

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

OBTENÇÃO DE CUCURBITACINAS A PARTIR DE
***Wilbrandia ebracteata* COGN. E MODIFICAÇÕES**
ESTRUTURAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
TATIANA DA ROSA GUIMARÃES

Florianópolis
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

OBTENÇÃO DE CUCURBITACINAS A PARTIR DE
***Wilbrandia ebracteata* COGN. E MODIFICAÇÕES**
ESTRUTURAIS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmácia por Tatiana da Rosa Guimarães como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

G963o Guimarães, Tatiana da Rosa
Obtenção de cucurbitacinas a partir de *Wilbrandia ebracteata* Cogn. e modificações estruturais [dissertação] / Tatiana da Rosa Guimarães ; orientador, Eloir Paulo Schenkel. - Florianópolis, SC, 2010.
146 p.: grafs., plantas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Wilbrandia ebracteata*. 3. Cucurbitacinas. 4. Elucidação estrutural. I. Schenkel, Eloir Paulo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Henrique e Tânia, pelo amor incondicional expresso em incentivo e apoio durante todas as etapas da minha vida, e principalmente durante o mestrado, pelo exemplo de integridade, dedicação e família.

AGRADECIMENTOS

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outros ainda porque nos desafiam a construí-los. Por esta razão desejo expressar meus sinceros agradecimentos:

A Deus pela sabedoria, coragem e força que me proporcionou para superar minhas dificuldades e medos.

Ao Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, orientador desta dissertação, pelo imprescindível e valioso apoio em todas as fases de execução deste trabalho, a minha sincera gratidão e profundo reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Flávio Reginatto que contribuiu com inúmeras sugestões enriquecedoras ao longo da elaboração da dissertação e por todo apoio ao qual me foi dado sempre que precisei.

À Profa. Dra. Claudia Maria Oliveira Simões e a doutoranda Karen Luise Lang, pela realização dos experimentos para avaliação da atividade citotóxica e antiviral. Um agradecimento especial a Karen por ter contribuído em vários momentos do desenvolvimento da pesquisa, mesmo quando estava fazendo parte do seu doutorado na Argentina, socorria-me através de e-mails e pelo MSN. Muito obrigada por tudo!

À Profa. Dra. Maique Weber e à Profa. Dra. Lilian Sibeles pelas contribuições que foram dadas ao trabalho, principalmente durante a apresentação dos seminários.

À Profa. Dra. Marení Farias pelas amostras autênticas de cucurbitacinas disponibilizadas em nosso laboratório.

Ao Prof. Dr. Jorge Palermo e ao Prof. Dr. Miguel Caro por terem feito os espectros das substâncias. Ao Prof. Dr. Fernando Durán pelos ensinamentos de síntese orgânica.

Aos amigos queridos do laboratório de Química Farmacêutica e Farmacognosia que tive o prazer de conviver e aprender Andressa, Carize, Carlos, Cacá, Cintia, Claiton, Cris, Dani, Fernanda, Lara, Silvana, Thaís, Virgínia e também as técnicas Claudinha e Solange. Cada um de vocês deram uma contribuição importante durante essa caminhada. Muito obrigada a todos!

Maria Izabel que foi um grande presente que recebi durante essa caminhada. Mesmo antes de sair o resultado da seleção do mestrado, já me passou o seu telefone e disse como seria bom se fizéssemos o mestrado juntas. Quero te agradecer pela amizade, pelo carinho e por estar sempre presente ao meu lado. Tens um lugar muito especial no meu coração minha amiga!

Simone e a Teca por toda a força e carinho que me foram dados em todos os momentos. É muito bom compartilhar o ambiente de trabalho com pessoas tão especiais e amigas como vocês. Aprendi muito com as duas! Obrigada por tudo!

Geison por sempre ter sido um amigo prestativo e disposto a ajudar a todos mesmo quando estava com mil coisas para fazer. Obrigada pela força no HPLC!

Solomon pela parceria de chegar às 7:15 h no laboratório, sempre de bom humor e com alegria contagiante. Brincávamos: “hoje você que caiu da cama”!

Agradeço de coração, àquelas que por um tempo contribuíram com esse trabalho: Carol e Vanessa, obrigada pela dedicação e carinho!

Em especial, meus sinceros agradecimentos e gratidão às pessoas que são à base da minha vida:

Aos meus pais Luiz Henrique e Tânia, por terem sentido junto comigo, todas as angústias e felicidades, acompanhando cada passo de perto. E *aos meus irmãos* amados Vânia e Luizinho pelas conversas, dúvidas e estímulos. Que sempre torceram para que os meus espectros ficassem “bons”. Amo vocês!

Ao meu noivo Thobias pelo inestimável apoio, carinho e paciência que teve comigo, já que muitas foram às vezes que me escutou e soube me incentivar com frases de persistência. Te amo!

Aos meus tios Kleber e Nolva, por sempre me apoiarem nessa caminhada com muito ânimo e interesse pela minha pesquisa.

E, por fim ao CNPq pela bolsa concedida.

“Toda pesquisa é um permanente início-reinício em ciclos convergentes que representam a expressão pessoal cada vez mais livre, produtiva e construtiva em prol do benefício de todos.”

Cerato SMM.

RESUMO

Conhecida popularmente como taiuiá, *Wilbrandia ebracteata* é uma espécie pertencente à família Cucurbitaceae, que apresenta raízes e frutos com amargor característico. O objetivo deste trabalho consiste na complementação dos estudos quanto à ocorrência de cucurbitacinas na espécie *Wilbrandia ebracteata* e obtenção de material para avaliação das atividades biológicas, bem como, também a realização de modificações estruturais nas substâncias isoladas.

O extrato em diclorometano preparado a partir das raízes secas foi fracionado em coluna cromatográfica do tipo *flash* sobre gel de sílica com hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. A partir dessas frações foram separadas as cucurbitacinas diidroisocucurbitacina B, diidrocucurbitacina B e uma cucurbitacina inédita na literatura. A elucidação estrutural foi determinada com base no espectro de massas de alta resolução e em métodos espectroscópicos de UV, IV, RMN 1D e 2D, com os quais foi possível identificar a substância 16 α ,2 β ,20 β -triidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-5,25-dien-3,11,22-triona. Foram realizadas modificações estruturais nessa substância, que permitiram a obtenção dos derivados diacetilado nas posições em C2 e C16, reduzido em C3 e C22 e do éster monossustituído em C2.

Palavras-chaves: *Wilbrandia ebracteata*, cucurbitacinas, elucidação estrutural.

ABSTRACT

OBTAIN CUCURBITACINES FROM *Wilbrandia ebracteata* COGN. AND STRUCTURAL MODIFICATIONS

Popularly known as taiuiá, *Wilbrandia ebracteata* is a species of the family of Cucurbitaceae, which have roots and fruits with a characteristic bitter taste. The aim of this work is to complement the studies regarding the occurrence of cucurbitacines in the specie of *Wilbrandia ebracteata* and to obtain material for the evaluation of biological activities as well as the implementation of structural modifications in isolated substances.

The dichloromethane extract prepared from dried roots was fractionated on flash type column on silica gel with hexane and ethyl acetate in increasing order of polarity. From these fractions were separated cucurbitacines dihydroisocucurbitacin B dihydrocucurbitacin B and a novel in the literature. Its structure was determined from the mass spectrum of high-resolution and spectroscopic methods of UV, IR, 1D and 2D NMR, with which it was possible to identify the substance 16 α , 2 β , 20 β -trihydroxy-10 α ,17 α -cucurbit-5,25-dien-3,11,22-trione. Structural elucidation based on spectroscopic methods indicated the substance as 16 α , 2 β , 20 β -trihydroxy-10 α , 17 α -cucurbit-5,25-dien-3,11,22-trione . Structural modifications were performed with this substance, which allowed the production of diacetylated derivatives in positions C2 and C16, reduced C3 and C22 and the monosubstituted esters in C2.

KEYWORDS: *Wilbrandia ebracteata*, *cucurbitacines*, *structural elucidation*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Família Cucurbitaceae	24
2.1.1 Metabólitos majoritários da família Cucurbitaceae: cucurbitacinas	25
2.1.2 Propriedades farmacológicas de cucurbitacinas	26
2.2 Espécie de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	31
2.2.1 Constituintes químicos descritos para <i>Cayaponia tayuya</i> e <i>Wilbrandia ebracteata</i>	32
2.2.2 Propriedades farmacológicas descritas para <i>Cayaponia tayuya</i>	41
2.2.3 Propriedades farmacológicas descritas para <i>Wilbrandia ebracteata</i>	42
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 Procedimentos gerais	48
4.1.1 Solventes e reagentes	48
4.1.2 Equipamentos	48
4.2 Material vegetal.....	49
4.3 Preparação dos extratos.....	49
4.3.1 Preparação do extrato em diclorometano.....	49
4.3.2 Comparação da composição química do material adquirido no comércio (raízes secas) e do material coletado (raízes frescas) de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	50
4.4 Isolamento, purificação e identificação das substâncias WT-01, WT-02 e WT-03	50
4.4.1 Fracionamento em coluna cromatográfica do tipo <i>flash</i> do extrato obtido a partir das raízes secas	50
4.4.2 Fracionamento sobre coluna em gel de sílica das frações obtidas da coluna <i>flash</i>	51
4.4.3 Isolamento da substância WT-01 a partir do fracionamento da fração FW3.....	52

4.4.4 Obtenção dos derivados semissintéticos da substância WT-01.....	53
4.4.4.1 Derivado obtido por acetilação com piridina e anidrido acético.....	53
4.4.4.2 Derivado obtido por redução com NaBH ₄	53
4.4.4.3 Derivado obtido por esterificação com anidrido succínico.....	54
4.4.5 Isolamento das substâncias WT-02 e WT-03 a partir do fracionamento das frações FW4 e FW5	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 Análise comparativa dos extratos em diclorometano de raízes frescas e secas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	59
5.2 Isolamento e identificação das cucurbitacinas a partir do extrato em diclorometano das raízes secas.....	65
5.2.1 Isolamento e identificação da substância WT-01.....	65
5.2.2 Isolamento e identificação das substâncias WT-02 e WT-03.....	66
5.3 Elucidação estrutural da substância WT-01	67
5.4 Derivados semissintéticos da substância WT-01.....	86
5.4.1 Derivado acetilado.....	86
5.4.2 Derivado reduzido	98
5.4.3 Derivado éster.....	109
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120
7 CONCLUSÕES.....	129
8 REFERÊNCIAS.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura geral cucurbitacinas: núcleo cucurbitano.....	24
Figura 2:	Exemplos de cucurbitacinas citotóxicas....	27
Figura 3:	Raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i> , coletada em Florianópolis, agosto de 2009.....	31
Figura 4:	Raízes e frutos de <i>Cayaponia tayuya</i> (Vell.) Cogn.....	33
Figura 5:	Perfil cromatográfico das frações obtidas a partir da coluna cromatográfica em sílica.....	55
Figura 6:	Esquema de fracionamento das frações reunidas da coluna tipo <i>flash</i>	52
Figura 7:	Representação esquemática do isolamento das substâncias WT-01, WT-02 e WT-03 e dos derivados semissintéticos.....	57
Figura 8:	CCD do extrato em diclorometano das raízes secas e frescas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	60
Figura 9:	Cromatogramas, obtidos por CLAE, das cucurbitacinas já descritas na literatura....	61
Figura 10:	Cromatogramas, obtidos por CLAE, das análises realizadas com extratos diclorometano das raízes secas e frescas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	62
Figura 11:	CCD de frações obtidas a partir da coluna cromatográfica do tipo <i>flash</i> com as raízes secas.....	65
Figura 12:	CCD do extrato em diclorometano das raízes secas e padrões DISO e DHB.....	66
Figura 13:	Espectro de infravermelho da substância WT-01 obtida na forma de pastilha com KBr através da reflectância difusa.....	68

Figura 14:	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz), em CDCl_3 , da substância WT-01.....	70
Figura 15:	Espectros expandidos de correlação HSQC (500 MHz), em CDCl_3 da substância WT-01.....	71
Figura 16:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) e ampliação, em CDCl_3 da substância WT-01.....	72
Figura 17:	Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz), em CDCl_3 , da substância WT-01....	73
Figura 18:	Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz), em CDCl_3 , na região das metilas da substância WT-01.....	74
Figura 19:	Espectro de correlação expandido $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY da substância WT-01.....	75
Figura 20:	Classificação do tipo estrutural do anel A de cucurbitacinas.....	76
Figura 21:	Espectro expandido de correlação (metilas) da substância WT-01.....	77
Figura 22:	Subestrutura 1 com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios e carbonos mostrando as principais correlações $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY.....	78
Figura 23:	Subestrutura 2 com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios e carbonos mostrando as principais correlações $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY.....	79
Figura 24:	Subestrutura 3 com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios e carbonos mostrando as principais correlações $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY.....	80
Figura 25:	Espectro expandido de correlação HSQC (δ_{C} 110,4; δ_{H} 4,76 e δ_{H} 4,70) da substância WT-01.....	81
Figura 26:	Espectro expandido de correlação $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY.....	82
Figura 27:	Subestrutura 4 com os deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios e carbonos da cadeia lateral	82
	Estrutura química proposta da	

Figura 28:	cucurbitacina WT-01, com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos dos hidrogênios e carbonos.....	83
Figura 29:	Espectro de massas de alta resolução (ionização por eletrospray) da substância WT-01.....	84
Figura 30:	Obtenção do derivado acetilado através da reação com piridina e anidrido acético a partir da substância WT-01.....	87
Figura 31:	CCD da substância WT-01 e derivado acetilado.....	88
Figura 32:	Espectro de infravermelho da substância WT-01_acetilada obtida na forma de pastilha com KBr através da reflectância difusa.....	89
Figura 33:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) e ampliação, em CDCl_3 , da substância WT-01_acetilada.....	90
Figura 34:	Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz), da substância WT-01_ acetilada em CDCl_3	91
Figura 35:	Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz), da substância WT-01_ acetilada em CDCl_3	92
Figura 36:	Espectro expandido de correlação HSQC, na região das metilas da substância WT-01_acetilada.....	93
Figura 37:	Espectro expandido de correlação HSQC dos carbonos carbinólicos (δ_c 73,3 e δ_c 74,1) da substância WT-01_acetilada.....	93
Figura 38:	Espectro HMBC (500 MHz; em CDCl_3) da WT-01_acetilada.....	94
Figura 39:	Estrutura química proposta da substância WT-01_acetilada.....	95
Figura 40:	Obtenção do derivado reduzido através da reação com NaBH_4 a partir da substância WT-01.....	98
Figura 41:	CCD do composto WT-01 e derivado reduzido.....	98

Figura 42:	Espectro de infravermelho da substância WT-01_reduzida com pastilhas KBr através de reflectância difusa.....	99
Figura 43:	Espectro de RMN ¹³ C e ampliação, em CDCl ₃ , da substância WT-01_reduzida.....	100
Figura 44:	Espectro de RMN ¹ H e ampliação 400 MHz, em CDCl ₃ , da substância WT-01_reduzida.....	101
Figura 45:	Espectro de RMN ¹ H e ampliação 400 MHz, em CDCl ₃	102
Figura 46:	Espectro de correlação ampliado ¹ H ¹ H-COSY da substância WT-01_reduzida.....	103
Figura 47:	Subestrutura 1 com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios mostrando as principais correlações ¹ H ¹ H-COSY dos anéis A e B.....	104
Figura 48:	Atribuições com δ obtidos para os hidrogênios da cadeia lateral baseados no espectro de RMN ¹ H e correlação ¹ H ¹ H-COSY.....	105
Figura 49:	Estrutura química proposta da substância WT-01_reduzida.....	106
Figura 50:	Análise cromatográfica por CCD dos produtos da reação com anidrido succínico.....	109
Figura 51:	Espectro de infravermelho do produto HEM1 obtido na reação com anidrido succínico em pastilha KBr através da reflectância difusa.....	110
Figura 52:	Espectro de RMN ¹ H e ampliação (500 MHz; em CDCl ₃) do éster obtido HEM1....	111
Figura 53:	Espectro de RMN ¹ H e ampliação (500 MHz; em CDCl ₃) do éster obtido HEM1, com a subestrutura do anel A.....	112
Figura 54:	Estrutura química proposta do éster obtido pela reação com anidrido succínico.....	113
Figura 55:	Cromatogramas, obtidos por CLAE, das frações enriquecidas com WT-02 e WT-03.....	115

Figura 56:	CCD comparativa das substâncias WT-02 e WT-03 e amostras autênticas diidrocurbitacina B (P1) e diidroisocurbitacina (P2).....	116
Figura 57:	Cromatogramas, obtidos por CLAE, das substâncias WT-02 e WT-03 com amostras autênticas da diidroisocurbitacina B e diidrocurbitacina B.....	117
Figura 58:	Estruturas químicas da diidroisocurbitacina B (WT-02) e diidrocurbitacina B (WT-03).....	118
Figura 59:	CCD comparativa padrão diidrocurbitacina B e substância isolada DHB do extrato de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	118
Figura 60:	Cromatogramas, obtidos por CLAE, das frações 70:30; 60:40; 50:50 e 40:60 obtidas a partir do fracionamento do extrato diclorometano.....	121
Figura 61:	Cromatogramas, obtidos por CLAE, de cucurbitacinas mais apolares.....	123
Figura 62:	Cromatogramas, obtidos por CLAE, das frações mais polares.....	124
Figura 63:	Formação das cucurbitacinas W6 e W7 a partir da W-15 em meio ácido.....	126
Figura 64:	Cromatogramas, obtidos por CLAE, comparando extratos raízes secas e frescas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Espécies conhecidas popularmente como Taiuiá.....	32
Tabela 2:	Cucurbitacinas descritas por Bauer e colaboradores (1983;1985).....	34
Tabela 3:	Flavonóides descritos por Bauer e colaboradores (1983;1985).....	35
Tabela 4:	Estruturas e nomenclaturas dos compostos descritos por Farias e colaboradores (1993).....	37
Tabela 5:	Estruturas e nomenclaturas dos compostos descritos por Schenkel e colaboradores (1992).....	38
Tabela 6:	Glicosídeos de nor-cucurbitacinas não aromáticos, descritos por Himeno e colaboradores (1992, 1993, 1994a, 1994b, 1994c) para <i>Cayaponia tayuya</i>	39
Tabela 7:	Glicosídeos de nor-cucurbitacinas com anel A aromático, descritos por Himeno e colaboradores (1992, 1993, 1994a, b, c) para <i>Cayaponia tayuya</i>	40
Tabela 8:	Comparação da área dos picos dos extratos obtidos a partir das raízes frescas e secas.....	63
Tabela 9:	Rendimentos da extração das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	64
Tabela 10:	Rendimentos das frações obtidas a partir da coluna tipo flash das raízes de <i>Wilbrandia bracteata</i>	64
Tabela 11:	Dados dos espectros de RMN ¹³ C e HSQC da substância WT-01 comparados com a diidrocurbitacina B (FARIAS, 1991).....	85

Tabela 12:	Dados espectrais de RMN ^1H da substância WT-01 e correlações COSY observadas no espectro.....	86
Tabela 13:	Comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C (125MHz) da substância WT-01_acetilada com WT-01, em CDCl_3	96
Tabela 14:	Dados espectrais de RMN ^1H da substância WT-01_acetilada.....	97
Tabela 15:	Comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C (125 MHz) da substância WT-01_reduzida com WT-01, em CDCl_3	107
Tabela 16:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância WT-01_reduzida.....	108
Tabela 17:	Dados de RMN ^1H (500 MHz) da substância HEM1.....	114
Tabela 18:	Análise por CLAE, da área dos picos de cucurbitacinas presentes nas frações obtidas com o fracionamento do extrato diclorometano.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

AcOEt= acetato de etila

CCD= cromatografia em camada delgada

CLAE= cromatografia líquida de alta eficiência

CH₂Cl₂=diclorometano

COSY= correlation spectroscopy

COX= enzima ciclooxigenase

DHB= diidrocucurbitacina B

DISO= diidroisocucurbitacina B

EtOH=etanol

HMBC= heteronuclear multiple bond correlation

HSQC= heteronuclear single quantum coherence

HSV-1=virus herpético simples 1

IV= infravermelho

MeOH=metanol

NOESY= the nuclear Overhauser enhancement spectroscopy

RMN ¹H=ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C= ressonância magnética nuclear de carbono

UV= ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

Encontrada predominantemente nas regiões sul e sudeste do Brasil, *Wilbrandia ebracteata* é uma espécie da família *Cucurbitaceae* conhecida na medicina popular como taiuiá (FARIAS; SCHENKEL, 1987; PORTO, 1974). Seu uso remonta à medicina indígena, como laxante ou drástico; no entanto, as indicações foram sendo ampliadas, como, por exemplo, para sífilis, picada de cobra, tumores na pele e doenças reumáticas (D'ÁVILA, 1910; MOREIRA, 1862), de forma a ser considerada ao final do século XIX uma panacéia. Com o mesmo nome popular, outras espécies, como por exemplo, *Cayaponia tayuya* são comercializados para fins farmacêuticos. No entanto, a análise da composição química de alguns produtos comercializados indicou diferentes composições em relação ao perfil de cucurbitacinas e de flavonóides (FARIAS; SCHENKEL, 1987), sendo que algumas especialidades farmacêuticas comercializadas na década passada não eram provenientes de *Cayaponia tayuya*, mas sim de *Wilbrandia ebracteata* (SANTOS; SANTOS; SCHENKEL, 1996; SANTOS, 1989).

A comercialização de produtos fitoterápicos com a declaração de tratar-se de *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. decorre, provavelmente, do fato da Farmacopéia Brasileira I (1926), ter incluído essa planta como a droga vegetal taiuiá. Os estudos realizados por Schenkel e colaboradores demonstraram a acumulação de cucurbitacinas e de C-glicosídeos de flavonóides, tanto em espécies de *Cayaponia* como de espécies de *Wilbrandia*, mas com diferentes composições. Adicionalmente, cabe esclarecer que a composição química descrita para as essas duas espécies é praticamente idêntica, o que decorre da exportação da droga vegetal taiuiá com a declaração de tratar-se de *Cayaponia tayuya**.

Tendo em vista os trabalhos anteriores, com enfoque químico, que incluem duas dissertações de mestrado (GAZOLA, 2008; FARIAS, 1986), uma tese de doutorado (FARIAS, 1991) e as publicações (SANTOS; SANTOS; SCHENKEL, 1996; SCHENKEL et al., 1992; FARIAS et al., 1987), a presente proposta está centrada na investigação complementar das raízes de *Wilbrandia ebracteata*, buscando verificar a presença de substâncias ainda não descritas, e, ao mesmo tempo re-

* SCHENKEL, E.P: Informação pessoal junto à empresa exportadora situada no município de Nova Petrópolis/ RS.

isolamento de algumas cucurbitacinas em quantidades suficientes para a realização de ensaios biológicos e modificações estruturais.

Para realização de ensaios biológicos, existe a cooperação com grupos de pesquisa desta Universidade que desenvolvem ensaios de citotoxicidade, atividade antiviral e antiinflamatória.

O interesse em retomar esse tema decorre principalmente devido a variedade estrutural das cucurbitacinas, substâncias triterpênicas tetracíclicas poliidroxiladas, que conferem sabor amargo as plantas da família *Cucurbitaceae* (SCHENKEL et al., 1992; LAVIE; GLOTTER, 1971) e pela constatação das importantes atividades biológicas descritas, inclusive nesta Universidade. Com a mesma espécie, foram realizados na UFSC, trabalhos com enfoque farmacológico que incluem uma dissertação de mestrado (FOLADOR, 2009), uma tese de doutorado (SIQUEIRA, 2007) e as publicações (SIQUEIRA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2007; PETERS et al., 2003; PETERS et al., 1999; PETERS, FARIAS, RIBEIRO-DO-VALLE, 1997). Os resultados apontaram uma destacada atividade antiinflamatória da cucurbitacina B e do extrato em diclorometano preparado com as raízes de *Wilbrandia ebracteata* (PETERS et al., 1999), assim como para a diidrocurcubitacina B foi constatada a redução do crescimento tumoral e da formação de metástase em pulmão induzidos pela inoculação de células B16F10 em camundongos (SIQUEIRA, 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura foram abordados, em um primeiro momento, dados gerais a respeito da família Cucurbitaceae e de um dos principais constituintes do metabolismo secundário dessa família: as cucurbitacinas, incluindo os estudos de atividade farmacológica dessas substâncias obtidas de diferentes espécies vegetais. São apresentados seqüencialmente dados a respeito da composição química e estudos farmacológicos concernentes às espécies *Wilbrandia ebracteata* e *Cayaponia tayuya*.

2.1 Família Cucurbitaceae

A família *Cucurbitaceae*, inserida na ordem Violales, é composta por aproximadamente 119 gêneros, com 775 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais e com presença limitada em regiões de clima temperado (MEBBERLEY, 1997).

Em nível mundial essa família ocupa um lugar preponderante, em virtude de apresentar um expressivo valor econômico e medicinal, já que muitas de suas espécies são plantas alimentícias de grande relevância na agricultura e fazem parte de outras facetas da vida humana em todo o mundo. No Brasil, a família *Cucurbitaceae* é representada por 30 gêneros, com aproximadamente 200 espécies relatadas (BARROSO, 1978). Abóbora (*Cucurbita pepo*), melancia (*Citrullus vulgaris*), pepino (*Cucumis sativus*) e chuchu (*Echium edule*) são alguns exemplos de cucurbitáceas cultivadas e de amplo uso na alimentação no Brasil (PAGOTO; KAPLAN; GOTTLIEB, 1996).

Do ponto de vista químico, os principais constituintes do metabolismo secundário da família *Cucurbitaceae* são cucurbitacinas, saponinas triterpênicas, óleos fixos contendo ácidos triênicos conjugados e aminoácidos não-proteinogênicos, além de esteróides (SCHENKEL et al., 1992; HEGNAUER, 1989). Também tem sido descrita a presença de proteínas e polipeptídeos biologicamente ativos (HAMATO et al., 1995) e C-glicosilflavonóides (SANTOS et al., 1996; BARANOWSKA; CISOWSKI, 1995; BAUER et al., 1985). Dentre os constituintes químicos presentes nessa família, serão abordadas nesta revisão

apenas as cucurbitacinas que se encontram relatadas no item a seguir.

Historicamente, as plantas da família Cucurbitaceae têm sido utilizadas como vermífugos e eméticos devido às propriedades tóxicas dessas substâncias (MIRÓ, 1995; NEUWINGER, 1994; GUHA; SEM, 1975; LAVIE; GLOTTER, 1971). As cucurbitacinas também são conhecidas por suas atividades citotóxicas e antitumorais (LAZARIS et al, 1998; DUNCAN; DUNCAN; 1997; DUNCAN et al., 1996; KONOSHIMA et al., 1995; MIRÓ, 1995; RYU et al., 1995; RAO et al., 1991; GUHA; SEN, 1975).

2.1.1 Metabólitos majoritários da família Cucurbitaceae: cucurbitacinas

Esses metabólitos secundários são classificados como triterpenos altamente oxigenados com o esqueleto biogeneticamente incomum 19-(10 \rightarrow 9 β)-abeo-10 α -lanost-5-eno (também conhecido como 9 β -metil-19-norlanosta-5-eno) (figura 1), que podem ser encontrados na forma livre ou glicosilados (LAVIE, 1971).

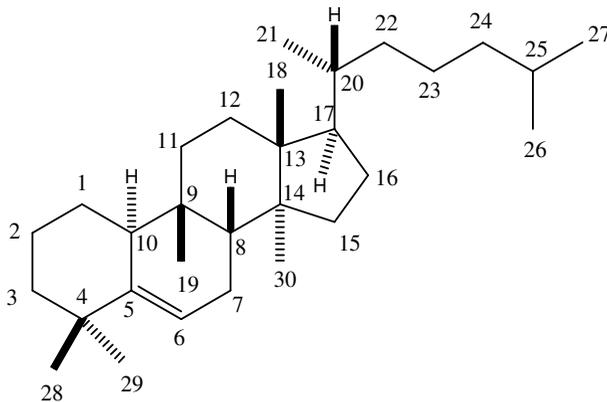


Figura 1: Estrutura geral das cucurbitacinas: núcleo cucurbitano.

Embora as cucurbitacinas sejam encontradas predominantemente em espécies da família cucurbitaceae, também estão presentes em várias outras famílias botânicas, como Cruciferae, Begoniaceae, Scrophulariaceae, Primulaceae, Datisceae, Desfontainaceae, Elaeocarpaceae, Sterculiaceae, Polemoniaceae, Rubiaceae, e Rosaceae (SHIBUYA; SHINYA; EBIZUKA, 2004; DINAN; HARMATHA; LAFONT, 2001). Das cucurbitaceas utilizadas na medicina popular do Brasil destacam-se as drogas vegetais “buchinha” (*Luffa operculata* L.), “taiuiá” (*Wilbrandia ebracteata* Cogn. e/ou *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn.).

Reconhecidas inicialmente por sua toxicidade e amargor ao paladar, as cucurbitacinas apresentam uma variedade de atividades farmacológicas, ressaltando-se como as mais significativas as atividades citotóxica, antitumoral, antiinflamatória, antifertilizante, hepatoprotetora e antimicrobiana conforme revistas por Miró (1995). Braga, Kreis e Oliveira (1995) ainda relatam que essas substâncias nas espécies em que estão presentes exercem ação protetora ao vegetal (repelente, formicida e tóxica) contra fitófagos e fungos parasitas.

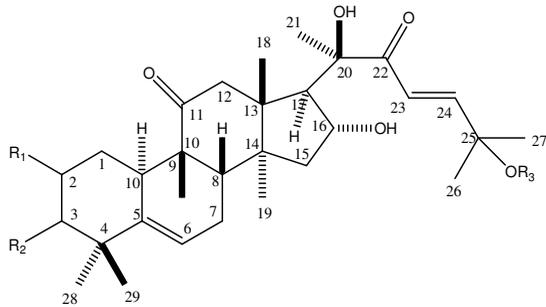
As cucurbitacinas são estruturalmente muito diversas, pois cerca de 50 análogos já foram identificados (DINAN, HARMATHA e LAFONT, 2001). Em uma revisão de 1992, dos autores Metcalf e Metcalf com espécies da família *Cucurbitaceae* foram apontadas como as mais comuns, as cucurbitacinas B, D, G/H e E. As principais características estruturais de diferenciação das cucurbitacinas estão localizadas no anel A e na cadeia lateral. Um aspecto destacado por Valente (2004) é a posição dos grupamentos carbonila, presentes de maneira sistemática na maioria dessas substâncias, e as possibilidades de oxigenação em C2, C3, C11, C16, C20, C22, C25 e eventualmente em C7 e C19. Para maiores informações estruturais verificar as revisões recentes de Chen e colaboradores (2005) e Valente (2004).

2.1.2 Propriedades farmacológicas de cucurbitacinas

As cucurbitacinas foram investigadas nas décadas de 50 e 60 principalmente em relação às características estruturais, às propriedades químicas e às atividades farmacológicas,

especialmente em relação à atividade antitumoral. No entanto, alguns estudos indicaram elevada toxicidade, o que trouxe consigo, na época, uma redução do interesse nessa classe de substâncias como possíveis fármacos, ou protótipos de fármacos. Posteriormente, alguns estudos sugeriram que essa citotoxicidade está relacionada a algumas características estruturais, que são freqüentes, mas não estão presentes em todas as estruturas, especialmente a presença ou não do grupo cetona α - β insaturada na cadeia lateral (FREI et al., 1998).

Bartalis e Halaweish (2005) apontaram que o aumento da citotoxicidade das cucurbitacinas está possivelmente correlacionado com a hidrofobicidade dessas moléculas. Alguns exemplos de cucurbitacinas citotóxicas são cucurbitacina B (ARISAWA et al., 1997), a isocucurbitacina B, a 3-epi-isocucurbitacina B (ARISAWA et al., 1984), cucurbitacina F (FANG et al., 1984) e cucurbitacina D (DANG et al., 1994; TESSIER; PARIS, 1978) (ver figura 2).



R ₁	R ₂	R ₃	Outros	
OH	O	Ac	$\Delta^{23,24}$	Cucurbitacina B
OH	OH	Ac	$\Delta^{23,24}$	Cucurbitacina F
OH	O	OH	$\Delta^{23,24}$	Cucurbitacina D
O	OH	OH	$\Delta^{23,24}$	Isocucurbitacina B
O	OH	Ac	$\Delta^{23,24}$	3-epiisocucurbitacina B

Figura 2: Exemplos de cucurbitacinas citotóxicas.

A partir da década de 90, observou-se um interesse crescente na investigação de propriedades farmacológicas de substâncias desta classe, especialmente em relação às atividades antiinflamatória e citotóxica/antitumoral, o que é apresentado a seguir através de alguns exemplos selecionados.

Zhang e colaboradores (2009) verificaram o efeito *in vitro* da cucurbitacina B frente à viabilidade da linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) através do ensaio MTT. A concentração que causou redução em 50% da proliferação celular (CI_{50}) foi de 1,66 μ M e 0,52 μ M, no período de 48 h e 72 h, respectivamente. Os mesmos autores ainda investigaram os efeitos *in vivo* do crescimento tumoral através do teste do modelo enxerto em ratos, tratados com cucurbitacina B. Os animais tratados com a cucurbitacina B na forma de lipossomas (27,5; 55 e 110 mg/Kg; i.v) mostraram uma taxa do crescimento tumoral significativamente inferior ao grupo controle (solução glicosada 5%). Somado as informações com outros trabalhos, os autores constataram pela primeira vez que a cucurbitacina B pode inibir a viabilidade celular das células HepG2 e induzir a apoptose celular através da supressão da fosforilação da STAT3. Sugerindo então, que essa cucurbitacina é uma alternativa promissora para o tratamento do carcinoma hepatocelular humano.

Outra cucurbitacina que *in vitro* induziu a apoptose das células de carcinoma hepatocelular humana (Hep 3B) foi a cucurbitacina D, isolada *Trichosanthes kirilowii*. A dose inibitória efetiva (ED_{50}) foi de 0,32-0,63 μ g/ml (TAKAHASHI et al., 2009).

Trabalho recente realizado nessa Universidade com a diidrocurcubitacina B, principal componente das raízes de *Wilbrandia ebracteata*, mostrou que essa cucurbitacina quando administrada na dose de 10 mg/mL durante 12 dias (1x ao dia; v.o) apresentou uma redução significativa do crescimento tumoral e de metástases de pulmão, em 83,5% e 50,3%, respectivamente, quando avaliada frente a linhagens celulares de B16F10 (SIQUEIRA et al., 2009).

A terapia combinada com múltiplos fármacos é uma prática comum no tratamento do câncer por promover um efeito adicional sinérgico e reduzir a toxicidade no hospedeiro. Os resultados clínicos promissores com o fármaco docetaxel tem

promovido um interesse considerável em sua combinação com outros agentes antitumorais. Liu e colaboradores (2008) com o intuito de determinar se a cucurbitacina B (Shenyang Pharmaceutical University, China) aumentaria a sensibilidade da quimioterapia associada a esse fármaco no câncer de laringe, realizaram estudo com a terapia combinada, cucurbitacina B (1 μM) e docetaxel (25 nM), em células humanas (Hep-2) Os resultados mostraram que, em comparação com o tratamento com um único agente, a terapia combinada produziu uma maior eficácia na inibição do crescimento das células Hep-2, com a interrupção do ciclo celular na fase G₂/M e indução da apoptose.

A cucurbitacina B, também foi avaliada frente a um mix de seis linhagens de câncer de mama (MDA-MB 231; ZR-75-1; MCF-7; T47D; BT474; MDA-MB-453) *in vivo* e *in vitro*. A dose inibitória efetiva (ED₅₀) variou entre $3,03 \times 10^{-8}$ a $4,18 \times 10^{-7}$ M para esta coleção de linhagens celulares. Em todas as células após 15 a 25 minutos de exposição com a cucurbitacina B na concentração 5×10^{-7} M foi observada uma rápida alteração morfológica associada ao rompimento dos microtúbulos e actina-F. Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram utilizadas células MDA-MB 231 implantadas ortotopicamente em camundongos. Os resultados mostraram que a cucurbitacina B quando administrada na dose 1,0 mg/Kg (i.p), reduziu potencialmente o crescimento do tumor em 55%, quando comparado ao grupo controle (WAKIMOTO et al., 2008).

Em relação à atividade de crescimento inibitória frente células humana de câncer de mama, foram testadas duas cucurbitacinas glicosiladas B e E, isoladas a partir das folhas *Citrullus colocynthis*. Nesse estudo os autores observaram que o tratamento com ambas combinadas na proporção 1:1 apresentou uma inibição crescimento celular (CI₅₀) de 8 μM para as linhagens MDA-MB 231, após 48 horas. Foi possível verificar que as cucurbitacinas glicosiladas B e E, tanto isoladas quanto combinadas atuam interrompendo o ciclo celular na fase G₂/M através da via de supressão da fosforilação da proteína STAT3 (TANNIN-SPITZ, et al., 2007).

Em relação à cucurbitacina E, foi constatada a inibição do crescimento de células de carcinoma de próstata. Estudando-se o mecanismo de ação foi verificado que esta substância é capaz de desestabilizar o citoesqueleto e desagregar os filamentos de

actina (DUNCAN et al., 1996). Também, foi observada atividade inibitória sobre o endotélio em fase de proliferação, sendo que doses mais elevadas e maior tempo de exposição é necessário para atingir o endotélio normal, efeito que parece estar relacionado com o fato da cucurbitacina E agir no citoesqueleto (DUNCAN; DUNCAN, 1997).

Das raízes de *Bryonia alba*, foi isolado um di-glicosídeo da cucurbitacina R, que induziu a elevação dos níveis plasmáticos de prostaglandina- E_2 em ratos submetidos a estresse por imobilização. Ainda, foi observado a inibição da liberação de ácido araquidônico, o que acarretou na diminuição da biossíntese dos mediadores da inflamação (eicosanóides) e no aumento da biossíntese e secreção de corticóides (PANOSSIAN; GABRIELIAN; WAGNER, 1999; 1997; WAGNER; NORR; WINTERHFF, 1994).

O potencial da atividade antitumoral de cucurbitacinas é realçado ainda por outros trabalhos. Witkowski e colaboradores (1984) relatam que as cucurbitacinas B, D e I, e a tetra-hidrocucurbitacina I têm a capacidade de inibir a biossíntese de DNA, RNA e proteínas em células HeLa-S3, levando à inibição da proliferação celular. Outros trabalhos no mesmo sentido são apontados em duas importantes revisões sobre atividades biológicas de cucurbitacinas, Miró (1995), Chen e colaboradores (2005). Esse conjunto de trabalhos indica que as cucurbitacinas vêm sendo investigadas por vários grupos, em relação às potenciais atividades antiinflamatórias e citotóxicas/antitumorais. Em relação à atividade antiviral, são mais raros os trabalhos na literatura, destacando-se um trabalho sobre a atividade anti-HIV para derivados da cucurbitacina F, obtida da planta *Cowania mexicana*, em células H9 com EC_{50} 0,3, 0,8 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (KONOSHIMA et al. 1994). Por outro lado, foi observada, em ensaios preliminares, significativa atividade do extrato metanólico contra HSV-1 (cepa KOS e 29-R) e HSV-2, o que realça a importância da investigação dessa atividade (ANDRIGHETTIFRÖHNER, 2005).

2.2 Espécie *Wilbrandia ebracteata*

O gênero *Wilbrandia* é composto por espécies tropicais e subtropicais, próprias da América do Sul, cuja área de dispersão estende-se do Rio Grande do Sul até o Espírito Santo. Muito provavelmente, o centro de origem desse grupo compreende os estados de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro. Conhecida popularmente como taiuiá, *Wilbrandia ebracteata* (figura 3) é uma espécie da família *Cucurbitaceae* que ocorre nos estados do Rio grande do Sul, Santa Catarina e Paraná leste do Paraguai e nordeste da Argentina (região das Missões) (CROVETTO, 1960).

As raízes de *Wilbrandia ebracteata* são citadas na literatura com uso popular como: laxante, anti-helmíntico, anti-reumático, em afecções da pele, como contraceptivo ou abortivo. (PEREIRA et al., 1992; PIO CORRÊA, 1978; PORTO, 1974; CROVETTO, 1960;HOEHNE, 1939; 1920).



Foto: Tatiana da R. Guimarães

Figura 3: Raízes de *Wilbrandia ebracteata*, coletada em Florianópolis, agosto 2009.

Duas classes de substâncias encontradas em grande quantidade nas frações de *Wilbrandia ebracteata* são as cucurbitacinas, geralmente provenientes da fração diclorometano das raízes (FARIAS et al., 1993; 1986; SCHENKEL et al., 1992) e os flavonóides (majoritariamente os flavonóides C-glicosídeos),

provenientes da fração em *n*-butanol e acetato de etila das raízes (SANTOS et al., 1996) ou das folhas de *Wilbrandia ebracteata* (COELHO et al., 2008).

2.2.1 Constituintes químicos descritos para *Cayaponia tayuya* e *Wilbrandia ebracteata*

O fato do nome popular “taiuíá” ser utilizado para designar diversas espécies como *Cayaponia hirsuta*, *Cayaponia martiana*, *Cayaponia tayuya*, *Wilbrandia ebracteata*, *Wilbrandia verticillata*, dentre outras espécies apresentadas na tabela 1, acaba gerando uma determinada confusão quanto à diferenciação das mesmas.

Tabela 1: Espécies conhecidas popularmente como Taiuíá, segundo a literatura.

Tribo	Subtribo	Gênero	Espécie
<i>Melothriinae</i>	<i>Anguiinae</i>	<i>Ceratosanthes</i> Burm	<i>C. hilariana</i> Cogn.
		<i>Melothria</i> L.	<i>M. fluminensis</i> Gardn. <i>M. warmingii</i> Cogn.
		<i>Wilbrandia</i> Manso	<i>W. verticillata</i> Cogn. <i>W. hibiscoides</i> Manso <i>W. ebracteata</i> Cogn. <i>W. glaziovii</i> Cogn.
<i>Cucurbiteae</i>	<i>Abobriinae</i>	<i>Cayaponia</i> Manso	<i>C. diversifolia</i> (Cogn.) Cogn. <i>C. bonarensis</i> (Mill.) RM Crovetto <i>C. podantha</i> Cogn. <i>C. tayuya</i> (Vell.) Cogn. <i>C. racemosa</i> Cogn. <i>C. glandulosa</i> (Poepp. Et Endl) Cogn. <i>C. martiana</i> (Cogn.) Cogn.
<i>Cyclanthereae</i>		<i>Cyclanthera</i> Schrad	<i>C. pedata</i> Schrad var <i>edulis</i> Naud <i>C. Eichleri</i> Cogn. <i>C. elegans</i> Cogn.

Fonte: Farias, 1991.

Cayaponia tayuya (figura 4) é uma das espécies de vegetais designadas popularmente como taiuiá. Essa espécie de trepadeira pertence à família Cucurbitaceae e está distribuída predominantemente na América tropical e subtropical (MONRO, 1996). Adicionalmente, cabe destacar que é a espécie incluída na Farmacopéia Brasileira (1926), o que facilita a sua entrada no comércio em diferentes produtos farmacêuticos. Especificamente para *Cayaponia tayuya* e *Wilbrandia ebracteata*, foi constatado através da análise cromatográfica que a droga vegetal taiuiá comercializada pela indústria farmacêutica do Rio Grande do Sul como sendo proveniente de *Cayaponia tayuya*, tratava-se na realidade de *Wilbrandia ebracteata* (FARIAS et al., 1986).

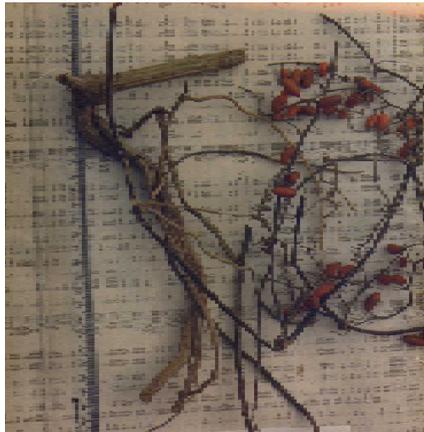
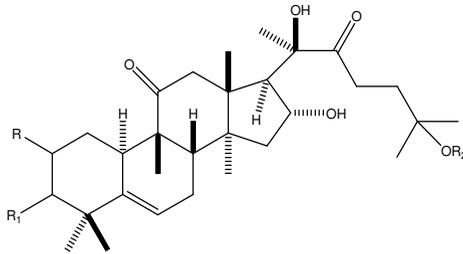


Figura 4: Raízes e frutos de *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn.

Os primeiros trabalhos sobre a composição química de *Cayaponia tayuya*, foram realizados a partir de amostra comercial de taiuiá adquiridas da empresa alemã F.G.Celo, adicionalmente o material vegetal foi obtido através do Prof. Luis H. Berganza (Paraguai), com a declaração de tratar-se de raízes de *Cayaponia tayuya*. Bauer e colaboradores (1985) descreveram o isolamento de cucurbitacinas e flavonóides C-glicosídeos, de frações clorofórmicas e do extrato em metanol: água 1:1, respectivamente. Foram descritos o isolamento das

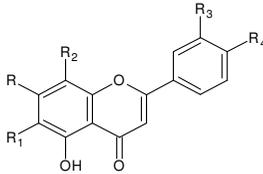
cucurbitacinas: R e seu glicosídeo, 23,24-diidrocucurbitacina B e seu glicosídeo, cucurbitacina B e seu 2-O-glicosídeo, como também dos flavonóides C-glicosídeos swertisina, spinosina, vitexina, isovitexina, vicenina-2, orientina e isoorientina (tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Cucurbitacinas descritas por Bauer e colaboradores para *Cayaponia tayuya* (1983; 1985).



Cucurbitacina	R	R ₁	R ₂	$\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina B	—OH	==O	—OCOCH ₃	==
Cucurbitacina R	—OH	==O	—OH	
Cucurbitacina B-glicosídeo	—O-Glicose	==O	—OCOCH ₃	==
Cucurbitacina R-glicosídeo	—O-Glicose	==O	—OH	
Diidrocucurbitacina B	—OH	==O	—OCOCH ₃	
Diidrocucurbitacina B-2- β -D-glicosídeo	—O-Glicose	==O	—OCOCH ₃	
Diidroisocucurbitacina B	==O	OH	—OCOCH ₃	

Tabela 3: Flavonóides descritos por Bauer e colaboradores para *Cayaponia tayuya* (1983; 1985).



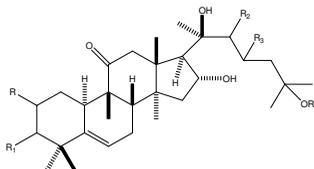
Flavonóides C-glicosídeos	R			R ₃	R ₄
Swertisina	—OCH ₃	Glicose	—H	—H	—OH
Vitexina	—OH	—H	Glicose	—H	—OH
Isovitexina	—OH	Glicose	—H	—H	—OH
vicenina-2	—OH	Glicose	Glicose	—H	—OH
Orientina	—OH	—H	Glicose	—OH	—OH
Isoorientina	—OH	Glicose	—H	—OH	—OH

Por outro lado, cabe destacar que as cucurbitacinas que foram isoladas de *Cayaponia tayuya*, também foram descritas para *Wilbrandia ebracteata*, a partir de material vegetal comercializado completo que são indispensáveis para diferenciar as espécies.

Os trabalhos realizados por Farias e colaboradores (1993) com a raiz comercializada de *Wilbrandia ebracteata*, foram assegurados através da coleta junto à empresa produtora do material vegetal com flores, frutos e raiz, e identificados botanicamente por especialista que conduziram o isolamento das seguintes cucurbitacinas já conhecidas (ver estruturas tabela 4):

- cucurbitacina B, D, E, P, R, G/H, J/K;
- diidrocurbitacina B e seu 2- β -D-glicosídeo;
- diidroisocucurbitacina B e seu 3- β -D-glicosídeo;
- diidrocurbitacina E e seu 2- β -D-glicosídeo;
- 22-deoxo-cucurbitacina D;
- Cayaponosídeo A₅ (nor-cucurbitacina)

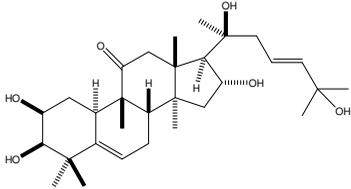
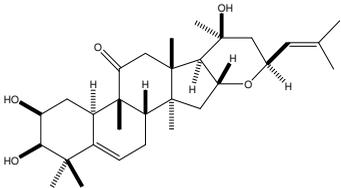
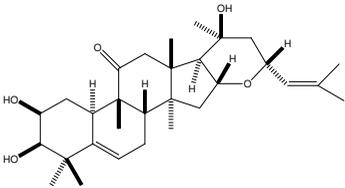
Tabela 4: Estruturas dos compostos descritos por Farias e colaboradores (1993).



Cucurbitacinas	R	R1	R2	R3	R4	Outros
Diidrocurbitacina E	—OH	==O	==O	—H	Acetila	$\Delta^{1,2}$
Diidrocurbitacina B	■OH	==O	==O	—H	Acetila	
Diidroisocucurbitacina B	==OOH	==O	—H	Acetila	
Cucurbitacina B	■OH	==O	==O	—H	Acetila	$\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina E	—OH	==O	==O	—H	Acetila	$\Delta^{1,2}$ $\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina D	■OH	==O	==O	—H	—OH	$\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina R	■OH	==O	==O	—H	—OH	
Cucurbitacina G/H	■OH	==O	==O	~~~~OH	—OH	
Cucurbitacina J/K	—OH	==O	==O	~~~~OH	—OH	$\Delta^{1,2}$
Cucurbitacina P	■OH	■OH	==O	—H	—OH	
Diidrocurbitacina E-2-glicosídeo	Glicose	==O	==O	—H	Acetila	$\Delta^{1,2}$
Diidroisocucurbitacina B-3-glicosídeo	==O	Glicose	==O	—H	Acetila	
Diidrocurbitacina B-2-glicosídeo	■OH	Glicose	==O	—H	Acetila	

Também foram descritas novas cucurbitacinas na época (SCHENKEL et al., 1992) obtidas a partir desse material vegetal apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Estruturas e nomenclatura dos compostos descritos por Schenkel e colaboradores (1992).

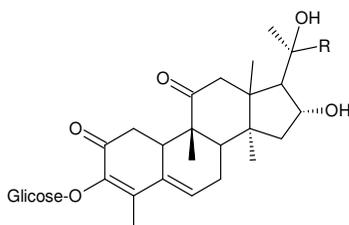
<p>2β,3β,16α,20,25-pentaidroxi-10α-cucurbit-5,23-dien-11-ona</p>	
<p>16α,23α-epoxi-2β,3β,20β-triidroxi-10α,23α-cucurbit-5,24-dien-11-ona</p>	
<p>16α,23α-epoxi-2β,3β,20β-triidroxi-10α,23β-cucurbit-5,24-dien-11-ona</p>	

Com o material vegetal declarado como “raízes de *Cayaponia tayuya* coletadas no Brasil em 1984”, Rios e colaboradores (1990) isolaram do extrato butanólico das raízes de *Cayaponia tayuya* os flavonóides C-glicosídeos vicenina-2 e spinosina.

Himeno e colaboradores (1992, 1993, 1994a, 1994b, 1994c) deram início ao isolamento e identificação de cucurbitacinas mais polares, denominadas cayaponosídeos, presentes no extrato metanólico de *Cayaponia tayuya*. Na declaração sobre a origem do material vegetal é declarado

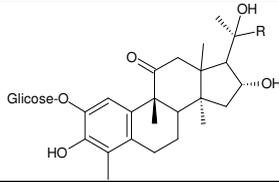
textualmente tratar da espécie *Cayaponia tayuya*, ainda que em nenhum dos estudos realizados por esse grupo foi assegurada a identificação botânica da espécie utilizada. Essas substâncias estão representadas nas tabelas 6 e 7 e podem ser diferenciadas pelo anel A (não aromáticos ou aromáticos) e pela cadeia lateral.

Tabela 6: Glicosídeos de nor-cucurbitacinas não aromáticos descritos por Himeno e colaboradores (1992, 1993, 1994a; 1994b; 1994c).



	R	Δ		R	Δ
Cayaponosídeo A ₁			Cayaponosídeo B _{6a}		
Cayaponosídeo B _{6b}			Cayaponosídeo C ₃		
Cayaponosídeo D _{3a}			Cayaponosídeo D _{3b}		

Tabela 7: Glicosídeos de nor-cucurbitacinas com anel A aromático, descritos por Himeno e colaboradores (1992, 1993, 1994 a,b,c) para *Cayaponia tayuya*.



	R	Δ		R	Δ
Cayaponosídeo A			Cayaponosídeo A ₃		
Cayaponosídeo A ₄			Cayaponosídeo A ₅		$\Delta^{6,7}$
Cayaponosídeo A ₆			Cayaponosídeo B		
Cayaponosídeo B ₂			Cayaponosídeo B ₃		
Cayaponosídeo B ₄			Cayaponosídeo B ₅		$\Delta^{6,7}$
Cayaponosídeo C			Cayaponosídeo C _{5a}		

2.2.2 Propriedades farmacológicas descritas para *Cayaponia tayuya*

Especificamente para cucurbitacinas obtidas de material vegetal declarado como *Cayaponia tayuya*, os cayaponosídeos isolados por Himeno e colaboradores (1992; 1993; 1994a; 1994b; 1994c) foi relatada atividade em carcinoma induzido em camundongos (KONOSHIMA et. al. 1995). Neste trabalho dentre os 24 compostos isolados, foi observado que a administração dos cayaponosídeos B, D e C₂ após 10 semanas acarretou na diminuição da porcentagem dos papilomas nos camundongos, indicando a inibição do segundo estágio da carcinogênese em tumores de pele nesses animais.

A atividade anti-inflamatória dos extratos em clorofórmio e em metanol, das frações em acetato de etila e em n-butanol e dos flavonóides C-glicosídeos vicenina-2 e spinosina foram avaliados no modelo de edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. O estudo permitiu constatar que tanto o extrato, as frações bem como os flavonóides C-glicosídeos quando administrados por via intraperitoneal foram eficazes, contudo por via oral apenas o extrato em clorofórmio foi eficaz (RÍOS et al., 1990).

Nos testes de modelos de edema de pata de camundongo induzido pela carragenina (v.o), edema de orelha de camundongo (v.o e tópico) e edema de pata de camundongo induzido pela carragenina (subcutâneo), as cucurbitacinas R e diidrocucurbitacina B mostraram-se eficazes, mas apenas a cucurbitacina R (i.p) tenha inibido o edema de pata de camundongo induzido pela fosfolipase A₂. No teste de contorção induzida pelo ácido acético em camundongos nenhum dos compostos avaliados na dose de 5 mg/Kg (v.o) apresentaram efeitos positivos (RECIO et al., 2004).

Através do modelo artrítico em ratos foi possível comprovar que a diidrocucurbitacina B, isolada das raízes *Cayaponia tayuya*, quando administrada por via oral na dose de 1mg/Kg foi capaz de diminuir o processo inflamatório (ESCANDELL et al., 2006). O mesmo autor constatou que a cucurbitacina R apresentou os mesmos efeitos (1mg/Kg; v.o) (ESCANDELL et al., 2007). Com esses estudos foi observado que, além de ambas cucurbitacinas serem capazes de diminuir o processo

inflamatório, acabam tendo ação em outros sintomas presentes em modelo artrítico em ratos como redução na perda de peso, redução da inflamação e do edema, diminuição da expressão de COX-2 e óxido nítrico sintetase-2, inibição da produção de prostaglandina-E₂ e fator de necrose tumoral- α *in vivo* além de diminuição do dano causado na articulação.

2.2.3 Propriedades farmacológicas descritas para *Wilbrandia ebracteata*

Em estudo com o extrato aquoso a 10% de *Wilbrandia ebracteata* observou-se inibição significativa em 30% do edema frente ao veneno jararaca (*Bothrops jararaca*) na dose de 1g/Kg (v.o). O uso popular de *Wilbrandia ebracteata* em mordeduras de cobras pode decorrer da atividade anti-inflamatória (Pereira et al., 1992).

Peters e colaboradores (1997) investigaram a atividade analgésica e anti-inflamatória de cucurbitacinas obtidas de *Wilbrandia ebracteata*. A avaliação da atividade analgésica foi realizada através do teste de contorção induzida por ácido acético 0,6% com camundongos (i.p), tendo como controle positivo o ácido acetilsalicílico (i.p). Pode-se verificar atividade significativa para a fração em diclorometano na dose de 10mg/kg. Os estudos mostraram que no teste de edema de pata induzido pela carragenina em ratos o extrato em diclorometano apresentou uma inibição dose dependente, com DI₅₀ 5 mg/Kg na dose 1-10 mg/Kg (i.p) e uma DI₅₀ 15 mg/Kg na dose 3-30 mg/Kg (v.o). A fração semipurificada (FIII), enriquecida em cucurbitacinas B, e as cucurbitacinas isoladas B e E também apresentaram atividade. As cucurbitacinas B e E apresentaram uma inibição do edema de pata induzido pela carragenina de 60,8% e 58,1%, respectivamente, ambas testadas na dose de 1 mg/kg (i.p). No teste de dor induzido pela formalina foi possível verificar que o extrato em diclorometano via intraperitoneal na dose 0,3-10 mg/Kg e via oral na dose 3-30 mg/Kg inibiu a fase neurogênica (primeira fase) e a fase inflamatória (segunda fase).

Os mesmos autores com intuito de avaliar o mecanismo de ação do processo anti-inflamatório do extrato diclorometano, da fração semipurificada FIII e da cucurbitacina B, de *Wilbrandia*

ebracteata, utilizaram o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Pode-se observar que o extrato em diclorometano nas doses 0,3-10 mg/Kg (i.p) e 3-30 mg/Kg (v.o) produziu uma significativa inibição do influxo de células para cavidade pleural induzida pela carragenina, ainda que de forma dose não dependente. Também, foi possível constatar que tanto o extrato em diclorometano nas doses 0,01-10 mg/Kg (i.p) e 0,1-10 mg/Kg (v.o), como a cucurbitacina B na dose 0,1 mg/Kg (i.p) diminuíram os níveis de prostaglandina PGE₂ (PETERS et al., 1999).

O tratamento dos camundongos com a fração em diclorometano por via oral (1, 3, 10 mg/Kg) reduziu significativamente, de forma dose-dependente, o número de contorções abdominais pelo modelo de zymosan. O controle positivo utilizado foi à indometacina (2mg/ Kg, i.p). Através do teste rota-rod foi constatado que tal fração não alterou a coordenação motora dos animais, na dose de 30 mg/ Kg (v.o). Quando administrado por via oral, a fração em diclorometano no modelo da artrite induzida pela zymosan em ratos reduziu a incapacidade articular (1, 3 e 10 mg/Kg; v.o.). A dose de 10 mg/Kg também reduziu o influxo de células para dentro da cavidade articular (PETERS et al., 2003).

Siqueira e colaboradores (2007) através do teste de pleurisia induzida pela carragenina evidenciaram a atividade da diidrocucurbitacina B na inibição do acúmulo de leucócitos na cavidade pleural, diminuição do influxo de células na dose de 10 mg/Kg (i.p) e inibição da produção de leucotrieno B₄ nas doses de 3 e 10 mg/Kg (i.p). Ainda foi observado que essa cucurbitacina na dose 10 mg/mL (i.p) inibiu em 72% a produção de prostaglandina-E₂ pela enzima COX-2 humana *in vitro*. Os autores afirmaram que o efeito anti-inflamatório *in vivo* da diidrocucurbitacina B ocorre através da inibição da enzima COX-2.

A atividade anti-ulcerogênica da fração hidrometanólico obtidas das folhas de *Wilbrandia ebracteata* foi avaliada, lembrando que os trabalhos anteriormente descritos referem-se às raízes. Pode-se constatar nesse estudo que quando as lesões gástricas eram induzidas com etanol em camundongos, observava-se uma inibição de 73% das lesões. Por outro lado, quando essas eram induzidas por indomentacina o extrato não

se mostrou eficaz. Além disso, não foi observada atividade analgésica para esta fração quando avaliadas nos testes de imersão de cauda e contorção induzida pelo ácido acético (GONZALEZ; STASI, 2002).

O efeito ulcerogênico da mucosa do estômago de ratos foi ainda avaliado para a fração diclorometano. Tal fração na dose de 30 mg/ Kg (v.o) não provocou lesões hemorrágicas, quando comparada aos controles indometacina (30 mg/Kg, v.o.) e ao ácido acetilsalicílico (100 mg/Kg, v.o). Através dos testes *in vitro* foi possível constatar que a fração em diclorometano não apresentou atividade sobre a enzima COX-1, por outro lado quando as células eram expostas a 1 e 10 µg/mL ocasionava a inibição da atividade da COX2 (PETERS et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Complementação dos estudos quanto à ocorrência de cucurbitacinas na espécie de *Wilbrandia ebracteata* e obtenção de material para avaliação das atividades biológicas e também para a realização de modificações estruturais.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar através de métodos cromatográficos cucurbitacinas das raízes de *Wilbrandia ebracteata*, buscando verificar a ocorrência de cucurbitacinas ainda não descritas.
- Comparar através de cromatografia líquida de alta eficiência extratos em diclorometano obtidos de raízes secas adquiridas no comércio e de raízes frescas não expostas ao processo de secagem.
- Elucidar através de métodos espectroscópicos de IV, RMN ^1H e ^{13}C e bidimensionais as substâncias isoladas.
- Obter derivados semissintéticos das substâncias isoladas através de reação de acetilação com piridina e anidrido acético, reação de redução com boroidreto de sódio e obtenção do derivado hemissucinato pela reação com anidrido succínico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Procedimentos gerais

4.1.1 Solventes e reagentes

Para preparação dos extratos e frações foram utilizados solventes e reagentes grau analítico de procedências variadas (Merck[®], Nuclear[®] e Vetec[®]). Nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram utilizados metanol e acetonitrila grau HPLC (MTedia[®]) e água Milli-Q (Millipore[®]).

Para as cromatografias em coluna foram utilizadas sílica gel 60 de procedência Merck[®] (tamanhos de partículas 0,04-0,063 mm/ 0,063-0,2 mm), gel de permeação molecular Sephadex LH-20 de procedência GE Healthcare[®], sílica gel 60 G para placa preparativa (5µm-40µm), sílica gel 60 RP-18 EMD[®].

Foram utilizados cromatofolhas de alumínio, para as cromatografias em CCD, de sílica gel 60 da Merck[®] F256 e Macherey-Nagel[®]. A detecção das substâncias foi através da observação sob lâmpada de ultravioleta de 254 nm e 366 nm. O agente cromogênico utilizado foi vanilina fosfórica (2,5 g de vanilina em 50 mL de etanol e 12,5 mL de ácido fosfórico 85%).

4.1.2 Equipamentos

Os espectros de RMN foram obtidos em equipamento Varian AS 400 MHZ (Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina) e em equipamento Bruker AM 500 MHZ (Instituto de Química da Universidade de Buenos Aires-Argentina). O espectro de infravermelho das substâncias foi obtido em equipamento Shimadzu Prestige-2 no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina. Espectros de massas com ionização por *electrospray* de alta resolução (ESI-HR-MS) foram obtidos em um Bruker-Daltonics MicroTOF-Q II em modo positivo utilizando H₂O/MeOH como solventes de infusão. As rotações ópticas foram determinadas em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 341, sendo as medidas realizadas a 589 nm (25 °C).

Para realização dos experimentos também foram utilizados os equipamentos listados a seguir:

- **Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência:** As análises foram realizadas em aparelho Shimadzu SCL-10A, com duas bombas isocráticas modelo LC-10AD e detector UV SPD-10AV.
- **Espectrofotômetro na região do ultra-violeta:** Espectrofotômetro Perkin Elmer UV/VIS spectrometer Lambda 10.
- **Ponto de fusão:** Equipamento da Microquímica MQAPF-301

4.2 Material vegetal

Amostras de raízes de *Wilbrandia ebracteata* foram originalmente coletadas no município de Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul e identificadas pelo Prof. Dr. Sérgio A. L. Bordignon (UNILASSALE, RS); material adicional foi adquirido no comércio, de empresa que comercializa as raízes já dessecadas. Além disso, tendo como finalidade análise comparativa entre o extrato preparado com as raízes secas e frescas, foi realizada uma nova coleta das raízes de *Wilbrandia ebracteata* no bairro Cacupé/Florianópolis em 2009, sendo o material também autenticado pelo botânico Prof. Dr. Sérgio A. L. Bordignon.

4.3 Preparação dos extratos

Para realização da investigação química foi preparado extrato em diclorometano, em virtude do intuito do trabalho estar centrado no isolamento de substâncias com características mais apolares que a diidrocucurbitacina B.

4.3.1 Preparação do extrato em diclorometano

As raízes de *Wilbrandia ebracteata*, tanto as adquiridas no comércio previamente secas (Nova Petrópolis) como as recentemente coletadas em Florianópolis (frescas), foram submetidas à maceração em diclorometano P.A, por 3 dias, e, após filtração e prensagem, o resíduo foi novamente macerado. Tanto para as raízes frescas como secas a proporção utilizada 50 g (droga vegetal)/100 mL (líquido extrator).

Os extratos em diclorometano foram concentrados em evaporador rotatório a temperatura inferior a 50° C resultando em 27,0 g de extrato a partir das raízes secas (1,5 Kg) e de 2,0 g do extrato obtido das raízes frescas (500 g).

4.3.2 Comparação da composição química do material adquirido no comércio (raízes secas) e do material coletado (raízes frescas) de *Wilbrandia ebracteata*

As raízes frescas e secas de *Wilbrandia ebracteata*, assim como as frações obtidas durante fracionamento em coluna tipo *flash*, foram analisadas cromatograficamente por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência.

As cromatografias em camada delgada foram desenvolvidas em cromatoplasas em gel de sílica 60 F₂₅₄, fase móvel hexano: acetato de (6:4; V/V). As cromatografias foram reveladas com vanilina fosfórica/aquecimento e observadas sob luz UV 254 nm e 366 nm.

A análise por cromatografia Líquida de Alta Eficiência das mesmas foi realizada baseada na publicação de KREPSKY e colaboradores (2009). A coluna utilizada foi coluna analítica C18 (150 X 4,6 mm; 5 µm), fase móvel acetonitrila na bomba A e água na bomba B (40:60, V/V; modo isocrático). O fluxo da fase móvel foi igual a 1,0 mL/min e a detecção das substâncias ocorreu por absorção UV a 230 nm.

4.4 Isolamento, purificação e identificação das substâncias WT-01, WT-02 e WT-03

4.4.1 Fracionamento em coluna cromatográfica do *tipo flash* do extrato obtido a partir das raízes secas

Uma parte do extrato em diclorometano (9,0 g), obtido das raízes secas de *Wilbrandia ebracteata*, foi submetido a fracionamento a vácuo utilizando funil de vidro sinterizado com granulometria G4 (d = 7 cm; h = 18 cm de altura), contendo 35 g de sílica gel 60 G para placa preparativa. Foi empregado como fase móvel hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade (70:30 à 20:80). Ao final, para eluição das substâncias

retidas na coluna foi utilizado acetato de etila 100%, obtendo-se dessa forma 7 frações. O volume de cada sistema de fase móvel utilizado em cada fração foi de 300 mL. A seguir as frações obtidas foram secas com auxílio de evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura inferior a 50 °C

4.4.2 Fracionamento sobre coluna em gel de sílica das frações obtidas da coluna cromatográfica tipo *flash*

Em virtude das características cromatográficas semelhantes observadas por CCD e por CLAE, além dos rendimentos apresentados (tabela 8). As frações 50:50 e 40:60, oriundas da coluna vácuo (*flash*), foram então reunidas resultando em cerca de 4,15 g da mistura dessas frações. Posteriormente, uma parte das frações reunidas (1,0 g) foi submetida a um novo processo de separação cromatográfica sobre 100 g de gel de sílica (granulometria 0,063-0,02 mm) em coluna de vidro (d = 3,5 cm; h = 40 cm de altura), com a mesma fase móvel empregada na separação anterior, em ordem crescente de polaridade (70:30-30:70, V/V), tendo sido utilizado 200 mL para cada sistema de eluente.

Foram obtidas 50 frações, posteriormente agrupadas em 5 (FW1, FW2, FW3, FW4 e FW5), de acordo com a semelhança cromatográfica observada na cromatografia em camada delgada (figura 5).

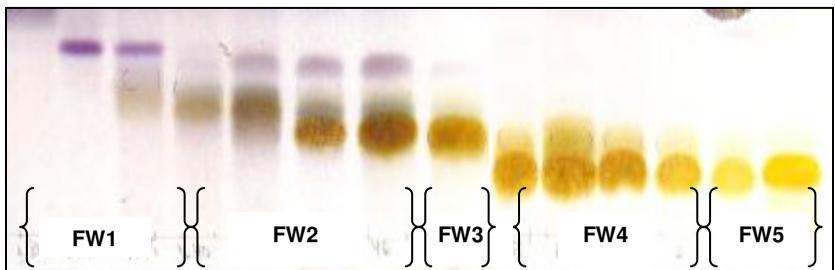


Figura 5: Perfil cromatográfico das frações obtidas a partir da coluna cromatográfica em sílica.

Fase móvel: hexano:acetato de etila (50:50, V/V).

Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄.

Deteção: Vanilina fosfórica/ aquecimento.

Os rendimentos obtidos para as frações FW1, FW2, FW3, FW4 e FW5 são representadas no esquema da figura 6.

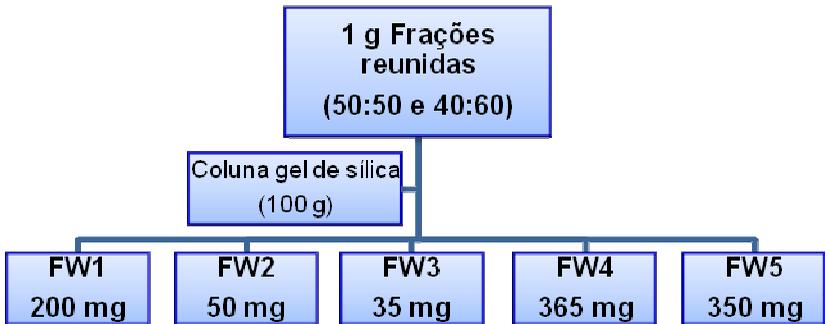


Figura 6: Esquema de fracionamento das frações reunidas da coluna tipo *flash*.

4.4.3 Isolamento da substância WT-01 a partir do fracionamento da fração FW3

Para a purificação da fração FW3 (35 mg) foi realizada uma nova coluna (d = 1cm; h = 20 cm de altura) sobre gel de sílica (10 g; granulometria 0,04-0,063 mm), empregando a mistura de eluentes de polaridade crescente hexano: acetato de etila o que resultou no isolamento da substância WT-01 com as seguintes características físicas:

- Pó fino e branco (Aspecto físico).
- 105-107° C (Ponto de fusão).
- 273 nm (UV-amostra dissolvida em metanol); 375 (ε).

A substância foi ainda analisada por espectroscopia de RMN ^1H , RMN ^{13}C , correlações (COSY, HSQC/DEPT, HMBC e NOESY) e infravermelho. Os espectros de massas e a medida da atividade ótica da substância WT-01 estão em andamento.

4.4.4 Obtenção dos derivados semisintéticos do composto WT-01

A partir do composto WT-01 foram preparados os derivados: acetilado com piridina e anidrido acético, reduzido com NaBH_4 e hemissuccinato com anidrido succínico.

4.4.4.1 Derivado acetilado

Em um tubo de ensaio contendo 20 mg da substância WT-01, foram adicionados os reagentes piridina 0,3 mL e anidrido acético 0,9 mL. A mistura ficou sob repouso durante 72 horas. Foi então adicionado gelo, contudo não ocorreu a formação do precipitado. A mistura foi então transferida para um funil de separação. Essa foi extraída com 3 x 40 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e o filtrado evaporado sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna com granulometria 0,04-0,063 mm ($d = 1$ cm; $h = 20$ cm), utilizando hexano/acetato de etila como eluentes, resultando no composto WT-01 _acetilado (18 mg), com as seguintes características físicas:

- Pó fino e branco (Aspecto físico)
- 140-141° C (Ponto de fusão)
- 268 nm (UV-amostra dissolvida em metanol); 276,5 (ϵ)

A substância foi ainda analisada por espectroscopia de RMN ^1H , RMN ^{13}C , correlações (COSY, HSQC/DEPT, HMBC e NOESY) e infravermelho.

4.4.4.2 Derivado obtido por redução com NaBH_4

O agente redutor utilizado nessa reação para obtenção do derivado reduzido foi NaBH_4 . O produto de partida WT-01 (30 mg) foi solubilizado em CH_2Cl_2 (2 mL) e EtOH (2 mL), e seqüencialmente transferido para um balão com fundo cônico, onde posteriormente foi adicionado NaBH_4 , mantendo a reação à temperatura de 0°C sob agitação durante 2 horas. A mistura reacional foi neutralizada com HCl 1N e o solvente evaporado a

um quinto do seu volume sob pressão reduzida. Este foi então extraído com acetato de etila e água. A fase orgânica foi filtrada, seca com Na_2SO_4 e novamente concentrado sob pressão reduzida resultando no composto WT-01 (21 mg), com as seguintes características físicas:

- Pó fino amarelado (Aspecto físico).
- 120-123° C (Ponto de fusão).
- 268 nm (UV-amostra dissolvida em metanol); 151,5 (ϵ).

A substância foi ainda analisada por espectroscopia de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações (COSY/HSQC/DEPT) e infravermelho.

4.4.4.3 Derivado obtido por esterificação com anidrido succínico

A uma solução contendo WT-01 (30 mg) em CH_2Cl_2 seco (3mL) e piridina (0,3 mL) foi adicionado anidrido succínico (30 mg) e dimetil-aminopiridina (DMAP). A mistura reacional ficou sob agitação em atmosfera de nitrogênio durante 72 horas, sendo que a cada 12 horas a reação era monitorada por cromatografia em camada delgada. Foram obtidos dois produtos com rendimento global de 20 mg. Através de coluna de vidro com gel de permeação Sephadex LH-20 utilizando metanol como fase móvel, obteve-se 6 mg (HEM1) e 10 mg (HEM2). Foram observadas as seguintes características físicas foram observadas para o derivado HEM1:

- Pó fino amarelado (Aspecto físico).
- 130-132° C (Ponto de fusão).
- 278 nm (UV-amostra dissolvida em metanol); 280 (ϵ).

A substância foi também analisada por espectroscopia de RMN ^1H e infravermelho.

4.4.5 Isolamento das substâncias WT-02 e WT-03 a partir do fracionamento das frações FW4 e FW5

Com a fração FW4 (365 mg) e FW5 (350 mg) foram realizadas colunas cromatográficas utilizando gel de sílica (37 g e 35 g, respectivamente) com granulometria 0,04-0,063 mm utilizando a mistura de eluentes hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade (60:40 à 30:70). Cada sistema de fase móvel passado na coluna foi de 150 mL.

Como resultado dessa primeira coluna realizada com a fração FW4 foram obtidas cerca de 60 frações, das quais foram reunidas as frações 32 à 55 por apresentarem majoritariamente duas substâncias que não puderam ser separadas (320 mg) nesse momento. Essa fração foi então aplicada em coluna de vidro ($d = 2$ cm; $h = 45$ cm de altura) sobre sílica gel 60 RP-18 (40 g), utilizando trompa d'água (vácuo). O sistema de eluentes empregado foi acetonitrila e água, 50 ml para cada sistema (100% H₂O; ACN: H₂O 30:70; ACN: H₂O 50:50, 100% ACN). As quatro frações foram concentradas em evaporador rotatório e, posteriormente cromatografadas em CCD. Pode-se observar que as duas substâncias permaneceram juntas e concentradas na fração ACN: H₂O (50:50).

Como os resultados obtidos nas separações anteriores não foram satisfatórios, parte da mistura (60 mg/mL) foi então submetida à cromatografia líquida de alta eficiência. Os parâmetros utilizados nas análises foram:

- Coluna preparativa Shim-pack ODS (250 x 21.2 mm; 10 mm);
- Fases móveis testadas: acetonitrila:água (4:6; v/v) e acetonitrila:metanol (1:1);
- Fluxo de 4mL/min;
- Detecção 230 nm.

Após a realização de 4 análises por CLAE, obteve-se a substância WT-02 (2,1 mg) e a substância WT-03 (200 mg) presentes na fração FW4. A substância WT-03 (320 mg) foi obtida através da purificação da fração FW5 em coluna de vidro ($d = 2,5$ cm; $h = 36$ cm de altura) sobre gel de sílica (30 g) com

tamanho de partícula 0,04-0,063 mm. As características físicas observadas para WT-02 e WT-03 foram:

- | WT-02 | WT-03 |
|---------------|------------------------------|
| • Pó branco; | Pó branco (Aspecto físico); |
| • 224-226 °C; | 180-183 °C (Ponto de fusão); |

As substâncias foram analisadas através da comparação com padrões disponíveis no laboratório por cromatografia em camada delgada e também por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram obtidos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e infravermelho. Contudo, em virtude de tratar de cucurbitacinas já descritas por Farias e colaboradores (1993) estes dados não serão apresentados na elucidação estrutural dessas substâncias.

Na figura 7 é mostrado esquema representativo do isolamento das substâncias WT-01, WT-02 e WT-03 e dos derivados semissintéticos.

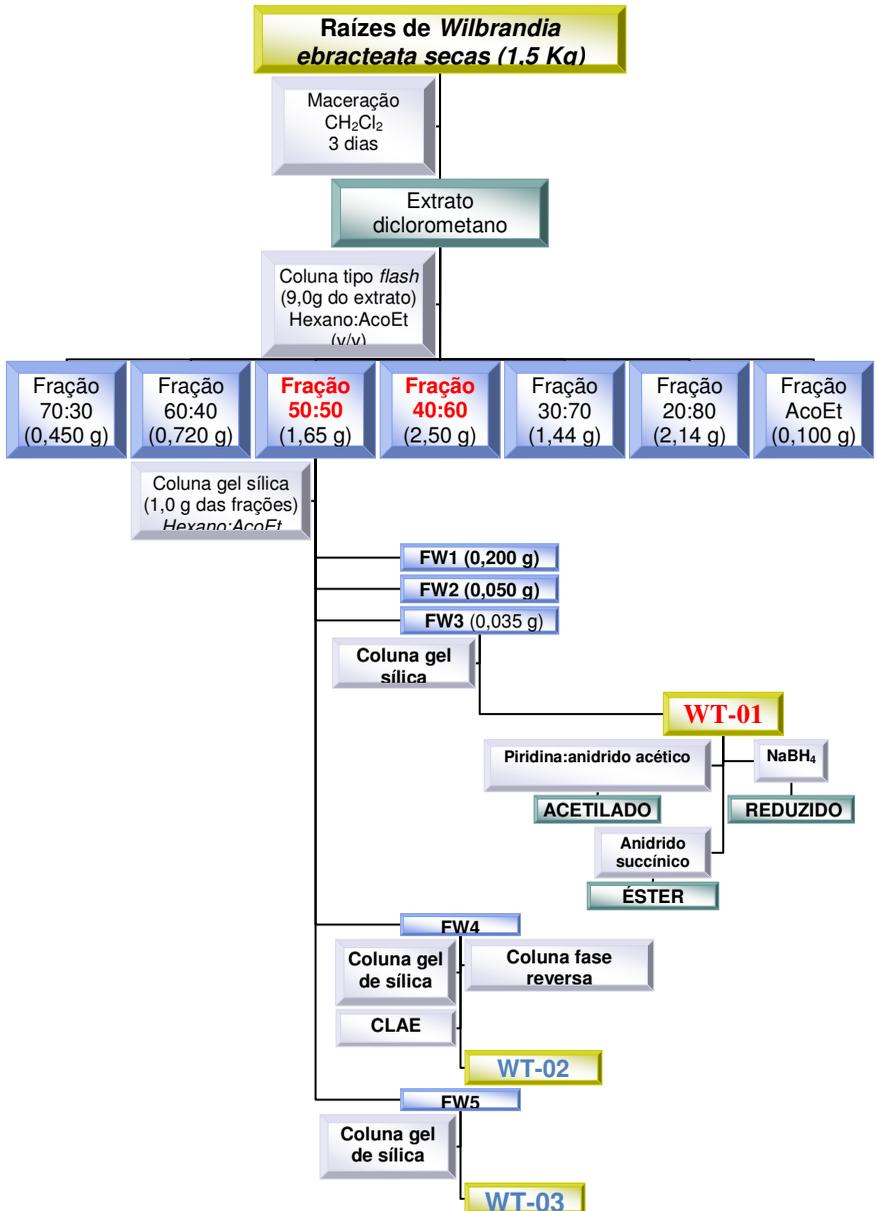


Figura 7: Representação esquemática do isolamento das substâncias WT-01, WT-02 e WT-03 e dos derivados semissintéticos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizada a análise das raízes de *Wilbrandia ebracteata*, visando o isolamento de compostos já conhecidos e a possível presença de compostos diferentes daqueles já descritos (FARIAS et al., 1993; SCHENKEL et al., 1992; FARIAS et al., 1987; BAUER et al., 1985). Para tanto foi utilizado o extrato em diclorometano obtido a partir de 1,5 Kg das raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Ao mesmo tempo, para certificação da autenticidade do material foi preparado o extrato com as raízes coletadas recentemente (frescas), junto com material botânico necessário para identificação. Esses materiais vegetais passam a ser aqui designados como raízes frescas e raízes secas.

5.1 Análise comparativa dos extratos em diclorometano de raízes frescas e secas de *Wilbrandia ebracteata*

Através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram analisados materiais provenientes das raízes secas adquiridas no comércio e de raízes coletadas recentemente e extraídas logo após a coleta, sem expor o material a um processo de secagem. A comparação por cromatografia em camada delgada (figura 8) dos extratos em diclorometano de raízes frescas e secas mostraram a presença dos mesmos compostos predominantes, sendo possível observar várias manchas com o mesmo comportamento cromatográfico (r_f e coloração), após revelação com agente cromogênico vanilina fosfórica/aquecimento.

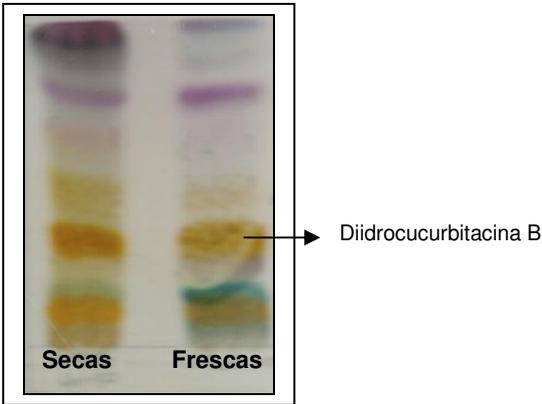


Figura 8: CCD do extrato em diclorometano das raízes secas e frescas de *Wilbrandia ebracteata*.
 Fase móvel: hexano:acetato de etila (60:40, V/V).
 Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄.
 Detecção: Vanilina fosfórica/aquecimento.

Com intuito de realizar uma análise qualitativa, foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência algumas cucurbitacinas isoladas já descritas, das quais havia disponibilidade de amostras autênticas em nosso laboratório. Inicialmente foram realizadas análises com as cucurbitacinas designadas como cucurbitacina R, isocucurbitacina R, cucurbitacina B e diidrocucurbitacina B. Os padrões da diidroisocucurbitacina B e diidrocucurbitacina E também foram analisados, contudo seus cromatogramas serão apresentados posteriormente. Nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos padrões de cucurbitacinas (Figura 9) e extratos em diclorometano (Figura 10) foi utilizado o sistema desenvolvido por KREPSKY (2009), consistindo da fase móvel acetonitrila e água (40:60, V/V; modo isocrático), coluna (150 X 4,6 mm; 5 µm) com sílica de fase reversa (C18). O comprimento de onda empregado na detecção das substâncias foi de 230 nm.

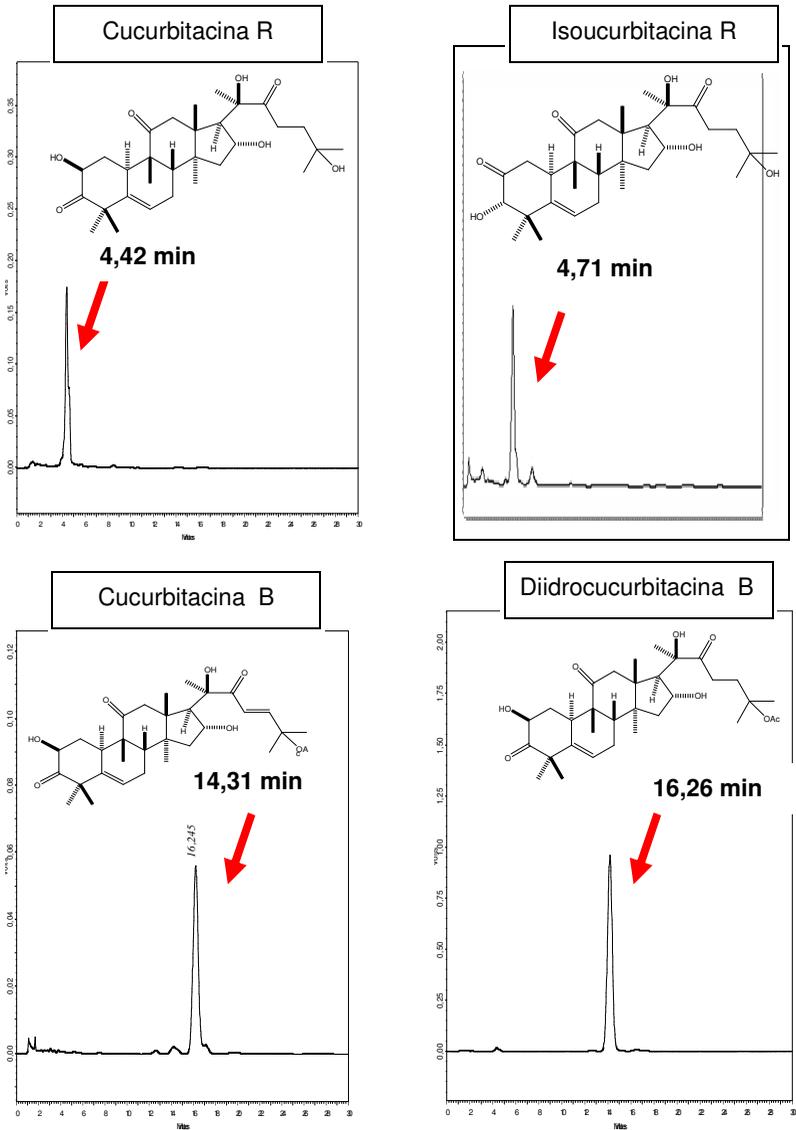


Figura 9: Cromatogramas, obtidos por CLAE, de cucurbitacinas já descritas na literatura.

Coluna: C18(150 X 4,6mm).

Eluente: CH₃CN:H₂O (40:60; V/V) - modo isocrático.

Deteção: 230 nm.

Fluxo: 1 mL/min.

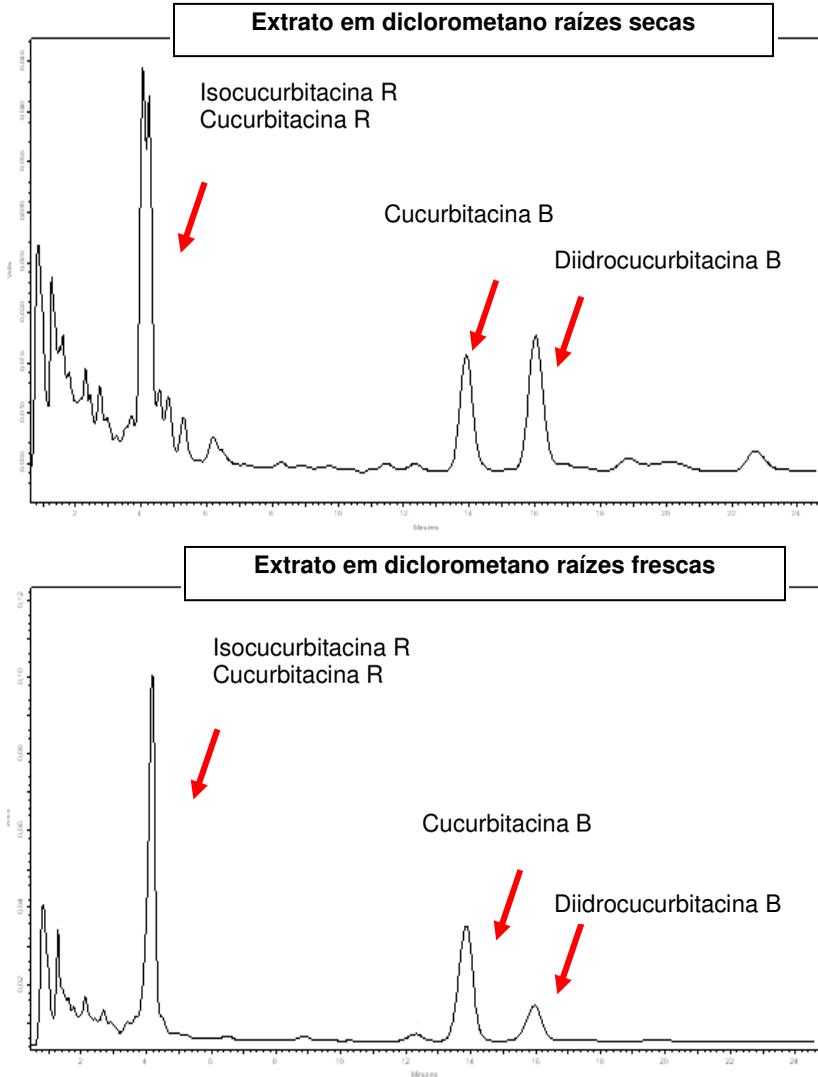


Figura 10: Cromatogramas, obtidos por CLAE, das análises realizadas com extratos em diclorometano das raízes secas e frescas de *Wilbrandia ebracteata*.

Coluna: C18 (150 X 4,6 mm)

Eluente: CH₃CN:H₂O (40:60; V/V) – modo isocrático

Deteção: 230 nm

Fluxo: 1 mL/min

Os cromatogramas obtidos pelas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência indicam que os extratos, obtidos a partir de raízes frescas e secas, apresentam um perfil semelhante quanto à composição química em cucurbitacinas. No entanto, observam-se algumas diferenças quantitativas, especialmente em relação as substâncias predominantes nos extratos: em raízes frescas observa-se que os componentes majoritários são a cucurbitacina R e a isocucurbitacina R e a cucurbitacina B, enquanto que em raízes secas predominam também a cucurbitacina R e a isocucurbitacina R, mas a diidrocucurbitacina B apresenta um teor maior. Dessa forma, observa-se uma variação no teor das cucurbitacinas entre o extrato preparado com as raízes frescas e secas, especialmente para a cucurbitacina B. Esse fato pode ser decorrente da utilização de raízes provenientes de diferentes localidades ou diferentes épocas de coleta, mas também pode estar relacionado a um processo de degradação da cucurbitacina B com o processo de secagem, o que não foi investigado. A tabela 8 mostra as áreas dos principais picos.

Tabela 8: Comparação da área dos picos dos extratos obtidos a partir das raízes frescas e secas.

Cucurbitacina Isolada	[] da amostra	Tempo de Retenção	Raízes frescas (Área)	Raízes secas (Área)
Cucurbitacina R	100 µg/mL	4,42 min	1461528	729129
Isocucurbitacina R	100 µg/mL	4,71 min		
Cucurbitacina B	100 µg/mL	14,31 min	934564	321147
Diidrocucurbitacina B	100 µg/mL	16,26 min	306525	415848

Os valores dos rendimentos obtidos com os extratos em diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata* são apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Rendimentos da extração das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

Extratos	Massa	Rendimento*
Raízes Frescas*	500 g	0,40 %
Raízes Secas	1,5 Kg	1,80%

*As raízes frescas foram cortadas, enquanto que as raízes secas foram moídas.

Diante, desses dados, o trabalho foi então realizado com material vegetal raízes secas. Inicialmente foram feitas sucessivas coluna tipo flash com cerca de 9,0 g do extrato. Com esse procedimento foram obtidas 7 frações e tiveram seus rendimentos calculados conforme a tabela 10.

Tabela 10: Rendimentos das frações obtidas a partir da coluna tipo *flash* das raízes de *Wilbrandia ebracteata*.

Fração	Massa (g)*	Rendimento (%)
Fração 70:30	0,45	5,0
Fração 60:40	0,72	8,0
Fração 50:50	1,65	18,3
Fração 40:60	2,50	27,8
Fração 30:70	1,44	16,0
Fração 20:80	2,14	23,7
Fração Acetato	0,10	1,2

* Valores calculados baseados em 9,0g de extrato em diclorometano.

A análise cromatográfica por cromatografia em camada delgada das frações obtidas da coluna tipo flash são apresentadas na figura 11.

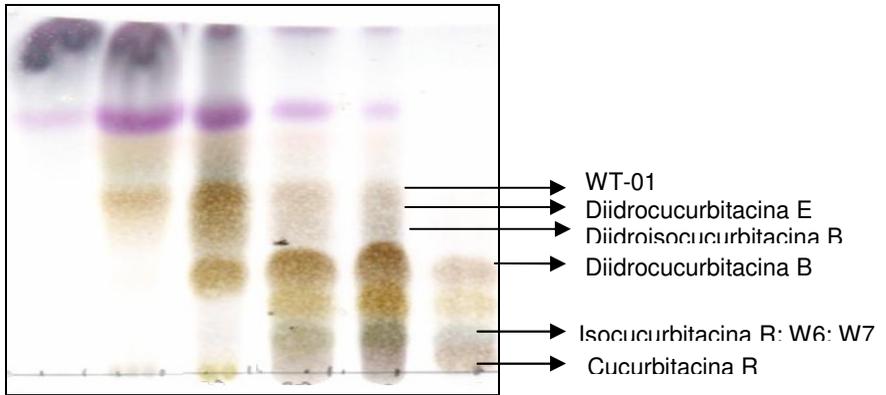


Figura 11: CCD de frações obtidas a partir de coluna cromatográfica tipo *flash* com as raízes secas.

Fase móvel: hexano:acetato de etila (60:40, V/V).

Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄. Detecção: Vanilina fosfórica/aquecimento.

Em um primeiro momento, com resultado da cromatografia em camada delgada observa-se a presença da diidrocucurbitacina B, em quatro das frações da coluna cromatográfica do *tipo flash*, cucurbitacina essa já descrita como majoritária no extrato em diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Pode-se constatar ainda, que dentre essas, as frações 50:50 e 40:60, foram as que apresentaram o maior número de compostos em diferentes *rf*. Diante do que foi exposto, associado aos maiores rendimentos, conforme apresentado em materiais e métodos, essas foram às frações inicialmente escolhidas para o isolamento de cucurbitacinas.

5.2 Isolamento e identificação de cucurbitacinas a partir do extrato diclorometano de raízes secas

5.2.1 Isolamento e identificação da substância WT-01

Na análise por cromatografia líquida de alta eficiência a substância com tempo de retenção de 19,20 min, diferente dos padrões de cucurbitacinas anteriormente analisados, não pode ser identificada através da comparação com amostras autênticas disponíveis no laboratório (FARIAS, 1991).

Na análise por cromatografia em camada delgada (figura 12), pode-se observar que a substância WT-01 (rf=0,59) apresenta um rf muito próximo a diidroisocucurbitacina B (rf=0,57), diidrocurcubitacina B (rf=0,55).

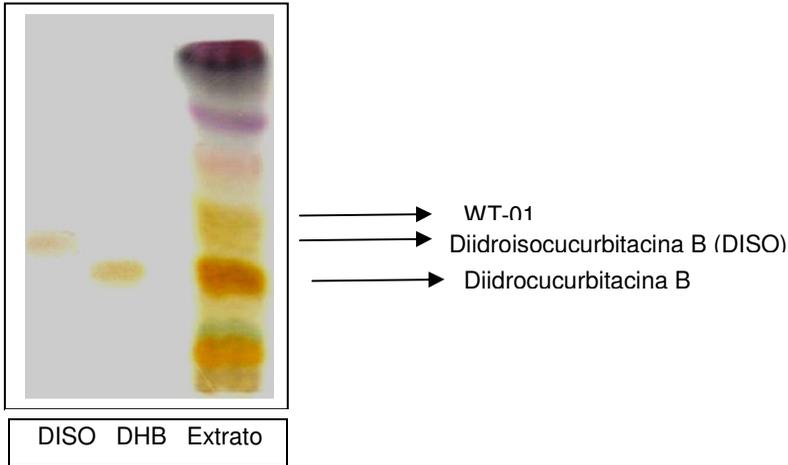


Figura 12: CCD extrato em diclorometano das raízes secas e padrões DISO e DHB.

Fase móvel: hexano:acetato de etila (60:40, V/V).

Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄.

Deteção: Vanilina fosfórica/ aquecimento.

Para o isolamento dessa substância foram reunidas as frações 50:50 e 40:60 (1,0 g), e realizadas subseqüentes separações cromatográficas, conforme descrito na parte experimental. Foram obtidos 25 mg dessa substância, codificada como WT-01.

5.2.2 Isolamento e identificação das substâncias WT-02 e WT-03

Os procedimentos cromatográficos realizados a partir da fração 50:50 e 40:60, permitiram além da separação da substância WT-01, a obtenção das substâncias WT-02 e WT-03, com características similares a diidroisocucurbitacina B e diidrocurcubitacina B, respectivamente. A identidade dessas

substâncias foi confirmada pelo ponto de fusão, cromatografia em camada delgada e por CLAE. Como resultado, foram obtidos 2,1 mg da substância WT-02 e 715 mg da substância WT-03.

Para elucidação estrutural dos compostos isolados foram utilizados espectros de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT, HSQC, COSY, HMQC e NOESY. Os dados obtidos foram comparados com espectros da literatura para cucurbitacinas com características similares aos dos compostos isolados. Para a interpretação dos espectros de UV e IV foram utilizados basicamente as seguintes literaturas: BREIATMAIER (1993); RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS (2001) e SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE (2005).

5.3 Isolamento e elucidação estrutural da substância WT-01

A substância WT-01 (25 mg) foi isolada como um pó fino e branco com ponto de fusão na faixa de 105 e 107 °C, a partir de diferentes frações do fracionamento em coluna a vácuo, após purificação em coluna cromatográfica de gel de sílica. Na análise cromatográfica essa substância apresentou valor de r_f 0,59 no sistema hexano:acetato de etila (60:40, V/V), com presença de extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 254 nm. Após revelação com vanilina-fosfórica, foi verificado o desenvolvimento da coloração amarela indicativo da presença de cadeia lateral saturada.

Avaliação do espectro de infravermelho (figura 13) mostra uma banda larga centrada em 3452 cm^{-1} que junto com a banda 1089 cm^{-1} (C-O-) sugere a presença de hidroxila livre (-OH) na molécula. Em 2968 cm^{-1} e 2954 cm^{-1} observa-se bandas de forte intensidade, característica do estiramento C-H.

Observam-se também absorções como de compostos carbonílicos em 1710 cm^{-1} e em 1693 cm^{-1} , além de absorção de menor intensidade 1650 cm^{-1} provavelmente de estiramentos olefínicos (-C=C-).

A análise conjunta do espectro de RMN ^{13}C (figura 14) e os experimentos HSQC- DEPT (figura 15) indicaram a presença 30 átomos de carbonos, sendo dez carbonos quaternários, seis carbonos metínicos, sete metilenos e sete grupos metilas. Em relação a estes carbonos, três sinais estão relacionados com os carbonos carbonílicos (δc 213,9, δc 213,0 e δc 212,1), provavelmente de carbonilas de cetonas saturadas, quatro sinais devem ser atribuídos a carbonos olefínicos (δc 144,5, δc 140,5, δc 120,4 e δc 110,5) e três sinais podem ser atribuídos a carbonos carbinólicos (δc 78,9, δc 71,7 e δc 71,1). Os demais sinais estão localizados na faixa entre δc 18,9 e δc 57,6, e foram atribuídos a carbonos sp^3 de metilas, metilenos e metinos. Não foram observados no espectro de RMN ^{13}C expandido (figura 14) sinais em campo mais desprotegido do espectro, região em torno de δc 170,0, referentes à presença de grupamento acetila. Portanto, pode-se inferir que a substância WT-01 não apresenta em sua estrutura esse grupamento, comum a outras cucurbitacinas.

Através de trabalhos específicos de identificação de cucurbitacinas com base em RMN ^1H (KOCH, 1963; LAVIE, 1964a, VELDE, 1983; CHE, 1985; FARIAS, 1993; CHEN, 2004) foi possível verificar a presença de sinais típicos de determinados hidrogênios e a partir destes dados começar a definir o tipo estrutural da cucurbitacina isolada. Também foram obtidos espectros RMN ^{13}C e espectros de correlação, sendo assim possível observar as conectividades entre carbonos e seus respectivos hidrogênios (HSQC), entre hidrogênios vizinhos (COSY) e entre hidrogênios e carbonos a longa distância (HMBC).

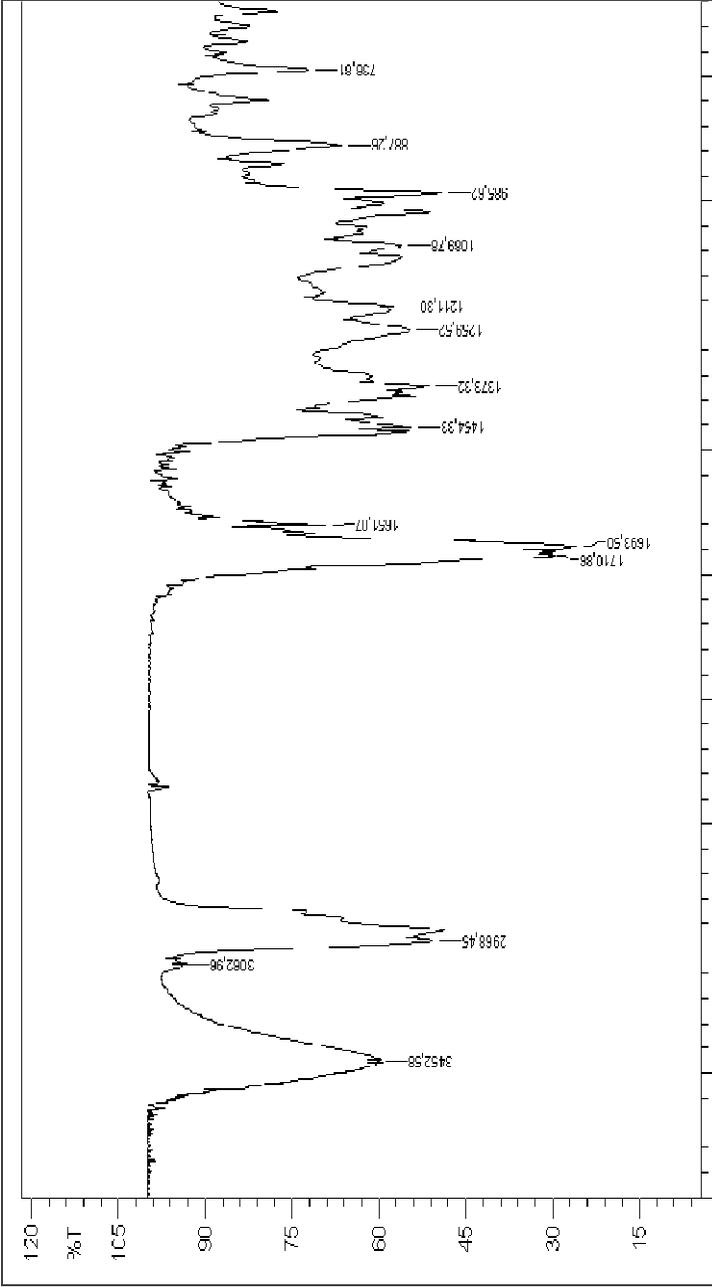


Figura 13: Espectro de infravermelho da substância WT-01 obtida na forma de pastilha com KBr através da reflectância difusa.

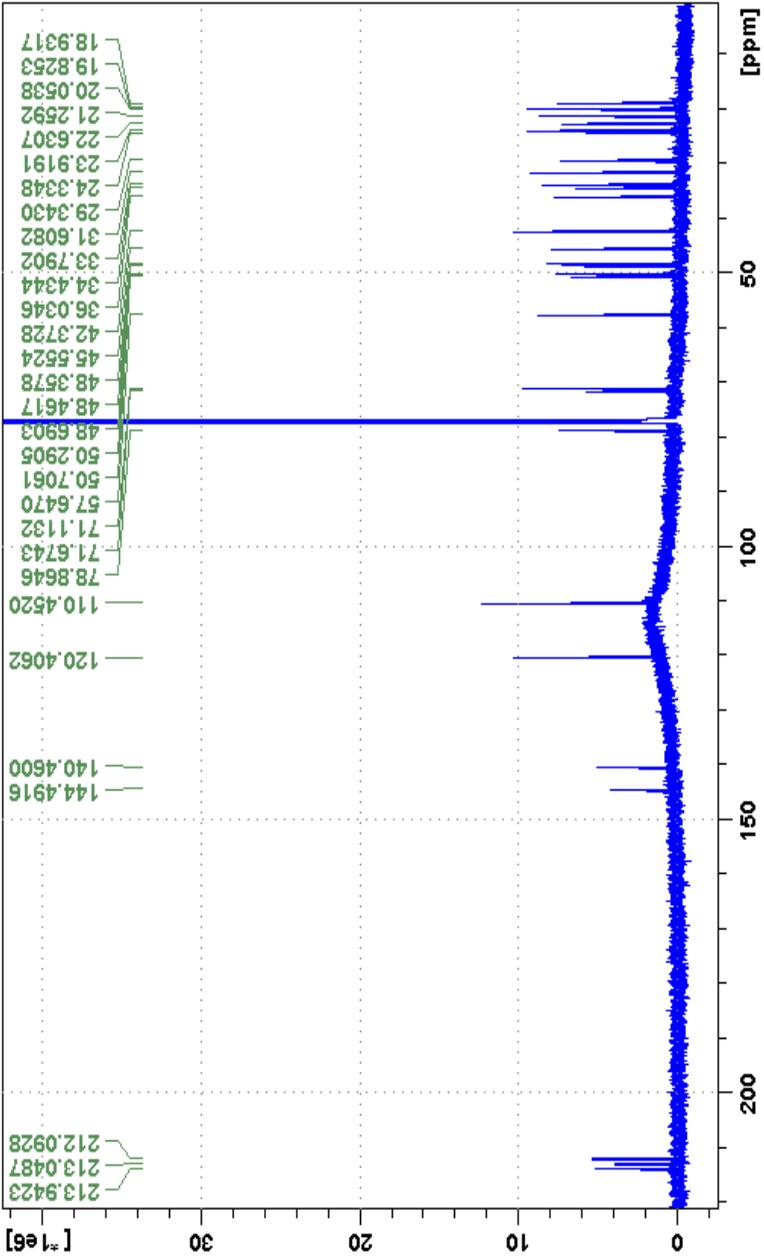


Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz), em CDCl_3 , da substância WT-01.

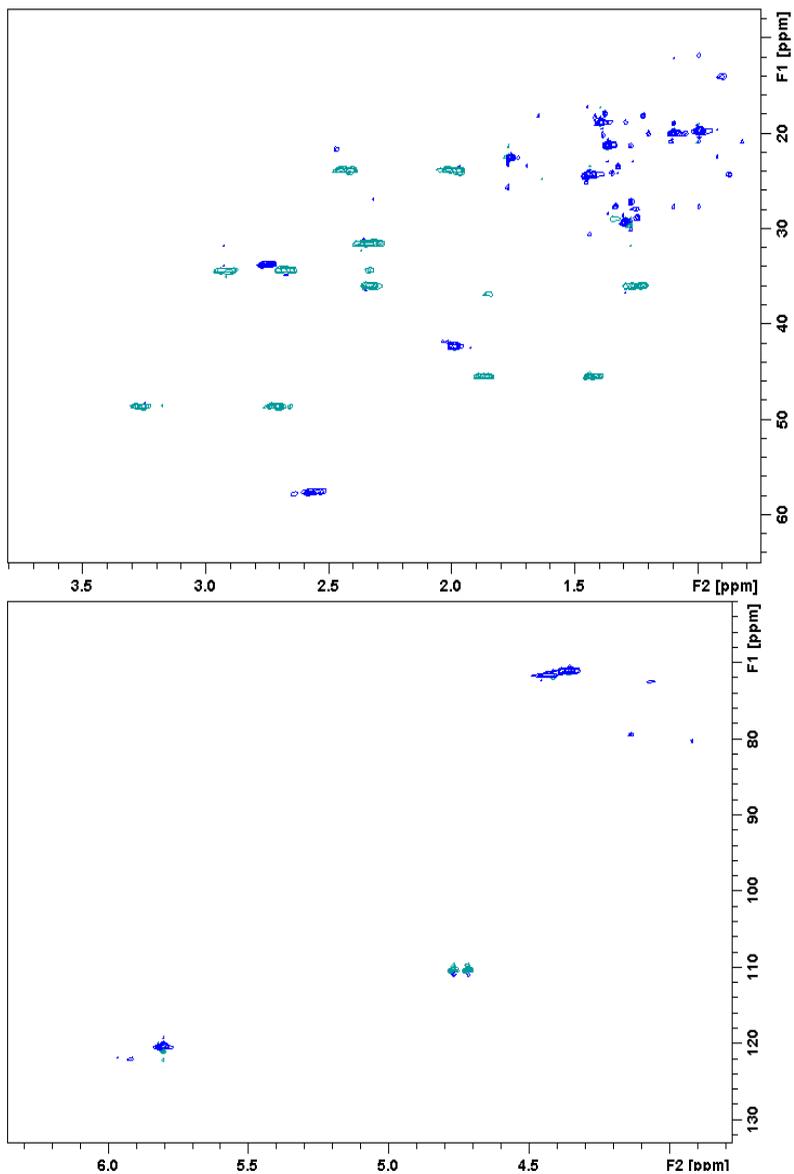


Figura 15: Espectros expandidos de correlação HSQC (500 MHz), em CDCl_3 , da substância WT-01.

Na avaliação inicial do espectro expandido RMN ^1H (figuras 16, 17 e 18) da substância WT-01 é possível constatar a presença do sinal em δ_{H} 4,42 (1H, dd, $J = 13; 6$ Hz), o qual é característico para cucurbitacinas com o sistema α -cetol no anel A, e pode ser atribuído ao hidrogênio em posição axial em C2 (posição “ α ”) acoplado aos dois hidrogênios em C1. Com essas constantes de acoplamento, pode-se concluir que o hidrogênio ligado ao carbono hidroxilado esta em posição axial (“ α ”), enquanto a hidroxila está em posição equatorial (“ β ”). Foi possível observar através do HSQC que esse hidrogênio esta conectado ao carbono δ_{C} 71,7, também ligado à hidroxila

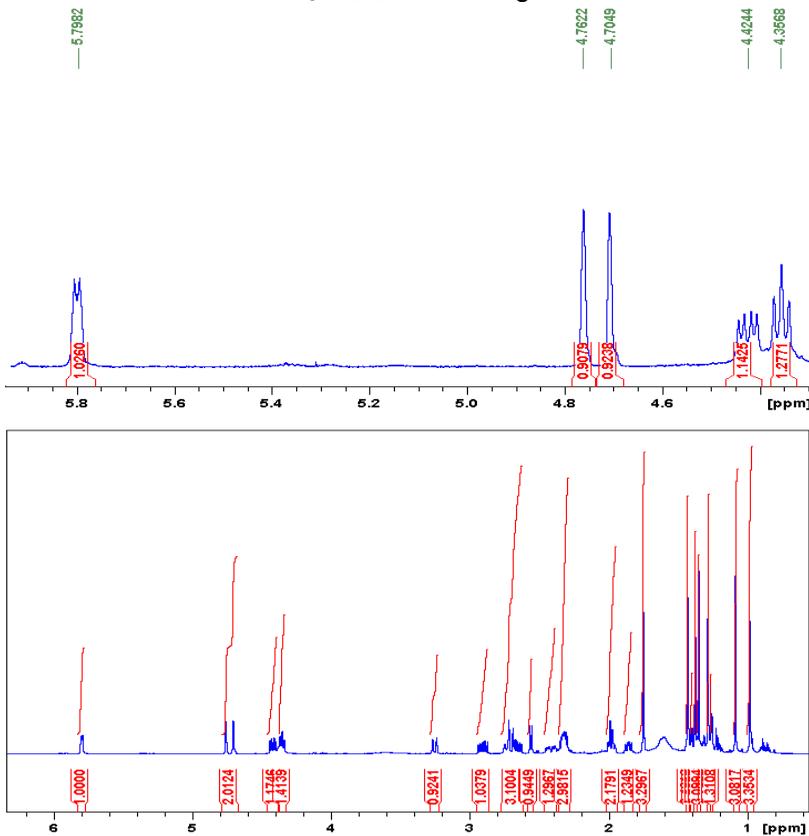


Figura 16: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) e ampliação, em CDCl_3 , da substância WT-01.

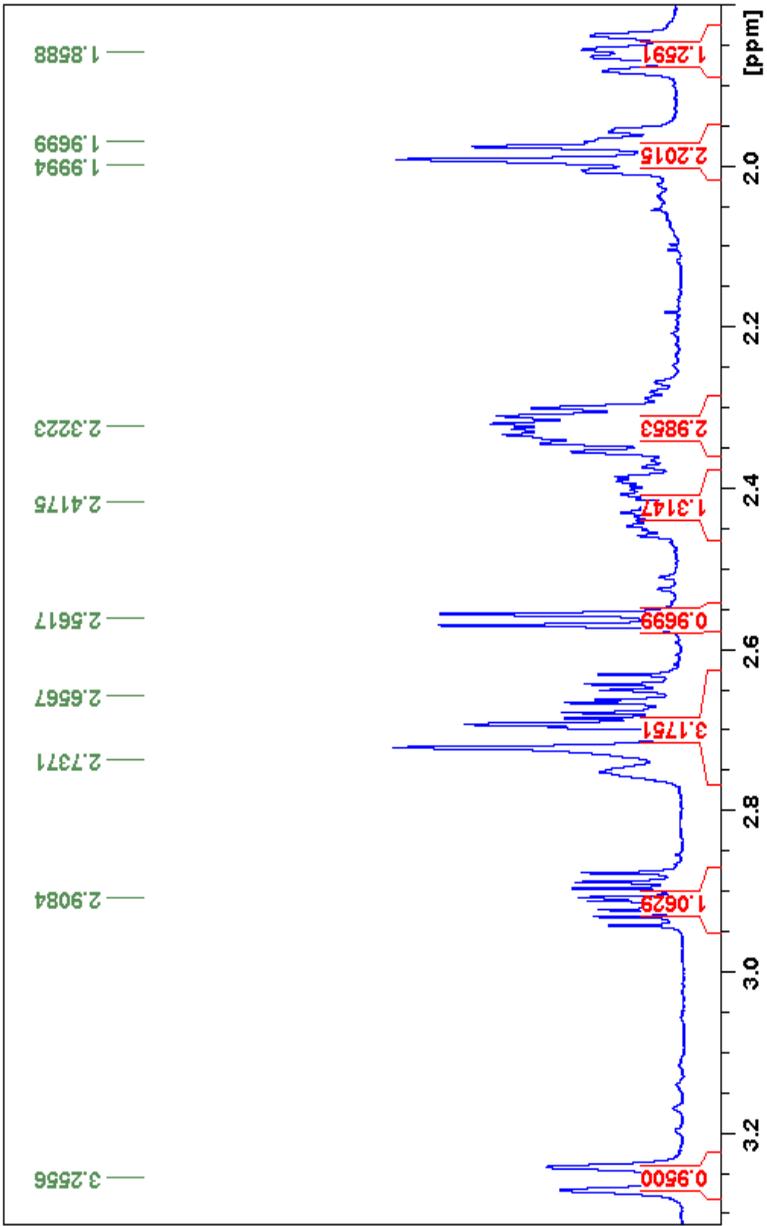


Figura 17: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz), em CDCl_3 , da substância WT-01.

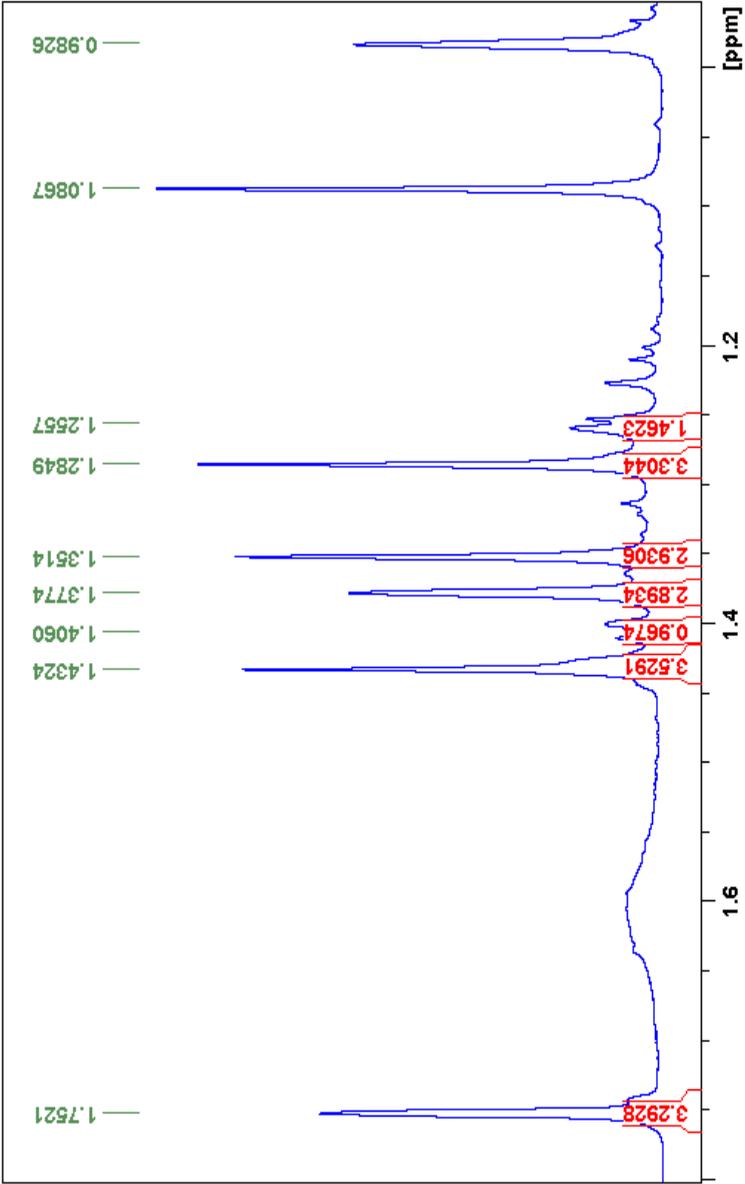


Figura 18: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz), em CDCl_3 , na região das metilas da substância WT-01.

Ainda em relação a este sinal (δ_{H} 4,42; δ_{C} 71,7), foi possível verificar pelo espectro $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY (figura 19) a correlação com os hidrogênios δ_{H} 2,32 e δ_{H} 1,23, os quais estão conectados diretamente ao átomo de carbono δ_{C} 36,0 (C1), justificando o duplo duplete observado no espectro de RMN ^1H . Os átomos de hidrogênios em δ_{H} 2,32 e δ_{H} 1,23 apresentam correlação no espectro $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY, com o hidrogênio δ_{H} 2,74. Através do HSQC pode-se verificar sinal do hidrogênio em δ_{H} 2,74 está conectado ao átomo carbono em δ_{C} 33,8 (C10).

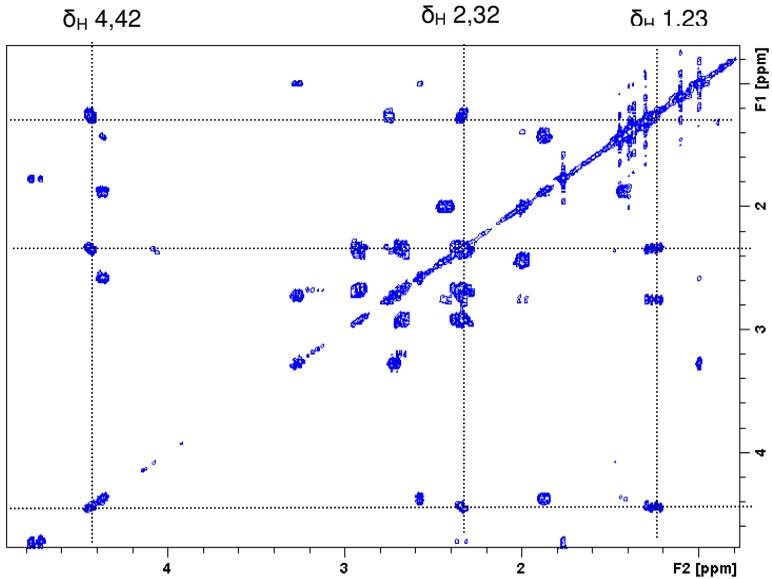
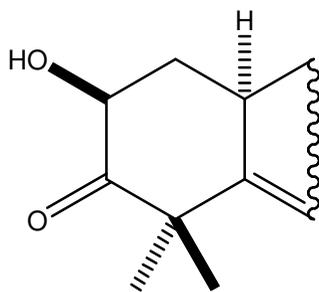
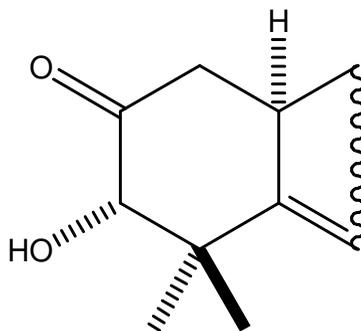


Figura 19: Espectro de correlação expandido $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY da substância WT-01.

Esse conjunto de sinais definiu a estrutura do anel A (figura 20) como de uma cucurbitacina e não isocucurbitacina, pois estas últimas caracterizam-se pela presença de um simpleto em δ_{H} 3,90 correspondente ao hidrogênio H3, sinal não observado no espectro de RMN ^1H (figura 16).



cucurbitacina



isocucurbitacina

Figura 20: Classificação do tipo estrutural do anel A de cucurbitacinas.

Com os espectros de HSQC (figura 21) foi possível identificar os carbonos correspondentes a sete metilas em δ_H 0,98, δ_H 1,09, δ_H 1,28, δ_H 1,35, δ_H 1,38, δ_H 1,43 e δ_H 1,75, que podem ser atribuídos aos átomos de carbonos em δ_C 19,8, δ_C 20,1, δ_C 29,3, δ_C 21,3, δ_C 18,9, δ_C 24,3 e δ_C 22,6, respectivamente.

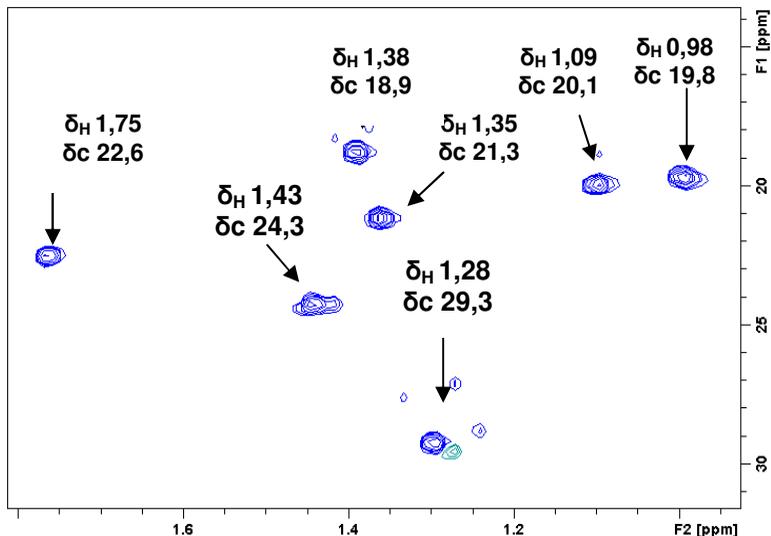


Figura 21: Espectro expandido de correlação (metilas) da substância WT-01.

Através do experimento HMBC foi possível observar que os hidrogênios metílicos em δ_H 1,28 estão correlacionando com os carbonos em δ_C 21,3, δ_C 50,3, δ_C 140,5 e δ_C 213,0. Com esse mesmo experimento, pode-se ainda observar que os átomos dos hidrogênios metílicos em δ_H 1,35 correlacionam com os átomos de carbonos em δ_C 29,3, δ_C 50,3, δ_C 120,4, δ_C 140,5, δ_C 213,0. O átomo de carbono em δ_C 213,0 refere-se à carbonila do grupamento α -cetol localizada no C3. A observação das correlações dos átomos metílicos permitiu complementar as atribuições do anel A, sendo que a análise desses dados corrobora a subestrutura 1 proposta a partir dos espectros de RMN 1H , RMN ^{13}C e de correlação que podem ser sumarizados na figura 22.

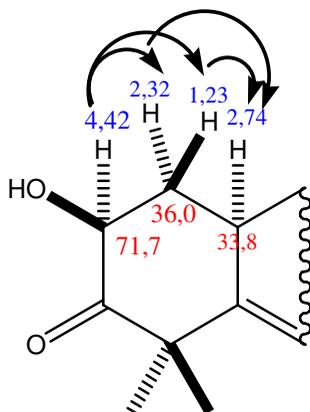


Figura 22: Subestrutura 1 com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios e carbonos mostrando as principais correlações $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY.

No espectro expandido RMN ^1H (Figura 16) da WT-01 foi observado o sinal em δ_{H} 5,80 (1H, ddd, $J = 6; 2; 2$ Hz) e que aparece no espectro de HSQC conectado ao átomo de carbono em δ_{C} 120,4. Esse átomo de hidrogênio em δ_{H} 5,80 é típico de hidrogênio olefínico em C6 originado pela dupla ligação que ocorre entre o carbono C5 e C6 do anel B. No espectro de $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY foi possível observar a correlação deste duplo duplo com os hidrogênios em δ_{H} 1,97 e δ_{H} 2,42. Os hidrogênios em δ_{H} 1,97 e δ_{H} 2,42 foram atribuídos através do HSQC ao carbono em δ_{C} 23,9 (C7). Esses hidrogênios, por sua vez, apresentam correlação $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY com o hidrogênio em δ_{H} 2,0 atribuído ao carbono em δ_{C} 42,3 (C8) através do experimento HSQC. A metila em δ_{H} 1,09 (δ_{C} 20,1) foi alocada na posição 19, tendo em vista as correlações HMBC com os carbonos em δ_{C} 33,8, δ_{C} 42,3, δ_{C} 50,3 e δ_{C} 212,1. O sinal do carbono em δ_{C} 212,1 sugere a presença da carbonila no C11.

Análise desses dados corrobora a subestrutura 2 proposta a partir dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e de correlação que podem ser sumarizados na figura 23.

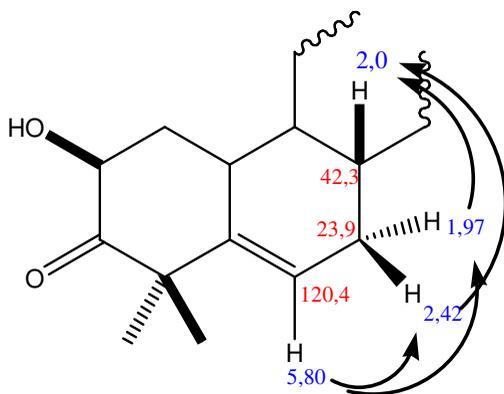


Figura 23: Subestrutura 2 com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios e carbonos mostrando as principais correlações $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY.

Outros sinais característicos observados no espectro expandido de RMN ^1H (figura 17) foram referentes aos sinais dos átomos de hidrogênios em C12, o que permitiu inferir a presença da função carbonila em C11 no anel C. O átomo de hidrogênio em C12 em posição α apresentou deslocamento químico em δ_{H} 3,26 (1H, dd, $J = 14,5; 1,0$ Hz) e o hidrogênio em posição β em δ_{H} 2,74. No espectro de correlação de $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY verificou-se a correlação com o átomo hidrogênio em δ_{H} 0,98 (s, 3H), sendo esse o sinal mais protegido do espectro RMN ^1H . Essa metila foi alocada no carbono 13 e pode ser atribuído ao carbono em δ_{C} 19,8. Através do experimento HMBC pode se observar a correlação com os carbonos em δ_{C} 48,7, δ_{C} 50,7 e δ_{C} 57,6. Ainda em relação a essa metila foi possível verificar correlação NOESY com os hidrogênios em δ_{H} 1,86, δ_{H} 2,0 e δ_{H} 4,35. O sinal do hidrogênio em δ_{H} 4,35 com multiplicidade duplo duplete ($J = 8,5; 7,0$ Hz) integrando para um hidrogênio, refere-se a presença da hidroxila em C16 no anel D, presente na maior parte das cucurbitacinas e possui correlação $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY com os hidrogênios em δ_{H} 1,40, δ_{H} 1,86 e δ_{H} 2,56.

Através do HSQC pode-se observar que o carbono em δ_{C} 57,6 está ligado ao hidrogênio em δ_{H} 2,56 (1H, d, 7,0 Hz), e que esse hidrogênio possui correlação no espectro de HMBC com os

carbonos em δ_C 19,8, δ_C 24,3, δ_C 50,7, δ_C 48,7, δ_C 71,1, δ_C 78,8 e δ_C 213,9.

A metila em δ_H 1,38 foi ligada ao carbono 14 em virtude de apresentar HMBC com os carbonos em δ_C 42,3 e em δ_C 45,6. O conjunto desses dados permitiu propor a subestrutura 3 apresentada conforme a figura 27.

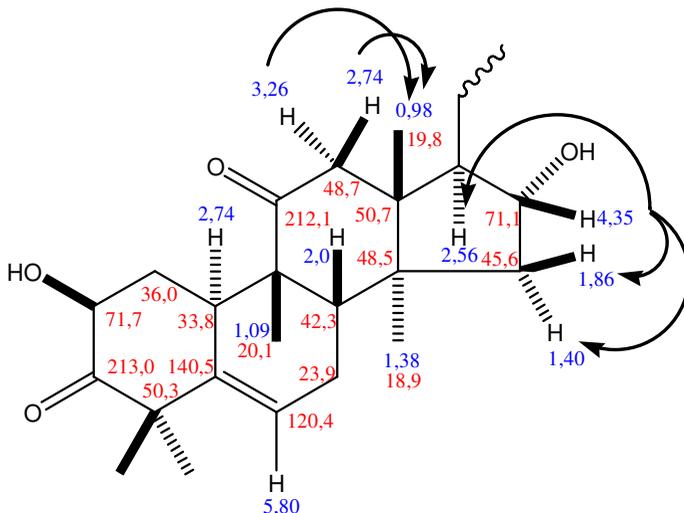


Figura 24: Subestrutura 3 com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios e carbonos mostrando as principais correlações $^1H-^1H$ -COSY

Em relação à cadeia lateral, o sinal do carbono em δ_C 24,3(CH₃) foi de grande relevância para iniciar a elucidação estrutural dessa parte da molécula da substância WT-01. Através do HSQC observa-se os hidrogênios dessa metila em δ_H 1,43 (s, 3H). No espectro HMBC é possível verificar a correlação dessa metila com os carbonos em δ_C 45,6, δ_C 57,6, δ_C 71,1, δ_C 78,8 e δ_C 213,9. Além disso, o sinal do carbono em δ_C 213,9 pode ser atribuído a carbonila na posição em C22, tendo em vista as correlações do HMBC com os carbonos em δ_C 24,3, e 57,6.

A substância WT-01 apresentou no espectro de RMN 1H (figura 16) expandido dois dupletos em δ_H 4,76 e δ_H 4,70, ambos

os sinais com constantes de acoplamento (J_{HH}) de 0,8 Hz. Em virtude da baixa constante de acoplamento desses hidrogênios, pode-se sugerir que esses estão ligados a um carbono terminal. Com o experimento HSQC expandido (figura 25), foi possível atribuir a conectividade desses dois hidrogênios ao carbono δ_c 110,4.

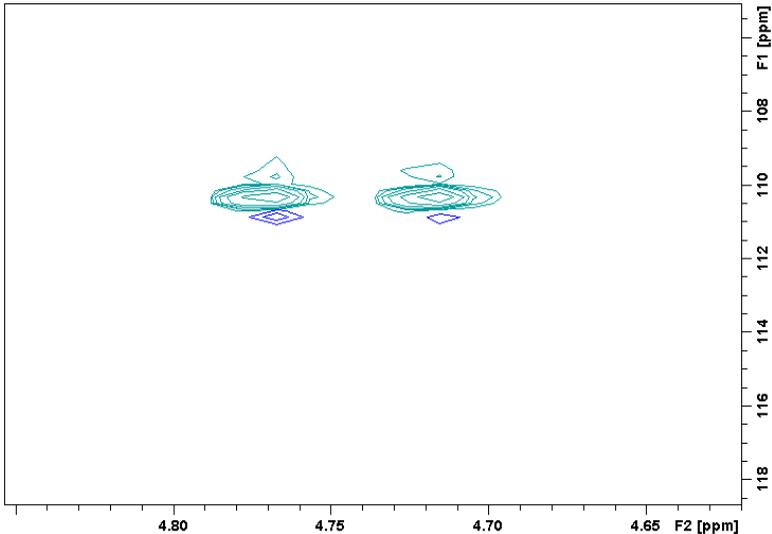


Figura 25: Espectro expandido de correlação HSQC (δ_c 110,4; δ_H 4,76 e δ_H 4,70) da substância WT-01.

Os sinais dos hidrogênios em δ_H 4,76 e em δ_H 4,70 apresentam correlação no espectro de $^1H^1H$ -COSY com o hidrogênio δ_H 1,75 (referente à metila mais desprotegida do espectro de RMN 1H), como pode-se observar na figura 26.

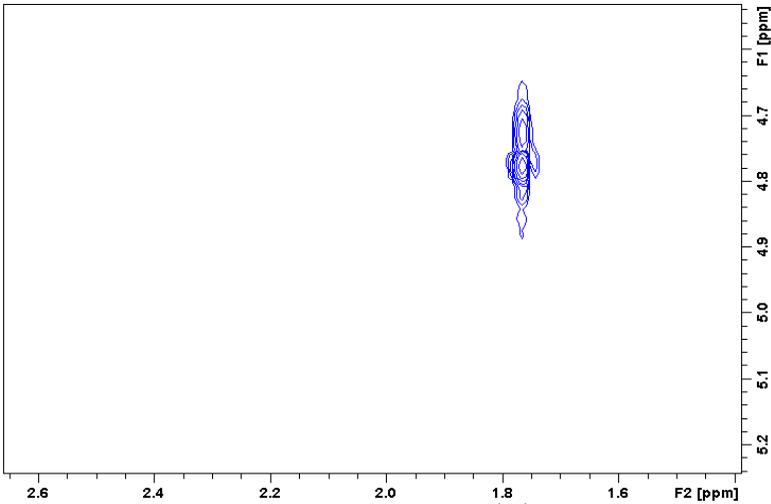


Figura 26: Espectro expandido de correlação $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY

Essa metila (δ_{H} 1,75; δ_{C} 22,6) por sua vez, apresenta HMBC com os carbonos em δ_{C} 31,6, δ_{C} 110,5, δ_{C} 144,5 e NOESY com os hidrogênios em δ_{H} 2,34, δ_{H} 2,66, δ_{H} 2,91 e δ_{H} 4,76. O sinal do carbono em δ_{C} 31,6 está conectado aos hidrogênios δ_{H} 2,34 e δ_{H} 2,34. Esses hidrogênios possuem correlação $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY com os hidrogênios em δ_{H} 2,66 e δ_{H} 2,91. A partir destes dados foi possível propor a subestrutura 4 da cadeia lateral da WT-01 observada na figura 27.

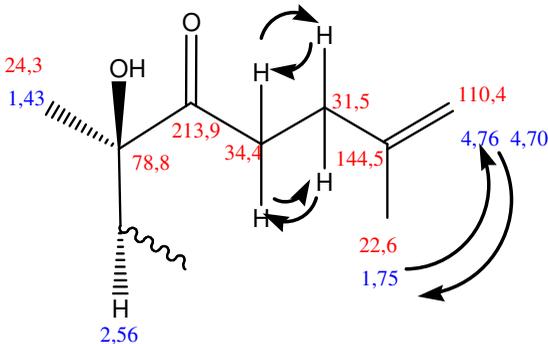


Figura 27: Subestrutura 4 com os deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios e carbonos da cadeia lateral.

Diante desses dados, pode-se atribuir a WT-01 a estrutura de uma cucurbitacina com uma dupla ligação terminal na cadeia lateral, conforme mostrado na figura 28

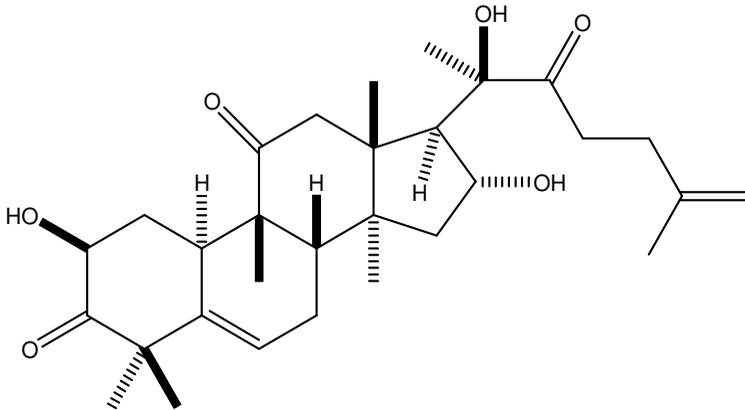


Figura 28: Estrutura química proposta da cucurbitacina WT-01, com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios e carbonos.

A substância WT-01 apresenta fórmula molecular $C_{30}H_{44}O_6$, determinada pela análise do espectro de massas de alta resolução via *electrospray* (ES-MS) no modo positivo, onde se pode identificar o íon $[M+H]^+$ em 501,3193 u.m.a.. De acordo com a estrutura proposta de massa molecular experimental 500,6783 u.m.a., foi confirmada a fórmula molecular para tal substância (figura 29).

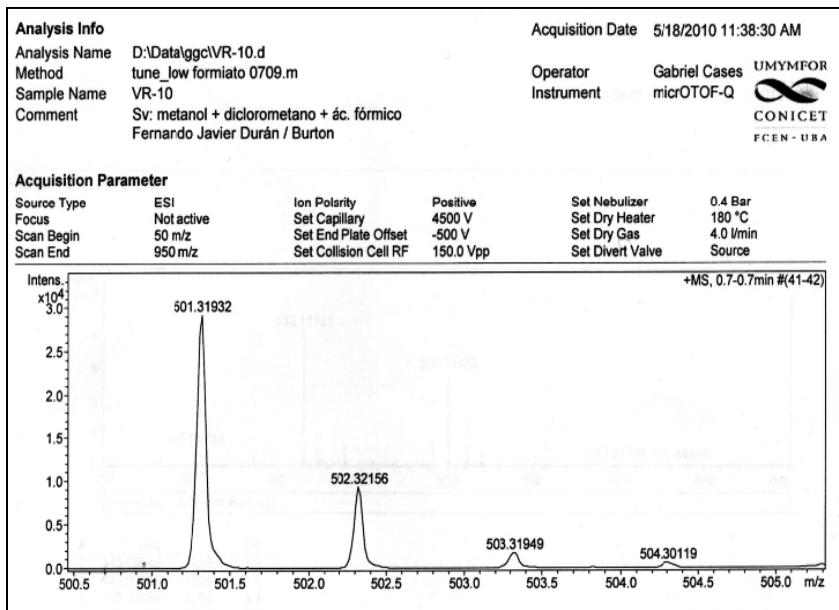


Figura 29: Espectro de massas de alta resolução (ionização por eletrospray) da substância WT-01.

Experimento de rotação ótica forneceu $[\alpha]_D^{25} +38,8$ (c.1,60; clorofórmio), permitindo identificá-la como (+)-16 α ,2 β ,20 β -triidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-5,25-dien-3,11,22-triona.

Na tabela 11 estão apresentados os deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^{13}C e HSQC da substância WT-01, comparado aos dados de deslocamento químico da dihidrocucurbitacina B. Na tabela 12 são mostrados os sinais dos hidrogênios e suas correlações COSY.

Tabela 11: Dados dos espectros de RMN ¹³ C e HSQC da substância WT-01, e os dados da diidrocucurbitacina B (DHB) da literatura (FARIAS, 1991).

C	Diidrocucurbitacina B (75 MHz;CDCl ₃)	WT-01 (125 MHz;CDCl ₃)	HSQC
	δ[ppm]	δ[ppm]	
1	36,0	36,0	2,32; 1,23
2	71,6	71,7	4,42
3	211,8	213,0	-
4	50,2	50,3	-
5	140,3	140,5	-
6	120,2	120,4	5,80
7	23,9	23,9	2,42; 1,97
8	42,3	42,3	2,0
9	48,4	48,4	-
10	33,8	33,8	2,80
11	212,7	212,1	-
12	48,7	48,6	3,26; 2,74
13	48,4	48,3	-
14	50,6	50,7	-
15	45,5	45,4	1,87; 1,40
16	70,9	71,6	4,35
17	57,8	57,6	2,56
18	19,8	19,8	0,98
19	20,1	20,1	1,09
20	78,9	78,8	-
21	24,5	24,3	1,43
22	213,6	213,9	-
23	30,7	34,4	2,91; 2,66
24	34,8	32,0	2,34; 2,34
25	81,2	144,5	-
26	26,2	110,4	4,76; 4,70
27	25,9	22,6	1,75
28	29,4	29,3	1,28
29	21,3	21,2	1,35
30	18,8	18,8	1,38
CH ₃ CO	22,4		
CH ₃ CO	170,1		

*Em destaque os principais valores de δ diferentes entre as substâncias WT-01 e DHB.

Tabela 12: Dados espectrais de RMN ^1H da substância WT-01, em CDCl_3 , e correlações COSY observadas.

H	M	WT-01 (500 MHz; CDCl_3)		
		δ [ppm]	J[Hz]	COSY
1 α	ddd	2,32	13;6;3	H-1 β ;H-2;H-10
1 β	ddd	1,23	13,13,13	H-1 α ; H-2; H-10
2	dd	4,42	13; 6	H-1 α ; H-1 β
6	ddd	5,80	6; 2;2	H-7 α
7 α	m	1,97	-	H-6; H-7 β
7 β	m	2,42	20; 9; 3	H-7 α ; H-8
8	d	2,0	-	H-7 α ; H-7 β
10	m	2,8	13	H-1 α ; H-1 β
12 α	dd	3,26	14,5;1,0	H-12 β Me-18
12 β	d	2,74	14,5	H-12 α
15 α	dd	1,40	14	H-15 β
15 β	m	1,87	14; 8,5	H-15 α ; H-16
16	dd	4,35	8,5;7,0	H-15 β ; H-17
17	d	2,56	7	H-16
23a	m	2,91	17;10; 5,5	H-24a; H-24b;23b
23b	m	2,66	17;10; 5,5	H-23a; H-24a; H-24b
24a	m	2,34	10; 5,5	H-23a; H-23b; H-24b
24b	m	2,34	10; 5,5	H-24a;H-23a; H-23b
26a	d	4,70	0,8	Me-27
26b	d	4,76	0,8	Me-27
Me-18	s	0,98		H-12 α
Me-19	s	1,09		
Me-21	s	1,43		
Me-27	s	1,75		
Me-28	s	1,35		
Me-29	s	1,28		
Me-30	s	1,38		

*M = multiplicidade (s=simpleto; dd=duplo dupleto;ddd=duplo duplo dupleto; m=multiplto).

5.4 Derivados semissintéticos da substância WT-01

Com o objetivo de obter compostos mais lipofílicos e hidrofílicos para ensaios biológicos, foram preparados derivados por acetilação, hidrogenação e esterificação com anidrido succínico.

5.4.1 Derivado acetilado

A reação de acetilação se realizou de maneira usual, com piridina/anidrido acético obtendo-se o derivado acetilado (figura 30) como um pó branco amorfo com faixa de fusão 140^o -141^o C.

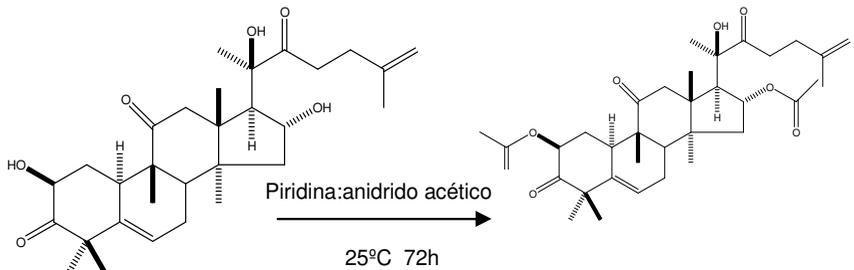


Figura 30: Obtenção do derivado acetilado através da reação com piridina e anidrido acético a partir da substância WT-01

Esse derivado quando analisado por cromatografia em camada delgada (figura 31) apresentou Rf 0,53 no sistema de eluentes hexano:acetato de etila (75:25, V/V).

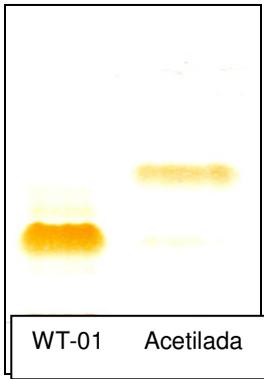


Figura 31: CCD da substância WT-01 e derivado acetilado.
Fase móvel: hexano:acetato de etila (75:25, V/V).
Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄.
Detecção: Vanilina fosfórica/ aquecimento.

Através do espectro de infravermelho (figura 32) foi possível, em comparação com a WT-01 observar a presença de bandas de absorção atribuídas a carbonilas adicionais em 1737 e 1732 cm^{-1} , que juntamente com a banda em 1240 cm^{-1} (-C-O-) sugerem a presença de grupamentos acetilas. Observa-se, também uma banda centrada em 3446 cm^{-1} , de menor intensidade quando comparada ao infravermelho do composto WT-01, que corresponde ao estiramento -OH, indicando a presença desse grupamento também no derivado acetilado.

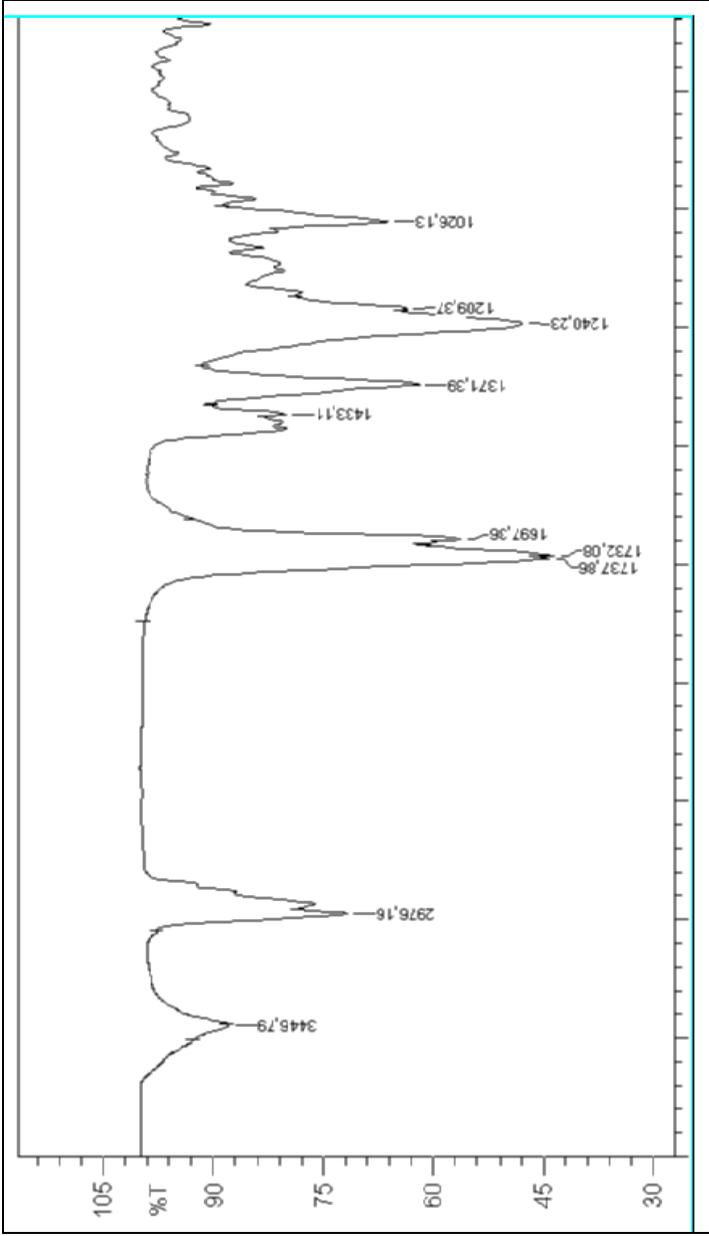


Figura 32: Espectro de infravermelho da substância WT-01 _acetilada obtida na forma de pastilha com KBr através de reflectância difusa.

O produto obtido apresentou em seus espectros de RMN ^1H (figuras 33 e 34) e RMN ^{13}C (figura 35) sinais característicos, que comprovam a obtenção de um derivado acetilado. No espectro expandido de RMN ^1H (figura 31) os sinais diagnósticos foram em δ_{H} 2,15 (s, 3H) e δ_{H} δ_{H} 1,93 (s, 3H), atribuídos a grupamento metilas em acetilas.

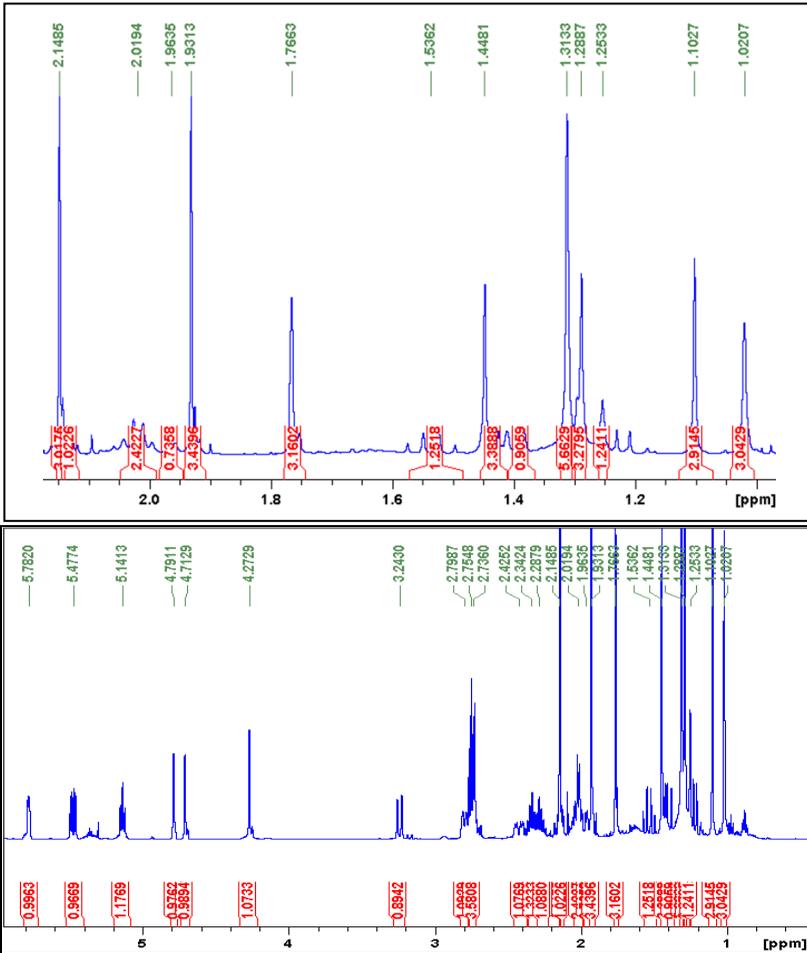


Figura 33: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) e ampliação, em CDCl_3 , da substância WT-01_acetilada.

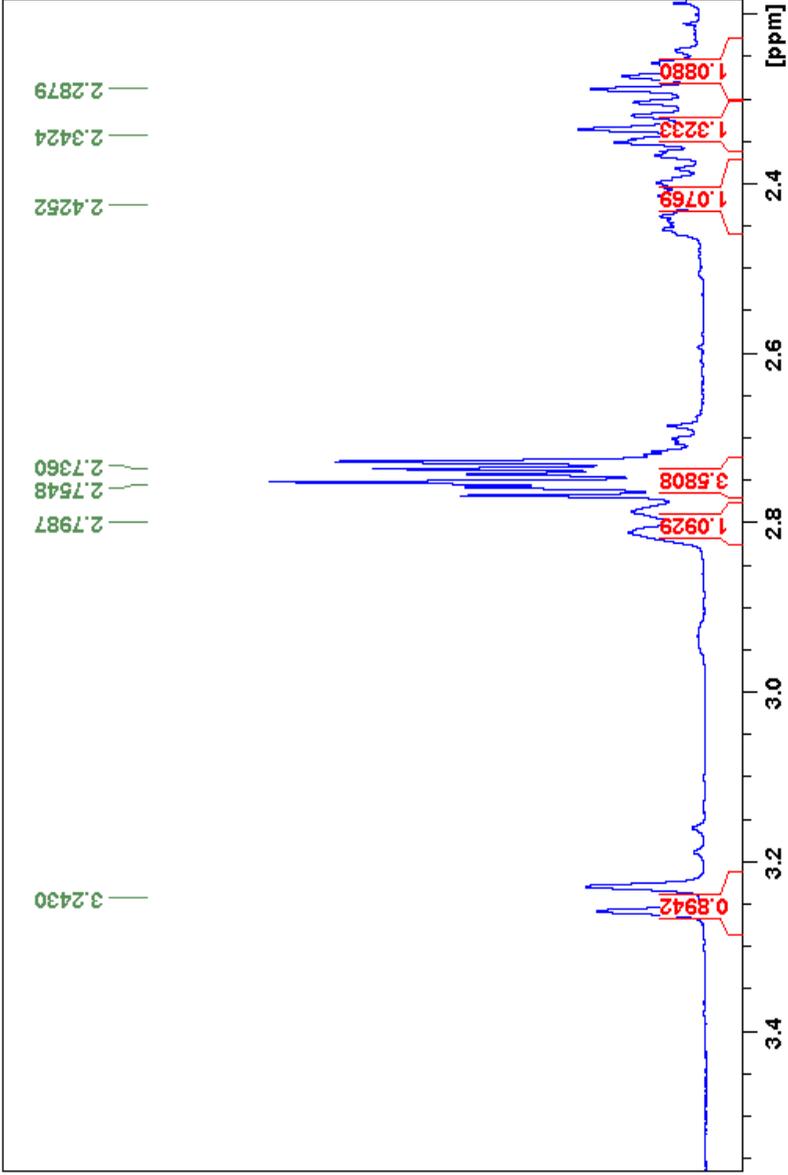


Figura 34: Espectro expandido de RMN ^1H (500 MHz), em CDCl_3 , da substância WT-01_acetilada.

No espectro de RMN ^{13}C (figura 35) pode-se evidenciar a presença de 34 átomos de carbono. Desses 34 carbonos, pelos valores de deslocamento químico, dois foram identificados como carbonos carbonílicos (δ_{C} 169,9 e δ_{C} 170,0), considerados diagnóstico nesse experimento.

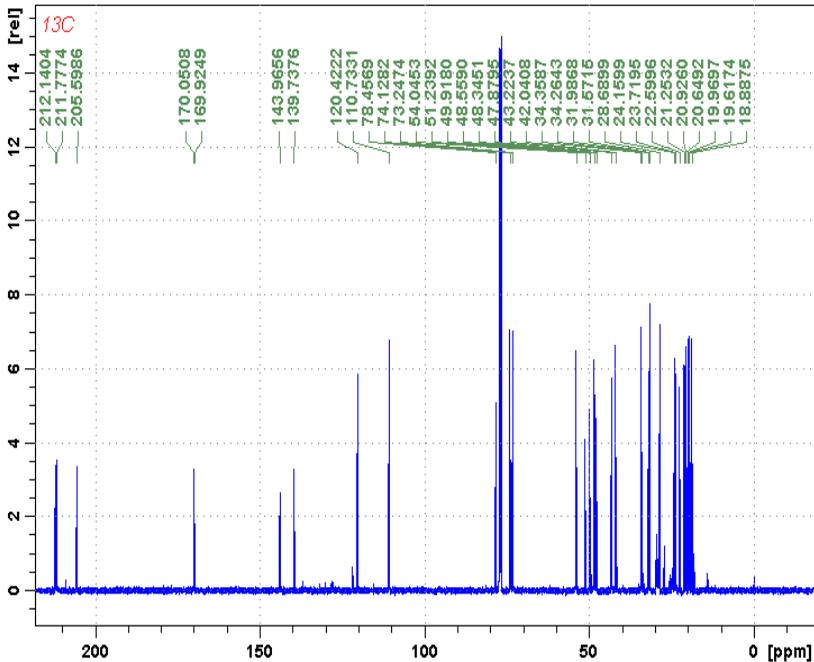


Figura 35: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da substância WT-01_acetilada, em CDCl_3 .

Os experimentos HSQC, indicaram para essas acetilas os sinais dos carbonos em δ_{C} 20,6 e δ_{C} 20,9, respectivamente. Observa-se a correlação do carbono em δ_{C} 20,6 ao hidrogênio em δ_{H} 2,15, enquanto que o carbono em δ_{C} 20,9 apresenta correlação com o hidrogênio em δ_{H} 1,93 (figura 36). Esses dois sinais encontram-se em região típica de hidrogênios ligados a carbonilas, o que nos permitiu inferir que a molécula encontrava-se acetilada em duas posições.

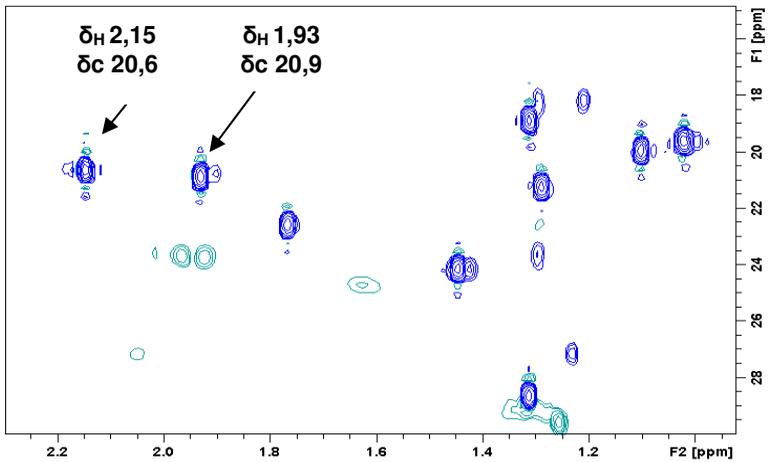


Figura 36: Espectro expandido de correlação HSCQ, na região das metilas da substância WT-01_acetilada.

Com esse mesmo experimento, também foi possível constatar que os carbonos carbinólicos δ_c 73,3 (C2) e δ_c 74,1 (C16) estão conectados aos hidrogênios em δ_H 5,48 e δ_H 5,14, respectivamente (figura 37).

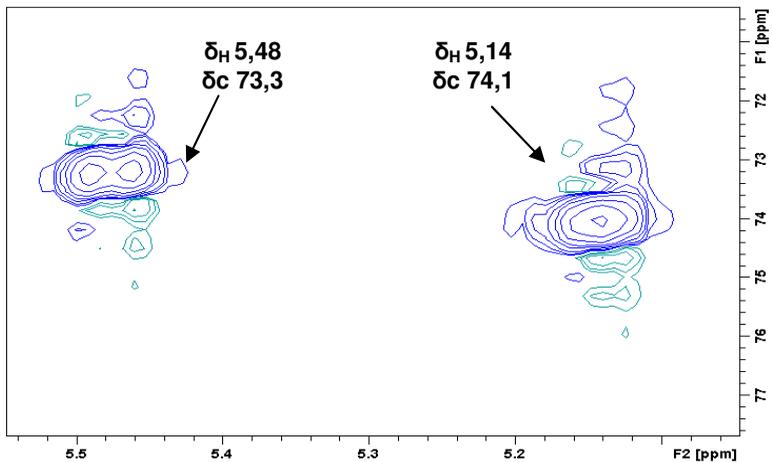


Figura 37: Espectro expandido de correlação HSQC dos carbonos carbinólicos (δ_c 73,3 e δ_c 74,1), da substância WT-01_acetilada.

Esses dados apontam para a acetilação das hidroxilas nas posições C2 e C16, não tendo ocorrido a acetilação da hidroxila em C20. Os espectros de correlação HMBC permitiram confirmar as posições de acetilação, tendo em vista as correlações da metila em δ_H 2,15 com o carbono ligado ao oxigênio δ_C 73,3 (C2), com o carbono da acetila δ_C 170,0 e com carbonila δ_C 205,6 (C3), portanto alocada no C2. Para a metila em δ_H 1,93 observa-se correlação HMBC com os carbonos em δ_C 74,1 e em δ_C 169,9, sendo então alocada em C16 (figura 38)

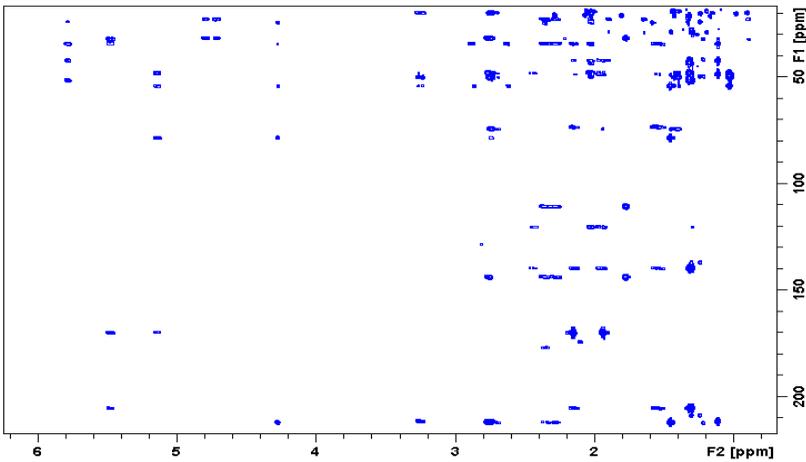
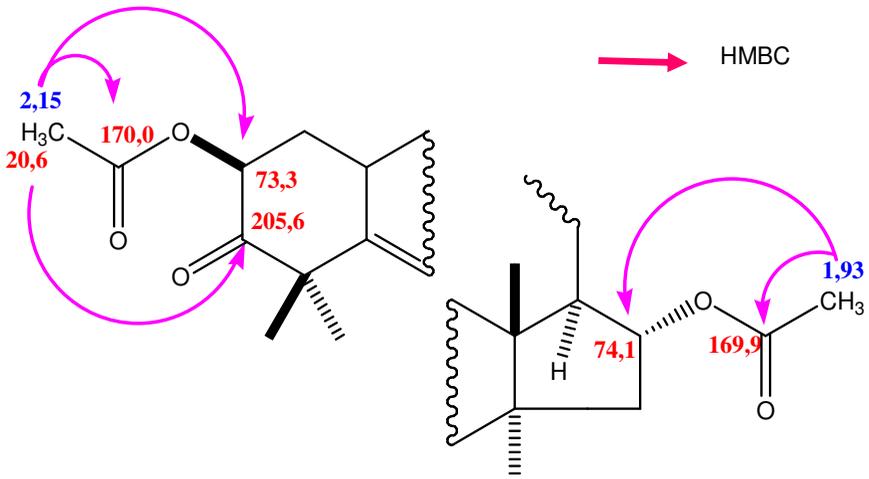


Figura 38: Espectro de HMBC (500 MHz; em $CDCl_3$) da WT-01_acetilada.



Dessa forma, através da análise dos dados RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectros de correlação, foi possível concluir que a substância WT-01_acetilada encontra-se substituída por grupamento acetila nos carbonos C2 e C16 (figura 39).

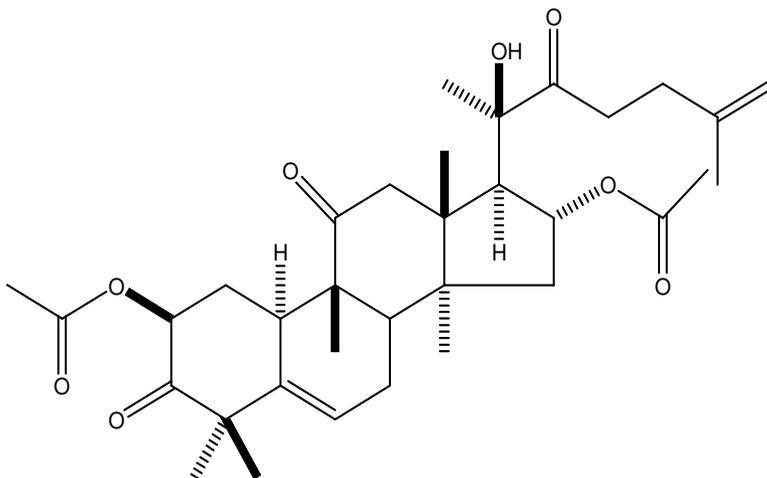


Figura 39: Estrutura química proposta da substância WT-01_acetilada.

Nas tabelas 13 e 14, os deslocamentos químicos RMN ^{13}C (125 MHz, em CDCl_3) e RMN ^1H (500 MHz, em CDCl_3) do composto WT-01_acetilada são comparados com aqueles da substância WT-01.

Tabela 13: Comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C (125 MHz) substância WT-01_ acetilada com WT-01, em CDCl_3 .

C	WT-01 (125 MHz; CDCl_3)	WT-01_ acetilada (125 MHz; CDCl_3)
	δ (ppm)	δ (ppm)
1	36,0	32,0
2	71,7	73,3
3	213,0	205,6
4	50,3	49,9
5	140,5	139,7
6	120,4	120,4
7	23,9	23,7
8	42,3	42,0
9	48,4	48,1
10	33,8	34,2
11	212,1	211,7
12	48,6	48,8
13	48,3	48,5
14	50,7	51,2
15	45,4	43,2
16	71,1	74,1
17	57,6	54,0
18	19,8	19,6
19	20,1	19,9
20	78,8	78,4
21	24,3	24,3
22	213,9	212,1
23	31,5	31,5
24	34,4	34,3
25	144,5	143,9
26	22,6	22,5
27	110,4	110,7
28	29,3	28,6
29	21,2	21,2
30	18,8	18,8
CH_3CO		169,9
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$		20,9
$\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{O}$		170,0
$\underline{\text{C}}\text{H}_3\underline{\text{C}}\text{O}$		20,6

* Em destaque os principais valores δ diferentes entre as substâncias WT-01 e WT-01_ acetilada.

Tabela 14: Dados espectrais de RMN ¹H da substância WT-01_acetilada.

H	M	WT-01 acetilada (500 MHz;CDCl ₃)		
		δ[ppm]	J[Hz]	COSY
1α	ddd	2,13	13;6;3	H-1β;H-2;H-10
1β	ddd	1,54	13;13;13	H-1α;H-2;H-10
2	dd	5,48	13;6	H-1α; H-1β
6	ddd	5,78	6;2;2	H-7α
7α	m	~2,0	-	H-6; H-7β,H-8
7β	m	2,43	20; 8; 2;	H-6; H-7α; H-8
8	d	~2,0	-	H-7α; H-7β
10	m	2,75	13	H-1α; H-1β
12α	dd	3,24	14,5;1,0	H-12β Me-18
12β	d	2,75	14,5	H-12α
15α	dd	1,40	14	H-15β
15β	m	1,96	14; 8,5	H-15α; H-16
16	dd	5,14	8,5;7,0	H-15β; H-17
17	d	2,80	7,0	H-16
23 ^a	m	2,34	9;5	H-24a; H-24b;23b
23b	m	2,28	9;5	H-23a; H-24a; H-24b
24 ^a	m	2,75		H-23a; H-23b; H-24b
24b	m	2,73		H-24a;H-23a; H-23b
26 ^a	d	4,71	0,8	Me-27
26b	d	4,79	0,8	Me-27
Me-18	s	1,02		H-12α
Me-19	s	1,10		
Me-21	s	1,45		
Me-27	s	1,77		
Me-28	s	1,32		
Me-29	s	1,27		
Me-30	s	1,30		
CH ₃ CO	s	2,15		
CH ₃ CO	s	1,93		

*M = multiplicidade (s=simpleto; dd=duplo dupleto;ddd=duplo duplo dupleto; m=multipleto).

5.4.2 Derivado reduzido

A redução da substância WT-01 foi realizada com o NaBH_4 , mantendo-se o meio reacional com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ a 0°C (figura 40).

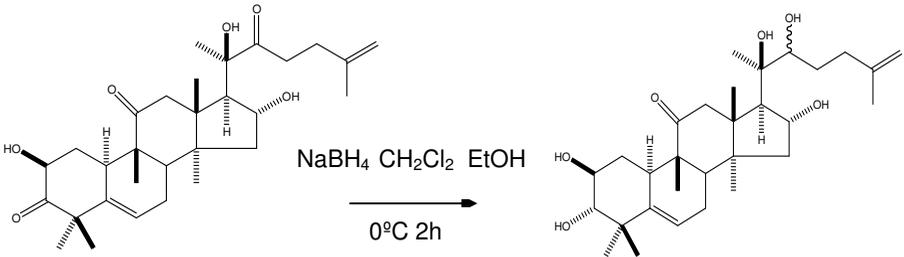


Figura 40: Obtenção do derivado reduzido através da reação com NaBH_4 a partir da substância WT-01

Após purificação em cromatografia em coluna esse derivado apresentou ponto de fusão em $120\text{-}123^\circ\text{C}$ e comportamento cromatográfico diferente (mais polar) do que o composto WT-01, conforme esperado (figura 41).

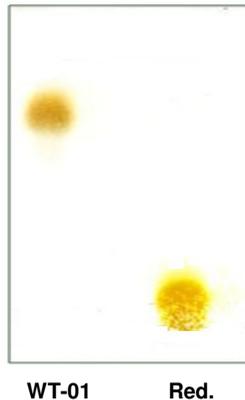


Figura 41: CCD comparativa substância WT-01 e derivado reduzido. Eluente: hexano:acetato de etila (40:60, V/V). Adsorvente: gel de sílica F_{254} . Detecção: Vanilina fosfórica/ aquecimento.

O espectro de infravermelho (figura 42) apresenta uma banda alargada e intensa centrada em 3444 cm^{-1} sugerindo a presença ligações O-H de álcool, o que é confirmado por duas bandas em 1066 e 1020 cm^{-1} provenientes do estiramento C-O de álcool. Esse dado somado à polaridade da substância em cromatografia em camada delgada (figura 41) indica a formação de um derivado reduzido.

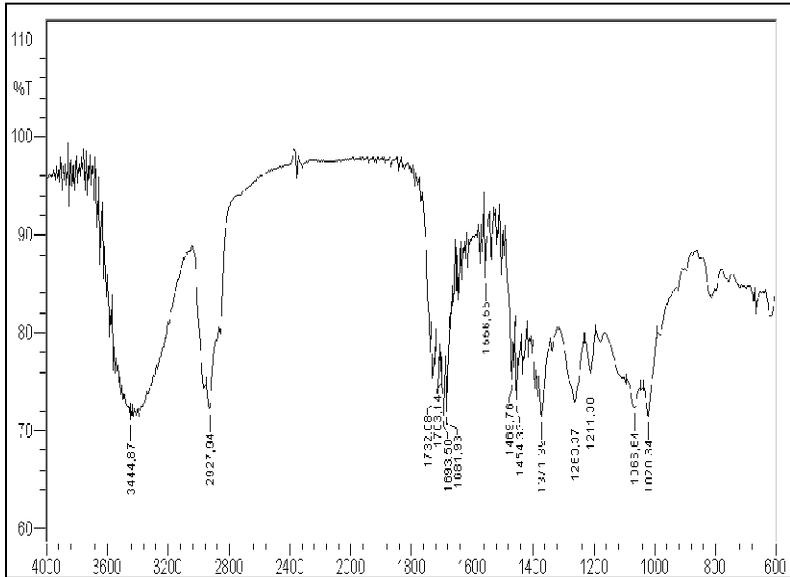


Figura 42: Espectro de infravermelho da substância WT-01_reduzida com pastilhas de KBr através da reflectância difusa.

No espectro de RMN ^{13}C (figura 43) da substância WT-01_reduzida, quando comparado a da substância WT-01, foi possível observar a ausência de dois dos sinais referentes às carbonilas na região de campo mais desprotegido do espectro. Permanece apenas um sinal relativo à carbonila em δc 213,9, que pode ser atribuída a carbono 11, em vista de tratar-se da carbonila de mais difícil redução. Adicionalmente, a presença de dois novos sinais em δc 81,1 e δc 78,7 que podem ser atribuídos a carbonos carbinólicos. Os demais sinais estão localizados na

faixa entre δ_c 19,1 e δ_c 55,0 e foram atribuídos a carbonos sp^3 de metilas, metilenos e metinos.

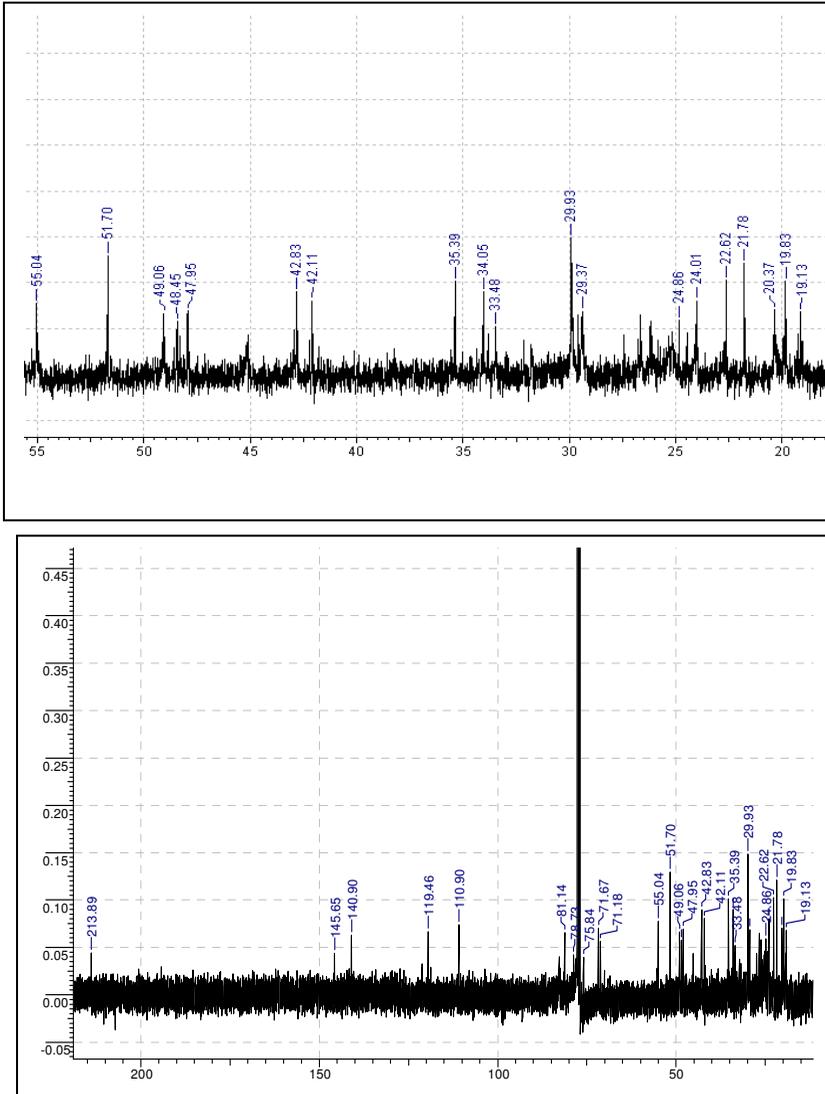


Figura 43: Espectro de RMN ^{13}C e ampliação, em CDCl_3 , da substância WT-01_reduzida.

No espectro expandido de RMN ^1H foram observados os hidrogênios característicos da estrutura WT-01, H6, H16, H26 com suas respectivas constantes de acoplamento conforme a figura 44. No entanto, observa-se um sinal de impureza, visto a presença do sinal em δ_{H} 5,35, com integração 1:0,5 em relação ao sinal em δ_{H} 5,72.

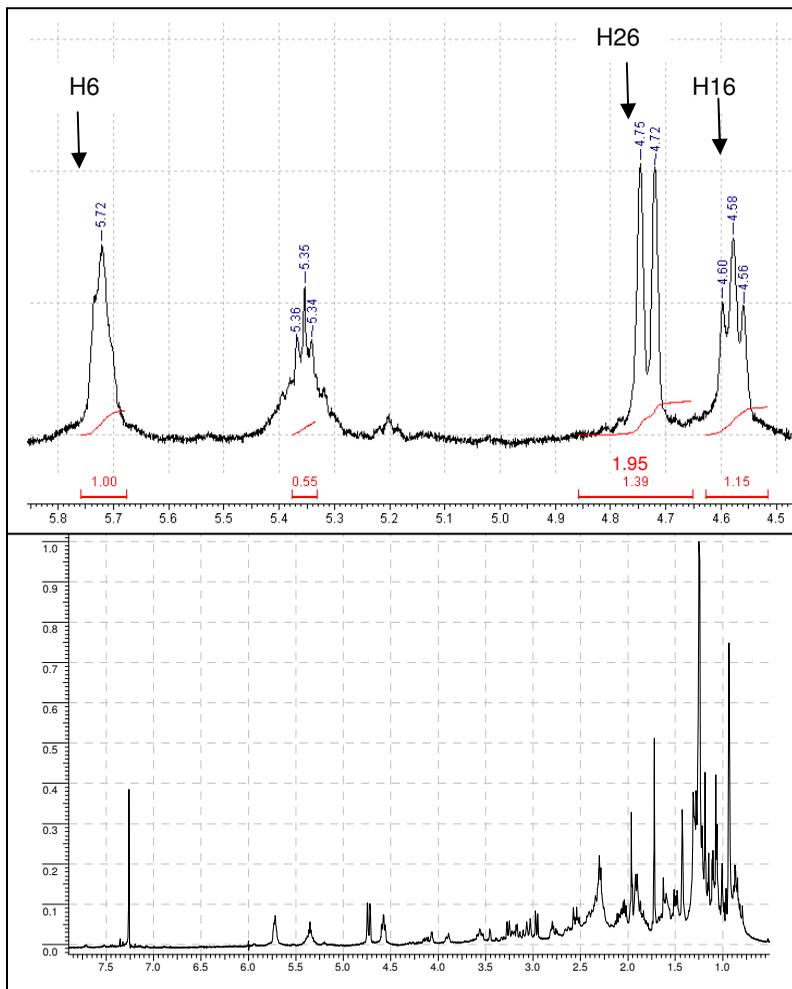
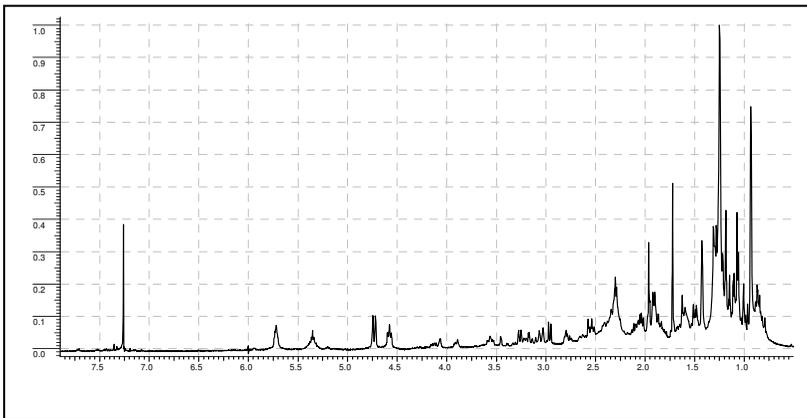
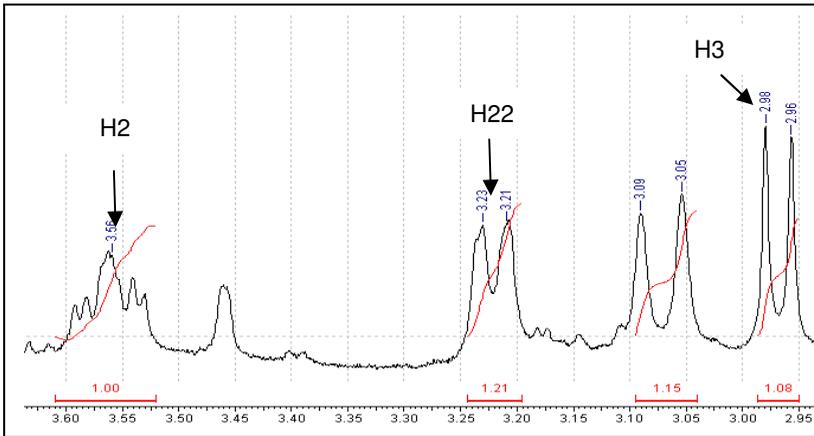


Figura 44: Espectro de RMN ^1H e ampliação 400 MHz, em CDCl_3 , da substância WT-01 reduzida.

A redução das carbonilas C3 e C22 foi diagnosticada através da observação da presença de novos sinais na região entre δ_H 2,97 à δ_H 3,56 (figura 42), quando comparado ao espectro de hidrogênio do composto original. Pode-se constatar o desaparecimento do sinal em δ_H 4,42 referente ao hidrogênio ligado ao C2 do composto não reduzido e adicionalmente foram observados dois novos sinais em δ_H 2,97 e δ_H 3,56. O sinal em δ_H 2,97 aparece como um duplete ($J=10$ Hz) o qual pode ser atribuído ao hidrogênio conectado ao carbono 3 e o sinal em δ_H 3,56 referente ao hidrogênio ligado ao carbono 2, de acordo com a correlação observada no espectro de correlação COSY (figura 46).



Ainda no espectro de $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY (figura 46) foi possível observar a correlação do hidrogênio em δ_{H} 3,56 com os hidrogênios em δ_{H} 2,97, δ_{H} 1,10 e δ_{H} 1,85, que apresentam correlação no espectro HSQC com o carbono em δ_{C} 35,3 (C1). Esses hidrogênios, por sua vez, apresentam correlação $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY com o hidrogênio em δ_{H} 2,34 ligado ao carbono em δ_{C} 33,8 (C10).

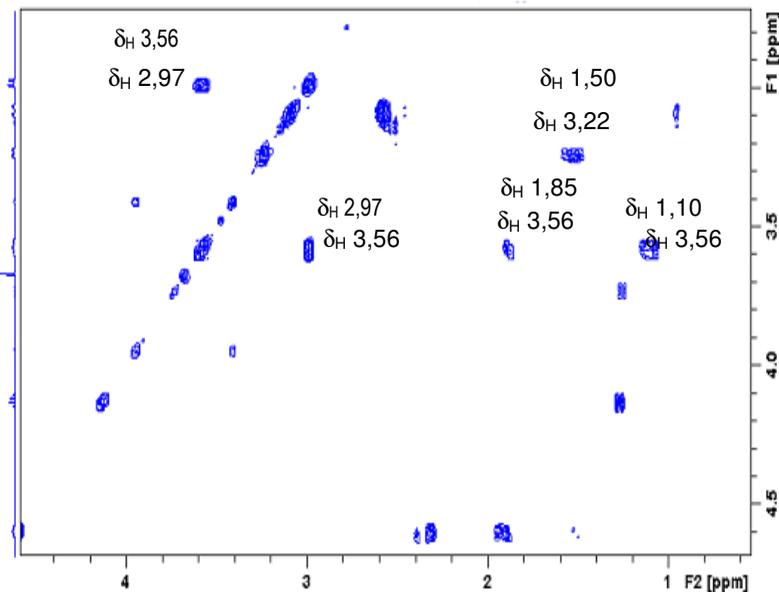


Figura 46: Espectro de correlação ampliado $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY da substância WT-01_reduzida.

A observação das correlações desses hidrogênios permitiu complementar as atribuições, sendo que a análise desses dados corrobora a subestrutura 1 proposta a partir dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e de correlação que podem ser sumarizados na figura 47.

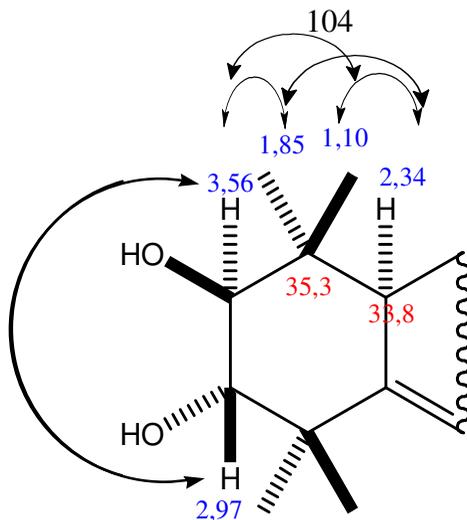


Figura 47: Subestrutura 1, com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios mostrando as principais correlações $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY dos anéis A e B.

A presença do grupamento hidroxila em C22 pode ser estabelecido considerando a ausência da carbonila nessa posição e a presença de um CH- carbinólico em δ_{H} 3,22 (duplete; $J=10,5$ Hz). No espectro de COSY (figura 46) esse hidrogênio apresenta acoplamento com os hidrogênios em δ_{H} 1,50 referentes aos hidrogênios em C-23 (m, 3H). Esses por sua vez apresentam correlação com os hidrogênios δ_{H} 2,07 e δ_{H} 1,80 correspondentes aos hidrogênios em C24. Na figura 48 é apresentada a subestrutura 2, com atribuição dos deslocamentos químicos (δ) obtidos para os hidrogênios da cadeia lateral baseados no espectro de RMN ^1H e as correlações $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY.

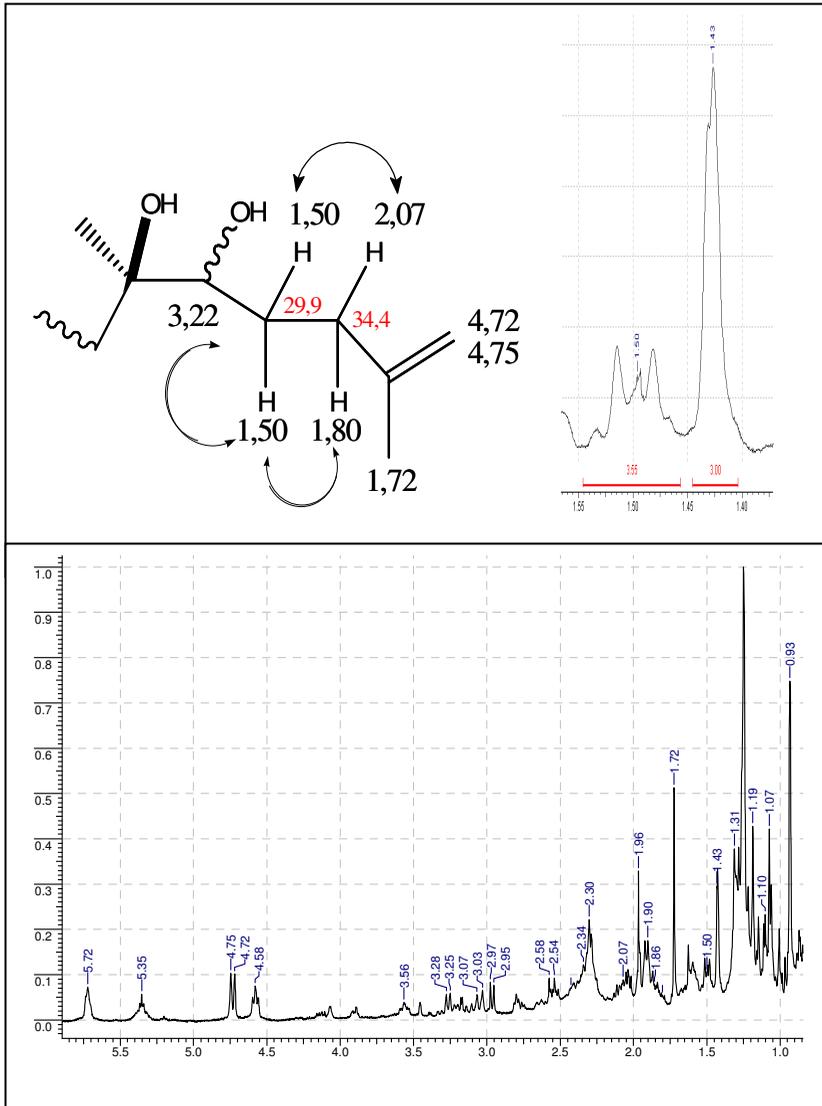


Figura 48: Atribuições com δ dos hidrogênios da cadeia lateral baseados no espectro de RMN ^1H e correlação $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY.

A observação das constantes de acoplamento permitiu estabelecer a estereoquímica relativa da hidroxila ligada ao carbono 3. A multiplicidade do H-3 (δ_H 2,97 (1H, d, 10 Hz) e do H-2 (δ_H 3,56 (1H, 10; 3 Hz) indicam uma interação axial axial para o hidrogênio em C3 permitindo inferir a posição 3 β para esse hidrogênio, portanto com a hidroxila na posição em 3- α .

Em relação à redução da carbonila em C-22 é possível ter ocorrida com a formação da mistura dois estereoisômeros ou de apenas um deles. Nesse caso, a determinação da sua configuração, requer experimentos adicionais como a difração de raio-x ou a formação de ésteres quirais, como os ésteres de Mosher *. A estrutura química proposta para WT-01_reduzida é mostrada na figura 49.

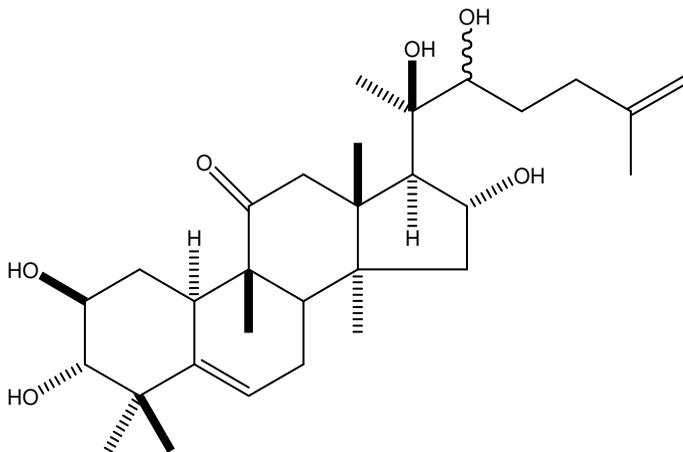


Figura 49: Estrutura química proposta da substância WT-01 reduzida.

Os dados obtidos no espectro de RMN ^{13}C e RMN ^1H encontram-se sumarizados nas tabelas 15 e 16.

*SECO, J.M, QUINOÁ, E.; RIGUERA, R. The assignment of absolute configuration by NMR. **American Chemical Society**, n.104, p.17-117, 2004.

Tabela 15: Comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C (100 MHz) da substância WT-01_reduzida com WT-01, em CDCl_3 .

C	WT-01 (125 MHz; CDCl_3)	WT-01_reduzida (100 MHz; CDCl_3)	HSQC
	δ [ppm]	δ [ppm]	
1	36,0	35,4	1,85; 1,10
2	71,7	71,2	3,56
3	213,0	78,7	2,97
4	50,3	42,1	-
5	140,5	140,9	-
6	120,4	119,5	5,72
7	23,9	24,0	2,42; 1,96
8	42,3	42,8	1,92
9	48,4	49,0	-
10	33,8	33,8	2,34
11	212,1	213,9	-
12	48,6	48,4	3,05; 2,54
13	48,3	47,9	-
14	50,7	51,7	-
15	45,4	45,1	1,90; 1,50
16	71,1	71,7	4,58
17	57,6	55,0	2,34
18	19,8	19,8	0,93
19	20,1	20,3	1,07
20	78,8	75,6	-
21	24,3	24,8	1,43
22	213,9	81,8	3,22
23	34,4	29,9	1,50;1,50
24	31,6	34,0	2,07; 1,80
25	144,5	145,6	-
26	22,6	22,6	4,75;4,72
27	110,4	110,9	1,72
28	29,3	29,3	1,30
29	21,2	21,7	1,25
30	18,8	19,1	1,19

* Em destaque os principais valores δ diferentes entre as substâncias WT-01 e WT-01_reduzida.

Tabela 16: Espectro de RMN ¹H (400 MHz) da substância WT-01 reduzida.

H	M	WT-01 acetilada (500 MHz; CDCl ₃)		
		δ[ppm]	J[Hz]	COSY
1α	m	1,85	10;6;3	H-1β;H-2;H-10
1β	ddd	1,10	-	H-1α;H-2;H-10
2	m	3,56	10;3	H-1α; H-1β; H-3
3	d	2,97	10	H-2
6	ddd	5,72	6;2;2	H-7α;H-7β
7α	m	1,96	-	H-6; H-7β,H-8
7β	m	2,42	21; 8; 2;	H-7α; H-6,H-8
8	d	~2,0	8	H-7α; H-7β
10	m	2,34	10	H-1α; H-1β
12α	dd	3,05	14,5;1,0	H-12β Me-18
12β	d	2,56	14,5	H-12α
15α	d	1,50	-	H-15β
15β	m	1,90	-	H-15α; H-16
16	dd	4,58	8,5;7,0	H-15α; H-15β; H-17
17	d	2,30	7,0	H-16
22	d	3,22	10,5	H-23a;H-23b
23a	d	1,50	-	H-24a; H-24b;23b
23b	d	1,50	-	H-23a; H-24a; H-24b
24a	m	1,80		H-23a; H-23b; H-24b
24b	m	1,10		H-24a;H-23a; H-23b
26a	d	4,72	0,8	Me-27
26b	d	4,75	0,8	Me-27
Me-18	s	0,98		H-12α
Me-19	s	1,07		
Me-21	s	1,43		
Me-27	s	1,72		
Me-28	s	1,30		
Me-29	s	1,25		
Me-30	s	1,19		

*M = multiplicidade (s=simpleto; dd=duplo dupleto;ddd=duplo duplo dupleto; m=multipleto).

5.4.3 Derivado Éster

Foi obtido um produto através da reação da cucurbitacina WT-01 com anidrido succínico/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$, utilizando como catalisador DMAP em atmosfera de N_2 . Na análise por CCD do produto final da reação observou-se a formação de dois compostos (figura 50a). A mistura foi então submetida a processo de separação em Sephadex LH-20, resultando em dois compostos (figura 50 b). Do produto codificado como HEM-01 foram obtidos 8 mg, com ponto de fusão de 130-133 ° C. Para o composto HEM-02 foram obtidos cerca de 10 mg, no entanto os espectros indicam a presença de mistura.

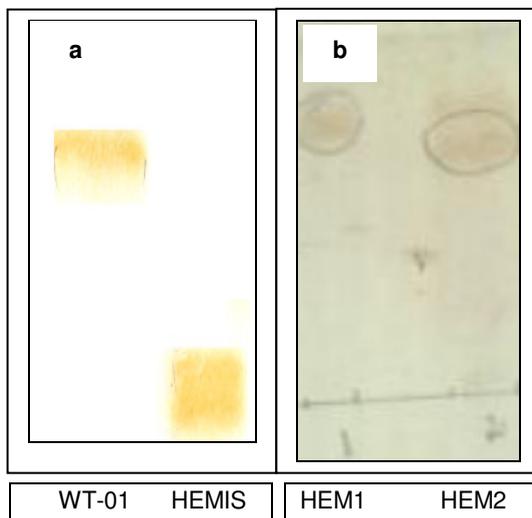


Figura 50: Análise cromatográfica por CCD dos produtos da reação com anidrido succínico.

Fase móvel: **a:** hexano:acetato de etila (60:40, V/V).

b: hexano:acetato de etila (30:70, V/V).

Adsorvente: gel de sílica F_{254} .

Deteção: Vanilina fosfórica/ aquecimento.

Para o produto codificado como HEM1 foi possível obter o espectro de infravermelho (figura 51) e comparar com o da substância WT-01 (figura 13). Foi possível, observar a presença de uma banda de absorção atribuída a carbonila adicional em 1732 cm^{-1} , que juntamente com a banda em 1200 cm^{-1} (-C-O-) sugerem a formação do éster do derivado succínico. Além disso, foi constatada ma banda centrada em 3444 cm^{-1} , de menor intensidade quando comparada ao infravermelho do composto original.

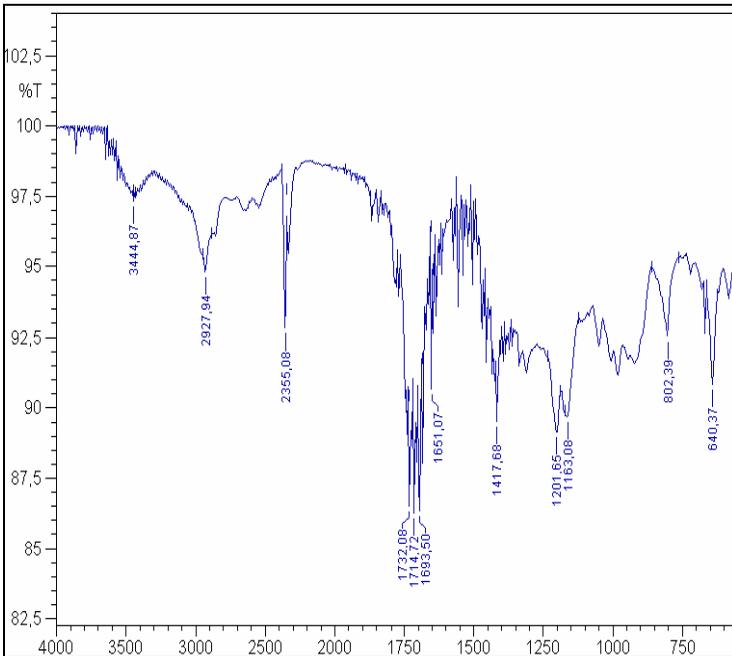


Figura 51: Espectro de infravermelho do produto HEM1 obtido na reação com anidrido succínico em pastilha de KBr através de reflectância difusa.

Comparando os dados de RMN ^1H do composto original, com os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^1H do éster obtido (figura 52) pode-se constatar que o sinal do hidrogênio em δ_{H} 4,42 correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do composto WT-01 encontra-se deslocado para δ_{H} 5,53 (dd, 1H, 13; 6 Hz) no derivado obtido com essa reação, indicando que a esterificação ocorreu na posição 2. A substituição por esse grupamento químico ocorreu apenas no C2, visto que não foi observado deslocamento químico do sinal em δ_{H} 4,35 (dd, 1H, 8,0;7,5 Hz) atribuído ao hidrogênio H16.

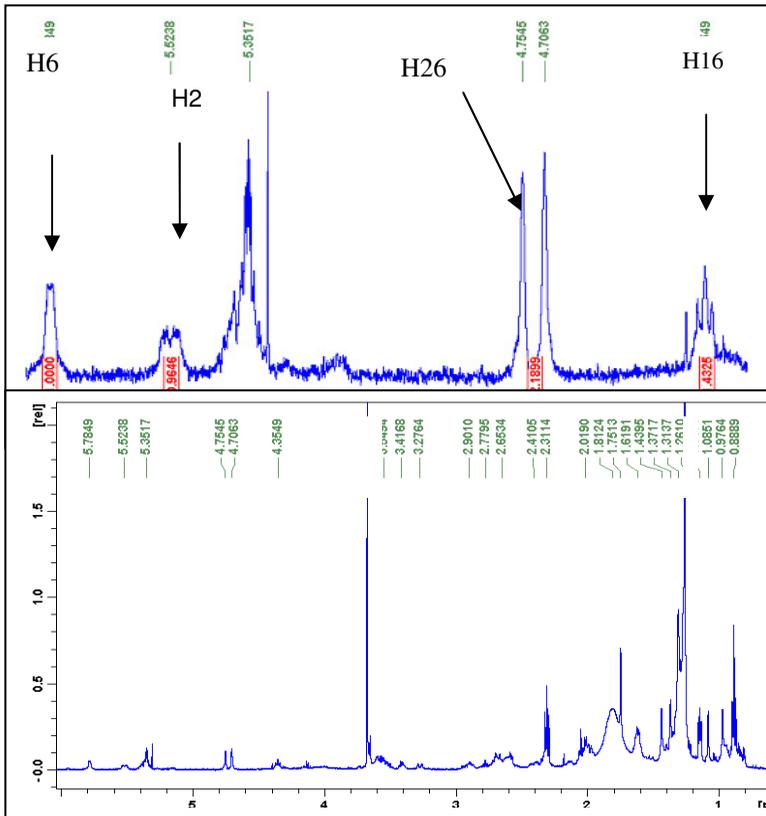


Figura 52: Espectro de RMN ^1H e ampliação (500 MHz, em CDCl_3) do éster obtido obtido HEM1.

Além disso, foram observados os sinais dos hidrogênios CH_2 do grupamento $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2$ na região em torno de δ_{H} 2,64. Análise desses dados permitiu corroborar a estrutura do anel A do derivado obtido conforme apresentado na figura 53.

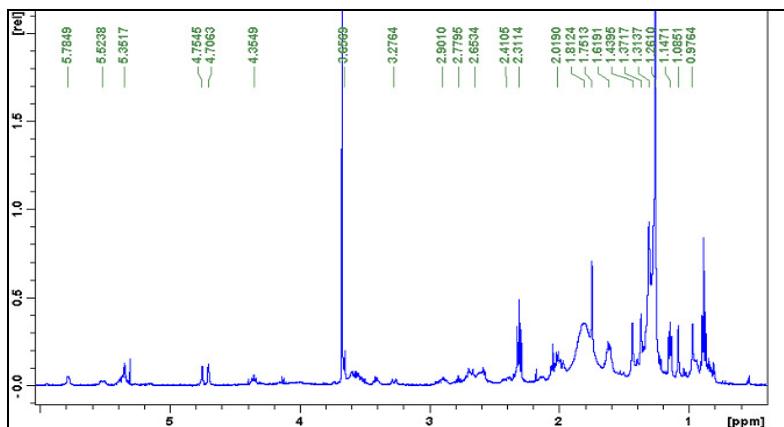
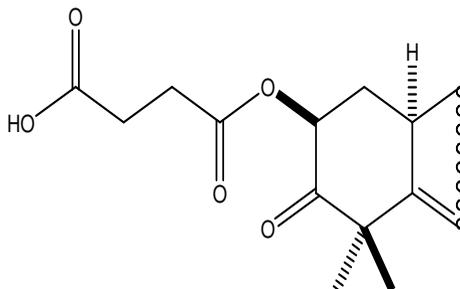
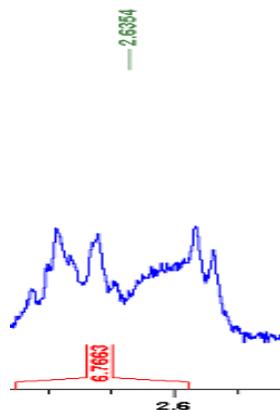


Figura 53: Espectro de RMN ^1H e ampliação (500 MHz, em CDCl_3) do éster obtido, com a subestrutura proposta para o anel A.

A estrutura foi proposta baseada na comparação com dos seus dados de RMN ^1H com os deslocamentos químicos observados do composto original WT-01. Para a comprovação da estrutura serão realizados ainda espectros de correlação e medida da atividade ótica. A estrutura proposta para o derivado hemissucinato obtido é apresentada na figura 54.

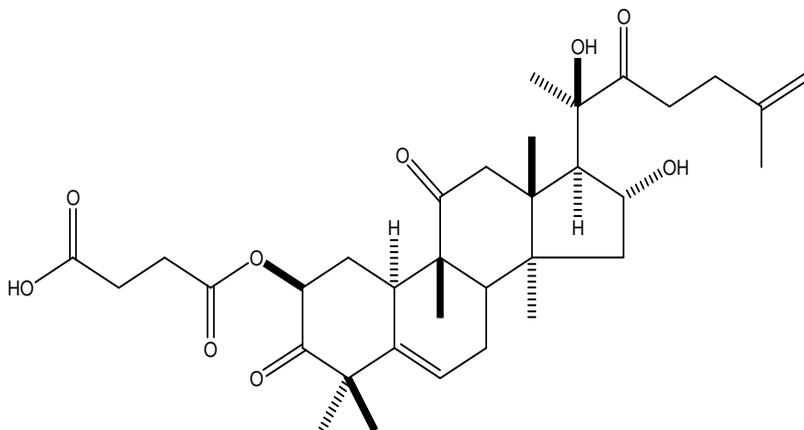


Figura 54: Estrutura do éster obtido pela reação com anidrido succínico.

Os dados de RMN ^1H desse derivado estão sumarizados na tabela 17.

Tabela 17: Dados de RMN ^1H (500 MHz) da substância HEM1

H	M	WT-01 HEM1 (500 MHz; CDCl_3)	
		δ [ppm]	J[Hz]
1 α	m	2,28	13;6;3
1 β	ddd	1,23	13;13;13
2	dd	5,52	13;6
2'	m	2,65	
6	ddd	5,78	6;2;2
7 α	m	~2,0	-
7 β	m	2,40	19; 8; 3
8	d	~2,0	-
10	m	2,78	13
12 α	dd	3,28	14,5;1,0
12 β	d	2,78	14,5
15 α	dd	1,41	14
15 β	m	1,81	14; 8,0
16	dd	4,35	8,0;7,5
17	d	2,57	7,5
23a	dd	2,30	
23b	dd	2,30	
24a	m	2,91	
24b	m	2,66	
26a	d	4,71	0,8
26b	d	4,75	0,8
Me-18	s	0,98	
Me-19	s	1,09	
Me-21	s	1,44	
Me-27	s	1,75	
Me-28	s	1,26	
Me-29	s	1,31	
Me-30	s	1,37	

5.5 Isolamento e elucidação estrutural das substâncias WT-02 e WT-03.

Para separação das substâncias WT-02 e WT-03 presentes na fração FW4 foram utilizadas colunas em gel de sílica, assim como colunas de fase reversa, contudo só foi possível a obtenção dessas substâncias na forma pura com as análises preparativas em cromatografia líquida de alta eficiência. Foram testadas duas fases móveis na tentativa de separar essas duas substâncias de comportamento cromatográfico semelhante que estavam presentes na fração FW4, a primeira utilizando acetonitrila (bomba A) e água (bomba B), em sistema isocrático (4:6) e a segunda fase móvel acetonitrila (bomba A) e metanol (bomba B), também em sistema isocrático (1:1). A detecção das substâncias ocorreu por absorção UV em 230 nm e o fluxo do eluente foi igual a 4,0 mL/min (figura 55).

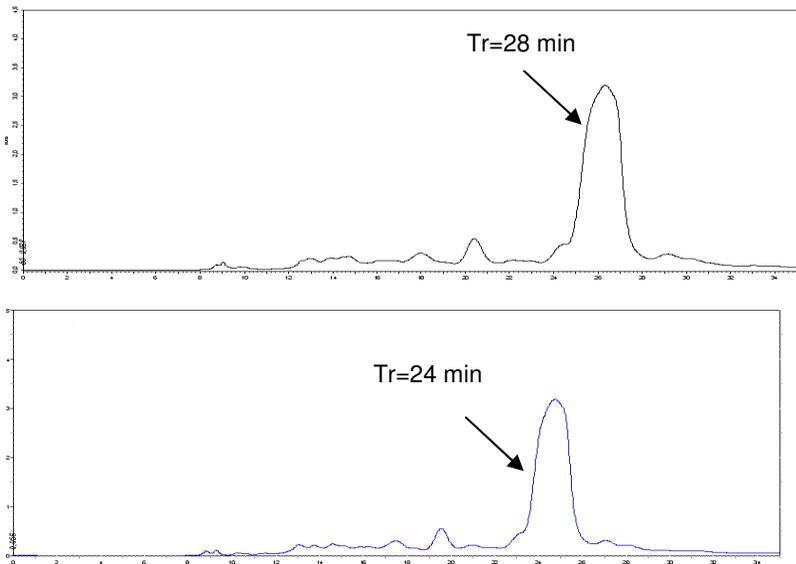


Figura 55: Cromatogramas, obtidos por CLAE, das frações enriquecidas com WT-02 e WT-03.

Eluentes: 1: ACN:H₂O (40:60) 2: ACN:MEOH (50:50).

Fluxo: 4ml/min. Detecção: 230 nm

Coluna preparativa Schim-Pack ODS (250X21,2 mm).

Em relação às análises, a principal diferença observada foi quanto ao tempo de retenção. No primeiro sistema cromatográfico testado foi de 28 min, enquanto que na segunda análise o tempo de retenção foi de 24 min.

O resultado obtido na separação dessas substâncias utilizando sistema de eluente acetonitrila e água (40:60; V/V) é mostrado na cromatografia em camada delgada (figura 56). Cabe ressaltar que a fração com a mistura de ambas cucurbitacinas foi injetada na concentração de 60 mg/ml, tendo sido obtido 45 mg da WT-03 e 0,66 mg da WT-02, Além de 14,34 mg da mistura.

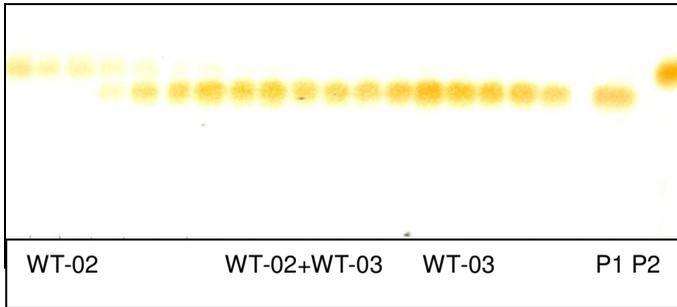


Figura 56: CCD comparativa das substâncias WT-02 e WT-03 e amostras autênticas diidrocurbitacina B (P1) e diidroisocurbitacina (P2).

Eluente: hexano:acetato de etila (60:40, V/V).

Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄.

Deteção: Vanilina fósforica/ aquecimento.

Para assegurar a identidade das substâncias WT-02 e WT-03 foram então realizadas análises comparativas com amostras autênticas da diidroisocurbitacina B e diidrocurbitacina B (figura 57).

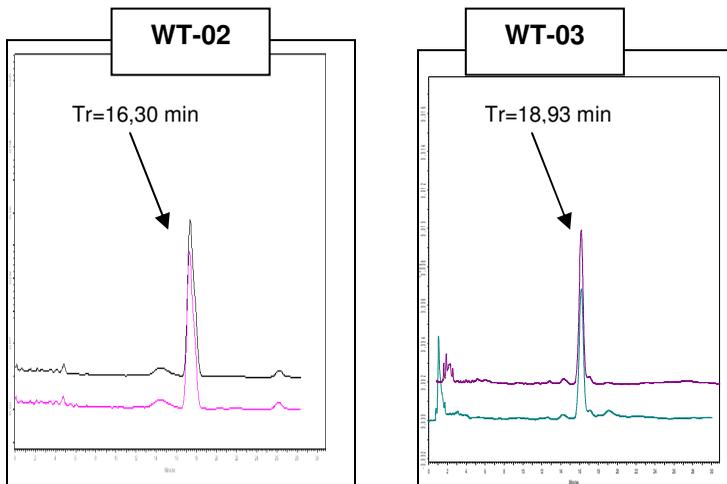


Figura 57: Cromatogramas, obtidos por CLAE, das substâncias WT-02 e WT-03 com amostras autênticas da diidroisocucurbitacina B e diidrocurcubitacina B.

Coluna: C18 (150 X 4,6mm).

Eluente: CH₃CN:H₂O (40:60; V/V) - modo isocrático.

Deteção: 230 nm.

Fluxo: 1 mL/min.

Pode-se concluir que nas condições testadas foi verificado comportamento cromatográfico semelhante ao da diidroisocucurbitacina B e diidrocurcubitacina B, referente às substâncias WT-02 e WT-03, respectivamente. Pela CCD não foram observadas outras manchas com comportamento cromatográfico (rf e coloração) semelhante aos padrões.

Em relação ao ponto de fusão, a substância WT-02 apresentou 226-228 ° C, já a WT-03 o ponto de fusão foi de 181-183 ° C. Esses valores encontram-se na mesma faixa descrita por Farias (1991) em sua tese de doutorado para a diidroisocucurbitacina B e diidrocurcubitacina B. Estruturalmente essas cucurbitacinas são muito semelhantes, diferindo apenas quanto à estereoquímica e posição da hidroxila do anel A, conforme mostrado na figura 58.

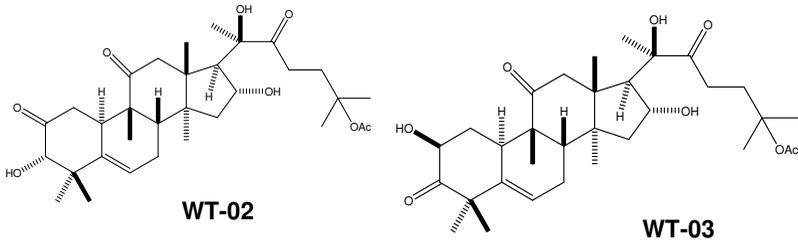


Figura 58: Estruturas químicas da diidroisocucurbitacina B (WT-02) e diidrocurbitacina B (WT-03)

Em virtude dos baixos rendimentos obtidos no isolamento da diidroisocucurbitacina B foi inviável a realização de modificações estruturais com essa molécula. A partir disso, uma perspectiva ou necessidade a obtenção de maiores quantidades dessa substância. Já a diidrocurbitacina B, pode ser isolada tanto da fração FW4 como da FW5 (figura 59), com bons rendimentos, sendo que nessa última estava praticamente pura.

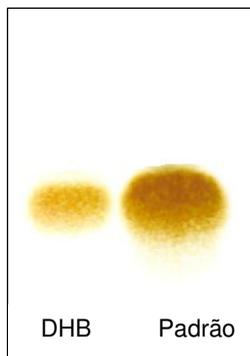


Figura 59: CCD comparativa padrão diidrocurbitacina B e substância isolada DHB do extrato de *W.ebracteata*.

Fase móvel: hexano:acetato de etila (1:1, V/V).

Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄.

Deteção: Vanilina fosfórica/ aquecimento.

Com a diidrocucurbitacina B foram realizadas algumas modificações estruturais que permitiram a obtenção dos seus derivados acetilado, reduzido e éster, mas não serão apresentados esses dados nesse momento.

Cabe destacar, que estão sendo realizada uma série de modificações moleculares com as cucurbitacina diidrocucurbitacina B e com a cucurbitacina R, majoritárias no extrato diclorometano, pela aluna de doutorado Karen Luise Lang, visando ensaios biológicos e verificar a relação estrutura atividade para esses compostos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com objetivo de obter cucurbitacinas de *Wilbrandia ebracteata* em quantidades adequadas para possibilitar ensaios biológicos e modificações estruturais, bem como verificar a existência de substâncias ainda não descritas, foi testado um procedimento cromatográfico em coluna *tipo flash* que permitiu constatar a predominância da diidrocurbitacina B nas frações 50:50 e 40:60 através das análises por CLAE (figura 60), o que foi verificado também por CCD (ver figura 11).

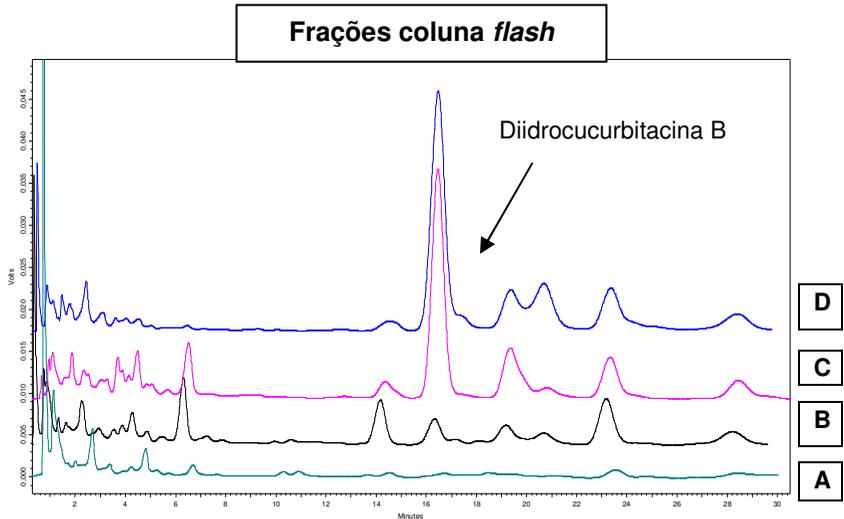


Figura 60: Cromatogramas, obtidos por CLAE, das frações 70:30; 60:40; 50:50 e 40:60 obtidas a partir do fracionamento do extrato diclorometano.

Coluna: C18 (150x4,6 mm; 5 μ m).

Eluente: CH₃CN:H₂O (40:60; V/V)

Deteção: 230 nm

Fluxo: 1 mL/min.

Amostras: **A**-Fração 70:30.

B-Fração 60:40.

C-Fração 50:50.

D-Fração 40:60.

A predominância da diidrocurbitacina B e da cucurbitacina B em extratos de *Wilbrandia ebracteata* já foi apontada por Krepsky e colaboradores (2009) que realizaram análise quantitativa do extrato diclorometano preparado com raízes de taiuiá. Os teores descritos para a diidrocurbitacina B foi de 63,0 mg/100 g de raiz, enquanto para a cucurbitacina B foi de 4,13 mg /100 g de raiz. Em nossos experimentos foi possível obter 47,0 mg/100 g de raiz da diidrocurbitacina B, rendimento próximo ao descrito por esses autores, indicando a efetividade do processo extrativo.

Por outro lado, entre as frações obtidas nesse processo, foi observada a presença de outras cucurbitacinas e algumas dessas substâncias puderam, com base na comparação com amostras autênticas, ser identificadas como a diidrocurbitacina E e diidroisocucurbitacina B, em concentrações relativamente baixas quando comparadas a diidrocurbitacina B. Além das citadas, foi constatada a presença de uma substância diferente dos padrões. Para essa substância foi realizada a elucidação estrutural com base em métodos espectroscópicos (IV, UV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC). Experimento de rotação ótica forneceu $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +38,8$ (c.1,60; clorofórmio) e espectrometria de massas de alta resolução permitiram identificá-la como (+) - 16 α ,20 β -triidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-5,25-dien-3,11,22-triona (WT-01). Para essa nova substância foram preparados os derivados por acetilação, redução com NaBH_4 e o éster com anidrido succínico.

Nos cromatogramas da figura 61 são representadas as análises realizadas com a WT-01 e padrões de cucurbitacinas com características de polaridade semelhantes. Os tempos de retenção observados foram de 14,31 min para a cucurbitacina B, 16,26 min para a diidrocurbitacina B, 18,95 min para a diidroisocucurbitacina B, 18,97 min para a diidrocurbitacina E e 19,20 min para a WT-01. As cucurbitacinas WT-01, diidrocurbitacina E e diidroisocucurbitacina B apresentam comportamento cromatográfico por CLAE e CCD bastante semelhante, sendo de difícil separação.

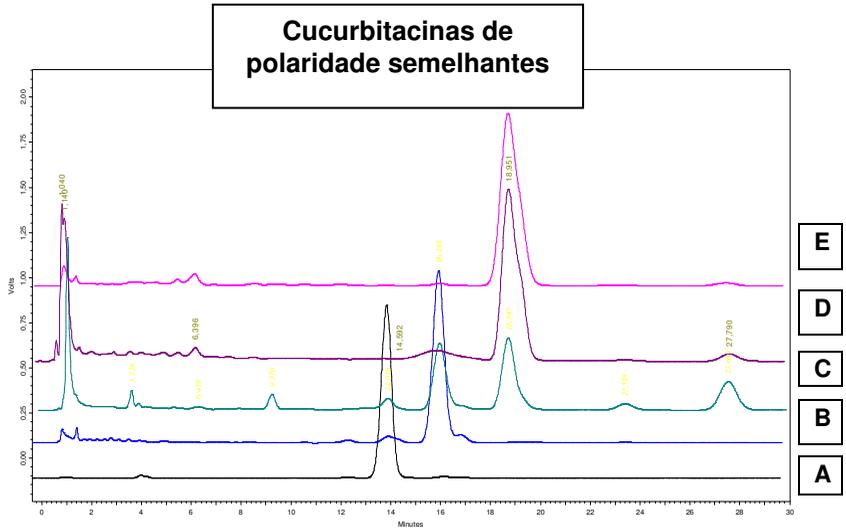


Figura 61: Cromatogramas, obtidos por CLAE, de cucurbitacinas mais apolares.

Coluna: C18 (150x4,6 mm; 5 μ m).

Eluente: CH₃CN:H₂O(40:60; V/V)

Deteção: 230 nm

Fluxo: 1mL/min.

Amostras: **A-** Cucurbitacina B.

B- Diidrocurbitacina B.

C- Diidrocurbitacina B + Diidrocurbitacina E.

D- Diidroisocurbitacina B.

E- WT-01.

Nas análises com as frações mais polares providas da coluna tipo flash (figura 62) foi observada em todas elas a predominância majoritária da isocurbitacina R e da cucurbitacina R.

Frações coluna flash

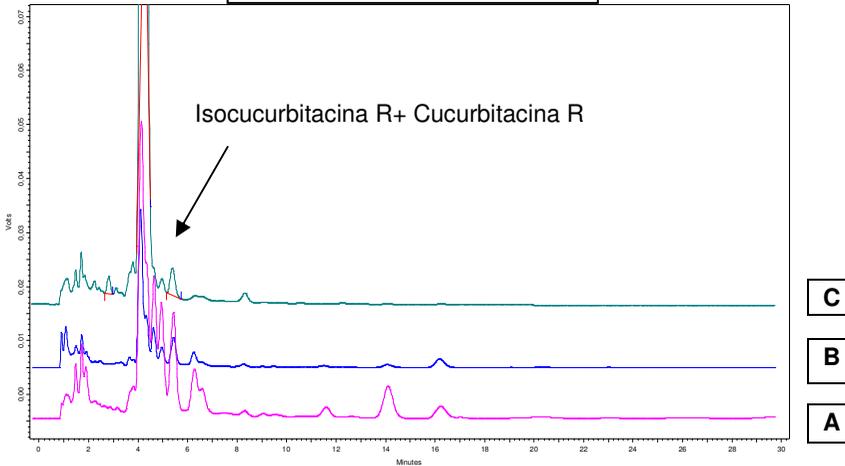


Figura 62: Cromatogramas, obtidos por CLAE, das frações mais polares.

Coluna: C18 (150x4,6 mm; 5 μ m).

Eluente: CH₃CN:H₂O (40:60; V/V)

Deteção: 230 nm

Fluxo: 1 mL/min.

Amostras: **A-** Fração 30:70.

B- Fração 20:80

C- Fração AcoEt.

As análises realizadas por CLAE permitiram, a partir da área dos picos, determinar quais são as cucurbitacinas encontradas majoritariamente em cada uma das frações obtidas do fracionamento das raízes secas de *Wilbrandia ebracteata*. Na tabela 18 são apresentados os valores obtidos nas análises.

Tabela 18: Análise por CLAE da área dos picos de cucurbitacinas presentes nas frações obtidas com o fracionamento do extrato diclorometano.

	F. 70:30	F. 60:40	F. 50:50	F. 40:60	F. 30:70	F. 20:80	F. AcoEt
1	-	122341	305788	237921	-	-	-
2	-	118052	969687	1170610	74521	-	-
3	-	56035	176185	911054	175873	-	-
4	-	-	-	604258	819175	1102150	2573960
5	-	-	-	-	13704	34142	64757

***Em negrito:** fração na qual cada cucurbitacina é predominante.

Cucurbitacinas: **1**-WT-01;

2-Diidrocucurbitacina B;

3- Cucurbitacina B;

4- Isocucurbitacina R +cucurbitacina R;

5-W6/W7

Esses dados podem orientar a continuidade dos trabalhos, visando o isolamento de maior quantidade das substâncias identificadas, por exemplo, para a mistura de isômeros W6/W7, os quais não foram avaliados quanto às atividades citostática, antiviral e antiinflamatória. Essas substâncias apresentam estrutura diferenciada, com ciclo adicional na cadeia lateral, possivelmente decorrente de uma reação de desidratação de outra cucurbitacina já descrita para *Wilbrandia ebracteata*.

Farias em sua tese de doutorado (1991) descreve um experimento realizado com a cucurbitacina codificada como W-15, na qual através da reação com H₂SO₄ 9N foi observada a formação das cucurbitacinas W6 e W7 (figura 63).

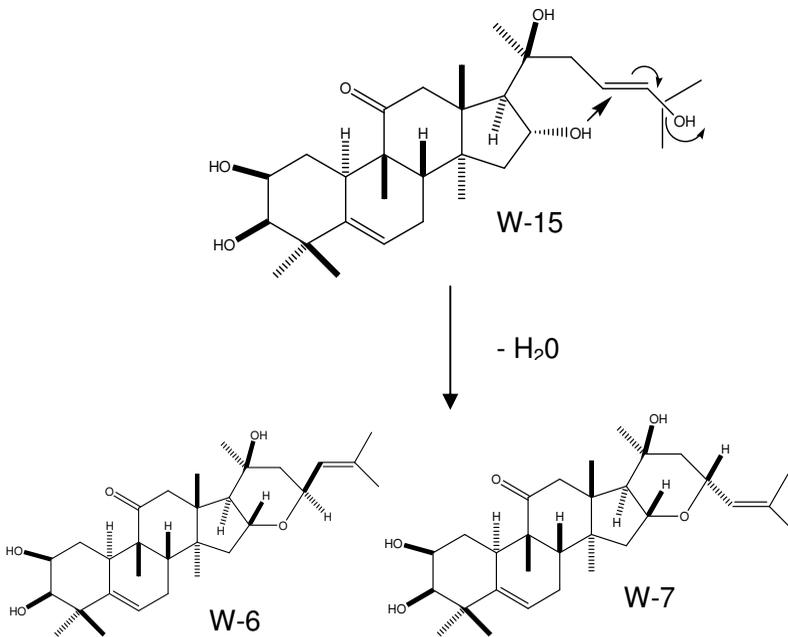


Figura 63: Formação das cucurbitacinas W6 e W7 a partir da W-15 em meio ácido. Fonte: FARIAS, 1991.

Também foram descritos outros experimentos para verificar a formação dessas cucurbitacinas durante o processo de secagem da raiz. Para tanto, amostras de W-6/W-7 foram aplicadas em uma placa sobre sílica gel a 60° C. Não foi constatada a formação da W6 e W7 a partir da W-15 durante esse procedimento e nem por exposição à luz. Dessa forma, não se comprovando a hipótese de tratar-se de um artefato formado durante a secagem do material vegetal

Cabe ressaltar ainda, que nas análises por CLAE, especialmente na fração 50:50 observa-se algumas substâncias que não puderam ser identificadas, como as com tempo de retenção de 6,93 min e 20,91 min.

Os cromatogramas obtidos através das análises por CLAE das raízes secas e frescas de *Wilbrandia ebracteata* mostraram semelhança no perfil cromatográfico, ainda que tenham sido constatadas variações em relação aos teores de algumas

cucurbitacinas, como por exemplo, em relação à concentração da diidrocurcubitacina B e da cucurbitacina B (figura 64). É interessante observar que nas análises realizadas com as raízes frescas, a cucurbitacina B apresentou maior teor do que no extrato preparado com as raízes secas. Esse fato pode ser em virtude dos diferentes locais de coleta, mas também sugere a possibilidade de uma menor estabilidade da cucurbitacina B, fato que não foi investigado neste trabalho.

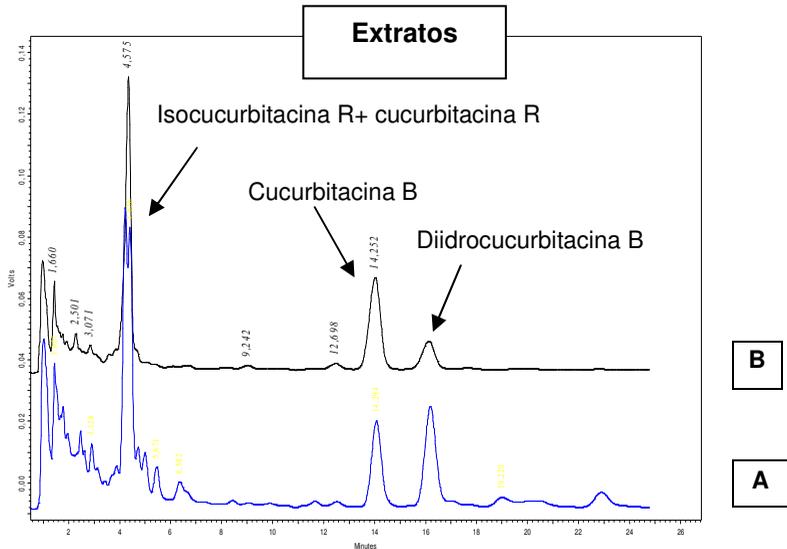


Figura 64: Cromatogramas, obtidos por CLAE, comparando extratos raízes secas e frescas de *Wilbrandia ebracteata*.

Coluna: C18 (150 X 4,6 mm; 5 μ m)

Eluente: CH₃CN:H₂O (40:60; V/V) - modo isocrático

Amostras: **A**- Raízes secas

B- Raízes frescas

Em relação à atividade biológica foram avaliados o potencial citotóxico e a atividade antiviral de uma série de cucurbitacinas modificadas sinteticamente pela aluna de doutorado Karen Luise Lang, dentre os quais foram inclusos o composto WT-01 e seus derivados acetilados e reduzidos. Esse trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório de

Virologia Aplicada, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pela Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões. Na avaliação da citotoxicidade foi utilizado o método colorimétrico do sal de tetrazolium (MTT) em células Vero. Desses compostos, nenhum apresentou atividade antiviral. Os mesmos compostos serão avaliados ainda a atividade citostática em cultura de células, com diferentes linhagens.

7 CONCLUSÕES

A partir do fracionamento do extrato em diclorometano de raízes de *Wilbrandia ebracteata* em coluna cromatográfica do tipo flash foi possível a separação da diidroisocucurbitacina B, diidrocucurbitacina B e de uma cucurbitacina inédita na literatura, cuja estrutura foi elucidada 16 α ,2 β ,20 β -triidroxi-10 α ,17 α -cucurbit 5,25-dien-3,11,22-triona (WT-01).

As modificações estruturais com essa cucurbitacina permitiram a obtenção dos derivados:

- Diacetilado nas posições C2 e C16, a partir da acetilação com piridina e anidrido acético;
- Reduzido nas posições C3 e C22, a partir da reação com NaBH₄;
- Éster monossustituído em C2, a partir da reação com anidrido succínico.

8 REFERÊNCIAS

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M.; SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; ALMEIDA, M.T.R.; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, vol.76, n.3-4, p.374-378, 2005.

ARISAWA, M.; HATASHITA, T.; NUMATA, Y.; TANAKA, M.; SASAKI, T. Citotoxic principles from *Chrysosplenium flagelliferum*. **International Journal of Pharmacognosy**, vol.35, n. 2, p. 141-143, 1997.

BARANOWSKA, M.K.; CISOWSKI, W. Flavonas C-glycosides from *Brionia alba* e *Brionia dioica*. **Phytochemistry**, vol. 39, n.3, p.727 - 729, 1995.

BARTALIS, J.; HALAWEISH, F.T. Relationship between cucurbitacins reversed-phase high-performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. **Journal of Chromatography B analytical Technologies Biomedical and Life Sciences**. vol. 818, p.159-166, 2005.

BARROSO, G.M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L. & LIMA; H.C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, vol.1. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 1978.

BAUER, R.; WAGNER, H. Cucurbitacin-containing drugs. Analysis and standardization of medicinal drugs and plant preparations by high-performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic methods. II. **Deut Apoth Zeit**, 123, p.1313-1321, 1983.

BAUER, R.; BERGANZA, L.H.; SELIGMANN, O.; WAGNER, H. Cucurbitacins and flavone C-glycosides from *Cayaponia tayuya*. **Phytochemistry**, vol. 24, n.7, p.1587-1591, 1985.

BRAGA, F. C.; KREIS, W.; OLIVEIRA, A. B. D. Isolation of cardenolides from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata* by rotation locular counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol.756, p.287-291, 1996.

BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry: A practical guide**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993.

CHEN, J.C.; CHIU, M.H.; NIE, R.L.; CORDELL, G.A.; QIU, S.X. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. **Natural Products Reports**, vol.22, n.6, p.386-399, 2005.

COELHO, R.G. **Estudo químico de *Zollernia ilicifolia*, *Wilbrandia ebracteata* e *Caesalpinia ferrea***. 2004. 186p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2004.

CROVETTO, R.M. Revisión crítica del género *Wilbrandia* (*Cucurbitaceae*). **Darwiniana**, vol.12, n.1, p.17-42, 1960.

DANG, G. V; RODE, B.M.; STUPPNER, H. Quantitative electronic structure-activity relationship (QESAR) of natural cytotoxic compounds: maytansinoids, quassinoids and cucurbitacins. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.2, n.5-6, p.331-350, 1994.

D'ÁVILA, M.C. **Da flora medicinal do Rio Grande do Sul**. 1910.155 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina e Farmácia de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1910.

DINAN, L.; HARMATHA, J.; LAFONT, R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. **Journal of Chromatography A**, New York, vol.935, n.1-2, p.105-123, 2001.

DUNCAN, K.L.K.; DUNCAN, M.D.; ALLEY, M.C.; SAUSVILLE, E.A. Cucurbitacin E induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. **Biochemical Pharmacology**, vol.52, n. 10, p. 1553-1560, 1996.

DUNCAN, M.D.; DUNCAN, K.L.K. Cucurbitacin E target proliferating endothelia. **Journal of Surgical Research**, vol. 69, n.1, p.55-60, 1997.

ESCANDELL, J.M.; RECIO, M.C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; NICOLÁS, M.C.; RÍOS, J.L. Dihydrocucurbitacin B isolated from *Cayaponia tayuya*, reduces damage in adjuvant-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, vol. 532, n.1-2, p.145-154, 2006.

ESCANDELL, J.M.; RECIO, M.C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; NICOLÁS, M.C.; RÍOS, J.L. Cucurbitacin R reduces the inflammation and bone damage associated with adjuvant arthritis in lewis rats by suppression of tumor necrosis factor- α in T lymphocytes and macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 320, n.2, p.581-590, 2007.

FANG, X.; PHOEBE Jr., C.H.; PEZZUTO, J.M.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R. Plant anticancer agents, XXXIV. Cucurbitacins from *Elaeocarpus dolichostylus*. **Journal of Natural Products**, vol.47, n.6, p.988-993, 1984.

FARIAS, M.R. **Análise de cucurbitacinas em espécies de cucurbitaceae conhecidas popularmente como taiuiá.** 1986. 300p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

FARIAS, M.R; SCHENKEL, E.P. Caracterização de cucurbitacinas em espécies vegetais conhecidas popularmente como taiuiá. **Ciência e Cultura**, vol.39, n.10, p.970-973, 1987.

FARIAS, M.R. **Cucurbitacine aus *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (*Cucurbitaceae*).** 1991. 237p. Tese de Doutorado – Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms, Universität Bonn, Bonn, Alemanha, 1991.

FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; MAYER, R.; RÜCKER, G. Cucurbitacins as constituents of *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, vol.59, n.3, p.272-275, 1993.

Farmacopéia Brasileira. São Paulo: Nacional, 1926.

FOLADOR, P. **Estudo do potencial hipoglicemiante da Wilbrandia ebracteata em ratos normais e diabéticos.** 2009. 70p. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

FREI, B.; HEINRICH, M.; HERRMANN, O.; ORJALA, J.E.; SCHMITT, J.; STICHER, O. Phytochemical and Biological Investigation of *Begonia heracleifolia*. **Planta Medica**, vol.64, p. 385-386, 1998.

GAZOLA, A.C. **Estudo químico das raízes e folhas de Wilbrandia ebracteata Cogn.** 2008. 142p Dissertação de Mestrado- Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GONZALEZ, F.G.; STASI, L.C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. **Phytomedicine**, vol.9, n.2, p.125-134, 2002.

GUHA, J.; SEM, S. The cucurbitacins, a review. **Plant Biochemistry Journal**, vol.2, n.1, p.12-28, 1975.

HAMATO, N.; KOSHIBAT.; PHAN, T.N.; TATSUMI, Y.; NAKAMURA, D.; TAKANO, R.; HAYASHI, K.; HONG, Y.M.; HARA, S. Trypsin and elastase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* LINN.) Seeds: purification, Amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors. **Journal of Biochemistry**, vol.117, n.2, p. 432-437, 1995.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen.** Basel: Birkhauser, vol.8, p.363-375 e 711, 1989.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T. Structures of cayaponosides A, B, C e D, glucosides of new nor-cucurbitacins in the roots of *Cayaponia tayuya*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.40, n.10, p.2885-2887, 1992.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T. Structures of new non-aromatized *nor*-cucurbitacin glucosides in the roots of *Cayaponia tayuya*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 41, n.5, p.986-988, 1993.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. I. Structures of cayaponosides, new 29-*nor*-1,2,3,4,5,10-hexadehidrocucurbitacin glucosides¹⁾. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.42, n. 11, p.2295-2300, 1994a.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. II.¹⁾ Structures of cayaponosides, new 29-*nor*-2,11-dioxocucurbita-3,5-diene glucosides²⁾. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.42, n.11, p.2301-2304, 1994b.

HIMENO, E.; NAGAO, T.; HONDA, J.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. III. Structures of cayaponosides, new 29-*nor*-1,-2,3,4,5,10-hexadehidrocucurbit-6-ene glucosides¹⁾. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol.42, n.11, p.2370-2372, 1994c.

HOEHNE, F.C. **Vegetais anti-helmínticos**. São Paulo: Weisflog, 1920.

HOEHNE, F.C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas**. São Paulo: Graphicars, 1939.

KONOSHIMA T, KASHIWADA, Y., TAKASAKI M, KOZUKA, M., YASUDA, I., CONSENTINO, M., LEE, K.-H. Cucurbitacin F derivatives, anti-HIV principles from *Cowania mexicana*. ***Biorganic & Medicinal Chemistry Letters***, vol.4, p.1323-1326, 1994.

KONOSHIMA, T.; TAKASAKI, M.; KOZUKA, M.; NAGAO, T.; OKABE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Inhibitory effects of cucurbitane triterpenoids on Epstein-barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumor. II^{1,2}. ***Biological & Pharmaceutical Bulletin***, vol.18, p.284-287, 1995.

KREPSKY, P.B.; CEVELIN, M.O.; PORATH, D.; PETERS, R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; FARIAS, M.R. High performance liquid chromatography determination of cucurbitacins in the roots of *Wilbrandia ebracteata* Cogn. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, vol.19, n.3, 2009.

LAZARIS, D.; CHINO, I.; ROUSSIS, V.; VAYIAS, C.; ROSSAKIS, C. Chemical constituents from *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae) and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. ***Pharmaceutical & Pharmacological Letters***, vol. 8, p.50-51, 1998.

LAVIE, D.; GLOTTER, E. The cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes. ***Fortschr. Chem Org. Naturst.***, vol.29, p.307-362, 1971.

LIU, T.; ZHANG, M.; ZHANG, H.; SUN, C.; YANG, X. Combined antitumor activity of cucurbitacin B and docetaxel in laryngeal cancer. ***European Journal of Pharmacology***, vol.587, n.1-3, p.78-84, 2008.

MEBBERLEY, D. J. **The plant book** - a portable dictionary of the vascular plants. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1997.

METCALF, R. L.; METCALF, E. R. **Plant kairomones in insect ecology and control**. Chapman and Hall, New York, p.168, 1992.

MIRÓ, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. **Phytotherapy Research**, vol. 9, n. 3, p. 159-168, 1995.

MONRO, A.K. A New species of *Cayaponia manso* (Cucurbitaceae: Cucurbitaceae) from Mesoamerica. **Novon**: a journal for botanical nomenclature, vol.6, p.82-84, 1996.

MOREIRA, N.J. **Dicionário de plantas medicinais brasileiras**. Rio de Janeiro: Correio Mercantil, 1862.

NEUWINGER, H.D. **Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgifte**. Stuttgart: Wissenschaftliche Vergesellschaft, 1994.

PAGOTO, C.L.A.; KAPLAN, M.A.C.; GOTTLIEB, O.R. Cucurbitacinas: fármacos ou toxinas? **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, n. 3, p. 113-124, 1996.

PANOSSIAN, A.; GABRIELIAN, E.; WAGNER, H. Plant adaptogens. II. Bryonia as an adaptogen. **Phytomedicine**, vol.4, p.85-99, 1997.

PANOSSIAN, A.; GABRIELIAN, E.; WAGNER, H. On the mechanism of action of plant adaptogens with particular reference to cucurbitacin R diglucoside. **Phytomedicine**, vol.6, p.147-155, 1999.

PEREIRA, B.M.R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III – atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.73, p.85-86, 1992.

PETERS, R.R.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, vol.63, n.6, p.525-528, 1997.

PETERS, R.R.; SALEH, T.F.; LORA, M.; PATRY, C.; BRUM-FERNANDES, A.J.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. **Life Sciences**, vol.64, n.26, p.2429-2437, 1999.

PETERS, R.R.; KREPSKY, P.B.; SIQUEIRA, J.M.; ROCHA, J.C.S.; BEZERRA, M.M.; RIBEIRO, R.A.; BRUM-FERNANDES, A.J.; FARIAS, M.R.; ROCHA, F.A.C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Nitric oxide and cyclooxygenase may participate in the analgesic and anti-inflammatory effect of the cucurbitacins fraction from *Wilbrandia ebracteata*. **Life sciences**, vol.73, n.17, p.2185-2197, 2003.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, vol.6, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978.

PORTO, M.L. Cucurbitaceae - In Schultz, A.R - **Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul**, vol.31, p.1-64, 1974.

RAO, V.S.N.; ALMEIDA, F.R.C.; MORAES, A.P.; SILVA, J.V.; NASCIMENTO, S.C.; MORAES, M.O. Evaluation of the purified fraction of *Wilbrandia verticillata* from antitumour activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol.86, p.43-46, 1991.

RECIO, M.C.; PRIETO, M.; BONUCELLI, M.; ORSI, C.; MÁÑES, S.; GINER, R.M.; CERDA-NICOLÁS, M.; RÍOS, J.L. Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. **Planta Medica**, vol.70, p.414-420, 2004.

RÍOS, J.L.; GINER, R.M.; JIMÉNEZ, M.J.; WICKMAN, G.; HANCKE, J.L. A study on the anti-inflammatory activity of *Cayaponia tayuya* root. **Fitoterapia**, vol. 61, p.275-278, 1990.

RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G.G. **Instrumentelle pharmazeutische analytik**. 3.ed. Stuttgart: Wissenschaftliche, 2001.

RYU, S.Y.; CHOI, S.U.; LEE, S.H.; LEE, C.O.; AHN, J.W.; Cytotoxicity of cucurbitacins in vitro. **Archives of Pharmacal Research**, vol.18, p.60-61, 1995.

SANTOS, R.I. **C-glicosilflavonas em espécies de cucurbitaceae conhecidas popularmente como taiuiá**. 1989. 154p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

SANTOS, R.I.; SANTOS, M.A.; SCHENKEL, E.P. Analysis of the plant drug *Wilbrandia ebracteata* (Cogn.) Cogn. **International Journal of Pharmacognosy**, vol.34, n.4, p.300-302, 1996.

SCHENKEL, E.P.; FARIAS, M.R.; MAYER, R.; BREITMAIER, E.; RÜCKER, G. Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Phytochemistry**, vol.31, n.4, p.1329-1333, 1992.

SECO, J.M, QUINOÁ, E.; RIGUERA, R. The assignment of absolute configuration by NMR. **American Chemical Society**, n.104, p.17-117, 2004.

SHIBUYA, M.;SHINYA, A.;EBIZUKA, Y. Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytoesterol biosynthesis. **Tetrahedron**, Oxford, vol.60, n.33, p.6995-7003, 2004.

SIQUEIRA, J.M. **Atividade antitumoral da dihidrocucurbitacina B, um composto isolado de *Wilbrandia ebracteata* Cogn: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2007. 114 p., Tese de doutorado- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SIQUEIRA, J.M.; PETERS, R.R.; GAZOLA, A.C.; KREPSKY, P.B.; FARIAS, M.R.; RAE, G.A.; BRUM-FERNANDES, A.J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Life Sciences**, vol. 80, n.15, p.1382-1387, 2007.

SIQUEIRA, J.M.; GAZOLA, A.C.; FARIAS, M.R.; VOLKOV, L.; RIVARD, N.; BRUM-FERNANDES, A.J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both in vitro and in vivo models. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, vol.64, p.529-538, 2009.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7.ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

TAKAHASHI, N.; YOSHIDA, Y.; SUGIURA, T.; MATSUNO, K.; FUJINO, A.; YAMASHITA, U. Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. **International Immunopharmacology**, vol.9, n.4, p.508-513, 2009.

TANNIN-SPITZ, T.; GROSSMAN, S.; DOVRAT, S.; GOTTLIEB, H.E.; BERGMAN, M. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. **Biochemical pharmacology**, vol.73, p.56-67, 2007.

TESSIER, A.M.; PARIS, R.R. Sur des euphorbiacées toxiques africaines à cucurbitacines. **Toxicological European Research**, vol.1, n.5, p.329-336, 1978.

VALENTE, L.M.M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. **Química Nova**, vol.27, n.6, p.944-948, 2004.

ZANG, M.; ZANG, H.; SUN, C.; SHAN, X.; YANG, X.; LI-LING, J.; DENG, Y. Targeted constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatocellular carcinoma cells by cucurbitacin B. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, vol.63, p.635-642, 2009.

WAGNER, H.; NORR, H.; WINTERHOFF, H. Plant adaptogens I. Bryonia as an adaptogen. **Phytomedicine**, vol.1, p.63-76, 1994.

WAKIMOTO, N.; YIN, D.; O'KELLY, J.; HARITUNIAN, T.; KARIAN, B.; SAID, J.; XING, H.; KOEFFIER, P. **Cancer Science**, vol.89, n.9, p.1793-1797, 2008.

WITKOWSKI, A.; WOYNAROWSKA, B.; KONOPA, J. Inhibition of the biosynthesis of DNA, RNA e protein in HeLa S3 cells by cucurbitacins, glucocorticoid-like cytotoxic triterpenes. **Biochemical Pharmacology**, vol.33, n.7, p.995-1004, 1984.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)