

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

**SEMI-SÍNTESE DE DERIVADOS GLICOSILADOS DE
DIHIDROCUCURBITACINA B, ISOLADA DE
Wilbrandia ebracteata Cogn.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
VANESSA ROCHA MACHADO**

FLORIANÓPOLIS

2011

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

**SEMI-SÍNTESE DE DERIVADOS GLICOSILADOS DE
DIHIDROCUCURBITACINA B, ISOLADA DE
Wilbrandia ebracteata Cogn.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmácia por Vanessa Rocha Machado como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Co-Orientadora: Prof. Dr^a. Lílian Sibelle Campos Bernardes

Florianópolis
2011

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

M149s Machado, Vanessa Rocha

Semi-síntese de derivados glicosilados de dihidrocucurbitacina B, isolada de *Wilbrandia ebracteata* Cogn [dissertação] / Vanessa Rocha Machado ; orientador, Eloir Paulo Schenkel. - Florianópolis, SC, 2011.

115 p.: il., tabs.

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. Citotoxicidade. I. Schenkel, Eloir Paulo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Dedico esta dissertação à LÍlian Sibelle Campos Bernardes, como forma de minha gratidão pela sua dedicação, não apenas com o trabalho desenvolvido, mas também com a minha formação ética e profissional. Por todo o carinho, confiança e principalmente, pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Farmácia pela oportunidade de realização deste trabalho;

Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida, e às outras agencias de fomento, CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, pela orientação, confiança e incentivo durante todo o período de iniciação científica e mestrado. Agradeço também pela preocupação com minha formação acadêmica, bem como com as valiosas contribuições para meu crescimento pessoal. São ensinamentos que levarei para a vida inteira. Sinto-me muito orgulhosa de fazer parte do seu currículo de orientações;

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Lílian Sibelle C. Bernardes, pela paciência, disponibilidade, carinho e por me contagiar diariamente com o amor pela pesquisa e docência;

Aos professores Dr^a. Ivone Carvalho, Dr^a. Mareni Farias e Dr. Miguel Caro por aceitar o convite para a partição da banca examinadora e contribuir com este trabalho. Em especial, à Prof. Dr^a. Mareni Farias pelo valioso “legado de cucurbitacinas” deixado para o nosso grupo de pesquisa;

Aos demais professores do Departamento de Ciências Farmacêuticas e do Programa de Pós-Graduação, em especial, Prof. Dra. Maique W. Biavatti, Prof. Dr^a. Miriam Falkenberg e Prof. Dr. Flavio Reginatto pelos conhecimentos transmitidos. Aos professores Jorge Palermo, Fernando Durán e Gabriela Cabrera, da Universidade de Buenos Aires, pelas análises espectroscópicas fornecidas;

Agradeço ao Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, em especial doutoranda Izabella Thaís da Silva pela realização dos ensaios de atividade citotóxica;

Às técnicas, Solange Dias e Cláudia Terrazas, pelo apoio. Em especial, a Sol, por estar sempre presente compartilhando nosso dia a dia no

laboratório de Química Farmacêutica Medicinal, sempre com disposição para nos ajudar a resolver os “pepinos”;

À nossa grande “família de pesquisa”. Àqueles que já não estão presentes no dia a dia, mas com lembranças inesquecíveis: Silvana, Fernanda, Cintia e Carize. Obrigada àqueles que participaram intensamente neste período: Geison, Carol, Andressa, Cassandra, Tati, Bel, Éverson, Teca, Simone, Cris, Dani, Andréia, Cintia e Carlos. A pesquisa é muito mais divertida com a presença de vocês! Especialmente, ao meu amigo Solomon: um presente que Deus importou de Gana para nosso laboratório. Amigo tu és um exemplo de força, fé e, principalmente, amor!

Agradeço especialmente as meninas do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal, principalmente pela paciência e compreensão nos últimos meses: Karen (obrigada por tudo! Aprendi muito com você!), Lara (obrigada pelo alto-astrol sempre!), Maluá (obrigada pela confiança), Ana Luisa (obrigada pela ajuda nos últimos dias) e Fabi (obrigada pela sua alegria);

À minha família: meus pais, Ana e Vaime, meus irmãos Janaina e Vaime Junior, meu sobrinho Cauan e meu cunhado Cleber. Agradeço ao apoio, e por estenderem a mão e doarem-se de coração quando eu mais precisei. Serei grata eternamente. Amo vocês!

Ao meu namorado: Rafael Roecker! Obrigada pelo amor, pela compreensão, pelos sonhos construídos e pelos momentos mais felizes da minha vida em dois anos de mestrado e namoro. Te amo! Agradeço também à sua família, Elzira, Valdori e Rangel, por todo o carinho e aconchego;

Aos meus amigos “antigos” e aos novos amigos, principalmente pós-graduandos, que conquistei nestes dois anos;

E por último, não em grau de importância, mas por ser o responsável por eu ter tanto a agradecer e pelo dom da vida! Obrigada, meu Deus!

“O conhecimento é orgulhoso por ter aprendido tanto; a sabedoria é humilde por não saber mais”.

William Cowper

RESUMO

Dihidrocucurbitacina B foi isolada do extrato diclorometânico das raízes de *Wilbrandia ebracteata* e submetida a reações de *O*-glicosilação, a fim de obter derivados glicosilados bioativos. Duas metodologias distintas foram utilizadas para o acoplamento de glicose e galactose, na formação da ligação *O*-glicosídica com dihidrocucurbitacina B. A reação clássica de Koenigs-Knorr forneceu o derivado 16-ortoéster peracetilado de dihidrocucurbitacina B (**7**), enquanto a reação com imidatos resultou no composto 2-*O*- β -galactosídeo de dihidrocucurbitacina B (**12**). As estruturas dos compostos obtidos, bem como de dihidrocucurbitacina B, foram confirmadas através de espectroscopia de RMN 1D e 2D, IV e espectrometria de massas (ESI-TOF). Cabe destacar que os compostos obtidos neste trabalho, são inéditos na literatura. Os derivados glicosídicos foram avaliados com relação à citotoxicidade em linhagem celular de adenocarcinoma humano pulmonar (A549) e apresentaram valores de CC₅₀ maiores que o composto natural dihidrocucurbitacina B, ou seja, mostram-se menos citotóxicos.

Palavras-chave: dihidrocucurbitacina B, *Wilbrandia ebracteata*, *O*-glicosilação, citotoxicidade.

ABSTRACT

Dihydrocucurbitacin B was isolated from the dichloromethane extract of the roots of *Wilbrandia ebracteata* and submitted to *O*-glycosylation reactions, in order to obtain bioactive glycosylated derivatives. Two different methodologies were used for coupling of glucose and galactose for the formation of *O*-glycosidic bond with dihydrocucurbitacin B. The reaction of classical Koenigs-Knorr provide the derivative of 3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-glucopyranose-1,2-(dihydrocucurbitacin B orthoacetate) (7) while the reaction with imidates reaction resulted 2-*O*- β -glucopyranosyl of dihydrocucurbitacin B. The structures of the compounds obtained, as well dihydrocucurbitacin B, were confirmed by spectroscopic 1D and 2D NMR, IR and mass spectroscopy (ESI-TOF). It should be noted that the compounds obtained in this study are unpublished in the literature. Glycosidic derivatives were evaluated with respect to cytotoxicity in cell lines of human lung adenocarcinoma (A549) and had CC_{50} values higher than the natural compound dihydrocucurbitacin B in other words that showed less cytotoxicity.

Keywords: dihydrocucurbitacin B, *Wilbrandia ebracteata*, *O*-glycosilation, cytotoxicity

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Cucurbitacinas.....	21
2.1.1 Potencial terapêutico de cucurbitacinas.....	25
2.1.1.1 Atividade citotóxica e antitumoral	25
2.1.1.2 Atividade anti-inflamatória	26
2.1.2 Glicosídeos de cucurbitacinas	27
2.2 <i>Wilbrandia ebracteata</i> Cogn.....	29
2.2.1 Constituição química	31
2.2.1.1 Atividade citotóxica e antitumoral de dihidrocucurbitacina B	34
2.2.1.2 Atividade anti-inflamatória de dihidrocucurbitacina B	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivos específicos	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Isolamento de dihidrocucurbitacina B	39
4.2 Síntese dos doadores monossacarídicos	43
4.2.1 Doadores monossacarídicos funcionalizado em C-1 com bromo.....	46
4.2.2 Doadores monossacarídicos funcionalizados em C-1 com tricloroacetimidato	48
4.3 Reações de <i>O</i> -glicosilação	53
4.3 Avaliação da atividade citotóxica	67
5. MATERIAIS E MÉTODOS	70
5.1 Materiais	70
5.2 Métodos.....	72
5.2.1 Aceptores monossacarídicos	72
5.2.2 Síntese dos doadores monossacarídicos	74
5.2.2.1 Derivados glicosídicos – série a.....	74
5.2.2.2 Derivados galactosídicos – série b	78
5.2.3 Derivados glicosilados de dihidrocucurbitacina B.....	82
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	88
7 CONCLUSÕES.....	96
8. APÊNDICE.....	97
9. REFERÊNCIAS.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Ecballium elaterium</i> (flores, habitat e frutos) e estrutura de elaterina (proposta em 1960).....	22
Figura 2: Estrutura correta de elaterina (cucurbitacina E).....	22
Figura 3: Estruturas químicas de algumas cucurbitacinas (CHEN et al., 2005).	23
Figura 4: Representação genérica de cucurbitacina e em destaque os componentes estruturais relacionados com toxicidade e citotoxicidade.	25
Figura 5: Exemplos de <i>O</i> -glicosídeos de cucurbitacinas.....	28
Figura 6: Raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i> e raízes e frutos <i>Cayaponia tayuya</i> (respectivamente).....	30
Figura 7: Cucurbitacinas isoladas de <i>W. ebracteata</i> (SCHENKEL et al., 1992, FARIAS et al., 1993, LANG et al., 2011).....	32
Figura 8: Estruturas químicas de <i>O</i> -glicosídeos de isolados de <i>W. ebracteata</i>	33
Figura 9: Estrutura química de dihidrocucurbitacina B.	33
Figura 10: Reação genérica de glicosilação. GP: grupo protetor; R: substituinte; X: grupo abandonador em C-1 (anomérico).	38
Figura 11: CCD comparativa extrato diclorometânico (DCM) e composto isolado dihidrocucurbitacina B (DCB).	39
Figura 12: Fracionamento cromatográfico a partir do extrato diclorometânico (DCM) de <i>W.ebracteata</i>	40
Figura 13: Representação 3D de dihidrocucurbitacina B, em destaque hidroxila ligada carbono 20 (<i>Software</i> Discovery Studio 3.1 Client)....	41
Figura 14: Estrutura química de dihidrocucurbitacina B e seu espectro completo de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃). Em destaque os sinais referentes aos hidrogênios em C-2 e C-16 em RMN ¹ H e COSY ¹ H- ¹ H.	42
Figura 15: Estruturas 3D de dihidrocucurbitacina B na conformação mais estável (menor energia) (<i>Software</i> Discovery Studio 3.1 Client).	42
Figura 16: Espectro RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acetil-D- α , β -D-glicopirranose (2a).	44
Figura 17: Espectros comparativos RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz): A) constantes de acoplamento H-3 e H-4 do composto 2a . B) constantes de acoplamento H-3 e H-4 do composto 2b	45
Figura 18: Sobreposição dos espectros de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acetil-D- α , β -D-glicopirranose (2a – azul) e brometo de 2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acetil-D- α -D-glicopirranose (3a – vermelho).	47

Figura 19: Representação da influência dos dipolos na formação da ligação β e α .	47
Figura 20: Estabilização eletrônica do efeito anomérico (A e B formas de ressonância). Orbitais moleculares n e σ^* estão sinperiplanares ideal para a sobreposição.	48
Figura 21: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-D-glicopiranosose (4a).	50
Figura 22: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato (5b).	52
Figura 23: Sobreposição dos espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) dihidrocucurbitacina B (composto 4 -azul) e composto 7 (vermelho).	54
Figura 24: Espectro HMBC (CDCl_3 , 500 MHz) composto 3,4,6-tri- <i>O</i> -acetil- α -D-glicopiranosose-16-ortoacetato de dihidrocucurbitacina B (7), região 2,2 a 0 ppm.	55
Figura 25: Participação do grupamento vizinho C-2 na formação de β -D-glicosídeos.	56
Figura 26: Espectro de massas (ESI-TOF) do composto 16-ortoéster peracetilado de dihidrocucurbitacina B.	57
Figura 27: Estrutura química de colesterol.	58
Figura 28: Espectro na região do infravermelho (pastilha KBr) colesterol (A) e produto glicosilado 9 (B).	60
Figura 29: Espectros comparativos de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz). Colesterol (composto 8 -azul) e 2,3,4,6-per- <i>O</i> -acetil- β -D-galactopiranosídeo colesterol (composto 10 -vermelho).	61
Figura 30: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 2- <i>O</i> - β -D-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-galactopiranosídeo) de dihidrocucurbitacina B (11).	63
Figura 31: Espectro 2D HMBC (500 MHz, CDCl_3) região δ 5,5 a 3,8.	64
Figura 32: Espectro de massas (ESI-TOF) do composto 11 .	64
Figura 33: Espectro de massas $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ do composto 12 .	66
Figura 34: Proposta de fragmentação do composto 12 .	67
Figura 35: CCD extrato diclorometânico (DCM) e dihidrocucurbitacina B (DCB). Fase estacionária: gel de sílica F_{254} ; Fase móvel: hexano:AcOEt (60:40; v/v); Detecção: vanilina- H_3PO_4 / aquecimento (100°C).	90
Figura 36: Frutos secos de <i>Luffa operculata</i> Cogn e estrutura química de cucurbitacina B. Foto: Vanessa Rocha Machado.	91
Figura 37: Monossacarídeos glicol (15), xilose (16), ribose (17) e arabinose (18).	95

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Representação esquemática de possíveis derivados glicosilados de dihidrocurbitacina B (unidade monossacarídica representada genericamente)	37
Esquema 2: Rota sintética para a preparação dos doadores monossacarídicos. Série a: glicose; Série b: galactose.....	43
Esquema 3: Mecanismo de acetilação promovido por iodo.....	45
Esquema 4: Bromação dos monossacarídeos peracetilados.....	46
Esquema 5: Esquema de síntese dos doadores funcionalizados com tricloroacetimidato.	49
Esquema 6: Mecanismo proposto para a desacetilação seletiva da hidroxila anomérica com o reagente acetato de hidrazina.....	51
Esquema 7: Mecanismo proposto para a formação do doador tricloroacetimidato em presença da base DBU.	52
Esquema 8: Reação de <i>O</i> -glicosilação de dihidrocurbitacina B; metodologia de Köenigs Knorr.	53
Esquema 9: Mecanismo de formação do 1,2-ortoéster (7).....	56
Esquema 10: Reação de <i>O</i> -glicosilação utilizando colesterol como aceptor.....	59
Esquema 11: Reação de imidatos com molécula simplificada (8).....	60
Esquema 12: Reação de <i>O</i> -glicosilação com imidatos utilizando como aceptor dihidrocurbitacina B.	62
Esquema 13: Provável mecanismo da reação de Imidatos para a formação do composto 11	65
Esquema 14: Reação de desacetilação do composto 11	65
Esquema 15: Preparação de derivados substituídos em C2 com tosila e posição C-16 oxidada.	94

LISTA DA TABELAS

Tabela 1: CC ₅₀ de dihidrocucurbitacina B para algumas linhagens celulares tumorais.	34
Tabela 2: Principais metodologias de formação da ligação O-glicosídica.	38
Tabela 3: Principais mudanças nas condições reacionais na reação de Koenigs-Knorr*	58
Tabela 4: Avaliação da atividade citotóxica dos derivados glicosilados	68
Tabela 5: Valores estimados de log <i>P</i> e valores de CC ₅₀ dos derivados glicosilados	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ : Deslocamento químico em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão trimetilsilano (TMS= 0 ppm)

AcOEt: Acetato de etila

Ag₂CO₃: Carbonato de prata

Ag₂O: Óxido de prata

CC₅₀: Concentração citotóxica para inibir o crescimento tumoral em 50 % das células.

CCD: Cromatografia em camada delgada

-CH₃: Grupamento metila

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

COSY: Espectro de correlação (*Homonuclear Correlation Spectroscopy*)

d: Duplete

DABCO: 1-4-diazabicyclo[2.2.2]octano

DBU: 1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno

DCB: Dihidrocucurbitacina B

DCE: 1,2-dicloroetano

DCM: Diclorometano

dd: Duplo duplete

ddd: Duplo duplo duplete

DE₅₀: Dose necessária para desempenhar a atividade em 50 % da população em teste

DL₅₀: Dose letal para 50 % da população em teste

EBV: Vírus Epstein –Barr

ESI-TOF: Ionização por *spray* eletrostático por tempo de voo

F.M: Fórmula molecular

Hex: Hexano

HMBC: Coerência Heteronuclear de Múltiplas Ligações (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*)

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

Hz: Hertz

J: Constante de acoplamento

logP: Coeficiente de partição

m: Multiplete

M.M: Massa molecular

MeOH: Metanol

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

N₂: Nitrogênio gasoso

Na₂SO₄: Sulfato de sódio

NOESY: *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*

-OAc: Grupamento acetila

P.F: Ponto de fusão

PCC: Clorocromato de piridínio

QSAR: Relação estrutura-atividade quantitativa

REA: Relação estrutura-atividade

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s: Simpleto

TMSOTf: Triflato de trimetilsilila

TPA: 12-tetradecanoilforbol-13-acetato

1 INTRODUÇÃO

A variedade de metabólitos secundários encontrados na natureza representa uma ferramenta essencial na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, tornando-se uma inspiração para os químicos neste processo, em função da diversidade de estruturas químicas dos produtos naturais (NICOLAOU;CHEN;DALBY, 2009)

A relevância dos produtos naturais como fonte de potenciais agentes quimioterápicos tem sido descrita na literatura. Em 2007, Newman e Cragg analisaram os fármacos lançados no período de janeiro de 1981 a junho de 2006 e constataram que 17 % das novas moléculas (NCE = novas entidades químicas) constituíam-se de moléculas sintéticas que continham grupos farmacofóricos derivados diretamente de fontes de produtos naturais. Dados de 2008 revelam que 225 fármacos baseados em produtos naturais estavam em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo que dois fármacos derivados de plantas e dois semi-sintéticos encontravam-se na fase de pré-registro (HARVEY, 2008). Nesse sentido, torna-se evidente a importância dos produtos naturais no processo de desenvolvimento de novos fármacos.

Cucurbitacinas são triterpenos dotados de um esqueleto incomum $19(10\rightarrow 9\beta)$ *abeo-5 α -lanostano* (cucurbitano), sendo principalmente encontradas na família Cucurbitaceae. Esta classe de compostos pode ser isolada na forma livre (aglicona) ou glicosilada. Algumas espécies de cucurbitáceas são utilizadas na medicina tradicional para as mais variadas enfermidades, dentre elas, artrite, sinusite, tumores de pele e até mordida de cobras (MOREIRA, 1862, PIO CORRÊA, 1978) No Brasil, foi incluída na Farmacopéia Brasileira I a cucurbitácea *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn, popularmente conhecida como taiuiá. O uso popular para as raízes de taiuiá é para o tratamento de doenças como dermatoses, amenorréia, úlcera gástrica aguda, prisão de ventre e doenças reumáticas (PIO CORRÊA, 1978). Na década de 80, o uso de taiuiá se tornou uma panacéia com alguns produtos contendo esta droga vegetal sendo comercializados, inclusive exportados.

Uma análise destes produtos revelou que o material vegetal utilizado como insumo farmacêutico tratava-se de *Wilbrandia ebracteata* Cogn., ao invés de *C. tayuya* a espécie da Farmacopéia Brasileira I, pelo menos no que diz respeito ao material comercializado no Rio Grande do Sul (FARIAS et al., 1986)

A partir dessa constatação, desde a década de 80, *W. ebracteata* vem sendo estudada por nosso grupo de pesquisa com relação a sua constituição química e propriedades biológicas, principalmente,

citotóxica, antitumoral e anti-inflamatória, as quais demonstram resultados promissores. Dentre as cucurbitacinas descritas para esta espécie, destaca-se a dihidrocucurbitacina B por ser o composto majoritário do extrato diclorometânico das raízes de *W. ebracteata*.

Especificamente dihidrocucurbitacina B, apresentou resultados relevantes na redução significativa do crescimento tumoral quando avaliada frente à linhagem de melanoma (B16F10), assim como, inibição do edema de pata induzido por carragenina (PETERS;FARIAS;RIBEIRO-DO-VALLE, 1997, SIQUEIRA JR et al., 2007, SIQUEIRA et al., 2009).

Atualmente, as pesquisas de novos fármacos tem se baseado na avaliação da estrutura química de compostos e no desenvolvimento de substâncias análogas, visto que a obtenção de estruturas completamente novas, depende grande investimento de tempo e dinheiro (PATRICK, 2009). Inserido neste contexto, está a obtenção de derivados glicosilados de dihidrocucurbitacina B, a fim de obter compostos ativos, com características físico-químicas melhoradas, como por exemplo solubilidade o que facilitaria os ensaios biológicos *in vitro*. Os O-glicósídeos de dihidrocucurbitacina B sintetizados neste trabalho serão avaliados por grupos de pesquisa colaboradores frente à atividade citotóxica em linhagens tumorais, anti inflamatória e anti-parasitária.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na presente revisão serão destacados, de forma sucinta, aspectos estruturais e alguns dados farmacológicos e toxicológicos sobre cucurbitacinas e *O*-glicosídeos de cucurbitacinas, especialmente sobre dihidrocucurbitacina B utilizada como material de partida para as reações de *O*-glicosilação. Ainda, será abordada a espécie *Wilbrandia ebracteata* Cogn, material vegetal utilizado como fonte de dihidrocucurbitacina B. Revisões mais amplas sobre o tema podem ser encontradas na literatura (LAVIE;GLOTTER, 1971, MIRO, 1995, CHEN et al., 2005, RÍOS et al., 2005, LEE;IWANSKI;THOENNISSEN, 2010).

2.1 Cucurbitacinas

Cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos altamente oxigenados e predominantemente encontrados na família Cucurbitaceae. No entanto, estes compostos também são encontrados em menor frequência em outras famílias, como por exemplo, Begoniaceae, Cruciferae, Dastiscaceae, Liliaceae entre outras. Os organismos vegetais das famílias citadas podem conter cucurbitacinas em diferentes órgãos, desde raízes e rizomas até folhas e frutos, bem como nas sementes (MIRO, 1995, VALENTE, 2004, CHEN et al., 2005).

As cucurbitáceas destacam-se pela importância econômica como preciosa fonte de alimentos e plantas ornamentais. Referindo-se ao primeiro aspecto estão abóbora moranga (*Cucumis pepo*), pepino e melão (*Cucumis sativus* e *Cucumis melo*), melancia (*Citrillus vulgaris*), maxixe (*Cucumis anguria*) e chuchu (*Schium eduli*). Outros gêneros são cultivados para fins ornamentais, como por exemplo, cabaça (*Lagenaria vulgaris*) também utilizada na fabricação de cuias e vasilhames (PAGOTTO;KAPLAN;GOTTLIEB, 1996).

A primeira cucurbitacina foi descrita em 1831 por Morries e Hannel, recebendo o nome de elaterina, uma vez que o composto cristalino foi isolado do suco dos frutos de *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae) (figura 1). Porém, sua caracterização estrutural ocorreu em 1960, sendo descrita com um esqueleto tetracíclico do tipo lanostano.



Figura 1: *Ecballium elaterium* (flores, habitat e frutos) e estrutura de elaterina (proposta em 1960). (Fotos: www.plantsystematics.org).

No entanto, a estrutura proposta em 1960 foi contestada um ano depois por Lavie e colaboradores, os quais comprovaram um novo esqueleto para elaterina. Baseados nas observações provindas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), os autores definiram um esqueleto tetracíclico inédito, no qual a metila 19 inicialmente alocada no carbono 10, encontrava-se na posição 9. Migração essa indicada com a nomenclatura 19 (10→9 β) *abeo* (LAVIE et al., 1961). Outras correções foram realizadas, como os posicionamentos da dupla ligação no anel B e a carbonila no anel C, caracterizando o esqueleto 19 (10→9 β) *abeo*-5 α -lanostano (cucurbitano) e, posteriormente, elaterina recebeu o nome de cucurbitacina E (figura 2).

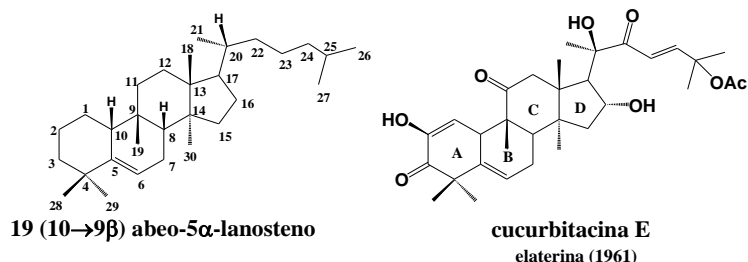


Figura 2: Estrutura correta de elaterina (cucurbitacina E).

Cucurbitacinas podem ser isoladas na forma livre (aglicona) ou glicosilada, no entanto, o isolamento de glicosídeos de cucurbitacinas é dificultado pela presença da enzima β -glicosidase em muitos tecidos vegetais (LAVIE;GLOTTER, 1971, DINAN;HARMATHA;LAFONT, 2001). Exemplos de *O*-glicosídeos

de cucurbitacinas, bem como suas atividades farmacológicas, serão abordados no **item 2.1.2**.

De maneira geral, existem mais de 50 cucurbitacinas identificadas e suas principais diferenças estruturais estão relacionadas às funcionalidades no anel A, modificações na cadeia lateral e fatores estereoquímicos (VALENTE, 2004, CHEN et al., 2005, RÍOS et al., 2005). Na figura 3, estão representados alguns exemplos de cucurbitacinas, demonstrando a diversidade estrutural desta classe de compostos:

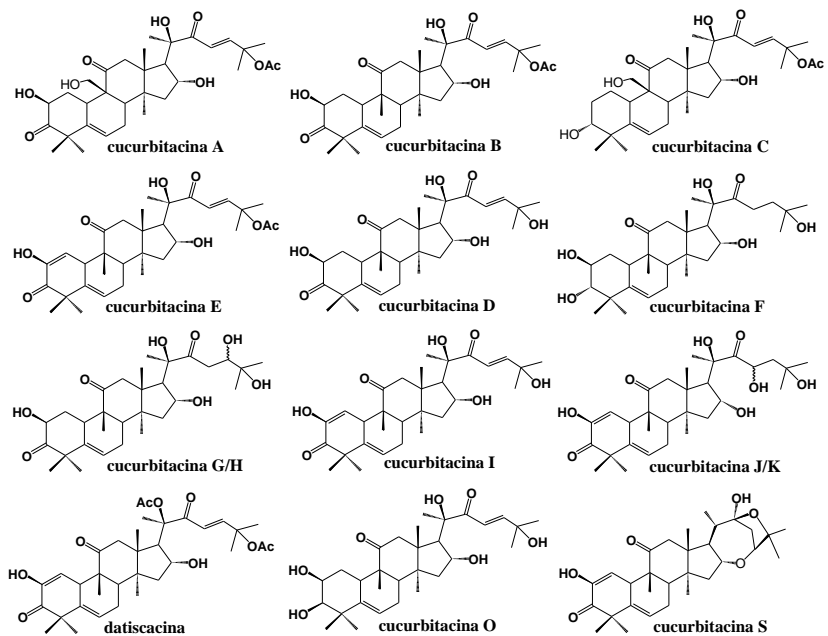


Figura 3: Estruturas químicas de algumas cucurbitacinas (CHEN et al., 2005).

Dentre as várias cucurbitacinas já descritas na literatura, a cucurbitacina B e cucurbitacina D são freqüentemente relatadas como as mais comuns em espécies da família Cucurbitaceae. Alguns autores sugerem que as cucurbitacinas B e cucurbitacina E são os compostos primários e dão origem as outras cucurbitacinas a partir de processos

enzimáticos durante o desenvolvimento e maturação da planta (METCALF;LAMPMAN, 1989).

Algumas espécies de cucurbitáceas são de uso tradicional na medicina popular e foram objeto de intensa investigação nas décadas de 50 e 60 do século passado. No entanto, para algumas delas foi evidenciada elevada toxicidade, o que trouxe consigo uma queda no interesse sob o ponto de vista terapêutico. Em relação à toxicidade, destacam-se os dados de dose letal mediana (DL_{50}) para a cucurbitacina D, apenas 5 mg via oral e 2,0 mg via intraperitoneal em ratos (DAVID;VALLANCE, 1955, GITTER et al., 1961). Estudos mais recentes associam essa toxicidade com alguns elementos estruturais, que são freqüentes, mas não estão presentes em todas as estruturas de cucurbitacinas.

A própria variedade estrutural de cucurbitacinas isoladas de fontes naturais permite avaliar qualitativamente a relação entre a estrutura e a citotoxicidade. Musza e colaboradores (1994) avaliaram diferentes cucurbitacinas isoladas de *Conocarpus scoparioides* em um modelo de citotoxicidade *in vitro* com células JY (vírus Epstein Barr imortalizado em células B), verificaram que a cadeia lateral está diretamente envolvida na citotoxicidade, bem como a presença de uma carbonila α,β insaturada na mesma. Já modificações no anel A parecem não influenciar na citotoxicidade, no modelo utilizado.

No entanto, estudos mais amplos utilizam métodos computacionais para avaliar a relação entre os elementos estruturais e a toxicidade. Van Dang, Rode e Stuppner (1994) realizaram um estudo de relação estrutura-atividade eletrônico quantitativo (QESAR) baseados em resultados descritos na literatura de citotoxicidade e toxicidade animal. Como resultado, observou-se que átomos estão associados, especialmente com a toxicidade animal: O-3, C-9, C-11, C-16 e C-25, enquanto outros estão relacionados com a citotoxicidade: C-1 e C-2 (insaturação ou posição 2 oxigenada), carbonila α,β insaturada em C-22, metila em C-9 , O-25 (substituído com acetila) (figura 4).

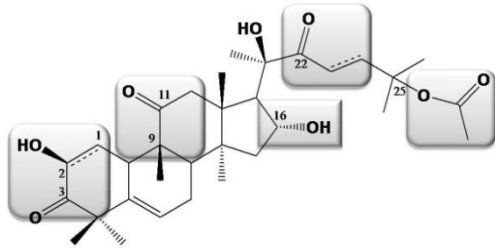


Figura 4: Representação genérica de cucurbitacina e em destaque os componentes estruturais relacionados com toxicidade e citotoxicidade.

O mesmo estudo ainda apontou que as hidroxilas em C-2 e C-16, quando substituídas, aumentavam drasticamente a citotoxicidade, na ordem de 100 vezes, quando comparados com compostos que continham as hidroxilas livres. Com o auxílio de programas computacionais foi possível estabelecer os grupos farmacofóricos, dentre eles, está o grupamento acetila substituído em C-25. Substituições nesta posição com grupos fortemente doadores de elétrons esterificados no O-25 tornavam a citotoxicidade seletiva cerca de 1700 vezes comparado a substituição com o grupamento acetila.

2.1.1 Potencial terapêutico de cucurbitacinas

Uma diversidade de atividades farmacológicas tem sido descritas para cucurbitacinas baseada no uso etnofarmacológico das plantas que as contém, como por exemplo, antimicrobiana, hepatoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória. Tendo em vista as revisões publicadas (MIRO, 1995, CHEN et al., 2005, RÍOS et al., 2005, LEE;IWANSKI;THOENNISSSEN, 2010), abordaremos neste tópico, de forma sucinta, alguns estudos recentes sobre atividades citotóxica, antitumoral e anti-inflamatória.

2.1.1.1 Atividade citotóxica e antitumoral

As atividades citotóxica e antitumoral são as propriedades mais investigadas para cucurbitacinas, reflexo da conhecida toxicidade destes compostos, que presumivelmente exercem sobre células cancerígenas. De fato, na literatura são descritos estudos frente a diversas linhagens celulares *in vitro* e *in vivo*, sendo que cucurbitacinas exibem CC_{50} na ordem de nanomolares, como por exemplo, cucurbitacina E que inibiu a

proliferação de linhagens celulares de câncer de próstata com doses de 12 nM a 295 nM (DUNCAN et al., 1996)

A toxicidade não seletiva e o baixo índice terapêutico são os fatores apontados como limitante para o desenvolvimento de um fármaco com base nas cucurbitacinas. Uma solução, atualmente abordada, é o sinergismo de cucurbitacinas com agentes quimioterápicos já utilizados clinicamente. Tais associações são vantajosas visto que o efeito terapêutico é alcançado em baixas doses e evitam a resistência celular (LEE;IWANSKI;THOENNISSSEN, 2010).

Nesse sentido, Sadzuka e colaboradores (2008) avaliaram *in vitro* e *in vivo* o sinergismo entre cucurbitacina E e doxorubicina em sarcoma ovariano M5076. Cucurbitacina E na dose de 0,1 μ M (*in vitro*) aumentou os níveis de doxorubicina nas células tumorais e diminuiu o efluxo de doxorubicina das mesmas, mantendo os níveis do quimioterápico nas células. Já os ensaios *in vivo* mostraram que cucurbitacina E (0,2 mg/kg) co-administrada com doxorubicina diminuiu o tamanho e o peso do tumor em 50 % quando comparado com o tratado com doxorubicina.

Cucurbitacina B (0,5mg/kg), avaliada *in vivo* em osteosarcomas, juntamente com metotrexato permitiu a diminuição para 1/3 da dose do agente quimioterápico, mantendo a atividade antitumoral apresentada somente pelo fármaco (LEE et al., 2011). O sinergismo de cucurbitacina B (0,5mg/kg) também foi avaliado *in vivo* em tumor pancreático com o quimioterápico gencitabina (25mg/kg) e demonstrou redução no crescimento tumoral em 79 %, sem apresentar sinais de toxicidade (IWANSKI et al., 2010).

O efeito sinérgico de cucurbitacinas e agentes quimioterápicos criam uma perspectiva para o uso terapêutico desta classe, visto que as doses avaliadas normalmente estão abaixo das doses tóxicas.

2.1.1.2 Atividade anti-inflamatória

Existem alguns relatos da potencial atividade anti-inflamatória de algumas cucurbitacinas. Cucurbitacinas B, D, E e I foram isoladas das frutas de *Cucurbita andreana* e foram avaliadas *in vitro* com relação a inibição das isoenzimas ciclooxigenases 1 e 2, apresentando seletividade para COX-2. Porém, a inibição foi considerada moderada quando comparada com anti-inflamatórios ibuprofeno, naproxeno e rofecoxibe. Na dose de 100 μ g/ml, cucurbitacina B apresentou percentual de inibição de 32 %, cucurbitacina D 29 %, cucurbitacina E 35 % e cucurbitacina I 27% (JAYAPRAKASAM;SEERAM;NAIR, 2003).

Em outro estudo, cucurbitacina B reduziu a permeabilidade vascular no modelo de edema induzido por ácido acético e apresentou DE_{50} de 6,1 mg/kg (YESILADA et al., 1989). A mesma cucurbitacina apresentou melhores valores de DE_{50} em modelos de inflamação induzido por serotonina (3,7 mg/kg) e bradicinina (3,7 mg/kg) (YESILADA et al., 1997).

Cucurbitacina R também apresenta atividade anti-inflamatória relevante. No modelo de edema de pata induzido por fosfolipase A_2 em ratos, foi capaz de reduzir em 61 % o edema na dose 3m/kg (v.i) e em edema de orelha induzido por TPA, cucurbitacina R na dose de 10mg/kg inibiu 36 % do edema (RECIO et al., 2004).

Outros trabalhos importantes destacam a atividade anti-inflamatória de dihidrocucurbitacina B e estão descritos no item **2.2.1.2**.

2.1.2 Glicosídeos de cucurbitacinas

Alguns autores descrevem que os glicosídeos de cucurbitacinas apresentam difícil isolamento (LAVIE;GLOTTER, 1971, DINAN;HARMATHA;LAFONT, 2001). No entanto, existem diversos exemplos de glicosídeos de cucurbitacinas, sendo estes em sua totalidade *O*-substituídos, podendo ser monossacarídeos ou oligossacarídeos (dextrógiros). Diferentes tipos de moléculas de açúcar podem ser encontradas como, por exemplo, rhamnose, gentibiose, alose, soforose e oligossacarídeos de glicose. A orientação da ligação glicosídica comumente encontrada é β , porém existem relatos de oligossacarídeos orientados em α (CHEN et al., 2005).

Os oxigênios freqüentemente substituídos por estas moléculas estão ligados aos carbonos C-2, C-3, C-16 e C-25, e com menor freqüência em C-8, C-19, C-23 e C-24. Alguns exemplos de *O*-glicosídeos de cucurbitacinas encontram-se na figura 5:

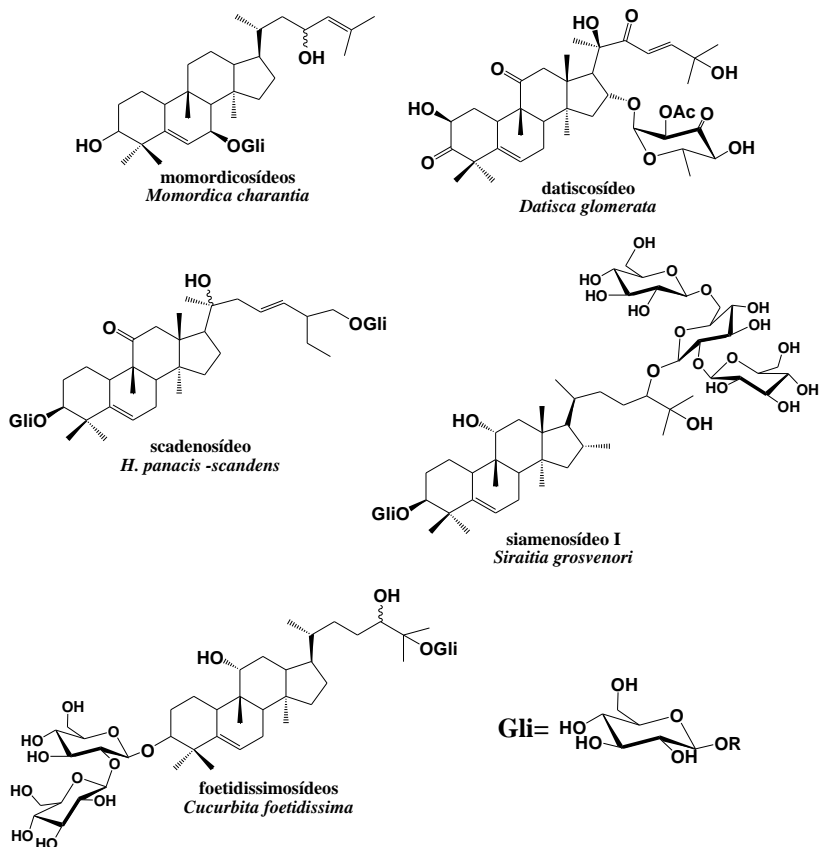


Figura 5: Exemplos de *O*-glicosídeos de cucurbitacinas.

Apesar de cucurbitacinas serem conhecidas pelo seu sabor amargo ao paladar, em 1990 foi isolado de *Siraitia grosvenori* (Cucurbitaceae) um heterosídeo extremamente doce. Siamenosídeo I (figura 5) é cerca de 560 vezes mais doce que o açúcar podendo ser um substituto do mesmo em pacientes diabéticos (MATSUMOTO et al., 1990). Com relação à atividade farmacológica de glicosídeos de cucurbitacinas, são poucos os relatos na literatura, concentrando-se principalmente na avaliação da citotoxicidade.

Os daticosídeos (figura 5) são monossacarídeos exclusivamente substituídos no oxigênio ligado ao carbono C-16 e com diversas

modificações (oxidação, acetilação e desoxigenação) na molécula de açúcar (quadro 3). Estes compostos foram avaliados em linhagens celulares de carcinoma nasofaríngeo e demonstraram elevada toxicidade, sendo a dose efetiva para inibir o crescimento de 50 % das células foi de 0,05 mg/ml (SASAMORI et al., 1983).

Tannin-Spitz e colaboradores (2007) verificaram a atividade citotóxica de 2-*O*- β -glicosídeo de cucurbitacina B associado ao glicosídeo de cucurbitacina E, na proporção de 1:1, em linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). A concentração citotóxica (IC₅₀) para esta associação foi de 8 μ M, para cada cucurbitacina, após 48 horas.

Alguns glicosídeos foram isolados de rizomas da cucurbitácea chinesa *H.panicis-scandens*, dentre eles o glicosídeo da cucurbitacina F, o qual apresentou significativa atividade inibitória na ativação do vírus EBV. O mesmo glicosídeo foi avaliado *in vivo* em ratos induzidos com TPA para carcinoma de pele, sendo capaz de reduzir em 40 % o número de papilomas por rato, quando comparado com o grupo não tratado (KONOSHIMA et al., 1994).

No entanto, controvérsias são encontradas na literatura, já que alguns estudos indicaram para os glicosídeos de cucurbitacinas a mesma atividade citotóxica que suas agliconas avaliadas isoladamente (MENG et al., 2008, MATSUDA et al., 2010)

2.2 *Wilbrandia ebracteata* Cogn

W. ebracteata (figura 5) é uma das espécies conhecidas popularmente como “taiuíá”, nome nativo de várias espécies de Cucurbitaceae, e sua distribuição ocorre desde o Rio Grande do Sul até o Espírito Santo (PORTO, 1974; MATOS, 1979). Essa espécie vem sendo estudada desde a década de 80, devido a comprovação da utilização de suas raízes como insumo farmacêutico em produtos com declaração de conteúdo de *Cayaponia tayuya*. Esta última, por sua vez, é a espécie descrita como “taiuíá” na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (1926) (figura 6).



Figura 6: Raízes de *Wilbrandia ebracteata* e raízes e frutos *Cayaponia tayuya* (respectivamente). (Fotos: Eloir Paulo Schenkel).

Na medicina tradicional, as raízes de taiuiá são utilizadas no tratamento das mais diversas enfermidades: prisão de ventre, dermatoses, amenorréia, úlcera gástrica aguda e doenças reumáticas (PIO CORRÊA, 1978).

Estudos farmacológicos *in vivo* realizados com o extrato diclorometânico de raízes de *W. ebracteata*, na dose de 10 mg/kg, administrados via oral (v.o), em ratos com artrite induzida por zimossana indicaram atividade antinociceptiva, diminuição da produção de óxido nítrico e não foram observados danos na mucosa gástrica dos ratos em que foram administrados com até 30 mg/kg (v.o) de extrato diclorometânico de *W. ebracteata*. (REBELO PETERS et al., 2003).

Em outro modelo de inflamação (pleurisia induzida por carragenina) o extrato diclorometânico também apresentou significativos resultados na inibição do influxo de células, diminuição no extravasamento dos fluidos na cavidade pleural, assim como, uma queda dos níveis de prostaglandinas E_2 na dose de 10 mg/kg (v.o) em ratos (PETERS et al., 1999).

A atividade hepatoprotetora foi avaliada em um estudo *in vivo* pela administração do extrato hidroetanólico das folhas de *W. ebracteata*. Os ratos, previamente tratados (v.o) com o extrato, exibiram redução da lesão gástrica induzida por etanol, sendo estes resultados mais expressivos que o tratamento com 20 mg/kg de omeprazol (GONZALEZ; DI STASI, 2002). Na avaliação da atividade antiherpética, os extratos (acetato de etila e butanólico) das raízes de *W. ebracteata* não apresentaram bons índices de seletividade (IS) em ensaio *in vitro* (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005).

2.2.1 Constituição química

Desde a década de 80, são realizados estudos sobre a constituição química de *W. ebracteata*, os quais resultaram em dissertações de mestrado (FARIAS, 1986, SANTOS, 1986, KREPSKY, 2003, GAZOLA, 2008, GUIMARÃES, 2010) e tese de doutorado (FARIAS, 1991). Destacam-se como constituintes majoritários cucurbitacinas, mas também foi verificada a presença de flavonóides C-glicosídeos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou a presença de duas cucurbitacinas inéditas (KL-39 e WT-01) e uma nova cucurbitacina para a espécie *W. ebracteata* (isocucurbitacina R), isoladas a partir do extrato diclorometânico (GUIMARÃES, 2010, LANG et al., 2011). Na figura 7, estão representadas as cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata*.

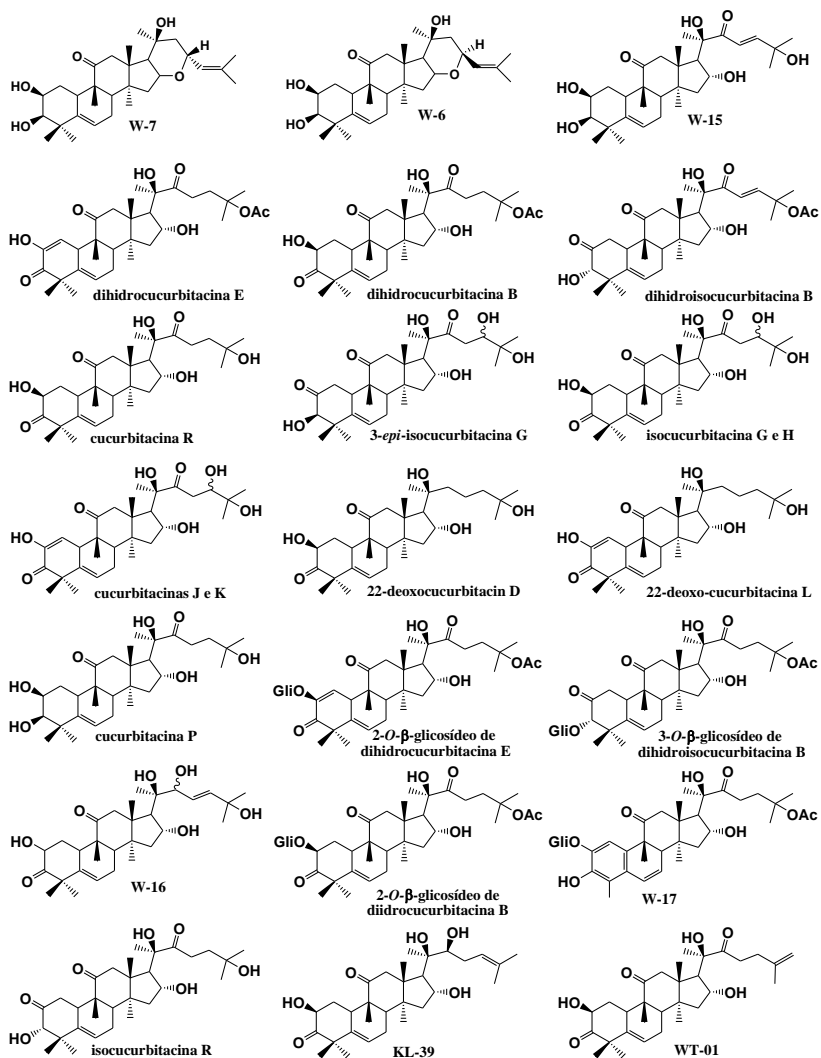


Figura 7: Cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata* (SCHENKEL et al., 1992, FARIAS et al., 1993, LANG et al., 2011)

São descritos também o isolamento de alguns *O*-glicosídeos presentes nas raízes de *W. ebracteata* (SCHENKEL et al., 1992, FARIAS et al., 1993, GAZOLA, 2008). Em sua totalidade *O*- β -glicosídeos de cucurbitacinas (figura 8):

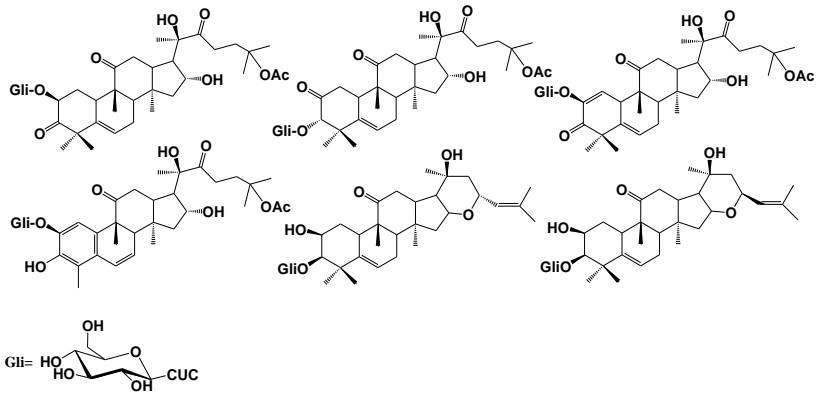


Figura 8: Estruturas químicas de *O*-glicosídeos de isolados de *W. ebracteata*.

Dentre as cucurbitacinas descritas para a espécie *W. ebracteata*, dihidrocucurbitacina B é composto majoritário do extrato diclorometânico das raízes desta espécie (KREPSKY et al., 2009). Estruturalmente, é caracterizada pela presença de dois sistemas α -cetol (localizados no anel A e cadeia lateral), cadeia lateral saturada além da presença de um grupamento acetila na mesma. Ainda estão presentes grupamentos mais comuns em cucurbitacinas, como a cetona em C-11, comum em esteróides, e hidroxila em C-16 (Figura 9).

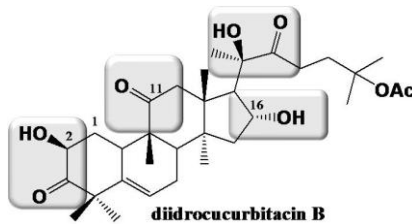


Figura 9: Estrutura química de dihidrocucurbitacina B.

2.2.1.1 Atividade citotóxica e antitumoral de dihidrocucurbitacina B

Seguindo a mesma lógica dos estudos realizados para cucurbitacinas em geral, a atividade citotóxica/antitumoral para dihidrocucurbitacina B vem sendo investigada. A maioria dos estudos, apresentam atividade citotóxica realizadas *in vitro* e apenas um estudo *in vivo* para atividade antitumoral.

Dihidrocucurbitacina B (1,8 e 3,6 μg) inibiu de forma potente a proliferação celular de maneira tempo e dose dependente em linhagem celular de câncer de mama (Bcap37). Os estudos *in vitro* determinaram que a ação citotóxica ocorra na fase G_2/M do ciclo celular, seguido pela apoptose (YANG et al., 2007).

O aprofundamento no estudo do mecanismo citotóxico de ação de dihidrocucurbitacina B mostrou que em linhagens celulares de câncer de colo com a ausência de fatores de transcrição (STAT3), a mesma inibiu significativamente a proliferação celular tumoral. Estes resultados sugeriram uma nova via de ação para a dihidrocucurbitacina B (MAPK), uma vez que estudos com outras cucurbitacinas apontavam a via STAT3 (ESCANDELL et al., 2008). Na tabela 1, são apresentadas as concentrações citotóxicas de dihidrocucurbitacina B capazes de inibir 50 % o crescimento tumoral (CC_{50}) em diferentes linhagens celulares.

Tabela 1: CC_{50} de dihidrocucurbitacina B para algumas linhagens celulares tumorais.

Linhagem celular	CC_{50} (μM)	Referência
HCT116 (câncer de colo)	9,8	(ESCANDELL et al., 2008)
HKe3 (câncer de colo)	4,7	(ESCANDELL et al., 2008)
NUGC-3 (câncer gástrico humano)	3,26	(WU et al., 2004)
HONE-1 (câncer nasofaríngeal)	1,55	(WU et al., 2004)
A549 (adenocarcinoma de pulmão)	12,84	(LANG et al., 2011)
KB (câncer nasofaríngeal)	14,72	(LANG et al., 2011)
RD (rabdomiosarcoma)	12,74	(LANG et al., 2011)
HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal)	10,57	(LANG et al., 2011)

Com relação a testes *in vivo*, o único trabalho descrito na literatura até o presente momento para a atividade antitumoral foi realizado nesta Universidade. Promissores resultados foram obtidos com dihidrocucurbitacina B em camundongos induzidos com linhagem de melanoma, especificamente células B16F10. Na dose de 10 mg/kg (v.o), o composto isolado foi capaz de reduzir em 83 % a massa tumoral, sem apresentar distúrbios como diarreia e sangramentos. Ainda, neste mesmo modelo, foi observada a redução em 50 % na metástase pulmonar (SIQUEIRA et al., 2009).

2.2.1.2 Atividade anti-inflamatória de dihidrocucurbitacina B

O uso popular mais difundido para a droga vegetal “taiuiá” é no tratamento de doenças reumáticas, ou seja, processos inflamatórios. Neste sentido, objetivando explicar cientificamente a tradição popular, alguns estudos avaliam a ação anti-inflamatória de dihidrocucurbitacina B.

No modelo de estudo inflamatório em ratos com edema de pata induzido por carragenina, dihidrocucurbitacina B na dose de 4mg/kg inibiu após 3 horas de administração (v.o) 46 % da formação do edema. Estes resultados foram mais promissores que aqueles obtidos com o fármaco indometacina (10mg/kg) (RECIO et al., 2004). Ainda utilizando este modelo, porém com a via de administração intraperitoneal, dihidrocucurbitacina B (3mg/kg) apresentou 56 % de inibição do edema, enquanto a indometacina (5mg/kg) causou 46 % de inibição (SIQUEIRA JR et al., 2007).

Outro modelo inflamatório avalia a ação de dihidrocucurbitacina B na hipersensibilidade tardia induzida por alérgenos utilizando a via de administração tópica. A aplicação de 0,3 mg/orelha de dihidrocucurbitacina B inibiu em 24 horas 39 % do edema causado por oxazolona, enquanto que resultados mais expressivos (60%) foram alcançados após 72 horas de administração tópica de 0,5 mg/orelha de dihidrocucurbitacina B contra o alérgeno dinitrofluorobenzeno (ESCANDELL et al., 2007).

3 OBJETIVOS

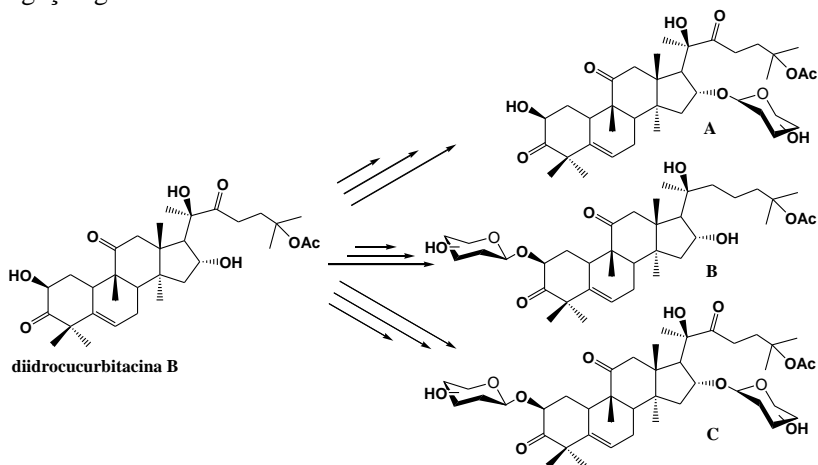
Os objetivos gerais do presente trabalho consistem na obtenção de dihidrocucurbitacina B a partir de raízes de *W. ebracteata* e a realização de reações de *O*-glicosilação, visando a obtenção de derivados glicosilados para a avaliação das atividades citotóxicas, antiviral, anti-inflamatória e antiparasitária.

3.1 Objetivos específicos

- Isolar dihidrocucurbitacina B a partir de raízes de *W. ebracteata*;
- Realizar reações de *O*-glicosilação na dihidrocucurbitacina B, buscando a obtenção de análogos mais hidrossolúveis e bioativos;
- Obter derivados contendo glicose e galactose nas posições C-2 e C-16 de dihidrocucurbitacina B;

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o interesse na obtenção de derivados de dihidrocucurbitacina B (DCB) com características hidrossolúveis o trabalho foi direcionado para a obtenção dos compostos **A**, **B** e **C** (figura 1), por meio de introdução de diferentes unidades monossacarídicas via ligação glicosídica.



Esquema 1: Representação esquemática de possíveis derivados glicosilados de dihidrocucurbitacina B (unidade monossacarídica representada genericamente)

Neste sentido, o desenvolvimento experimental do trabalho foi dividido em 3 etapas: (i) isolamento dihidrocucurbitacina B a partir de raízes de *W. ebracteata*, (ii) síntese dos doadores monossacarídicos (iii) reações de *O*-glicosilação.

A formação da ligação *O*-glicosídica (figura 10) é quimicamente caracterizada pela substituição de um grupo abandonador (X) da posição anomérica do açúcar devidamente protegido, o qual é denominado *doador monossacarídico*, por uma função hidroxílica qualquer que desempenha o papel de *ceptor*. A realização desta ligação é alcançada na presença de promotores específicos para cada tipo de metodologia utilizada, considerando o doador glicosídico selecionado. (DAVIS;FAIRBANKS, 2002, BRITO-ARIAS, 2007)

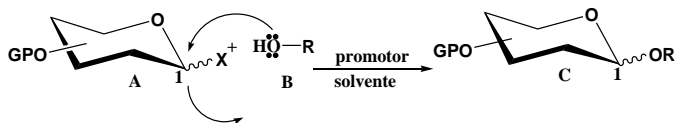


Figura 10: Reação genérica de glicosilação. GP: grupo protetor; R: substituinte; X: grupo abandonador em C-1 (anomérico).

A literatura descreve diversas metodologias para *O*-glicosilação. Na tabela 2, estão listados os principais métodos, denominados de forma simplificada, assim como o grupo abandonador do doador monossacarídico e os respectivos promotores reacionais.

Tabela 2: Principais metodologias de formação da ligação *O*-glicosídica.

Metodologia	Grupo abandonador no doador	Promotor	Referências
Koenig Knorr	Cl, Br	Ag ₂ CO ₃ ; Ag ₂ O; AgNO ₃ ; AgClO ₄ ; AgOTf	(KÖENIGS;KNO RR, 1901)
Fisher	OH	HCl (gás); pTsOH	(FISCHER, 1893)
Michael	Cl, Br	NaOH; K ₂ CO ₃ ; NaH	(ANDERSON;LE ABACK, 1961)
Helferich	Cl, Br	Hg(CN) ₂ ; HgBr ₂ ; HgI ₂	(HELPERICH;SC HMITZ- HILLEBRECHT, 1933)
Fusão	OAc	ZnCl ₂ ; TsOH BF ₃ .OEt ₂	(BAGGETT;SAM RA;SMITHSON, 1983)
Imidatos	OC(NH)CCl ₃	AgOTf; TMSOTf; BF ₃ .OEt ₂ ; NaH	(SCHMIDT;KIN ZY, 1992)
Tioglicosídeos	SCH ₃ , SC ₂ H ₅ ,S C ₆ H ₅	Hg(OAc) ₂ , NBS, DMTST, NIS/TfOH, IDCP	(LONN, 1985)
Sililados	SiCH ₃ , SiCH ₃ Bu ^t	TMSOTf, BF ₃ .Et ₂ O	(TIETZE, 1983)

4.1 Isolamento de dihidrocucurbitacina B

As raízes dessecadas e cortadas em pequenos fragmentos de *W. ebracteata* foram adquiridas comercialmente na empresa Lohmann Ltda, situada no município de Nova Petrópolis (RS). A autenticidade da amostra foi aferida por meio de técnicas cromatográficas, cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com material coletado e identificado com base em características das flores e frutos (KREPSKY et al., 2009). Na figura 11, pode ser visualizado o perfil cromatográfico do extrato diclorometânico, como também, do composto isolado (dihidrocucurbitacina B):

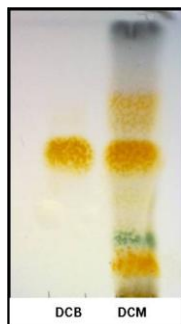


Figura 11: CCD comparativa extrato diclorometânico (DCM) e composto isolado dihidrocucurbitacina B (DCB). Fase estacionária: gel de sílica F₂₅₄; Fase móvel: hexano:AcOEt (60:40; v/v); Detecção: vanilina-H₃PO₄/ aquecimento (100°C).

A fim de aumentar a superfície de contato com o líquido extrator, 3,7 kg de raízes de *W. ebracteata* foram moídas em moinho de facas e em seguida submetidas a maceração em diclorometano (10 L). Após quatro dias em contato com o solvente, o extrato foi filtrado e o solvente concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O diclorometano destilado foi re-utilizado na maceração subsequente das raízes, sendo este processo repetido por mais duas vezes. Ao final, a massa total de extrato diclorometânico foi de 74 g, representando o rendimento de 2 %.

O isolamento de dihidrocucurbitacina B a partir do extrato DCM foi conduzido de acordo com a figura 12.

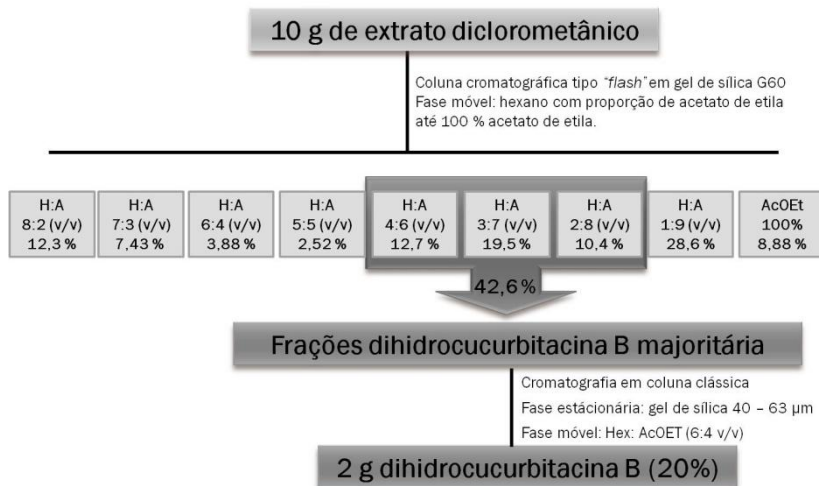


Figura 12: Fracionamento cromatográfico a partir do extrato diclorometânico (DCM) de *W.ebracteata*.

A elucidação estrutural de DCB através de espectroscopia de RMN ^1H , ^{13}C , correlações bidimensionais (COSY, HMBC, HSQC, NOESY) e espectrometria de massas está detalhadamente descrita na literatura (MORRIS KUPCHAN;GRAY;GROVE, 1967, DUNCAN;LEVI;PYTTEL, 1968, CHE et al., 1985, FARIAS, 1991). A estrutura do composto isolado (dihidrocucurbitacina B) foi comprovada utilizando as técnicas mencionadas acima, além de se basear na literatura referenciada.

Em resumo, a estrutura triterpênica de dihidrocucurbitacina B é composta por 32 carbonos, sendo que 11 são quaternários, 9 metílicos, 6 metilenos e 6 metinos e ao todo são 46 hidrogênios ligados a estes carbonos, com exceção de 3 hidrogênios ácidos, ou seja, hidroxílicos. Tais hidroxilas estão dispostas duas no cliclopentanoperidrofenantreno (C-2 e C-16) e uma hidroxila ligada à um átomo de carbono terciário (C-20) na cadeia lateral. Acredita-se que esta última não seja capaz de realizar o ataque nucleofílico devido ao impedimento estérico que a metila ligada geminalmente neste carbono deve exercer, juntamente com a cadeia lateral (SMITH;MARCH, 2007)(figura 13).

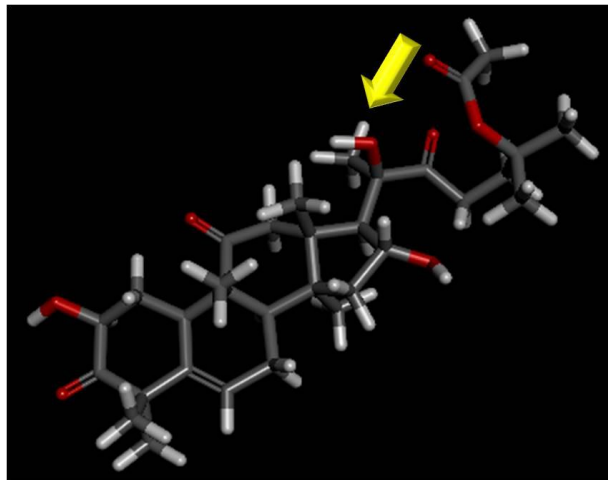


Figura 13: Representação 3D de dihidrocucurbitacia B, em destaque hidroxila ligada carbono 20 (*Software Discovery Studio 3.1 Client*).

Destacamos a seguir os sinais de ressonância relacionados com os carbonos hidroxilados, considerando a sua importância em vista do objetivo da glicosilação desses grupos. Cabe destacar que, o sinal do hidrogênio ligado ao carbono 2 apresenta a multiplicidade de duplo duplete em δ 4,41 ppm e suas constantes de acoplamento são $J_{1\beta,2}$ 13 Hz e $J_{1\alpha,2}$ 6 Hz. Já o hidrogênio ligado ao carbono 16 (δ 4,31) pode ser interpretado como um pseudo-triplete, uma vez que ao analisar o espectro bidimensional COSY é possível observar o acoplamento deste hidrogênio com 3 núcleos diferentes: H-17, H-15 $_{\alpha}$ e H-15 $_{\beta}$. Uma possível explicação para o sinal em δ 4,31 não resultar em duplo duplo duplete é o ângulo diedro formado entre os planos próximo a 90° com os átomos de hidrogênio ligados ao carbono 15, influenciando em uma constante pequena (inferior a 1Hz), demonstrado na forma alargada do sinal (figura 14).

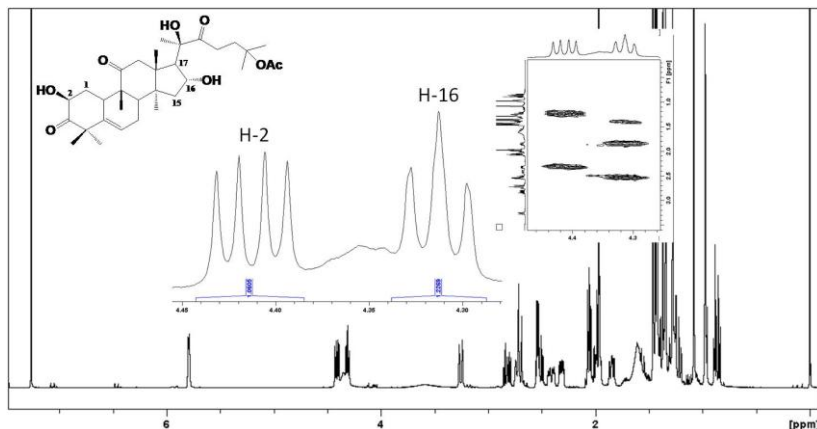


Figura 14: Estrutura química de dihidrocucurbitacina B e seu espectro completo de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3). Em destaque os sinais referentes aos hidrogênios em C-2 e C-16 em RMN ^1H e COSY ^1H - ^1H .

A estereoquímica do esqueleto cucurbitano foi determinada através de dados cristalográficos como *cis* para junção dos anéis B e C, enquanto que entre os anéis C e D é *trans*. Com relação à conformação adotada, os anéis A e C adotam a forma de cadeira, enquanto os anéis B e D a forma usual é de meia cadeira (RESTIVO;BRYAN;KUPCHAN, 1973)(figura 15).

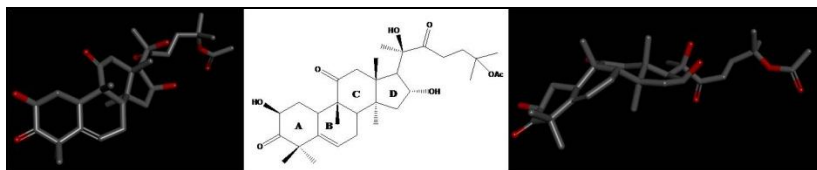
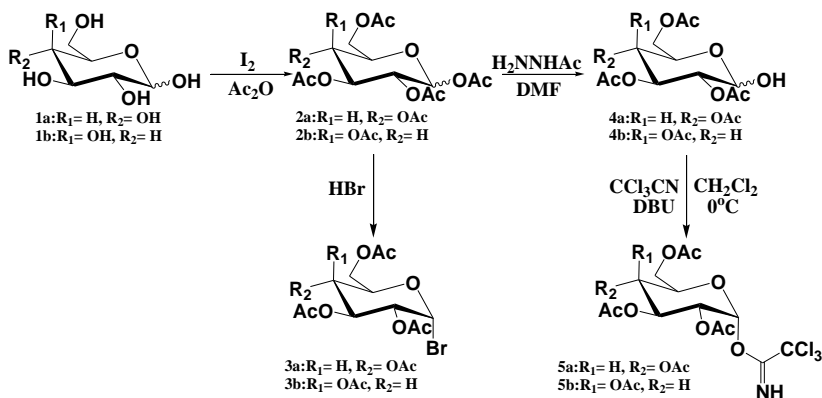


Figura 15: Estruturas 3D de dihidrocucurbitacina B na conformação mais estável (menor energia) (*Software* Discovery Studio 3.1 Client).

4.2 Síntese dos doadores monossacarídicos

Na linha de pesquisa iniciada com a preparação de glicosídeos de cucurbitacinas, o interesse é possibilitar a avaliação das atividades biológicas desses triterpenos contendo diferentes unidades monossacarídicas. Neste trabalho, o objetivo estabelecido foi a obtenção de glicosídeos e galactosídeos de dihidrocucurbitacina B.

Dessa forma, as reações para a preparação dos doadores monossacarídicos, bem como as reações de *O*-glicosilação foram realizadas com os monossacarídeos D-glicose e D-galactose. Esses doadores são os mais frequentemente utilizados nas reações de *O*-glicosilação e a partir dos mesmos foi planejada a síntese dos doadores funcionalizados em C-1' com halogênio (bromo) e também o grupamento tricloroacetimidato (esquema 2). O primeiro utilizado nas reações de Koenigs-Knorr, desde o início do século passado e o segundo, derivado tricloroacetimidato proposto por Schmidt e colaboradores (1986) com algumas vantagens, principalmente maior estabilidade química e o alto rendimento nas reações de *O*-glicosilação.



Esquema 2: Rota sintética para a preparação dos doadores monossacarídicos. Série a: glicose; Série b: galactose.

As reações de síntese dos doadores monossacarídicos **3 (a,b)** e **5 (a,b)** envolve a formação de um intermediário comum (**2a 2b**), o qual foi sintetizado a partir de D-glicose (**1a**) e D-galactose (**1b**), ambos adquiridos comercialmente. Os compostos 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D- α , β -D-glicopiranosose (**2a**) e 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α,β -D-galactopiranosose (**2b**) foram obtidos a partir do tratamento dos precursores (**1a,b**) com iodo molecular e anidrido acético em temperatura ambiente. Nos primeiros minutos da reação, ocorre intensa liberação de calor e os monossacarídeos **1 (a,b)** permanecem insolúveis em anidrido até a formação completa do produto **2**. O rendimento desta reação é quantitativo, não sendo necessária separação cromatográfica para ser utilizado nas próximas etapas.

Os compostos **2a** e **2b** foram caracterizados por espectroscopia de RMN ^1H , principalmente pela presença de 5 simpletos próximos a região de δ 2 correspondentes a CH_3 de grupamentos acetila. Pode-se observar também, a formação de isômeros na proporção de 5:1 ($\alpha:\beta$), com base na integração dos sinais do hidrogênio em C-1, conforme indicado na figura 16.

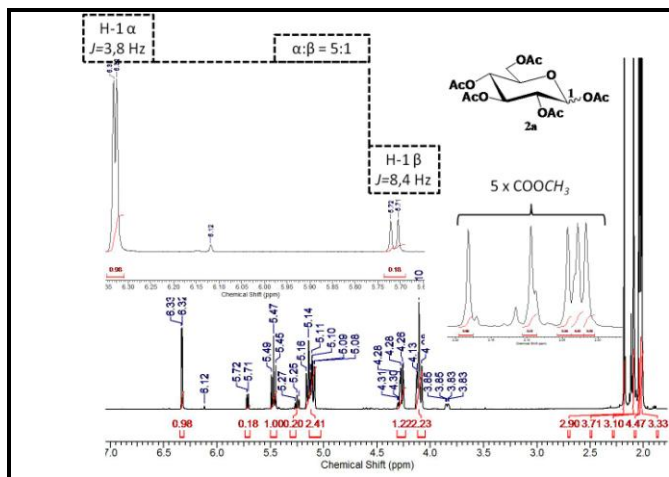


Figura 16: Espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D- α,β -D-glicopiranosose (**2a**).

Cabe destacar que a diferença estrutural entre glicose e galactose está na configuração adotada pelo carbono 4. Na glicose, este carbono apresenta configuração *S* e a hidroxila está em posição equatorial na

conformação 4C_1 , a qual é predominante e mais estável. Enquanto na galactose, a configuração do carbono 4 é R na conformação 1C_4 e a hidroxila ligada a este carbono está na posição axial. Essa diferença é visível nos espectros de RMN 1H pelas diferentes constantes de acoplamento destes epímeros (figura 17)

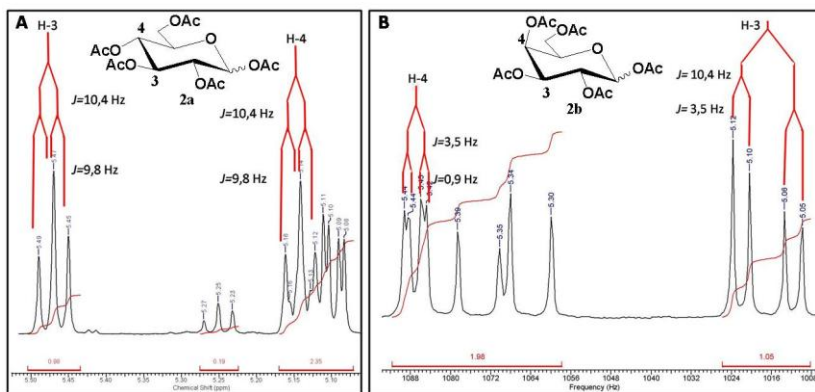
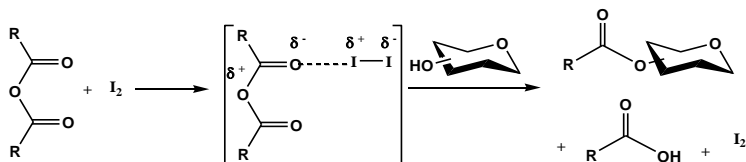


Figura 17: Espectros comparativos RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): **A)** constantes de acoplamento H-3 e H-4 do composto **2a**. **B)** constantes de acoplamento H-3 e H-4 do composto **2b**.

Dentre os métodos existentes para reações de acetilação o uso de iodo molecular como promotor da transferência de acetila em reações de acetilação é uma alternativa de baixo custo e fácil manuseio quando comparada com os outros catalisadores comumente usados, por exemplo, piridina e acetato de sódio. O iodo apresenta características ácidas sendo capaz de interagir com os centros ricos em elétrons de solventes e reagentes. Desta forma, torna possível a polarização de anidridos provendo com eficiência reações de acetilação (esquema 3) (KARTHA;FIELD, 1997).

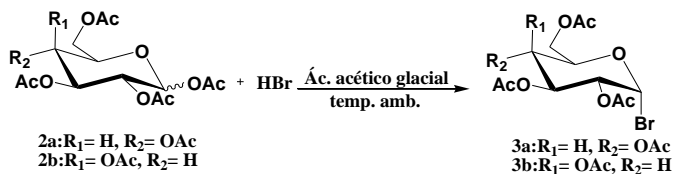


Esquema 3: Mecanismo de acetilação promovido por iodo.

Após a preparação do intermediário comum (**2a,b**), deu-se seqüência na rota sintética para preparação dos doadores halogenados (**3**) e tricloraacetimidatos (**5**).

4.2.1 Doadores monossacarídicos funcionalizado em C-1 com bromo

Inicialmente, optou-se em obter os doadores brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (**3a**) e brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (**3b**) a partir do tratamento dos monossacarídeos peracetilados (**2**) com ácido bromídrico 33% em ácido acético glacial a temperatura ambiente (esquema 4).



Esquema 4: Bromação dos monossacarídeos peracetilados.

O acompanhamento da reação por CCD mostrou a formação de um produto com característica mais apolar que o material de partida (**2**) e alguns subprodutos. Após a separação cromatográfica, os brometos foram cristalizados a partir de éter etílico e hexano, fornecendo cristais brancos com rendimento de 67 % para ambas as unidades.

As estruturas foram comprovadas pelos espectros de RMN ^1H , tanto pela presença de 4 simpletos na região de δ 2 correspondentes a 12 hidrogênios ($-\text{OCOCH}_3$), como também pela desblindagem do sinal do hidrogênio anomérico (H-1) para δ 6,61 (**3a**) e δ 6,71 (**3b**) em relação ao material de partida (δ 6,33 em **2a**; δ 6,38 em **2b**) (figura 18). A posição α do bromo foi determinada com base na constante de acoplamento do H-1 $J_{1,2} = 4$ Hz (figura 18). Esta tendência do substituinte eletronegativo no carbono anomérico assumir orientação α , ao invés de β , a qual seria a esperado devido ao menor impedimento estérico, é explicada pelo efeito estereoeletrônico conhecido como efeito anomérico (LEMIEUX; HAYAMI, 1965).

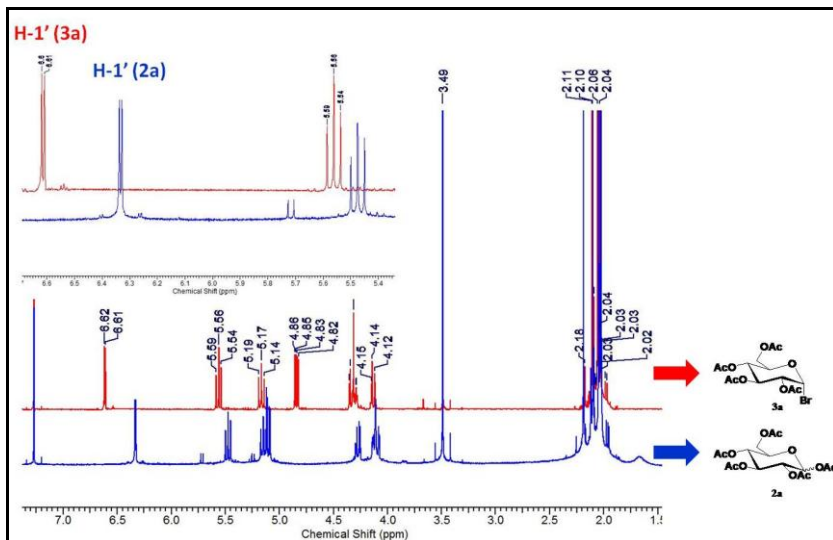


Figura 18: Sobreposição dos espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\text{D-}\alpha,\beta\text{-D}$ -glicopirranose (**2a** – azul) e brometo de 2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\text{D-}\alpha\text{-D}$ -glicopirranose (**3a** – vermelho).

Diversos fatores estruturais são considerados como as possíveis causas para o efeito anomérico, dentre elas está a grande repulsão dipolo-dipolo entre as ligações polares (C-O e C-Br) no carbono anomérico quando o substituinte (X) está na orientação equatorial. Esta repulsão é reduzida quando o substituinte encontra-se orientado axialmente, contribuindo para a forma mais estável do composto (figura 19).

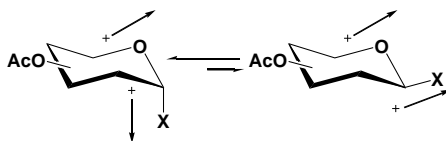


Figura 19: Representação da influência dos dipolos na formação da ligação β e α .

A estabilização eletrônica através da hiperconjugação é outra explicação bastante aceita para este fenômeno. Ocorre entre o substituinte eletronegativo (X) na posição axial do centro anomérico e o

átomo de oxigênio do anel pirano, quando este último tem um de seus pares de elétrons dispostos antiperiplanar à ligação C-X. Este par de elétrons pode participar estabilizando a estrutura, podendo esses mesômeros serem representados pelas formas de ressonância **A** e **B**. Em termos de orbital molecular, corresponde a doação parcial ($n \rightarrow \sigma^*$) dos elétrons desemparelhados do átomo de oxigênio endocíclico (orbital n) para o orbital antiligante (orbital σ^*) da ligação C-X. O efeito da deslocalização eletrônica corrobora para a estabilização da estrutura (figura 20) (DAVIS;FAIRBANKS, 2002, CAREY;SUNDBERG, 2007, SMITH;MARCH, 2007)

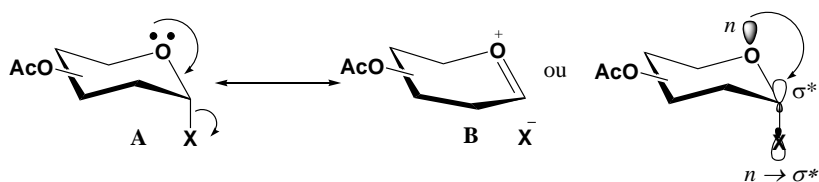
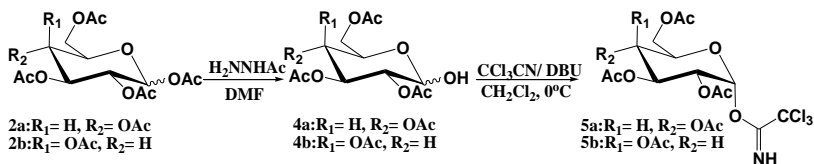


Figura 20: Estabilização eletrônica do efeito anomérico (A e B formas de ressonância). Orbitais moleculares n e σ^* estão sinperiplanares ideal para a sobreposição.

4.2.2 Doadores monossacarídicos funcionalizados em C-1 com tricloroacetimidato

Nos últimos 5 anos, os doadores funcionalizados em C-1 com tricloroacetimidato têm sido bastante utilizados devido a maior estabilidade térmica e química, bem como o alto rendimento em reações de glicosilação (SCHMIDT;KINZY, 1992, JACOBSSON;MALMBERG;ELLERVIK, 2006).

Neste sentido, os doadores monossacarídicos tricloroacetimidatos foram preparados a partir dos precursores peracetilados (**2a** e **2b** – esquema 5). Inicialmente, foi realizada a desproteção seletiva da hidroxila anomérica na presença de acetato de hidrazina (em excesso) em DMF, gerando os compostos 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glicopirranose (**4a**) e 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopirranose (**4b**) (esquema 5). Embora o acetato de hidrazina tenha sido utilizado em excesso devido a sua alta higroscopicidade, os compostos foram obtidos em rendimentos menores (**4a**: 42 % e **4b**: 62 %) que aqueles referidos na literatura (96%) (REN;ZHANG;LIU, 2001).



Esquema 5: Esquema de síntese dos doadores funcionalizados com tricloroacetimidato.

Na tentativa de melhorar os rendimentos desta etapa, foram utilizados aquecimento convencional (60 °C) e aquecimento por irradiação de micro-ondas (60 °C, 100 W) (REN;ZHANG;LIU, 2001, CHENG et al., 2005). Porém, em ambas as tentativas não foram observadas o aumento no rendimento, pelo contrário, o mesmo diminuiu para 30%.

A estrutura deste intermediário (**4a** e **4b**) foi confirmada por espectroscopia de RMN ¹H pelo deslocamento do duplete correspondente ao hidrogênio anomérico para a região de menor desblindagem do espectro e pela presença de 4 simpletos na região de δ 2, os quais correspondem a 12 hidrogênios e confirmam a perda de um grupamento acetila em relação ao produto de partida (composto **2**). A proporção entre os isômeros α:β foi de 3:1 com base na integração dos sinais do H-1. No entanto, não foi necessária a purificação cromatográfica dos isômeros e a mistura foi utilizada na próxima etapa de reação (figura 21).

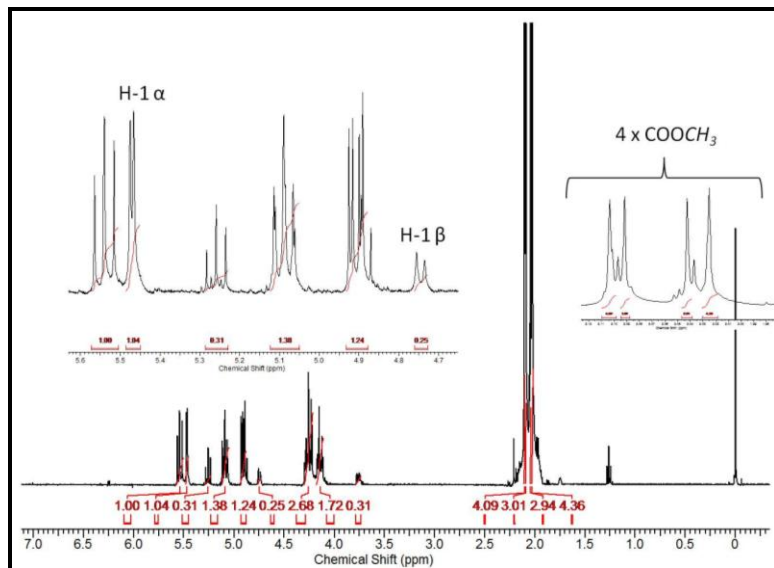
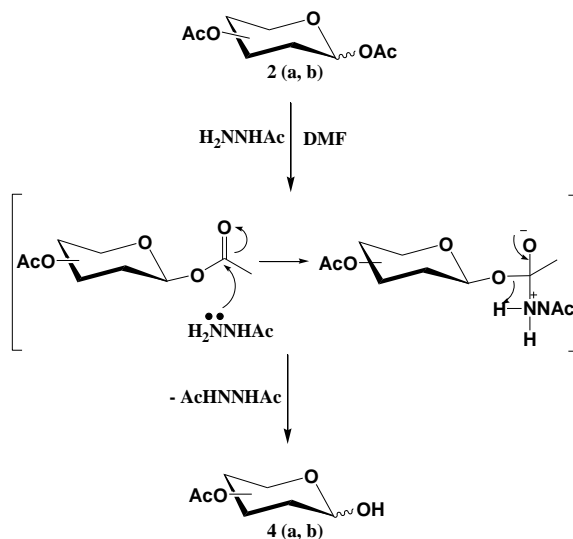


Figura 21: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glicopirranose (**4a**).

Acredita-se que o grupo amino livre do acetato de hidrazina atue como nucleófilo e ataque o carbono carbonílico do grupamento acetila da posição anomérica para formar o composto hemiacetal e gerar, ao mesmo tempo, diacetato de hidrazina (esquema 6).



Esquema 6: Mecanismo proposto para a desacetilação seletiva da hidroxila anomérica com o reagente acetato de hidrazina.

Na seqüência, os doadores tricloroacetimidatos (**5a e 5b**) foram preparados através da reação da hidroxila anomérica (C-1) dos compostos **4a** e **4b** com o grupamento tricloroacetimidato, na presença de DBU a 0°C (esquema 6). Os compostos **5a** e **5b** foram obtidos exclusivamente na orientação α e com rendimento de 50 % (**5a**) e 62 % (**5b**).

O espectro de RMN ^1H apresentou um simpleto em δ 8,57 (composto **5a**) e δ 8,67 (composto **5b**) correspondente ao hidrogênio do imidato (NH) e um duplete em δ 6,65 e δ 6,60 (respectivamente, **5a** e **5b**) correspondente ao hidrogênio anomérico (figura 22). A orientação da ligação foi confirmada como α , devido a constante de acoplamento de 3,5 Hz. A ausência de sinais de isômeros no espectro sugere a estereosseletividade da reação

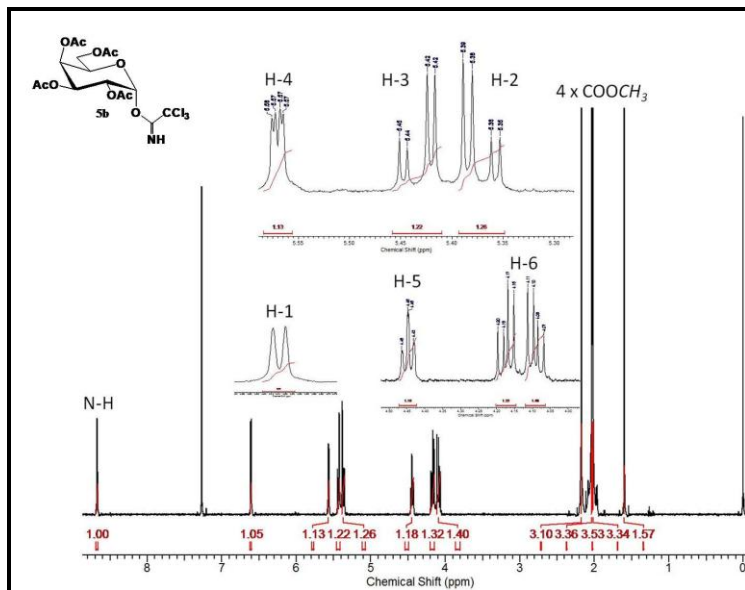
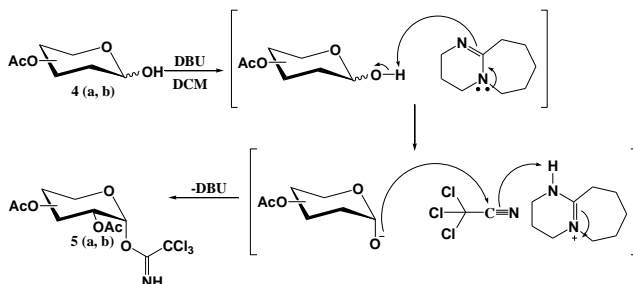


Figura 22: Espectro de RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato (5b).

De maneira geral, bases fracas levam a formação predominante do estereoisômero β , enquanto que bases fortes favorecem o estereoisômero α , sendo este último o produto termodinamicamente mais estável (DAVIS;FAIRBANKS, 2002). Nesse sentido, acredita-se que DBU (base muito forte) retire o próton da hidroxila anomérica para formar o alcóxido, facilitando o ataque ao reagente tricloroacetimidato (esquema 7).



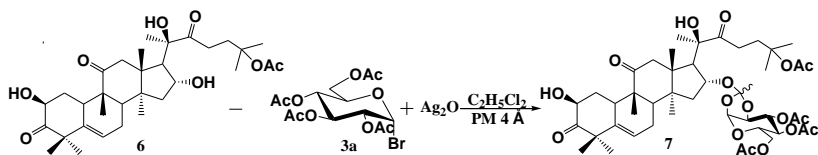
Esquema 7: Mecanismo proposto para a formação do doador tricloroacetimidato em presença da base DBU.

4.3 Reações de *O*-glicosilação

A princípio foram escolhidas dois métodos de *O*-glicosilação para serem aplicadas neste trabalho, a clássica reação de Koenigs-Knorr e a reação com tricloroacetimidatos. A fim de determinar a estequiometria dos reagentes e condições reacionais, foi realizada uma busca na literatura de reações de *O*-glicosilação em produtos naturais, mais precisamente, em estruturas triterpênicas (ANUFRIEV et al., 1997, ATOPKINA;UVAROVA;ELYAKOV, 1997, YU et al., 2001, ATOPKINA;DENISENKO, 2009; 2011).

Descrita em 1901, por Wilhelm Koenigs e Eduard Knorr, a reação de Koenigs-Knorr é uma das mais antigas e mais relatada metodologia de *O*-glicosilação. A sua principal característica é a utilização de haletos (Cl, Br) em C-1 como doadores monossacarídeos em presença de sais de metais pesados, principalmente sais de prata e mercúrio. Neste sentido, foram preparados os doadores brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (**3a**) e brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (**3b**).

De acordo com a método escolhido (ATOPKINA;DENISENKO, 2009), dihidrocurbitacina B (**6**) foi submetida à reação de *O*-glicosilação com o doador **3a**, promovida por óxido de prata (Ag_2O) em 1,2 dicloroetano, a temperatura ambiente. O composto **7** foi obtido com 17 % de rendimento na forma de sólido branco, após a separação em coluna cromatográfica (esquema 8).



Esquema 8: Reação de *O*-glicosilação de dihidrocurbitacina B; metodologia de Koenigs Knorr.

A análise dos espectros de RMN ^1H do composto **7** revelou a presença de um duplete em δ 5,61, sinais na região entre δ 5,10 e δ 3,89 e ainda simpletos na região de δ 2. Esses sinais não estão presentes no espectro de RMN ^1H de dihidrocurbitacina B e referem-se respectivamente, ao hidrogênio anomérico, aos hidrogênios do anel pirano e as metilas dos grupamentos protetores acetilas (figura 23). Além disso, baseado nas integrais destes sinais foi possível afirmar a

presença de apenas uma unidade monossacarídica, o que implicou na necessidade de espectros bidimensionais para determinar a posição de substituição.

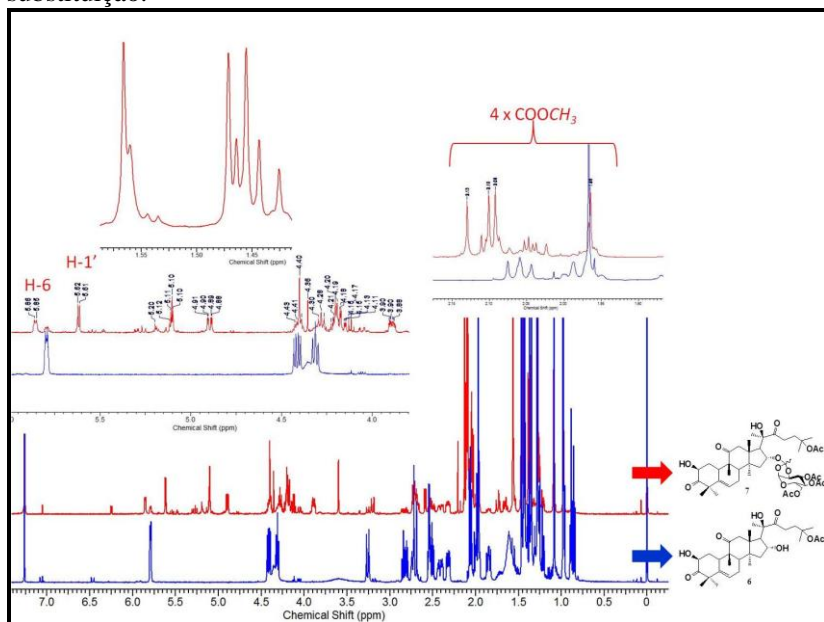


Figura 23: Sobreposição dos espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) dihidrocucurbitacina B (composto **4**-azul) e composto **7** (vermelho).

Inesperadamente, no espectro de RMN ^{13}C do composto **7**, chamou a atenção um sinal em δ 122, o qual não estava presente no espectro de dihidrocucurbitacina B. Através do espectro heteronuclear de múltiplas ligações (HMBC) foi possível observar a correlação deste carbono com um simpleto (3H) em δ 1,55, o qual também não pertencia a dihidrocucurbitacina B. O simpleto em δ 1,55, por sua vez, apresentou correlação com o sinal em δ 74, referente ao carbono 16 (figura 24). Dessa maneira, pode-se alocar a unidade monossacarídica, porém os sinais anteriormente descritos sugerem um rearranjo na mesma sendo compatível com a formação de 16-(1,2-ortoacetato-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glicopirranose)-dihidrocucurbitacina B (**7**). Cabe destacar que, ocorreu uma desblindagem no sinal de C-16 em relação ao receptor (dihidrocucurbitacina B), porém o mesmo não foi observado para o sinal do hidrogênio ligado ao C-16.

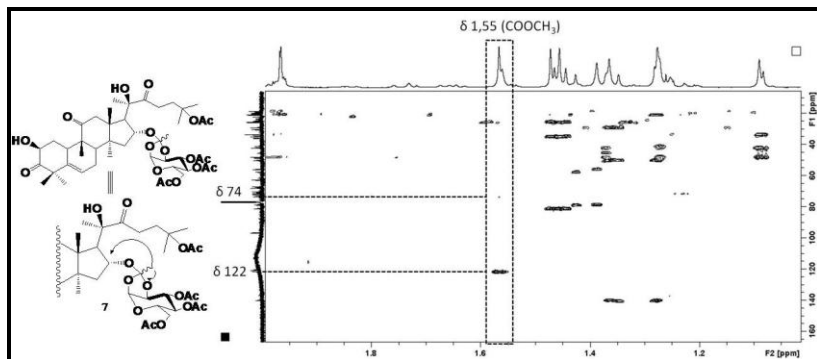


Figura 24: Espectro HMBC (CDCl_3 , 500 MHz) composto 3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glicopiranoze-16-ortoacetato de dihidrocucurbitacina B (7), região 2,2 a 0 ppm.

A formação de glicosídeos ortoéster em reações de Koenigs-Knorr é descrita na literatura, principalmente quando sais de prata insolúveis (Ag_2O , Ag_2CO_3) são utilizados como agentes promotores da *O*-glicosilação (LEMIEUX;MORGAN, 1965, ATOPKINA;UVAROVA;ELYAKOV, 1997, DESMARES et al., 2001, SEEBACHER;HASLINGER;WEIS, 2001, PRESSER;KUNERT;PÖTSCHGER, 2006). No entanto, a formação do produto β -D-glicosilado é descrita como sendo majoritária, em torno de 40 a 50 % de rendimento, e apenas 8 % de glicosídeos 1,2-ortoéster (ATOPKINA;UVAROVA;ELYAKOV, 1997). Entretanto, em nosso trabalho não foi observada a formação do β -D-glicosídeo de dihidrocucurbitacina B, apenas do derivado 16- glicosídeos ortoéster peracetilado de dihidrocucurbitacina B.

O emprego de grupamentos ésteres protetores em C-2 na unidade monossacarídea é uma estratégia para garantir a esteroseletividade da ligação *O*-glicosídica. A carbonila do grupamento acetila em C-2 participa na estabilização (**B**) do íon *oxocarbênium* (**C**) logo após a perda do grupo abandonador (Br). Esta participação do grupamento vizinho no estado de transição leva a formação predominante de β -D-glicosídeos (**D**) (figura 25).

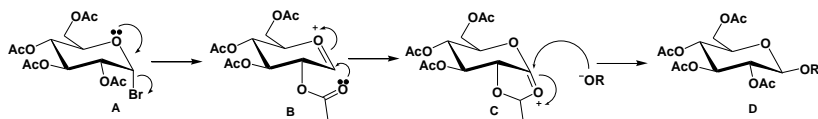
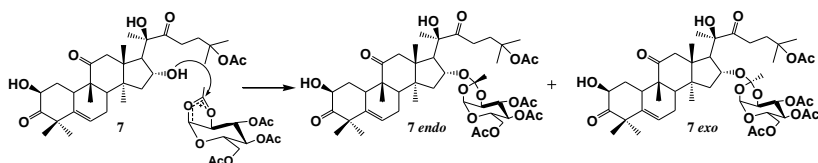


Figura 25: Participação do grupamento vizinho C-2 na formação de β-D-glicosídeos.

O mecanismo de formação do composto **7** pode ser explicado pelo ataque nucleofílico da hidroxila em C-16 ao íon oxocarbenium do composto **3a**, porém no carbono carbonílico do grupamento acetato de C-2', dando origem ao 3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopirranose-16-ortoacetato de dihidrocucurbitacina B (**7**) (esquema 9).



Esquema 9: Mecanismo de formação do 1,2-ortoéster (**7**).

Ademais, foi observada a formação de diastereoisômeros no espectro de RMN ^1H na proporção de 2:1, com base nas integrais do hidrogênio olefínico (H-6). De acordo com a literatura, a isomeria é com relação à estereoquímica da metila em δ 1,55 ligada ao carbono carbonílico (δ 122), o qual sofreu o ataque nucleofílico. A metila pode estar orientada em β caracterizando o composto *exo* (*trans* ao anel pirano), ou *endo* quando disposta em α (MILJKOVIC, 2010). No entanto, devido ao alargamento do simpleto em δ 1,55, não foi possível distinguir a proporção destes diastereoisômeros.

A estrutura foi confirmada por espectroscopia de massas (ESI-TOF) calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{70}\text{O}_{17}\text{N}$ $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$: 909,0445; encontrado 908,46316 (figura 26).

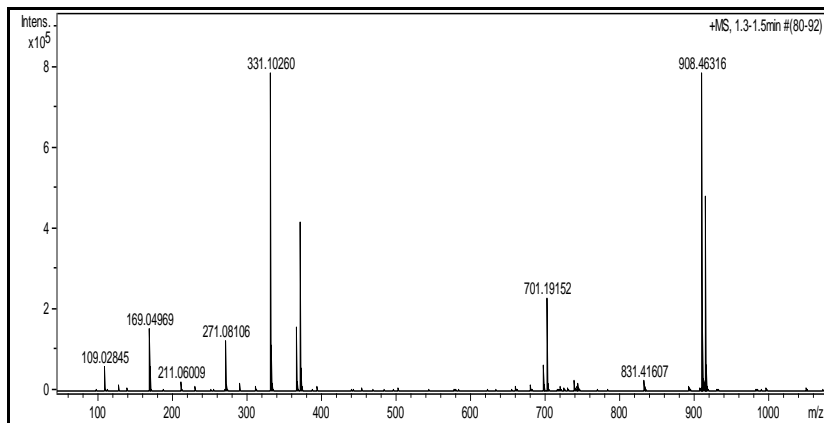


Figura 26: Espectro de massas (ESI-TOF) do composto 16-ortoéster peracetilado de dihidrocucurbitacina B.

A fim de obter o derivado *O*-glicosídico de dihidrocucurbitacina B desejado e evitar a formação do derivado ortoéster **7**, a reação de Königs-Knorr foi repetida por algumas vezes. Algumas mudanças nas condições reacionais como tempo de reação, solvente, promotor e número de equivalentes entre os reagentes foram realizadas, conforme tabela 3.

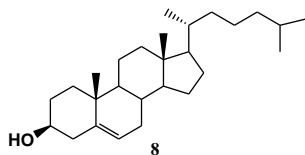
Tabela 3: Principais mudanças nas condições reacionais na reação de Königs-Knorr*

	Doador / n ^o . equivalentes*	Promotor/ equivalentes*	n ^o . Solvente	Tempo de reação (horas)*
1	glicose/ 3	Ag ₂ O / 3	DCE	24
2	glicose/ 3	Ag ₂ O / 3	DCE	48
3	glicose/ 3	Ag ₂ O / 3	DCE	72
4	glicose/ 3	Ag ₂ O / 3	DMF	24
5	glicose/ 2	Ag ₂ O / 2	DCE	24
6	galactose/ 4	Ag ₂ O / 3 + 3 (24hs)	DCE	88
7	galactose/ 3	Ag ₂ CO ₃ / 3	DCM	24

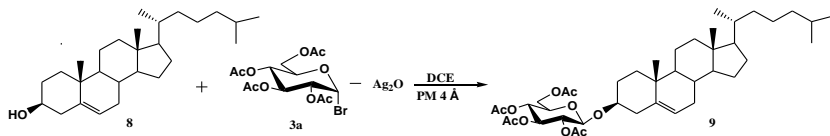
*número de equivalentes em relação a 1 equivalente de dihidrocucurbitacina B.

Diante das variações testadas não foi observada a formação do derivado glicosilado desejado, sendo que apenas a condição **2** forneceu o derivado 16 -glicosídeo ortoéster de dihidrocucurbitacina B. A reação apresenta um perfil cromatográfico complexo, no qual é observado a formação de vários subprodutos, o que dificulta a purificação cromatográfica.

Na busca de um melhor entendimento do comportamento da reação de *O*-glicosilação, a mesma foi realizada utilizando o colesterol como aceptor, pelo fato de possuir característica estrutural semelhante à dihidrocucurbitacina B, porém com apenas uma hidroxila passível de substituição (figura 27).

**Figura 27:** Estrutura química de colesterol.

Dessa maneira, o colesterol foi submetido à reação de *O*-glicosilação utilizando Ag₂O (óxido de prata) como promotor reacional. A reação foi conduzida em temperatura ambiente, com proteção da luz, em atmosfera de N₂ e acompanhada por CCD durante 24 horas (esquema 10).



Esquema 10: Reação de O-glicosilação utilizando colesterol como aceptor.

O perfil da reação foi similar àquela realizada com dihidrocucurbitacina B como aceptor (esquema 10), ou seja, não houve conversão completa do material de partida (**8**) no derivado glicosilado (**9**), sendo este obtido com 17 % de rendimento.

A análise do espectro de RMN ¹H demonstra a formação da ligação O-glicosídica pela presença do duplete em δ 4,59 com constante de acoplamento de J 8 Hz, indicando um β -glicopiranosídeo. No entanto, não evidenciou a formação do derivado ortoéster, principalmente pela ausência do simpleto em δ 1,55, conforme verificamos no caso da reação com o aceptor dihidrocucurbitacina B. Ainda, foram observados 4 simpletos na região de 2 ppm correspondentes a 12 hidrogênios (de acordo com a integral relativa) confirmando o monossacarídeo com 4 acetilas.

A fim de avaliar o desempenho do promotor Ag₂O, a reação de Königs-Knorr foi realizada utilizando outro sal de prata para essa função, desta vez, carbonato de prata 50 % em Celite[®] (Ag₂CO₃) (esquema 11). O composto de **3a** foi empregado como doador monossacarídico e o colesterol como aceptor. A reação foi conduzida a temperatura ambiente, sob atmosfera de N₂ pelo período de 24 horas. Também nestas condições, o derivado **9** foi obtido com rendimento similar.

O composto **9** foi identificado, desta vez, por comparação com o fator de retenção (Rf) em CCD com o produto obtido pela metodologia anterior. Além disso, a espectroscopia na região do infravermelho indica a presença de uma banda intensa na região de 1752 cm⁻¹, característica do estiramento da ligação CO de éster atribuído as acetilas dos grupos protetores do glicosídeo formado (figura 28).

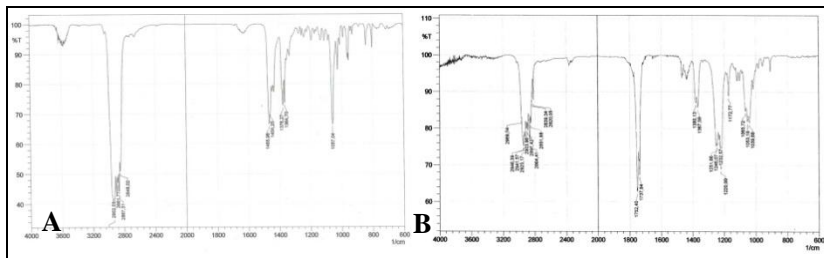
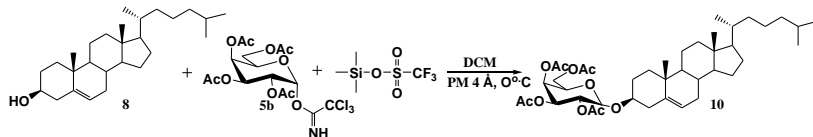


Figura 28: Espectro na região do infravermelho (pastilha KBr) colesterol (A) e produto glicosilado **9** (B).

Fazendo uma análise comparativa entre os aceptores, dihidrocucurbitacina **B** e colesterol, utilizados nas reações de Koenigs-Knorr, algumas características em comum podem ser destacadas, como por exemplo, a reação é lenta além dos aceptores não serem completamente transformados no produto glicosilado. Porém, quando o colesterol foi utilizado como aceptor, não foi observada a formação do 1,2 ortoéster.

Uma alternativa para melhorar o rendimento da reação é a utilização de doadores monossacarídicos funcionalizados em C-1 com tricloroacetimidato (compostos **5a** e **5b**) devido a sua maior reatividade, conforme discutido no item 4.2 (SCHMIDT; KINZY, 1992).

A reação de Imidatos foi desenvolvida com o doador **5b** e, inicialmente, com o colesterol **8** na presença do promotor triflato trimetilsilila (TMSOTf) em quantidades catalíticas (14 μ L) a 0 °C, por uma hora. Ao final da reação o produto **10** foi obtido como sólido branco com 40% de rendimento (esquema 11).



Esquema 11: Reação de imidatos com molécula simplificada (**8**).

A identificação do composto **10** foi realizada por meio do espectro de RMN ^1H , o qual indicou a presença de um duplete em δ 4,55, referente ao hidrogênio anomérico com constante de acoplamento $J=7,9$ Hz, cujo valor indica a estereoquímica da ligação glicosídica

formada (β). O espectro comparativo entre o aceptor (**8**) e o produto glicosilado (**11**) está apresentado na figura 29.

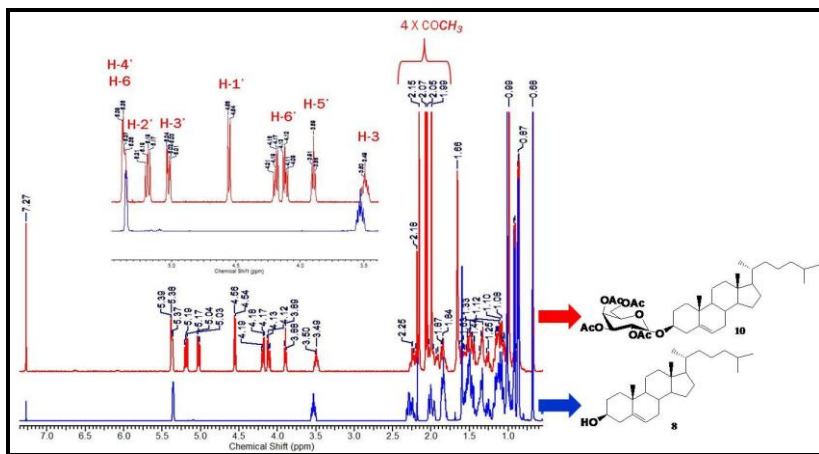
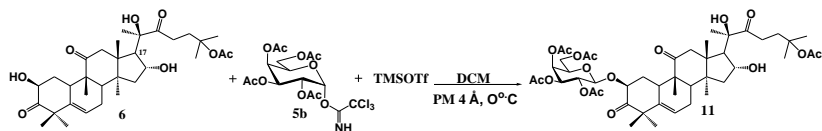


Figura 29: Espectros comparativos de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz). Colesterol (**composto 8–azul**) e 2,3,4,6-per-O-acetil- β -D-galactopiranosídeo colesterol (**composto 10–vermelho**).

Pode-se observar também, a manutenção do deslocamento do hidrogênio ligado ao carbono hidroxilado (H-3), após a formação da ligação glicosídica. A falta de deslocamento do hidrogênio ligado ao carbono carbinólico, após a formação da ligação *O*-glicosídica também foi observada para dihidrocurbitacina B (**8**). Este fato implica na necessidade de espectros bidimensionais para a confirmação estrutural dos derivados glicosilados de dihidrocurbitacina B.

Motivado pela melhora significativa no rendimento obtido com o aceptor colesterol utilizando a reação com imidatos, foram realizadas as reações com dihidrocurbitacina B como aceptor monossacarídico nas mesmas condições aplicadas para a obtenção do composto **11** (esquema 12).



Esquema 12: Reação de *O*-glicosilação com imidatos utilizando como aceptor dihidrocucurbitacina B.

Dihidrocucurbitacina B e o doador galactosídeo (**5b**) em diclorometano foram submetidos à atmosfera inerte (N_2) na presença do promotor TMSOTf, em quantidades catalíticas. A reação foi mantida a $0^\circ C$ até o consumo total do doador (**5b**), apesar de dihidrocucurbitacina B ainda estar presente no meio reacional, o que foi observado por CCD. O produto bruto da reação foi purificado por cromatografia em coluna e o composto **11** foi isolado com 17 % de rendimento.

A confirmação da formação do galactosídeo 2-*O*- β -D-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-galactopiranosídeo de dihidrocucurbitacina B (**11**) através do espectro de RMN 1H foi possível, principalmente, pela presença de um duplete em δ 4,63, referente ao hidrogênio anomérico da unidade monossacarídica, bem como os outros sinais da unidade na região de δ 5,5 a 3,5. Os simpletos correspondentes aos grupamentos $-CH_3$ das acetilas na região de δ 2,2 a 1,9 ppm, também confirmaram a formação do produto **11**, como mostra a figura 30.

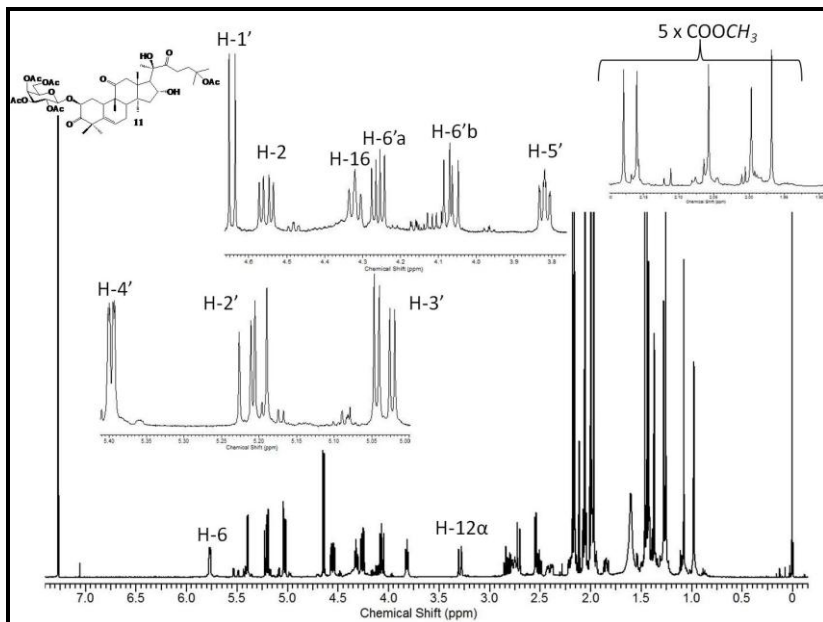


Figura 30: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 2-*O*- β -D-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-galactopiranosídeo) de dihidrocucurbitacina B (**11**).

Com relação ao número de unidades monossacarídicas, a integração dos hidrogênios indica a presença de apenas uma unidade galactosídica no composto **11** e não foi observada a formação de esteriosômeros. Já a posição de substituição na dihidrocucurbitacina B pôde ser determinada pelo espectro 2D HMBC, no qual o sinal do hidrogênio ligado ao carbono hidroxilado C-2 (δ 4,54) apresenta correlação com o carbono anomérico (δ 100,3) (figura 31).

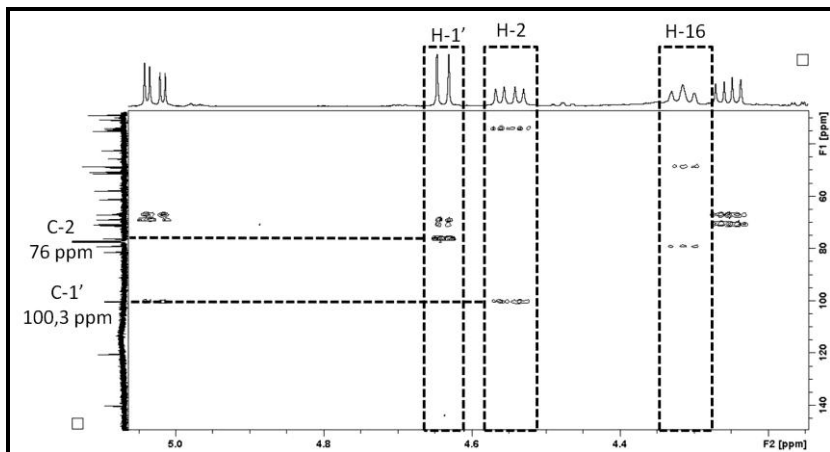


Figura 31: Espectro 2D HMBC (500 MHz, CDCl₃) região δ 5,5 a 3,8.

A estrutura foi confirmada por espectroscopia de massas (ESI-TOF) calculado para C₄₆H₆₅O₁₇ [M - H]: 889,9981; valor encontrado 889,41956 (figura 32)

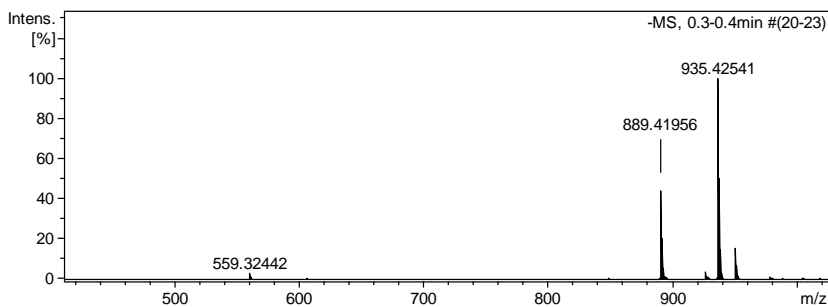
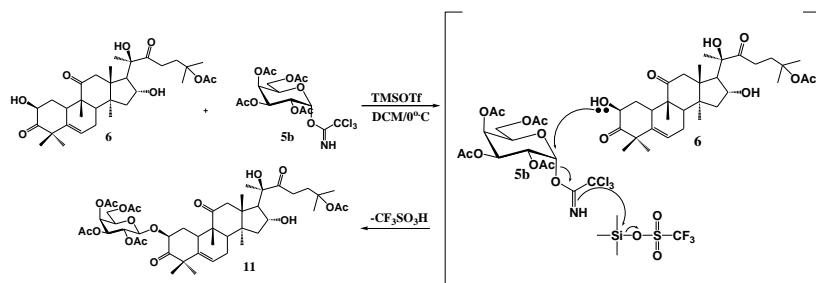


Figura 32: Espectro de massas (ESI-TOF) do composto **11**.

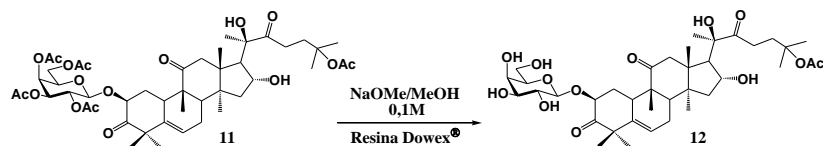
A reação foi repetida algumas vezes com ambos os doadores tricloroacetimidatos (**5a** e **5b**), porém não foi possível obter nenhum derivado de dihidrocucurbitacina B contendo glicose como unidade monossacarídica, por meio da reação com imidatos. Diferentes variações foram realizadas como, por exemplo, aumento do número de equivalentes do doador, maior tempo de reação e temperatura, porém não houve aumento significativo no rendimento do produto **11**.

No mecanismo da reação é atribuído ao TMSOTf a função de ácido de Lewis, ou seja, o mesmo facilita a saída do grupo abandonador retirando um par de elétrons do grupamento tricloacetimidato, Dessa forma, a hidroxila de C-2 do aceptor (dihidrocurcurbitacina B) faz o ataque nucleofílico na posição anomérica, invertendo a configuração da ligação glicosídica (β), conforme esquema 13.



Esquema 13: Provável mecanismo da reação de Imidatos para a formação do composto **11**.

A fim de obter o derivado glicosilado com as características físico-químicas desejadas, o composto **11** foi submetido à reação de desacetilação para desproteção dos grupos hidroxílicos da unidade galactosídica. A reação foi efetuada com solução de NaOMe 0,1 mol/L, em quantidade catalítica, sendo realizado o controle do pH da mistura reacional até pH 9-10. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1 hora. No final, foi tratada com resina Dowex 50WX8-200 (Sigma) até pH neutro para troca dos íons Na^+ e H^+ , sendo filtrada logo em seguida (esquema 14).



Esquema 14: Reação de desacetilação do composto **11**.

A confirmação da desproteção da unidade monossacáridica do composto **11**, bem como da massa molecular, foi realizada por

espectrometria de massas ESI-TOF calculado para $C_{38}H_{62}O_{13}N [M + NH_4]^+$: 740.89778; valor encontrado 740.42041 (figura 33).

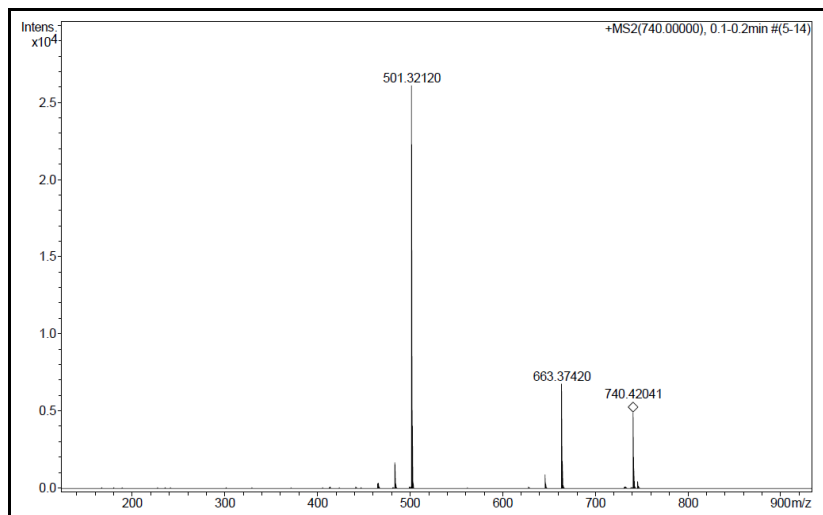


Figura 33: Espectro de massas $[M + NH_4]^+$ do composto **12**.

O valor de massa molecular encontrado no espectro de massas apresentado na figura 22 indica que a desacetilação ocorreu em 4 unidades de acetila. No entanto, a confirmação que a acetila substituída no O-25 da cadeia lateral de dihidrocucurbitacina B não foi afetada com a reação de desacetilação foi possível por meio do padrão de fragmentação do íon molecular $m/z = [740.42041]^+$ (Figura 34). (composto **12**)

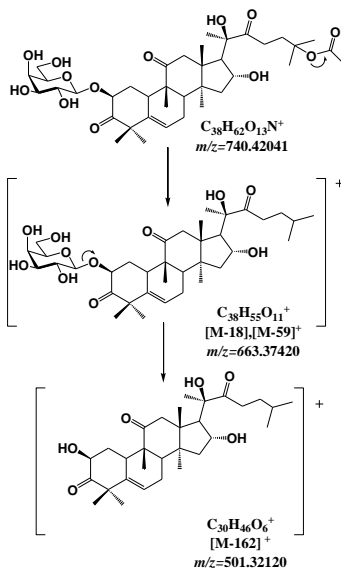


Figura 34: Proposta de fragmentação do composto **12**.

A formação do íon $m/z=663.37420$ indica a perda do fragmento ($C_2H_3O_2$) correspondente ao grupamento acetila da cadeia lateral, sendo este resultado descrito na literatura para a fragmentação da dihidrocucurbitacina B (DUNCAN;LEVI;PYTTEL, 1968). Já a perda da molécula monossacarídica ($C_6H_{10}O_6$) levou a formação íon $m/z=501.32120$, confirmando dessa forma o derivado 2-*O*- β -galactosídeo de dihidrocucurbitacina B.

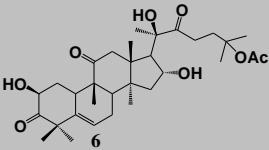
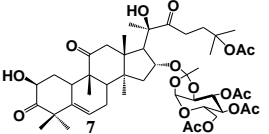
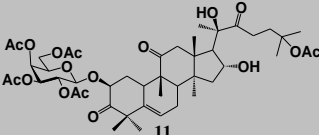
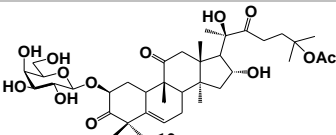
4.3 Avaliação da atividade citotóxica

Os derivados glicosilados de dihidrocucurbitacina B foram avaliados com relação ao potencial citotóxico em linhagens de células tumorais A549, correspondentes ao adenocarcinoma humano de pulmão. Esta parte do trabalho foi desenvolvida em cooperação com o Laboratório de Virologia Aplicada desta Universidade sob coordenação da Prof^a. Dra. Cláudia Oliveira Simões.

A metodologia utilizada para avaliar a concentração citotóxica necessária para reduzir o crescimento celular de 50 % das células tumorais (CC_{50}) foi conduzida conforme o ensaio de redução metabólica MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazo-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

(MOSMANN, 1983). Os valores de CC_{50} foram calculados baseados na viabilidade celular após 72 horas de tratamento das células tumorais com os compostos. A tabela 4 apresenta os valores de CC_{50} para a dihidrocucurbitacina B (**6**) e seus derivados glicosilados sintetizados:

Tabela 4: Avaliação da atividade citotóxica dos derivados glicosilados

Estrutura química (composto)	CC_{50} (μ M)
	$12,84 \pm 0,58$
	$38,72 \pm 2,81$
	$81,82 \pm 1,79$
	>100
Paclitaxel	$0,054 \pm 0,010$
Doxorrubicina	$1,459 \pm 0,160$

Diante dos resultados obtidos, pode-se avaliar que os compostos glicosilados (**7**, **11**, **12**) não exibiram significativa atividade citotóxica frente à linhagem de células tumorais A549. Os três derivados glicosídicos testados apresentaram valores de CC_{50} maiores do que a dihidrocucurbitacina B.

Estudos de atividade citotóxica frente à linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) mostraram que 2-O- β -glicosídeos de cucurbitacina E e I apresentaram atividade citotóxica inferior às suas agliconas (cucurbitacina E e I). Os autores sugerem uma correlação

entre lipofilicidade e a atividade citotóxica dos compostos (BARTALIS;HALAWEISH, 2005).

A predição da lipofilicidade dos compostos pode ser feita através do cálculo do coeficiente de partição octanol-água (P_{oct}), o qual é a razão entre a concentração do composto solubilizado em octanol pela concentração do mesmo solubilizado em água. O $\log P$ é um parâmetro de lipofilicidade utilizado com frequência em estudos de relação estrutura - atividade (REA).

Existem algumas ferramentas computacionais que auxiliam na predição de valores de $\log P$ de novos compostos. Neste sentido, mesmo com o número reduzido de compostos obtidos, foi realizado o cálculo do $\log P$ para avaliar, preliminarmente, a relação entre lipofilicidade e os valores de CC_{50} . Os compostos **6**, **7**, **11**, **12** foram submetidos ao cálculo de $\log P$ através do programa *on-line* ALOGPS 2.1 (Virtual Computational Chemistry Laboratory) de acesso livre em www.vcclab.org.

Na tabela 5, estão apresentados os valores estimados de $\log P$ e os valores de CC_{50} dos derivados glicosilados

Tabela 5: Valores estimados de $\log P$ e valores de CC_{50} dos derivados glicosilados

Composto	$\log P$ (calculado)	CC_{50} (μM)
6	3,84	$12,84 \pm 0,58$
7	3,39	$38,72 \pm 2,81$
11	3,02	$81,82 \pm 1,79$
12	2,26	>100

Os resultados apontam que o glicosídeo ortoéster de dihidrocucurbitacina B (**7**) apresenta o maior $\log P$, ou seja, o derivado mais lipofílico com CC_{50} de $38,72 \mu M$. Já o 2-*O*- β -galactosídeo de dihidrocucurbitacina B com as hidroxilas do monossacarídeo protegidas (**11**) exibe CC_{50} de $81,82 \mu M$ e $\log P$ 3,02, enquanto que o mesmo galactosídeo desacetilado (**12**) apresenta uma diminuição no $\log P$ (2,26) e a perda da atividade citotóxica. Dessa forma, na linhagem celular tumoral (A549), os resultados observados estão concordantes com o trabalho discutido anteriormente, visto que o derivado mais hidrofílico (**12**) não apresenta atividade citotóxica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

Aparelhagem analítica:

- Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C : Varian AS 400 MHz (Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina), Bruker Advance DPX 400 MHz (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCRRP-USP) e Bruker AM 500 MHz (Departamento de Química da Universidade de Buenos Aires).
- Espectrometria de Massas de alta resolução: Bruker Daltonics MicroTOF-Q II (Departamento de Química da Universidade Federal de Buenos Aires);
- Espectrometria na região do Infravermelho: Shimadzu Prestige-2 (Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina);
- Atividade óptica: Polarímetro Perkin Elmer modelo 141 com lâmpada de sódio.

Aparelhagem laboratorial:

- Evaporador rotatório: Büchi V-700
- Balança: Bioprecisa FA.2104 N
- Luz ultravioleta: Dist modelo GRC-03
- Ponto de fusão: Microquímica MQAPF-301

Solventes, reagentes e outros materiais

- As Cromatografias em Camada Delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de gel de sílica G60 com indicador de fluorescência utilizando como suporte de alumínio (Macherey-Nagel®)
- As Cromatografias em Coluna foram realizadas utilizando gel de sílica com as seguintes granulometrias: 40-63 μm e 63-200 μm . Agentes cromogênicos de detecção: vanilina fosfórica (2,5 g de vanilina em 50 mL de etanol e 12,5 mL de ácido orto-

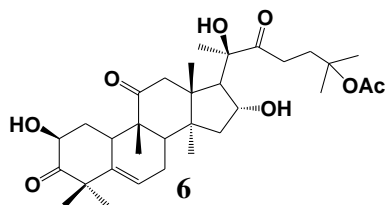
fosfórico 85 %) e solução ácida de cério molibdênio (cério molibdênio 1%, ácido molíbdico 1,5 % diluídos em ácido sulfúrico concentrado 10 % (v/v) e água qsp.).

- Alguns reagentes foram convenientemente purificados conforme métodos usuais, descritos na literatura (PERRIN;ARMAREGO;PERRIN, 1996)

5.2 Métodos

5.2.1 Aceptores monossacarídicos

Dihidrocucurbitacina B



F.M.: C₃₂H₄₈O₈
M.M.: 560,72 g. mol⁻¹
P.F.: 180 – 184 °C

As raízes dessecadas de *W. ebracteata* foram adquiridas comercialmente da empresa Lohmann Ltda, situada no município de Nova Petrópolis (RS). As raízes de *W. ebracteata* (3,7 kg) foram moídas em moinho de facas e em seguida submetidas a maceração em DCM (10 L). Após quatro dias em contato com o solvente, as raízes foram filtradas e o solvente foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O DCM destilado foi re-utilizado na maceração subsequente das raízes, sendo este processo repetido por mais duas vezes. Ao final, a massa total de extrato DCM foi de 74 g, representando o rendimento de 2 %.

O isolamento de dihidrocucurbitacina B a partir do extrato DCM (10 g) iniciou com fracionamento cromatográfico do tipo “flash” em funil com placa de vidro sinterizado, utilizando como fase estacionária gel de sílica para CCD G60. A fase móvel foi constituída com a mistura de solventes hexano com proporção crescente de acetato de etila, até final de acetato de etila (300 mL). Deste fracionamento inicial, foram obtidas 9 frações, sendo que, 3 dessas foram reunidas devido a sua semelhança cromatográfica em CCD e também por apresentarem dihidrocucurbitacina B como constituinte majoritário.

A etapa seguinte foi a realização de uma nova coluna cromatográfica das frações reunidas contendo dihidrocucurbitacina B majoritariamente. A fase estacionária foi sílica gel G60 e a fase móvel foi a mistura de solventes hexano e acetato de etila na proporção 60:40 (v/v). O rendimento final de dihidrocucurbitacina B foi de 20 % em relação ao extrato DCM (m/m).

Dados do composto: Rf 0,53 [Hex: AcOEt: 50:50 (v/v)]. δ ¹H (CDCl₃, 500 MHz): 5,79 (1H, m, H-6), 4,41 (1H, dd, J_{1 β -2} 13; J_{1 α -2} 6, H-2),

4,31 (1H, t, $J_{16,17}$ 7,4, H-16), 3,25 (1H, d, $J_{12\alpha-12\beta}$ 14,5, H-12 α), 2,82 (1H, m, 23 a), 2,73 (1H, m, H-10), 2,70 (1H, d, $J_{12\beta-12\alpha}$ 14,5, H-12 β), 2,54 (1H, m, H-23b), 2,49 (1H, d, $J_{17,16}$ 7,4 Hz, H-17), 2,41 (1H, m, H-7 β), 2,31 (1H, ddd, $J_{1\alpha-1\beta}$ 13; $J_{1\alpha-2}$ 6; $J_{1\alpha-10}$ 3,6, H-1 α), 2,03 (2H, m, H-23a, H-23b), 1,99 (1H, m, H-7 α), 1,98 (1H, m, H-8), 1,96 (3H, s, -OCOCH₃), 1,85 (1H, dd, J 9; J 13; H-15 β), 1,46 (3H, s, CH₃-27), 1,44 (3H, s, CH₃-26), 1,43 (3H, s, CH₃-21), 1,40 (1H, m, H-15 α), 1,37 (3H, s, CH₃-30), 1,35 (3H, s, CH₃-28), 1,29 (3H, s, CH₃-29), 1,24 (1H, m, H-1 α), 1,08 (3H, s, CH₃-19), 0,98 (3H, s, CH₃-18).

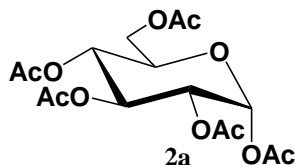
$\delta^{13}\text{C}$ (CDCl₃; 500 MHz): 213.9 (C-22), 213.1 (C-3), 212.1 (C-11), 170.4 (OCOCH₃), 140.6 (C-5), 120.5 (C-6), 81.3 (C-25), 78.9 (C-20), 71.7 (C-2), 71.1 (C-16), 57.8 (C-17), 50,7 (C-14), 50.3 (C-4), 48.7 (C-12), 48,4 (C-9), 48.3 (C-13), 45.5 (C-15), 42.3 (C-8), 36.1 (C-1), 38,4 (C-24), 33.8 (C-10), 30,7 (C-23), 29,4 (C-29), 26.2 (C-26), 25.8 (C-27), 24.5 (C-21), 23,9 (C-7), 22.4 (OCOCH₃), (21.3 (C-28), 20.1 (C-19), 19.8 (C-18), 18.8 (C-30).

ESI-MS (M - H): calculado para C₃₂H₄₇O₈: 559.3276; encontrado: 559.3314

5.2.2 Síntese dos doadores monossacarídicos

5.2.2.1 Derivados glicosídicos – série a

1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α -D-glicopirranose (2a) (KARTHA;FIELD, 1997)

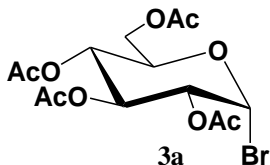


F.M.: C₁₆H₂₂O₁₁
M.M.: 390,34 g. mol⁻¹
P.F.: 91-93 °C

Uma suspensão de D-glicose **1a** (1,0 g; 5,5 mmol) em anidrido acético (5 mL) foi tratada com iodo (0,05 g, 0,47 mmol) e o sistema foi agitado a temperatura ambiente. Após uma hora, todo o açúcar havia se dissolvido formando uma solução castanha escura. O acompanhamento da reação por CCD [hexano: acetato de etila 1:1 (v/v)] mostrou a formação de apenas um produto. A mistura reacional foi diluída em DCM e extraída com solução de Na₂S₂O₄ 5% e gelo picado. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de Na₂SO₃, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida, fornecendo um óleo viscoso amarelo, o qual resultou na formação de cristais durante a secagem em alto vácuo. O rendimento do composto **2a** foi quantitativo (2,14 g; 5,5 mmol) observando-se a formação de isômero na proporção de 4:1 α : β .

Dados do composto (α): Rf 0,63[Hex: AcOEt 1:1 (v/v)]. δ_H (ppm) (CDCl₃; 400 MHz): 6,33 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,8 Hz, H-1), 5,48 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{3,4}$ 9,8 Hz, H-3), 5,15 (1H, dd, $J_{3,4}$ 10,4 Hz; $J_{4,5}$ 9,8 Hz, H-4), 5,10 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{1,2}$ 3,8 Hz, H-2), 4,26 (1H, m, H-6a), 4,11 (2H, m, H5, H-6a), 2,19 - 2,02 (15 H, 5s, 5 -OCOCH₃).

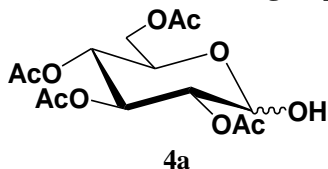
Brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (3a)
(LEMIEUX;LINEBACK, 1963)



F.M.: C₁₄H₁₉BrO₉
M.M.: 411,20 g. mol⁻¹
P.F.: 85-86 °C

Uma solução de penta-*O*-acetil-D-glicopiranosose **2a** (1,0 g; 2,43 mmol) em ácido acético glacial (5 mL) foi resfriada em banho de gelo e tratada lentamente com solução de HBr (4 mL, solução em 30 % de ácido acético m/v). A solução foi agitada por 4 horas e armazenada na geladeira por 12 horas. A mistura reacional foi diluída com diclorometano e vertida em mistura de gelo picado e água. A fase aquosa foi separada e extraída com DCM e as frações orgânicas reunidas foram lavadas com solução de NaHCO₃ 5%, secas com Na₂SO₄ anidro e concentradas sob pressão reduzida, resultando em um óleo amarelado viscoso, cristalizado na presença de éter etílico e éter de petróleo. O produto **3a** foi obtido como um sólido branco (0,67 g; 1,63 mmol) com 67% de rendimento.

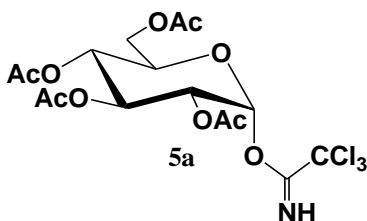
Dados do composto: R_f 0,81 [Hex: AcOEt 1:1 (v/v)]. δ_H (ppm) (CDCl₃; 400 MHz): 6,61 (1H, d, *J*_{1,2} 4,0 Hz, H-1), 5,56 (1H, dd, *J*_{2,3} 10,1 Hz; *J*_{3,4} 10,4 Hz, H-3), 5,17 (1H, dd, *J*_{3,4} 10,4 Hz; *J*_{4,5} 9,4 Hz, H-4), 4,85 (1H, dd, *J*_{2,3} 10,1 Hz; *J*_{1,2} 4,0 Hz, H-2), 4,32 (2H, m, H-5, H-6a), 4,14 (1H, m, H-6a), 2,11 - 2,04 (12 H, 4s, 4 COCH₃).

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glicopirranose (**4a**)

F.M.: $C_{14}H_{20}O_{10}$
 M.M.: 348,3 g. mol⁻¹

O reagente acetato de hidrazina (H_2NNHAc) (0,236 g; 2,56 mmol) foi adicionado à solução de **2a** (1,0 g; 2,56 mmol) em DMF (5 mL) e a reação foi deixada sob agitação durante 16 horas em temperatura ambiente. Em seguida, o sistema reacional foi diluído em AcOEt, lavado com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e água. A fase aquosa foi extraída com AcOEt e as frações orgânicas foram reunidas, dessecadas com Na_2SO_4 anidro e concentrado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica [Hexano: AcOEt 4:6 (v:v)] fornecendo o composto **3a**, na forma de um óleo transparente com rendimento de 62 % (0,54g; 1,59 mmol). Com base na integração dos sinais foi possível observar a proporção de isômeros $\alpha:\beta$ (2.8: 1).

Dados do composto: Rf 0,36 [Hex: AcOEt 1:1 (v/v)]. δ_H ($CDCl_3$, 300 MHz): 5,54 (1H, t, J 10 Hz, H-3), 5,47 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-1), 5,09 (1H, dd, $J_{3,4}$ 10 Hz; $J_{4,3}$ 9,5 Hz, H-4), 4,90 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,6 Hz; $J_{1,2}$ 3,7 Hz), 4,25 (2H, m, H-5, H-6a), 4,15 (m, 1H, H-6b), 2,10-2,02 (12H, 4s, 4- $OCOCH_3$)

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosil tricloroacetimidato 5b
(REN;ZHANG;LIU, 2001)

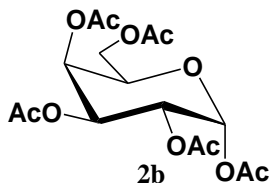
F.M.: C₁₆H₂₀Cl₃NO₁₀
M.M.: 492,69 g. mol⁻¹

A uma solução de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glicopiranosose (**4a**) (0,5 g; 1,44 mmol) em DCM destilado (5mL), resfriada em banho de gelo e sob atmosfera inerte (N₂), foram adicionados tricloroacetoneitrila (CCl₃CN) (0,56 mL; 5,74 mmol) e 1,8-diazobiciclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) (0,06 mL; 0,43 mmol). A reação permaneceu sob agitação por 2 horas. Após evidenciado o término da reação por CCD, a mistura reacional foi concentrada e purificada por cromatografia em coluna cromatográfica em gel de sílica [hexano: acetato de etila 7:3 (v:v)] e forneceu um óleo viscoso amarelado. O composto **5a** apresentou rendimento de 50 % (0,354 g; 0,72 mmol) e foi possível identificar no espectro de RMN ¹H apenas a formação do isômero α .

Dados do composto: Rf 0,88 [Hex: AcOEt: 1:1 (v/v)]. δ_H (CDCl₃; 400 MHz): 8,57 (1H, s, NH), 6,65 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1), 5,66 (1H, t, $J_{3,4}$ 9,8 Hz, H-3), 5,19 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,7 Hz; $J_{2,3}$ 10,2 Hz, H-2), 5,10 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{1,2}$ 3,8 Hz, H-2), 4,26 (1H, m, H-6a), 4,11 (2H, m, H5, H-6a), 2,19 - 2,02 (15 H, 5s, 5 -OCOCH₃).

5.2.2.2 Derivados galactosídicos – série b

1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- β -D-galactopirranose (2b)(KARTHA;FIELD, 1997)

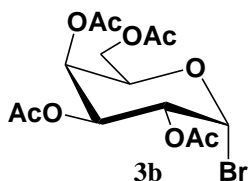


F.M.: C₁₆H₂₂O₁₁
M.M.: 390,34 g. mol⁻¹
P.F.: 86-88 °C

A reação foi conduzida como descrito para o composto **1b** e foram utilizados (1,0 g; 5,5 mmol) de D-galactose, anidrido acético (5 mL) e iodo (0,05 g, 0,47 mmol), porém o tempo reacional foi de 4 horas. O composto **2b** foi obtido como óleo viscoso amarelado, cristalizado em etanol, com rendimento de 94 % (2,0 g; 5,2 mmol) sendo observada a proporção de formação de isômeros de 5:1 α : β , com base na integração dos sinais no espectro de RMN ¹H.

Dados do composto: R_f 0,63 [Hex: AcOEt 1:1 (v/v)]. δ_H (CDCl₃; 400 MHz): 6,33 (1H, d, $J_{1,2}$ 1,5 Hz, H-1), 5,44 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,5 Hz; $J_{4,5}$ 0,9 Hz, H-4), 5,35 (1H, dd, $J_{1,2}$ 8,4 Hz; $J_{2,3}$ 10,4 Hz, H-2), 5,08 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,4 Hz; $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-3), 4,15 (3H, m, H-5, H-6a, H-6b), 2,17 - 2,00 (15 H, 4 s, 5 -OCOCH₃).

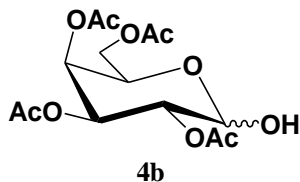
Brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (3b)
(LEMIEUX;LINEBACK, 1963)



F.M.: C₁₄H₁₉BrO₉
M.M.: 411,20 g. mol⁻¹
P.F.: 85 86 °C

A reação foi conduzida como descrito para o composto **3a** e foram utilizados (1,0 g; 2,43 mmol) de D-galactose, ácido acético glacial (5 mL) e solução de HBr (4 mL, solução em 30 % de ácido acético m/v). O composto **3b** foi obtido como óleo viscoso amarelado, cristalizado na presença de éter etílico e hexano fornecendo um sólido branco com rendimento de 67% (0,67 g; 1,63 mmol), sendo observada apenas a formação do isômero α , de acordo com o espectro de RMN ¹H.

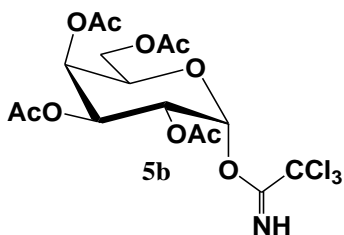
Dados do composto: R_f 0,81 [AcOEt: Hex 1:1 (v/v)]. δ_H (ppm) (CDCl₃; 400 MHz): 6,71 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,9 Hz, H-1), 5,53 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,3 Hz; $J_{4,5}$ 1 Hz, H-4), 5,41 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,3 Hz; $J_{2,3}$ 10,6 Hz, H-3), 5,05 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,6 Hz; $J_{1,2}$ 3,9 Hz, H-2), 4,49 (1H, m, H-5), 4,19 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,4 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,5 Hz), 4,12 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 6,4 Hz; $J_{6a,6b}$ 11,5 Hz) 2,16- 2,01 (12 H, 4s, 4 -OCOCH₃).

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-galactopiranosose (**4b**)

F.M.: C₁₄H₂₀O₁₀
M.M.: 348,3 g. mol⁻¹

A reação foi conduzida como descrito para o composto **4a** e foram utilizados (1,0 g; 2,56 mmol) de penta-*O*-acetil-D-galactopiranosose **2b**, acetato de hidrazina (H₂NNHAc) (0,236 g; 2,56 mmol em DMF (5mL)). O composto **4b** foi obtido como um óleo transparente com rendimento de 42 % (0,37 g; 1,07 mmol). Baseado nas integrais relativas dos sinais no espectro de RMN ¹H, pode-se constatar a formação de isômeros na proporção de α : β (3:1).

Dados do composto (α): Rf 0,36 [AcOEt: Hex 1:1 (v/v)]. δ_H (ppm) (CDCl₃; 400 MHz): 5,52 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1), 5,47 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,3 Hz; $J_{4,5}$ 1,3 Hz, H-4), 5,41 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz; $J_{2,3}$ 10,6 Hz, H-2), 5,14 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,6 Hz; $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-3), 4,49 (1H, m, H-5), 4,41 (2H, m, H-6a, H-6b), 2,16 - 2,00 (12 H, 4 s, 4 -OCOCH₃).

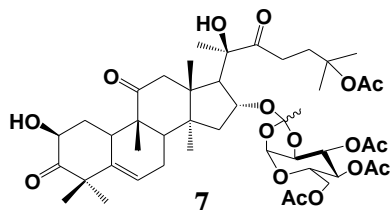
2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato 5b
(REN;ZHANG;LIU, 2001)

F.M.: $C_{16}H_{20}Cl_3NO_{10}$
M.M.: 492,69 g. mol⁻¹
P.F.: 95-98 °C

A reação foi conduzida como descrito para o composto **5a** e foram utilizados (1,0 g; 2,87 mmol) do composto **4b**, CCl_3CN (1,2 mL; 11,48 mmol) e DBU (0,13 mL, 0,861 mL) em DCM (5mL). O composto **5b** foi obtido como um pó branco com 62 % (0,848 mg; 1,72 mmol) de rendimento, sendo observada no espectro de RMN ¹H apenas a formação do isômero α .

Dados do composto: Rf 0,88 [AcOEt: Hex 1:1 (v/v)]. δ_H (CDCl₃; 400 MHz): 8,67 (1H, s, NH), 6,60 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1), 5,57 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,2 Hz; $J_{4,5}$ 1,2 Hz, H-4), 5,43 (1H, dd, $J_{3,4}$ 3,2 Hz; $J_{2,3}$ 10,5 Hz, H-3), 5,37 (1H, dd, $J_{2,3}$ 10,5 Hz; $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-2), 4,44 (1H, m, H-5), 4,17 (1H, m, H-6a), 4,09 (1H, m, H-5) 2,17 - 2,02 (12 H, 4 s, 4 -OCOCH₃).

5.2.3 Derivados glicosilados de dihidrocurbitacina B

16-(1,2-ortoacetato-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopirranose)-dihidrocurbitacina B (7)(ATOPKINA;DENISENKO, 2009)F.M.: C₄₆H₆₆O₁₇M.M.: 891,01 g. mol⁻¹

P.F.:123-134 °C

Os reagentes, bem como os materiais necessários para a realização da reação, foram mantidos sob alto vácuo por 1 hora antecedente a reação, a fim de manter o sistema seco. Em um balão de 2 bocas contendo o composto brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (**3a**) (0,242 g; 0,54 mmol), dihidrocurbitacina B (**6**) (0,1 g; 0,18 mmol), Ag₂O (0,124 g; 0,54 mmol) e peneira molecular (0,3 g) foram diluídos em 5 mL de 1,2 dicloroetano seco e submetidos a atmosfera de N₂ sob proteção de luz. O sistema foi mantido com agitação por 24 horas à temperatura ambiente sendo acompanhado por CCD [hexano: acetato de etila 4:6 (v/v)]. Após 24 horas a mistura reacional foi diluída em diclorometano e filtrada em Celite® utilizando funil com placa de vidro sinterizado. O produto bruto da reação foi purificado por coluna cromatográfica em gel de sílica [hexano: acetato de etila 1:1 (v/v)] e o composto **7** foi isolado como um sólido branco com 17 % de rendimento (0,027 g, 0,030 mmol). De acordo com as integrais relativas no espectro de RMN ¹H, o composto **7** foi isolado como uma mistura de diastereoisômeros endo e exo, na proporção de 2:1.

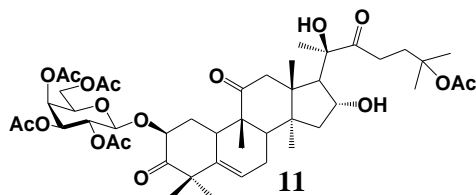
Dados do composto: R_f 0,38 [AcOEt: Hex 1:1 (v/v)]. δ_H^1 (CDCl₃; 500 MHz): 5,85 (1H, m, H-6), 5,61 (1H, d, $J_{1',2'}$ 5 Hz, H-1), 5,10 (1H, m, H-5'), 4,89 (1H, dd, $J_{3',4'}$ 9,7 Hz; $J_{4',5'}$ 2,8Hz, H-4'), 4,40 (1H, m, H-2), 4,30 (1H, m, H-16), 4,20 (2H, m, H-2', H-6a'), 4,18 (1H, m, H-6b'), 3,89 (1H, m, H-3'), 3,60 (1H, d, $J_{OH,2}$ 4 Hz), 3,20 (1H, d, $J_{12\alpha,12\beta}$ 15Hz, H-12 α), 2,72 (1H, d, $J_{12\alpha,12\beta}$ 15Hz, H-12 β), 2,70 (1H, m, H-10), 2,68 (1H, m, H-23a), 2,58 (1H, d, $J_{16,17}$ 7Hz, H-17), 2,51 (1H, m, H-23b), 2,03 (2H, m, H-24a, H-24b), 2,13 (3H, s, COCH₃), 2,10 (3H, s, COCH₃), 2,09 (3H, s, COCH₃), 1,98 (1H, m, H-8), 1,96 (1H, s, -OCOCH₃), 1,74 (1H, m, H-15 β), 1,65 (1H, m, H-15 α), 1,55 (3H, s,

CH₃'), 1,45 (3H, s, CH₃-27), 1,44 (3H, s, CH₃-26), 1,42 (3H, s, CH₃-21), 1,34 (3H, s, CH₃-28), 1,27 (3H, s, CH₃-29), 1,26 (3H, s, CH₃-30), 1,24 (1H, m, H-1 α), 1,09 (3H, s, CH₃-19), 0,98 (3H, s, CH₃-18).

δ ¹³C (CDCl₃; 100 MHz): 213.9 (C-22), 212.9 (C-3), 211.9 (C-11), 170.7 (C-OAc), 170.2 (C-OAc), 169.7 (C-OAc), 169.3 (C-OAc), 140,0 (C-5), 122 (C-7'), 120.8 (C-6), 96.7 (C-1'), 81.3 (C-25), 78.9 (C-20), 73.8 (C-16), 72.3 (C-2'), 71.7 (C-2), 70.6 (C-5'), 68.0 (C-4'), 67.0 (C-3'), 62.9 (C-6'), 56.3 (C-17), 50.1 (C-4), 49.0 (C-13), 48.7 (C-12), 48.3 (C-9), 48.1 (C-14), 42.3 (C-8), 41.1 (C-15), 35.9 (C-1), 35.0 (C-24), 33.8 (C-10), 30.1 (C-23), 29.4 (C-29), 26.2 (C-26), 25.8 (C-27), 24.4 (C-21), 23.6 (C-7), 22.4 (C-OAc), 21.3 (C-28), 21.3 (C-8'), 20.1 (C-19), 19.8 (C-18), 18.8 (C-30) .

ESI-TOF: calculado para C₄₆H₇₀O₁₇N [M + NH₄]⁺: 909,0445; encontrado 908,46316

2-*O*-β-D-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-galactopiranosídeo) de dihidrocucurbitacina B (11) (CHENG et al., 2005)



F.M.: C₄₆H₆₆O₁₇
M.M.: 891,01 g. mol⁻¹
P.F.: 121-128 °C
[α]_D: +22.8 (c 0,25 %; CHCl₃)

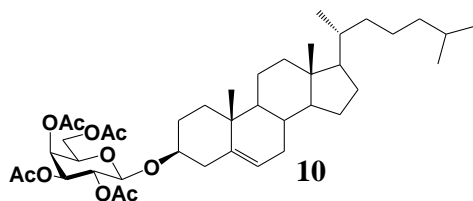
Em um balão de duas bocas, foram reunidos os compostos dihidrocucurbitacina B (0,1 g; 0,178mmol), 1- tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-galactopiranosila (**5b**) (0,105 g; 0,214 mmol) e peneira molecular 4 Å e mantidos sob alto vácuo por 1 hora, a fim de manter o sistema seco. Em seguida, foram diluídos em diclorometano destilado (5 mL) e mantidos sob N₂ a temperatura de -10°C para a adição do promotor triflato de trimetilsilila (TMSOTf) (14 μL; 77 μmol). O sistema foi agitado por 1 hora nas condições mencionadas anteriormente, em seguida a reação foi finalizada com a adição de Et₃N, concentrada. O produto bruto da reação foi purificado por coluna cromatográfica em gel de sílica [hexano: acetato de etila 1:1 (v:v)], sendo o composto **11** isolado como um sólido branco com 17 % (0,027 g; 0,030 mmol).de rendimento. De acordo com o espectro de RMN¹ H, foi observada apenas a formação do isômero β.

Dados do composto: Rf 0,31 [AcOEt: Hex 1:1 (v/v)]. δ_H (CDCl₃; 500 MHz: 5,76 (1H, m, H-6), 5,39 (1H, dd, *J*_{3',4'} 3,4 Hz, *J*_{4',5'} 1,0 Hz, H-4'), 5,20 (1H, dd, *J*_{1',2'} 7,9 Hz, *J*_{2',3'} 10,8 Hz, H-2'), 5,03 (1H, dd, *J*_{3',4'} 3,4 Hz; *J*_{3',2'} 10,8 Hz, H-3'), 4,63 (1H, d, *J*_{1',2'} 7,8 Hz, H-2'), 4,54 (1H, dd, *J*_{2,1β} 13 Hz, *J*_{2,1α} 5,7Hz, H-2), 4,31 (1H, m, H-16), 4,25 (1H, dd, *J*_{6a',5'} 5,7 Hz, *J*_{6a',6b'} 11,2 Hz, H-6a'), 4,05 (1H, dd, *J*_{6b',5'} 7,8 Hz, *J*_{6a',6b'} 11,2 Hz, H-6b'), 3,81 (1H, m, H-5'), 3,28 (1H, d, *J*_{12α,12β} 15 Hz, H-12α), 2,82 (1H, m, H-23a), 2,76 (1H, m, H-10), 2,70 (1H, d, *J*_{12α,12β} 15Hz, H-12β), 2,54 (1H, d, *J*_{16,17} 7Hz, H-17), 2,52 (1H, m, H-23b), 2,40 (1H, m, H-7β), 2,20 (1H, m, H-1β), 2,05 (2H, m, H-24a, H-24b), 1,97 (1H, m, H-8), 1,96 (1H, m, COOCH₃), 1,95 (1H, m, H-7α), 1,84 (1H, m, H-15β), 1,46 (3H, s, CH₃-27), 1,44 (3H, s, CH₃-26), 1,42 (3H, s, CH₃-21), 1,42 (1H, m, H-1α), 1,40 (1H, m, H-15α), 1,36 (3H, s, CH₃-30), 1,27 (3H, s, CH₃-28), 1,25 (3H, s, CH₃-29), 1,07 (3H, s, CH₃-19), 0,98 (3H, s, CH₃-18).

δ ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): 213.9 (C-22), 212.0 (C-11), 208.7 (C-3), 170.5 (C-OAc), 170.4 (C-OAc), 170.3 (C-OAc), 170.2 (C-OAc), 170.1 (C-OAc), 140.0 (C-5), 120.3 (C-6), 100.1 (C-1'), 81.3 (C-25), 78.9 (C-20), 76.0 (C-2), 71.1 (C-16), 70,8 (C-3'), 70.5 (C-5'), 68.8 (C-2'), 66.8 (C-4'), 60,9 (C-6'), 57.8 (C-17), 50.7 (C-14), 50.3 (C-4), 48.9 (C-17, C-12), 48.5 (C-13), 48.4 (C-9), 45.5 (C-15), 42.3 (C-8), 34.9 (C-24), 34.4 (C-10), 33.8 (C-1), 30.7 (C-23), 28.8 (C-29), 26.2 (C-26), 25.8 (C-27), 24.4 (C-21), 23.9 (C-7), 21.5 (C-28), 20.0 (C-19), 19.8 (C-18), 18.7 (C-30).

ESI-TOF: calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{O}_{17}$ [M - H]: 889,9981; valor encontrado 889,41956

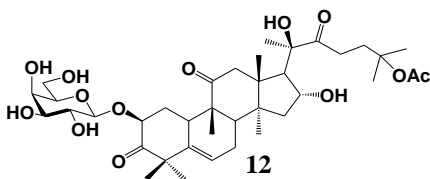
3-O-β-D-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-galactopiranosídeo) de colesterol (10)(CHENG et al., 2005)



F.M.: C₄₁H₆₄O₁₀
M.M.: 716,94 g. mol⁻¹
P.F.: 170 – 175 °C

A reação foi conduzida nas mesmas condições descritas para a síntese do composto 16-(1,2-ortoacetato-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-glicopiranosose)-dihidrocucurbitacina B (**7**), porém partindo do colesterol (0,1 g; 0,258mmol), adquirido comercialmente. A uma mistura de colesterol em DCM (5 mL), foram acrescentados o composto 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosil tricloroacetimidato (**5b**) (0,32 g; 0,65 mmol) e TMSOTf (14 μL). O produto foi obtido como um pó branco com rendimento de 40 % (0,074 g, 0,103 mmol).

Dados do composto: Rf 0,31 [Hex: AcOEt: 9:1 (v/v)]. δ_H (CDCl₃; 400 MHz): 5,38 (2H, m, H-4', H-6), 5,19 (1H, dd, *J*_{1,2}7,9 Hz; *J*_{2,3}10,4 Hz, H-2'), 5,02 (1H, dd, *J*_{2,3} 10,4 Hz; *J*_{3,4} 3,4 Hz, H-3'), 4,55 (1H, d, *J*_{1,2} 7,9 Hz, H-1'), 4,18 (1H, dd, *J*_{5,6a} 6,4 Hz; *J*_{6a,6b} 11,4 Hz, H-6a'), 4,12 (1H, dd, *J*_{5,6a} 7,2 Hz; *J*_{6a,6b} 11,4 Hz, H-6b'), 3,89 (1H, m, H-5'), 3,29 (1H, m, H-3), 2,23 – 0,68 (43 H, sinais do colesterol, incluindo os simpletos em 0,99 (CH₃), 0,68 (CH₃) e os dupletos em 0,86 (*J* 2 Hz), 2,15 – 1,99 (12H, 4s, 4x -OCOCH₃).

2-*O*-β-D-galactopiranosídeo de dihidrocurbitacina B (12)**F.M.:** C₃₈H₅₈O₁₃**M.M.:** 722,86 g. mol⁻¹**P.F.:** 145- 148 °C

O composto 2-*O*-β-D-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-galactopiranosídeo) de dihidrocurbitacina B (**11**) (33 mg, 0,037 mmol) foi dissolvido em MeOH (1 mL) seguido do tratamento com solução de NaOMe 1M (Na⁺ em MeOH) até pH básico (9-10). O sistema reacional foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por 1 hora, e em seguida resfriado a 0 °C para a adição de resina Dowex 50WX8-200 para a neutralização (pH 7) da mistura reacional. O produto bruto da reação foi filtrado, concentrado e purificado por coluna cromatográfica com sistema de solventes [DCM: MeOH 5:0,5 (v:v)]. O composto 2-*O*-β-D-galactopiranosídeo de dihidrocurbitacina B **12** foi isolado com 48 % (0,013 mg; 0,018 mmol) de rendimento.

Dados do composto: Rf 0,17 [DCM: MeOH: 5:0,5 (v/v)]. **ESI-TOF:** calculado para C₃₈H₆₂O₁₃N [M + NH₄]⁺: 740.89778; valor encontrado 740.42041

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O interesse em obter compostos semi-sintéticos de cucurbitacinas, provém dos resultados promissores das atividades biológicas exercidas por esta classe de compostos, associado ao fato de que alguns elementos estruturais peculiares a algumas estruturas tornam limitante o avanço das pesquisas, pois os mesmos estão relacionados à toxicidade não seletiva. Neste sentido, a obtenção de análogos de cucurbitacinas por meio de reações de modificações estruturais, tem como objetivo estabelecer quais os elementos estruturais estão relacionados com as atividades biológicas e com a toxicidade, bem como melhorar as características físico-químicas de algumas cucurbitacinas, corroborando para a melhora do índice terapêutico das mesmas.

Inseridos neste contexto, o nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo essa abordagem desde 2008, motivados principalmente por resultados relevantes no âmbito da atividade antitumoral e anti-inflamatória, de alguns trabalhos desenvolvidos, inclusive, nesta Universidade. Siqueira e colaboradores (2009) analisaram ação antitumoral de dihidrocucurbitacina B em camundongos induzidos com células de melanoma (B16F10), na qual a mesma foi capaz de diminuir o crescimento tumoral e reduzir a metástase pulmonar. Este trabalho destaca-se ainda, por ser o único relato de estudo *in vivo* de dihidrocucurbitacina B para esta atividade. O potencial anti-inflamatório de dihidrocucurbitacina B foi demonstrado em estudo *in vivo* em diferentes modelos de inflamação (edema de pata e pleurisia), sugerindo uma ação inibitória de COX-2 (SIQUEIRA JR et al., 2007).

Há apenas três trabalhos na literatura que abordam derivados sintéticos e semi-sintéticos de cucurbitacinas. Bartalis e Halaweish (2005) obtiveram ésteres e éteres das cucurbitacinas B, E, I e L através de reações de semi-síntese e avaliaram a relação entre lipofilicidade e potencial citotóxico dos mesmos. Posteriormente, o mesmo grupo localizado na Universidade da Dakota do Sul (EUA) apresentou estudos de QSAR da atividade hepatoprotetora das cucurbitacinas semi-sintéticas (BARTALIS;HALAWEISH, 2005; 2011).Recentemente, um grupo de pesquisa da Universidade da Califórnia, descreveu a síntese total das cucurbitacinas B e D por uma rota sintética que envolve conjugação de Diels-Alder entre um dieno derivado de 2,2-dimetil-1,5-ciclohexanona e um dienófilo derivado de metilciclohexanona, obtido por uma sequência de reações de conjugação, redução e condensação aldólica, em um total de 16 etapas de reação (JUNG;LUI, 2010). No

entanto, cabe destacar que não são encontrados trabalhos descrevendo a síntese de derivados glicosilados de cucurbitacinas.

Os estudos com *Wilbrandia ebracteata* foram iniciados na década de 80 e até o presente momento já foram identificadas mais de 20 cucurbitacinas desta espécie. Popularmente conhecida como taiuiá, *W.ebracteta* é uma planta nativa da região sul usada na medicina tradicional para diversas finalidades. As raízes desta espécie são robustas e apresentam um bom rendimento, uma vez que existem relatos que 1/3 das raízes de um exemplar forneceu cerca de 70 kg de material vegetal (SCHENKEL, E.P, depoimento pessoal). Na figura 7 (página 34), estão representadas as principais cucurbitacinas descritas para esta espécie. Na amostra de material vegetal utilizada neste trabalho foi possível identificar, principalmente, a dihidrocucurbitacina E, dihidrocucurbitacina B, os isômeros W-6 e W-7, cucurbitacina R, além de três novas cucurbitacinas (WT-1, KL-39, e isocucurbitacina R) recentemente descritas por nosso grupo (LANG et al., 2011). Na figura 35 abaixo, pode ser visualizado o perfil cromatográfico do extrato diclorometânico das raízes de *W. ebracteata* utilizada neste trabalho e a representação esquemática de algumas cucurbitacinas já descritas, conforme comparação com padrões disponíveis no laboratório.

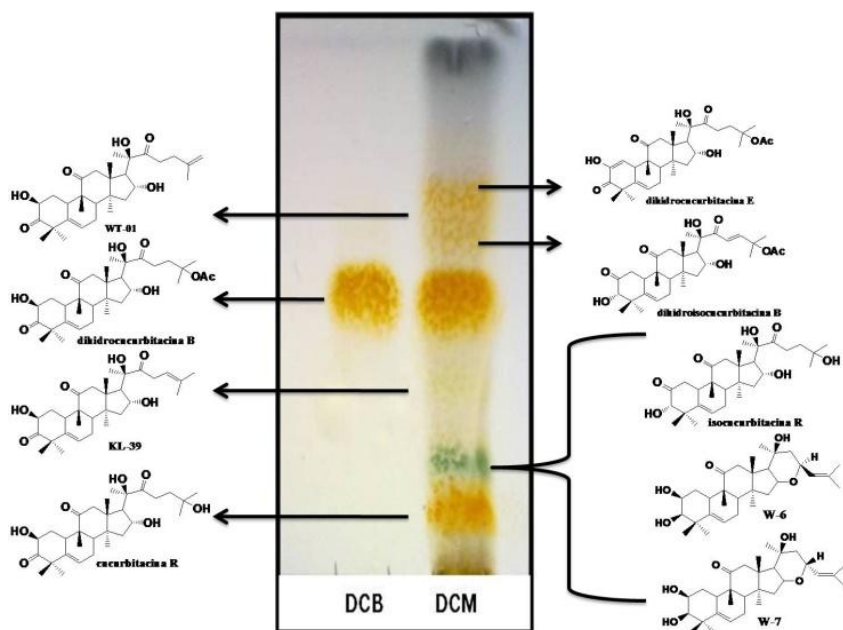


Figura 35: CCD extrato diclorometânico (DCM) e dihidrocucurbitacina B (DCB). Fase estacionária: gel de sílica F₂₅₄; Fase móvel: hexano:AcOEt (60:40; v/v); Detecção: vanilina-H₃PO₄/ aquecimento (100°C).

As cucurbitacinas majoritárias do extrato diclorometânico de *W. ebracteata* são dihidrocucurbitacina B e cucurbitacina R. No entanto, observou-se um maior rendimento de dihidrocucurbitacina B, cerca de 20 % do extrato diclorometânico (m/m) e aproximadamente 0,054 g em 100 g de material vegetal.

Os motivos que culminaram na escolha da estrutura de dihidrocucurbitacina B como material de partida para as reações de *O*-glicosilação foram os resultados relevantes apresentados nas atividades biológicas antitumoral e anti-inflamatória descritas anteriormente, e o bom rendimento no isolamento do extrato diclorometânico das raízes de *W. ebracteata*.

É interesse do grupo avaliar a ação farmacológica de glicosídeos de outras cucurbitacinas, como por exemplo, a cucurbitacina B. As estruturas diferem-se pela presença de uma insaturação na cadeia lateral de cucurbitacina B, formando uma cetona α,β insaturada na mesma, a qual alguns autores associam à toxicidade desta cucurbitacina (MUSZA et al., 1994, RÍOS et al., 2005). Tendo em vista os resultados obtidos para os glicosídeos de dihidrocucurbitacina B frente à linhagem celular de adenocarcinoma humano de pulmão (A549), se torna interessante a avaliação da influência de unidades monossacarídicas na estrutura de cucurbitacina B frente à toxicidade.

A presença de cucurbitacina B nas raízes de *W. ebracteata* é de aproximadamente 2 mg/100 g de material vegetal (KREPSKY et al., 2009). No entanto, o mesmo composto é encontrado majoritariamente em *Luffa operculata* Cogn, outra espécie da família Cucurbitaceae. A partir do extrato etanólico dos frutos de *L. operculata* (figura 36), cucurbitacina B pode ser isolada com cerca de 15% de rendimento. *L. operculata* é conhecida popularmente como buchinha-do-norte ou cabacinha e é usada na medicina tradicional para inalação no tratamento de doenças do trato respiratório e abortivo (MATOS, 1979).

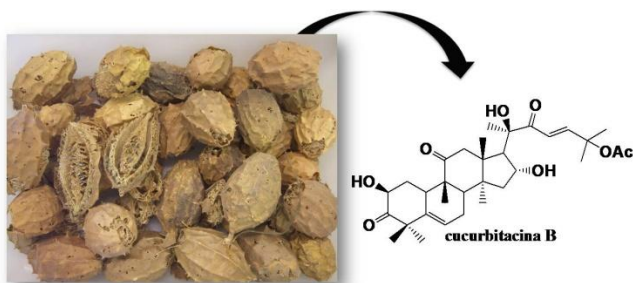


Figura 36: Frutos secos de *Luffa operculata* Cogn e estrutura química de cucurbitacina B. Foto: Vanessa Rocha Machado.

Com relação aos derivados monoglicosilados descritos neste trabalho, os mesmos foram obtidos em diferentes posições na dihidrocucurbitacina B (C-2 e C-16). Inicialmente, dihidrocucurbitacina B foi submetida à clássica reação de *O*-glicosilação de Koenigs Knorr. Esta metodologia utiliza haletos como doadores monossacarídicos, sendo que neste trabalho foram utilizados os brometos. Os doadores, brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (**2a**) e brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (**2b**), foram sintetizados em rendimentos moderados (~50 %) em uma rota sintética constituída por duas etapas reacionais. Uma desvantagem destes doadores é que os mesmos precisam ser utilizados logo que preparados, visto que são compostos de alta labilidade química e térmica. Em média, estes doadores demonstraram estabilidade por 60 dias com armazenamento a -17 ° C.

Os promotores reacionais utilizados em reações de Koenigs-Knorr são sais de metais pesados, normalmente sais de prata ou mercúrio, e em nosso trabalho foram avaliados os sais de prata (Ag_2CO_3 e Ag_2O). No entanto, apenas as reações com Ag_2O forneceram o derivado 16-(1,2-ortoacetato-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosose)-dihidrocucurbitacina B (**7**) em rendimentos moderados (17%). A formação de 1,2 ortoéster de glicosídeos em reações de Koenigs-Knorr é descrita na literatura, principalmente, quando são utilizados sais de prata insolúveis como promotores da reação (DESMARES et al., 2001, SEEBACHER; HASLINGER; WEIS, 2001, PRESSER; KUNERT; PÖTSCHGER, 2006). Porém, os mesmos trabalhos descrevem o isolamento do composto glicosilado desejado de forma majoritária e seu derivado 1,2 ortoéster apresenta-se como um

subproduto de baixo rendimento. No entanto, em nosso trabalho foi observada apenas a formação do derivado 16-(1,2-ortoacetato-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopirranose)-dihidrocucurbitacina B (**7**), visto que não foi possível identificar a formação do produto *O*-glicosilado.

O derivado 1,2-ortoéster (**7**) foi submetido a reação de desproteção das hidroxilas da unidade monossacarídica com solução metanólica de NaOMe, porém devido a quantidade reduzida de material e a formação de alguns subprodutos, não foi possível isolar o composto desacetilado em quantidades para a análise espectroscópica de RMN ^1H . A reação de desproteção precisa ser repetida para avaliar a estabilidade da ligação glicosídica formada.

Uma alternativa descrita na literatura é a obtenção do derivado glicosilado evitando a formação de 1,2 ortoéster nas reações de Koenigs Knorr é a utilização de sais prata solúvel, como triflato de prata, além da proteção das hidroxilas da unidade monossacarídica com grupos protetores volumosos, como por exemplo, isobutirila (DESMARES et al., 2001).

As mesmas condições reacionais utilizadas na obtenção do derivado 1,2-ortoéster (**7**) foram utilizadas na reação de Koenigs-Knorr com colesterol como acceptor glicosídico. O derivado glicosilado de colesterol foi obtido em rendimento similar ao composto **7**, porém não foi observada a formação do derivado 1,2-ortoéster. Outra observação importante do desenvolvimento desta reação foi a conversão completa do acceptor glicosídico em produtos, independente de tempo reacional e proporção entre os reagentes. O mesmo fato foi observado quando dihidrocucurbitacina B é utilizada como acceptor glicosídico nas mesmas condições reacionais, o que sugere que esta é uma peculiaridade da metodologia e independe da estrutura do acceptor glicosídico, visto que a molécula de colesterol apresenta apenas uma hidroxila passível de glicosilação.

A utilização do colesterol como molécula modelo nas reações de *O*-glicosilação mostrou-se bastante valiosa para a compreensão do desenvolvimento das mesmas. O composto 3-*O*- β -galactosídeo de colesterol foi obtido também através da reação com o doador tricloroacetimidato em presença do promotor triflato de trimetilsilila (TMSOTf). Porém, o rendimento do produto glicosilado foi superior ao obtido na reação de Koenigs-Knorr (40 %), motivando o desenvolvimento desta metodologia com a dihidrocucurbitacina B.

A metodologia de *O*-glicosilação com doadores monossacarídeos funcionalizados em C-1 com imidatos (trifluoroacetimidatos e tricloroacetimidatos) tem sido bastante relatada na literatura nos últimos

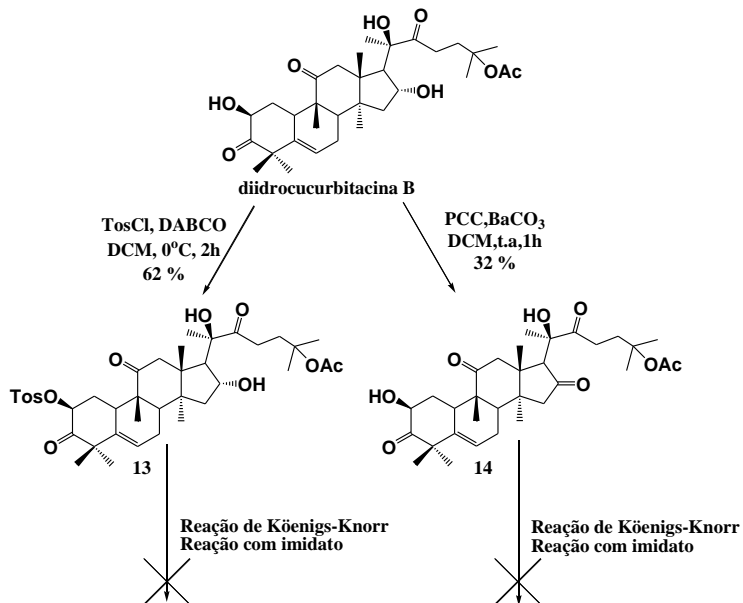
anos, principalmente devido a maior estabilidade destes doadores quando comparados com os haletos, assim como pelo o alto rendimento do produtos glicosilados (JACOBSSON;MALMBERG;ELLERVIK, 2006).

Em nosso trabalho, utilizamos os doadores funcionalizados em C-1 com tricloroacetimidato e os mesmos foram sintetizados em três etapas reacionais em rendimentos moderados (50 a 60 %). As reações de *O*-glicosilação de dihidrocucurbitacina B foram realizadas com ambos os doadores monossacarídicos [2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosil tricloroacetimidato (5a) e 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato (5b)], no entanto, apenas as reações com o doador galactosídeo forneceram o derivado desejado com 17 % de rendimento e substituído na posição C-2 de dihidrocucurbitacina B.

Uma perspectiva do trabalho é estudar estratégias sintéticas de proteção e desproteção das hidroxilas em C-2 e C-16, com o objetivo de desenvolver as reações de *O*-glicosilação realizadas neste trabalho de maneira seletiva, visto que as metodologias apresentaram seletividade para diferentes posições de substituição na dihidrocucurbitacina B.

A escolha dos grupos protetores deve ser adequada com a rota sintética de *O*-glicosilação escolhida, ou seja, os mesmos precisam ser estáveis nos meios reacionais. Alguns exemplos de grupos protetores como cloreto de terbutildimetilsilila (TBDMSCl), cloreto de tosila e até oxidações estão planejadas para trabalhos futuros.

Tentativas preliminares foram realizadas, de acordo com os resultados prévios da tese em desenvolvimento em nosso grupo de pesquisa (LANG, K.L, tese em andamento, 2011). Dessa forma, foi possível obter a hidroxila de C-2 substituída com o grupamento tosila e a posição 16 com função cetona, a partir da oxidação da hidroxila (esquema 15)



Esquema 15: Preparação de derivados substituídos em C2 com tosila e posição C-16 oxidada.

Os compostos **13** e **14**, por sua vez, foram submetidos às reações de *O*-glicosilação de Koenigs-Knorr e reação com tricloroacetimidatos. No entanto, não foi evidenciada a formação dos respectivos derivados glicosilados. Estudos adicionais precisam ser desenvolvidos com relação às condições reacionais, como por exemplo, tempo de reação, ajustes da proporção de equivalentes dos reagentes e mudanças no promotor reacional.

Os doadores monossacáridicos utilizados nas reações deste trabalho foram glicose e galactose, uma vez que os mesmos são os mais comuns utilizados na obtenção de derivados glicosídicos, facilitando a padronização das reações devido à disponibilidade de dados na literatura. No entanto, é interesse do grupo obter derivados de diidrocucurbitacina B com outras unidades monossacáridicas, como por exemplo, pentoses (ribose, arabinose e xilose) e o monossacárideo insaturado, glicol (Figura 37).

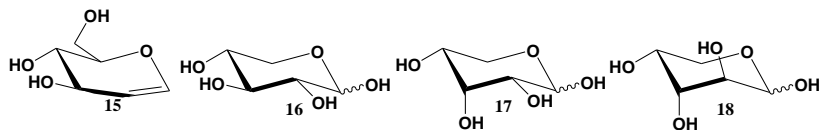


Figura 37: Monossacarídeos glicial (15), xilose (16), ribose (17) e arabinose (18)

Dentre os monossacarídeos citados, o glicial foi previamente avaliado. Dihidrocucurbitacina B foi submetida à reação de *O*-glicosilação com 3,4,6,-tri-*O*-acetil-D-glucal utilizando ácidos de Lewis como promotores de glicosilação (LiBr e ZnCl₂), conforme metodologias descritas na literatura (FLEKHTER;BALTINA;TOLSTIKOV, 2000, BETTADAIHA;SRINIVAS, 2003). Entretanto, o produto glicosilado de interesse não foi obtido, sendo necessários estudos adicionais com relação às condições reacionais utilizadas, como por exemplo, o tempo da reação, purificação dos reagentes (umidade) e até o uso de irradiação por micro-ondas estão planejados.

Em resumo, o trabalho desenvolvido apresenta perspectivas de continuidade, não somente no âmbito da obtenção de compostos glicosilados de dihidrocucurbitacina B, como também de outras cucurbitacinas como, por exemplo, cucurbitacina B. Ainda são previstas reações com outras unidades monossacarídicas e o direcionamento da glicosilação para diferentes posições no esqueleto cucurbitano (C-2 e C-16). Os compostos obtidos serão avaliados frente a outras atividades biológicas, como por exemplo, anti-inflamatória, antiparasitária e antiviral, corroborando desta forma, com outros trabalhos desenvolvidos pelo nosso de grupo de pesquisa em estudos de relação estrutura-atividade desta classe de compostos.

7 CONCLUSÕES

- Dihidrocucurbitacina B, utilizada como o acceptor glicosídico nas reações de *O*-glicosilação desenvolvidas neste trabalho, foi isolada a partir do extrato diclorometânico das raízes de *W. ebracteata*. O processo extrativo foi exaustivo e a purificação do composto isolado por processos cromatográficos forneceram dihidrocucurbitacina B em rendimentos satisfatórios, em torno de 20 %, o que viabilizou as reações de modificação molecular.
- A metodologia clássica de Koenigs-Knorr em presença do promotor reacional óxido de prata (Ag_2O) e brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila não forneceu o composto glicosilado desejado, porém o composto 16-(1,2-ortoacetato-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosil)-dihidrocucurbitacina B (**7**) substituído na posição 16 de dihidrocucurbitacina B foi isolado com 17 % de rendimento.
- A reação de *O*-glicosilação com o doador 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato promovida por triflato de trimetilsilila (TMSOTf) forneceu o derivado 2-*O*- β -galactosídeo de dihidrocucurbitacina B, após reação de desproteção das hidroxilas da unidade monossacarídica.
- De acordo com revisão bibliográfica realizada e apresentada no item 2 deste trabalho, os derivados glicosilados obtidos são inéditos na literatura. Ressaltando que são poucos os glicosídeos de cucurbitacinas substituídos na posição 16 (com exceção de dastiscosídeos) e não há relato de galactose como unidade monossacarídica em glicosídeos de cucurbitacinas.
- Na avaliação da citotoxicidade em linhagem celular de adenocarcinoma humano de pulmão (A549), os derivados glicosilados não mostraram inibição significativa do crescimento celular. Nessa linhagem celular O galactosídeo de dihidrocucurbitacina B apresentou perda da atividade citotóxica quando comparado com atividade da aglicona (dihidrocucurbitacina B).

8. APÊNDICE

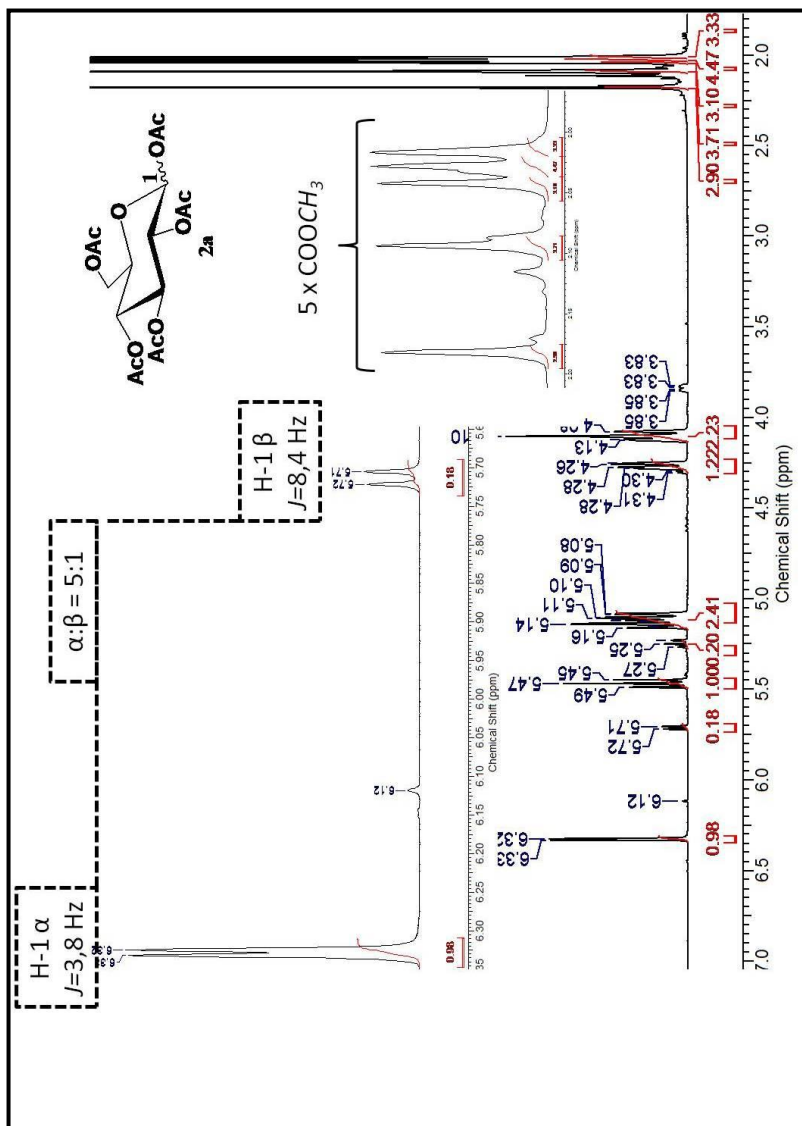


Figura 16: Espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D- α , β -D-glicopiranoose (**2a**).

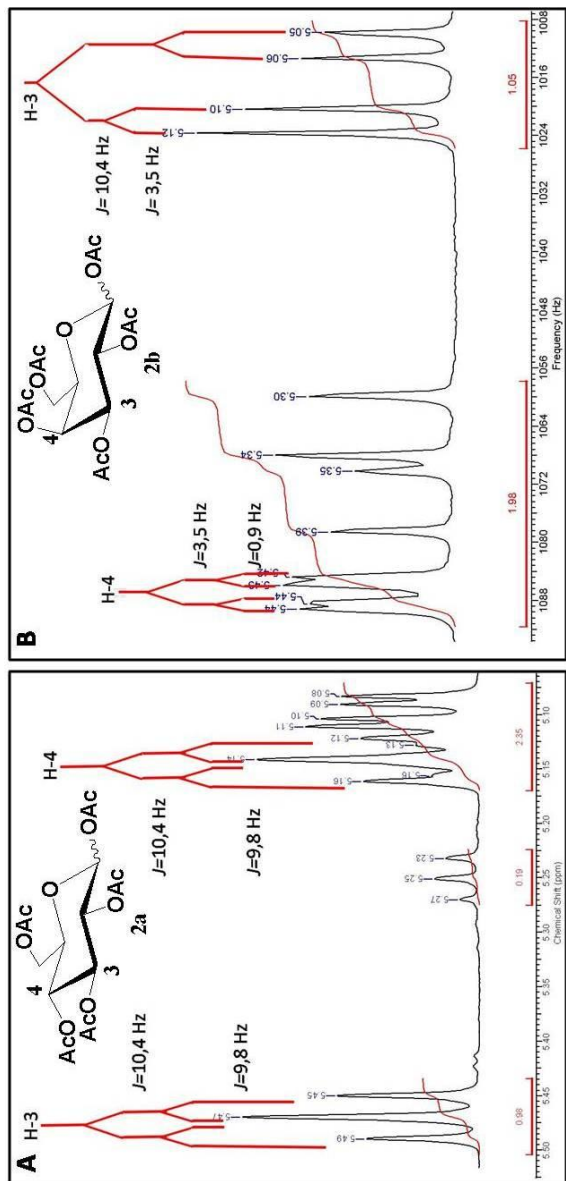


Figura 17: Espectros comparativos RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): **A)** constantes de acoplamento H-3 e H-4 do composto **2a**. **B)** constantes de acoplamento H-3 e H-4 do composto **2b**.

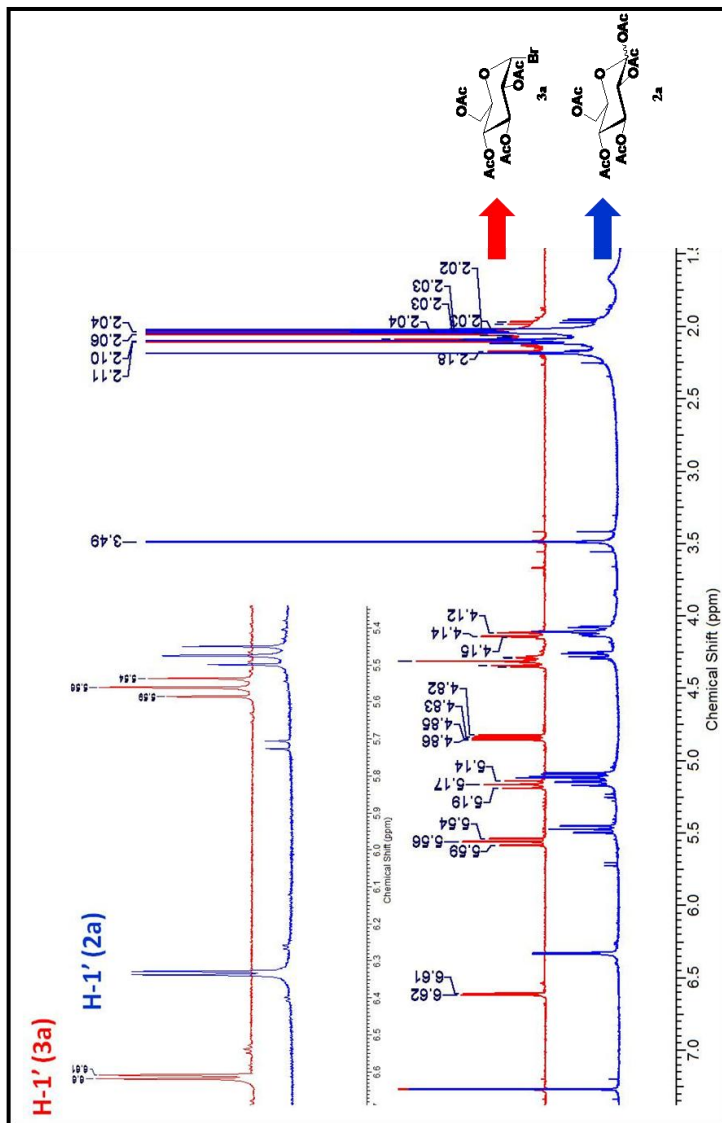


Figura 18: Sobreposição dos espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D- α,β -D-glicopiranoose (**2a** – azul) e brometo de 2,3,4,6-penta-*O*-acetil-D- α -D-glicopiranoose (**3a** – vermelho).

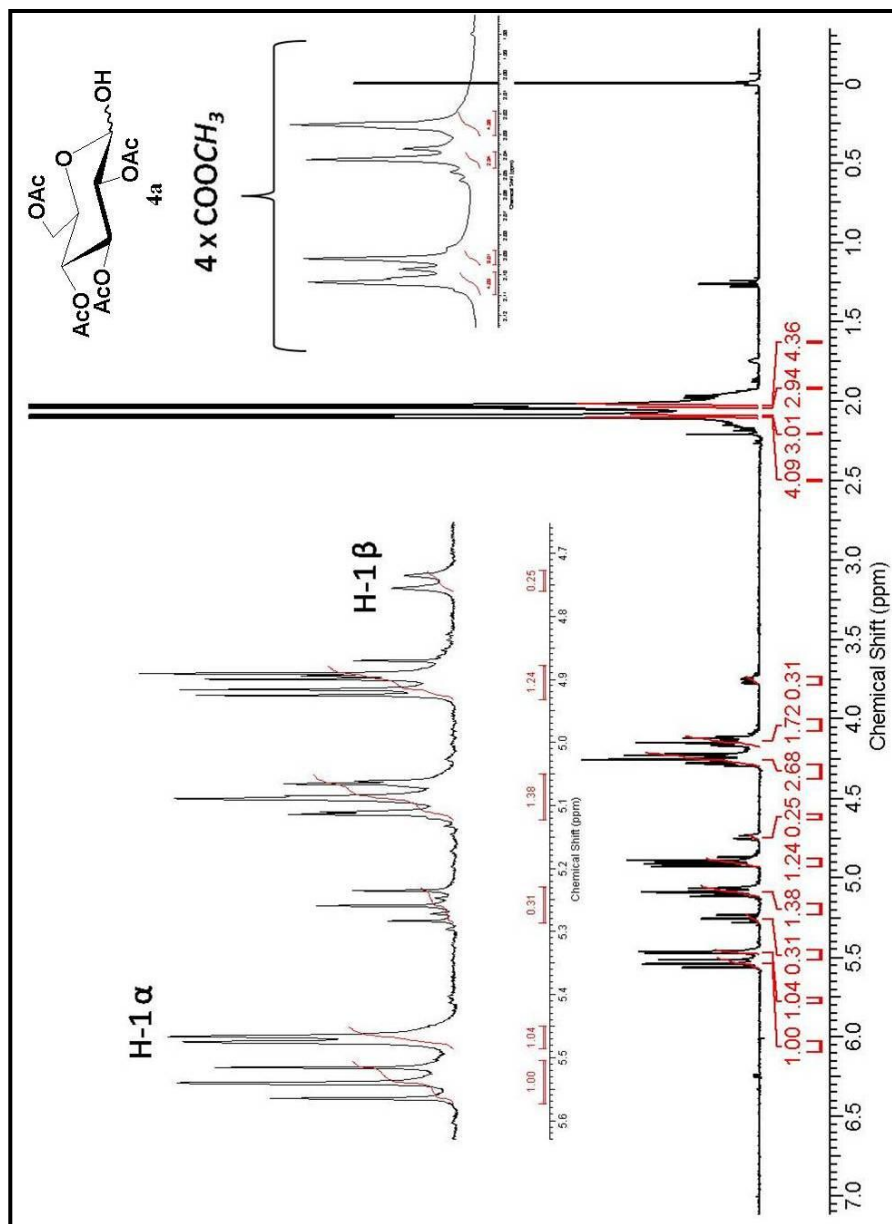


Figura 21: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-glicopirranose (**4a**).

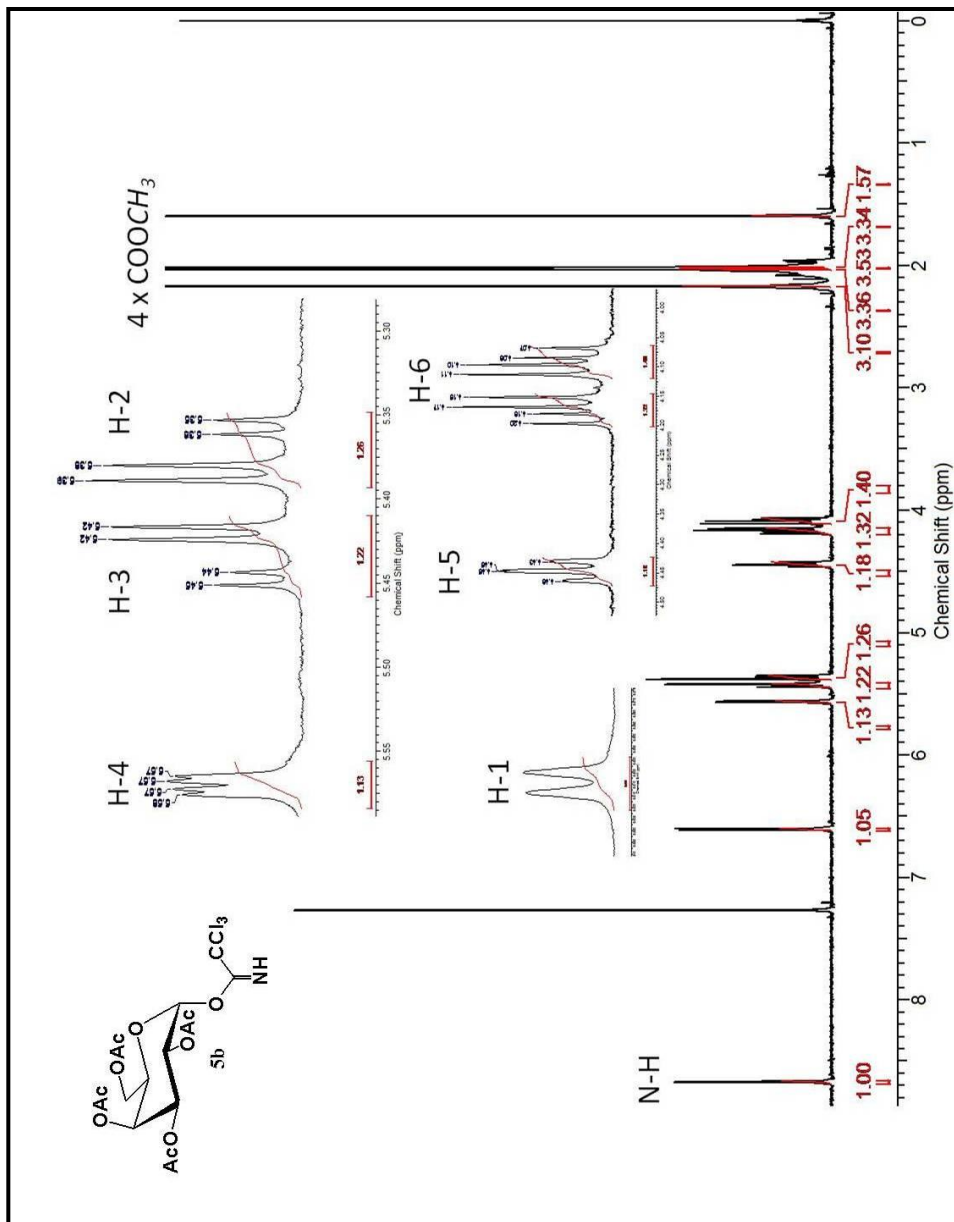


Figura 22: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosil tricloroacetimidato (**5b**).

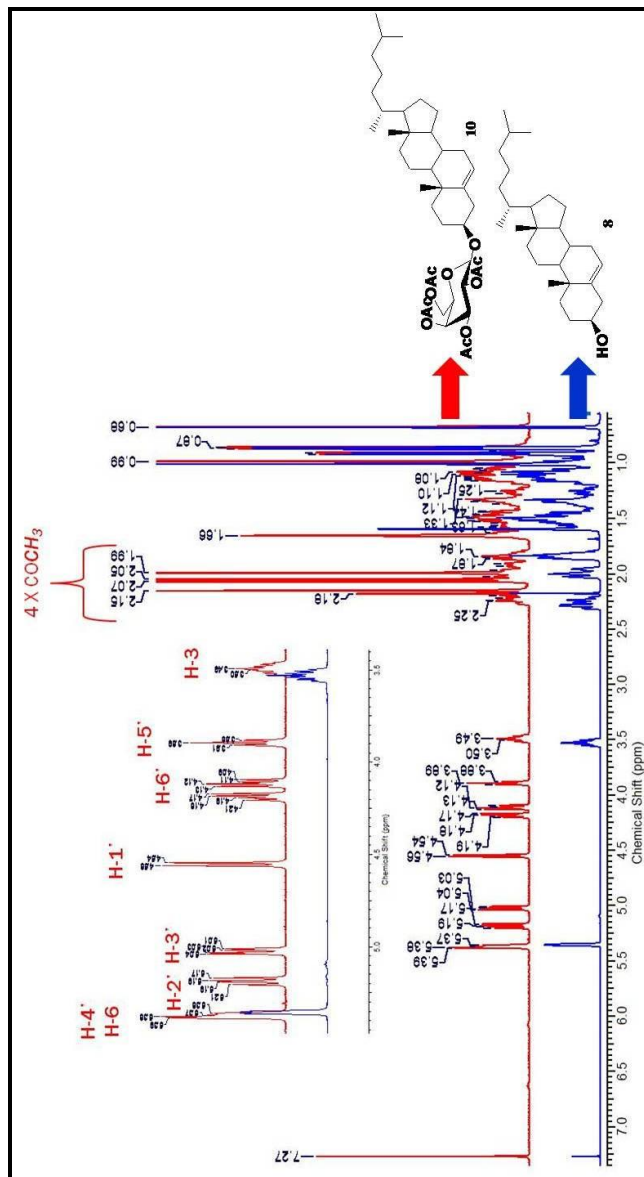


Figura 29: Espectros comparativos de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz). Colesterol (**composto 8-azul**) e 2,3,4,6-per-O-acetil- β -D-galactopiranosídeo colesterol (**composto 10-vermelho**).

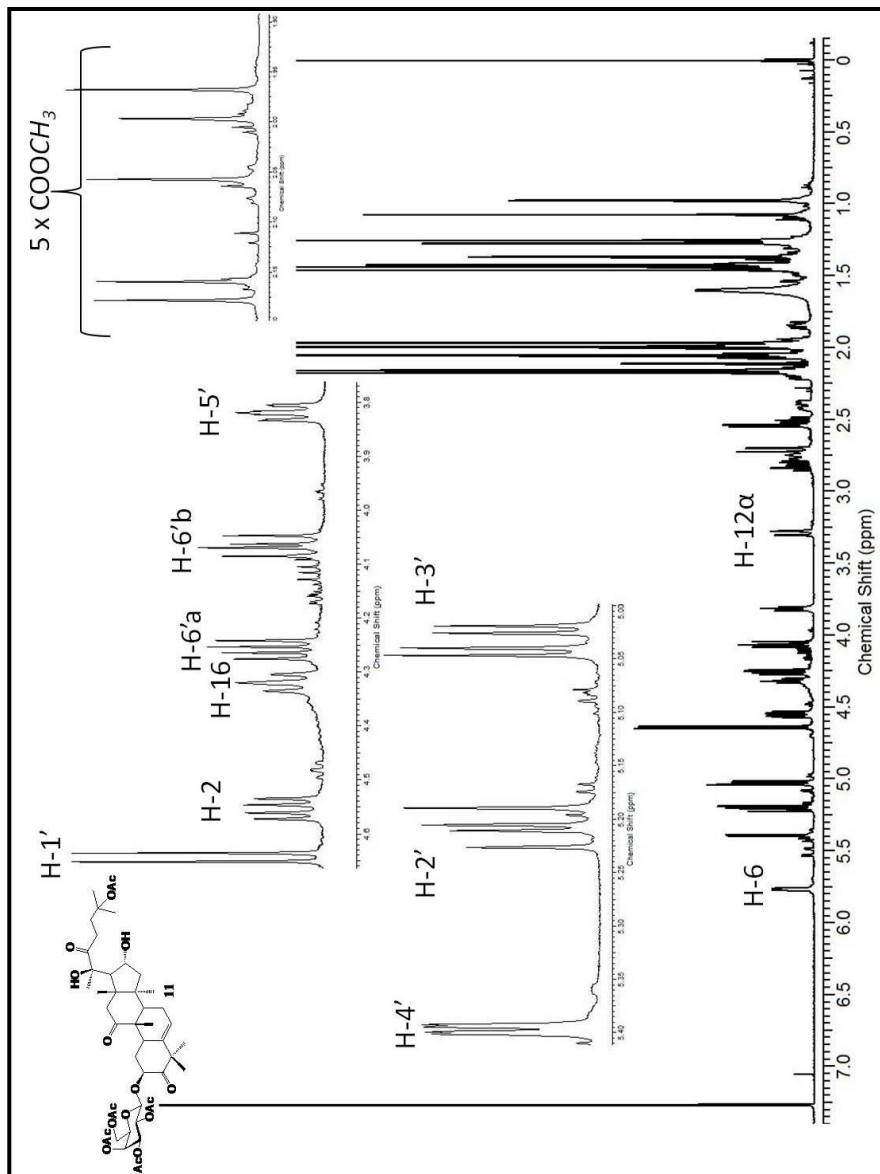


Figura 30: Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 2-O-β-D-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-galactopiranosídeo) de dihidrocurbitacina B (11).

9. REFERÊNCIAS

ANDERSON, F. B.; LEABACK, D. H. Substrates for the histochemical localization of some glycosidases. **Tetrahedron**. v. 12, n. 4, p. 236-239, 1961.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SINCERO, T. C. M.; DA SILVA, A. C.; SAVI, L. A.; GAIDO, C. M.; BETTEGA, J. M. R.; MANCINI, M.; DE 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**. v. 76, n. 3-4, p. 374-378, 2005.

ANUFRIEV, V. P.; MALINOVSKAYA, G. V.; DENISENKO, V. A.; UVAROVA, N. I.; ELYAKOV, G. B.; KIM, S. I.; BAEK, N. I. Synthesis of ginsenoside Rg3, a minor constituent of ginseng Radix. **Carbohydrate Research**. v. 304, n. 2, p. 179-182, 1997.

ATOPKINA, L. N.; DENISENKO, V. A. Synthesis of panaxatriol glucosides. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 45, n. 5, p. 664-672, 2009.

ATOPKINA, L. N.; DENISENKO, V. A. Glycosylation of panaxadiol. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 46, n. 6, p. 892-896, 2011.

ATOPKINA, L. N.; UVAROVA, N. I.; ELYAKOV, G. B. Simplified preparation of the ginsenoside-Rh2 minor saponin from ginseng. **Carbohydrate Research**. v. 303, n. 4, p. 449-451, 1997.

BAGGETT, N.; SAMRA, A. K.; SMITHSON, A. Synthesis of some aryl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-idopyranosides and of 4-methylcoumarin-7-yl- α -1-idopyranosiduronic acid. **Carbohydrate Research**. v. 124, n. 1, p. 63-74, 1983.

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 in the Biomedical and Life Sciences**. v. 818, n. 2, p. 159-166, 2005.

BARTALIS, J.; HALAWEISH, F. T. In vitro and QSAR studies of cucurbitacins on HepG2 and HSC-T6 liver cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v. 19, n. 8, p. 2757-2766, 2011.

BETTADIAH, B. K.; SRINIVAS, P. ZnCl₂-catalyzed Ferrier reaction; Synthesis of 2,3-unsaturated 1-O-glucopyranosides of allylic, benzylic and tertiary alcohols. **Tetrahedron Letters**. v. 44, n. 39, p. 7257-7259, 2003.

BRITO-ARIAS, M. **Synthesis and Characterization of Glycosides**. New York: Springer, 2007. 349 p.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry - A: Structures and Mechanisms**. 5. ed. New York: Springer, 2007.

CHE, C. T.; FANG, X.; PHOEBE JR, C. H.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R.; YELLIN, B.; HECHT, S. M. High-field ¹H-NMR spectral analysis of some cucurbitacins. **Journal of Natural Products**. v. 48, n. 3, p. 429-434, 1985.

CHEN, J. C.; CHIU, M. H.; NIE, R. L.; CORDEL, G. A.; QIU, S. X. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: Structures and biological activities. **Natural Product Reports**. v. 22, n. 3, p. 386-399, 2005.

CHENG, H.; CAO, X.; XIAN, M.; FANG, L.; CAI, T. B.; JI, J. J.; TUNAC, J. B.; SUN, D.; WANG, P. G. Synthesis and enzyme-specific activation of carbohydrate-geldanamycin conjugates with potent anticancer activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 48, n. 2, p. 645-652, 2005.

DAVID, A.; VALLANCE, D. K. Bitter principles of cucurbitaceae. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 7, n. 4, p. 295-296, 1955.

DAVIS, B. G.; FAIRBANKS, A. J. **Carbohydrate Chemistry**. New York: Oxford University Press, 2002. 100 p.

DESMARES, G.; LEFEBVRE, D.; RENEVRET, G.; LE DRIAN, C. Selective formation of beta-D-glucosides of hindered alcohols. **Helvetica Chimica Acta**. v. 84, n. 4, p. 880-889, 2001.

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

DUNCAN, G. R.; LEVI, D. D.; PYTTEL, R. Bitter principles of cucurbitaceae -*Bryonia dioica*. **Planta Medica**. v. 16, n. 2, p. 224-&, 1968.

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**. v. 52, n. 10, p. 1553-1560, 1996.

ESCANDELL, J. M.; KALER, P.; RECIO, M. C.; SASAZUKI, T.; SHIRASAWA, S.; AUGENLICHT, L.; RII • OS, J. L.; KLAMPFER, L. Activated kRas protects colon cancer cells from cucurbitacin-induced apoptosis: The role of p53 and p21. **Biochemical Pharmacology**. v. 76, n. 2, p. 198-207, 2008.

ESCANDELL, J. M.; RECIO, M. C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R. M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; GIL-BENSO, R.; RÍOS, J. L. Dihydrocucurbitacin B inhibits delayed type hypersensitivity reactions by suppressing lymphocyte proliferation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 322, n. 3, p. 1261-1268, 2007.

FARIAS, M. R. **Análise de Cucurbitacinas em Espécies de Cucurbitaceae conhecidas popularmente como Taiuiá**. 1986. 300 p Pós- Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

FARIAS, M. R. **Cucurbitacine aus *Wilbrandia ebracteata* Cogn (*Cucurbitaceae*)**. 1991. 237 p Pharmazeutische Chemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, 1991.

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

FARIAS, M. R.; SCHENKEL, E. P.; VIANNA, R. M. J.; DOS SANTOS, R. I. Identificação de amostras comerciais de raiz de Taiuiá como *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 1, n. 2, 1986.

FISCHER, E. Ueber die Glucoside der Alkohole. **Chemische Berichte**. v. 26, n. 3, 1893.

FLEKHTER, O. B.; BALTINA, L. A.; TOLSTIKOV, G. A. Glycals in the stereoselective synthesis of triterpene 2-deoxy- α -L-glycosides under conditions of acidic catalysis. **Journal of Natural Products**. v. 63, n. 7, p. 992-994, 2000.

GAZOLA, A. C. **Estudo químico das raízes e folhas de *Wilbrandia ebracteata* Cogn.** 2008. 142 p Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GITTER, S.; GALLILY, R.; SHOHAT, B.; LAVIE, D. Studies on the antitumor effect of cucurbitacins. **Cancer research**. v. 21, p. 516-521, 1961.

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

GUIMARÃES, R. T. **Obtenção de cucurbitacinas a partir de *Wilbrandia ebracteata* Cogn. e modificações estruturais.** 2010. 142 p Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**. v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HELFERICH, B.; SCHMITZ-HILLEBRECHT, E. Eine neue Methode zur Synthese von Glykosiden der Phenole. **Chemische Berichte**. v. 66, n. 3, 1933.

IWANSKI, G. B.; LEE, D. H.; EN-GAL, S.; DOAN, N. B.; CASTOR, B.; VOGT, M.; TOH, M.; BOKEMEYER, C.; SAID, J. W.; THOENNISSEN, N. H.; KOEFFLER, H. P. Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. **British Journal of Pharmacology**. v. 160, n. 4, p. 998-1007, 2010.

JACOBSSON, M.; MALMBERG, J.; ELLERVIK, U. Aromatic *O*-glycosylation. **Carbohydrate Research**. v. 341, n. 10, p. 1266-1281, 2006.

JAYAPRAKASAM, B.; SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. **Cancer Letters**. v. 189, n. 1, p. 11-16, 2003.

JUNG, M. E.; LUI, R. M. Studies toward the total syntheses of cucurbitacins B and D. **Journal of Organic Chemistry**. v. 75, n. 21, p. 7146-7158, 2010.

KARTHA, K. P. R.; FIELD, R. A. Iodine : A versatile reagent in carbohydrate chemistry IV. Per-O-Acetylation, regioselective acylation and acetolysis. **Tetrahedron**. v. 53, n. 34, p. 11753-11766, 1997.

KÖENIGS, W.; KNORR, E. Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose. **Chemische Berichte**. v. 34, 1901.

KONOSHIMA, T.; TAKASAKI, M.; TATSUMOTO, T.; KOZUKA, M.; KASAI, R.; TANAKA, O.; NIE, R. L.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; IWASHIMA, A. Inhibitory effects of cucurbitane triterpenoids on Epstein-Barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumors. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 17, n. 5, p. 668-671, 1994.

KREPSKY, P. B. **Contribuição para o desenvolvimento de método para análise quantitativa de cucurbitacinas em *Wilbrandia ebracteata* Cogn. e *Luffa operculata* (L.)Cogn., empregando CLAE e espectrofotometria no UV**. 2003. 92 p Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

KREPSKY, P. B.; CERVELIN, M. D. O.; PORATH, D.; PETERS, R. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; FARIAS, M. R. High performance liquid chromatography determination of cucurbitacins in the roots of *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n. 3, p. 715-719, 2009.

LANG, K. L.; DA ROSA GUIMARÃES, T.; ROCHA MACHADO, V.; ZIMMERMANN, L. A.; SILVA, I. T.; TEIXEIRA, M. R.; DURÃN, F. J.; PALERMO, J. A.; SIMÕES, C.; CARO, M.; SCHENKEL, E. P. New Cytotoxic Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Planta Medica**. v., 2011.

LAVIE, D.; GLOTTER, E. The cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**. v. 29, p. 307-362, 1971.

LAVIE, D.; SHVO, Y.; GOTTLIEB, O. R.; GLOTTER, E. Constitution of the Cucurbitacins. **Tetrahedron Letters**. v. 2, n. 18, p. 615-623, 1961.

LEE, D. H.; IWANSKI, G. B.; THOENNISSSEN, N. H. Cucurbitacin: Ancient compound shedding new light on cancer treatment. **The Scientific World Journal**. v. 10, p. 413-418, 2010.

LEE, D. H.; THOENNISSSEN, N. H.; GOFF, C.; IWANSKI, G. B.; FORSCHER, C.; DOAN, N. B.; SAID, J. W.; PHILLIP KOEFFLER, H. Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. **Cancer Letters**. v. 306, n. 2, p. 161-170, 2011.

LEMIEUX, R. U.; HAYAMI, J. I. Mechanism of anomerization of tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranosyl chlorides **Canadian Journal of Chemistry**. v. 43, n. 8, p. 2162-&, 1965.

LEMIEUX, R. U.; LINEBACK, R. CHEMISTRY OF THE CARBOHYDRATES. **Annual review of biochemistry**. v. 32, p. 155-184, 1963.

LEMIEUX, R. U.; MORGAN, A. R. Preparation and configurations of tri-*O*-acetyl- α -D-glucopyranose 1,2-(orthoesters). **Canadian Journal of Chemistry**. v. 43, n. 8, p. 2199-&, 1965.

LONN, H. Synthesis of a tetra- and a nona-saccharide which contain α -1-fucopyranosyl groups and are part of the complex type of carbohydrate moiety of glycoproteins. **Carbohydrate Research**. v. 139, n. C, p. 115-121, 1985.

MATOS, F. J. A. Farmacognosia de *Luffa operculata* Cogn. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 60, n. 7, 1979.

MATSUDA, H.; NAKASHIMA, S.; ABDEL-HALIM, O. B.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, M. Cucurbitane-type triterpenes with anti-proliferative effects on U937 cells from an Egyptian natural medicine, *Bryonia cretica*: Structures of new triterpene glycosides, bryoniaosides A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 58, n. 5, p. 747-751, 2010.

MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; OHTANI, K.; TANAKA, O. Minor cucurbitane-glycosides from fruits of *Siraitia grosvenori* (Cucurbitaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 38, n. 7, p. 2030-2032, 1990.

MENG, D.; QIANG, S.; LOU, L.; ZHAO, W. Cytotoxic cucurbitane-type triterpenoids from *Elaeocarpus hainanensis*. **Planta Medica**. v. 74, n. 14, p. 1741-1744, 2008.

METCALF, R. L.; LAMPMAN, R. L. The chemical ecology of diabroticites and cucurbitaceae. **Experientia**. v. 45, n. 3, p. 240-247, 1989.

- MILJKOVIC, M. **Carbohydrates Synthesis, Mechanisms and Stereoelctronic Effects**. New York: Springer, 2010. 539 p.
- MIRO, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. **Phytotherapy Research**. v. 9, n. 3, p. 159-168, 1995.
- MOREIRA, N. J. **Dicionário de plantas medicinaes brasileiras**. Rio de Janeiro: Typographia do Correio Mercantil, 1862, 1862. 144 p.
- MORRIS KUPCHAN, S.; GRAY, A. H.; GROVE, M. D. Tumor inhibitors. XXIII. The cytotoxic principles of marah oreganus H. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 10, n. 3, p. 337-340, 1967.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MUSZA, L. L.; SPEIGHT, P.; MCELHINEY, S.; BARROW, C. J.; GILLUM, A. M.; COOPER, R.; KILLAR, L. M. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conobea scoparioides*. **Journal of Natural Products (Lloydia)**. v. 57, n. 11, p. 1498-1502, 1994.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S.; DALBY, S. M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 17, n. 6, p. 2290-2303, 2009.
- PAGOTTO, C. L. A. C.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R. Curcurbitacins: Pharmaceuticals or toxins? **Cucurbitacinas: Farmacos ou toxinas?** v. 77, n. 3, p. 113-124, 1996.
- PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2009.
- PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L.; PERRIN, D. R. **Purification of Laboratory Chemicals**. 4. ed. EUA: Elsevier, 1996.

- PETERS, R. R.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**. v. 63, n. 6, p. 525-528, 1997.
- PETERS, R. R.; SALEH, T. F.; LORA, M.; PATRY, C.; DE 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**. v. 64, n. 26, p. 2429-2437, 1999.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. v 6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978.
- PRESSER, A.; KUNERT, O.; PÖTSCHGER, I. High-Yield Syntheses of Tetra-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl bromide and Tetra-O-pivaloyl- α -D-glucopyranosyl bromide and their Advantage in the Koenigs-Knorr Reaction. **Monatshefte Fur Chemie**. v. 137, n. 3, p. 365-374, 2006.
- REBELO PETERS, R.; KREPSKY, P. B.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; DA SILVA ROCHA, J. C.; BEZERRA, M. M.; DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, R.; DE BRUM-FERNANDES, A. J.; FARIAS, M. R.; CASTRO DA ROCHA, F. A.; 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**. v. 73, n. 17, p. 2185-2197, 2003.
- RECIO, M. C.; PRIETO, M.; BONUCELLI, M.; ORSI, C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R. M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. L. Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. **Planta Medica**. v. 70, n. 5, p. 414-420, 2004.
- REN, T.; ZHANG, G.; LIU, D. Synthesis of bifunctional cationic compound for gene delivery. **Tetrahedron Letters**. v. 42, n. 6, p. 1007-1010, 2001.
- RESTIVO, R. J.; BRYAN, R. F.; KUPCHAN, S. M. Stereochemistry of cucurbitacins - crystal and molecular-structure and absolute-configuration of datiscoside bis-(para-iodobenzoate) dihydrate. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2**. v. n. 7, p. 892-897, 1973.
- RÍOS, J. L.; ESCANDELL, J. M.; RECIO, M. C.; . **New insights into the bioactivity of cucurbitacins**. 5. ed. v 32. Karachi: Elsevier, 2005.

- SADZUKA, Y.; HATAKEYAMA, H.; DAIMON, T.; SONOBE, T. Screening of biochemical modulator by tumor cell permeability of doxorubicin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 354, n. 1-2, p. 63-69, 2008.
- SANTOS, R. I. **Estudos dos flavonóides em vegetais dos gêneros *Cayaponia* Mansa e *Wilbrandia* Mansa, família Cucurbitacea**. 1986. 138 p Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.
- SASAMORI, H.; REDDY, K. S.; KIRKUP, M. P.; SHABANOWITZ, J.; LYNN, D. G.; HECHT, S. M.; WOODE, K. A.; BRYAN, R. F.; CAMPBELL, J.; LYNN, W. S.; EGERT, E.; SHELDRIK, G. M. New cytotoxic principles from *Datisca glomerata*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**. v., p. 1333-1347, 1983.
- SCHENKEL, E. P.; FARIAS, M. R.; MAYER, R.; BREITMAIER, E.; RÜCKER, G. Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Phytochemistry**. v. 31, n. 4, p. 1329-1333, 1992.
- SCHMIDT, R. R.; KINZY, W. Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: The trichloroacetimidate method. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 50, p. 21-123, 1992.
- SEEBACHER, W.; HASLINGER, E.; WEIS, R. Formation of orthoesters of oleanolic acid during Konigs-Knorr glycosidations. **Monatshefte Fur Chemie**. v. 132, n. 7, p. 839-847, 2001.
- SIQUEIRA, J. M.; GAZOLA, A. C.; FARIAS, M. R.; VOLKOV, L.; RIVARD, N.; DE 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 and Pharmacology**. v. 64, n. 3, p. 529-538, 2009.
- SIQUEIRA JR, J. M.; PETERS, R. R.; GAZOLA, A. C.; KREPSKY, P. B.; FARIAS, M. R.; RAE, G. A.; DE BRUM-FERNANDES, A. J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Life Sciences**. v. 80, n. 15, p. 1382-1387, 2007.
- SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure**. 6. ed. New Jersey: Wiley, 2007.

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. v. 73, n. 1, p. 56-67, 2007.

TIETZE, L.-F. Secologanin, a biogenetic key compound - synthesis and biogenesis of the iridoid and secoiridoid glycosides. **Angewandte Chemie - International Edition in English**. v. 22, n. 11, p. 828-841, 1983.

VALENTE, L. M. M. Cucurbitacins and their main structural characteristics. **Química Nova**. v. 27, n. 6, p. 944-948, 2004.

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

WU, P. L.; LIN, F. W.; WU, T. S.; KUOH, C. S.; LEE, K. H.; LEE, S. J. Cytotoxic and anti-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 52, n. 3, p. 345-349, 2004.

YANG, L.; WU, S.; ZHANG, Q.; LIU, F.; WU, P. 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Letters**. v. 256, n. 2, p. 267-278, 2007.

YESILADA, E.; TANAKA, S.; TABATA, M.; SEZIK, E. Antiinflammatory effects of the fruit juice of *Ecballium elaterium* on edemas in mice. **Phytotherapy Research**. v. 3, n. 2, p. 75-76, 1989.

YESILADA, E.; ÜSTÜN, O.; SEZIK, E.; TAKAISHI, Y.; ONO, Y.; HONDA, G. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: Interleukin- α , interleukin- β and tumor necrosis factor α . **Journal of Ethnopharmacology**. v. 58, n. 1, p. 59-73, 1997.

YU, B.; LIAO, J.; ZHANG, J.; HUI, Y. The first synthetic route to furostan saponins. **Tetrahedron Letters**. v. 42, n. 1, p. 77-79, 2001.