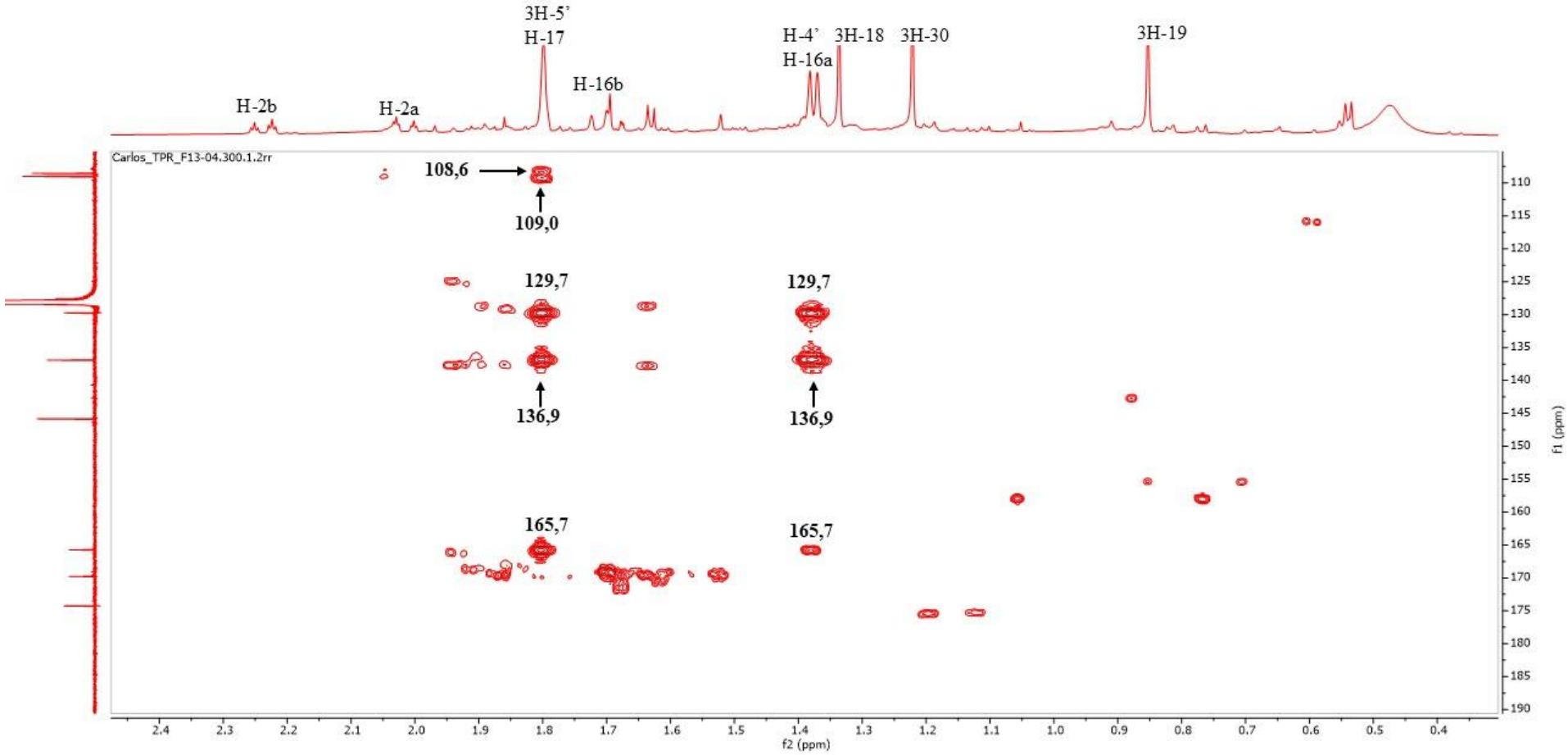


Figura 78 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

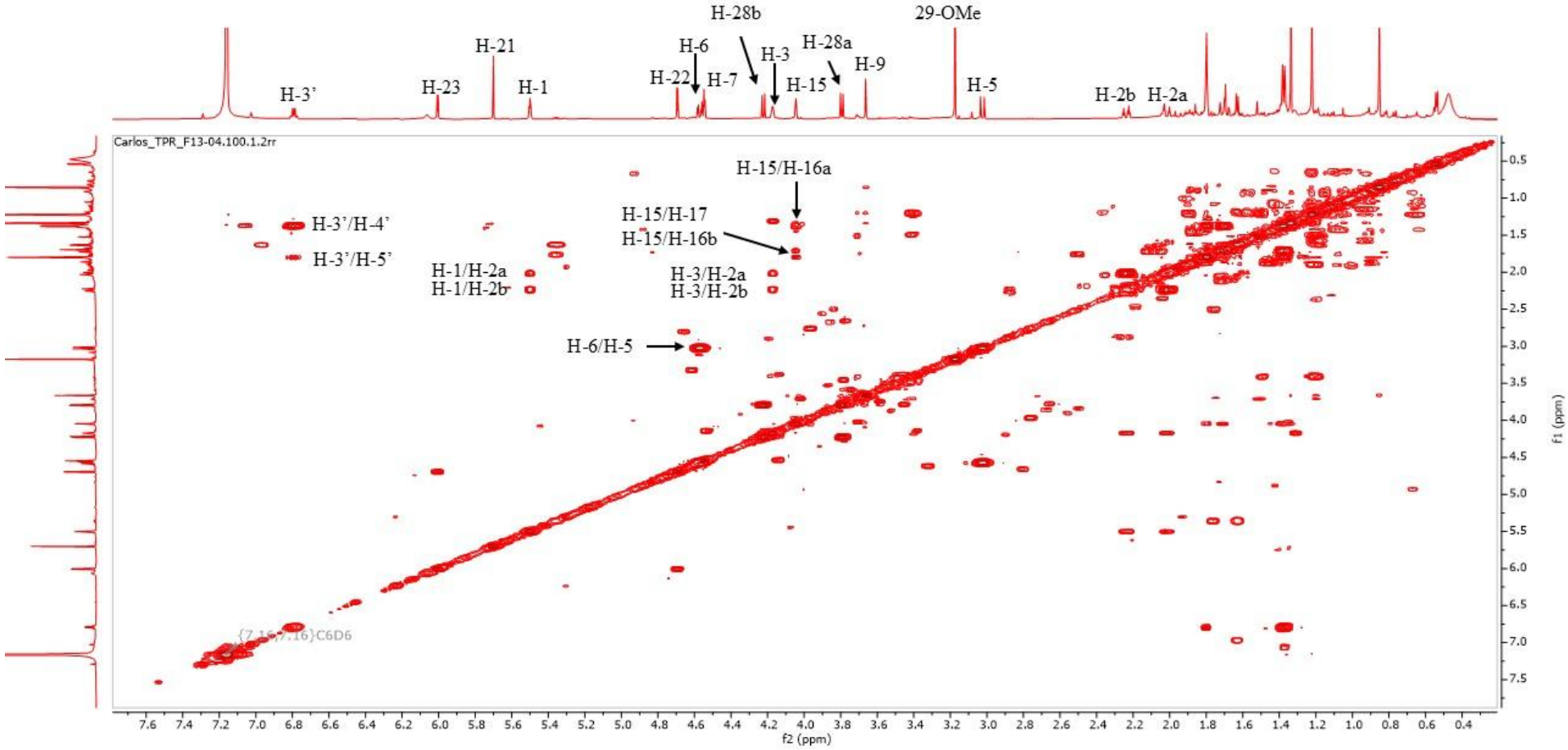
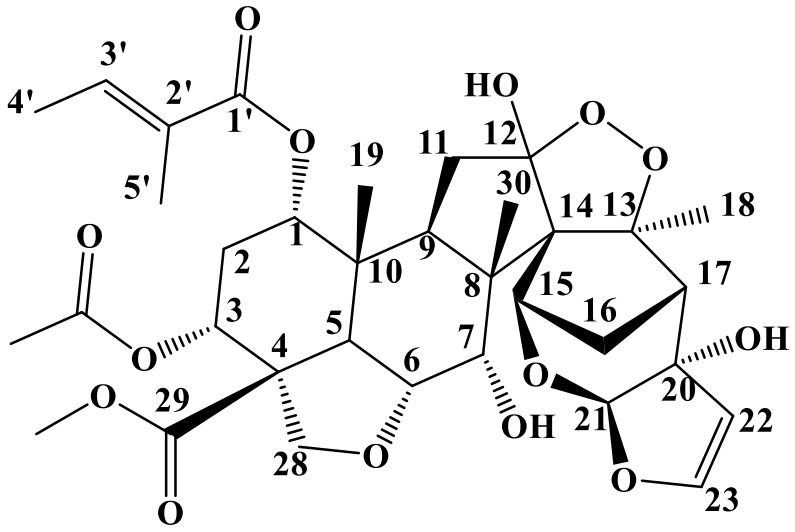


Figura 79 - Mapa de contorno COSY do norlimonoide 07 em C_6D_6 (14,1 T).

Limonoide 08 – Pallidalina



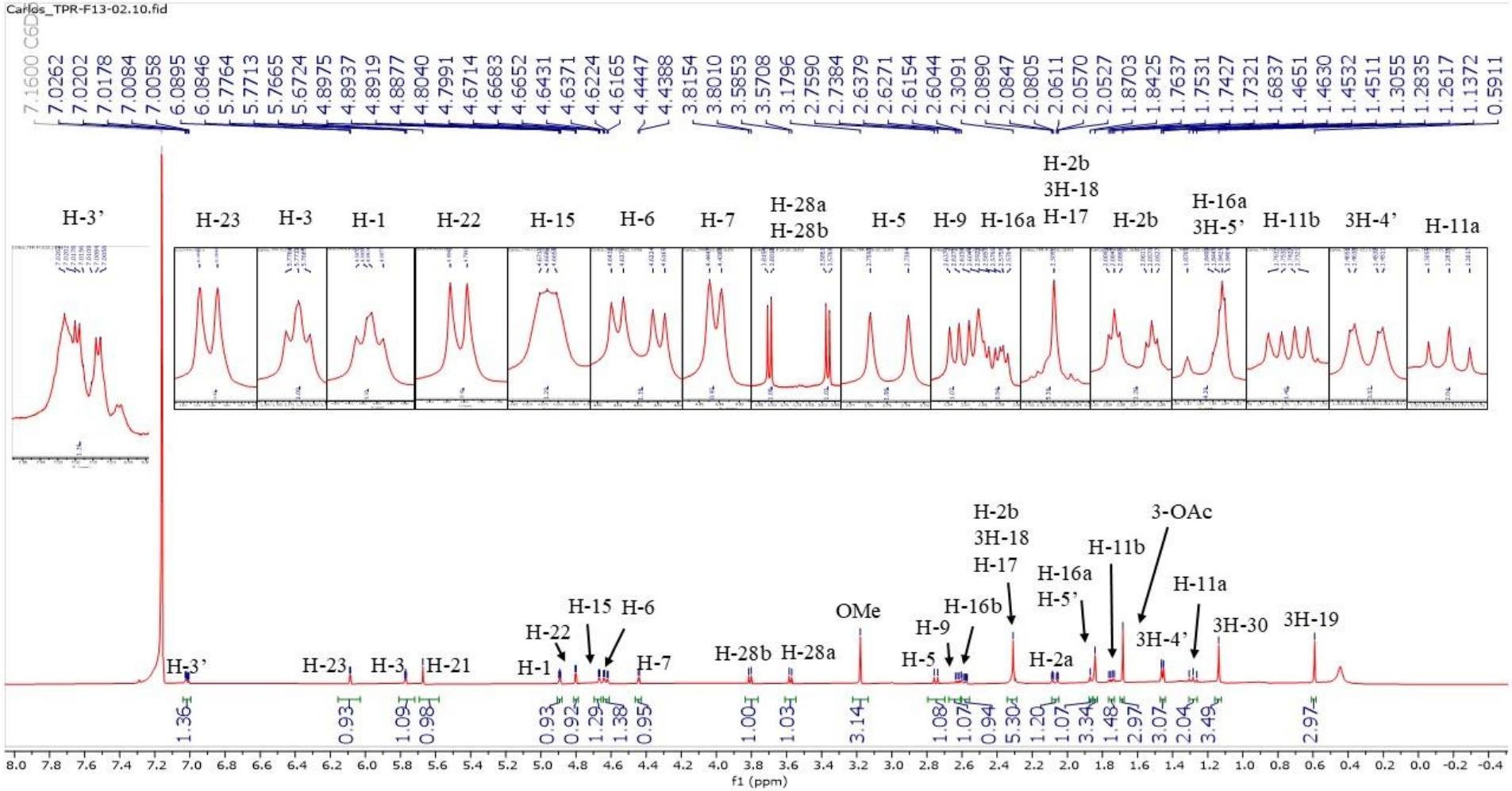


Figura 80 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

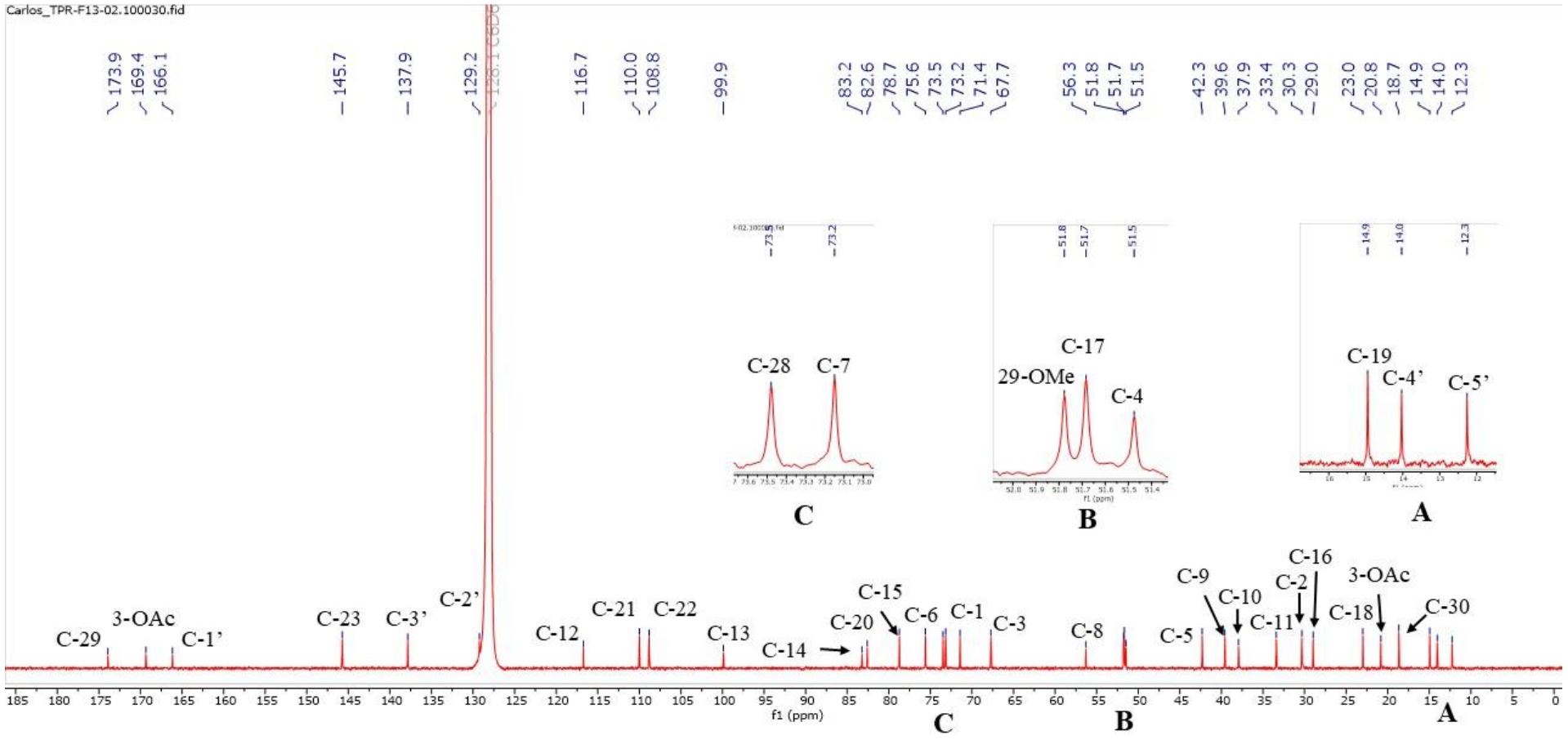


Figura 81 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

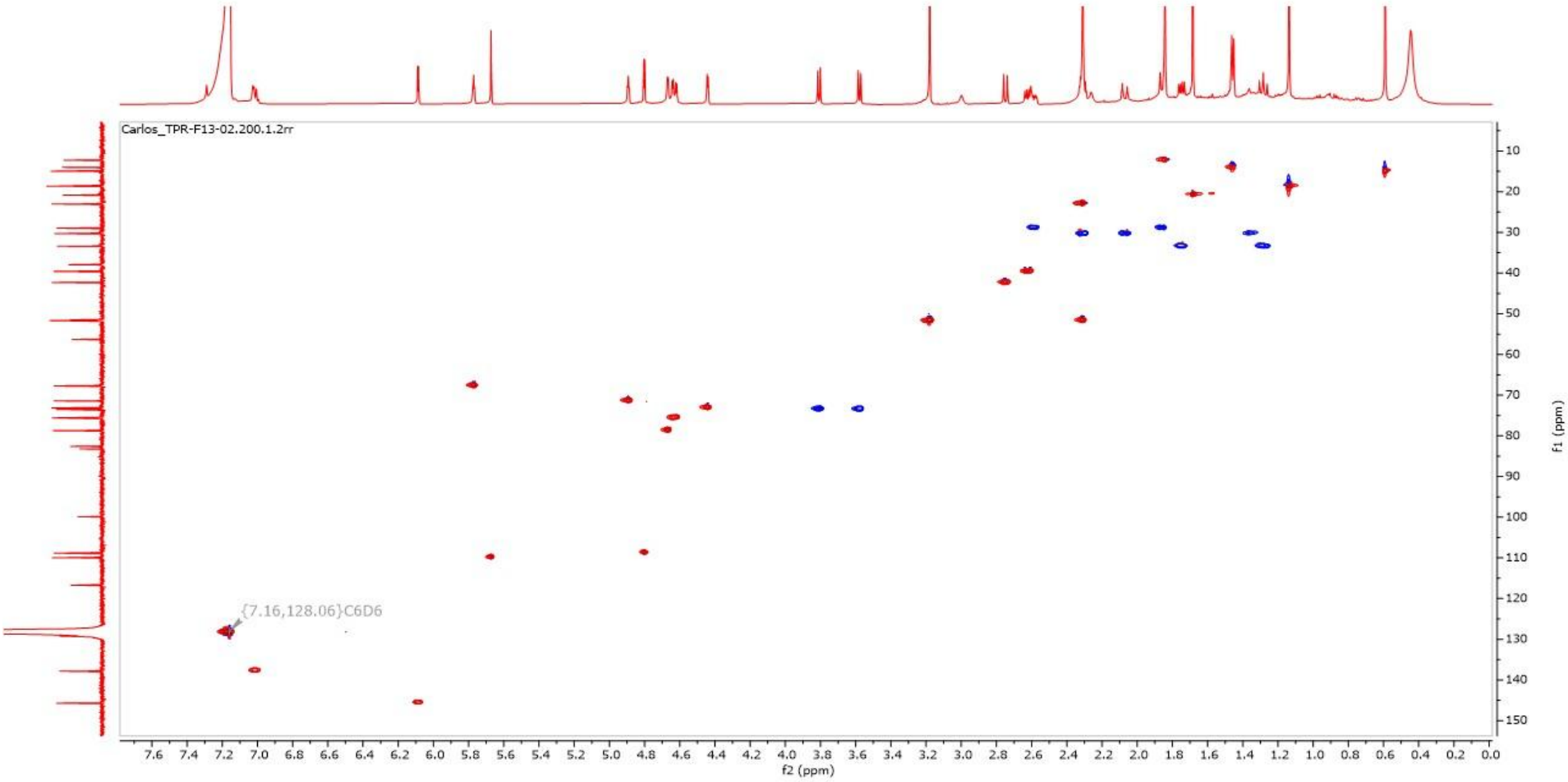


Figura 82 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

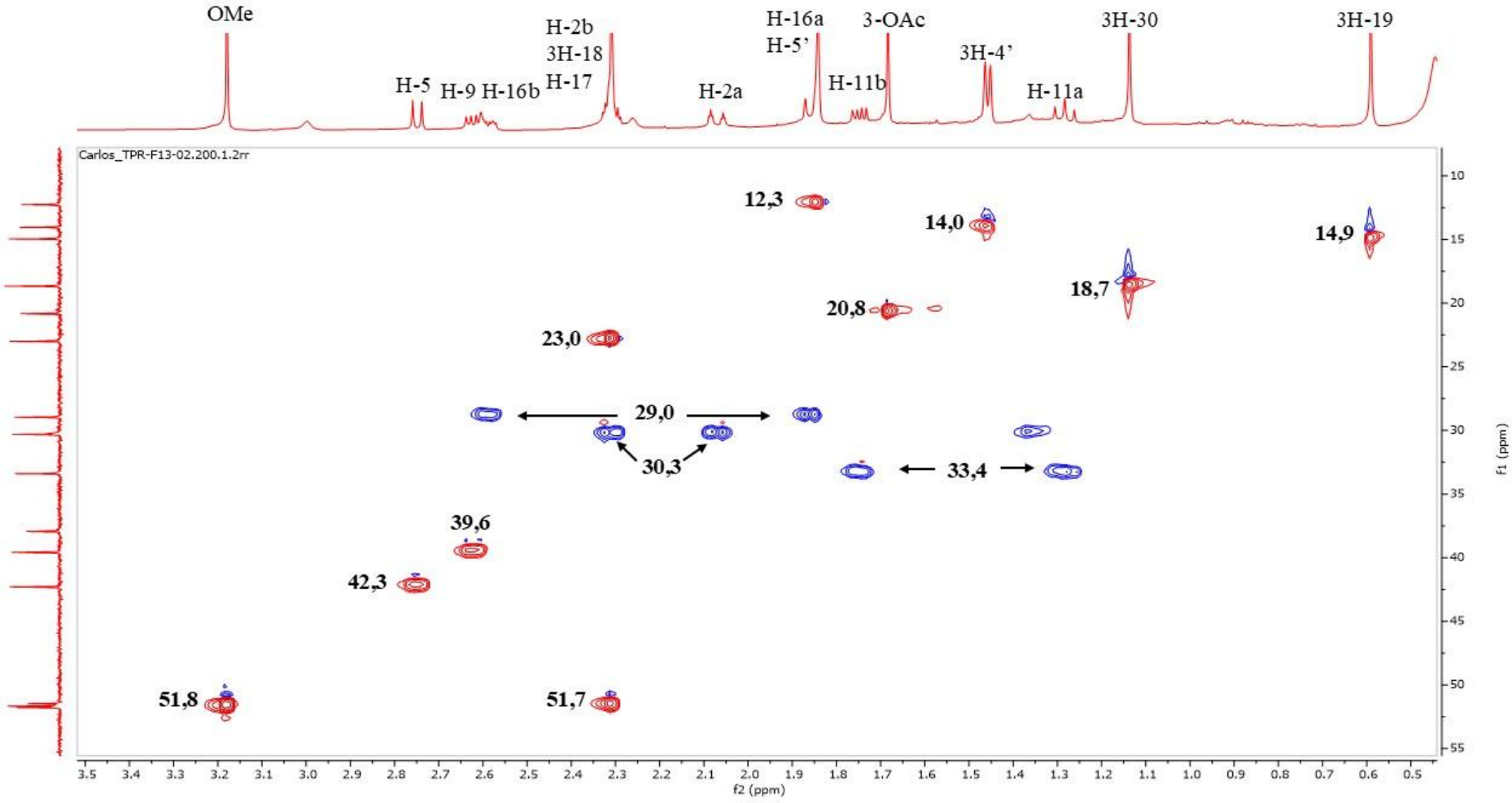


Figura 83 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

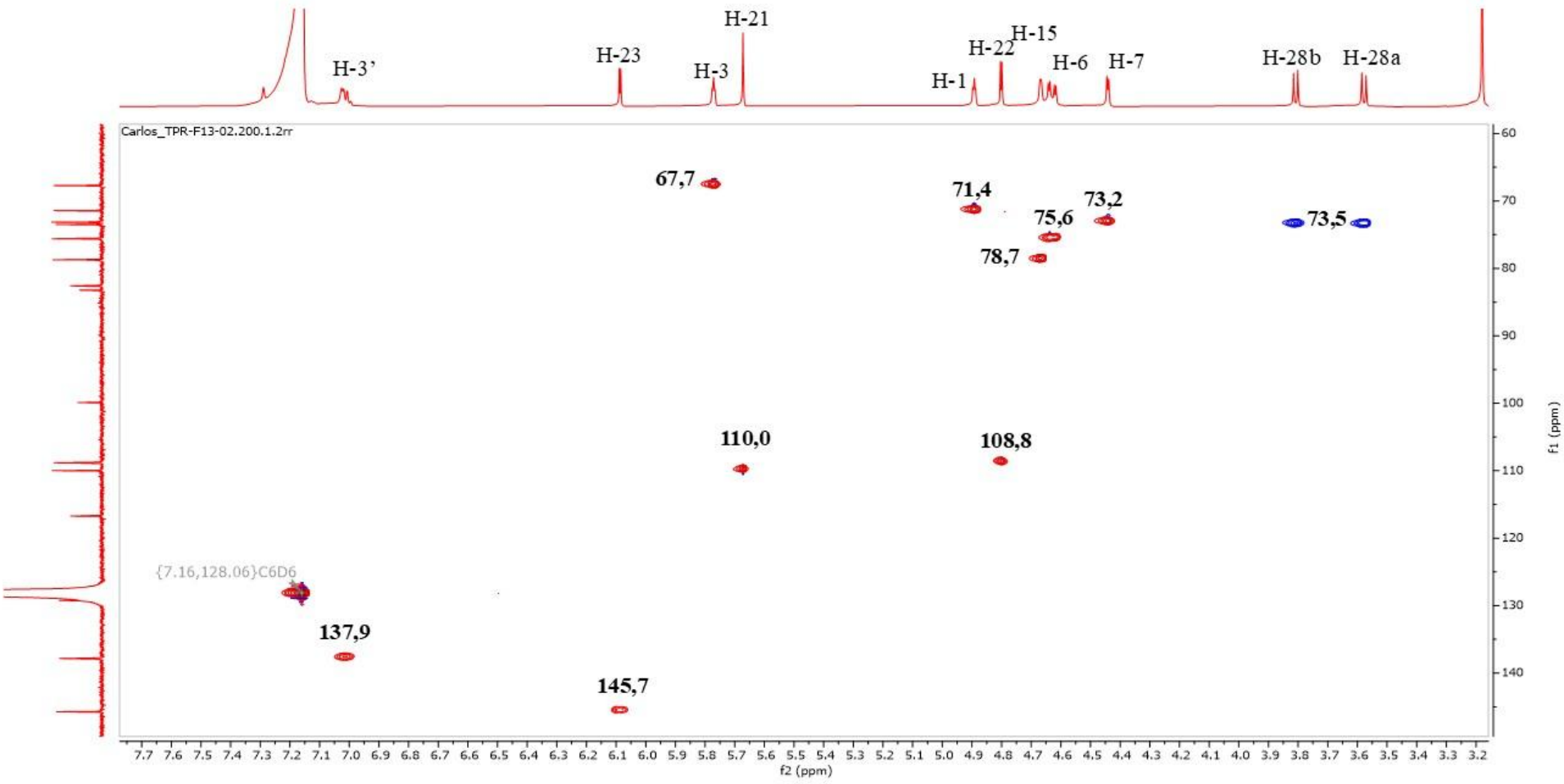


Figura 84 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

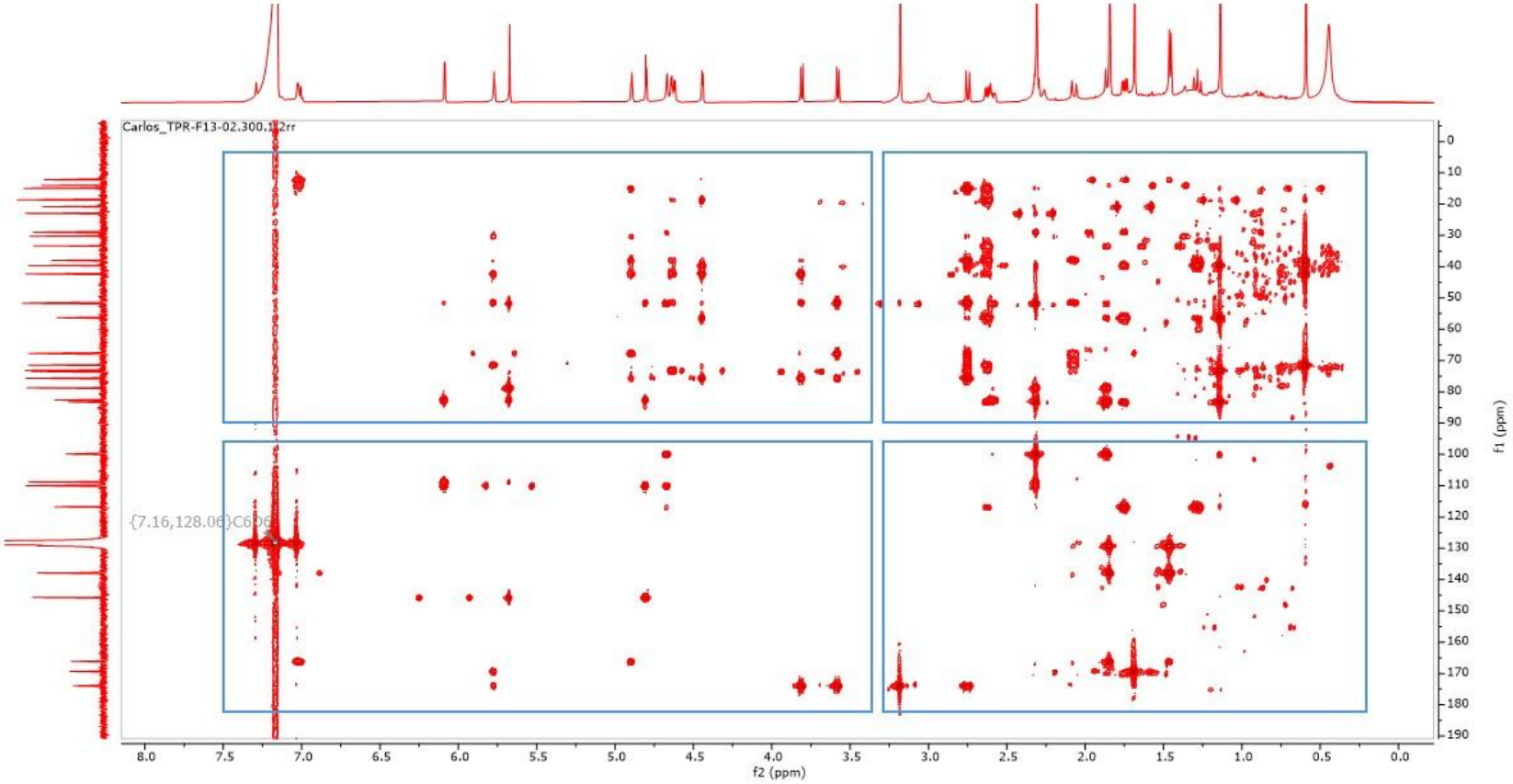


Figura 85 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T), as áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

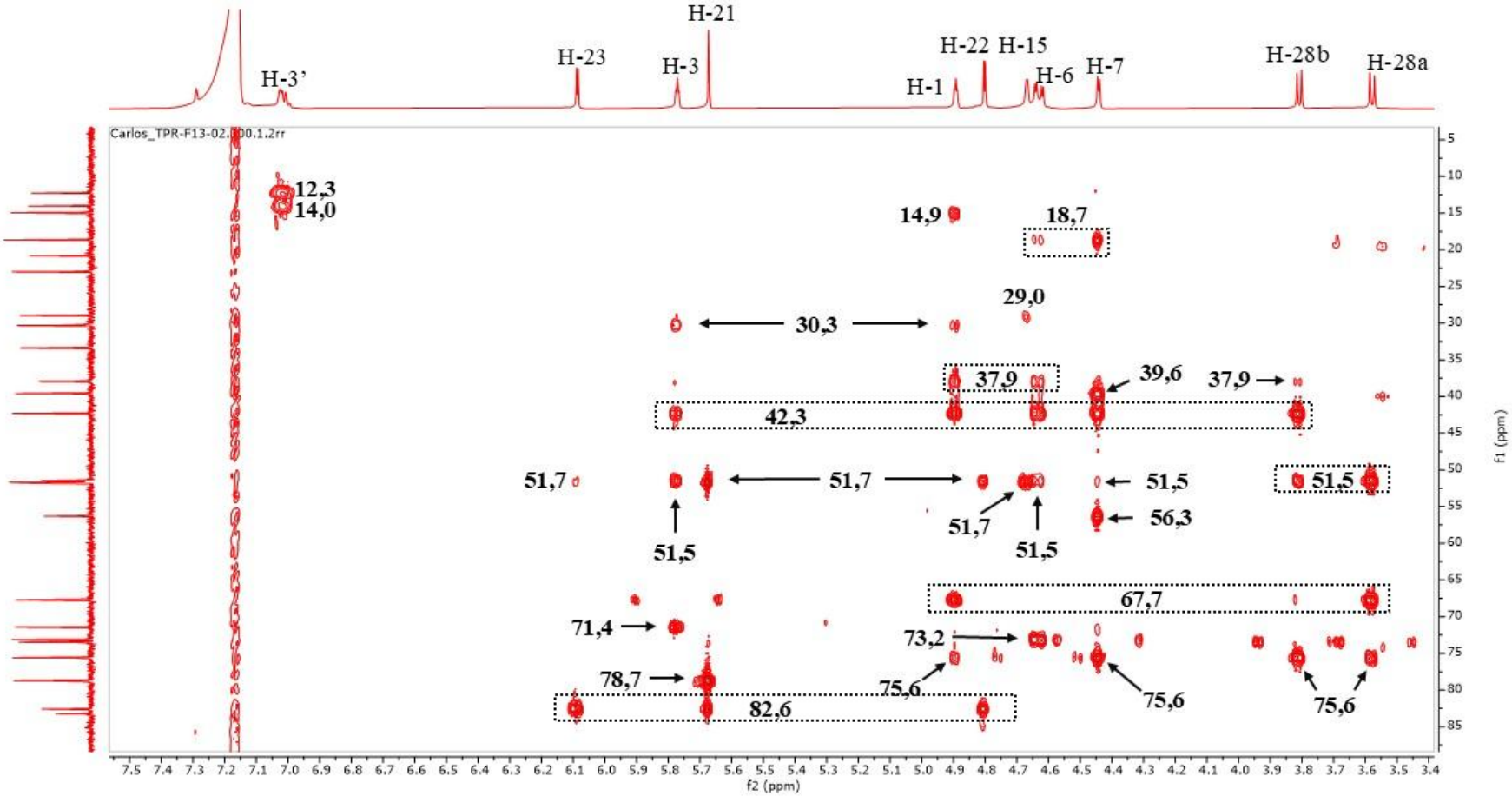


Figura 86 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

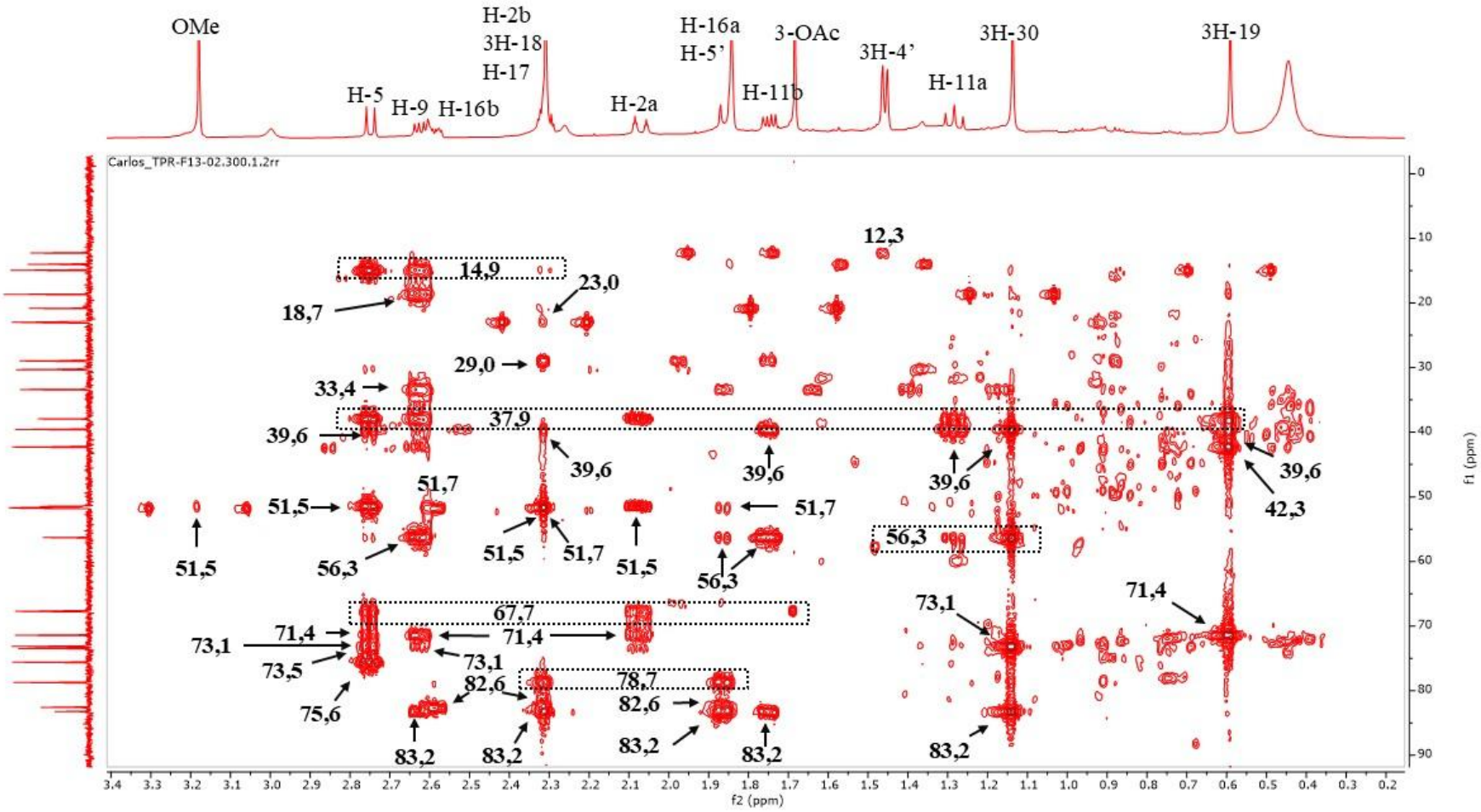


Figura 87 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

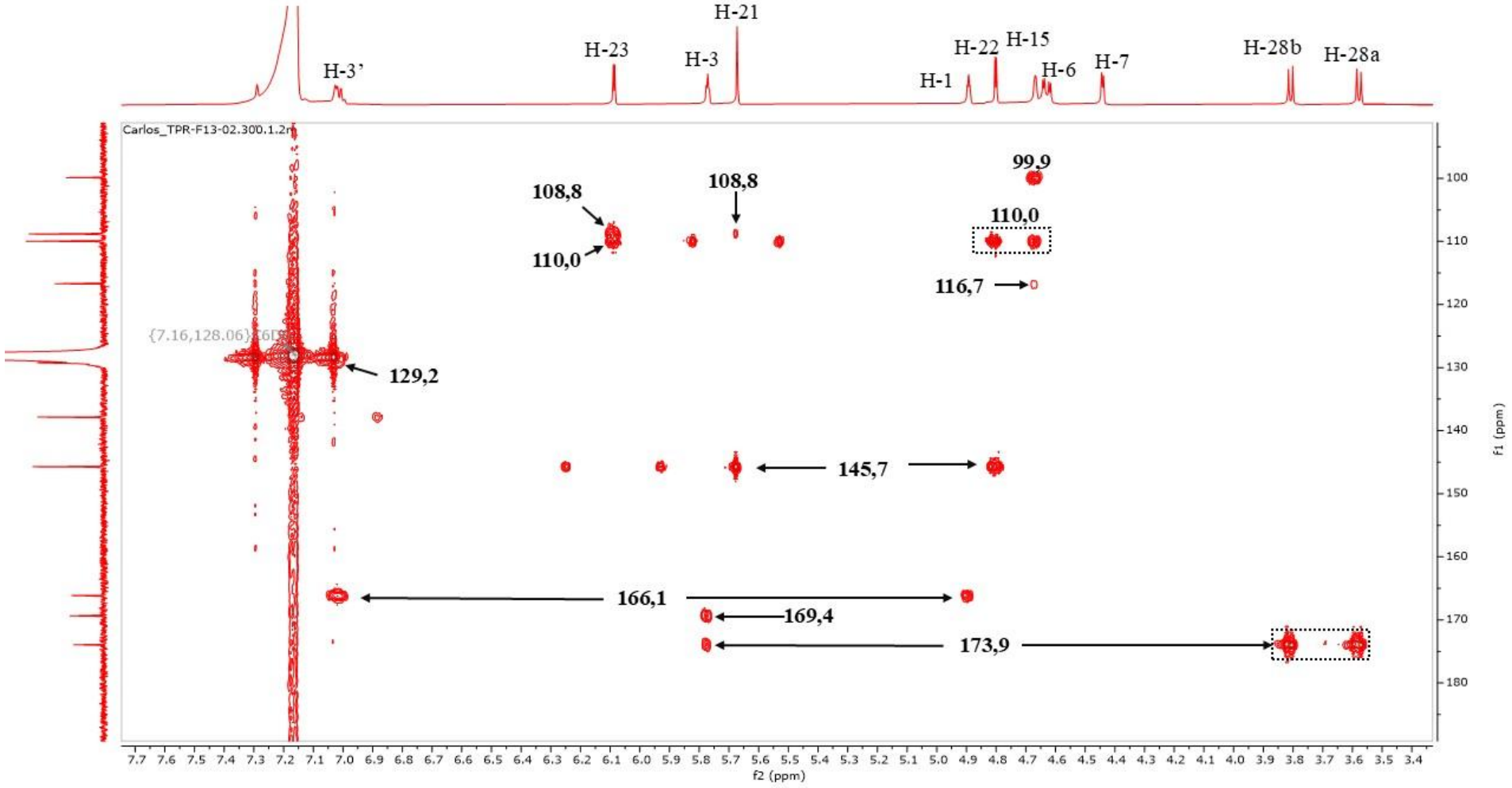


Figura 88 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

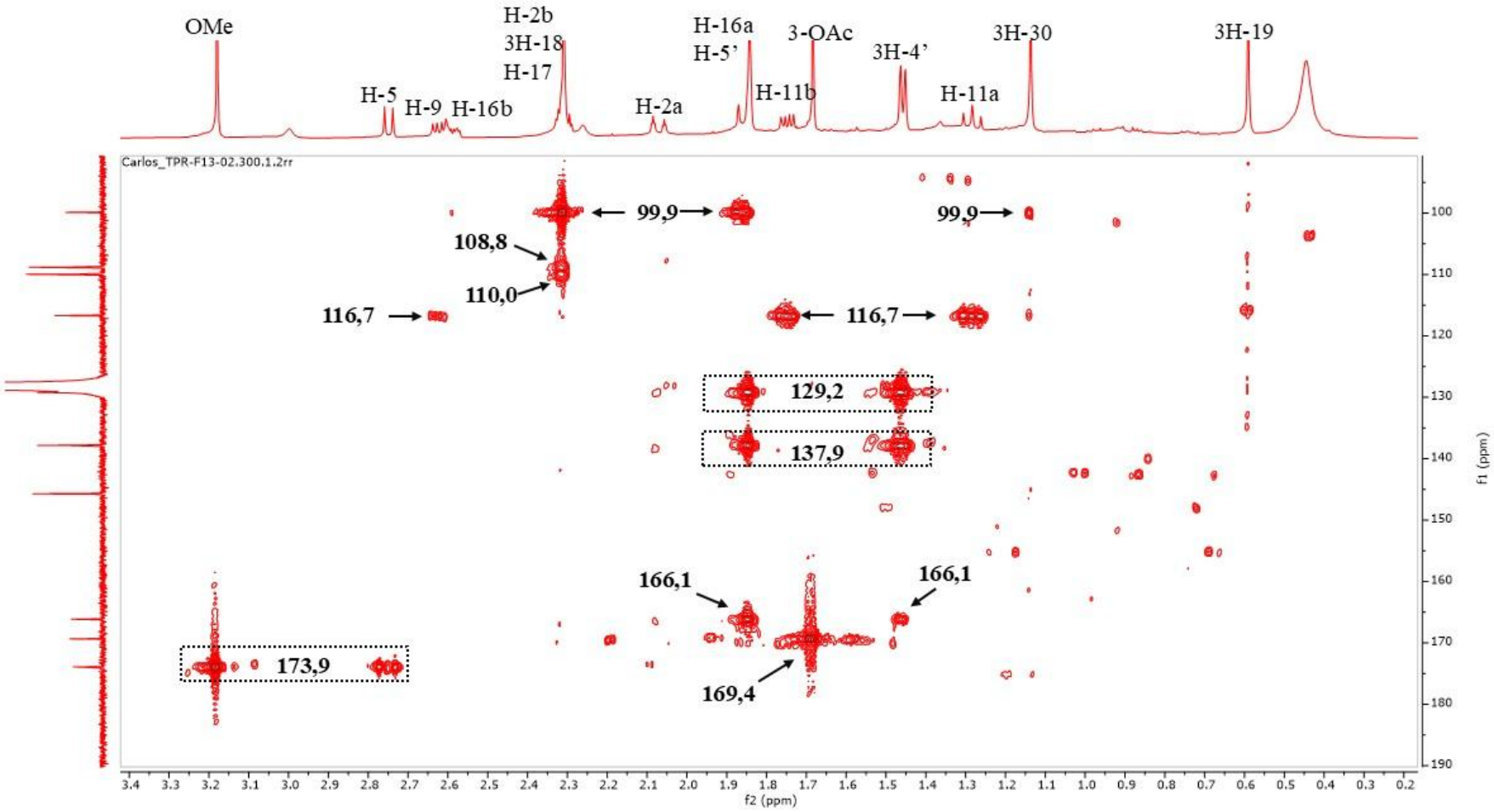


Figura 89 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

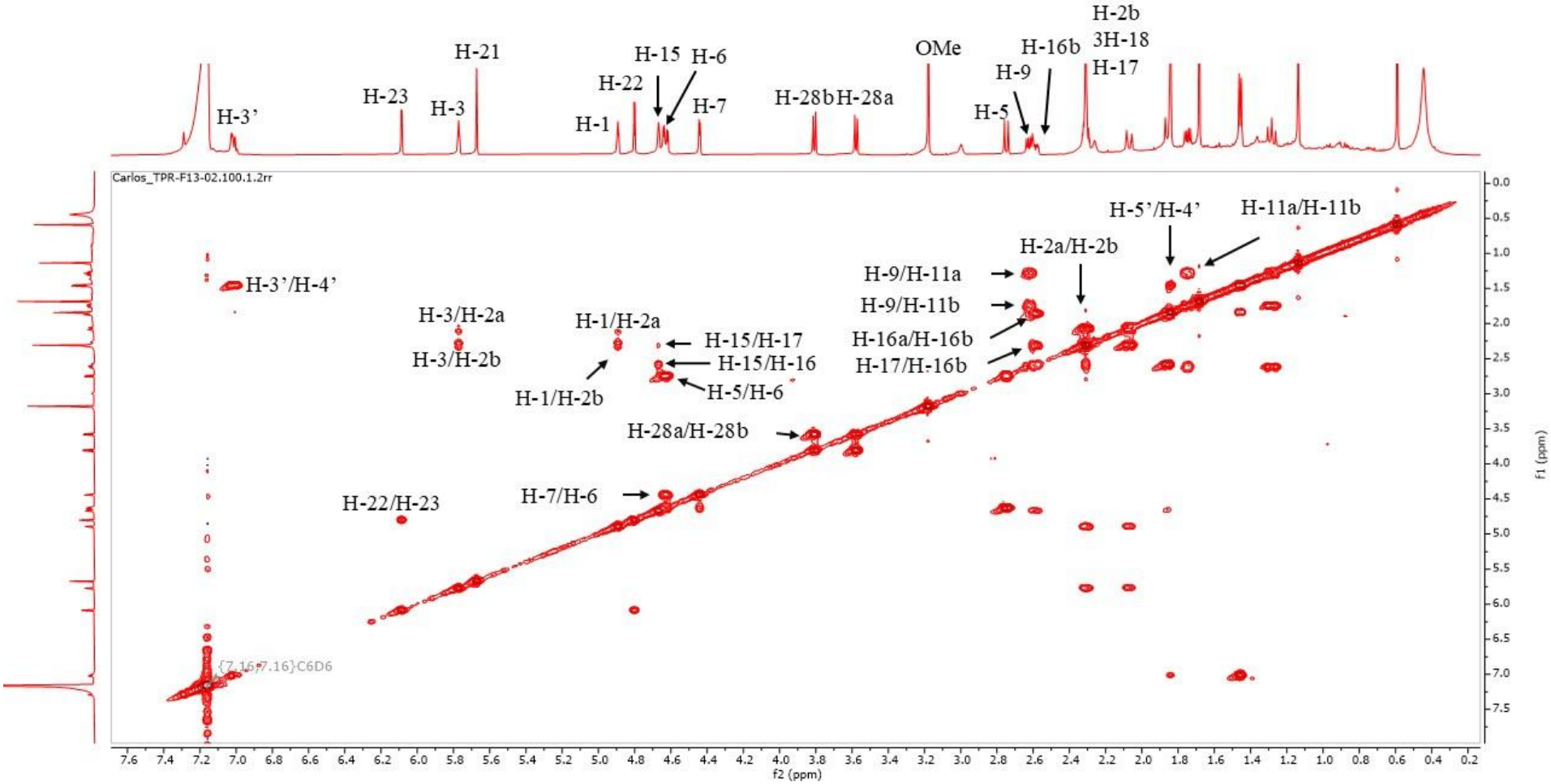


Figura 90 - Mapa de contorno COSY do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

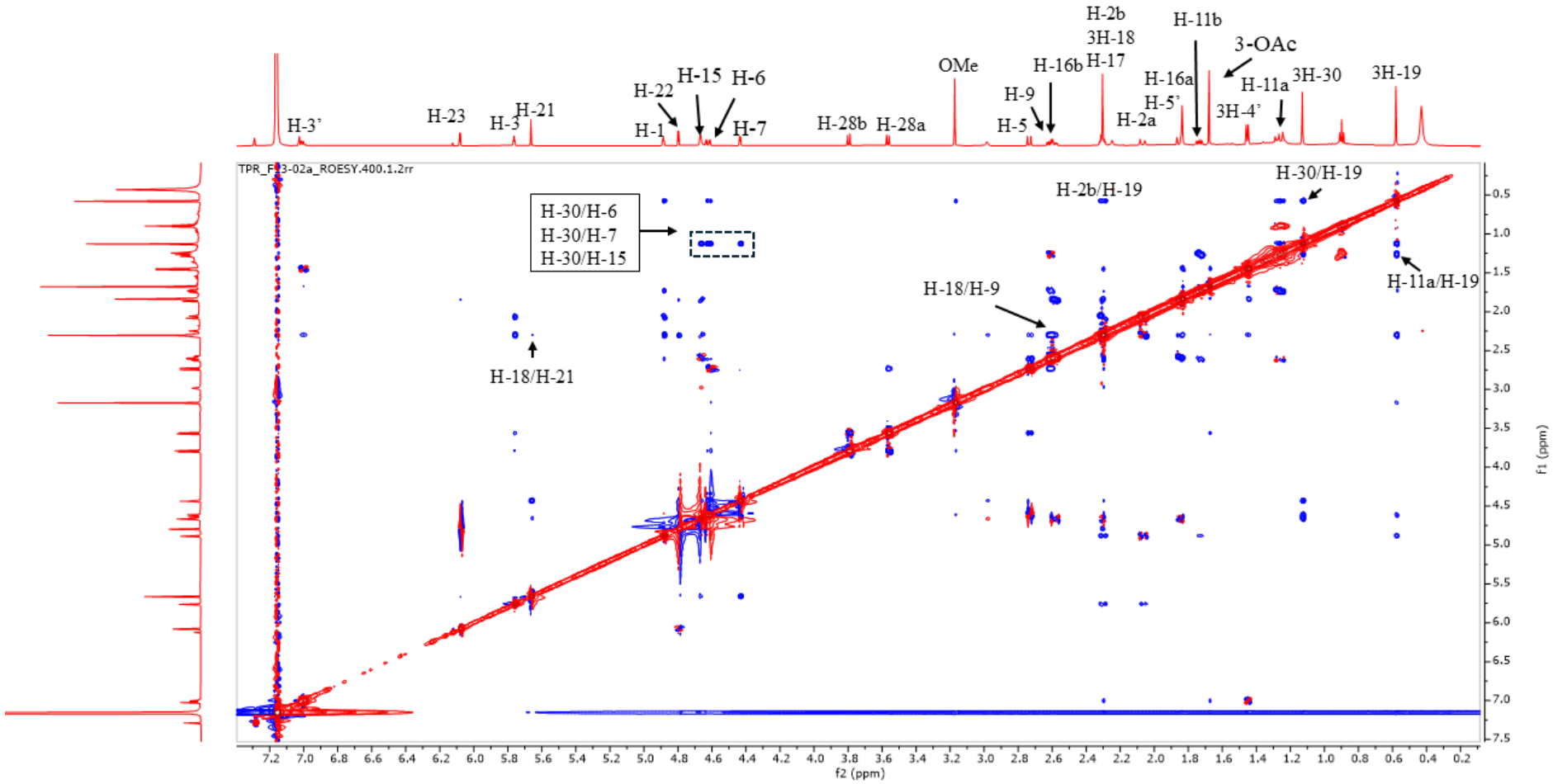
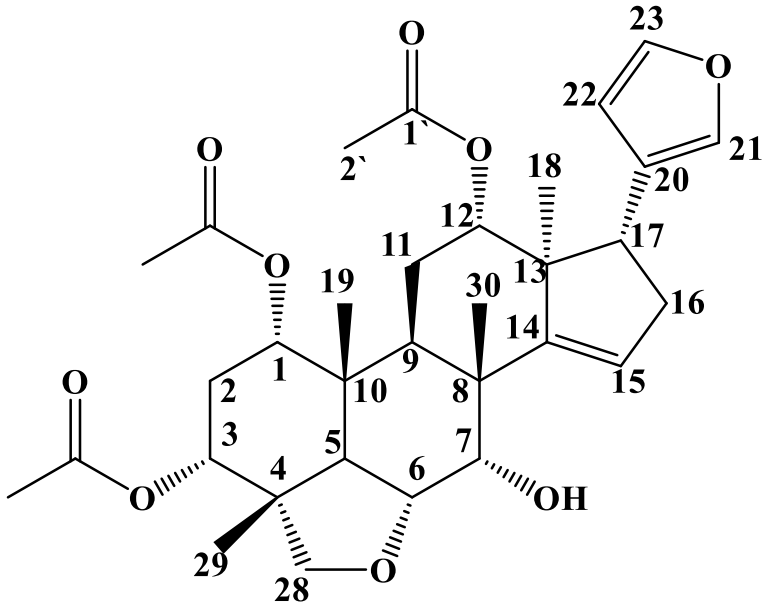


Figura 91 - Mapa de contorno ROESY do limonoide 08 em C_6D_6 (14,1 T).

Substância 09 – 1-acetóxitrichilinina



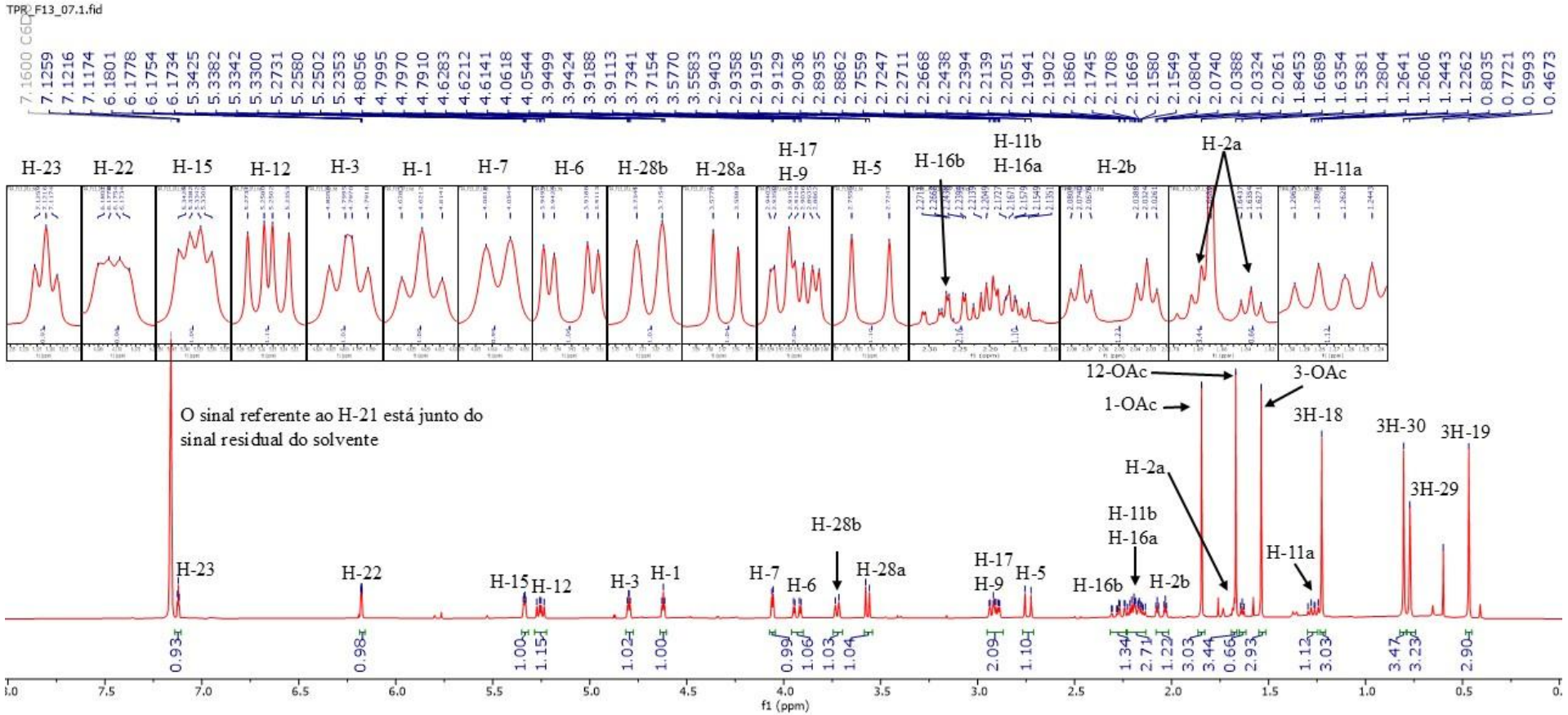


Figura 92 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

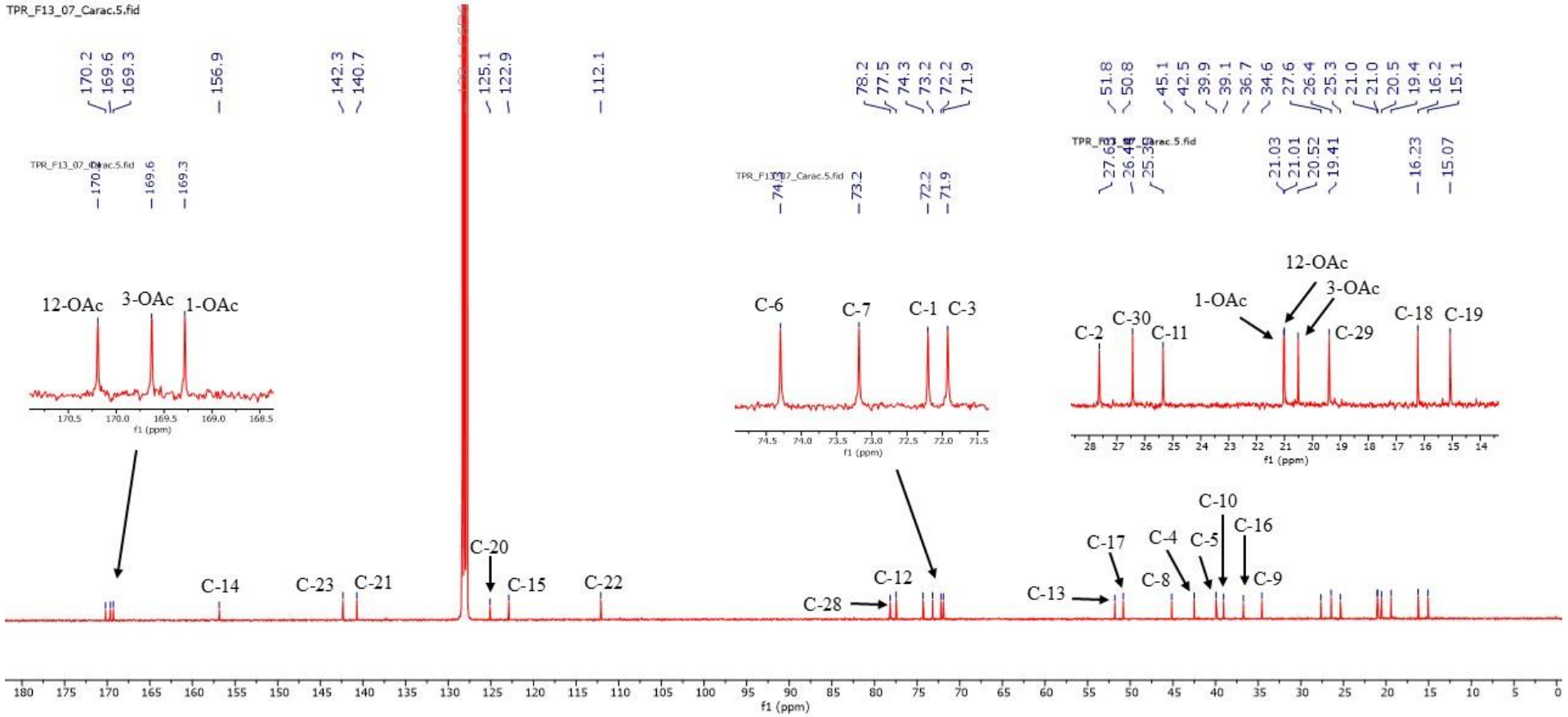


Figura 93 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

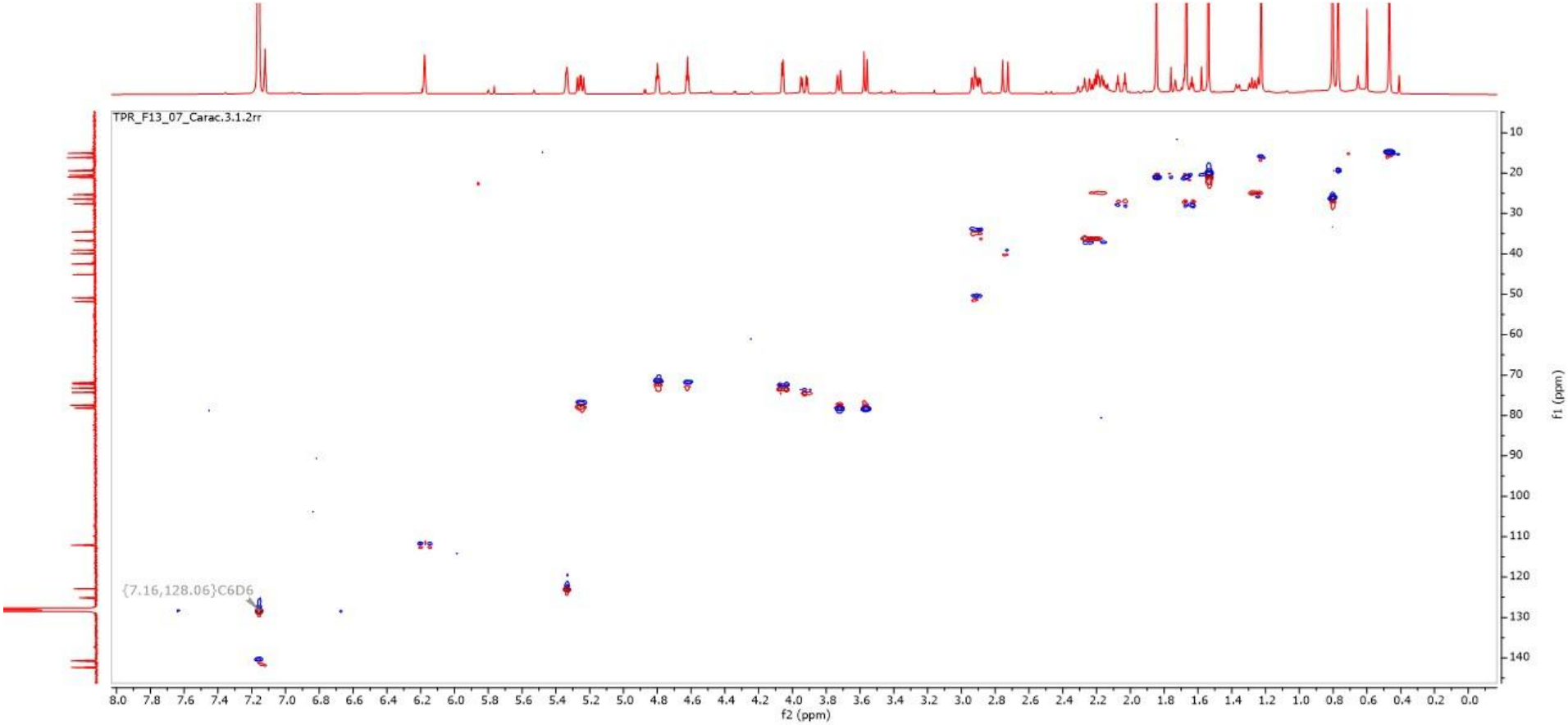


Figura 94 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

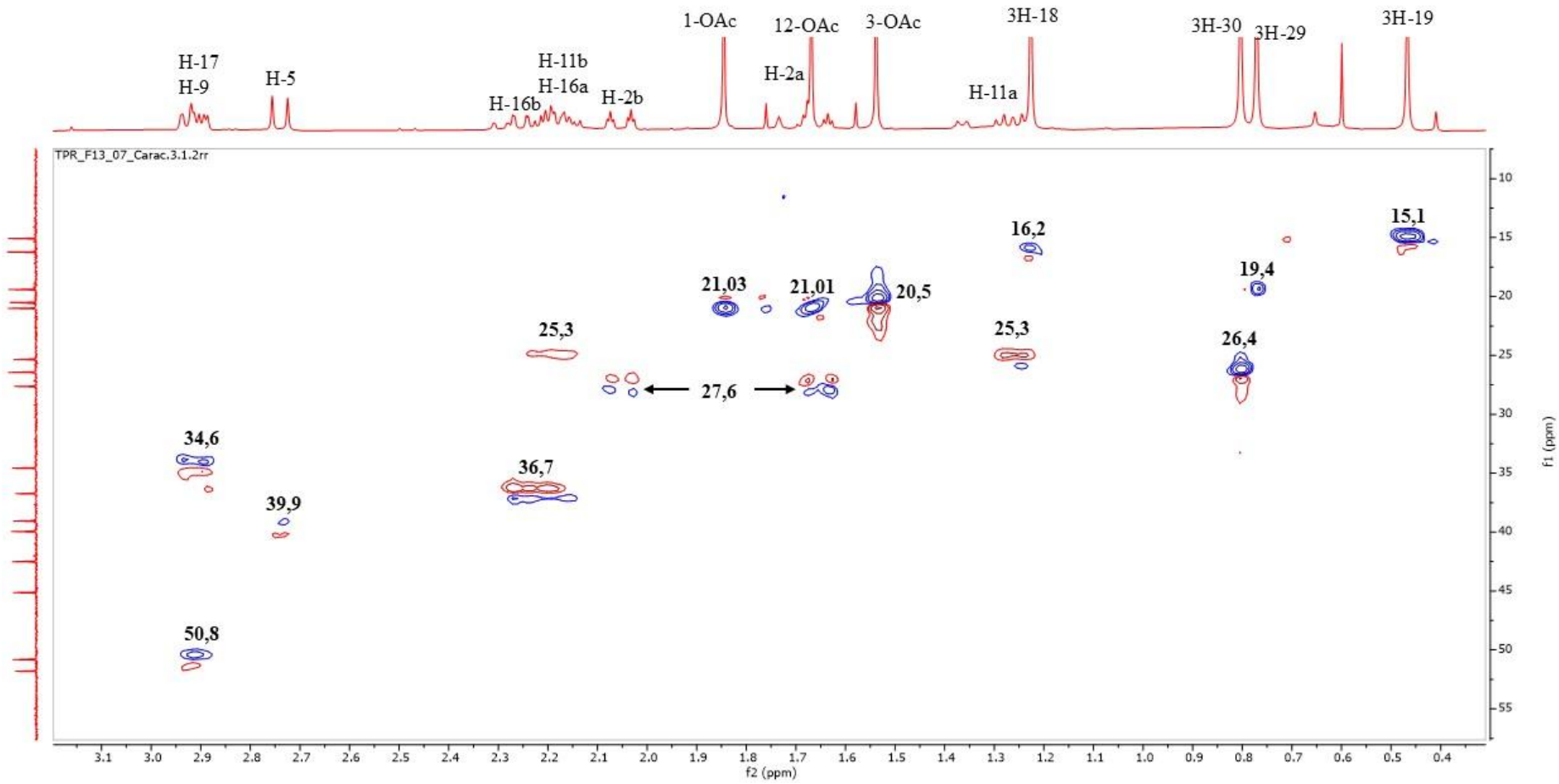


Figura 95 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

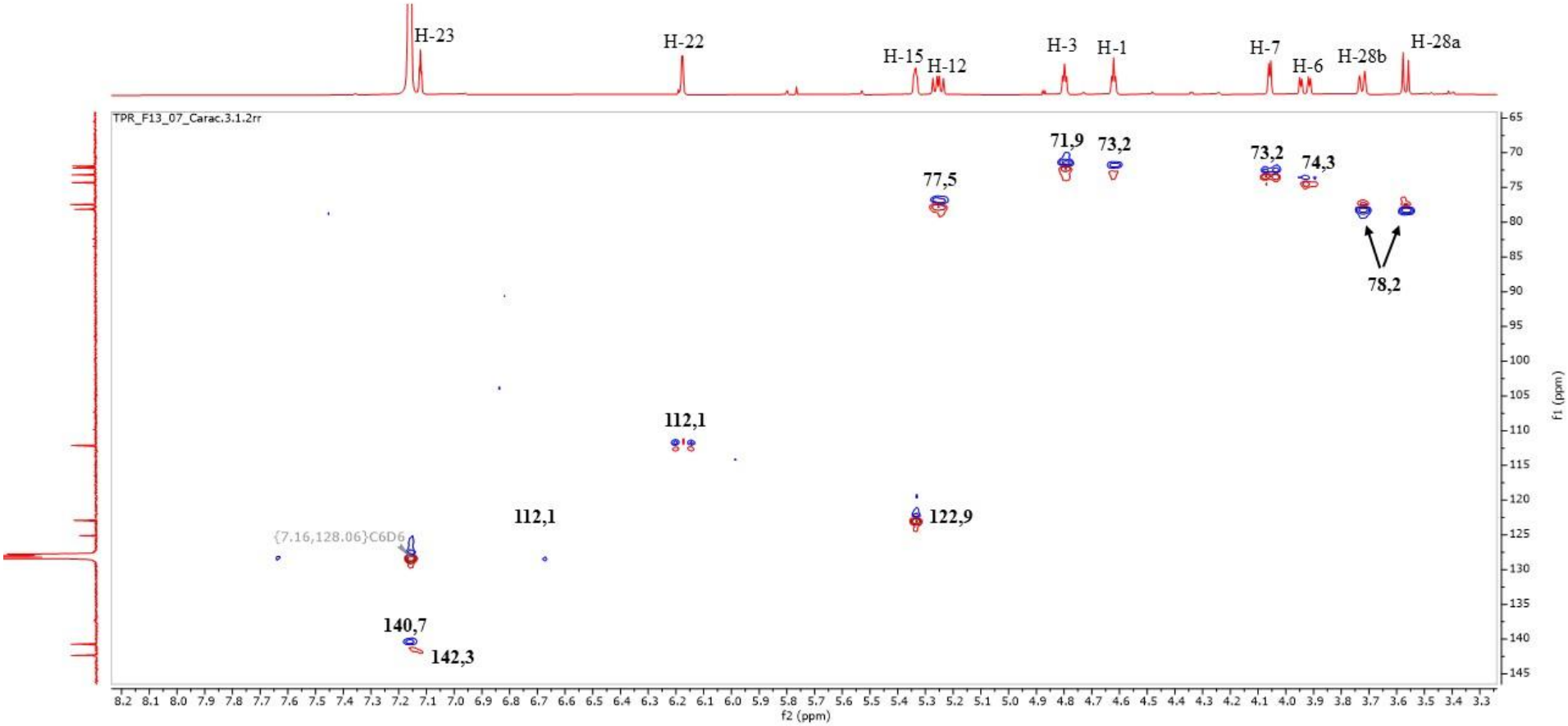


Figura 96 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

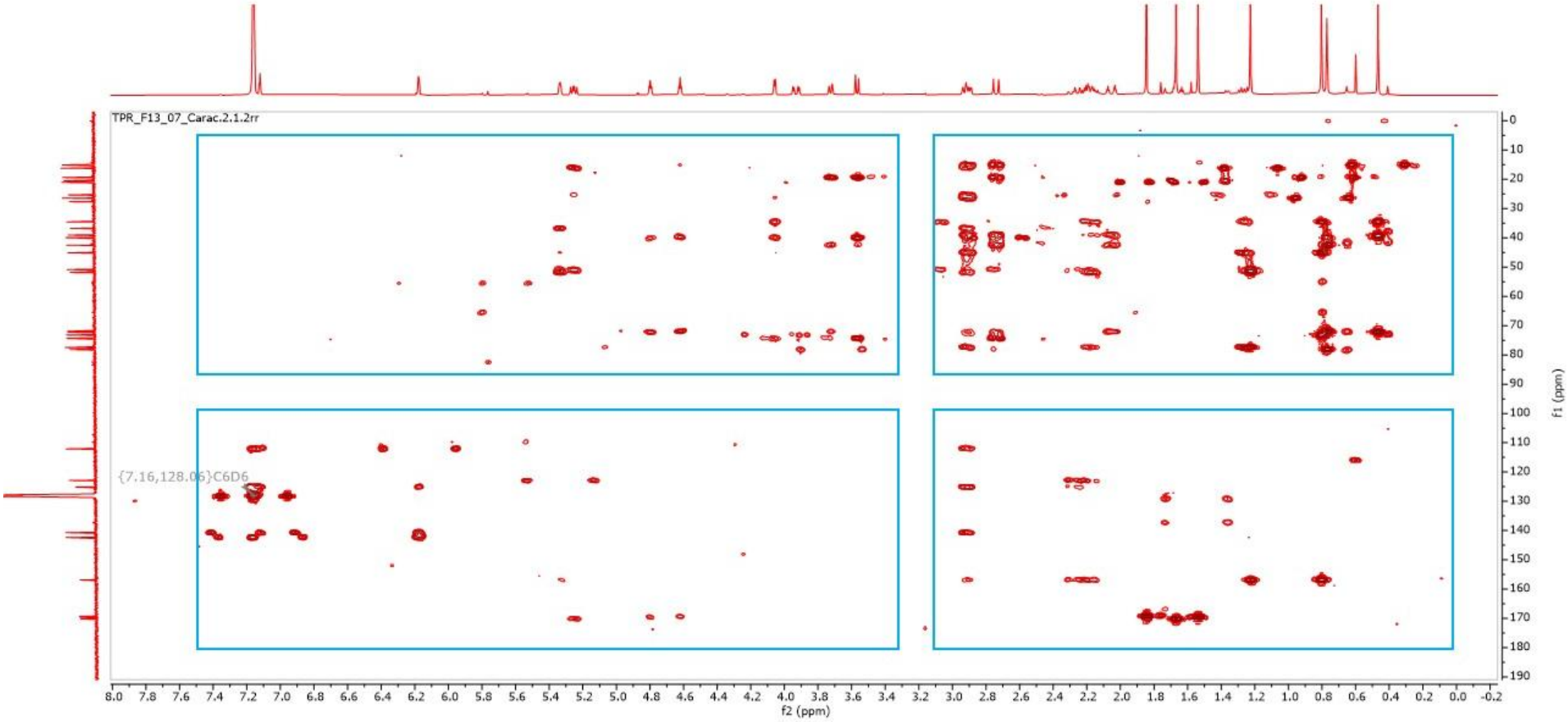


Figura 97 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

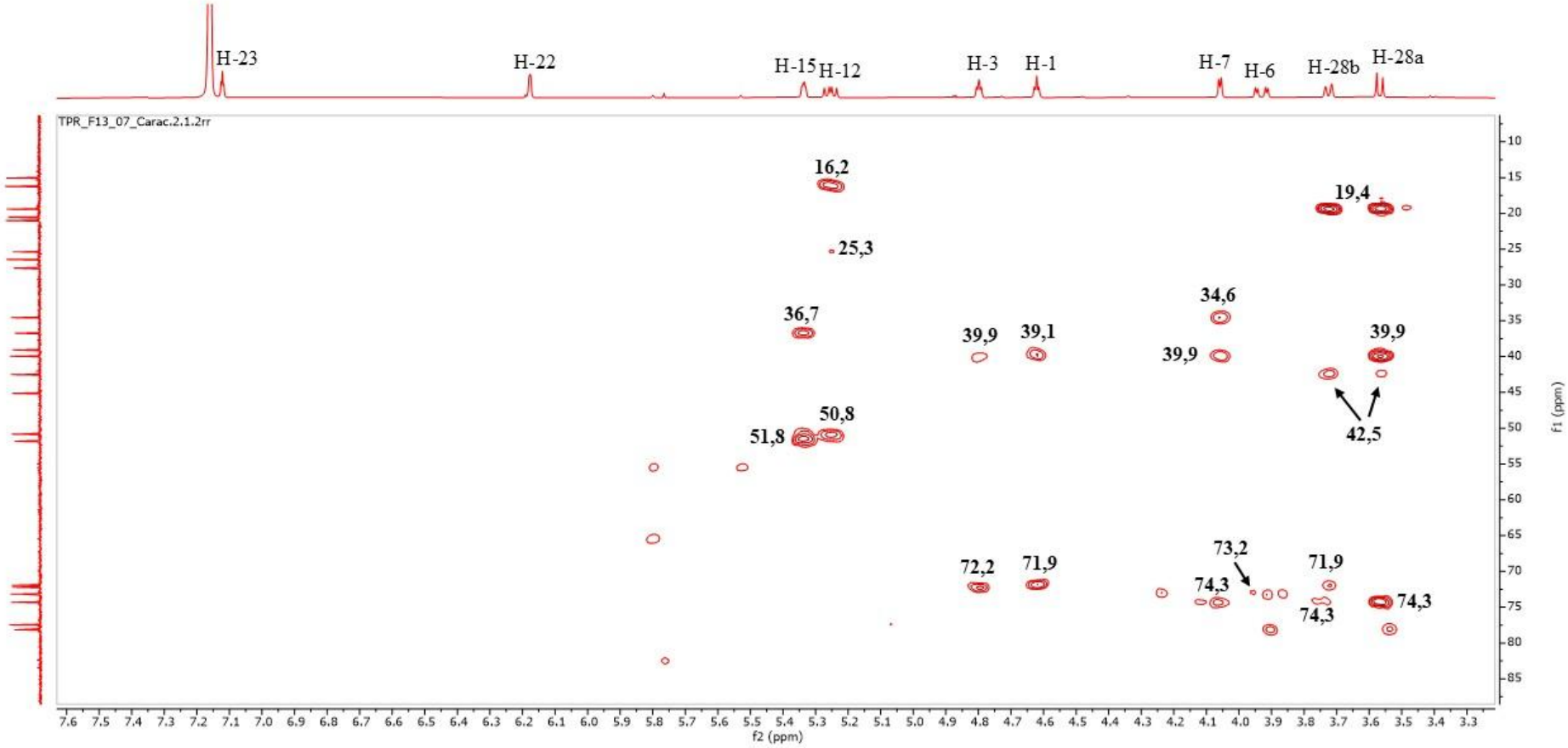


Figura 98 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

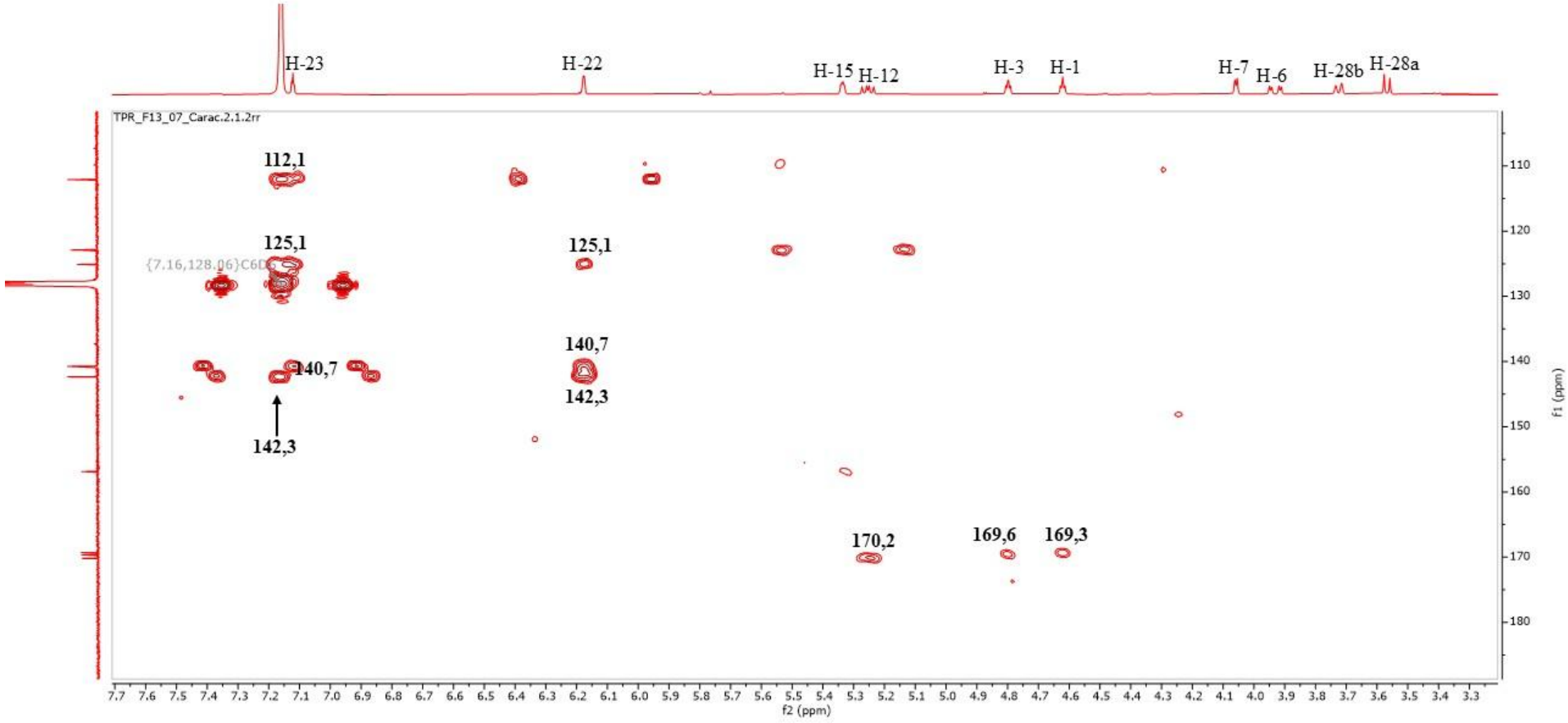


Figura 99 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

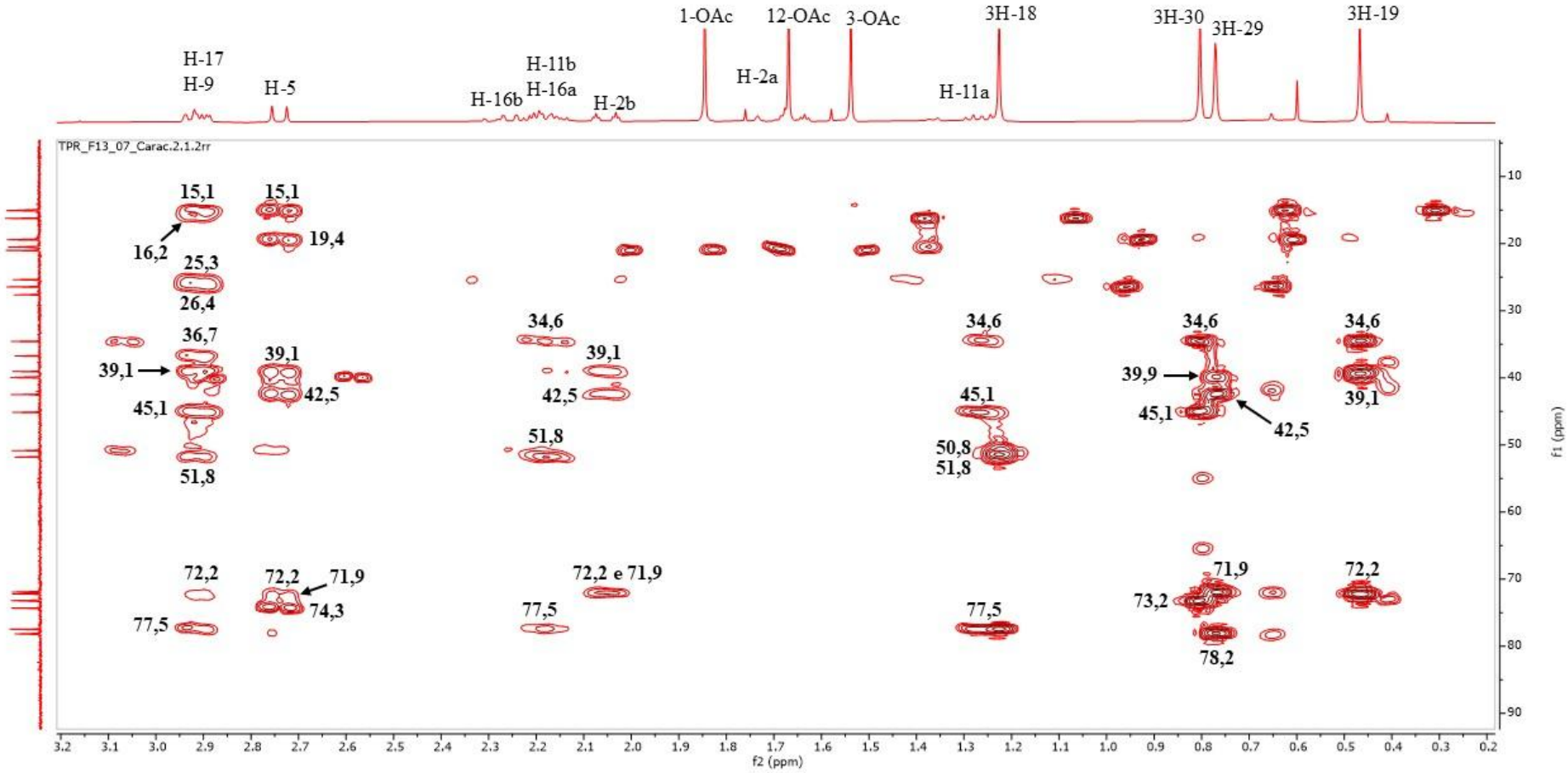


Figura 100 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

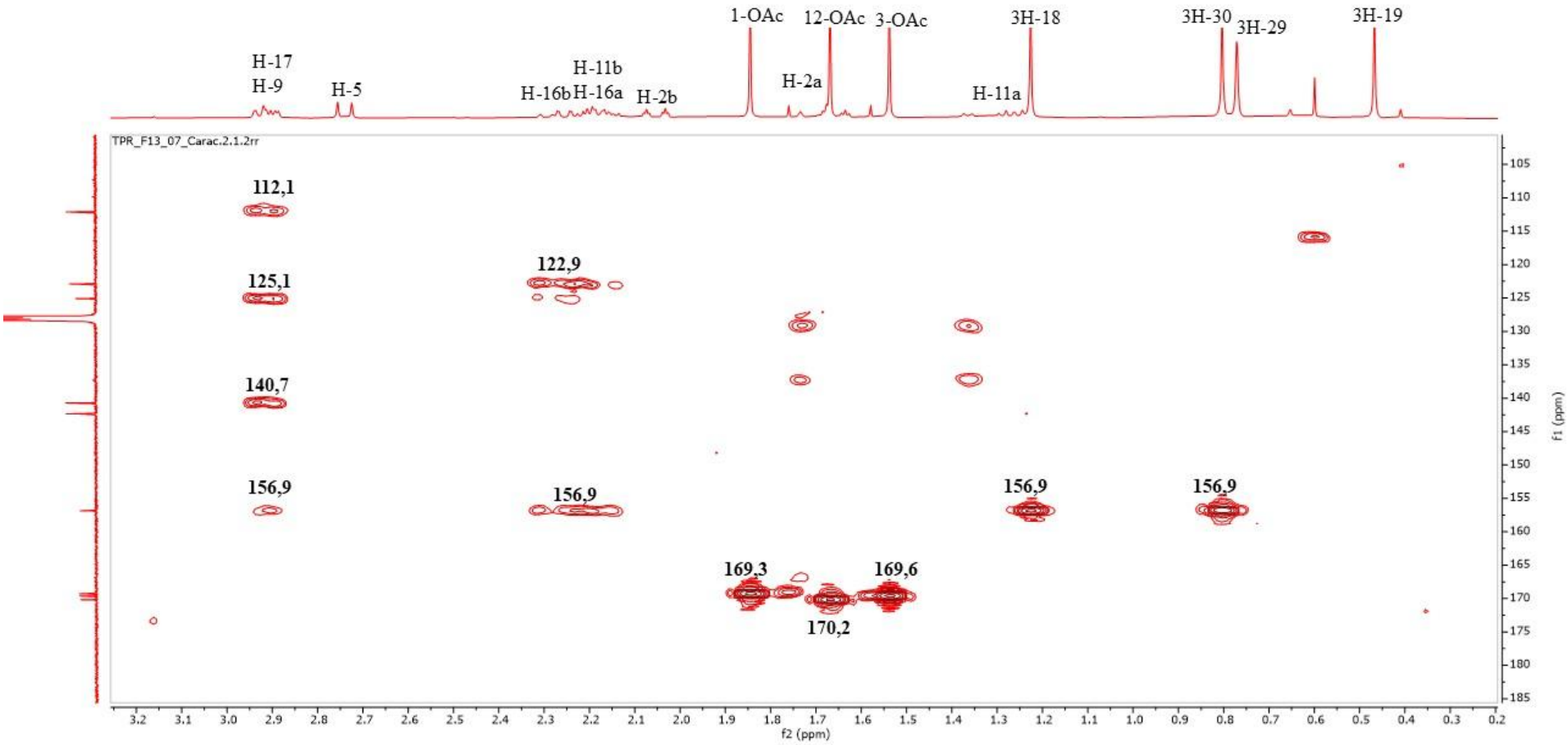


Figura 101 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

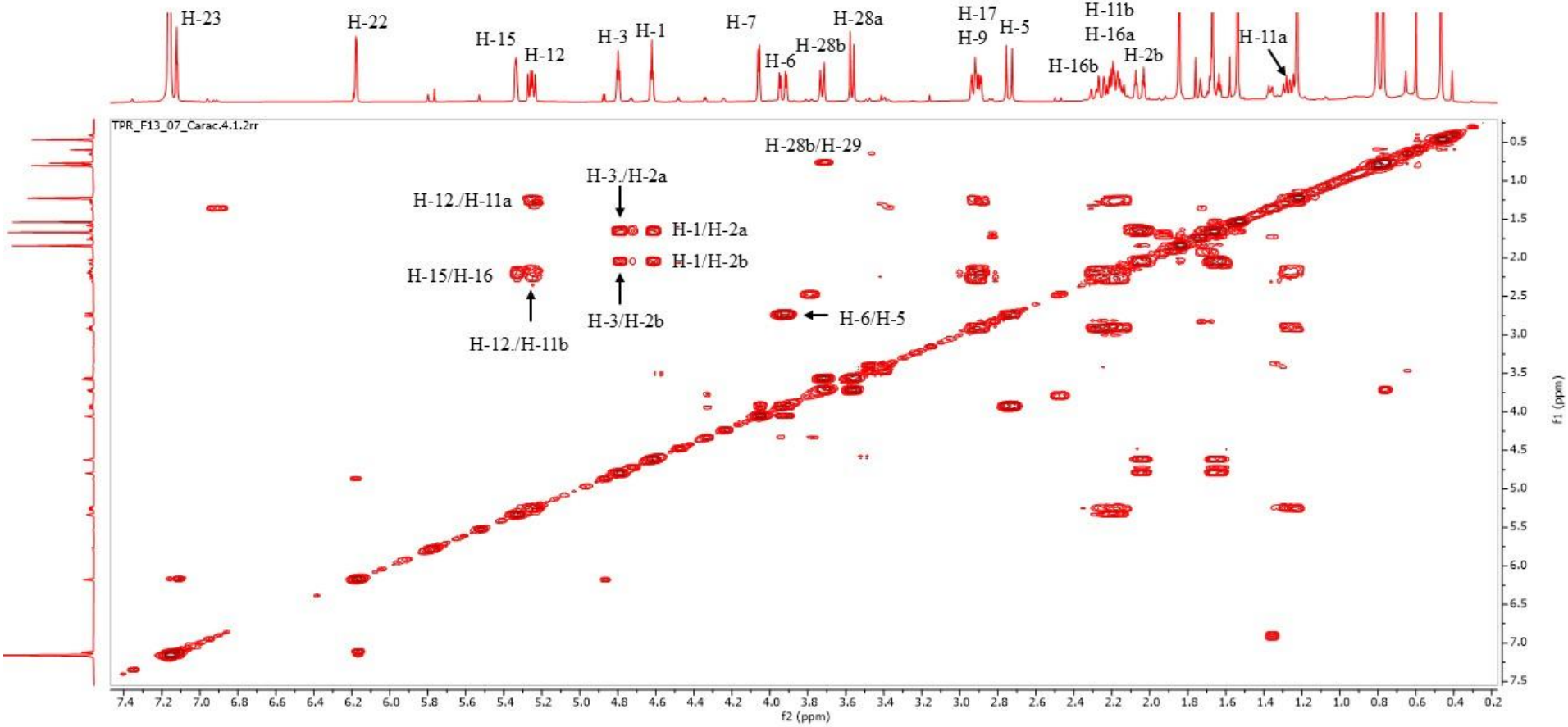
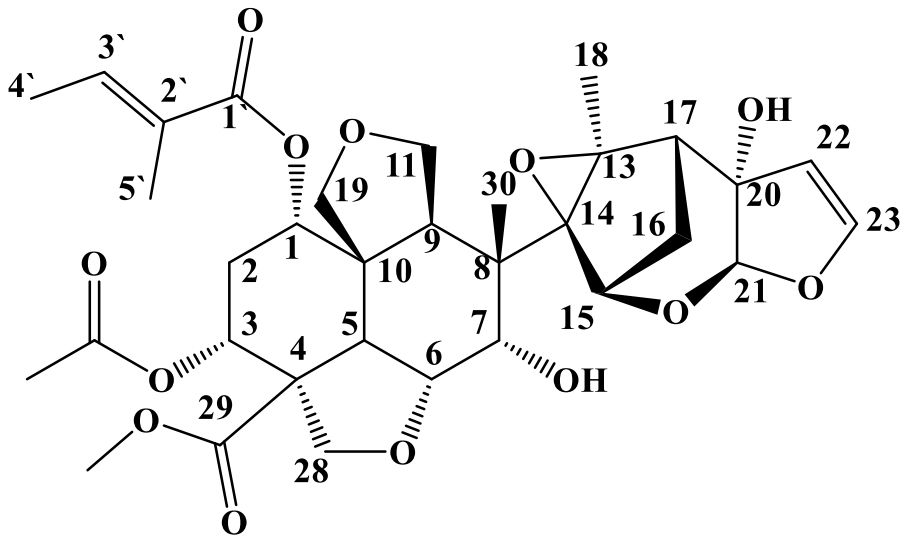


Figura 102 - Mapa de contorno COSY do limonoide 09 em C_6D_6 (9,4 T).

Substância 10 – Norpallidalina B



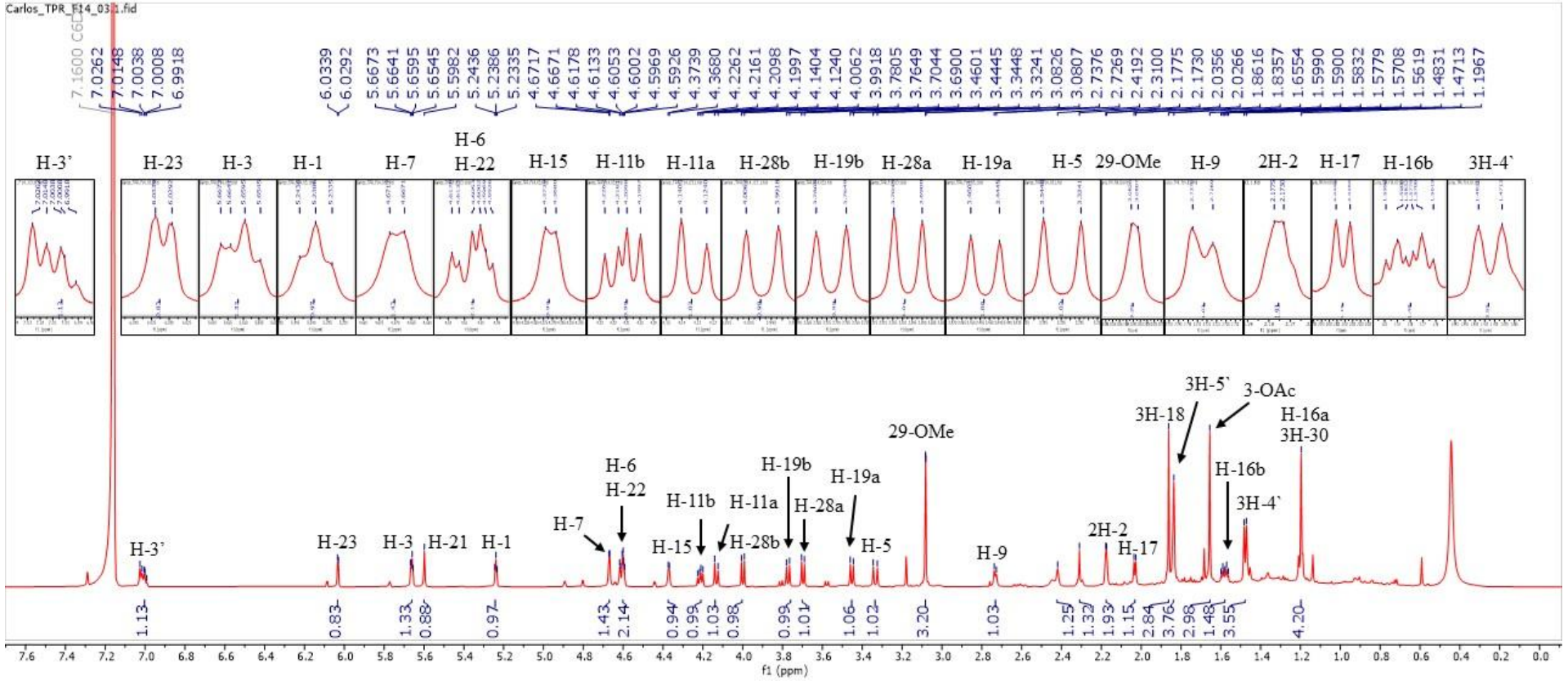


Figura 103 - Espectro de RMN de ^{1}H do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

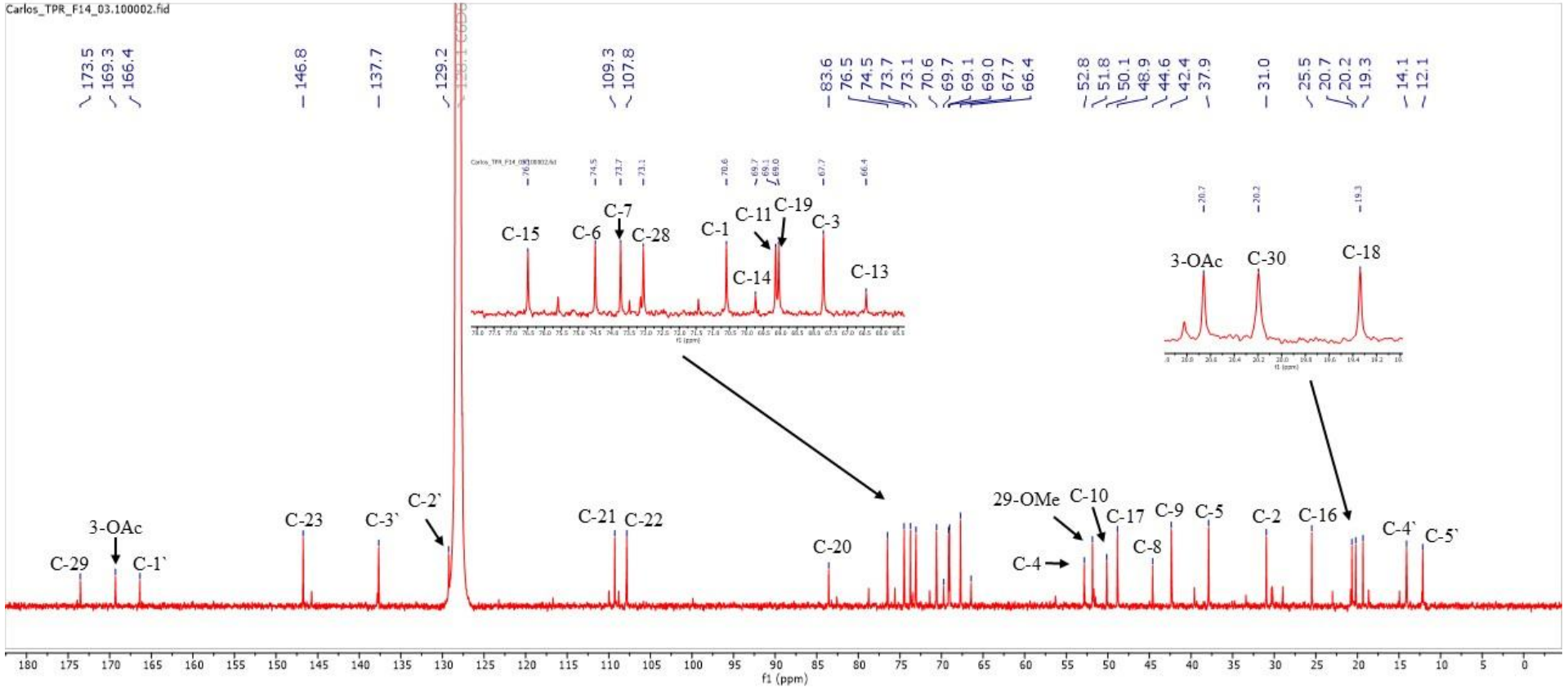


Figura 104 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

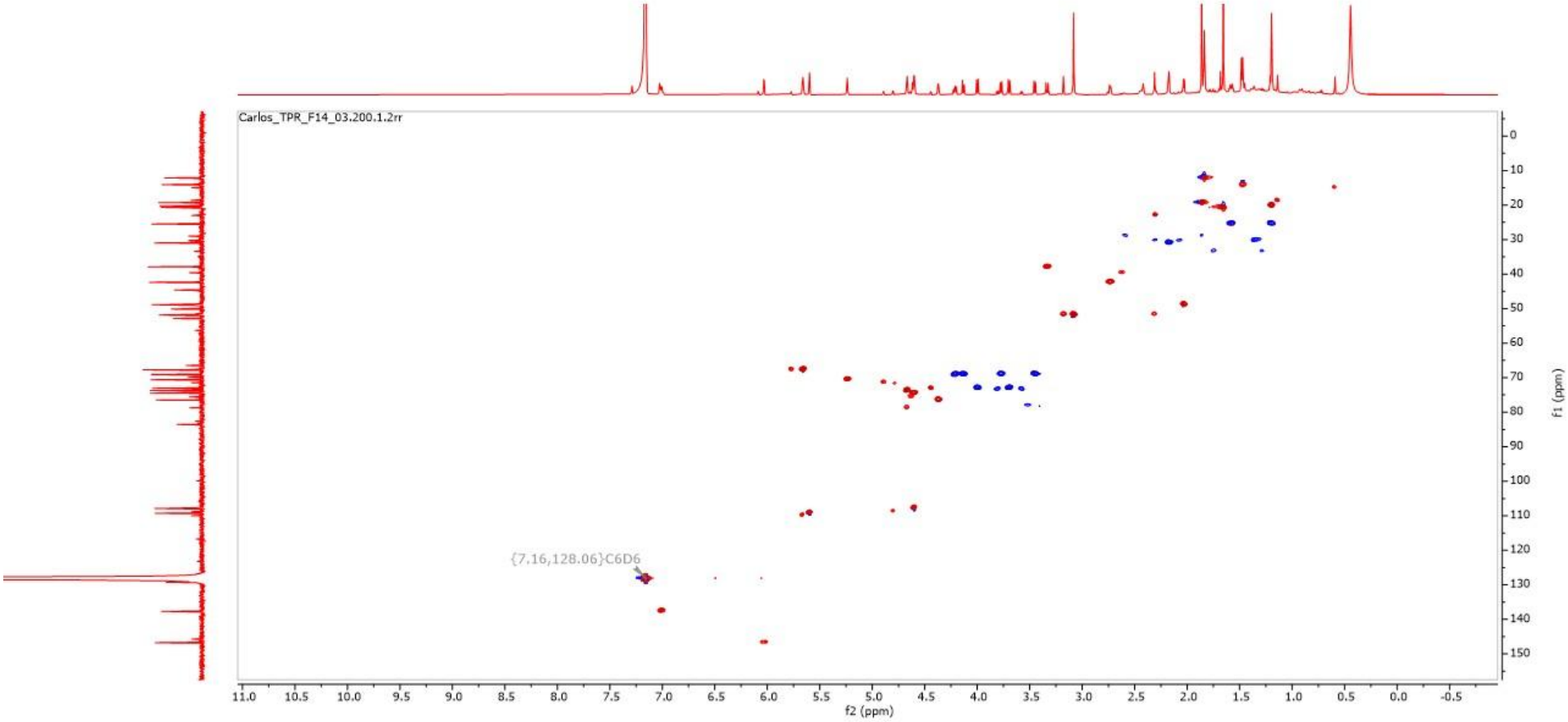


Figura 105 - Mapa de contorno HSQC do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

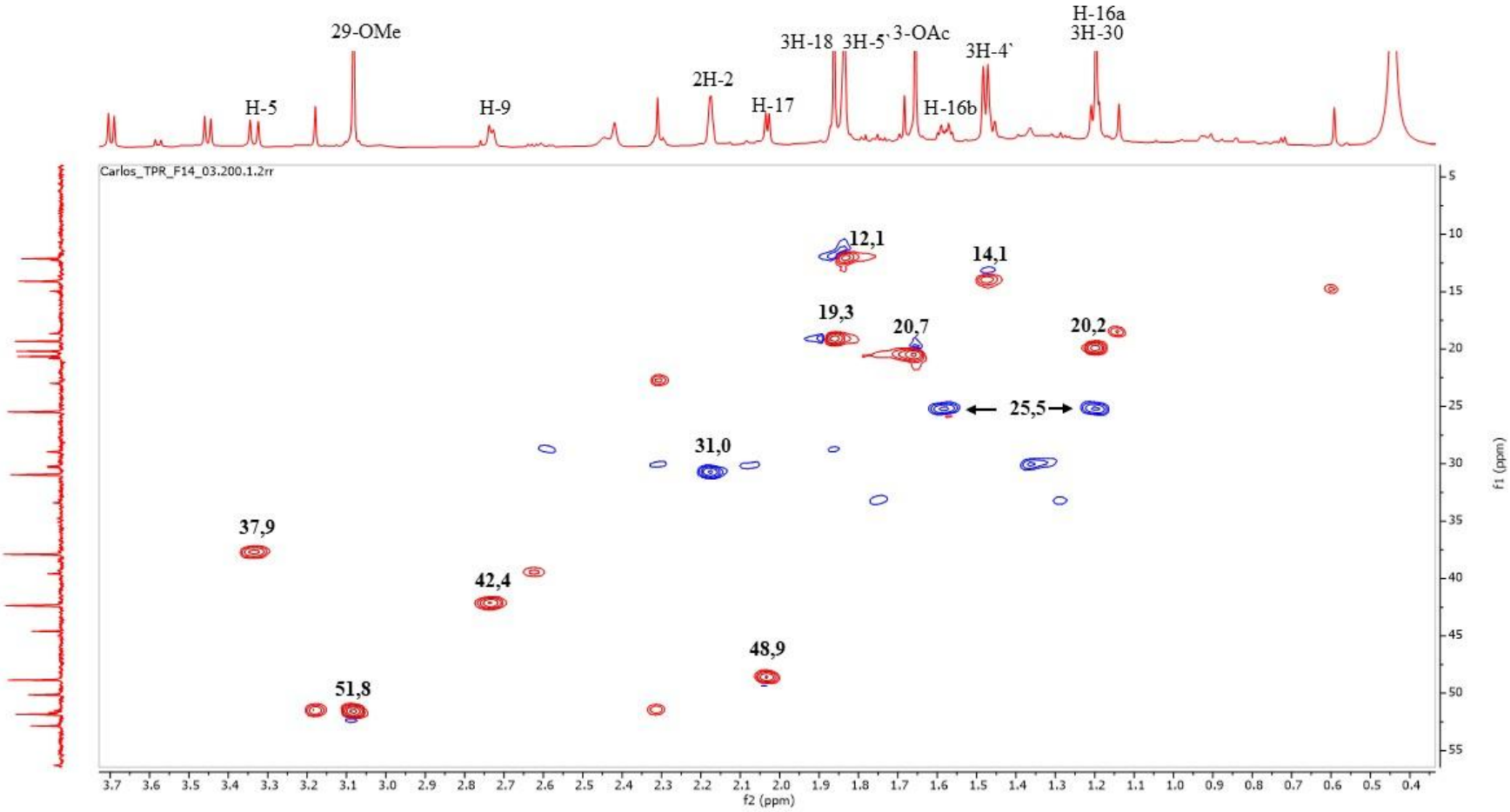


Figura 106 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

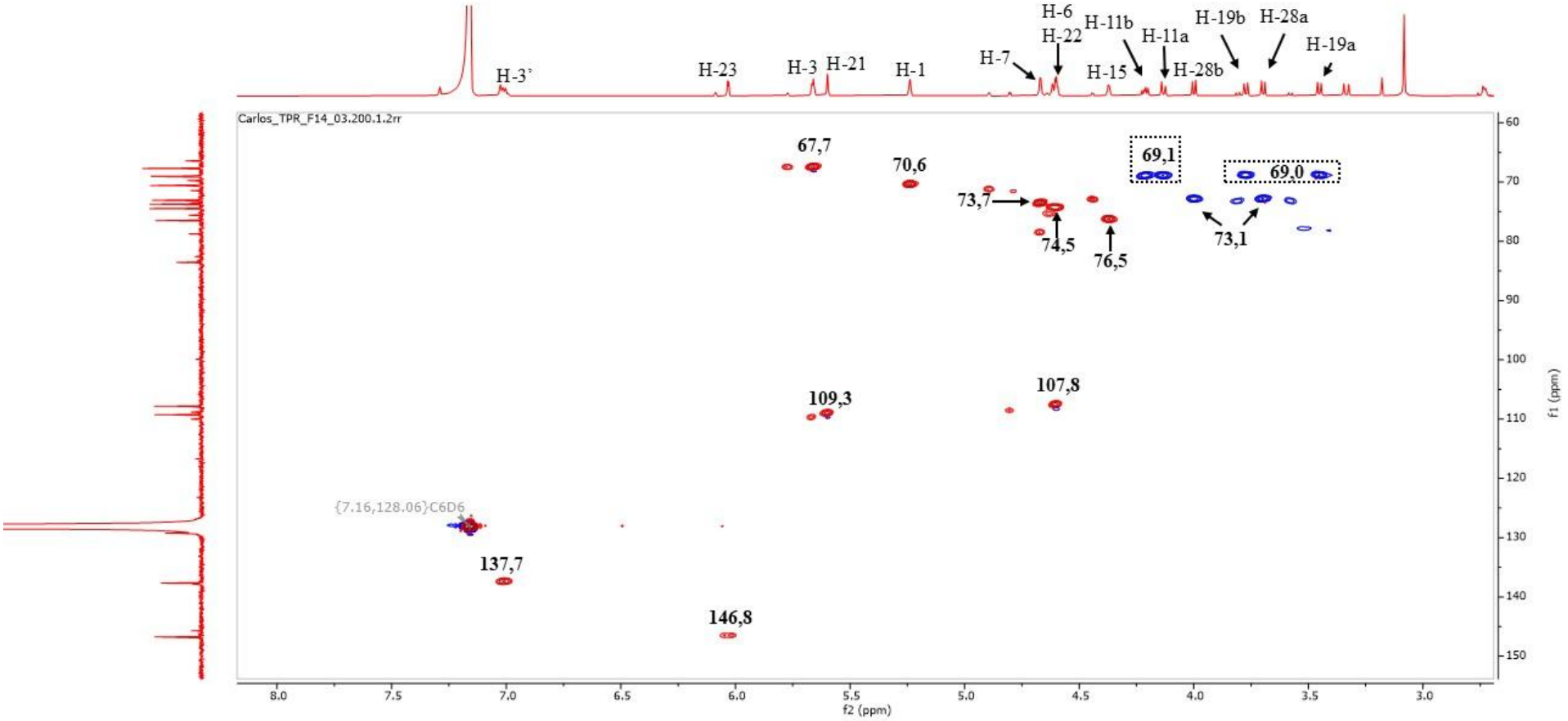


Figura 107 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

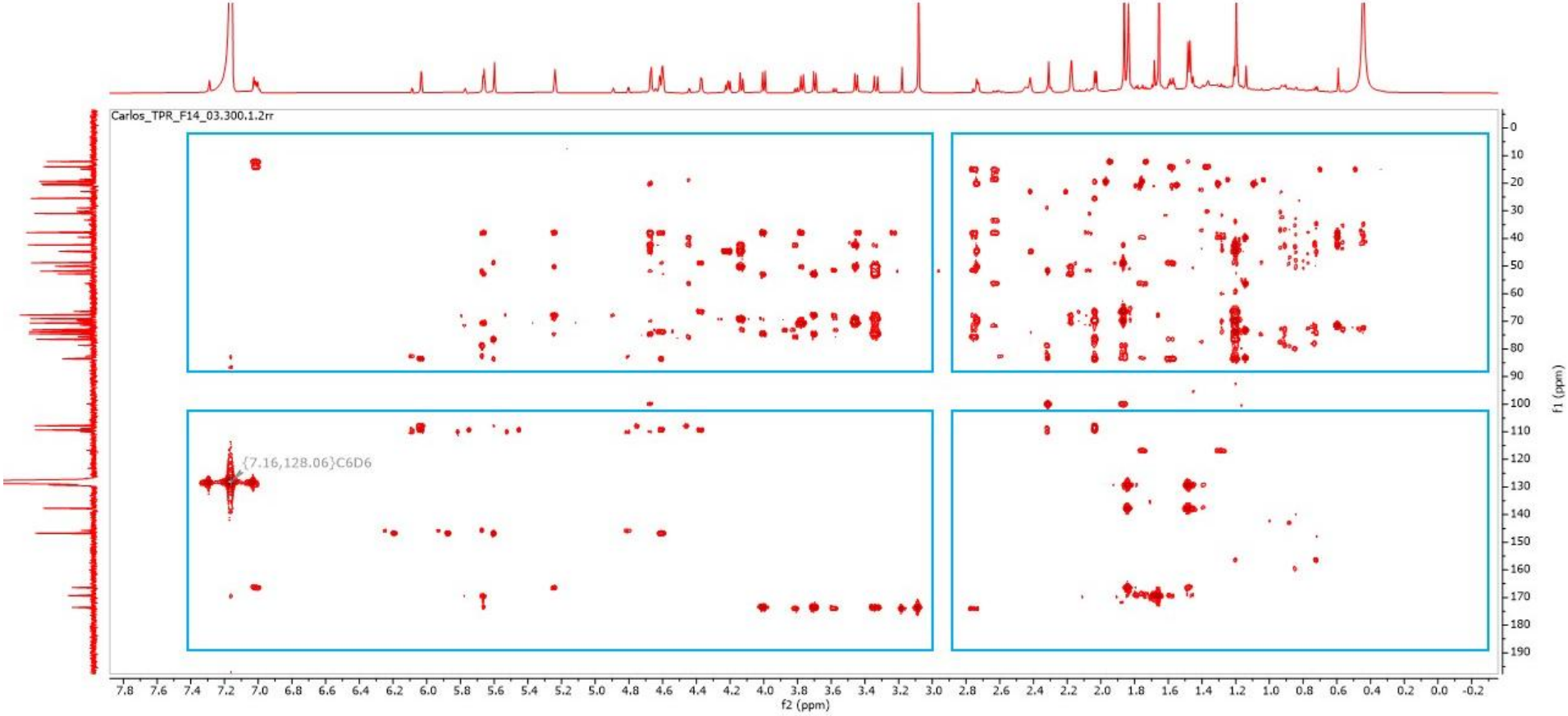


Figura 108 - Mapa de contorno HMBC do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

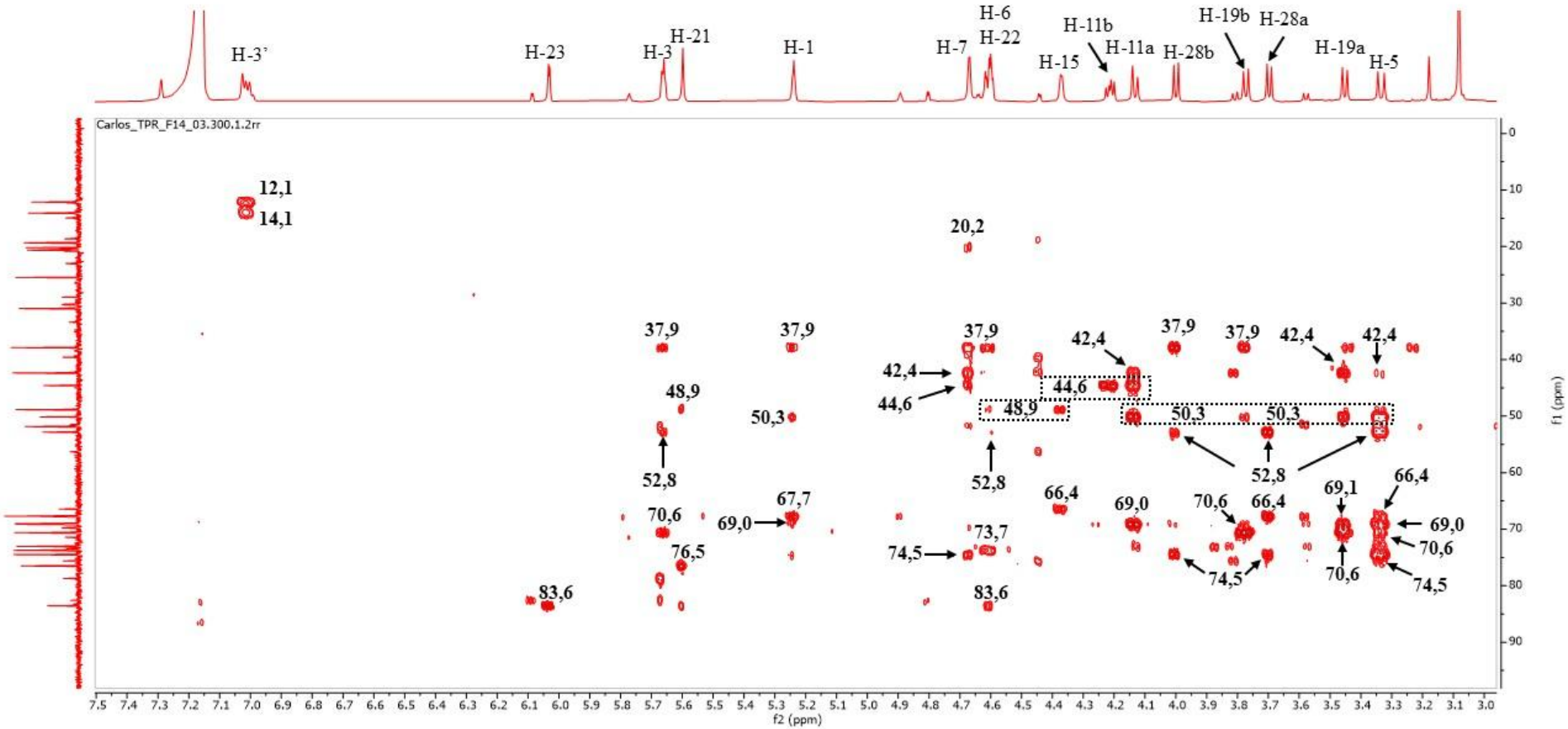


Figura 109 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

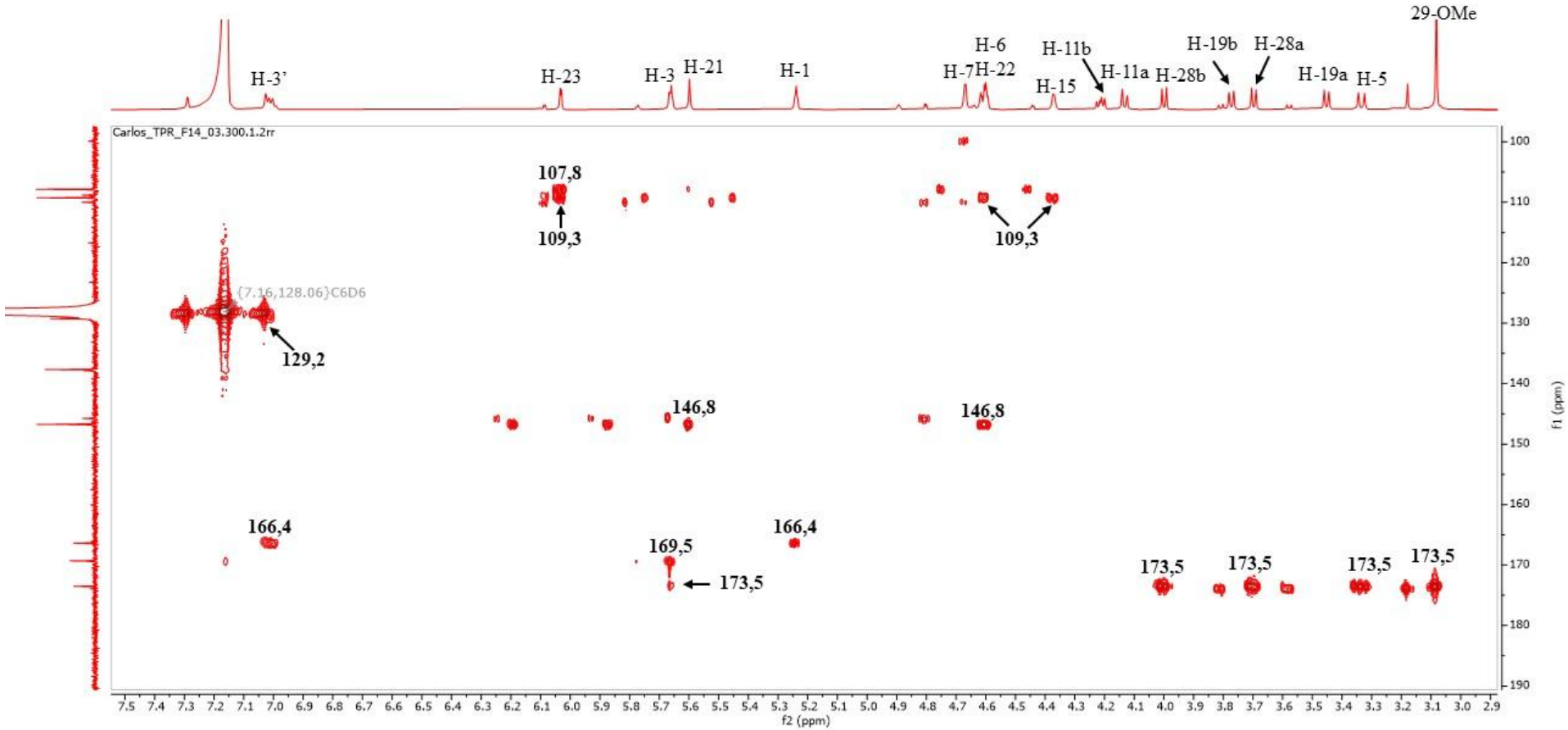


Figura 110 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

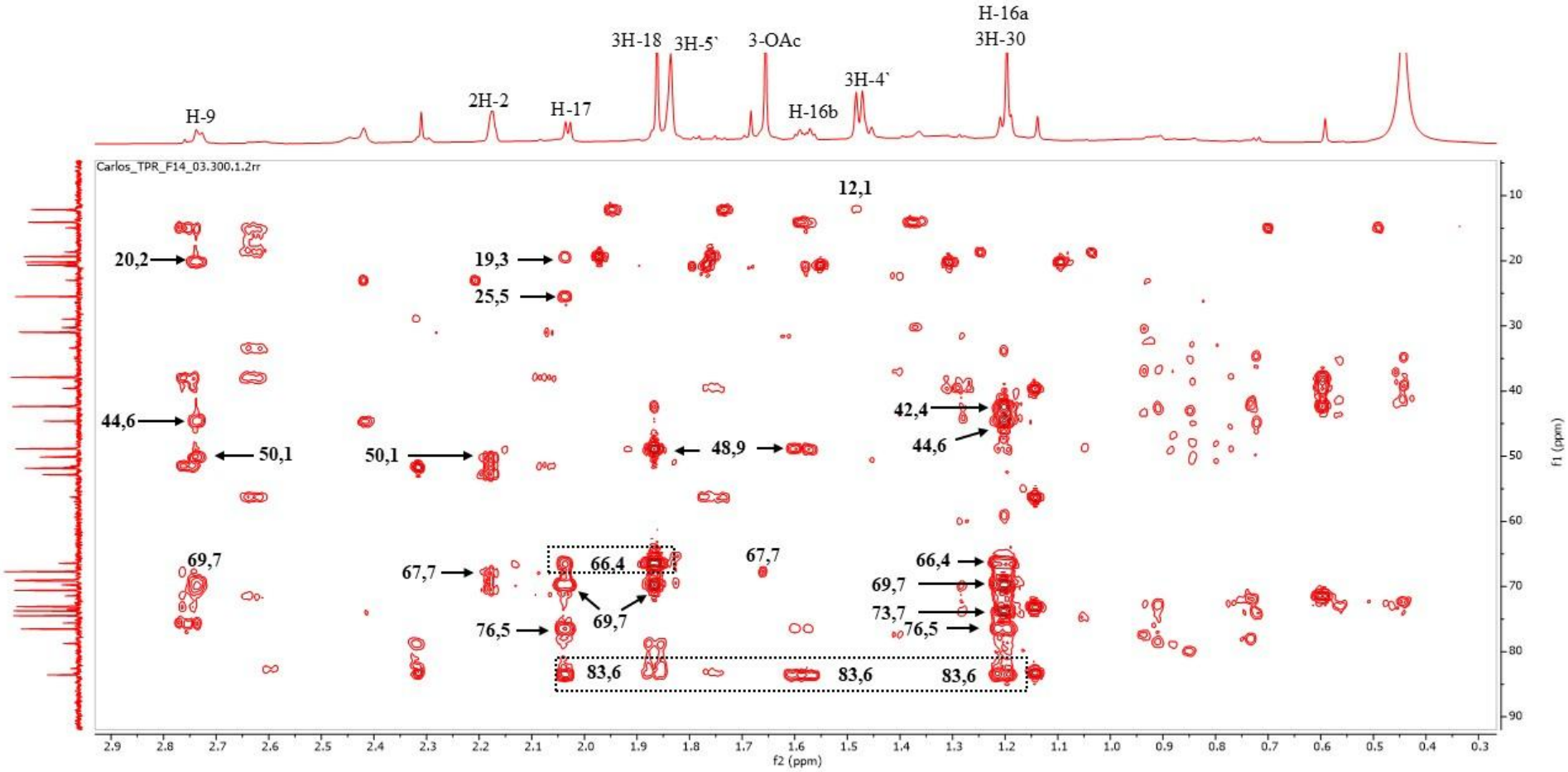


Figura 111 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

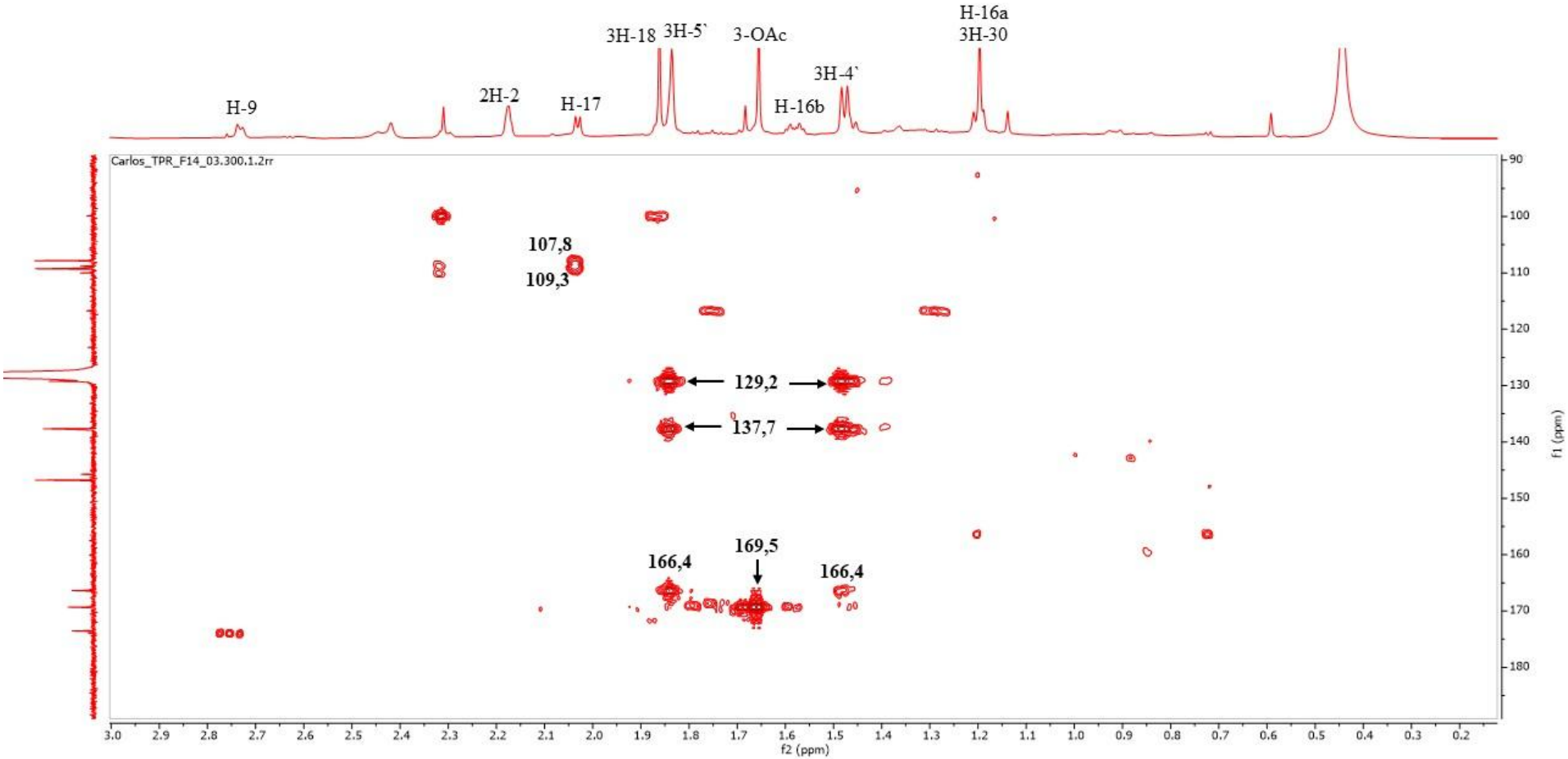


Figura 112 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

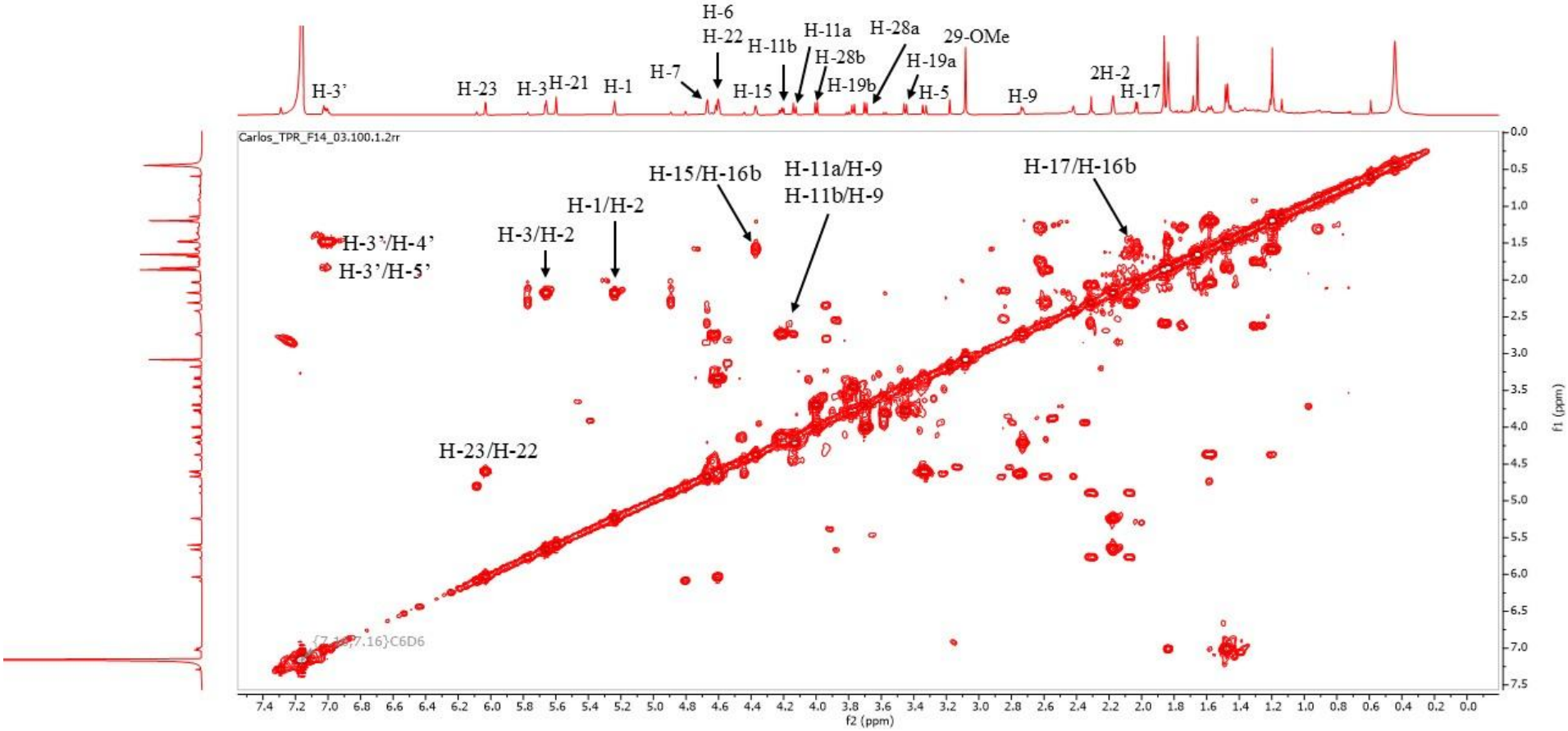
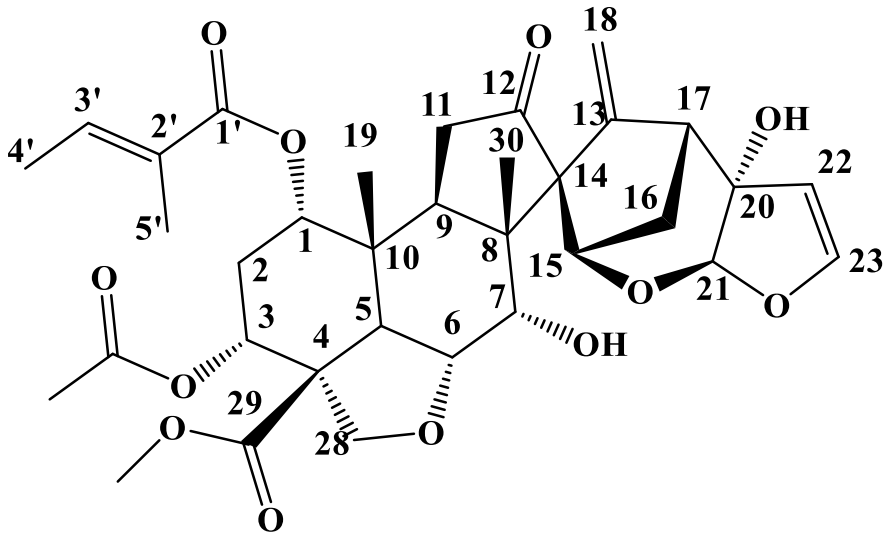


Figura 113 - Mapa de contorno COSY do norlimonoide 10 em C_6D_6 (14,1 T).

Substância 11 – Espiropallidalina A



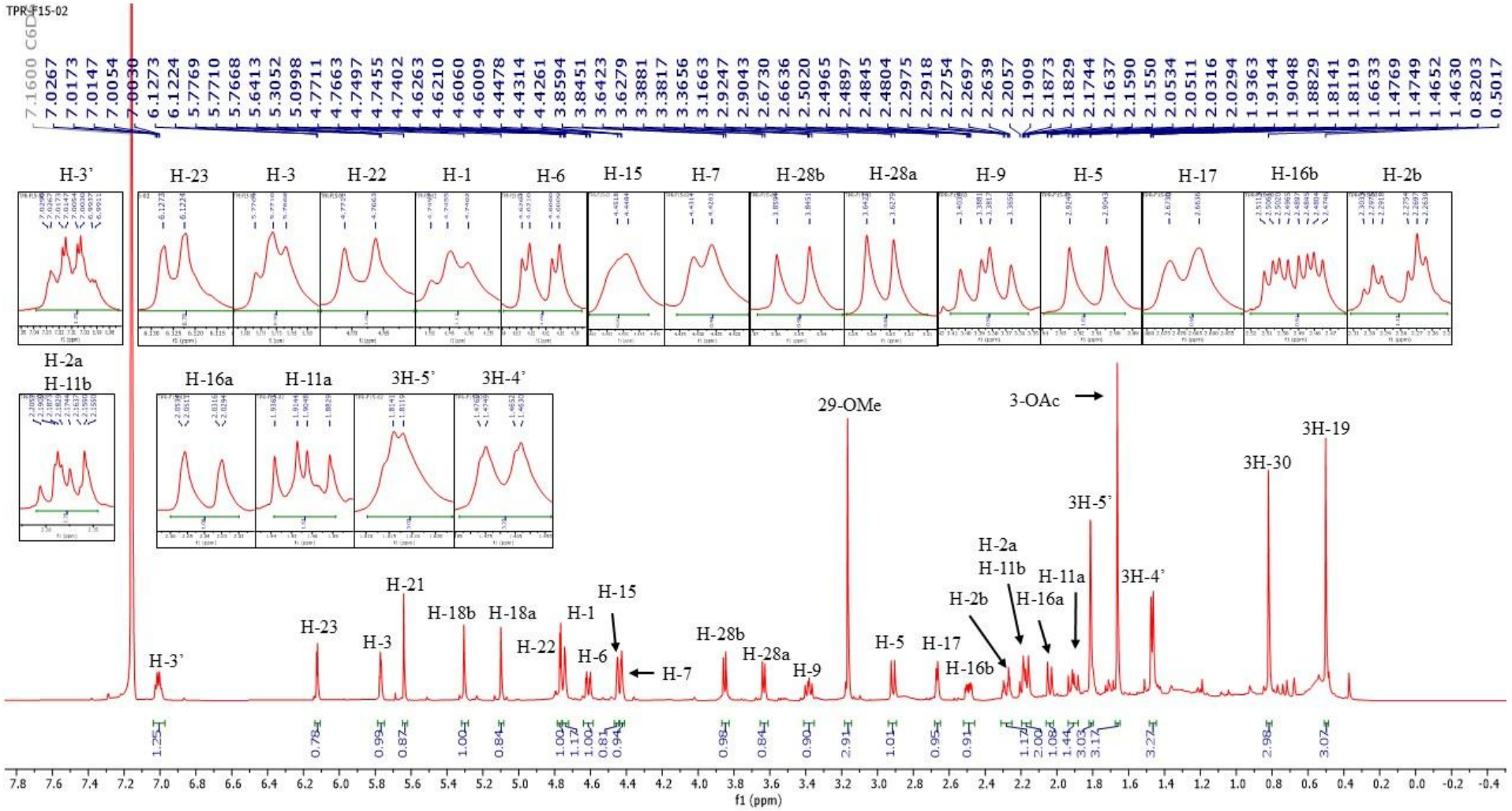


Figura 114 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

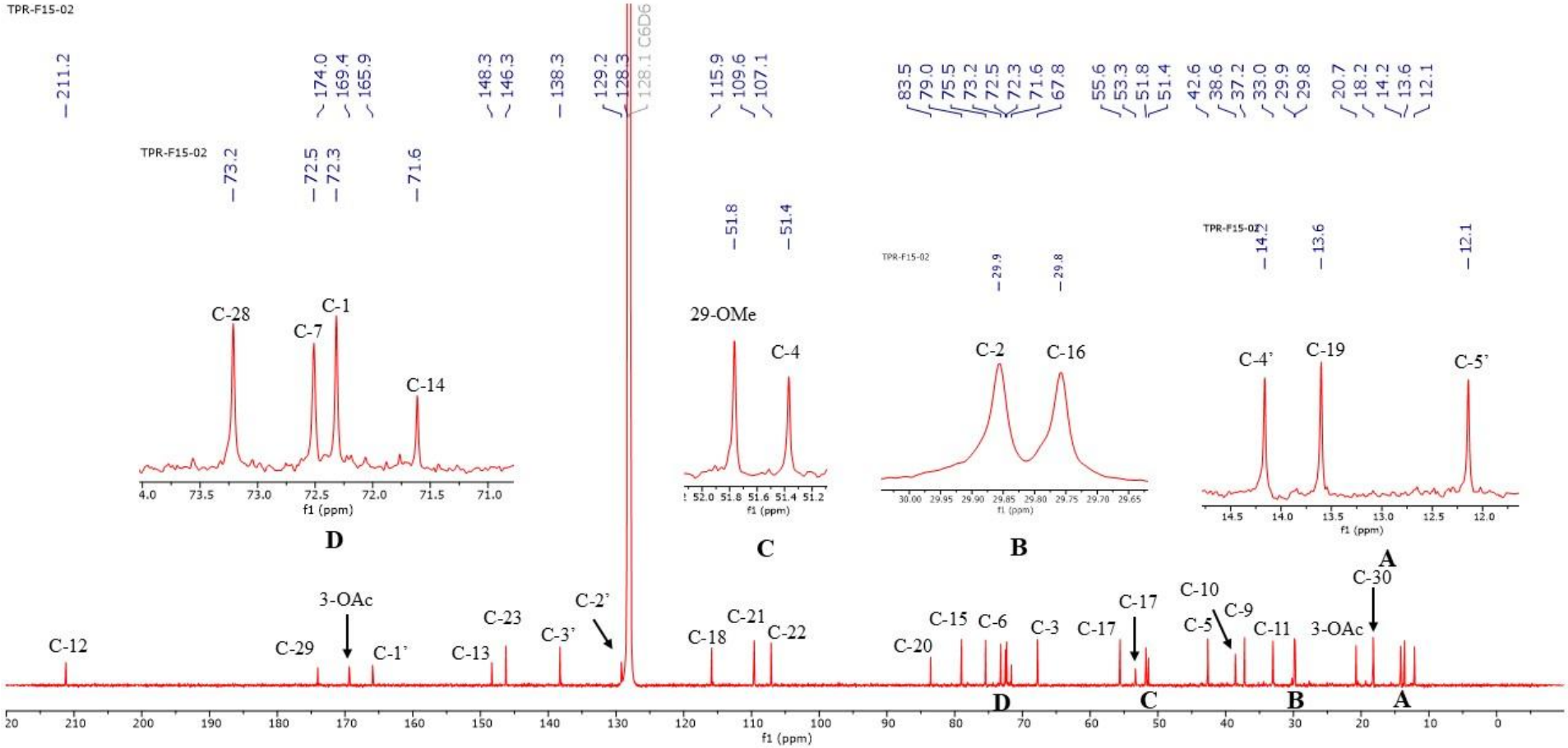


Figura 115 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

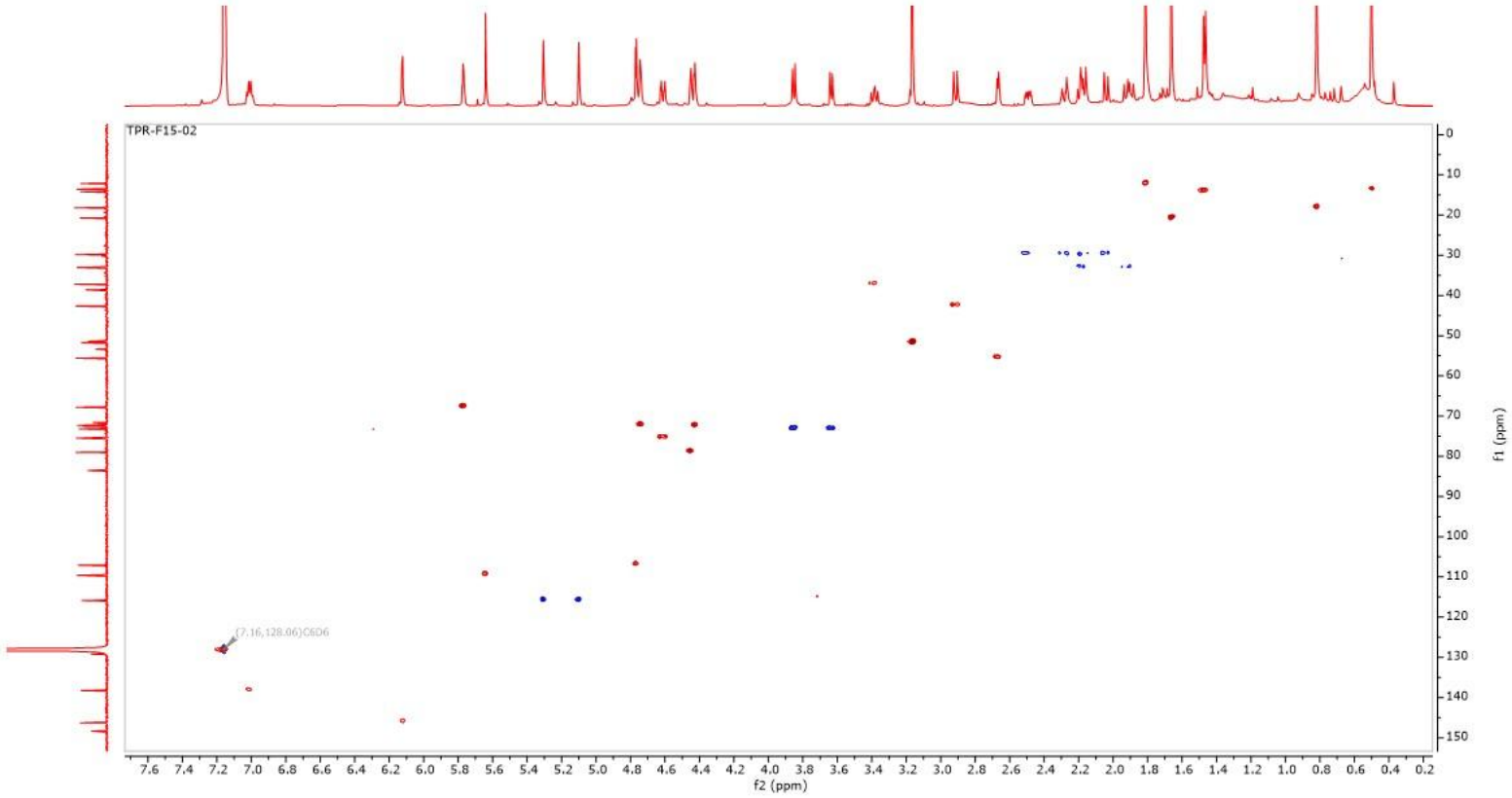


Figura 116 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

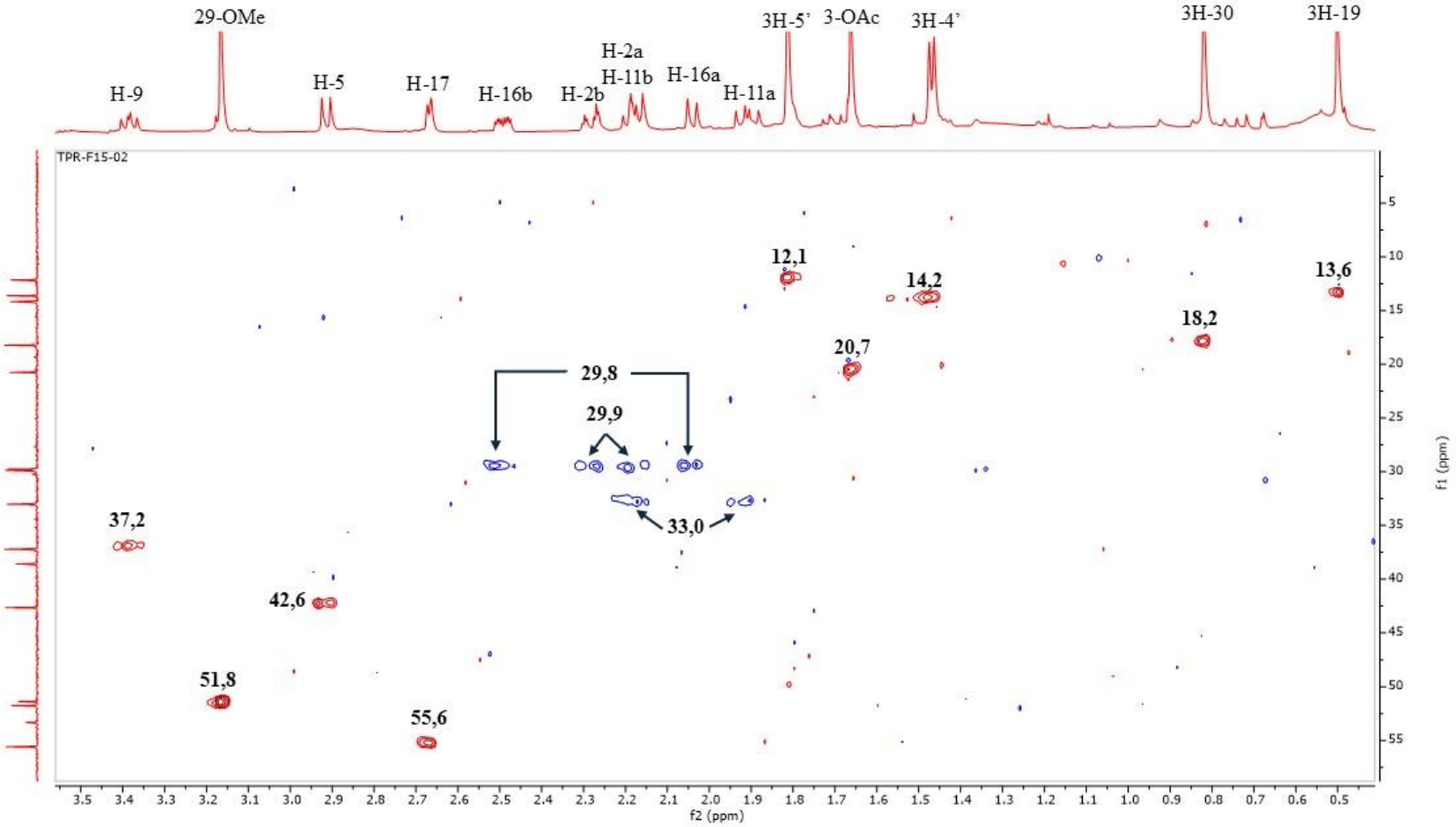


Figura 117 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

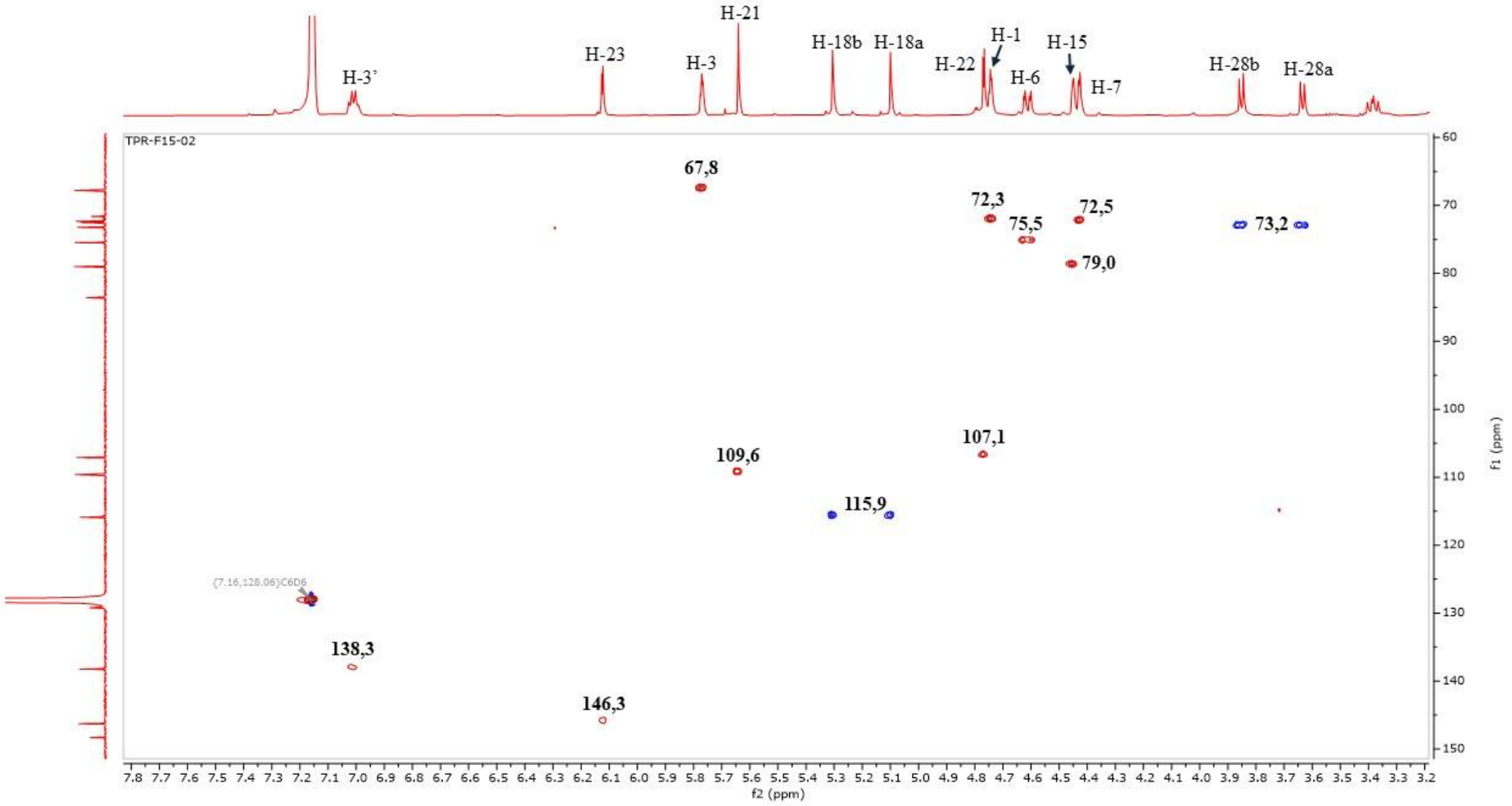


Figura 118 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

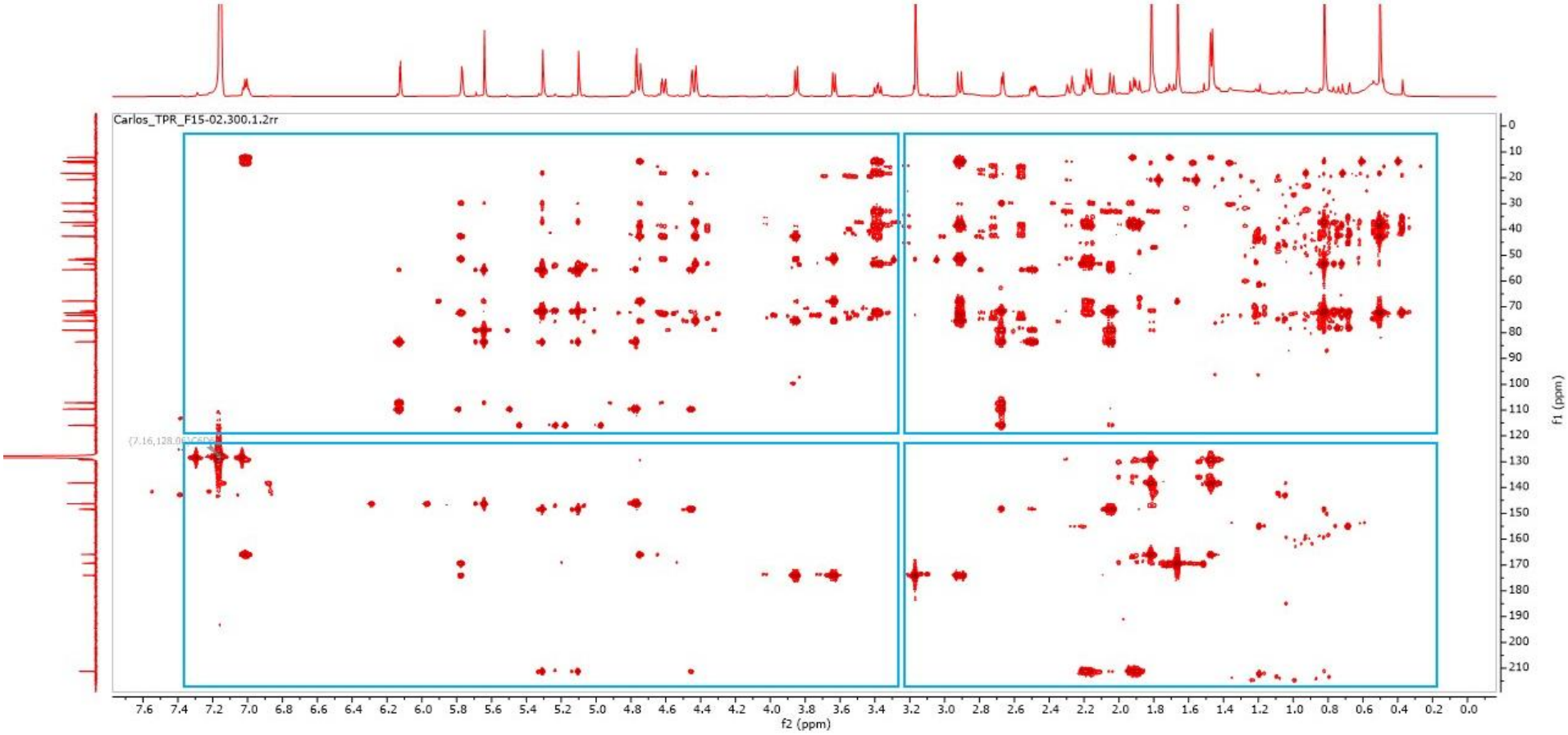


Figura 119 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

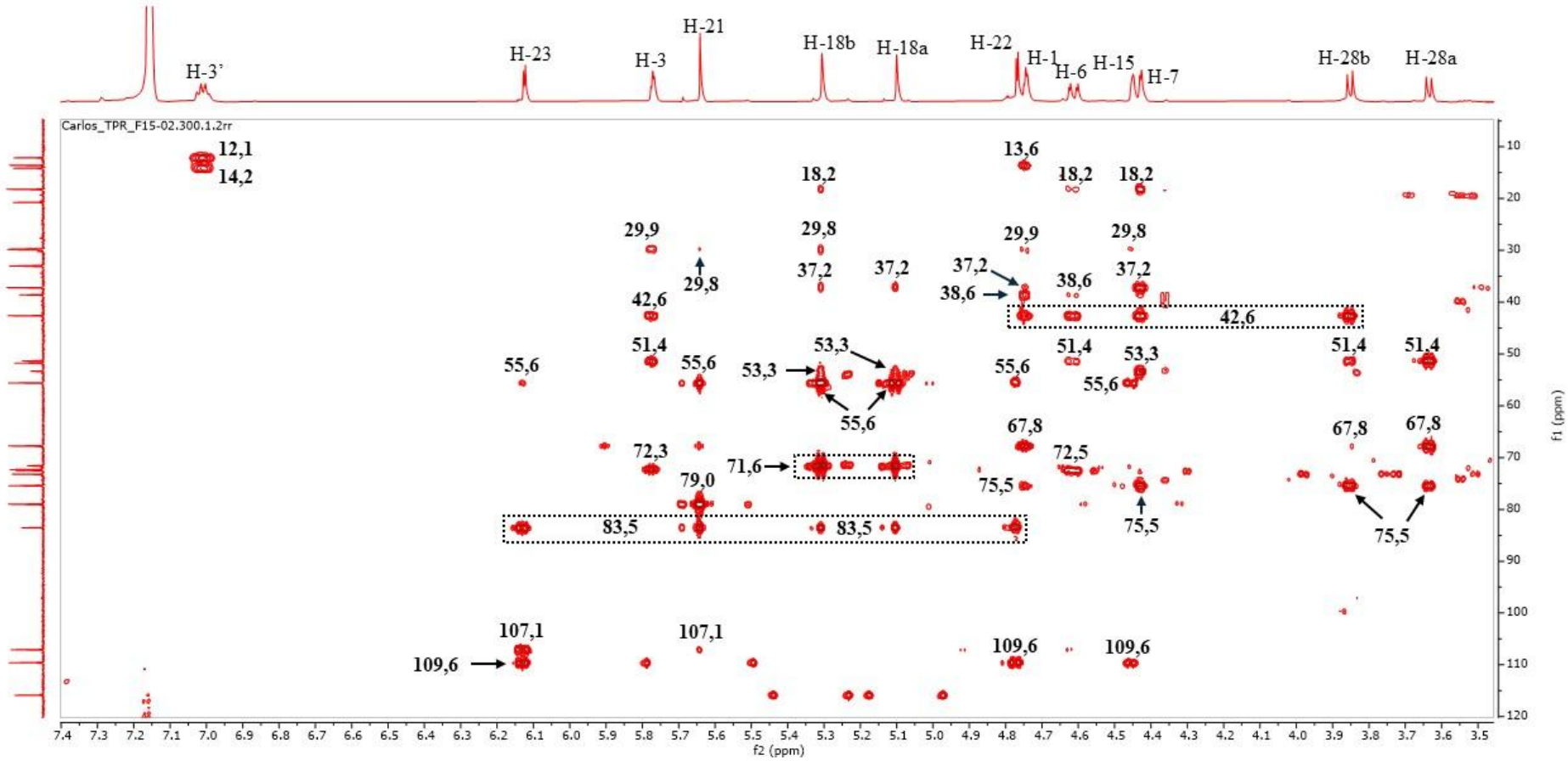


Figura 120 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

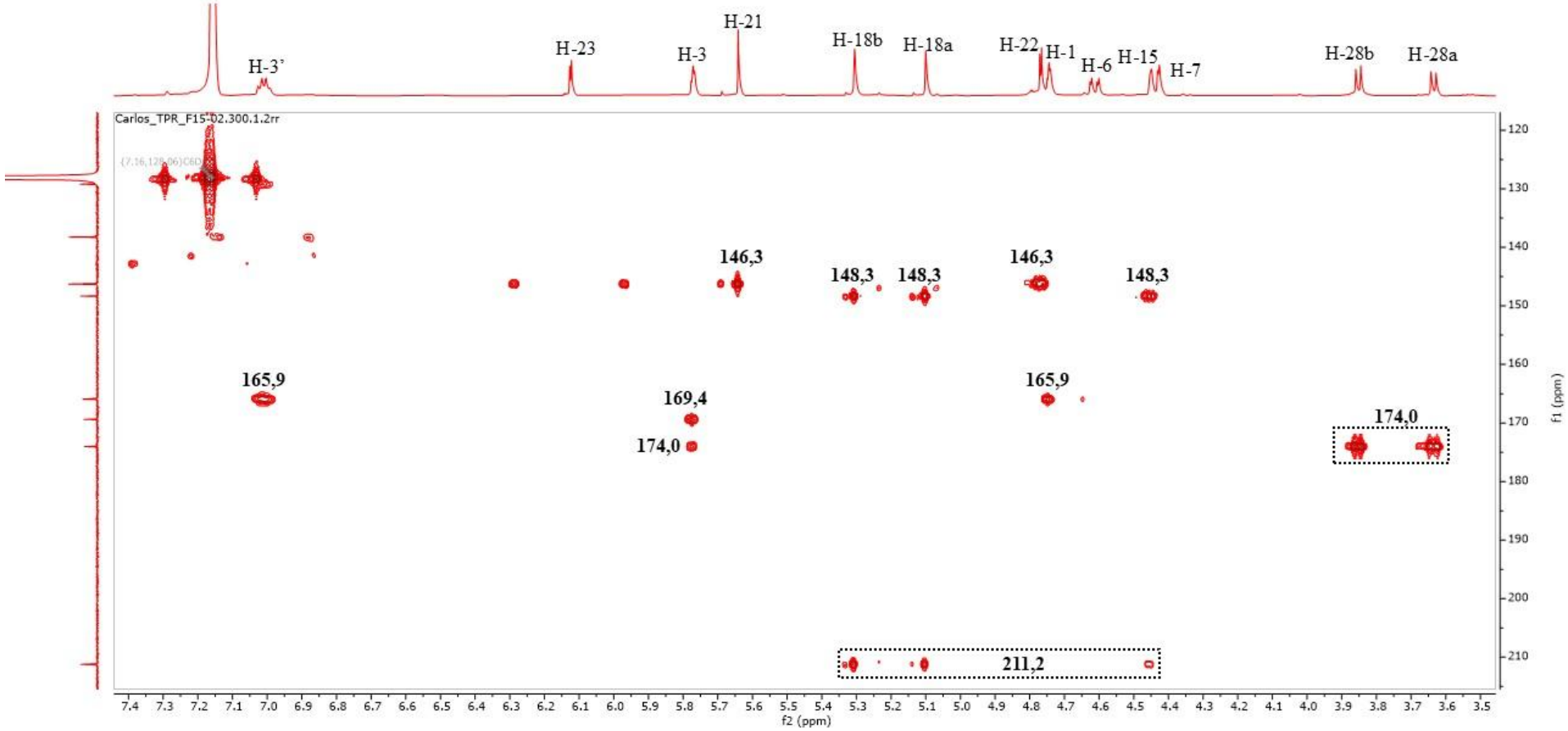


Figura 121 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

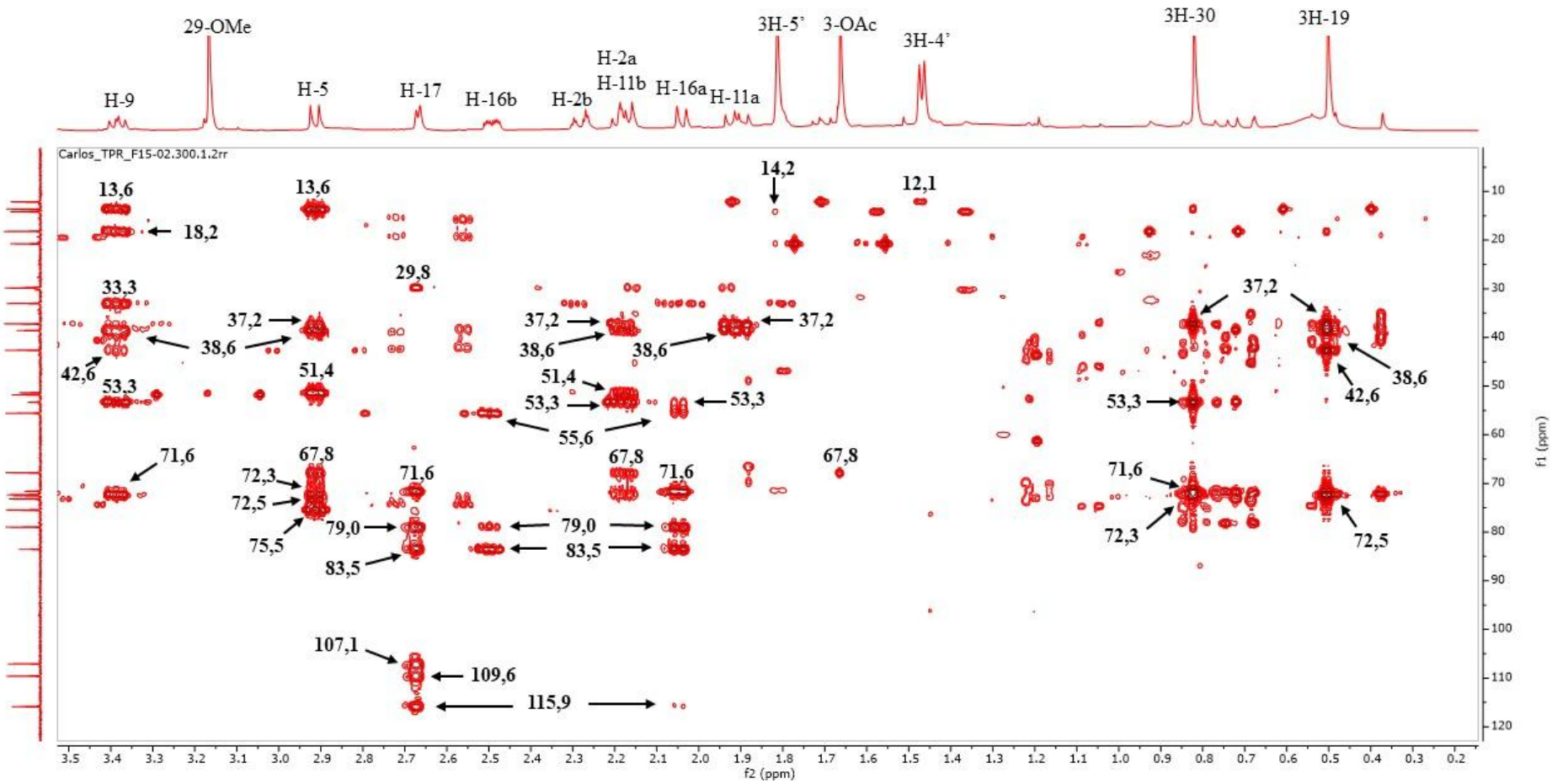


Figura 122 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

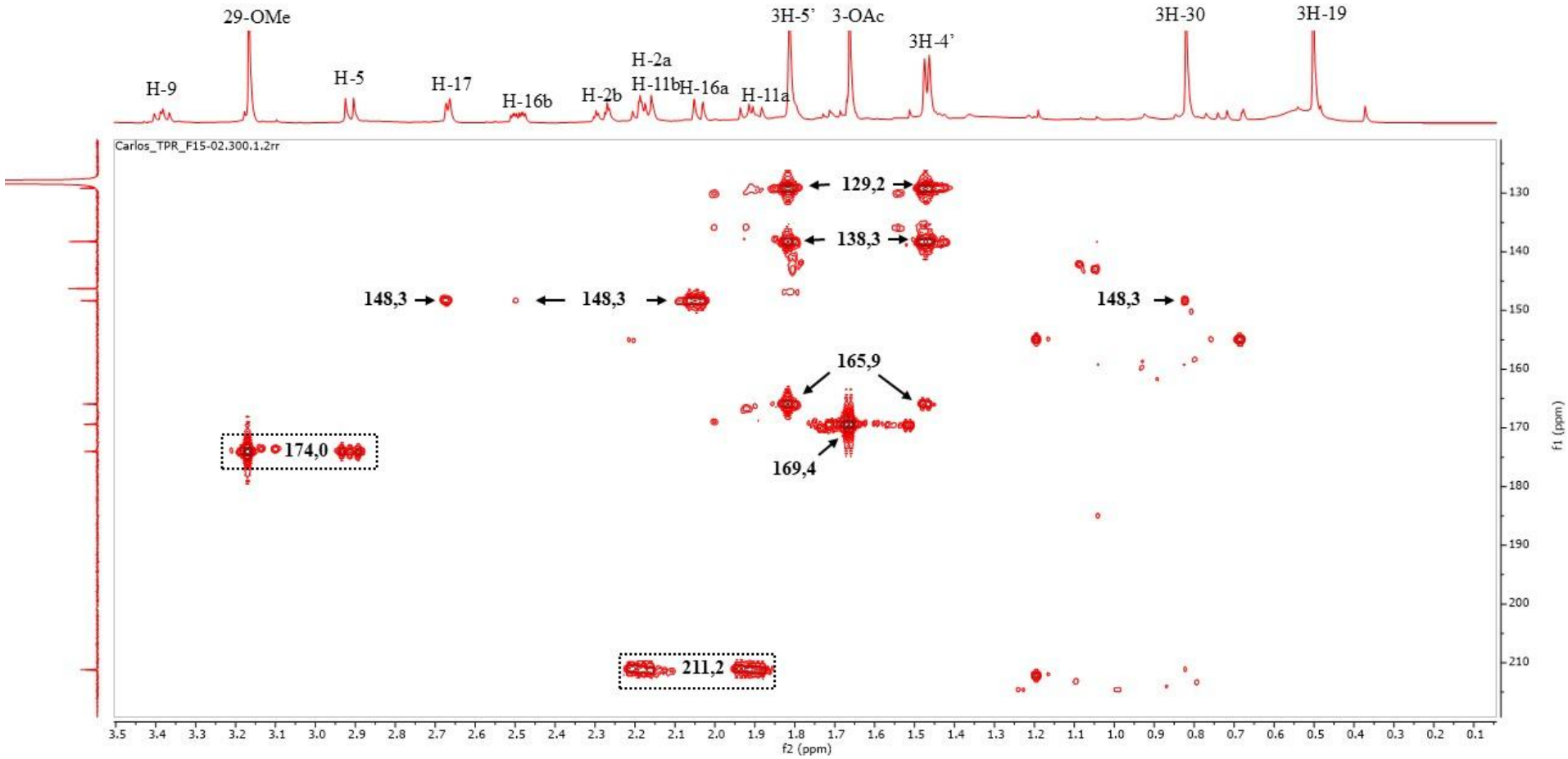


Figura 123 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

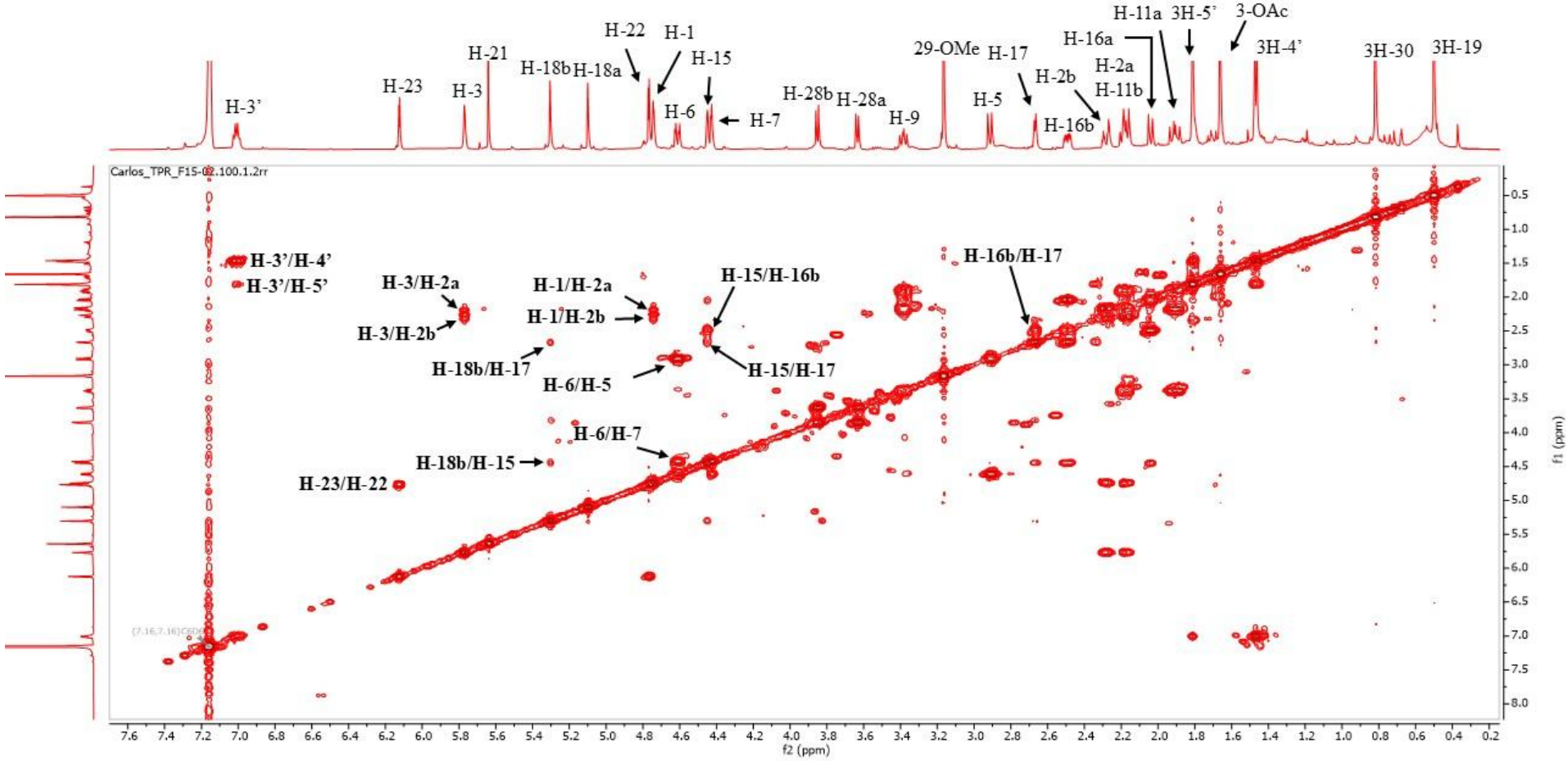


Figura 124 - Mapa de contorno COSY do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

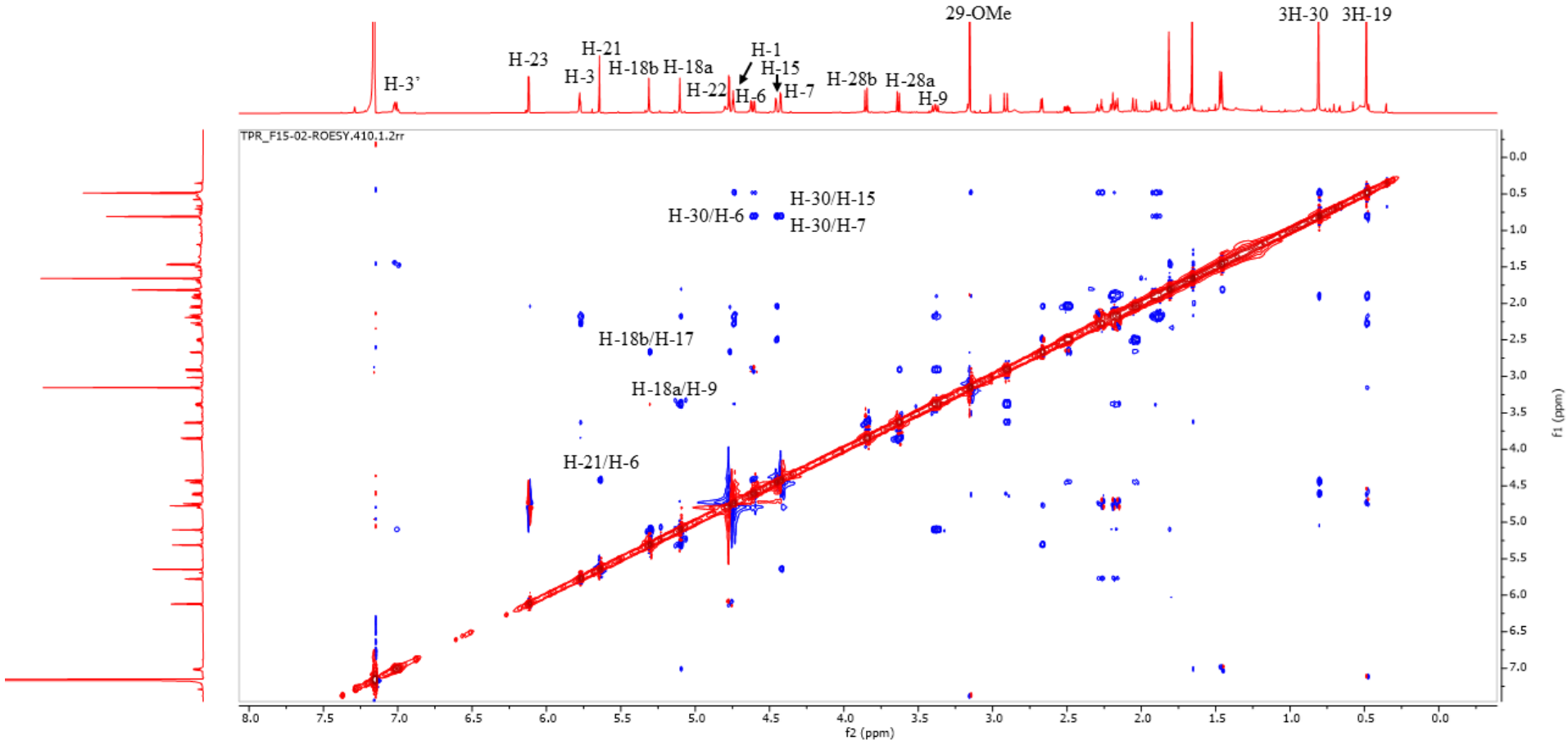
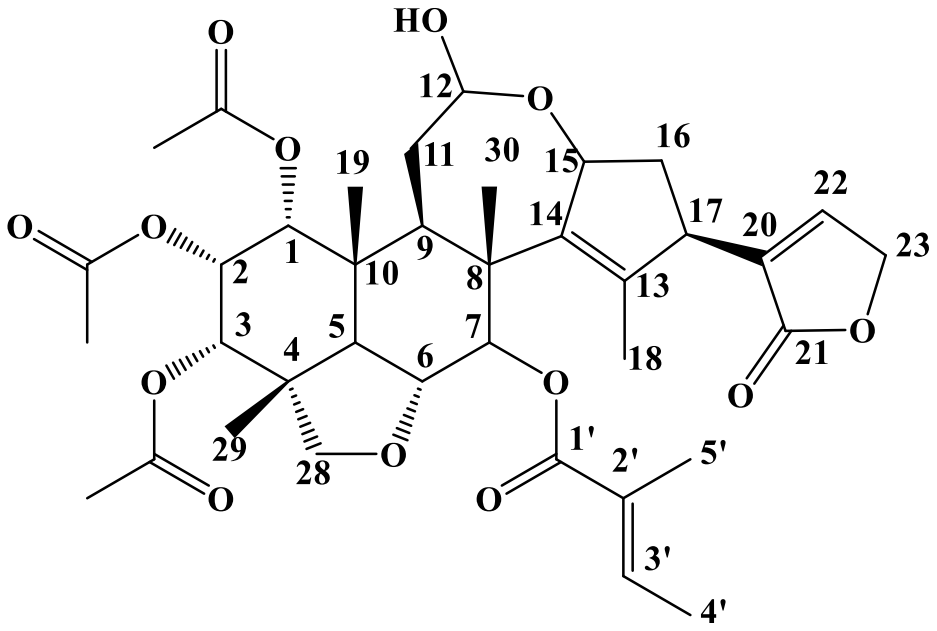


Figura 125 - Mapa de contorno ROESY do limonoide 11 em C_6D_6 (14,1 T).

Substância 12 – Pallidalina C



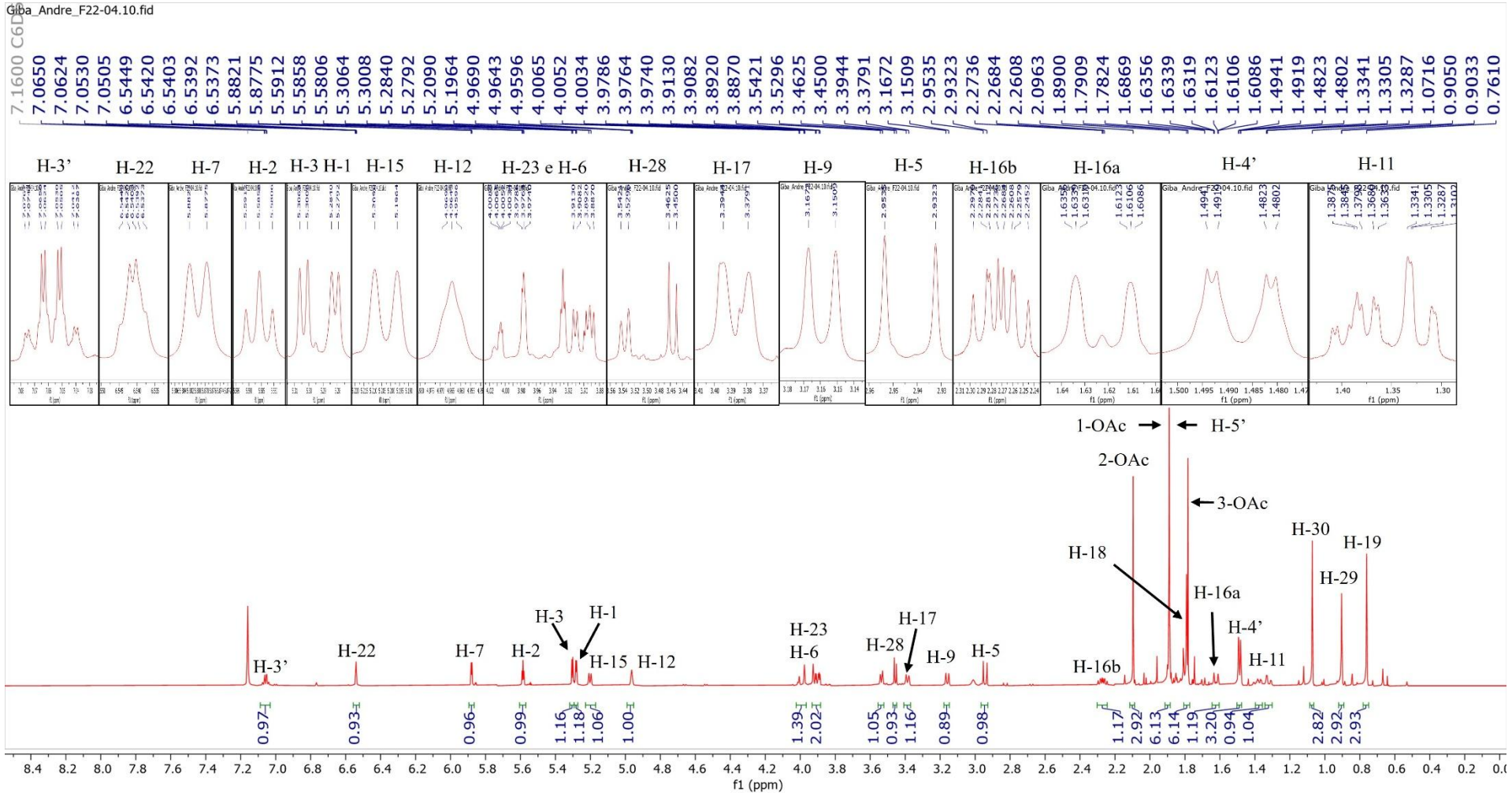


Figura 126 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

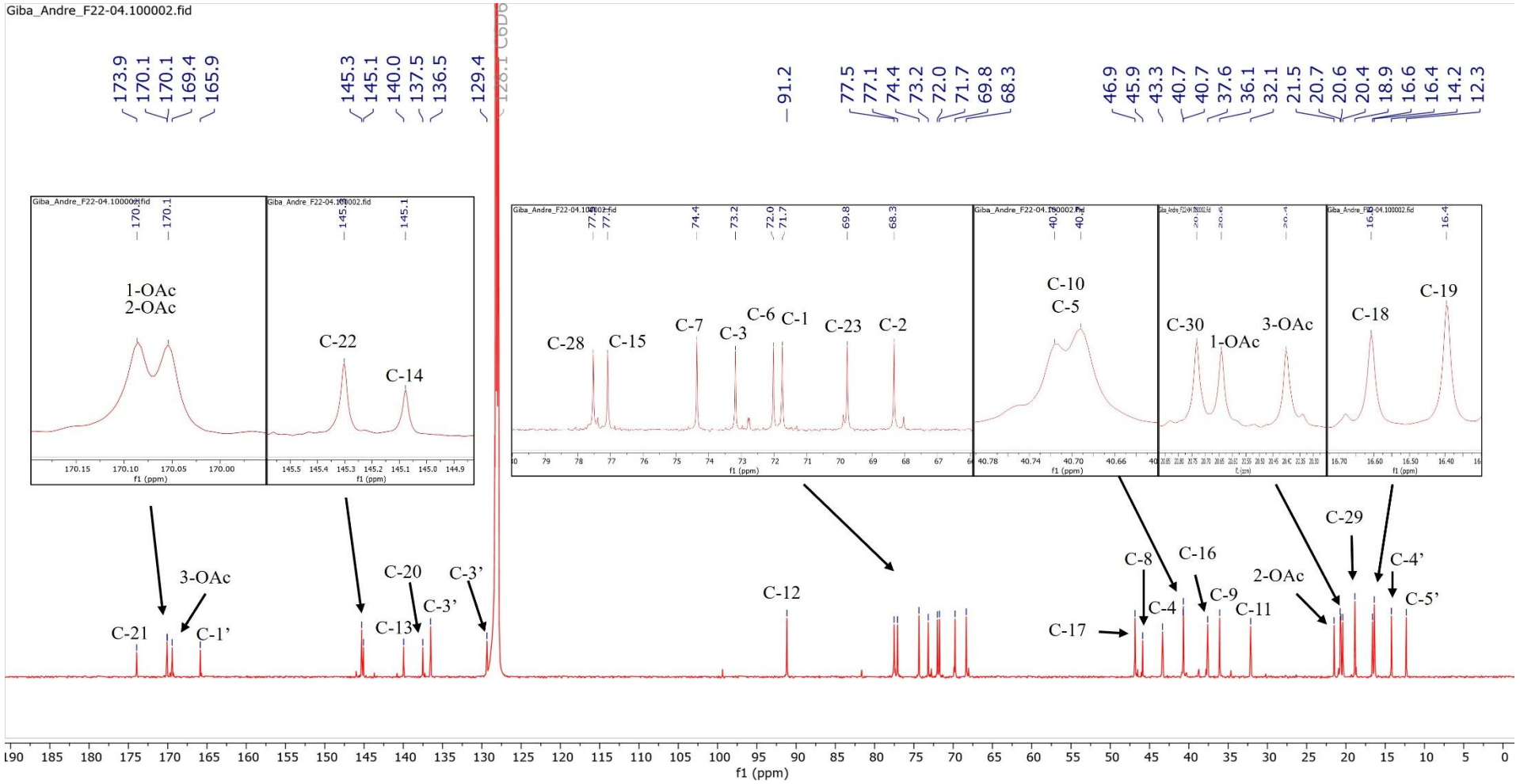


Figura 127 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

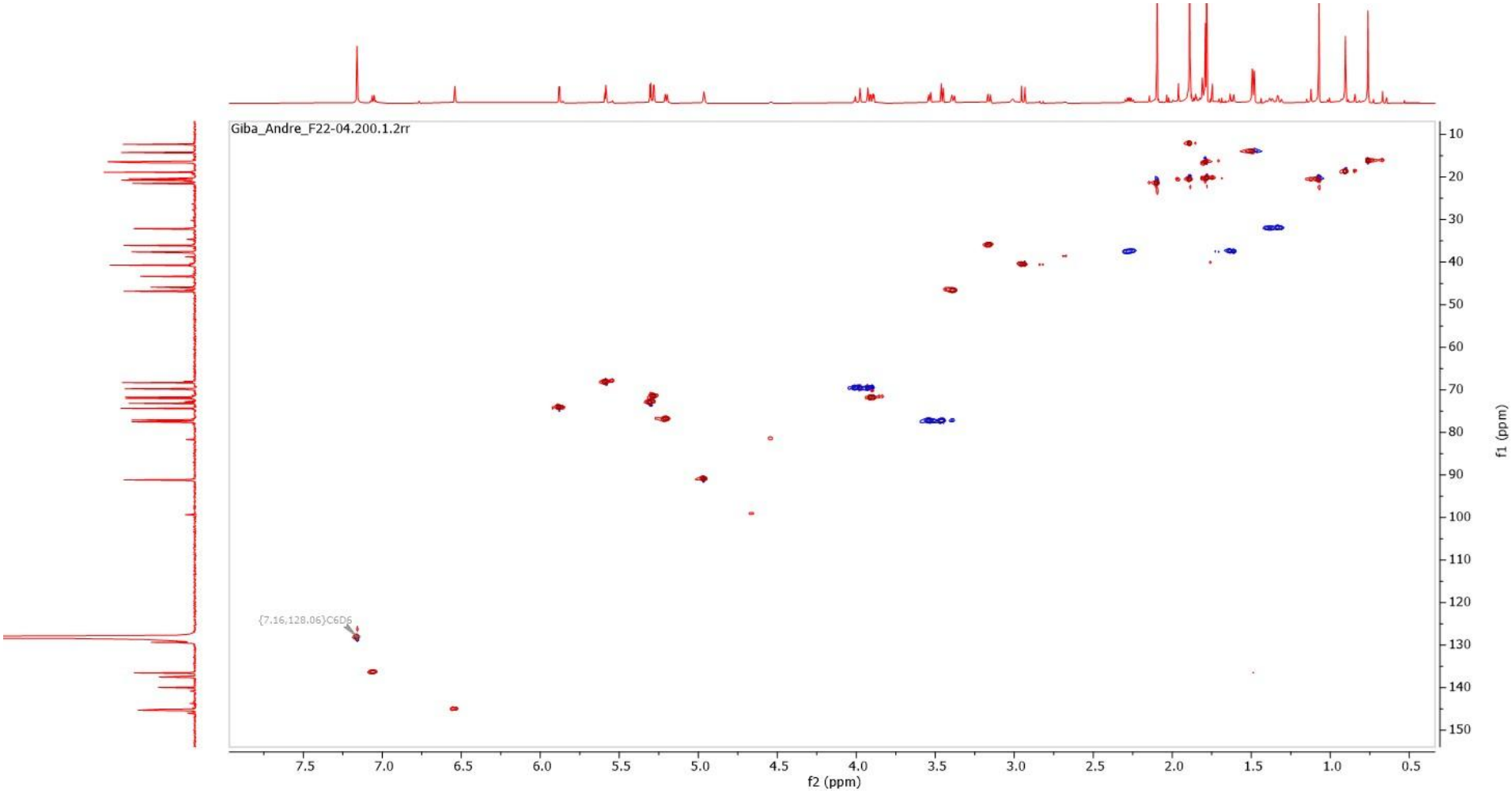


Figura 128 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

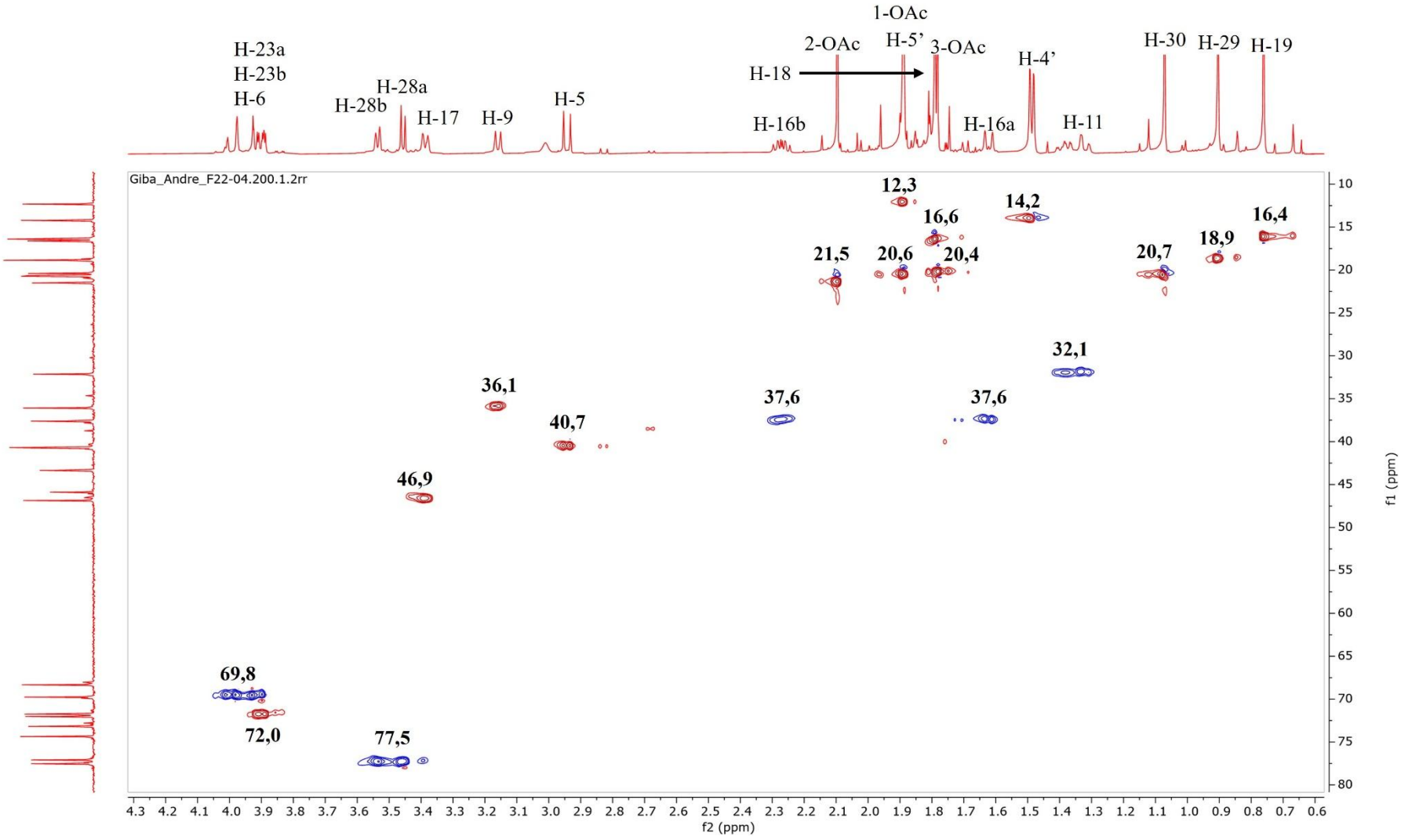


Figura 129 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

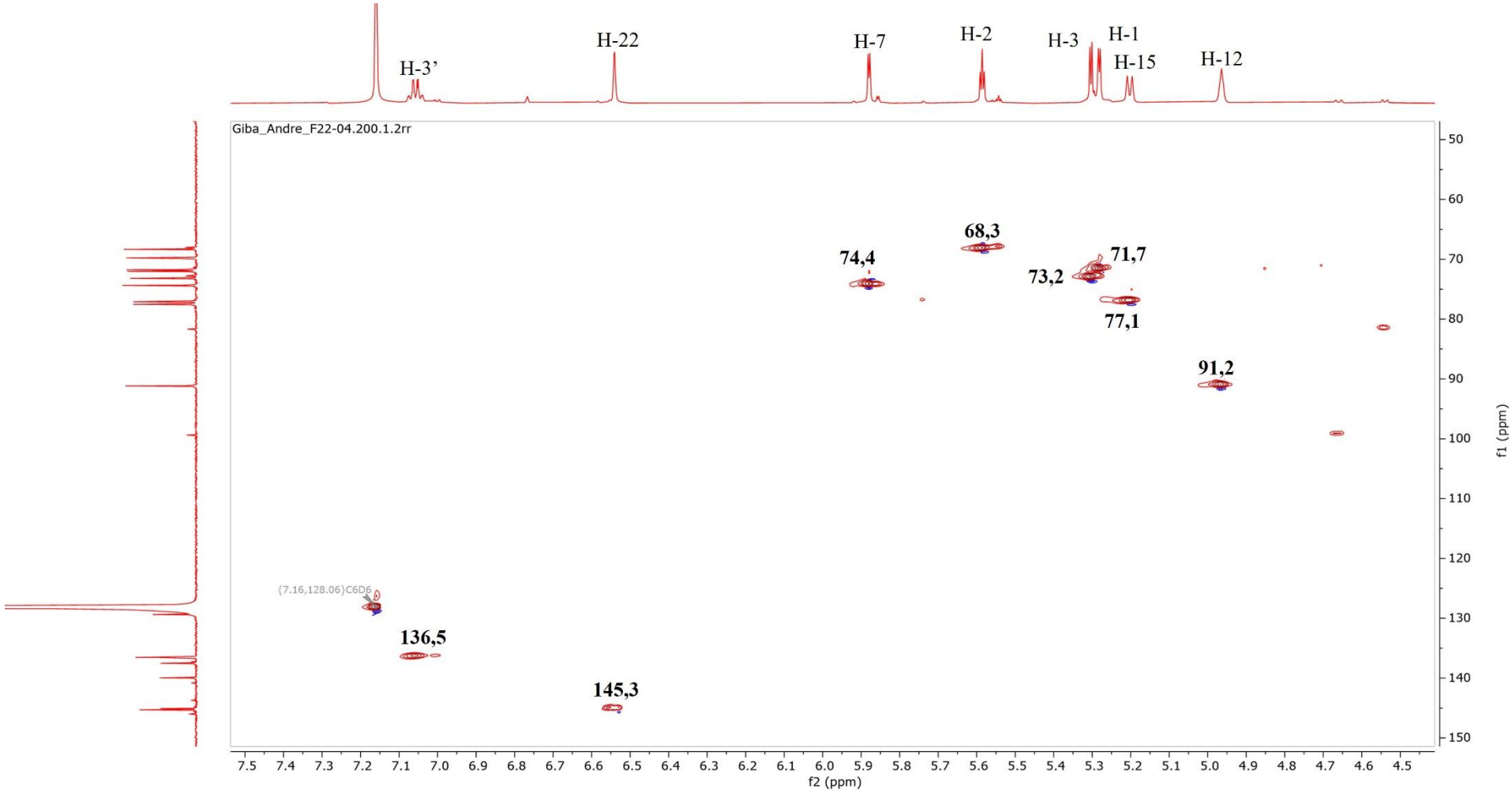


Figura 130 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

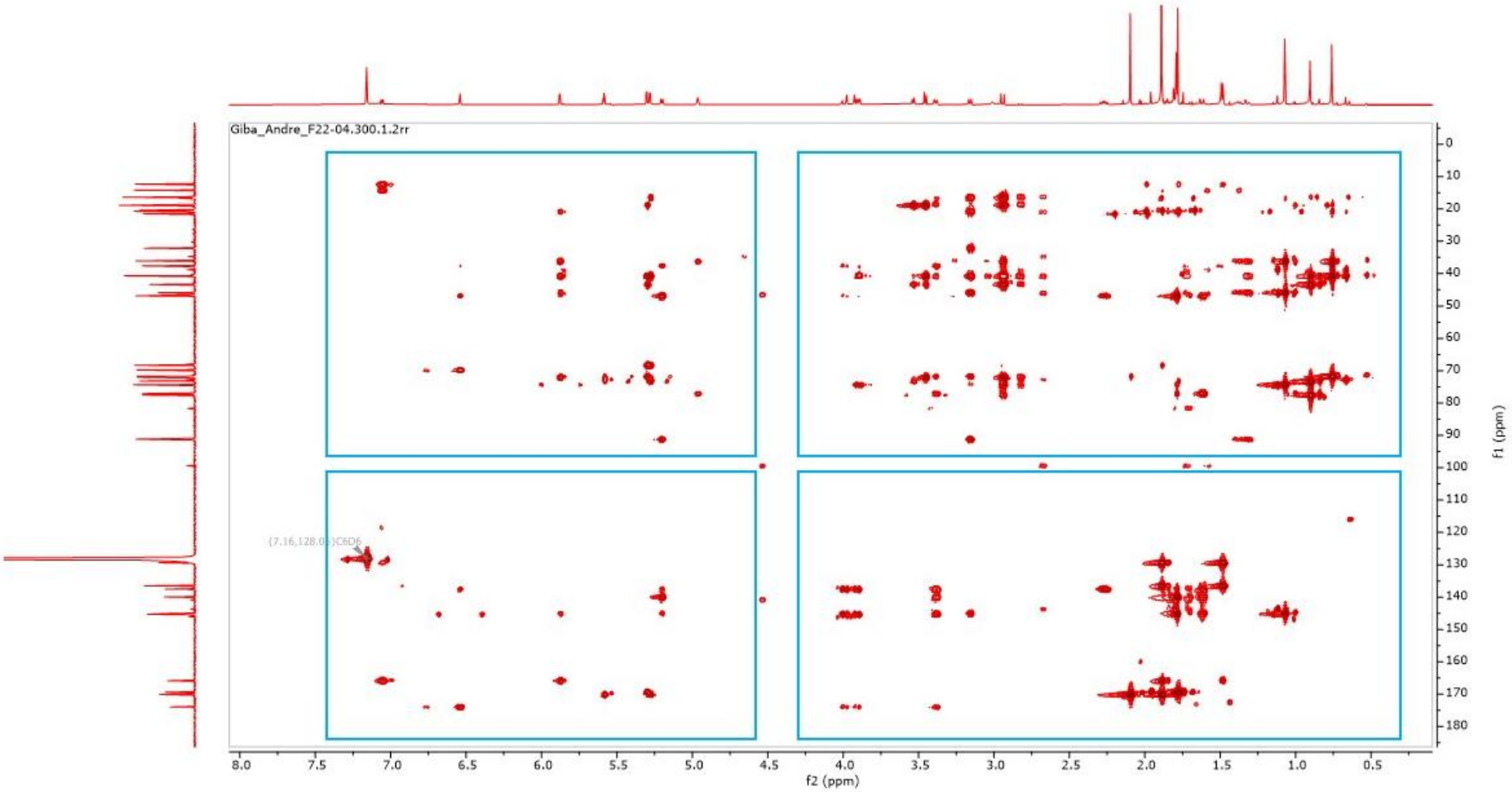


Figura 131 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T). As ampliações estão demonstradas nas páginas seguintes.

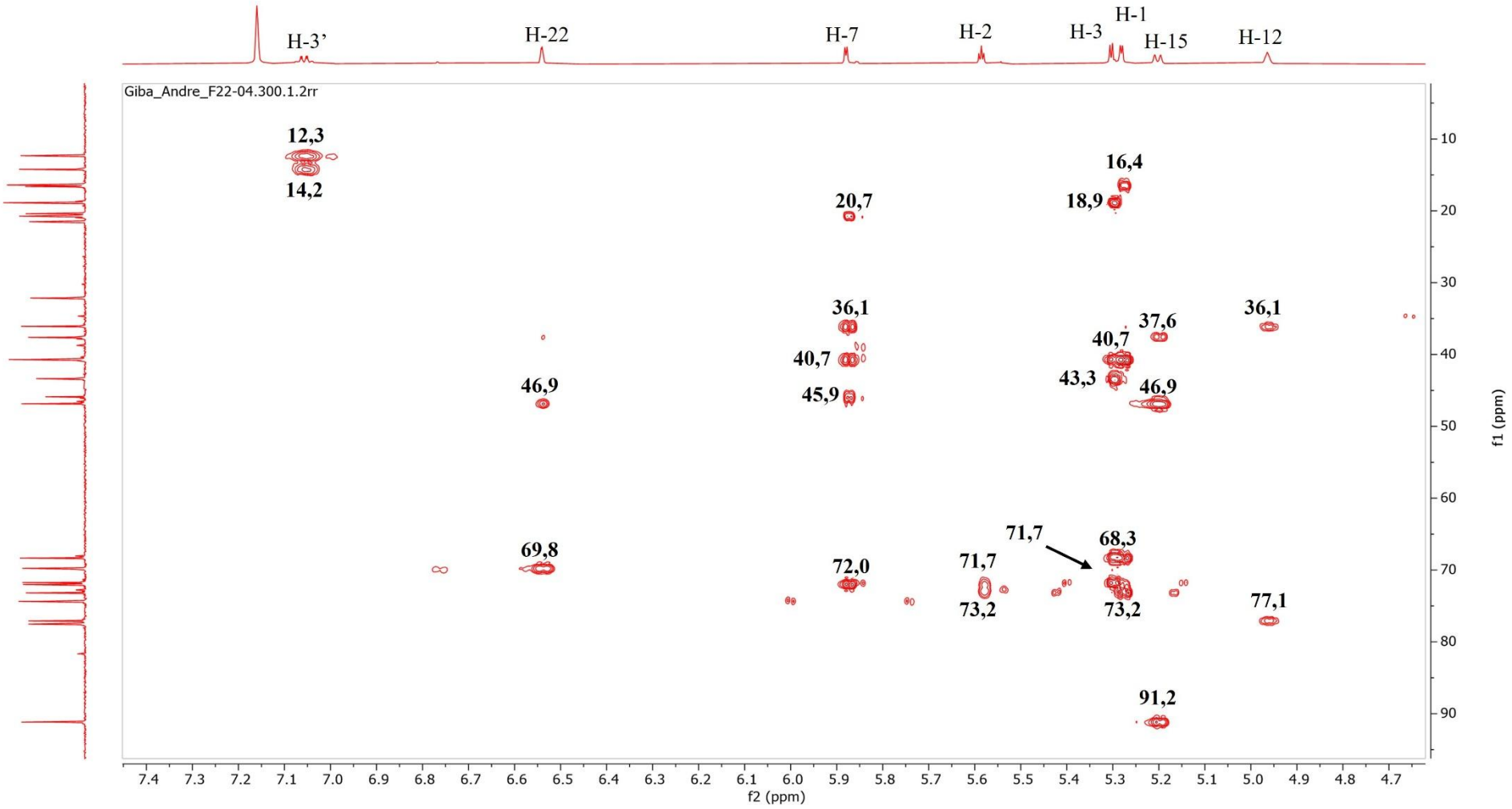


Figura 132 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

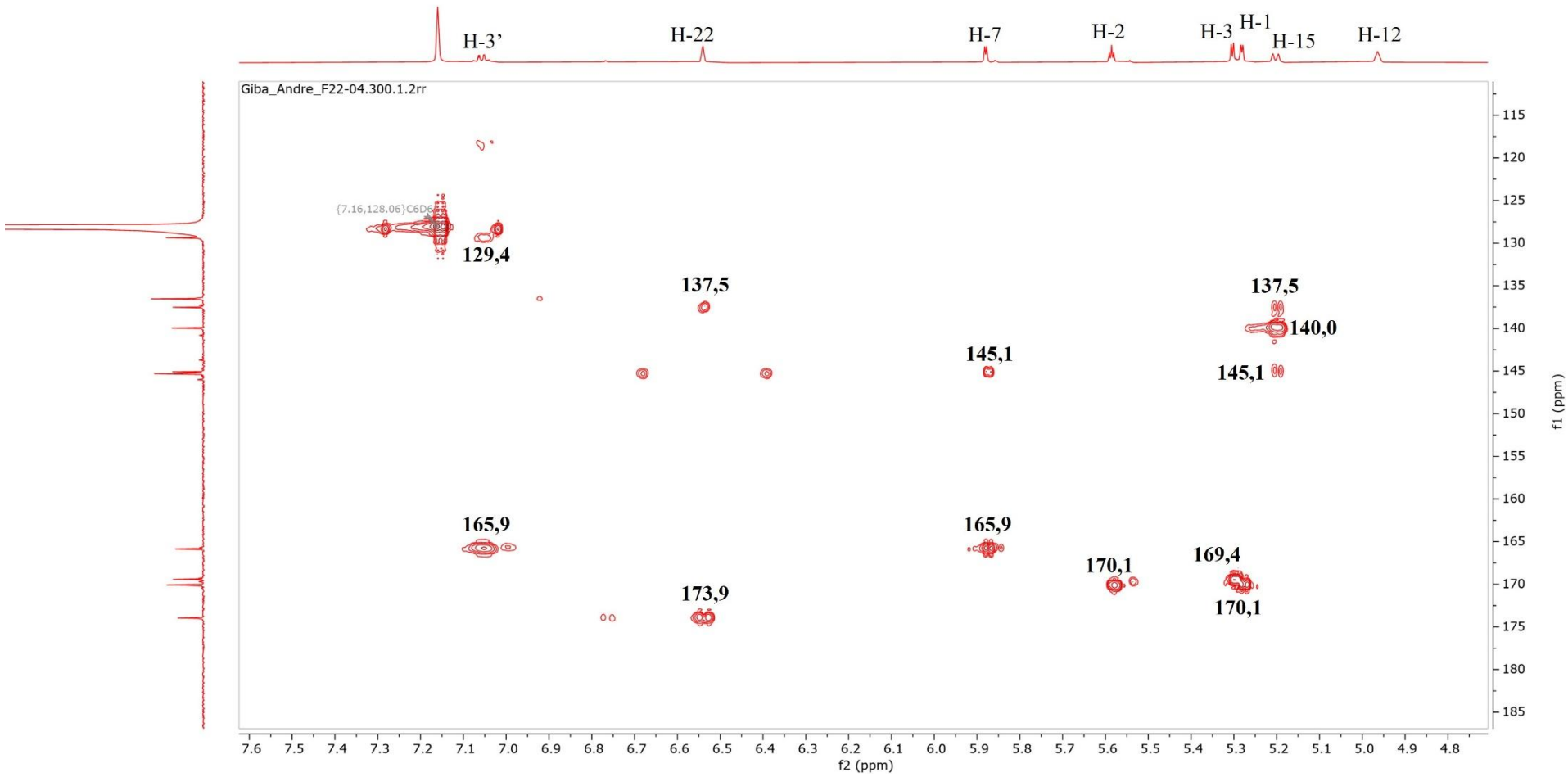


Figura 133 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

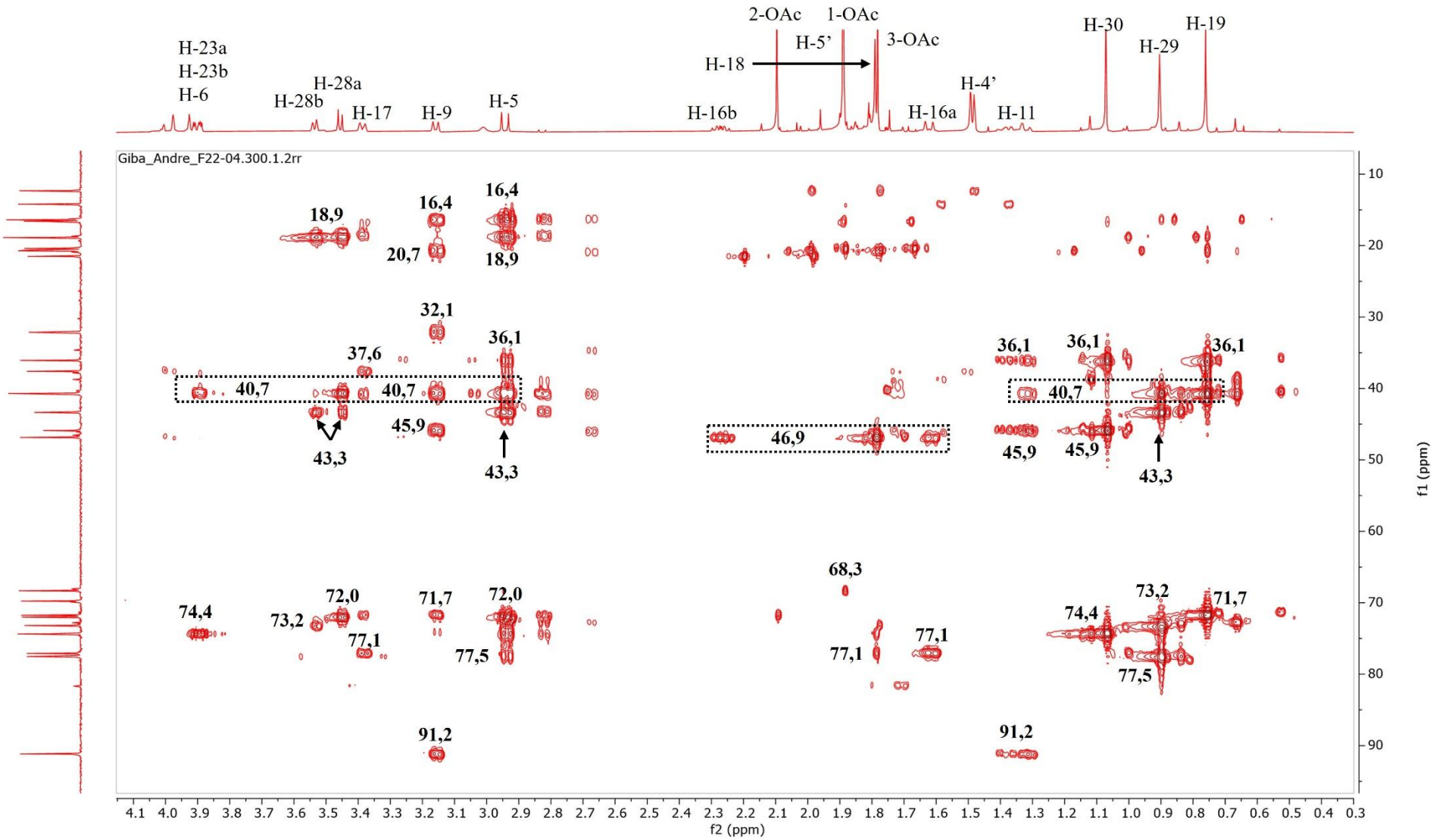


Figura 134 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

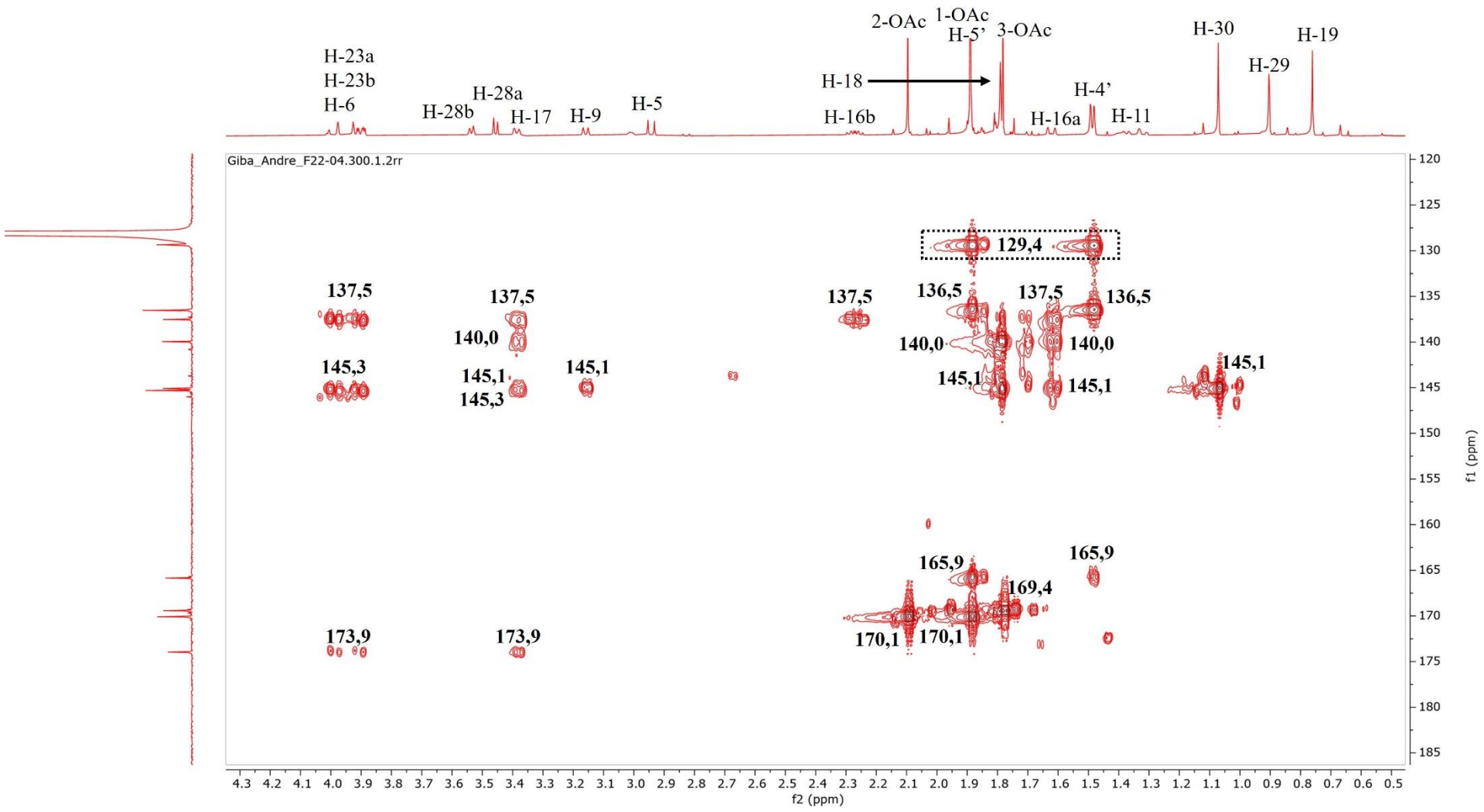


Figura 135 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

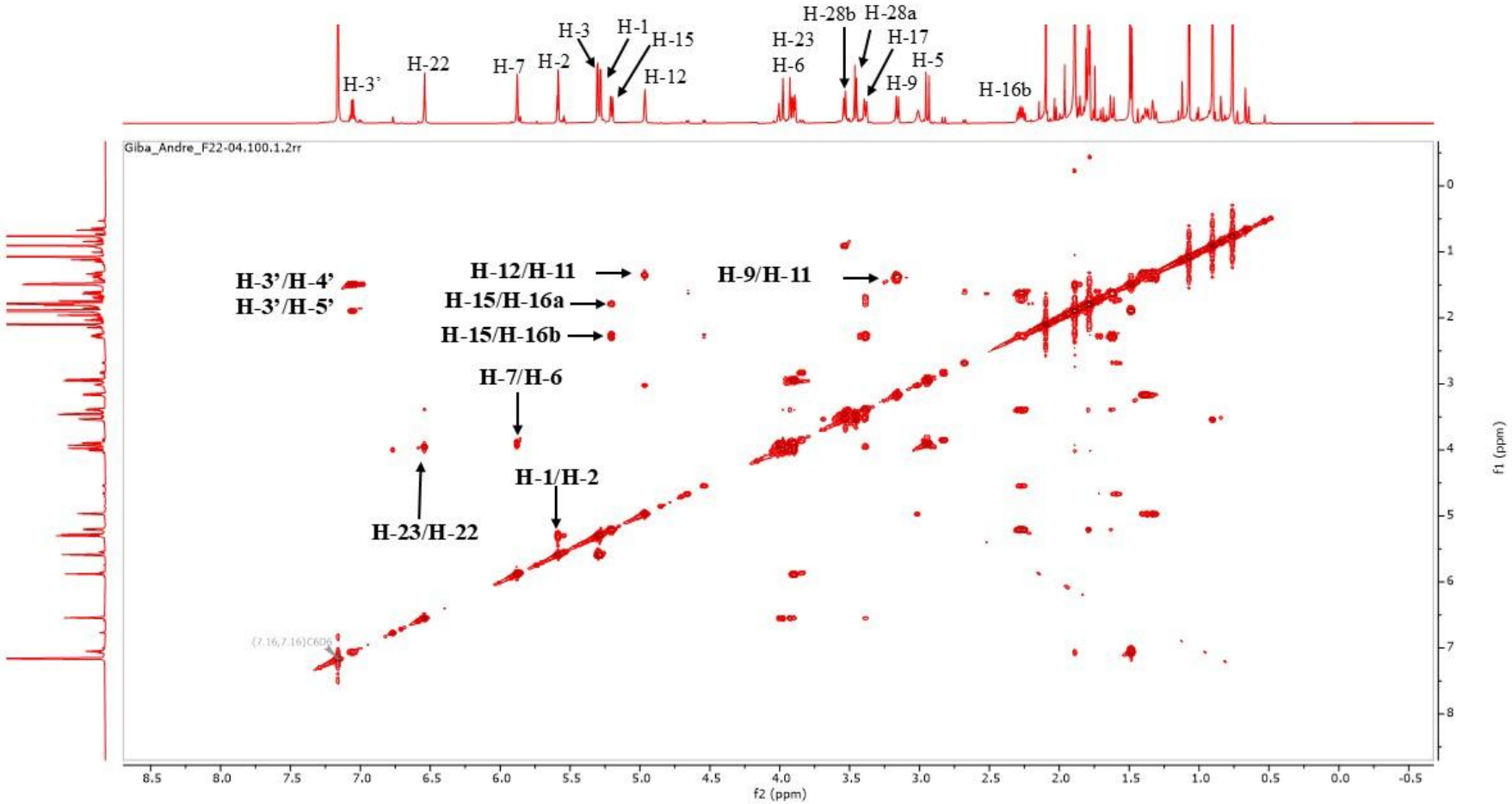
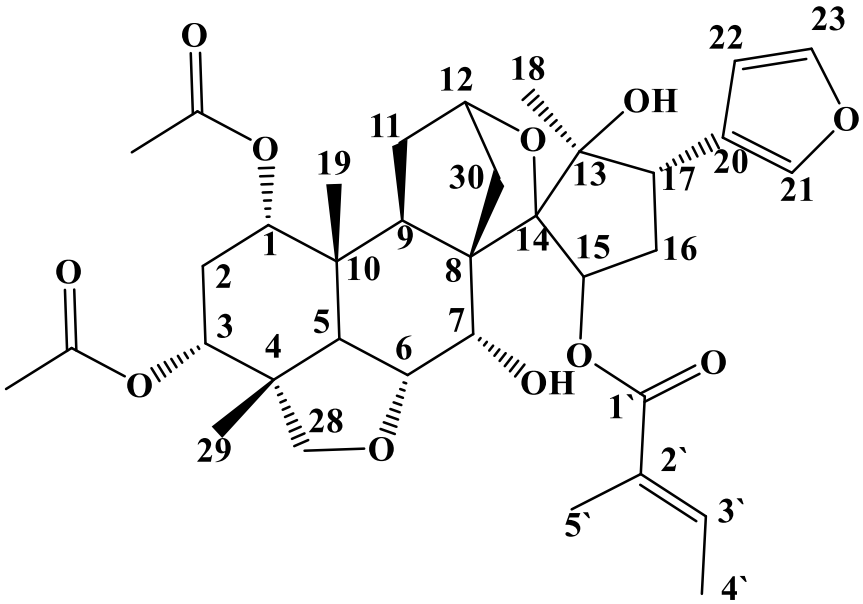


Figura 136 - Mapa de contorno COSY do limonoide 12 em C_6D_6 (14,1 T).

Substância 13 – Spirosendan



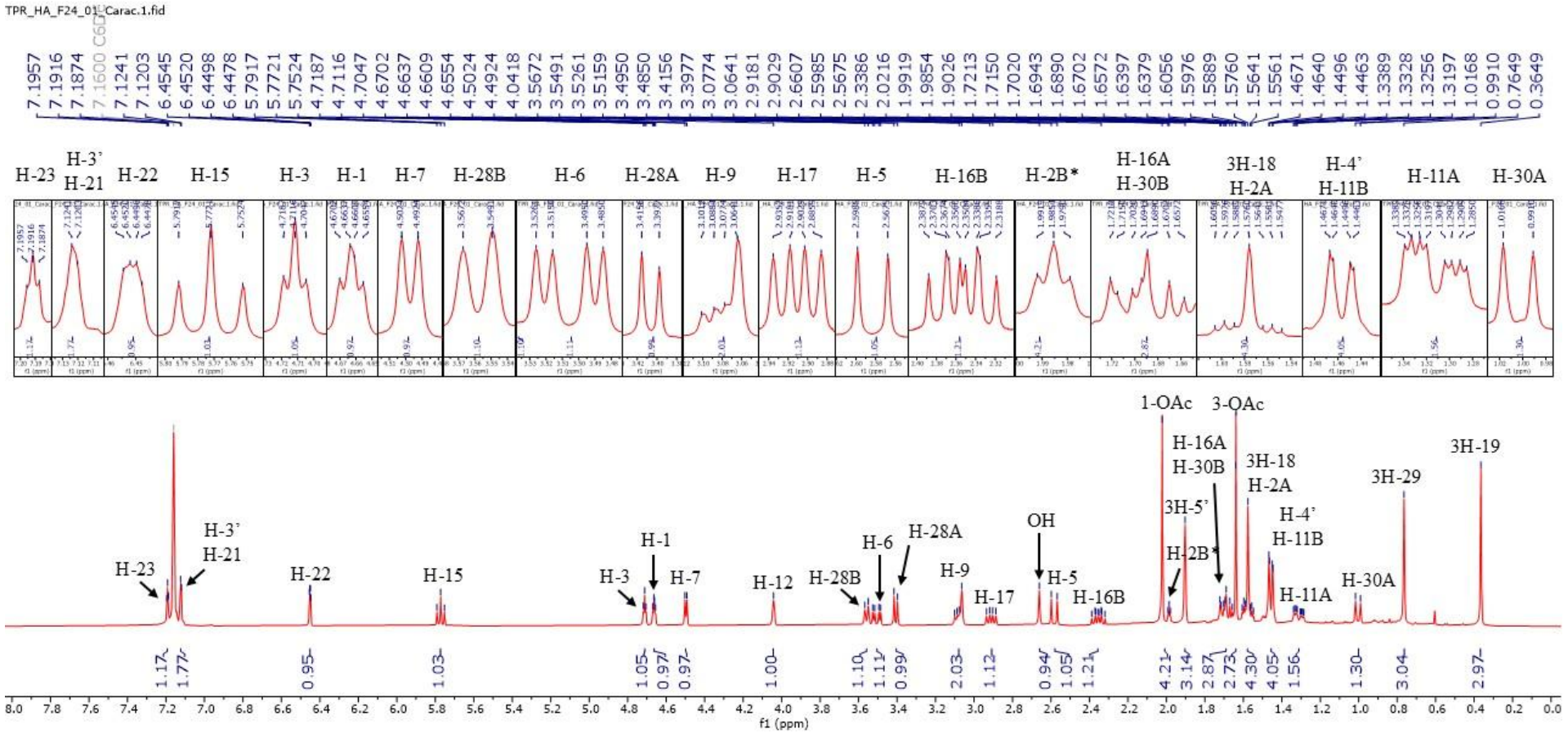


Figura 137 - Espectro de RMN de ^{1}H do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).

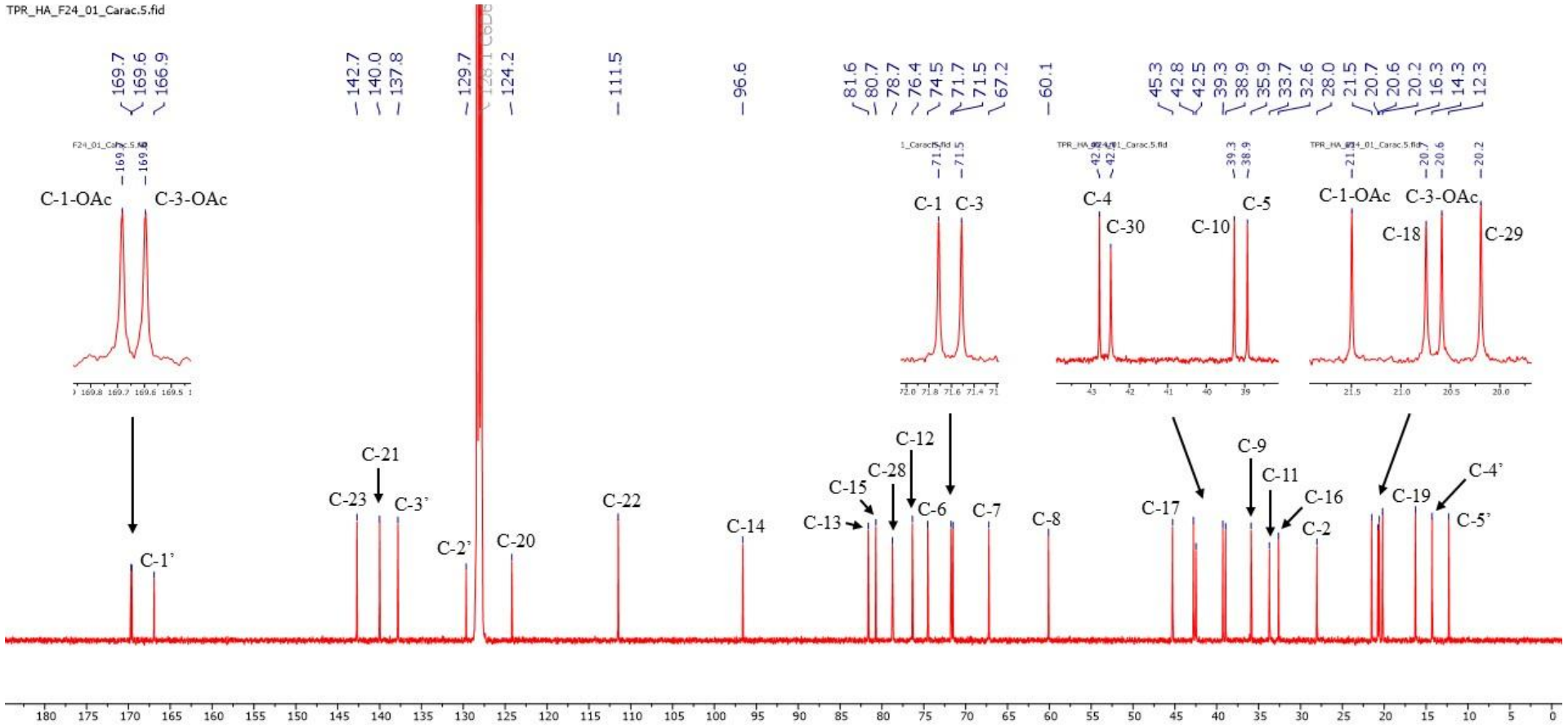


Figura 138 - Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).

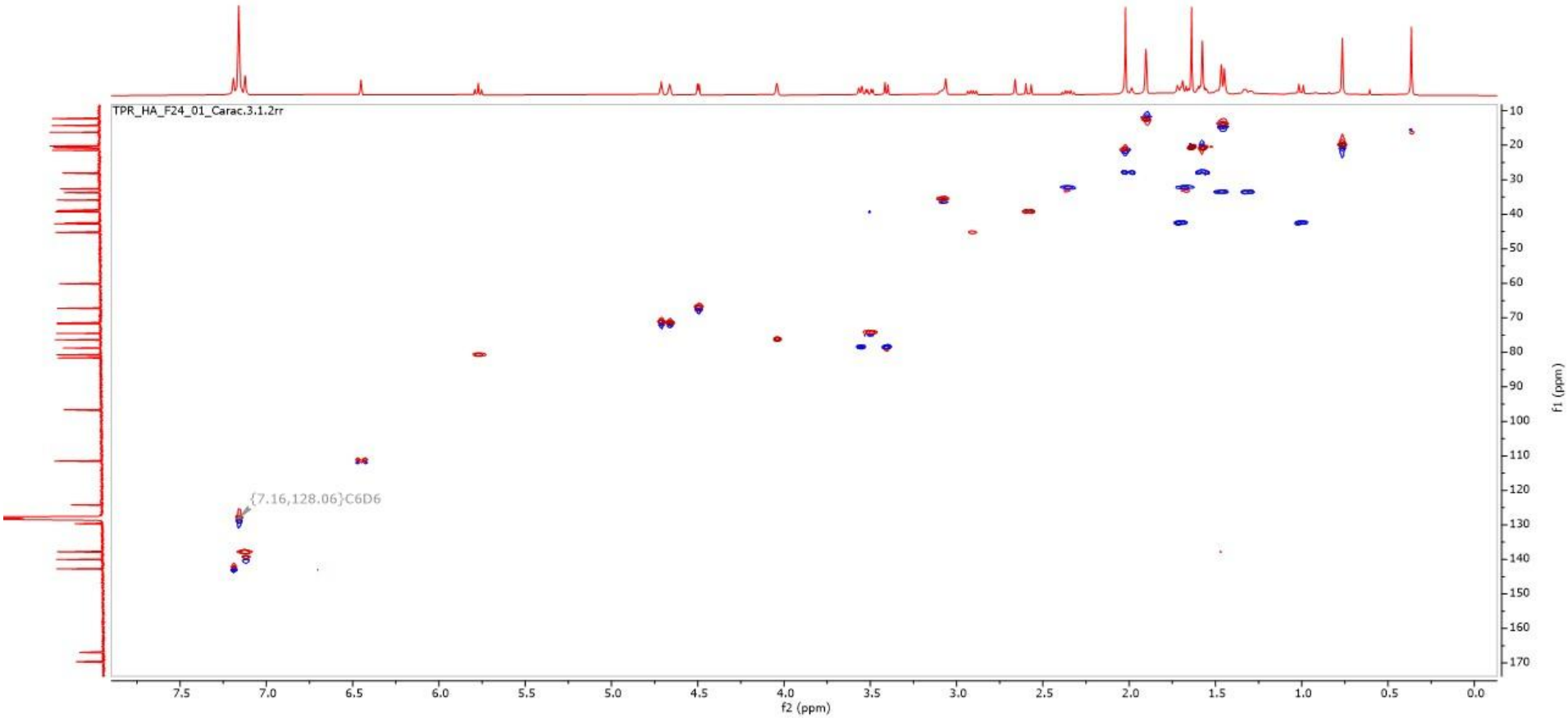


Figura 139 - Mapa de contorno HSQC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).

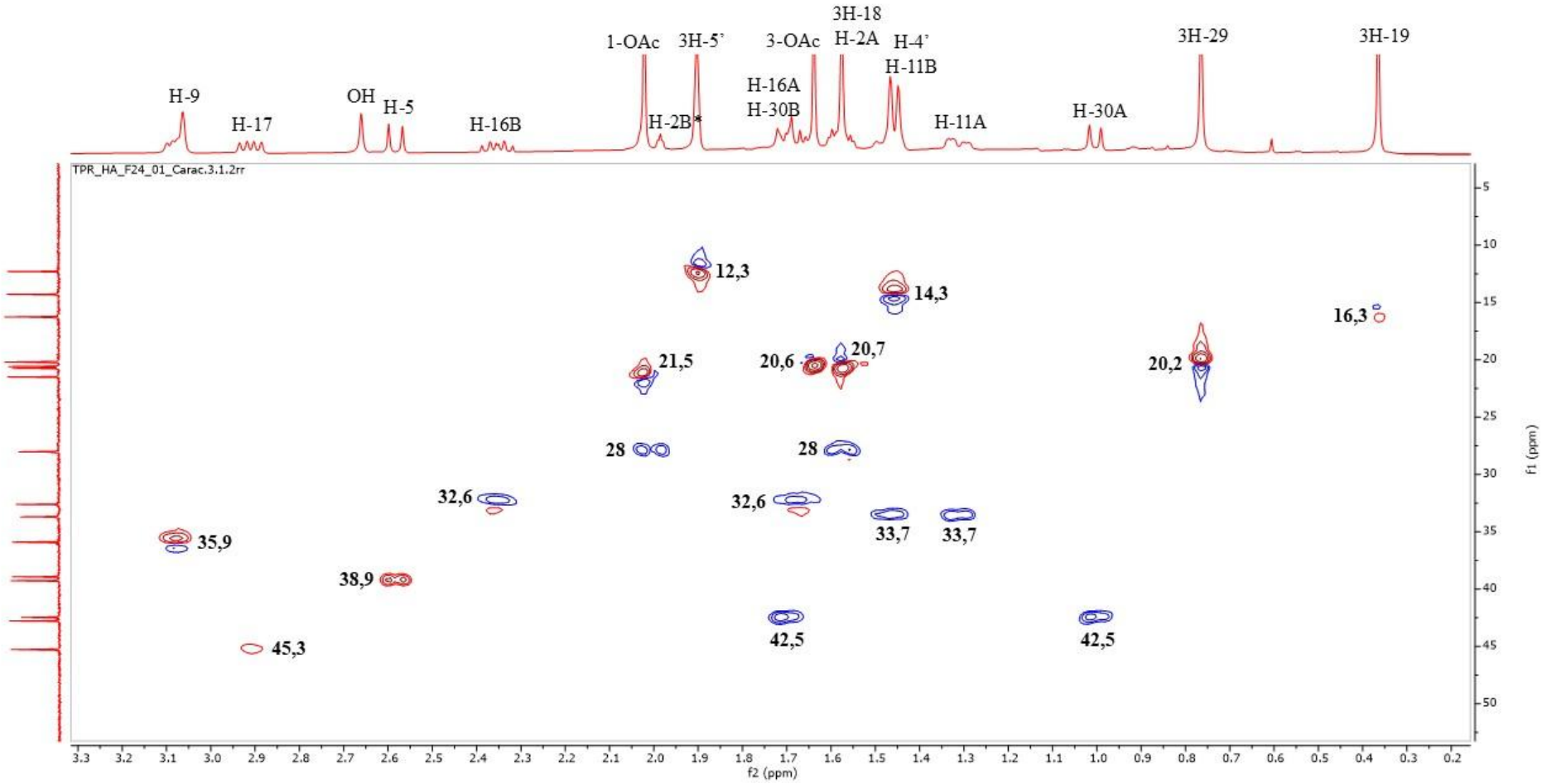


Figura 140 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).

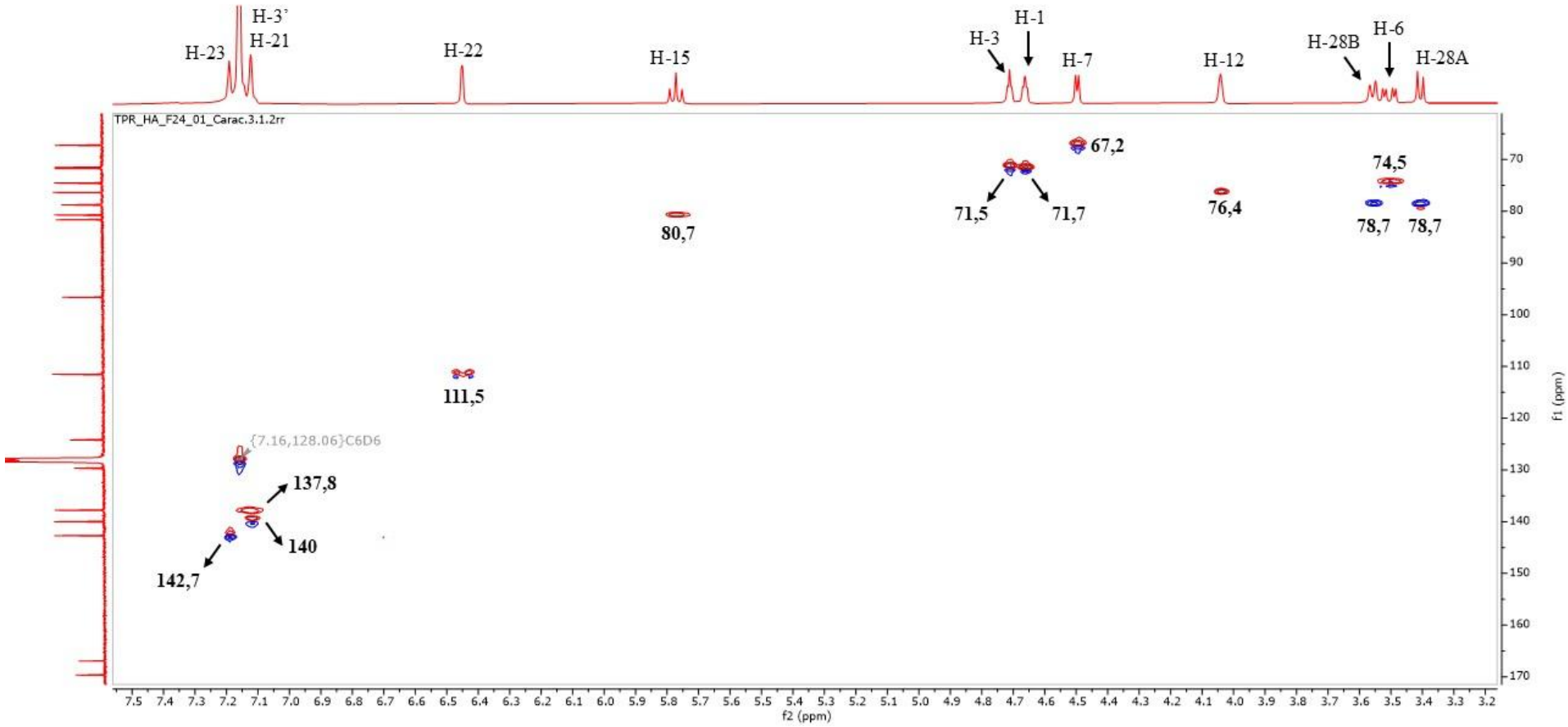


Figura 141 - Ampliação do mapa de contorno HSQC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).

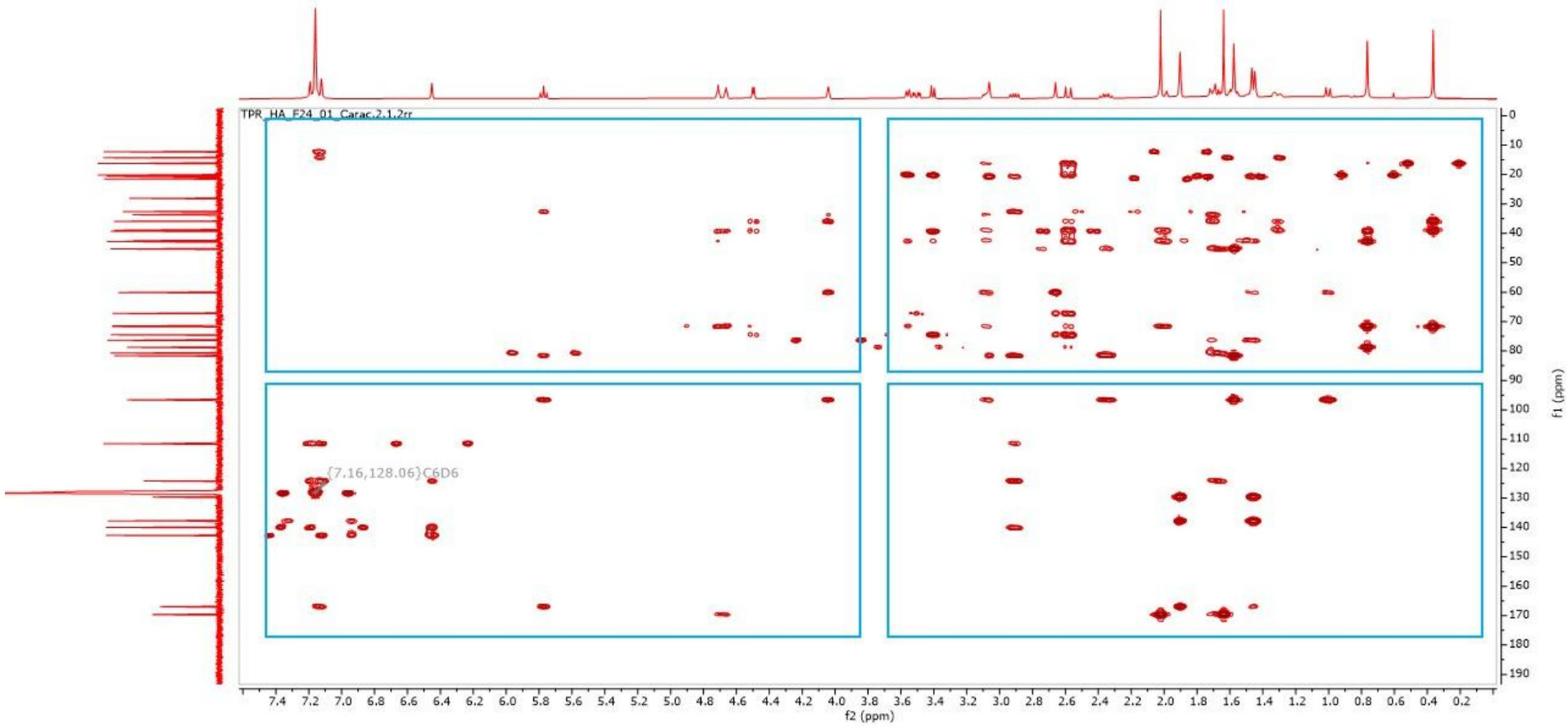


Figura 142 - Mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T). As áreas selecionadas representam as ampliações demonstradas nas páginas seguintes.

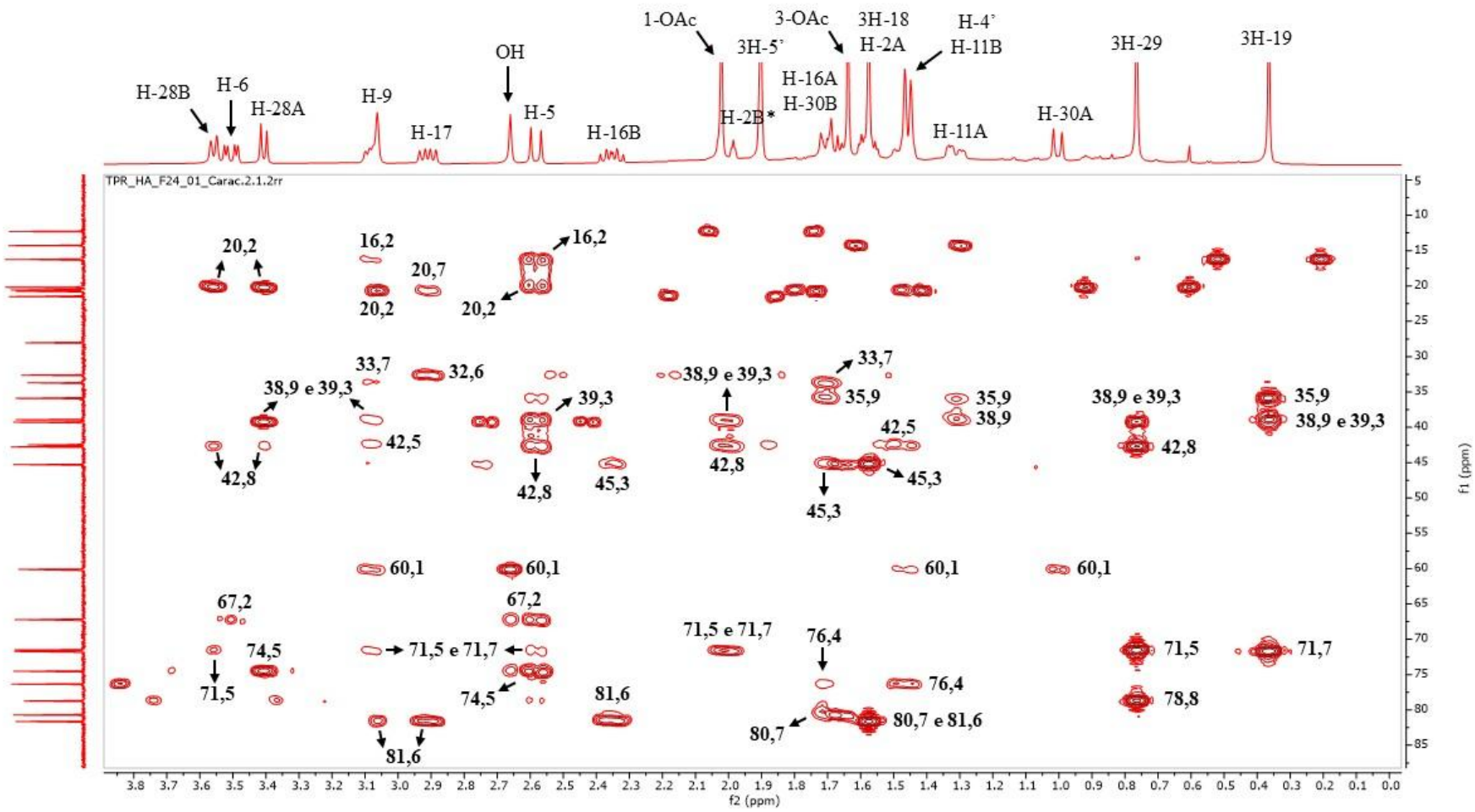


Figura 143 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).

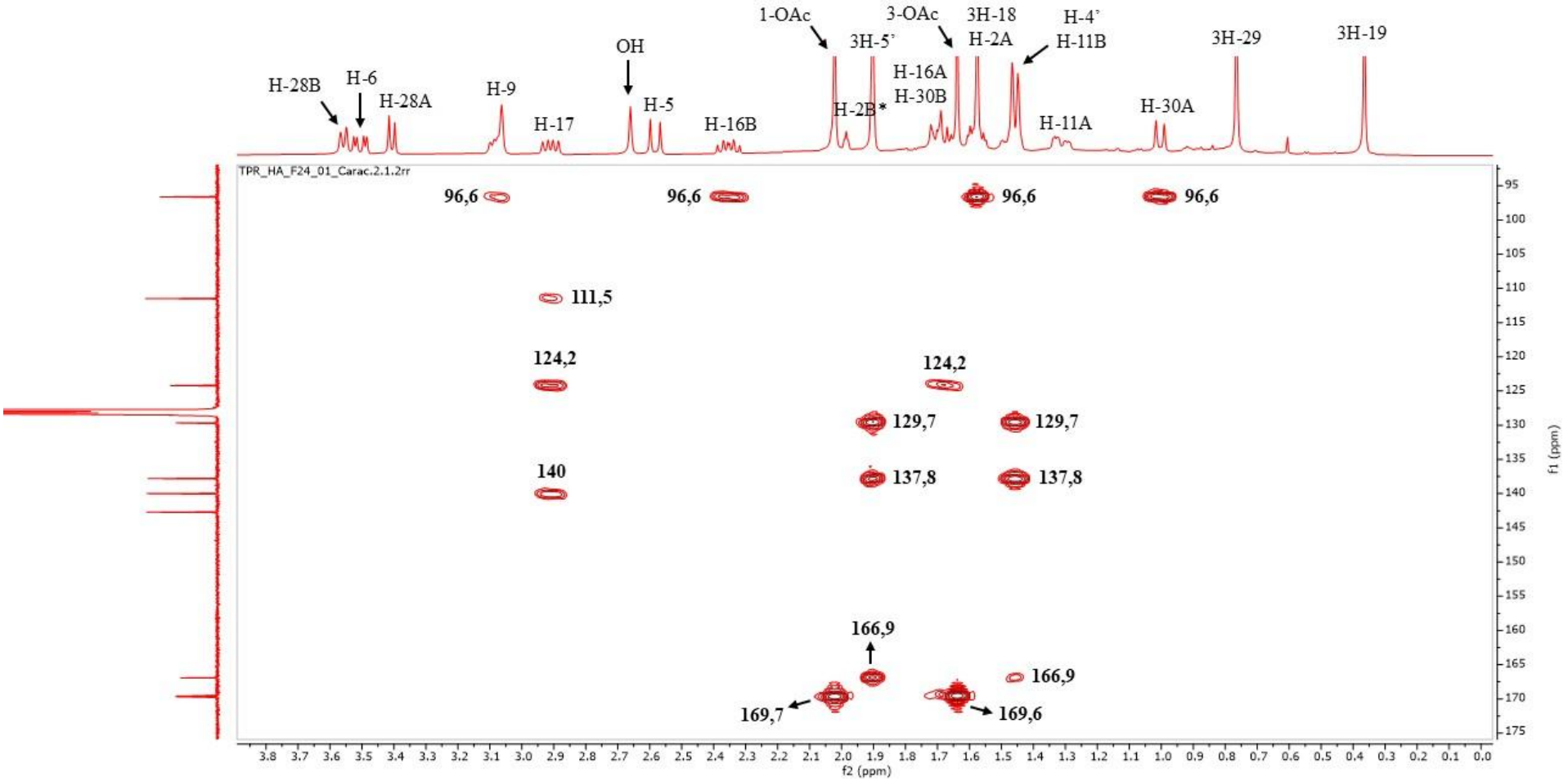


Figura 144 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).

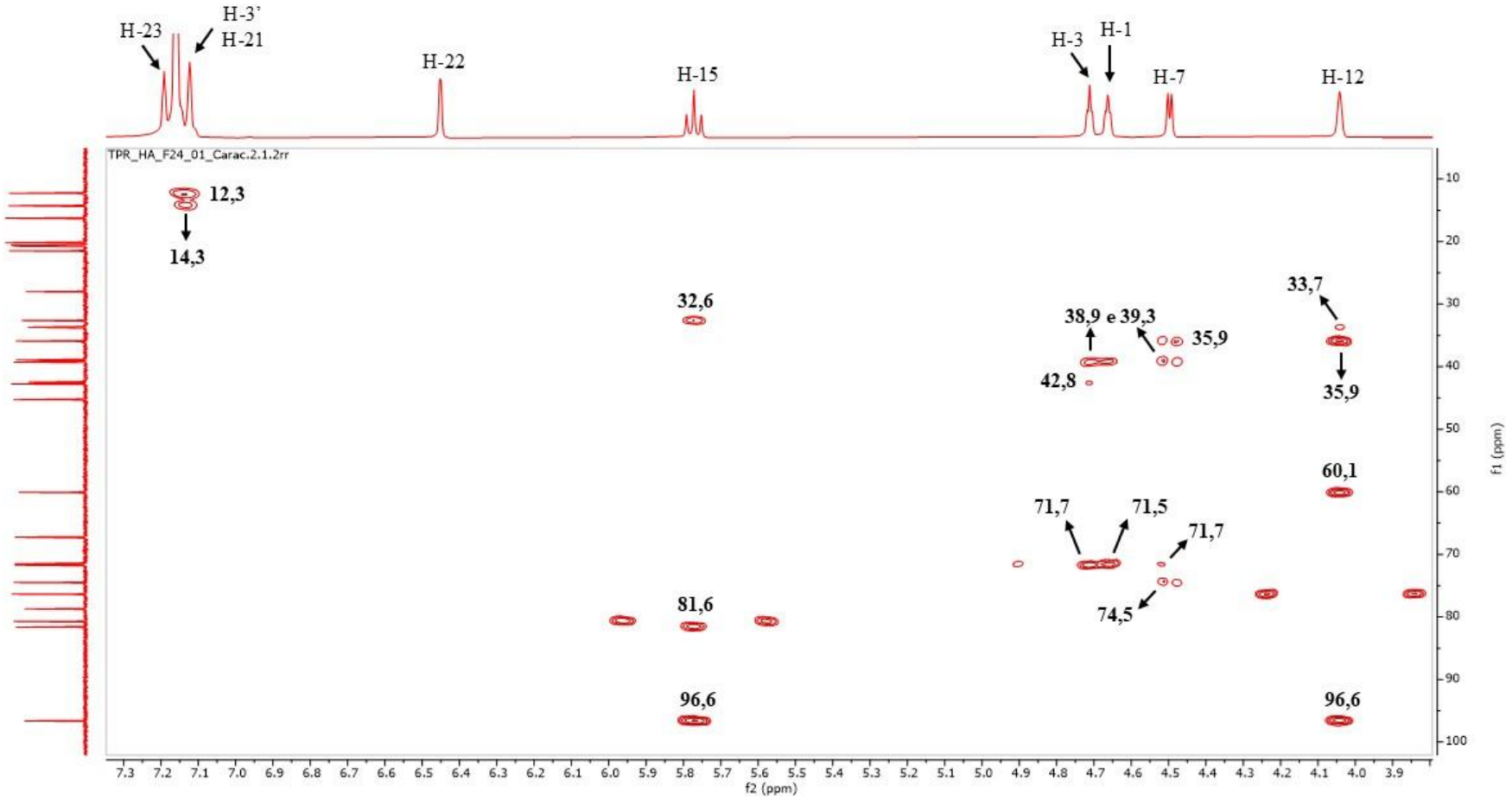


Figura 145 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).

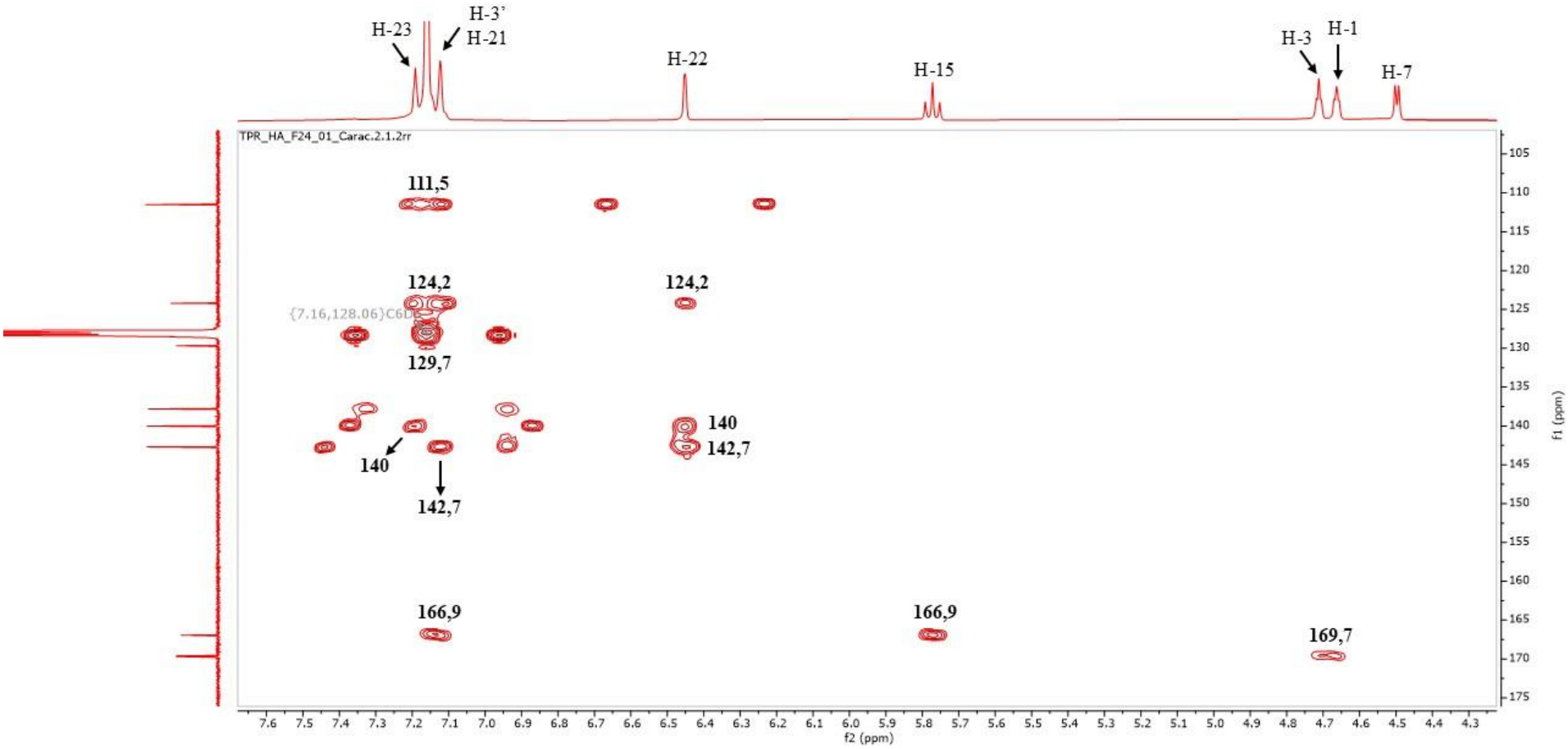


Figura 146 - Ampliação do mapa de contorno HMBC do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).

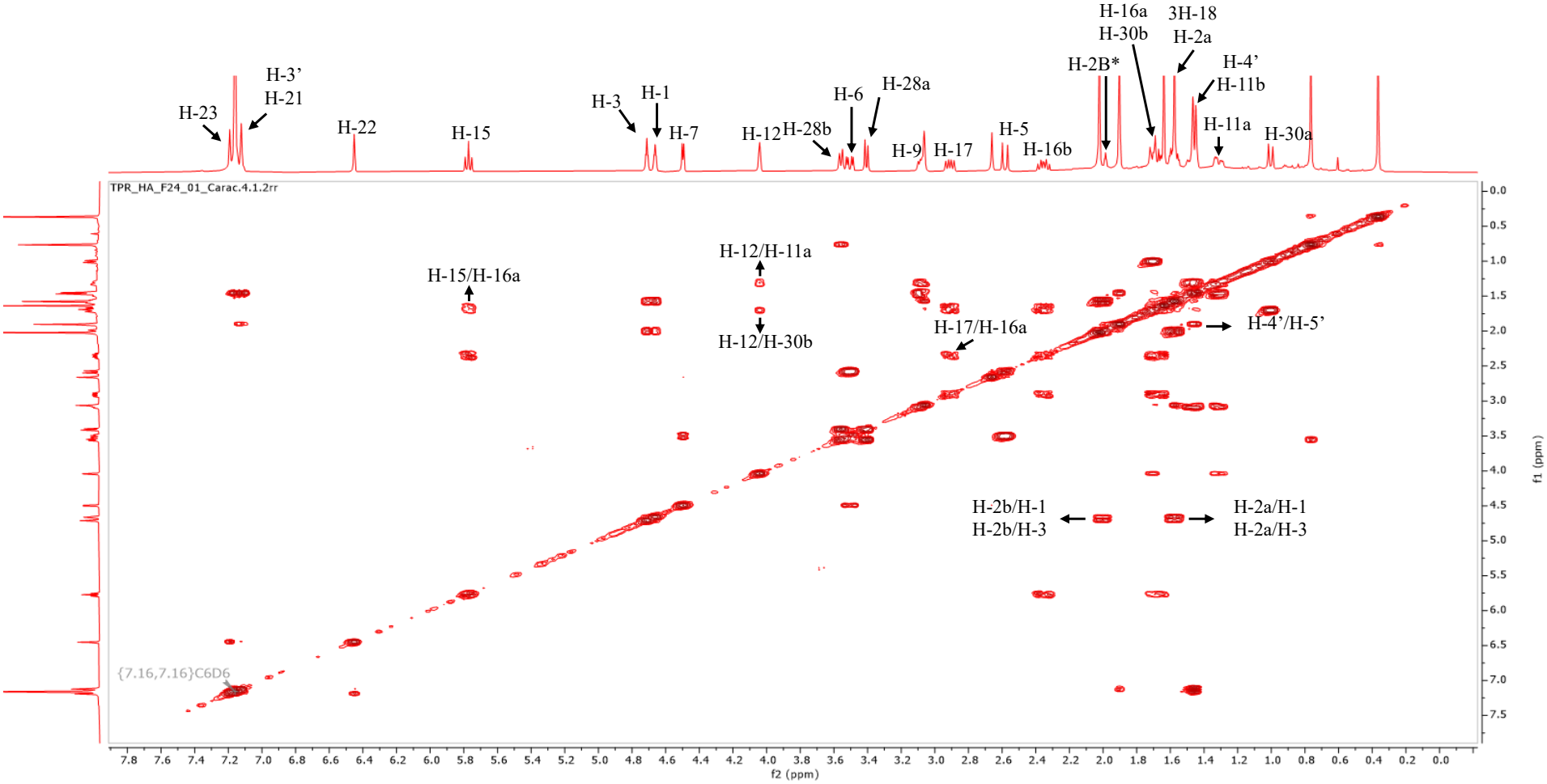


Figura 147 - Mapa de contorno COSY do limonoide 13 em C_6D_6 (9,4 T).