



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**OBTENÇÃO DE CUCURBITACINAS A PARTIR DE PLANTAS
NATIVAS E MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS VISANDO À
SÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

Karen Luise Lang

**Florianópolis – SC
2012**

Karen Luise Lang

**OBTENÇÃO DE CUCURBITACINAS A PARTIR DE PLANTAS
NATIVAS E MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS VISANDO À
SÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química, no curso Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Área de concentração: Química Orgânica e Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

Co-orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Javier Durán

Florianópolis - SC

2012

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

L269o Lang, Karen Luise

Obtenção de cucurbitacinas a partir de plantas nativas e modificações estruturais visando à síntese de compostos bioativos [tese] / Karen Luise Lang ; orientador, Miguel Soriano Balparda Caro. - Florianópolis, SC, 2012.

304 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Cucurbitacinas. I. Caro, Miguel Soriano Balparda. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores na Universidade Federal de Santa Catarina, Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro e Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, pela amizade e orientação, por acreditarem em minha capacidade, e por terem me dado a oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente. Em especial ao Prof. Dr. Eloir, exemplo de professor e pesquisador, o muito obrigado por todo o aprendizado recebido em todos esses anos de convívio e por permitir que eu fizesse parte da família tuiuíá.

Ao meu co-orientador na Universidade de Buenos Aires (UBA), Argentina, Prof. Dr. Fernando Javier Durán, pela paciência e dedicação incansáveis para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada pelo carinho, amizade e companheirismo durante toda a jornada.

À Profa. LÍlian Sibelle Campos Bernardes, por toda amizade e carinho com que sempre esteve presente, orientando o caminho correto a ser seguido nas mais diversas situações.

Ao Prof. Dr. Jorge Alejandro Palermo, pelo aprendizado constante, tanto químico quanto filosófico.

À Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFSC), por permitir que eu realizasse os ensaios de atividade anti-herpética em seu laboratório, e a sua aluna Izabella Thaís da Silva, realização dos testes de atividade citotóxica.

Ao Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela realização do estudo de QSAR.

À Dra. Daniela Ferraz e à Dra. Maíra Cola, da empresa Trial Pharma, pela parceria na realização dos ensaios de atividade anti-inflamatória. Ao Dr. Jarbas Motta Siqueira Junior, por acreditar no potencial das cucurbitacinas.

À Central de Análises do Departamento de Química da UFSC e ao Departamento de Química Orgânica da Universidade de Buenos Aires pelas análises espectroscópicas.

À Profa. Dra. Gabriela Cabrera, do Departamento de Química Orgânica da Universidade de Buenos Aires, pela realização das análises de espectrometria de massas.

Aos professores do Departamento de Química e de Ciências Farmacêuticas da UFSC pela contínua contribuição para meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Departamento de Química da UFSC, principalmente Graça e Jadir, da Secretaria da Pós-graduação.

Às técnicas dos Laboratórios de Química Farmacêutica e Farmacognosia, Solange e Claudinha, por todo carinho, amizade e apoio para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório no Brasil: Geison, Andressa, Caroline, Cassandra, Tatiana, Maria Izabel, Éverson, Maria Tereza, Simone, Carlos e Solomon, obrigada pela amizade e companheirismo, apesar da ausência constante.

Aos colegas dos laboratórios de Controle de Qualidade e Virologia Aplicada, obrigada pelas risadas e amizade durante todos os anos de convívio;

Aos colegas de laboratório em Buenos Aires: Muchas gracias por toda la amistad con que me recibieron! Les llevaré para todo lo siempre em mi corazón!

Às minhas queridas e eternas alunas de iniciação científica, Vanessa e Lara, obrigada por toda força e dedicação durante o tempo de doutorado. Tenho muito orgulho de ter participado da formação de vocês e as levarei para sempre no coração! Aos novos membros do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal e da família cuc: Ana Luisa e Rafael, muito obrigada pela força nos últimos meses.

À minha família: meus pais, Paulo e Marli, por serem meu porto seguro e meu exemplo constante de retidão e dignidade; meus irmãos, João Paulo e Katya, e cunhados, Mila e Bruno, por todo carinho e amizade. A distância nos separa, mas meu coração está sempre perto de vocês.

Ao meu sobrinho Theo, que ainda está se formando, mas já encheu de alegria nossas vidas.

Ao meu marido Daniel e minha “meia filha” Ana Luisa pelo amor, compreensão e paciência nessa etapa importante da minha vida. Amo vocês!

A toda família Lucena: Ariovaldo e Anajara; Adriana, Ricardo e Júlia; Leonardo, Patrícia, Vitória e Mariana, por todo carinho, leveza e alegria com que conduzem a vida.

À Capes e à UFSC pelo suporte financeiro.

*Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!*

Mario Quintana

RESUMO

Na busca por novas moléculas com potencial biológico, o objetivo deste trabalho foi complementar o estudo fitoquímico do extrato DCM de *Wilbrandia ebracteata*, bem como o isolamento dos constituintes majoritários deste e do extrato DCM de *Luffa operculata* para utilização como material de partida na obtenção de análogos de cucurbitacinas. Foram isoladas e caracterizadas 2 novas cucurbitacinas naturais e os compostos majoritários di-hidrocucurbitacina B (**CN-1**), cucurbitacina R (**CN-3**) e cucurbitacina B (**CN-7**) foram obtidos em quantidades adequadas para utilização como material de partida na síntese de derivados. Através de modificações estruturais aplicadas seguindo diferentes estratégias de química medicinal, como variação de grupos substituintes, simplificação e extensão de cadeia, foram obtidos 55 derivados semissintéticos. No anel A, modificações foram realizadas no grupo α -hidroxi-cetona através de reações de substituição nucleofílica, desoxigenação, esterificação e eliminação da hidroxila na posição 2; no anel B, uma cetona α,β -insaturada foi introduzida; a hidroxila na posição 16 do anel D foi oxidada, desoxigenada ou convertida a éster; a cadeia lateral foi clivada, a cetona α,β -insaturada modificada e a acetila em C-25 eliminada. As cucurbitacinas naturais e semissintéticas foram avaliadas quanto às propriedades anti-herpética, citotóxica frente a linhagens de células tumorais e anti-inflamatória. Na avaliação da atividade anti-herpética, somente o derivado **CS-46** apresentou alguma atividade, porém com baixo índice de seletividade. Frente às linhagens de células tumorais avaliadas, A549, RD, KB, HCT-8 e RD, os resultados mais promissores foram obtidos com as cucurbitacinas naturais **CN-3**, **CN-4**, **CN-5** e **CN-7**, com CI_{50} entre 0,01 e 7,22 μ M, e com os derivados da cucurbitacina B **CS-15** (2,64 μ M), **CS-34** (0,12 μ M), **CS-41** (0,12 μ M) e **CS-44** (11,52 μ M) para a linhagem A549. Estudo de QSAR sugeriu que a morte celular provocada pelas cucurbitacinas nas células tumorais pode estar associada a ataques eletrofílicos e a distribuição eletrônica no anel A. Em relação à atividade anti-inflamatória, os derivados da cucurbitacina B **CS-34** e **CS-44** apresentaram atividade promissora, com CI_{50} = 0,66 e 1,04 μ M, respectivamente.

Palavras-chave: cucurbitacinas, semissíntese, atividade biológica.

ABSTRACT

Searching for molecules with biological potential, the aim of this work was to complement the phytochemical study of the dichloromethane extract of *Wilbrandia ebracteata* roots, as well as the isolation of its major constituents from it and the dichloromethane extract of *Luffa operculata*, in order to use them as starting material for the synthesis of cucurbitacins analogues. Two new natural cucurbitacins were isolated and characterized and the major compounds dihydrocucurbitacin B (CN-1), cucurbitacin R (CN-3) and cucurbitacin B (CN-7) were obtained in adequate quantities for use as starting material in the synthesis of derivatives. Through the applying of structural changes using different strategies of medicinal chemistry, such as variation of substituent groups, simplification and chain extension, 55 cucurbitacins derivatives were obtained. In the ring A, modifications of the α -hydroxy ketone group were made by nucleophilic substitution, esterification and deoxygenation of the hydroxyl at position 2; at the ring B, the formation of α,β -unsaturated ketone was performed; the hydroxyl in position 16 at the ring D was oxidized, deoxygenated or converted to ester; the side chain was cleaved, the α,β -unsaturated ketone was modified and the C-25 acetyl was eliminated. The natural and semisynthetic cucurbitacins were evaluated for their anti-herpetic, cytotoxicity against tumor cell lines and anti-inflammatory properties. In the anti-herpetic activity assays, only CS-46 analog showed some activity, but with low selectivity index. Against the tumor cell lines analyzed, A549, RD, KB, HCT-8 and RD, the best results were obtained with the natural cucurbitacins CN-3, CN-4, CN-5 and CN-7, with IC_{50} values between 0.01 and 7.22 μ M, and with cucurbitacin B derivatives CS-15 (2.64 μ M), CS-34 (0.12 μ M), CS-41 (0.12 μ M) and CS-44 (11.52 μ M), for A549 cell line. QSAR studies suggest that the cell death caused by cucurbitacins may be associated with electrophilic attacks and electronic distribution in ring A. With regard to anti-inflammatory activity, cucurbitacin B derivatives CS-34 and CS-44 showed promising activity, with $IC_{50} = 0.66$ and 1.04 μ M, respectively.

Keywords: cucurbitacins, semisynthesis, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fármacos obtidos a partir de produtos naturais.	31
Figura 2: Esqueleto cucurbitano [19-(10→9β)-abeo-10α-lanostenol]... 33	
Figura 3: Principais variações no anel A encontradas em cucurbitacinas.	35
Figura 4: Principais variações de cadeia lateral encontradas em cucurbitacinas.	37
Figura 5: Estrutura de hexanor (32), heptanor (33) e octanorcucurbitacinas (34).....	37
Figura 6: Exemplar da espécie <i>W. ebracteata</i> Cogn.	41
Figura 7: Estrutura das principais cucurbitacinas isoladas de <i>W. ebracteata</i>	42
Figura 8: Frutos de <i>L. operculata</i> Cogn.	43
Figura 9: Estrutura das principais cucurbitacinas isoladas de <i>L. operculata</i>	44
Figura 10: Fracionamento do extrato DCM de <i>W. ebracteata</i>	52
Figura 11: Espectros RMN ¹³ C (125,8 MHz, CDCl ₃) e HSQC-dept e estrutura de CN-1.....	53
Figura 12: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de CN-1, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2 e H-16.	53
Figura 13: Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) e estrutura de CN-2, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-3 e 3-OH.....	54
Figura 14: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e estrutura de CN-3, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-2 e H-16.	55
Figura 15: Espectro RMN ¹ H de CN-4 (500 MHz, CDCl ₃), com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2 e H-16.	56
Figura 16: Espectro RMN ¹³ C (125,8 MHz, CDCl ₃) e estrutura de CN-4.....	57
Figura 17: Espectro RMN ¹ H de CN-5 (500 MHz, CDCl ₃), com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2 e H-16.	58

Figura 18: Estrutura molecular e espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de CS-8	59
Figura 19: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e estrutura de CN-6 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-16, H-3 e 3-OH.....	60
Figura 20: Fracionamento do extrato DCM de <i>L.operculata</i>	61
Figura 21: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e estrutura de CN-7 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-23, H-24, H-2 e H-16.....	62
Figura 22: Produtos obtidos na oxidação com PCC, CS-9 e CS-10	64
Figura 23: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e estrutura de CS-9 , com destaque para a comparação com o espectro RMN ¹ H de CN-1	64
Figura 24: Espectro RMN ¹³ C (125,8 MHz, CDCl ₃) e estrutura de CS-9 , com destaque para as correlações entre C-16 e H-17, H-15 α e H-15 β no espectro HMBC.....	65
Figura 25: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e estrutura de CS-10 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-1 e H-6.....	66
Figura 26: Espectro RMN ¹³ C (125,8 MHz) e estrutura de CS-11	67
Figura 27: Espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de CS-11	68
Figura 28: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) e estrutura de CS-13 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-24, H-23 e H-6 (a) e H-22, H-2, H-12 α e H-3 (b).....	70
Figura 29: Espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de CS-13 , com destaque para a correlação de H-22 com H-17 e H-21.....	71
Figura 30: Estruturas 3D de CN-1 na conformação mais estável (menor energia). Hyperchem 8.0.	72
Figura 31: Comparação entre os espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de CS-14 (a) e CN-1 (b), com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2, H-16 e metilas Me-2', Me-32 e Me-2''.....	74
Esquema 7: Síntese dos ésteres benzoílicos CS-20 e CS-21	75
Figura 32: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e estrutura de CS-20 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2, H-16 e H-aromáticos.	76

Figura 33: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura de CS-21 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2 e H-aromáticos.....	76
Figura 34: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura de CS-22 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2 e H-16.	77
Figura 35: Espectro RMN ^1H (500 MHz, MeOD) e estrutura de CS-25 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-9' e H-9''	79
Figura 36: Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CS-26 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, H-6, H-2 e H-16.....	80
Figura 37: Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CS-27 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos (a) e H-6 e H-2 (b).	81
Figura 38: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CS-28 , com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, H-6 e H-2.	82
Figura 39: Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3) de CS-28 , com destaque para a região de 170 a 115 ppm (a) e de 81 a 78 ppm (b).....	82
Figura 40: Estrutura molecular de CS-28	83
Figura 41: Obtenção de carbonato cíclico a partir de 7,10-dinitrobacatina III.....	83
Figura 42: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de CS-29 , com destaque para os hidrogênios aromáticos do grupo tosila.	86
Figura 43: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de CS-33 , com destaque para os sinais referentes a H-6 e H-2.	88
Figura 44: Comparação entre os espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CN-1 , CS-37 e CS-39	89
Figura 45: Correlações NOE para CS-37 e CS-39	90
Figura 46: Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de CS-45	92
Figura 47: Comparação entre os espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CN-1 , CS-48 e CS-49	95

Figura 48: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de CS-54 , com destaque para H-1 e H-2.	98
Figura 49: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de CS-55 , com destaque para H-6.	99
Figura 50: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de CS-58 , com destaque para H-2, H-3 e H-12a.	102
Figura 51: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CS-64 , com destaque para os sinais referentes a H-1 e H-6.	104
Figura 52: Análogos de nucleosídeos utilizados no tratamento de infecções herpéticas.	108
Figura 53: Cucurbitacinas ativas frente ao vírus Epstein-Barr descritas por Konoshima e col. (1993; 1994a,b; 1995) e Ukiya e col. (2002).	109
Figura 54: Metabólitos secundários e derivados utilizados na terapia do câncer.	114
Figura 55: Cucurbitacinas E (9) e B (CN-7).	117
Figura 56: Cucurbitacinas citotóxicas isoladas de <i>M. balsamina</i>	117
Figura 57: cucurbitacinas I (JSI-124), Q (57) e A (58).	119

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Obtenção de análogos de hexanorcucurbitacina descrita por Ruy e col. (1995).....	39
Esquema 2: Obtenção de derivados das cucurbitacina E (9) e I (JSI-124) descrita por Bartalis e Halaweish (2005).	39
Esquema 3: Síntese de epímero do núcleo cucurbitano descrita por Jung e Lui (2010).	40
Esquema 4: Provável rota sintética de formação do diosfenol CS-10..	66
Esquema 5: Mecanismo da redução de Luche.	69
Esquema 6: Síntese dos derivados ésteres succínicos e ftálicos CS-16 - CS-19.....	74
Esquema 7: Síntese dos ésteres benzoílicos CS-20 e CS-21.....	75
Esquema 8: Obtenção dos ésteres bromobutirílicos CS-22 e C.....	77
Esquema 9: Obtenção do derivado triazólico CS-25.....	78
Esquema 10: Síntese dos carbamatos CS-26, CS-27 e CS-28.....	80
Esquema 11: Provável mecanismo para formação do carbonato CS-28.....	84
Esquema 12: Obtenção de derivados halogenados de cucurbitacinas..	87
Esquema 13: Provável mecanismo de formação de derivados via substituição nucleofílica.....	88
Esquema 14: Obtenção de derivados sulfurados de cucurbitacinas CS-35 – CS-9.....	89
Esquema 15: Síntese das enamionas CS-40, CS-41 e CS-42.....	90
Esquema 16: Provável mecanismo de formação das enamionas CS-40 - CS-42.....	91
Esquema 17: Síntese dos aminotiazóis CS-43, CS-44 e CS-45.....	91
Esquema 18: Provável mecanismo de formação dos aminotiazóis CS-43 - CS-45.....	91
Esquema 19: Mecanismo de desoxigenação radicalar de tiocarbamatos descrito por Barton e McCombie (1975)	93
Esquema 20: Síntese dos derivados 2-desóxi e 2,16-di-desóxi-dihidrocucurbitacina B CS-48 e CS-49.....	94
Esquema 21: Síntese do derivado trifluoroacetato CS-50.....	96

Esquema 22: Síntese dos derivados 25-deacetil-di-hidrocurbitacina B CS-51 e CS-52.....	96
Esquema 23: Obtenção do derivado com cetona α,β -insaturada no anel A, CS-54.....	98
Esquema 24: cucurbitacinas contendo diosfenol no anel A.....	100
Esquema 25: Clivagem da cadeia lateral de CS-57.....	102
Esquema 26: Desproteção de CS-58 com formação de CS-62.....	103
Esquema 27: Obtenção das hexanorcucurbitacina F (CS-63) e I (CS- 64).....	103
Esquema 28: Obtenção de di-hidrocurbitacina B (CN-1) através da hidrogenação de CN-7	105

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Citotoxicidade sobre células vero e potencial atividade anti-herpética de cucurbitacinas naturais e semissintéticas.....111
- Tabela 2:** Valores de CC_{50}^* de cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata* frente a cinco linhagens de células tumorais.....121
- Tabela 3:** Valores de CC_{50}^* de cucurbitacinas semissintéticas frente à linhagem de células tumorais A549.....123
- Tabela 4.** Modelo QSAR obtido e suas respectivas informações estatísticas.....128
- Tabela 5:** Viabilidade celular* valores de $CI_{50}^{\#}$ e CL_{50}^{\pm} de cucurbitacinas naturais e semissintéticas, em culturas de macrófagos (*J774*).....135
- Tabela 6:** Valores de RMN ^{13}C (500 MHz, $CDCl_3$) das cucurbitacinas naturais CN-1 – CN-3, CN-6 e CN-7.....142
- Tabela 7:** Valores de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) das cucurbitacinas naturais CN-1 – CN-3, CN-6 e CN-7.....143

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

- A549 – Linhagem celular de carcinoma de pulmão
Ac – acetila
Bz – benzofila
Calc. – calculado
CC – coluna cromatográfica
CC₅₀ - concentração citotóxica para 50% das células em cultura
CCD – cromatografia em camada delgada
CDI - 1,1'-carbonildiimidazol
CI₅₀ - Concentração inibitória de 50%
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
CMC – carboximetilcelulose
CN – cucurbitacinas naturais
Col. – colaboradores
CS – cucurbitacinas sintéticas
d – duplete
DABCO – 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano
DBU – 1,8-diazabicycloundec-7-eno
DCM – diclorometano
dd – duplo duplete
ddd – duplo duplete de duplete
DMAP – dimetilaminopiridina
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF – dimetilformamida
DMSO – dimetilsulfóxido
DOX - doxorubicina
ECP – efeito citopático viral
Eq. – equivalente
ESI-TOF-MS – espectrometria de massas por *electrospray ionization time-of-flight*
FE – fase estacionária
FM – fase móvel
Gli – glicose
HCT-8 -1 celular de adenocarcinoma ileocecal
HRMS – espectrometria de massas de alta resolução
IBX – ácido iodoxibenzóico
IC₅₀ - Concentração inibitória de 50%
IL – interleucina
i.p. - intraperitoneal
IS – índice de seletividade

IV – espectroscopia no infravermelho
J774 - linhagem celular de macrófagos murinos
KB - linhagem celular de carcinoma nasofaríngeo
LPS - lipopolissacarídeo
m - múltiplo
m-CPBA – ácido meta-cloroperbenzóico
Me – metila
MEM – *Minimum Essential Medium*
MW – micro-ondas
N2A - linhagem celular de neuroblastoma murino
NO – óxido nítrico
PACLI - paclitaxel
PBS – solução tampão fosfato
PCC – clorocromato de piridínio
PGs - prostaglandinas
Ph – fenila
p.f. – ponto de fusão
ppm – partes por milhão
PSA – penicilina + estreptomicina + anfotericina
Py – piridina
RD - linhagem celular de rabiomiocarcinoma
Rend. – rendimento
RMN ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*
s – simples
SAR – relação estrutura atividade
SBF – soro bovino fetal
sbposto – sobreposto
sl – simples largo
SN – substituição nucleofílica
t – triplo
t.a. – temperatura ambiente
TCDI - 1,1'-tiocarbonildiimidazol
TFAA – anidrido trifluoro acético
THF – tetrahidrofurano
TMS – tetrametilsilano
Tosila – *p*-toluenossulfonila
UFC - unidade formadora de colônia
UFP – unidades formadoras de placa
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. A QUÍMICA MEDICINAL E O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS	30
1.2. CUCURBITACINAS.....	32
1.2.1. Variações do anel A de cucurbitacinas.....	34
1.2.2. Variações da cadeia lateral de cucurbitacinas	36
1.2.3. Toxicidade.....	37
1.2.4. Derivados semissintéticos	38
1.3. <i>Wilbrandia ebracteata</i> Cogn	40
1.3.1. Constituintes químicos	41
1.4. <i>Luffa operculata</i> (L.) Cogn.....	42
1.4.1. Constituintes químicos	43
2. JUSTIFICATIVA.....	45
3. OBJETIVOS.....	48
3.1. OBJETIVO GERAL	49
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	51
4.2. ISOLAMENTO DE CUCURBITACINAS.....	51
4.2.1. A partir de <i>W. ebracteata</i>	51
4.2.2. A partir de <i>L. operculata</i>	60
4.3. SÍNTESE DE DERIVADOS DE CUCURBITACINAS..	63
4.3.1. Considerações Iniciais.....	63
4.3.2. Reações de oxidação e redução	63
4.3.3. Obtenção de ésteres.....	73
4.3.4. Obtenção de derivados via substituição nucleofílica....	85

4.3.5.	Obtenção de derivados via desoxigenação ou desidratação	93
4.3.6.	Obtenção de derivados com cetona α,β -insaturada nos anéis A e B.....	97
4.3.7.	Obtenção semissintética de cucurbitacinas naturais...	100
4.4.	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	106
4.4.1.	Atividade anti-herpética.....	106
4.4.2.	Atividade citotóxica.....	113
4.4.3.	Atividade anti-inflamatória	130
5.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	137
5.1.	TÉCNICAS GERAIS.....	138
5.1.1.	Instrumentação.....	138
5.1.2.	Técnicas cromatográficas.....	138
5.1.3.	Solventes e reagentes	139
5.2.	ISOLAMENTO DAS CUCURBITACINAS CN-1 – CN-7.....	139
5.2.1.	Preparação dos extratos.....	139
5.2.2.	Isolamento de cucurbitacinas.....	140
5.2.3.	Identificação das cucurbitacinas CN-1 – CN-7	141
5.3.	PROCEDIMENTOS PARA SEMISSÍNTESE DE CUCURBITACINAS	146
5.3.1.	Preparação de CS-8.....	146
5.3.2.	Preparação de CS-9 e CS-10	147
5.3.3.	Preparação de CS-11.....	149
5.3.4.	Preparação de CS-13.....	150
5.3.5.	Procedimento geral para obtenção dos ésteres CS-14 – CS-19.....	151
5.3.6.	Preparação de CS-20 e CS-21	155
5.3.7.	Preparação de CS-22 e CS-23	158
5.3.8.	Preparação de CS-24 e CS-25	159
5.3.9.	Preparação de CS-26, CS-27 e CS-28	161
5.3.10.	Preparação de CS-29, CS-30 e CS-31	164

5.3.11.	Preparação de CS-32	167
5.3.12.	Preparação de CS-33 e CS-34	168
5.3.13.	Preparação de CS-35 e CS-36	170
5.3.14.	Preparação de CS-37 , CS-38 e CS-39	171
5.3.15.	Preparação de CS-40 , CS-41 , CS-42	174
5.3.16.	Preparação de CS-43 , CS-44 e CS-45	177
5.3.17.	Preparação de CS-46 e CS-47	179
5.3.18.	Preparação de CS-48 e CS-49	181
5.3.19.	Preparação de CS-50	182
5.3.20.	Preparação de CS-51	183
5.3.21.	Preparação de CS-52	184
5.3.22.	Preparação de CS-53	185
5.3.23.	Preparação de CS-54	186
5.3.24.	Preparação de CS-55	187
5.3.25.	Procedimento geral para obtenção dos diosfenóis.....	188
5.3.26.	Preparação de CS-57	189
5.3.27.	Preparação de CS-58	190
5.3.28.	Preparação de CS-59	191
5.3.29.	Preparação de CS-60 e CS-61	192
5.3.30.	Preparação de CS-62	194
5.3.31.	Preparação de CS-63 e CS-64	195
5.4.	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE CUCURBITACINAS NATURAIS E SEMISSINTÉTICAS	197
5.4.1.	Atividade anti-herpética	197
5.4.2.	Atividade citotóxica	202
5.4.3.	Atividade anti-inflamatória	203
6.	CONCLUSÕES	205
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	209
	ANEXO 1- RESUMO DAS ESTRUTURAS	235
	ANEXO 2- ESPECTROS DE RMN ¹H E ¹³C	245

ANEXO 3- ESPECTROS BIDIMENSIONAIS.....	292
ANEXO 4- TRABALHOS PUBLICADOS E APRESENTADOS EM CONGRESSOS	302

APRESENTAÇÃO

Para facilitar a leitura e compreensão deste material, esta tese foi organizada da seguinte forma:

- 1) Inicialmente, apresenta-se uma breve introdução do tema, abordando química medicinal e a desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais, as características estruturais de cucurbitacinas, e as espécies vegetais utilizadas para obtenção dos precursores semissintéticos;
- 2) Em seguida, são apresentados justificativa e objetivos (geral e específicos) do trabalho;
- 3) Na continuidade, são apresentados os resultados e discussão divididos em três partes: Na primeira, relativa à obtenção dos precursores e ao isolamento de novas cucurbitacinas de *W. ebracteata* e *L. operculata*, apresenta-se a discussão dos resultados do isolamento e elucidação estrutural; Na segunda parte, relativa à síntese e caracterização de derivados, apresenta-se a discussão dos resultados da semissíntese de cucurbitacinas; Na terceira parte, expõe-se a atuação dos compostos naturais e semissintéticos sobre os sistemas biológicos, envolvendo herpes, câncer e inflamação. Esta terceira parte é subdividida em subitens referentes a cada atividade biológica investigada, com uma introdução para atualização sobre o tema, seguida dos resultados biológicos obtidos nesta pesquisa, bem como as discussões de relação estrutura-atividade;
- 4) Na sequência, apresenta-se a seção experimental, dividida em duas subseções. Na primeira estão descritas as metodologias de isolamento dos precursores, de síntese dos intermediários e dos produtos finais, enquanto na segunda apresenta-se a descrição das metodologias dos testes biológicos realizados;
- 5) Finalmente, relacionam-se as conclusões e as referências;
- 6) Nos anexos, disponibilizam-se:
 - i) o resumo das estruturas;
 - ii) os espectros de RMN ^1H e ^{13}C ;
 - iii) os espectros de correlação mononucleares (COSY e NOESY) e heteronucleares (HMBC e HMQC); e
 - iv) os trabalhos científicos publicados e a relação dos apresentados em congressos.
 - iv) os trabalhos científicos publicados e a relação dos apresentados em congressos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A QUÍMICA MEDICINAL E O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS

A química medicinal é conceituada como uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (WERMUTH et al., 1998). Dessa forma, a química medicinal é considerada uma ciência tipicamente interdisciplinar, transitando entre as subáreas da química e das ciências biológicas. A aproximação destas duas grandes áreas do conhecimento propiciou as condições necessárias e essenciais à interação entre químicos medicinais e farmacologistas, conduzindo, dessa forma, à descoberta de novos fármacos, inovações terapêuticas autênticas e com padrões moleculares originais, atuando, em muitos casos, por mecanismos farmacológicos de ação inéditos (BARREIRO, 2009).

A descoberta de novos fármacos inclui três etapas importantes: i) *descobrimto* – que consiste na identificação e produção de novas substâncias ativas, originadas de produtos naturais, síntese orgânica ou de processos biotecnológicos; ii) *otimização* – que baseia-se nas modificações sintéticas das estruturas, no sentido de aumentar a potência, seletividade e conferir menor toxicidade; iii) *desenvolvimento* – que consiste na otimização das rotas sintéticas para a produção em larga escala e a modificação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da substância ativa para uso clínico (WERMUTH, 2008).

A utilização de produtos naturais ativos como matéria-prima, modelo ou molécula-protótipo para a síntese de análogos mais potentes e seletivos tem contribuído significativamente para a obtenção de novos agentes terapêuticos. Muitos fármacos disponíveis atualmente no mercado farmacêutico foram obtidos sinteticamente baseados em estruturas ativas de fontes naturais. Como exemplo (Figura 1), podem ser citados fármacos como o captopril (**2**, Capoten®), obtido a partir da simplificação molecular de um peptídeo (**1**) isolado do veneno de *Bothrops jararaca* ou ainda o aciclovir (**4**, Zovirax®), um derivado

purínico sintético, obtido por simplificação molecular da guanosina (**3**) (BARREIRO, 2002).

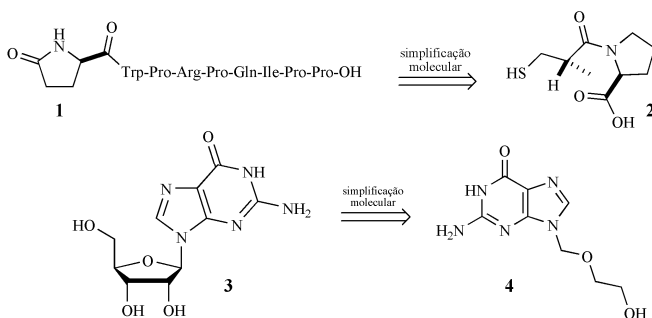


Figura 1: Fármacos obtidos a partir de produtos naturais.

Diversas estratégias da química medicinal podem ser empregadas no desenho molecular de novos candidatos a agentes terapêuticos. Além disso, estas estratégias são cruciais na etapa de modificação molecular necessária à sua otimização, reduzindo efeitos adversos e aumentando sua potência, por exemplo. Dentre muitas se destacam a variação de grupos funcionais e a simplificação molecular (BARREIRO, 2002).

A variação de grupos funcionais é uma estratégia interessante quando se inicia o estudo de relação estrutura atividade (SAR) de um composto. Nesse caso, obtêm-se derivados através de modificações mínimas na estrutura do precursor, como hidrogenações, metilações, acetilações, modificação de substituintes e isosterismo. Apesar de simples na maioria das vezes, mudanças pequenas poderão produzir alterações expressivas na atividade de um determinado protótipo (WERMUTH, 2008).

A simplificação molecular foi inicialmente empregada na obtenção de compostos estruturalmente mais simples, a partir de protótipos naturais ativos, estruturalmente complexos. Esta estratégia de planejamento foi inicialmente empregada sem o prévio conhecimento das diferentes contribuições farmacofóricas das distintas subunidades estruturais do protótipo, geralmente de origem natural. Atualmente, os avanços observados no estudo da relação entre a estrutura química e a atividade permitiram que esta estratégia passasse a ser empregada de forma racional, preservando as subunidades farmacofóricas, previamente identificadas no composto-protótipo eleito, natural ou sintético (BARREIRO, 2002).

Produtos naturais são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012, BUTLER, 2008). A singularidade dos metabólitos secundários encontrados na natureza ocupa um espaço químico diferenciado e por vezes difícil de ser alcançado através da síntese pura, representando uma ferramenta essencial na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e uma fonte constante de inspiração para os químicos nestes processos (NICOLAOU; CHEN; DALBY, 2009).

1.2. CUCURBITACINAS

Inicialmente consideradas os princípios tóxicos da família Cucurbitaceae, as cucurbitacinas estão presentes em algumas espécies utilizadas na medicina popular brasileira como a “buchinha” (*Luffa operculata*) (MATOS; GOTTLIEB, 1960, KAWAHARA et al., 2001) “taiuiá” (*Wilbrandia ebracteata* e/ou *Cayaponia tayuya*) (SCHENKEL et al, 1992, FARIAS et al 1993) e “nhandiroba” (*Fevillea trilobata*) (VALENTE et al., 1993, VALENTE et al., 1994).

Cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos altamente oxigenados, com o esqueleto biogeneticamente incomum 19(10→9β)-abeo-10α-lanostenos (cucurbitano, Figura 2), que pode ser encontrado livre ou glicosilado (LAVIE; GLOTTER, 1971). As primeiras agliconas isoladas com esqueleto cucurbitano receberam como nome a palavra cucurbitacina seguida de uma letra, de acordo com a cronologia do isolamento/elucidação estrutural. No entanto, isso não se constituiu numa regra geral, encontrando-se atualmente diversos nomes para essas substâncias (VALENTE, 2004).

Embora encontradas predominantemente em espécies da família Cucurbitaceae, esses compostos já foram também identificados em representantes das famílias Begoniaceae, Cruciferae, Datisceae, Desfontainaceae, Elaeocarpaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae e Sterculiaceae (DINAN; HARMATHA; LAFONT, 2001), podendo ser encontradas em diversas partes dessas plantas. Em *Cayaponia tayuya* (HIMENO et al., 1992), *Wilbrandia ebracteata* (SCHENKEL et al, 1992), *Bryonia alba* e *Bryonia dioica* (UKIYA et al., 2002), por exemplo, esses compostos concentram-se majoritariamente em partes subterrâneas, como raízes e

rizomas. Já em espécies como *Cucurbita andreata* (JAYAPRAKASAM; SEERAM; NAIR, 2003), *Trichosanthes tricuspidata* (KANCHANAPOOM; KASAI; YAMASAKI, 2002), *Citrullus colocynthis*, *Luffa operculata* e *Ecballium elaterium* (BAUER; WAGNER, 1983), os frutos são a principal fonte de cucurbitacinas. Em outras plantas como *Iberis amara*, esses compostos são encontrados majoritariamente nas sementes, enquanto que em espécies como *Kageneckia oblonga* (DELPORTE et al., 2002) e *Gratiola officinalis* (BAUER; WAGNER, 1983) cucurbitacinas podem ser obtidas das folhas.

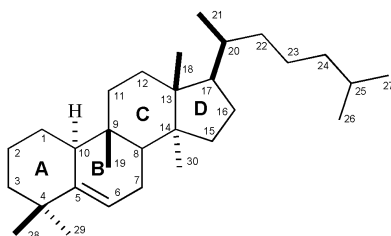


Figura 2: Esqueleto cucurbitano [19-(10→9β)-abeo-10α-lanostenol]

A grande variedade estrutural encontrada em cucurbitacinas, decorrente de diferentes padrões de oxigenação, posição de insaturações e fatores estereoquímicos, deu origem a ampla gama de compostos conhecidos atualmente, porém com algumas características em comum. Grande parte das cucurbitacinas descritas até o momento possui insaturação entre C-5 - C-6 e muitas delas possuem dupla ligação entre C-1 - C-2 e/ou em C-23 - C-24. Frequentemente, diversos carbonos do esqueleto cucurbitano possuem substituintes oxigenados, gerando compostos com variados padrões de oxidação. Hidroxilas estão presentes normalmente em C-16 (α), C-20 (β) e C-25, enquanto os carbonos 11 e 22 são tipicamente carbonílicos. Adicionalmente, C-2 e C-3 podem estar substituídos por um grupo hidroxila ou carbonila. Outras substituições típicas incluem hidroxilas em C-24 e raramente em C-9 e acetilação da hidroxila em C-25 (RÍOS et al., 2005).

Todo o histórico da elucidação estrutural das cucurbitacinas até 1970, incluindo a determinação da estereoquímica dos centros quirais de seu esqueleto, foi detalhadamente revisto por Lavie e Glotter (1971). Os trabalhos descritos basearam-se principalmente em transformações químicas, análises de Dispersão Óptica Rotatória e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) de vários derivados em

comparação com modelos. Com a evolução das técnicas de separação e elucidação estrutural, várias estruturas foram sendo isoladas e identificadas com precisão, através da utilização de métodos como RMN ^{13}C e ^1H (VELDE; LAVIE, 1983, SASAMORI et al., 1983, CHE et al., 1985) e espectrometria de massas (AUDIER; DAS, 1966, KUPCHAN et al., 1970), inclusive de alta resolução (JOHNSON et al., 1991).

Mais recentemente, com as modernas técnicas de RMN bidimensional, difração de raios-X (OKABE et al., 1980, NES et al., 1991) e técnicas hifenadas (STURM; STUPPNER, 2000), está sendo possível ampliar cada vez mais o universo estrutural das cucurbitacinas, detectando estruturas mais complexas mesmo quando minoritárias. O conhecimento acumulado até o momento tem mostrado que as principais características estruturais de diferenciação das cucurbitacinas estão localizadas no anel A e na cadeia lateral (VALENTE, 2004, CHEN et al., 2005, RÍOS et al., 2005).

1.2.1. VARIAÇÕES DO ANEL A DE CUCURBITACINAS

Até o momento são descritas para cucurbitacinas doze variações estruturais no anel A (Figura 3) que podem ser agrupadas em oito sistemas básicos. Os sistemas 12 (tipo diosfenol) e 13 (tipo α -cetol) foram os primeiros a serem descritos (LAVIE; GLOTTER, 1971), e foi através da observação de que o próton olefínico (H-1) do sistema 12 apresentava-se como um duplete em $\delta = 5,97$ ($J = \sim 3\text{Hz}$) no RMN ^1H , que se confirmou a presença de um hidrogênio em C-10, surgindo assim uma das primeiras evidências do esqueleto lanostano rearranjado das cucurbitacinas.

Ainda relacionadas às variações no anel A, são denominadas *isocucurbitacinas* aquelas que possuem o sistema 14a (α -cetol, com 3α -OH em posição equatorial) e *epi-isocucurbitacinas* as do sistema 14b (α -cetol, com 3β -OH em posição axial). No sistema 2,3-di-hidroxi, as variações 15b ($2\beta,3\alpha$ com ambas hidroxilas em posição equatorial) e 15c [2β (equatorial), 3β (axial)] são as de maior ocorrência (VALENTE, 2004). A determinação da configuração relativa desses centros é geralmente assinalada por RMN, principalmente através da observação da constante de acoplamento entre H-2 e H-3 (STUPPNER, 1990; SCHENKEL et al., 1992).

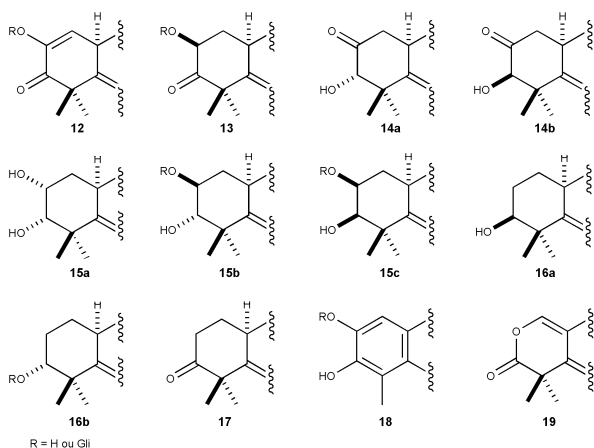


Figura 3: Principais variações no anel A encontradas em cucurbitacinas

Cucurbitacinas contendo no anel A somente uma hidroxila em C-3 (sistemas 16a e 16b) são geralmente encontradas na natureza na forma de glicosídeos e podem apresentar um esqueleto menos oxigenado que as outras cucurbitacinas. A orientação da hidroxila em C-3 é de um modo geral β (axial), entretanto foram isoladas algumas cucurbitacinas glicosiladas com o substituinte em C-3 (OGli) com posição α (ACHENBACH et al., 1993, HUANG et al., 1998). Podem ser encontradas ainda variações onde a posição 3 apresenta-se oxidada, como é o caso do sistema 17 (RODRIGUEZ et al., 2003).

São denominadas *norcucurbitacinas* as que possuem o anel A aromatizado, com perda de um dos grupos metila geminais ligados a C-4 (sistema 18). Essas substâncias são em sua grande maioria glicosiladas em C-2 e foram isoladas, em sua grande maioria, de espécies latino-americanas da família Cucurbitaceae (FARIAS et al., 1993, VALENTE et al., 1993; 1994, ACHENBACH et al., 1993, PAGOTTO; KAPLAN; GOTTLIEB, 1996).

Cucurbitacinas com o anel A rearranjado, com a perda de um átomo de carbono e formação de um anel δ -lactona C-1/C-3 (sistema 19) são denominadas *neocucurbitacinas*, sendo a variação de anel mais recentemente descrita para a classe (KAWAHARA et al., 2001).

1.2.2. VARIAÇÕES DA CADEIA LATERAL DE CUCURBITACINAS

Podem ser encontradas diversas variações na cadeia lateral de cucurbitacinas, sendo que as primeiras estruturas a serem identificadas e de ocorrência majoritária até hoje, foram aquelas com cadeia lateral acíclica e grupamento α -cetol, com hidroxila em C-20 e carbonila em C-22, com ou sem insaturação em C-23 (Figura 4, sistema 20). Outras variações incluem cucurbitacinas com cadeia lateral acíclica não-oxigenada (sistema 21) (FUJIMOTO et al., 1987, AKIHISA et al., 1994), di-hidroxilada (sistema 22) (STUPPNER, 1990), tri-hidroxilada (sistema 23) (ACHENBACH et al., 1993) até tetra-oxigenadas (sistemas 24 e 25) (KANCHANAPOOM et al., 2002), além de uma nova variação (sistema 26) observada em uma cucurbitacina isolada de *W. ebracteata* (LANG et al., 2011). São descritas também cadeias laterais ciclizadas, que resultam de reações intramoleculares entre diferentes átomos de carbono e de oxigênio presentes no anel D (sistemas 27 e 28) (JOHNSON et al., 1989, STUPPNER; MÜLLER; WAGNER, 1991, HUANG et al., 1998) ou na cadeia lateral (sistemas 29, 30 e 31) (HYLANDS; KOSUGI, 1982, SCHENKEL et al., 1992, CHEN et al., 2009).

Mesmo com o avanço das técnicas de elucidação estrutural, a determinação da configuração absoluta dos centros quirais presentes nas cadeias laterais de algumas cucurbitacinas ainda permanece um desafio. Okabe e col. (1980), Achenbach e col. (1993) e Lang e col. (2011), através da obtenção de derivados conseguiram definir a estereoquímica desses centros nos sistemas 22, 23 e 25. No sistema 24, a estereoquímica de C-24 ainda permanece indeterminada (FARIAS et al., 1993).

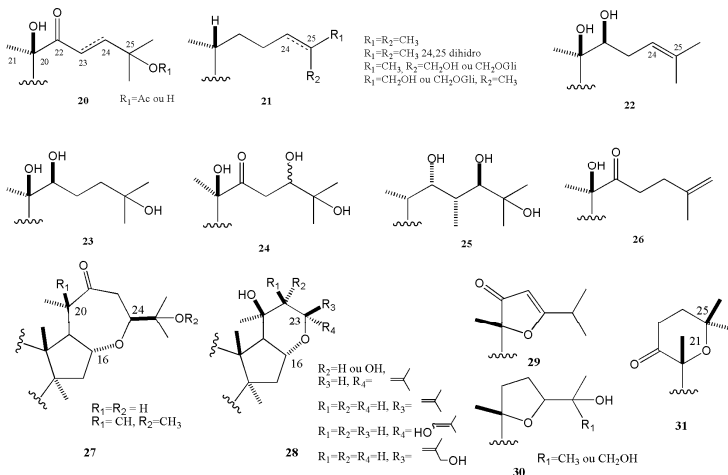


Figura 4: Principais variações de cadeia lateral encontradas em cucurbitacinas.

Também já foram descritas algumas cucurbitacinas com perda parcial da cadeia lateral (Figura 5), como as *hexanor* (**32**) (STUPPNER et al., 1990, KANCHANAPOOM et al., 2002) e *heptanorcucurbitacinas* (**33**) (VALENTE et al., 1993), com manutenção de C-20 e C-21, ou ainda perda total da cadeia lateral, denominadas *octanorcucurbitacinas* (**34**) (KANCHANAPOOM et al., 2002).

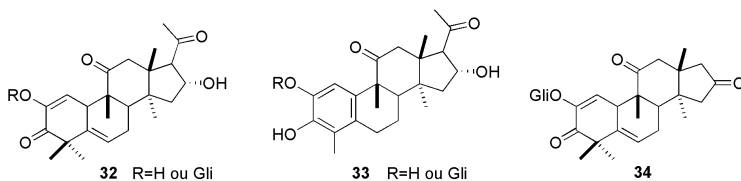


Figura 5: Estrutura de hexanor (**32**), heptanor (**33**) e octanorcucurbitacinas (**34**).

1.2.3. TOXICIDADE

Plantas contendo cucurbitacinas despertaram interesse inicialmente devido a preocupação com sua possível toxicidade. Em Israel, foram relatados casos de intoxicação por suco do fruto de

Ecbalium elaterium (pepino-de-São-Gregório), uma planta cujo componente principal é a cucurbitacina B e cujo uso popular é semelhante ao de *L. operculata*, para tratamento de sinusite e doenças hepáticas. Observou-se que a exposição ao suco, especialmente se concentrado, pode causar irritação de membranas mucosas, supostamente de origem inflamatória (RAIKHLIN-EISENKRAFT; BENTUR, 2000). Anteriormente, Vlachos e Kanitsakis (1994) já haviam relatado caso de morte por insuficiência cardíaca e renal de usuário do suco de *E. elaterium* em aspirações nasais no tratamento de sinusite crônica.

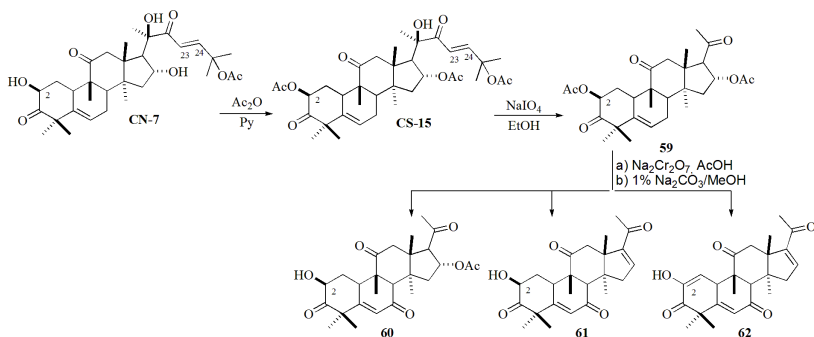
Alguns estudos com diferentes cucurbitacinas, obtidas de fontes naturais, parecem indicar que a cadeia lateral é essencial para a toxicidade desses compostos, enquanto que substituições no anel A parecem não afetar a toxicidade. Musza e col. (1994) observaram que os di-hidro derivados da cucurbitacina I (cucurbitacina L) e da cucurbitacina D (cucurbitacina R) são significativamente menos tóxicos que seus análogos que possuem uma cetona α,β -insaturada na cadeia lateral. Além disso, observou-se que a presença de uma acetila na cadeia lateral (C-25), é responsável por um aumento da toxicidade de cucurbitacinas (MUSZA et al., 1994, RECIO et al., 2004). Esses mesmos dados foram observados em um estudo sobre relações entre a estrutura química e a atividade de cucurbitacinas, no que diz respeito à atividade citotóxica *in vitro* e à toxicidade em animais a partir de dados já descritos na literatura (VAN DANG; RODE; STUPPNER, 1994). Embora o número de compostos estudados e a variabilidade estrutural dos mesmos tenham sido limitados, os dados existentes também sugeriram a relação entre a presença de carbonila α,β -insaturada na cadeia lateral e a presença de acetila em C-25 com a toxicidade destes compostos.

1.2.4. DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS

Na literatura são encontrados poucos relatos de semissíntese de derivados triterpênicos, sendo que a maioria se refere à obtenção de derivados dos ácidos betulínico, ursólico e oleanólico. Em relação às cucurbitacinas, grande parte dos trabalhos de modificações estruturais é referente a estudos de comprovação de características estruturais, realizados na década de 1950 e 1960 (LAVIE; WILLNER, 1960,

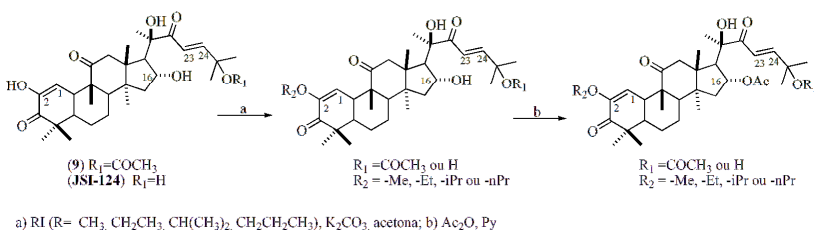
SCHLEGEL; MELERA; NOLLER, 1960, LAVIE et al., 1961, LAVIE; GLOTTER, 1971, LAVIE; SHVO; WILLNER, 1958).

Na década de 1990, Ryu e col. (1995) descreveram a preparação de análogos de hexanorcucurbitacinas utilizando reações clássicas de proteção/desproteção/oxidação (Esquema 1).



Esquema 1: Obtenção de análogos de hexanorcucurbitacina descrita por Ryu e col. (1995).

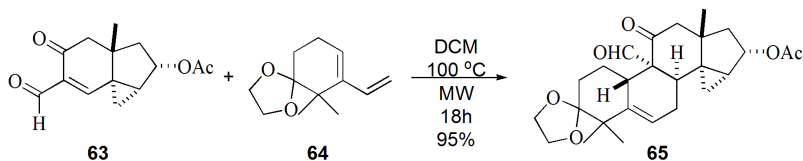
Mais recentemente, Bartalis e Halaweish (2005), obtiveram através de reações de alquilação e acetilação, derivados das cucurbitacinas E (**9**) e I (**JSI-124**) (Esquema 2) com a finalidade de avaliar a influência da hidrofobicidade dos compostos sintetizados, juntamente com cucurbitacinas isoladas de fontes naturais, na citotoxicidade frente a uma linhagem de células tumorais (HepG2). Dentre os compostos avaliados, foi possível observar que o aumento da lipofilia, calculada através do Log P, apresenta uma forte correlação com o aumento da citotoxicidade sobre as células tumorais.



Esquema 2: Obtenção de derivados das cucurbitacina E (**9**) e I (**JSI-124**) descrita por Bartalis e Halaweish (2005).

Desde 2006 são publicadas comunicações em congressos da Sociedade Americana de Química, a respeito da obtenção de derivados semissintéticos de cucurbitacinas com atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais. Os resumos relatam a obtenção de diversos análogos, estudos de QSAR e de Docking, porém não apresentam as metodologias utilizadas e tampouco os derivados obtidos (YOUNG; HALAWEISH, 2006, YOUNG; HALAWEISH, 2007b; a, RICE et al., 2008, YOUNG; HALAWEISH, 2008, FAHEY; YOUNG; HALAWEISH, 2009).

Recentemente, Jung e Lui (2010) descreveram a síntese de um diastereoisômero do núcleo cucurbitano, epimérico em C-8, C-9 e C-10 (**65**), obtido por uma sequência de reações de conjugação, redução e condensação aldólica, em um total de 16 etapas de reação, através de uma rota sintética que envolve conjugação de Diels-Alder entre um dieno derivado de 2,2-dimetil-1,5-ciclo-hexanona (**64**) e um dienófilo (**63**) (Esquema 3).



Esquema 3: Síntese de um epímero do núcleo cucurbitano descrita por Jung e Lui (2010).

1.3. *Wilbrandia ebracteata* Cogn.

O gênero *Wilbrandia*, família Cucurbitaceae, é composto por espécies tropicais e subtropicais, próprias da América do Sul. Muito provavelmente, o centro de origem deste grupo compreende os estados de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro, no entanto, a sua distribuição vai do Rio Grande do Sul até o Espírito Santo (PORTO, 1974, MATOS, 1979). O gênero possui cinco espécies (CROVETTO, 1960), porém na literatura são encontrados dados apenas sobre *W. ebracteata* Cogn. e *W. verticillata* Cogn.

Wilbrandia ebracteata Cogn. (Figura 6) é uma das várias espécies de Cucurbitáceas conhecidas popularmente como “taiuiá”. A planta é empregada (como falsificação ou por equívoco), como insumo

farmacêutico, ao invés de *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn., a espécie descrita na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (FARIAS, 1986).

Espécies conhecidas como taiuiá são empregadas na medicina popular para o tratamento das mais diversas enfermidades. Em *W. ebracteata*, a parte utilizada é a raiz, empregada na medicina popular no tratamento de prisão de ventre, dermatoses, amenorréia, úlcera gástrica aguda e doenças reumáticas (PIO CORRÊA, 1978).



Figura 6: Exemplar da espécie *W. ebracteata* Cogn. Foto: Andressa C. Gazola

1.3.1. CONSTITUENTES QUÍMICOS

Para *W. ebracteata* é descrita a presença majoritária de duas classes de metabólitos secundários: flavonoides e cucurbitacinas. O foco deste trabalho é as cucurbitacinas, por isso a abordagem será restrita a essa classe de compostos.

As cucurbitacinas são encontradas predominantemente nas raízes de *W. ebracteata*, para as quais já foi descrito um grande número de compostos dessa classe (Figura 7) (SCHENKEL et al., 1992, FARIAS et al., 1993), sendo majoritária a presença de di-hidrocurbitacina B (~45%) (KREPSKY et al., 2009) e cucurbitacina R (GUIMARÃES, 2010).

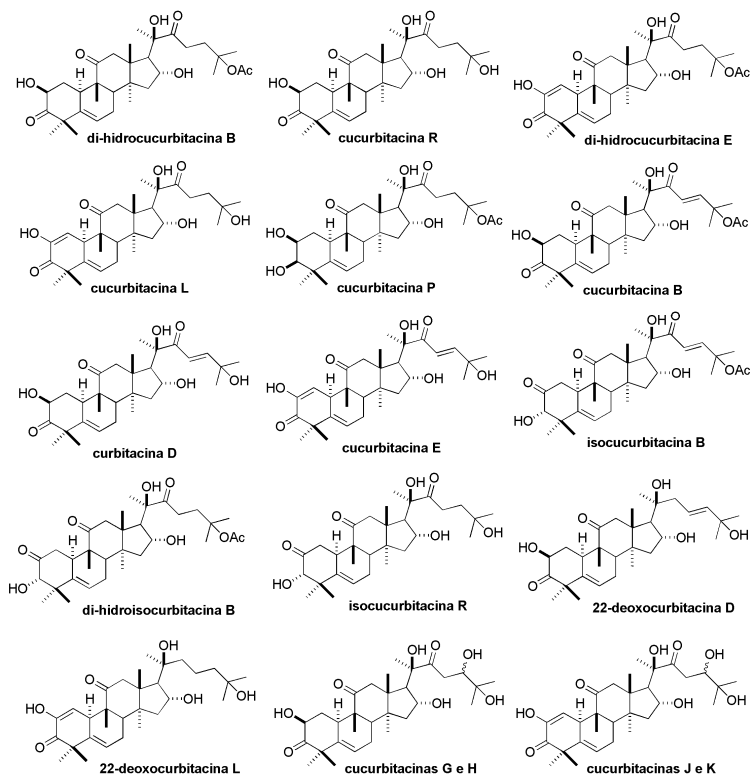


Figura 7: Estrutura das principais cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata* Cogn. (SCHENKEL et al., 1992; FARIAS et al., 1993).

1.4. *Luffa operculata* (L.) Cogn.

O gênero *Luffa*, família Cucurbitaceae, possui sete espécies conhecidas, sendo quatro delas originárias do Velho Mundo (*L. echinata*, *L. acutangula*, *L. aegyptiaca* e *L. graveolens*) e três com origem no Novo Mundo (*L. operculata*, *L. quinquefida* e *L. astorii*) (DUTT; ROY, 1990).

Luffa operculata (L.) Cogn. é originária da América tropical e cultivada principalmente no norte e nordeste do Brasil. A planta é conhecida popularmente como buchinha, cabacinha, purga-de-jalapa e purga-dos-paulistas, entre outros nomes (MATOS, 1979, OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991, JOLY, 1998, SIMÕES, 2000, MILIJKOVIC,

2010) A parte da planta utilizada é o fruto (Figura 8), empregado na medicina tradicional principalmente como purgativo, emenagogo e descongestionante nasal (VASQUES et al., 1982, LORENZI; MATOS, 2002).



Figura 8: Frutos de *L. operculata*. Fonte: (MENON-MIYAKE et al., 2005).

Os frutos de *L. operculata* também são utilizados na medicina popular como abortivos, estando entre as dez plantas mais utilizadas para essa finalidade no Brasil (MENGUE et al., 1997).

Em livro a respeito do uso de plantas medicinais empregadas na região nordeste do Brasil, Matos (2000) cita a espécie *L. operculata* como responsável por intoxicações graves, cujos sintomas incluem diarreia, vômitos, prostração, bradicardia, hipotensão, no caso de uso oral, e hemorragia nasal nos casos de tratamento local. O autor relaciona a toxicidade com a presença de saponinas e cucurbitacinas, referindo-se a estas substâncias como pró-inflamatórias.

1.4.1. CONSTITUENTES QUÍMICOS

Para *L. operculata* é descrita a presença de triterpenos, saponinas e principalmente, cucurbitacinas, sendo as últimas associadas ao amargor e aos efeitos tóxicos dos frutos.

A composição química dos frutos de *L. operculata* começou a ser estudada na década de 1960, quando Matos e Gottlieb descrevem a presença de isocucurbitacina B no extrato clorofórmio da planta (MATOS; GOTTLIEB, 1960). Também é relatada a presença de glicosídeos de triterpenos do tipo damarano, denominados luperosídeos A – H (KUSUMOTO et al., 1989) e saponinas com esqueleto do tipo oleanano, denominadas luperosídeos I – L (OKABE et al., 1989).

Em relação às cucurbitacinas, para os frutos de *L. operculata*, além da isocucurbitacina B (5) é descrita a presença de cucurbitacina B

(CN-7), cucurbitacina D (6) e seus 2-O-glicosídeos (7 e 8, respectivamente) (BAUER; TITTEL, 1996, KAWAHARA et al., 2004), cucurbitacina E (9) e das neocucurbitacinas A (10) e B (11). As estruturas dos compostos são apresentadas na Figura 9 (KAWAHARA et al., 2001).

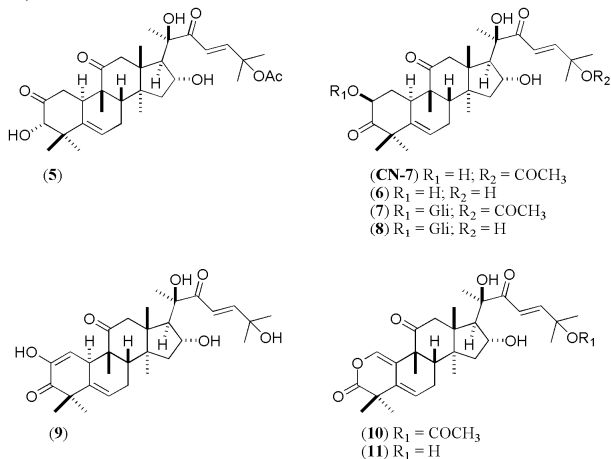


Figura 9: Estrutura das principais cucurbitacinas isoladas de *L. operculata*.

2. JUSTIFICATIVA

Há muito tempo compostos obtidos de fontes naturais têm sido utilizados como modelos para a síntese e semissíntese de novos compostos bioativos e são inúmeros os exemplos de fármacos de alguma forma baseados em produtos naturais. Certamente a terapêutica moderna, composta por um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual não fosse o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas superiores. Uma revisão recente publicada por Newman e Cragg (2012), estima que grande parte dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna, entre os anos de 1981 e 2010, foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de fontes naturais, sendo que cerca de 39% possui uma estreita ligação com produtos naturais, tendo sido descobertos diretamente ou obtidos por semissíntese.

A busca por fármacos mais eficientes para o tratamento de patologias como o câncer e para contornar a resistência de diversos micro-organismos aos antimicrobianos existentes tem motivado a pesquisa envolvendo novas substâncias oriundas de fontes naturais. Das plantas, como exposto anteriormente, já foram isolados muitos compostos utilizados na medicina para a cura de várias enfermidades, sendo esta considerada uma fonte inesgotável de compostos com características estruturais únicas.

O interesse na obtenção de derivados de cucurbitacinas deve-se ao fato de que esses compostos, quando anteriormente investigados nesta Universidade (PETERS; FARIAS; RIBEIRO-DO-VALLE, 1997, PETERS et al., 1999, PETERS et al., 2003, SIQUEIRA et al., 2007, SIQUEIRA et al., 2009) apresentaram marcante atividade antitumoral e anti-inflamatória e em doses reduzidas, como descrito nos itens 4.4.2 e 4.4.3. Adicionalmente, cucurbitacinas isoladas de produtos naturais vem sendo também estudadas por diversos outros grupos de pesquisa, onde se destacam as mesmas atividades, inclusive em estudos *in vivo*.

Cabe aqui salientar o importante rendimento obtido a partir das raízes de *W. ebracteata*, o que viabiliza a utilização das cucurbitacinas isoladas como precursoras para a obtenção de derivados. O material coletado inicialmente, em 1987, forneceu cerca de 70 kg, o que corresponde a aproximadamente 1/3 das raízes de um exemplar¹. O extrato DCM apresenta um rendimento aproximado de 2% a partir do material vegetal, e é composto majoritariamente por cucurbitacinas, tendo sido descritos até o momento mais de 20 compostos desse grupo

¹ E. Schenkel, S.A.L. Bordignon, M.R. Farias, depoimento pessoal.

(Figura 7) (SCHENKEL et al, 1992; FARIAS et al, 1993), destacando-se a di-hidrocurbitacina B como principal componente (~45%), conforme doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (KREPSKY et al., 2009).

Apesar da promissora atividade apresentada em muitos modelos farmacológicos, algumas cucurbitacinas são descritas como compostos com elevada toxicidade, tendo sido este, durante muitos anos, um fator limitante para o seguimento de ensaios pré-clínicos. Nesse sentido, a obtenção de derivados é importante para que possam ser estabelecidas quais partes da molécula estão diretamente relacionadas à ação farmacológica e à ação tóxica, bem como a avaliação da possibilidade de reduzi-la a níveis toleráveis, possibilitando a continuidade dos estudos com essa classe de compostos.

Embora apresentem grande potencial como modelo para o desenvolvimento de fármacos, são relativamente raros os estudos visando à obtenção de derivados semissintéticos de cucurbitacinas. Como apresentado anteriormente, não existem estudos envolvendo a obtenção de derivados de cucurbitacinas em que as alterações tenham sido feitas no sentido de remover, modificar ou substituir grupos funcionais a fim de explorar a influência dessas alterações sobre sistemas biológicos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho compreende a complementação do estudo fitoquímico do extrato DCM de *Wilbrandia ebracteata*, bem como o isolamento dos constituintes majoritários deste e do extrato DCM de *Luffa operculata* para utilização como material de partida na obtenção de análogos de cucurbitacinas. Os derivados semissintéticos obtidos serão submetidos a avaliação de suas propriedades anti-herpética, citotóxica e anti-inflamatória a fim de, ao final, buscar estabelecer as bases para um estudo quantitativo de relação estrutura-atividade (QSAR).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Separar e identificar novas cucurbitacinas no extrato DCM de *W. ebracteata*;
- Isolar, a partir do extrato DCM de *W. ebracteata* e *L. operculata*, di-hidrocucurbitacina B, cucurbitacina R e cucurbitacina B, em quantidades adequadas para utilização como material de partida na síntese de derivados.
- Explorar a reatividade das diferentes funcionalidades presentes nas cucurbitacinas através de reações de proteção, desproteção, oxidação, redução, entre outras;
- Realizar modificações estruturais em cucurbitacinas, como desoxigenação, desidratação e simplificação molecular;
- Obter por via sintética cucurbitacinas minoritárias em Cucurbitáceas, possibilitando assim a avaliação de atividades biológicas desses compostos;
- Avaliar cucurbitacinas naturais e semissintéticas quanto à atividade anti-herpética;
- Avaliar cucurbitacinas naturais e semissintéticas quanto às atividades citotóxica e anti-inflamatória através da interação com grupos de pesquisa desta Universidade;
- Realizar um estudo de QSAR com os dados de atividade citotóxica através da colaboração com outros grupos de pesquisa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção serão inicialmente apresentadas a obtenção e a identificação estrutural de cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata* e *L. operculata*. Em seguida são apresentados e discutidos os resultados obtidos na síntese de derivados de três cucurbitacinas presentes em grande quantidade no extrato dessas duas plantas, bem como a avaliação das atividades anti-herpética, citotóxica e anti-inflamatória.

4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Raízes de *W. ebracteata* compradas da empresa Lohmann Ltda (Nova Petrópolis, RS) foram moídas e submetidas à maceração em DCM por 4 dias. A partir de 8 kg de raízes foram obtidos cerca de 160 g de extrato, representando um rendimento final de 2%.

Frutos de *L. operculata* foram adquiridos comercialmente, cortados com o auxílio de uma tesoura e submetidos à maceração em DCM por 7 dias. A partir de 2 kg de frutos foram obtidos 35,3 g de extrato, representando um rendimento final de 1,8%.

4.2. ISOLAMENTO DE CUCURBITACINAS

4.2.1. A PARTIR DE *W. ebracteata*

O extrato DCM de *W. ebracteata* foi inicialmente submetido a coluna cromatográfica a vácuo, seguido de colunas cromatográficas clássicas para isolamento de di-hidroocucurbitacina B (**CN-1**), di-hidroisocucurbitacina B (**CN-2**), cucurbitacina R (**CN-3**) e de três novas cucurbitacinas para a espécie [composto **CN-4**, composto **CN-5**, e isocucurbitacina R (**CN-6**)], como descrito na Figura 10.

A partir de 160 g de extrato DCM foi possível obter cerca de 32 g de **CN-1** (20%) e 30 g de **CN-3** (18,8%), utilizadas para obtenção de derivados semissintéticos. A união das frações F3 e F4 (9,2 g) permitiu o isolamento de 120 mg de **CN-2** (0,075%) e 72 mg de **CN-4** (0,045%). A partir da união das frações F5, F6 e F7 (68,2 g), além de **CN-1**, foram isolados 130 mg de **CN-5** (0,08%) e a união das frações F8 e F9 (53 g) possibilitou, além do isolamento de **CN-3**, a purificação de cerca de 100 mg (0,06%) de **CN-6**.

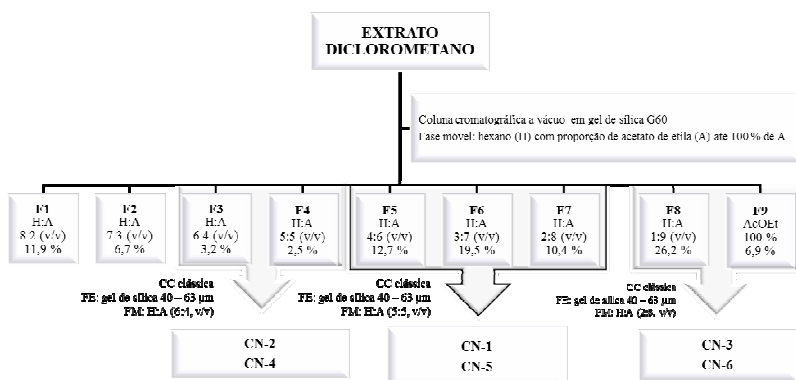


Figura 10: Fracionamento do extrato DCM de *W. ebracteata*.

A elucidação estrutural de todos os compostos isolados foi baseada em espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , correlações bidimensionais (COSY, HMBC, HSQC, NOESY), espectrometria de massas, infravermelho (IV) e, quando possível, confirmada através da comparação com dados disponíveis na literatura (FARIAS, 1991). Os dados completos de RMN ^1H e ^{13}C podem ser visualizados no item 5.2.3.

O espectro RMN ^{13}C de di-hidrocurbitacina B (CN-1, Figura 11) mostrou a presença de 32 carbonos, que através da comparação com o espectro de HSQC-dept puderam ser definidos como quaternários (11), metínicos (6), metilênicos (6) ou metílicos (9). Destaca-se a presença de quatro carbonilas [213,1 ppm (C-3), 212,1 ppm (C-11), 213,9 ppm (C-22) e 170,4 ppm (C-31)] e quatro carbonos oxigenados, dois secundários [71,7 ppm (C-2) e 71,1 ppm (C-16)] e dois terciários [78,9 ppm (C-20) e 81,3 ppm (C-25)].

No espectro RMN ^1H de CN-1 destaca-se o hidrogênio em 5,79 ppm ($J_{6-10} = 2$ Hz, $J_{6-7\alpha} = 2$ Hz e $J_{6-7\beta} = 6$ Hz, H-6) ligado ao carbono C-6 e aqueles correspondentes às posições hidroxiladas 4,41 ppm (H-2) e 4,31 ppm (H-16). Como pode ser observado na Figura 12, H-2 aparece como duplo duplete com $J_{1\alpha-2} = 6$ Hz e $J_{2-1\beta} = 13$ Hz e H-16 aparece como um duplo duplete de duplete com $J_{16-15\alpha} = 1,5$ Hz, $J_{16-17} = 7$ Hz e $J_{16-15\beta} = 9$ Hz.

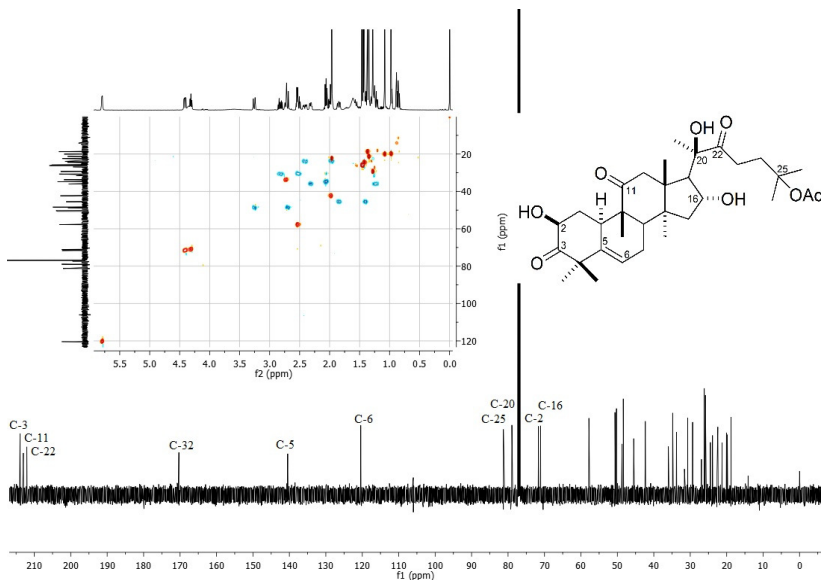


Figura 11: Espectros RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3) e HSQC-dept e estrutura de CN-1.

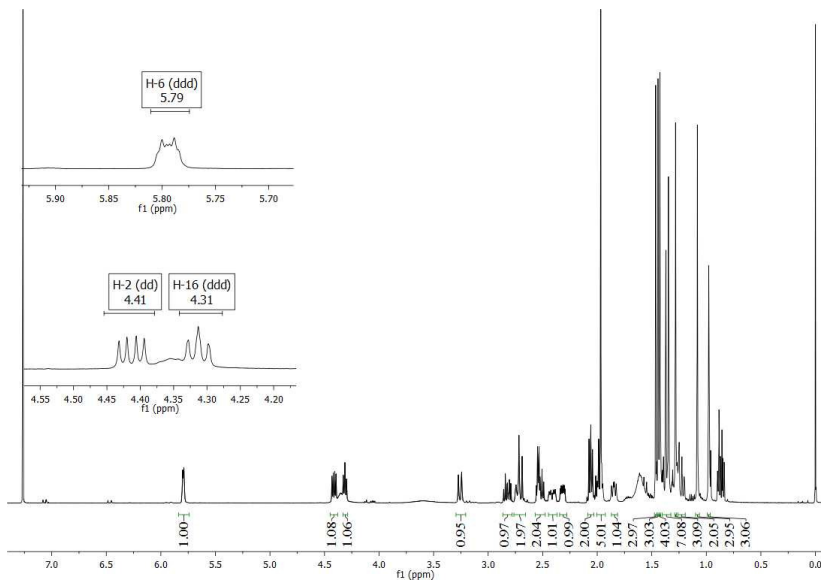


Figura 12: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CN-1, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2 e H-16.

A elucidação estrutural de di-hidroisocucurbitacina B (CN-2) foi baseada na comparação de seu espectro de RMN ^1H com dados da literatura (FARIAS, 1991, AFIFI et al., 1999) e com substância de referência disponível no laboratório. Destaca-se para esse composto a presença de um sistema $3\alpha\text{-OH}$ no anel A (Figura 13), característica que o diferencia de CN-1. No espectro de RMN ^1H observa-se a presença de um duplo duplete (3,91 ppm) com $J = 1,2$ e $4,5$ Hz, referente ao acoplamento de H-3 com H-1 β e com 3-OH, respectivamente (FARIAS, 1991). A presença do duplete 3,51 ppm ($J = 4,5$ Hz) confirma a correlação entre H-3 e 3-OH.

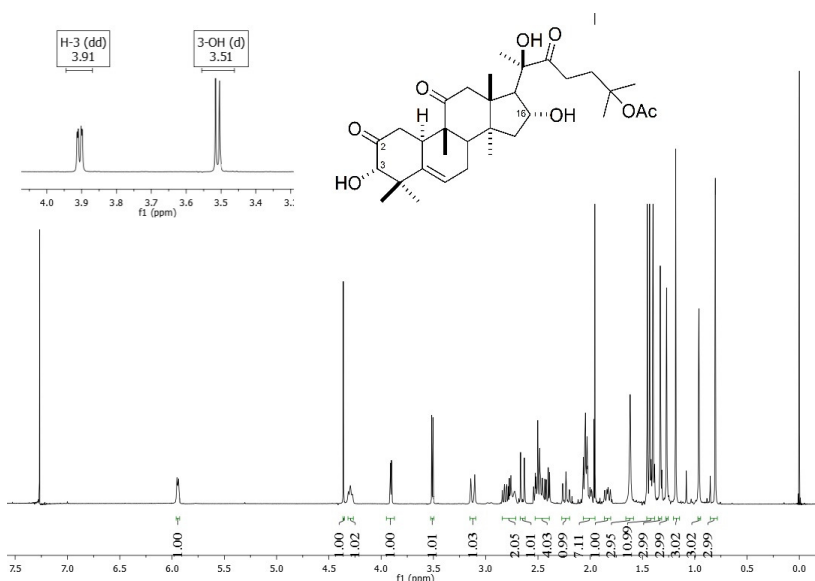


Figura 13: Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e estrutura de CN-2, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-3 e 3-OH.

No espectro de RMN ^1H de cucurbitacina R (CN-3) destaca-se o hidrogênio em 5,79 ppm ($J_{6-10} = 2$ Hz, $J_{6-7\alpha} = 2$ Hz e $J_{6-7\beta} = 6$ Hz, H-6), associado ao carbono C-6 e os hidrogênios correspondentes às posições hidroxiladas, 4,42 ppm (H-2) e 4,32 ppm (H-16), os dois últimos em destaque na Figura 14.

O espectro de RMN ^{13}C de CN-3 apresenta 30 carbonos, que através da análise comparativa com o espectro de HSQC-dept puderam

ser definidos como quaternários (10), metínicos (6), metilênicos (6) ou metílicos (8). Destaca-se a presença de três carbonilas (C-3, 213,1 ppm; C-11, 212,1 ppm e C-22, 215,4 ppm) e quatro carbonos oxigenados, sendo dois secundários (C-2, 71,6 ppm e C-16, 70,9 ppm) e dois terciários (C-20, 79,2 ppm e C-25, 70,2 ppm).

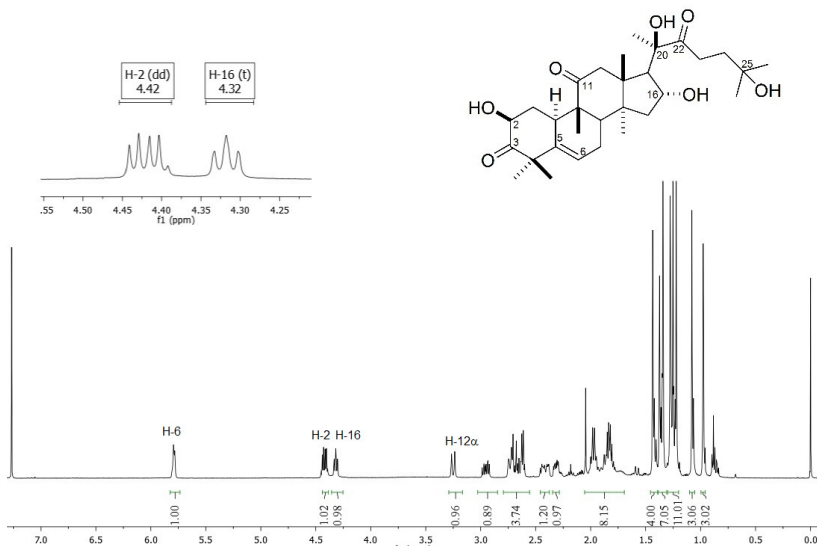


Figura 14: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura de **CN-3**, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-2 e H-16.

O espectro RMN ^1H de **CN-4** (Figura 15) revelou a presença do duplo duplo de duplo em 5,79 ppm ($J_{6-10} = 2$ Hz, $J_{6-7\alpha} = 2$ Hz e $J_{6-7\beta} = 6$ Hz, H-6), característico do esqueleto cucurbitano. Adicionalmente, foi possível observar a presença de um duplo duplo de duplo em 4,42 ppm, típico de cucurbitacinas com o sistema α -cetol no anel A e de um duplo duplo de duplo em 4,35 ppm, indicando a presença de uma hidroxila em C-16, no anel D. No mesmo espectro destaca-se a presença de dois dupletos em 4,70 ppm e 4,75 ppm, ambos com $J = 0,8$ Hz, sugerindo a presença de um metileno terminal na estrutura de **CN-4**. Dessa forma, a análise desses dados iniciais permitiu inferir que este composto trata-se de uma cucurbitacina com esqueleto semelhante à **CN-1**, diferenciando-se desta, provavelmente, na cadeia lateral.

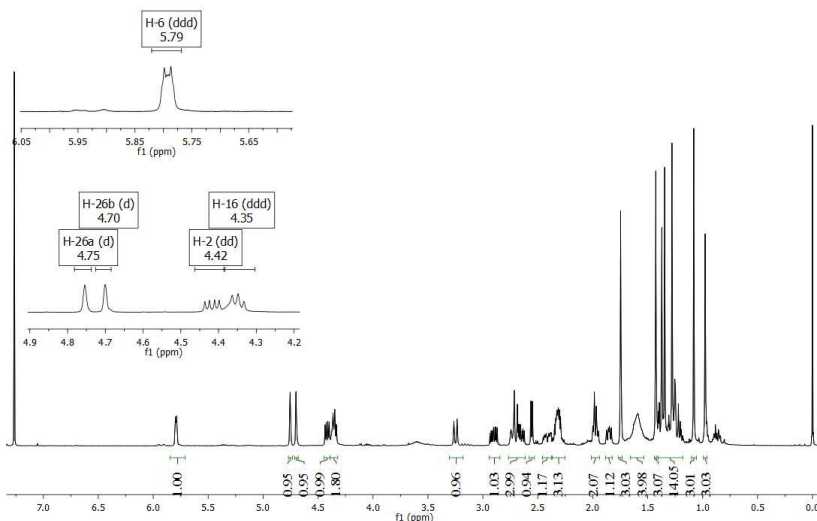


Figura 15: Espectro RMN ^1H de **CN-4** (500 MHz, CDCl_3), com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2 e H-16.

O espectro RMN ^{13}C de **CN-4** (Figura 16) apresenta 30 carbonos, definidos como quaternários (10), metínicos (6), metilênicos (6) ou metílicos (7) através da análise comparativa com o espectro HSQC-dept. O espectro HMBC permitiu atribuir aos sinais 213,0, 212,1 e 213,9 ppm as carbonilas C-3, C-11 and C-22, respectivamente.

No espectro de RMN ^{13}C de **CN-4** destaca-se também a presença de quatro carbonos: 144,5, 140,5, 120,4 e 110,4 ppm, que indicam a presença de dois sistemas olefínicos na estrutura. Dois deles (140,5 e 120,4 ppm) foram facilmente associados a C-5 e C-6, constituindo a insaturação típica do esqueleto cucurbitano. Através da análise dos espectros bidimensionais, a segunda insaturação pode ser localizada na porção final da cadeia lateral, e confirmada pelos sinais do metileno e da metila 1,75 ppm (3H, Me-26) ligada à dupla ligação. Dessa forma, **CN-4** pode ser identificada como 2 β ,16 α ,20*R*-tri-hidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-5,25-dien-3,11,22-triona, uma cucurbitacina com cadeia lateral inédita, provável precursor biossintético das cucurbitacinas com hidroxila ou grupo acetila em C-25.

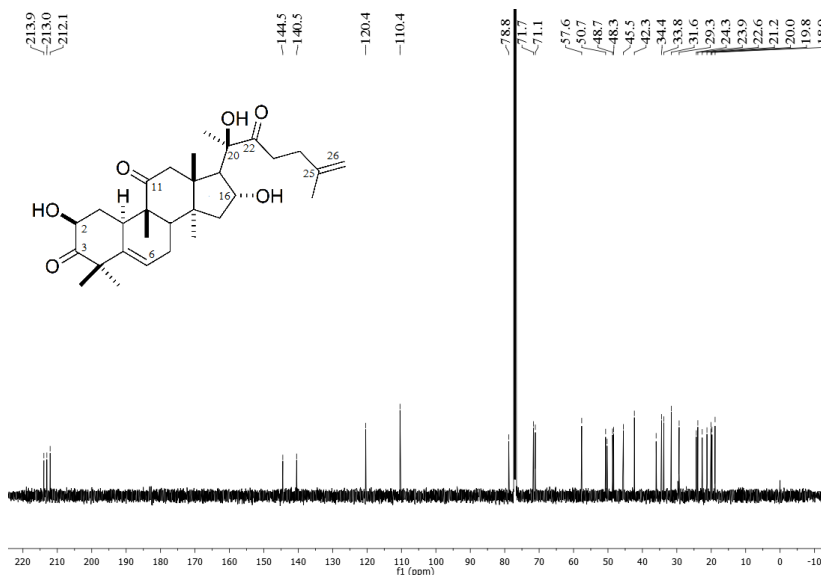


Figura 16: Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3) e estrutura de CN-4.

A análise do espectro RMN ^1H de CN-5 (Figura 17) mostrou-se semelhante ao da CN-1, com a presença de 8 metilas, um duplo duplete de duplete em 5,80 ppm (H-6), um duplo duplete em 4,40 ppm (H-2), típico de cucurbitacinas com o sistema α -cetol no anel A e um duplo duplete de duplete em 4,60 ppm (H-16), indicando a presença de uma hidroxila no anel D e sugerindo que a diferença entre os compostos também estaria localizada na cadeia lateral.

Da mesma forma que para CN-4, o espectro RMN ^{13}C de CN-5 evidenciou a presença de uma insaturação incomum em sua estrutura. A análise dos espectros bidimensionais permitiu localizar tal insaturação entre C-24 e C-25 (120,6 e 135,1 ppm), confirmado pela presença de duas metilas olefínicas, no espectro HSQC, em 1,74 ppm e 1,64 ppm, ligadas ao mesmo carbono quaternário (C-25). Além disso, foi possível observar a presença de uma hidroxila em C-22 (3,35 ppm, dd, $J_{22-23\alpha} = 10,7$ Hz e $J_{22-23\beta} = 3,4$ Hz), posição que normalmente aparece oxidada nessa classe de compostos.

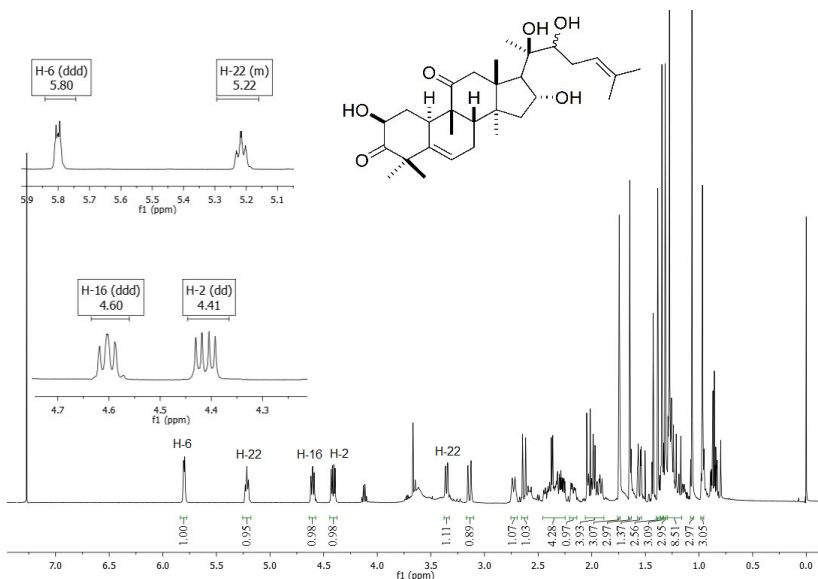


Figura 17: Espectro RMN ^1H de **CN-5** (500 MHz, CDCl_3), com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2 e H-16.

Para determinação da estereoquímica relativa de C-22 em **CN-5**, preparou-se o derivado acetonídeo (**CS-8**, Figura 18) (GÓMEZ; KOLENDER; VARELA, 2006). A derivatização de **CN-5** permitiu observar claramente, através da análise do espectro NOESY, a correlação entre os sinais em 3,88 ppm (H-22) e 1,40 ppm (Me-21). Assumindo a configuração típica 20R em triterpenos do tipo cucurbitano, a correlação observada indicou uma configuração S para C-22.

A comparação com dados da literatura (STUPPNER et al., 1990) permitiu identificar **CN-5** como 2 β ,16 α ,20R,22S-tetrahidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-5,24-dien-3,11-diona. Stuppner e col. (1990) descrevem o isolamento de um composto semelhante à **CN-5** a partir das raízes de *Picrorhiza kurrooa* (Scrophulariaceae). Apesar da semelhança estrutural, tal composto foi isolado na forma de glicosídeo e a configuração de C-22 não foi estabelecida. Sendo assim, **CN-5** pode ser considerada uma nova cucurbitacina já que é descrita pela primeira vez na forma livre.

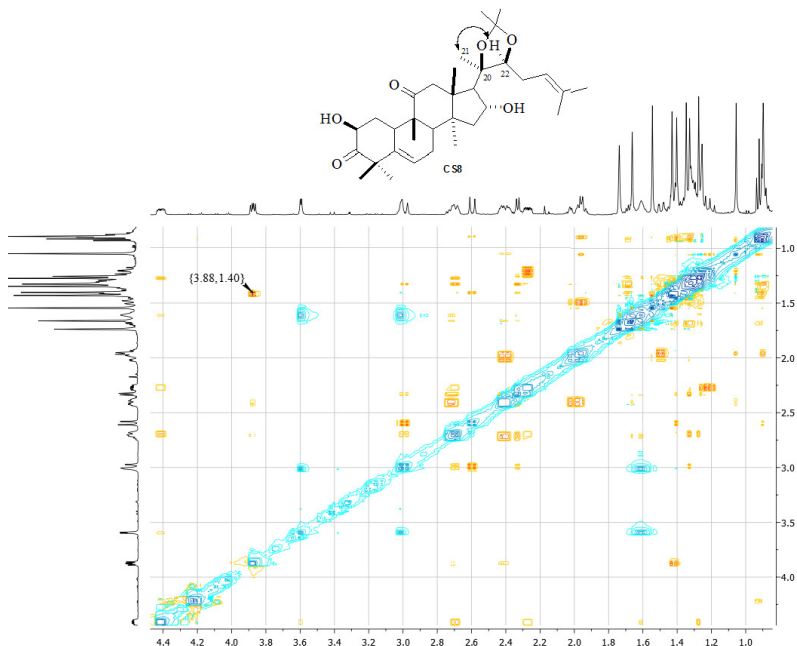


Figura 18: Estrutura molecular e espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de CS-8.

O espectro RMN ^1H de isocucurbitacina R (CN-6, Figura 19) apresenta sinais característicos de isocucurbitacinas, como já descrito para CN-2. Nele pode ser observada a presença de um duplo duplo de duplo em 4,30 ppm ($J_{16-15\alpha} = 1,5$ Hz, $J_{16-17} = 7$ Hz e $J_{16-15\beta} = 9$ Hz, H-16), de um duplo duplo em 3,90 ppm ($J = 1,5$ e 4,5 Hz), referente ao acoplamento de H-3 com H-1 β e com 3-OH, respectivamente e do duplo 3,52 ppm ($J = 4,5$ Hz) que confirma a correlação entre H-3 e 3-OH. As correlações observadas no espectro HMBC juntamente com a comparação com dados da literatura (HYLANDS; MAGD, 1986) permitiram identificar a 16 α ,3 α ,20R,25-tetrahidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-2,11,22-triona, conhecida como isocucurbitacina R.

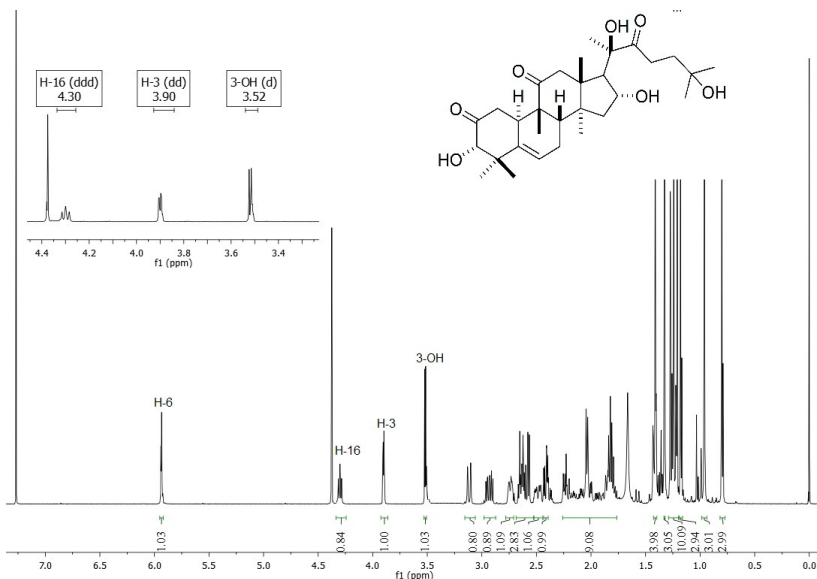


Figura 19: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura de **CN-6**, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-16, H-3 e 3-OH.

4.2.2. A PARTIR DE *L. operculata*

O extrato DCM de *L. operculata* foi inicialmente submetido à coluna cromatográfica a vácuo, seguido de coluna cromatográfica clássica para isolamento de curbitacina B (**CN-7**), como descrito na Figura 20.

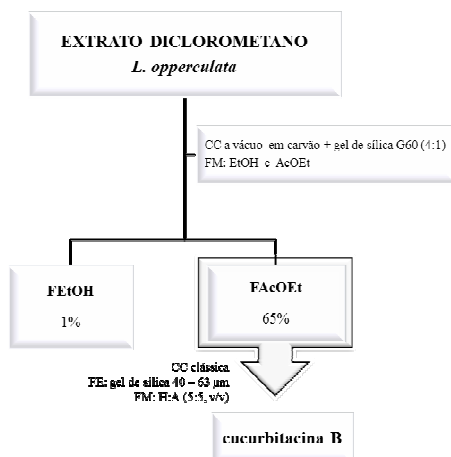


Figura 20: Fracionamento do extrato DCM de *L. operculata*.

A partir de 35,3 g de extrato DCM de *L. operculata* foi possível obter cerca de 15 g de **CN-7** (42,5%) para utilização com precursor na obtenção de análogos semissintéticos.

Estruturalmente, **CN-7** diferencia-se de **CN-1** pela presença de uma cetona α,β -insaturada na cadeia lateral, como pode ser observado na Figura 21. Os sinais referentes à insaturação podem ser observados no espectro RMN ^1H como dois dupletos em 7,06 ppm ($J_{23-24} = 15,6$ Hz, H-24) e 6,48 ppm ($J_{23-24} = 15,6$ Hz, H-23). Além desses sinais, destacam-se os referentes à insaturação do anel B em 5,79 ppm (ddd, $J_{6-10} = 2$ Hz, $J_{6-7\alpha} = 2$ Hz e $J_{6-7\beta} = 6$ Hz, H-6), ao H-16 em 4,36 ppm (ddd, $J_{16-15\alpha} = 1,5$ Hz, $J_{16-17} = 7$ Hz e $J_{16-15\beta} = 9$ Hz) e ao H-2 em 4,42 ppm, que nesse caso aparece como um ddd ($J_{2-3\text{OH}} = 3,5$ Hz, $J_{1\alpha-2} = 6$ e $J_{1\beta-2} = 13$ Hz) devido à correlação com 2-OH, confirmada pelo dupletos em 3,62 ppm ($J = 3,5$ Hz).

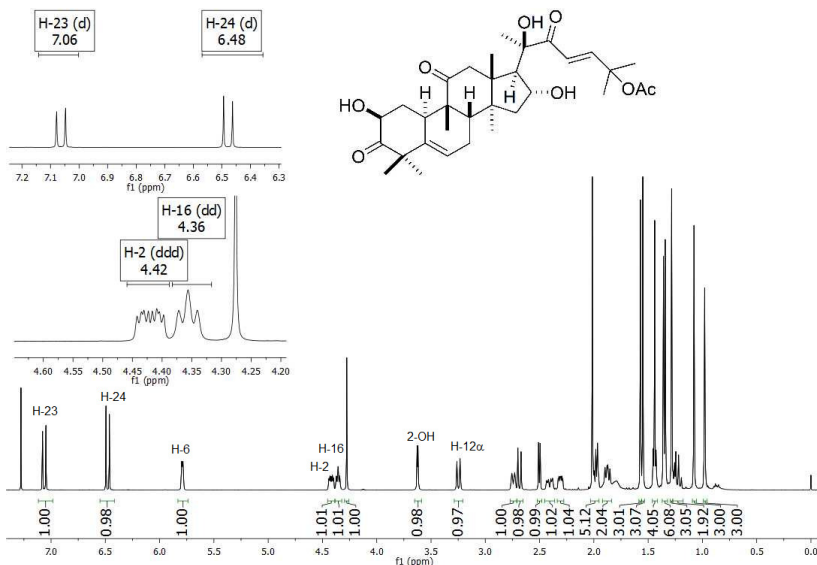


Figura 21: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura de **CN-7**, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-23, H-24, H-2 e H-16.

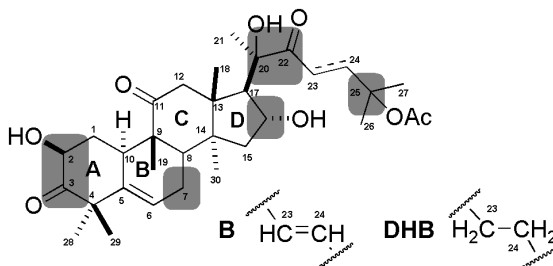
Os compostos isolados foram submetidos à avaliação da atividade citotóxica frente a quatro linhagens de células tumorais (A549, KB, RD e HCT-8), conforme descrito na seção 4.4.2.3. A elucidação estrutural e os resultados referentes à atividade biológica foram reunidos em artigo publicado recentemente (LANG et al., 2011).

4.3. SÍNTESE DE DERIVADOS DE CUCURBITACINAS

4.3.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Pretendeu-se realizar a síntese de uma biblioteca de derivados de cucurbitacina B (CN-7), cucurbitacina R (CN-3) e principalmente de di-hidrocucurbitacina B (CN-1) na busca por protótipos candidatos a fármacos antitumorais e anti-inflamatórios em vista da promissora atividade biológica apresentada pelos precursores já bem documentada na literatura.

Para o desenvolvimento dos análogos foram aplicadas estratégias consolidadas em Química Medicinal, como a simplificação molecular, extensão de cadeia e a variação de grupos funcionais, envolvendo as posições 2, 3, 7, 16, 20, 22 e 25 do esqueleto cucurbitano.



4.3.2. REAÇÕES DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO

Diante dos escassos relatos de derivados semissintéticos de cucurbitacinas, inicialmente foram empregadas metodologias clássicas de oxidação e redução que possibilitaram explorar aspectos da reatividade dos compostos.

Com o objetivo de estudar a reatividade das hidroxilas secundárias, 2-OH e 16-OH, quatro diferentes agentes oxidantes foram avaliados. Jones, IBX e Dess Martin foram testados sem sucesso: a reação com Jones originou uma mistura complexa de produtos e os dois últimos reagentes não foram efetivos na oxidação da di-hidrocucurbitacina B (CN-1), sendo possível a recuperação total do produto de partida. A reação de CN-1 com PCC (clorocromato de piridínio) resultou na formação de dois produtos (Figura 22), com 48% (CS-9) e 2% de rendimento (CS-10). Tentativas de otimização, com

variação do número de equivalentes de PCC (3 até 6 equivalentes) e a utilização de peneira molecular (3 Å) (HERSCOVICI; ANTONAKIS, 1980) não foram eficientes na melhora do rendimento.

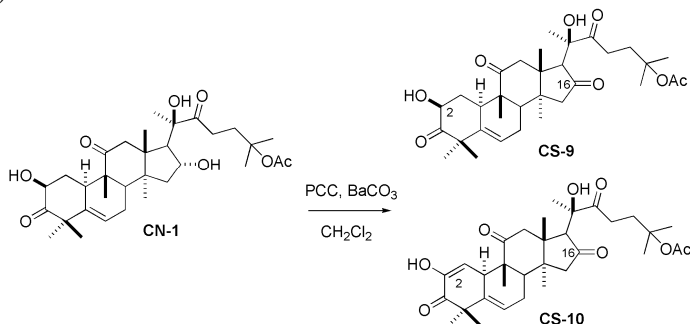


Figura 22: Produtos obtidos na oxidação com PCC, **CS-9** e **CS-10**

A análise do espectro RMN ^1H de **CS-9** permitiu identificar facilmente a oxidação de C-16, devido ao desaparecimento do sinal referente ao H-16, como pode ser observado na Figura 23. Confirmando essa observação, H-17 aparece como um simpleto em 3,61 ppm.

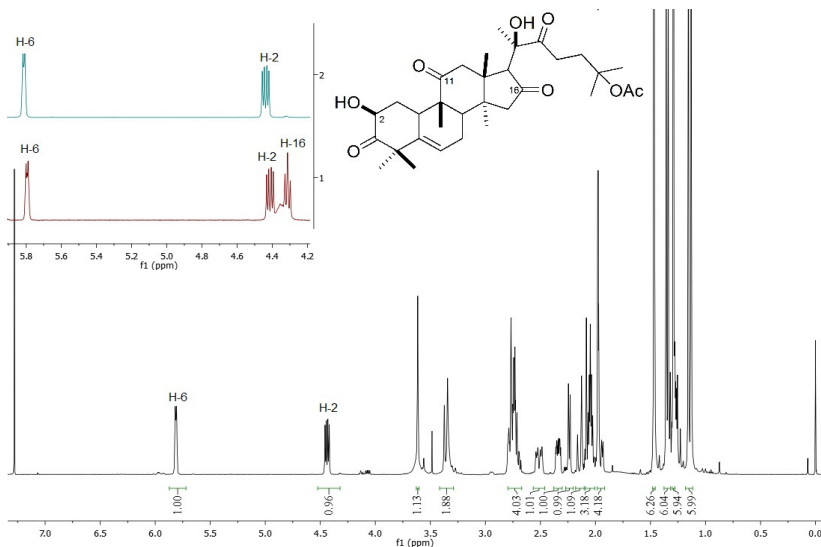


Figura 23: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura de **CS-9**, com destaque para a comparação com o espectro RMN ^1H de **CN-1**.

No espectro RMN ^{13}C observam-se quatro sinais na região entre 220 e 210 ppm, correspondentes às quatro cetonas presentes em **CS-9**. Através da análise do espectro HMBC (em destaque na Figura 24) foi possível determinar C-16, que apresenta correlação com H-17 (3,61 ppm) e com os hidrogênios H-15 $_{\alpha}$ (2,06 ppm) e H-15 $_{\beta}$ (2,14 ppm).

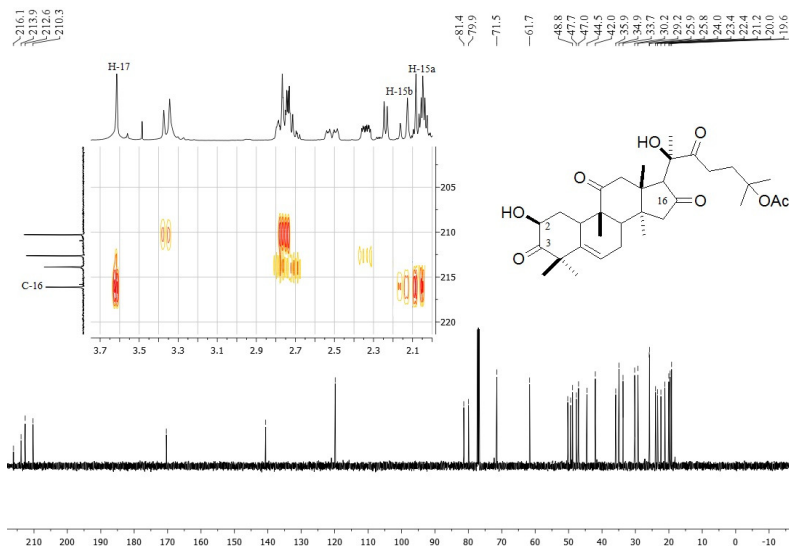


Figura 24: Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3) e estrutura de **CS-9**, com destaque para as correlações entre C-16 e H-17, H-15 $_{\alpha}$ e H-15 $_{\beta}$ no espectro HMBC.

Em geral, reações com PCC apresentam rendimentos superiores a 90% (TOJO; FERNANDEZ, 2006), fato não observado nesse trabalho. De certa forma, o baixo rendimento obtido pode ser mais bem compreendido com a identificação do produto **CS-10**. A análise de seu espectro RMN ^1H (Figura 25) mostrou que este se trata do tautômero do produto de oxidação das hidroxilas 2-OH e 16-OH (Esquema 4). No espectro, além dos aspectos já descritos para **CS-9**, pode ser observada também a ausência do sinal correspondente a H-2 (4,43 ppm) e a presença de um duplete em 5,95 ppm, característico de cucurbitacinas com sistema diosfenol no anel A.

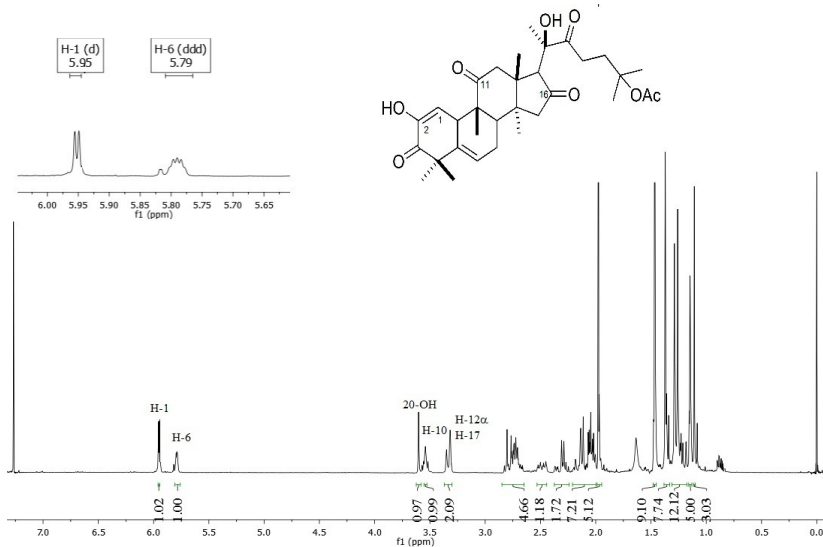
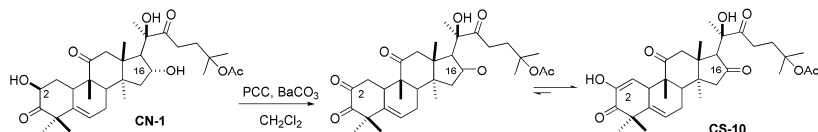


Figura 25: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura de **CS-10**, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-1 e H-6.

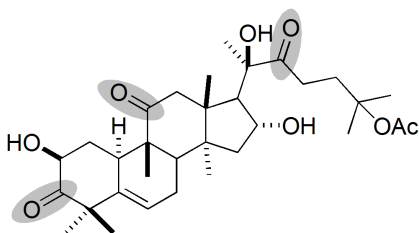


Esquema 4: Provável rota sintética de formação do diosfenol **CS-10**.

Em α -dicetonas cíclicas a forma diosfenólica é geralmente mais estável que a forma dicetônica, sendo este, muitas vezes, o único tautômero isolado (KALSI, 2004, TROST; DONG; VANCE, 2010). Por esse motivo, o baixo rendimento observado na oxidação de **CN-1** poderia ser explicado, pelo menos em parte, pela reduzida estabilidade observada em α -dicetonas cíclicas. Aparentemente, 16-OH é mais reativa e é oxidada mais rapidamente. Na sequência, a oxidação de 2-OH geraria um produto instável, que sofreria decomposição ou conversão à forma diosfenólica.

Quanto às reações de redução, foram utilizados inicialmente os hidretos de boro e sódio (NaBH_4) e de lítio e alumínio (LiAlH_4), visando estudar a reatividade das carbonilas C-3, C-11 e C-22. Com ambos os

reagentes foi observada por CCD a formação de apenas um produto, porém a análise espectroscópica revelou a presença de estereoisômeros.



A reação de **CN-1** e **CN-3** com NaBH_4 aconteceu com 95% e 96% de rendimento, respectivamente, dando origem ao mesmo produto majoritário **CS-11**. Observa-se no espectro RMN ^{13}C (Figura 24) a manutenção de apenas uma carbonila, identificada através do espectro HMBC como C-11, sugerindo que as carbonilas de C-3 e C-22 (do precursor **CN-1**) tenham sido reduzidas e o éster em C-25 tenha sofrido hidrólise.

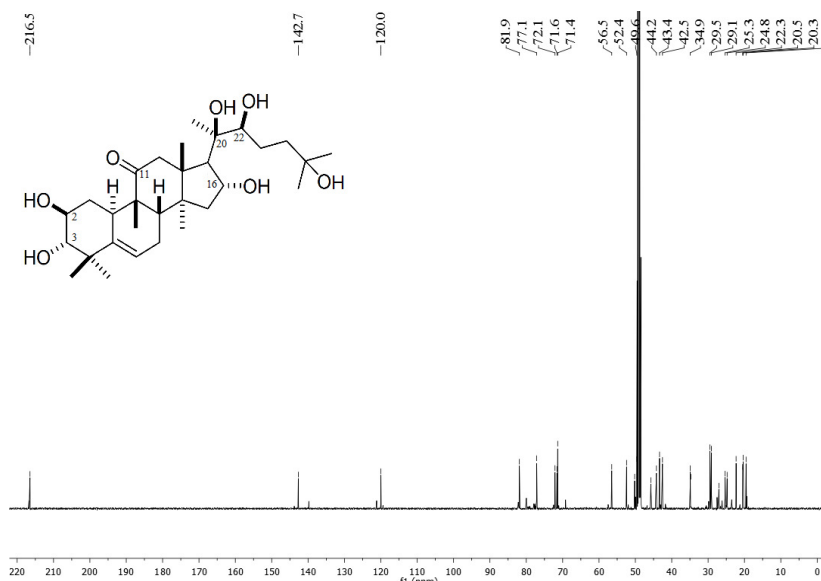


Figura 26: Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz) e estrutura de **CS-11**.

Quanto a estereoquímica do principal produto de redução (**CS-11**), o espectro NOESY (Figura 27) permitiu observar a correlação de H-3 (2,86 ppm) com H-1 β (1,02 ppm) e com a metila 1,19 (Me-28). No espectro RMN ^1H , H-2 aparece como um ddd com $J_{2-1\alpha}= 4,2$ Hz, $J_{2-3}= 9,4$ Hz e $J_{2-1\beta}= 11,5$ Hz. Já H-3 aparece como um duplete, com $J_{2-3}= 9,4$ Hz. A constante de acoplamento observada entre H-2 e H-3 apresenta valor característico de acoplamento axial/ axial (WEN et al., 2006), e juntamente com os dados observados no espectro NOESY sugerem uma orientação alfa para 3-OH.

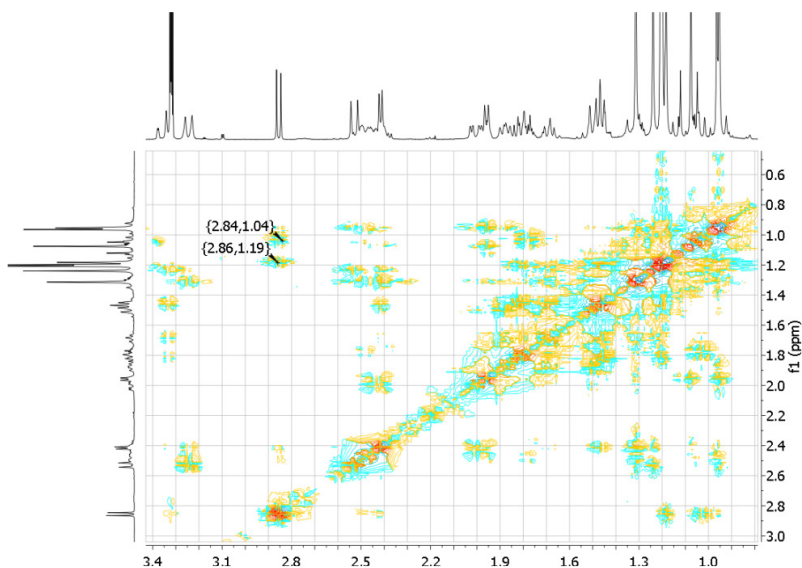


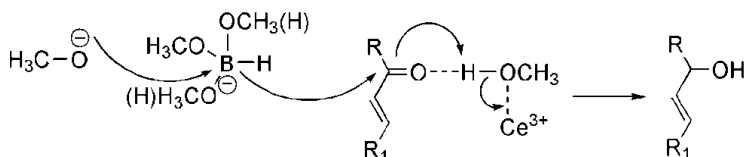
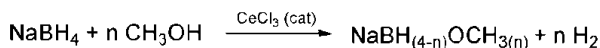
Figura 27: Espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de **CS-11**.

A análise dos espectros de RMN (resultados não apresentados) do produto de reação de **CN-3** com LiAlH_4 revelou a presença de um grande número de isômeros, não sendo possível a separação e identificação.

Conforme apresentado, pode-se observar que a redução de **CN-1** e/ou **CN-3** com NaBH_4 (produto **CS-11**) e LiAlH_4 não é estereosseletiva. Como alternativa, podem ser empregados hidretos mais volumosos, como o hidreto de diisobutilalumínio (DIBALH), hidreto de *tert*-butoxialumínio, *n*-butilboridreto de lítio e *trise*c-butilboroidretos de lítio e potássio (*L* e *K*-selectride®) na tentativa de aumentar a seletividade das reações (CAMOZZATO et al., 2008). Nesse sentido, o

hidreto de *tert*-butoxialumínio também foi empregado na redução de **CN-1**, dando origem ao mesmo produto **CS-11**, porém sem melhora aparente na estereosseletividade.

A cucurbitacina B (**CN-7**) foi submetida à reação com NaBH_4 na presença de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (composto **CS-13**) em metanol a $-30\text{ }^\circ\text{C}$, conhecida como redução de Luche (Esquema 5). Nesse caso, a utilização do sal de cério favorece a redução 1,2 e evita a formação do produto de redução 1,4, que é altamente favorável na ausência desse lantanídeo, possibilitando assim a obtenção de um álcool alílico na cadeia lateral (ST'ASTNA et al., 2010). O CeCl_3 é um ácido de Lewis que catalisa a metanólise do NaBH_4 dando origem a metoxiborohidretos de sódio. Esses agentes são redutores mais duros, sendo, portanto, mais seletivos à redução 1,2. O sal de cério participa também através da ativação do solvente, que ao se coordenar com a carbonila cetônica irá aumentar a eletrofilicidade do carbono, contribuindo para a formação do álcool alílico.



Esquema 5: Mecanismo da redução de Luche.

O produto **CS-13** possui o mesmo anel A de **CS-11**, como pode ser observado em seu espectro RMN ^1H (Figura 28). A redução da carbonila em C-22 pode ser confirmada pela mudança na multiplicidade dos sinais dos hidrogênios H-23 e H-24 e pela presença de um novo sinal no espectro RMN ^1H , referente ao H-22. Nesse espectro, os hidrogênios olefínicos aparecem como dois duplos dupletos, H-23 com $J_{22-23} = 5,9\text{ Hz}$ e $J_{23-24} = 16\text{ Hz}$ e H-24 com $J_{22-24} = 1,2\text{ Hz}$ e $J_{23-24} = 16\text{ Hz}$. H-22 também aparece como duplo duplete em $3,97\text{ ppm}$, com $J_{22-24} = 1,2\text{ Hz}$ e $J_{22-23} = 5,9\text{ Hz}$.

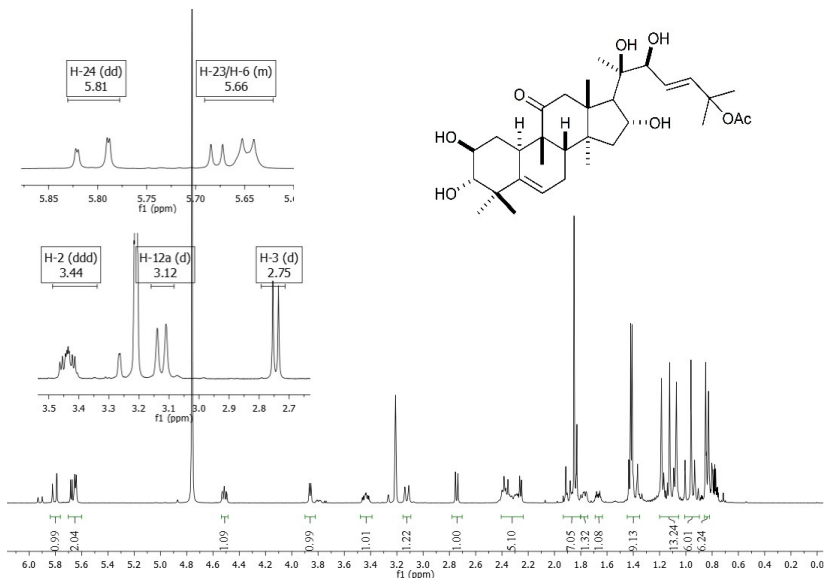


Figura 28: Espectro RMN ^1H (500 MHz, MeOD) e estrutura de **CS-13**, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-24, H-23 e H-6 (a) e H-22, H-2, H-12 α e H-3 (b).

No espectro NOESY de **CS-13** (Figura 29) observa-se correlação de H-22 (3,97 ppm) com H-17 (2,37 ppm) e Me-21 (1,23 ppm). Assumindo a configuração R para C-20, característica no esqueleto cucurbitano, pode-se sugerir que C-22 possui configuração S. No entanto, essa evidência só poderia ser confirmada com a derivatização do produto **CS-13**.

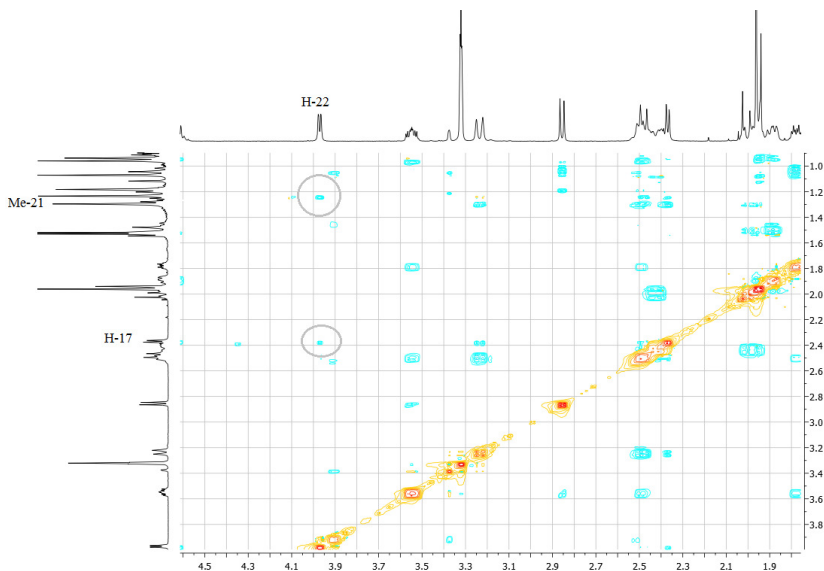
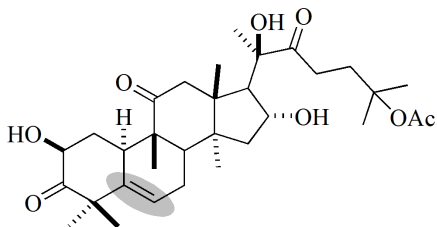


Figura 29: Espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de **CS-13**, com destaque para a correlação de H-22 com H-17 e H-21.

A fim de conhecer a reatividade da insaturação presente em C-5, característica de triterpenos do tipo cucurbitano, algumas metodologias como hidrogenação catalítica e reações de epoxidação foram conduzidas.



A hidrogenação catalítica de **CN-1** foi testada tanto com catalisadores heterogêneos, como Pd/C e PtO_2 quanto com homogêneos, como o de Wilkinson $[\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_2]$. Utilizando AcOEt como solvente, procurou-se variar a concentração do catalisador (10% até 20%) e a

pressão empregada (2,0 até 3,5 bar), porém não houve formação de produtos em nenhuma das tentativas.

Seguindo metodologia descrita por Leng e col. (2010), utilizando m-CPBA e por Salvador, Melo e Neves (1996), empregando KMnO_4 e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, foram realizadas tentativas de epoxidação da insaturação em C-5 de **CN-1**, porém ambas resultaram em uma mistura complexa de produtos. Na reação com m-CPBA, o resultado observado deve-se provavelmente a reação de Baeyer-Villiger com as carbonilas C-3 e C-11, favorecida pela presença dos carbonos quaternários C-4 e C-9 na vizinhança.

O insucesso da hidrogenação e da epoxidação da insaturação presente no anel B de **CN-1** também pode ser associado ao impedimento estérico dessa posição (Figura 30). Como pode ser observado, a vizinhança é constituída por quatro metilas (Me-18, M-28, Me-29 e Me-30) que dificultam a aproximação tanto dos catalisadores nas reações de hidrogenação quanto dos reagentes para a epoxidação.

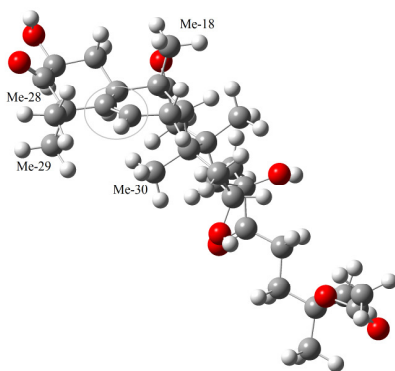
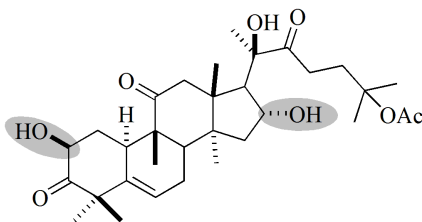


Figura 30: Estruturas 3D de **CN-1** na conformação mais estável (menor energia). Hyperchem 8.0.

4.3.3. OBTENÇÃO DE ÉSTERES

No presente trabalho foram obtidos dez diferentes ésteres através de reações clássicas com anidridos ou haletos de ácidos (MARCH; SMITH, 2007). De maneira geral, todos os produtos foram sintetizados com rendimento superior a 70%, com esterificação das hidroxilas secundárias 2-OH e 16-OH ou, ainda, somente de 2-OH.



A reação de **CN-1** e **CN-7** tanto com anidrido acético quanto com cloreto de acetila originou os produtos **CS-14** e **CS-15**, respectivamente. Apesar de ambas apresentarem rendimentos semelhantes (> 90%), a reação com anidrido acético é mais limpa, facilitando a purificação do produto obtido.

Na Figura 31, observa-se nitidamente, na comparação entre os espectros RMN ^1H de **CS-14** (a) e do precursor **CN-1** (b), o deslocamento para região menos blindada dos sinais associados a H-2 (5,48 ppm) e H-16 (5,14 ppm), as duas posições esterificadas. Confirmando a reação, dois novos sinais relativos às metilas das acetilas podem ser observados no espectro [2,15 (Me-2') e 1,95 (Me-2'')].

Da mesma forma, no espectro RMN ^1H de **CS-15** podem ser observados os sinais 5,48 ppm (H-2) e 5,18 ppm (H-16), deslocados para região menos blindada, indicando a acetilação dessas posições. No espectro observa-se também a presença de duas novas metilas (2,15 ppm e 1,95 ppm) que confirmam a esterificação.

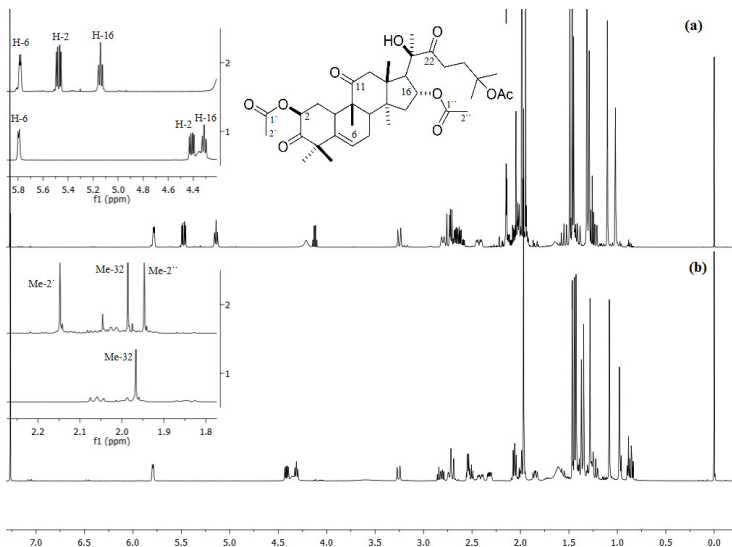
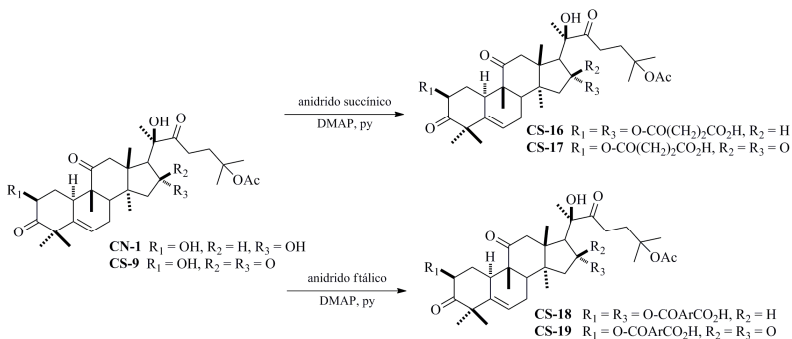


Figura 31: Comparação entre os espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **CS-14** (a) e **CN-1** (b), com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2, H-16 e metilas Me-2', Me-32 e Me-2''.

A reação de **CN-1** e **CS-9** com anidrido succínico originou os produtos **CS-16** e **CS-17**, respectivamente (Esquema 6). Utilizando anidrido ftálico, os mesmos precursores deram origem aos ésteres **CS-18** e **CS-19**.



Esquema 6: Síntese dos derivados ésteres succínicos e ftálicos **CS-16** - **CS-19**.

A principal evidência para confirmar a formação dos produtos foi o deslocamento dos sinais dos hidrogênios carbinólicos H-2 e H-16,

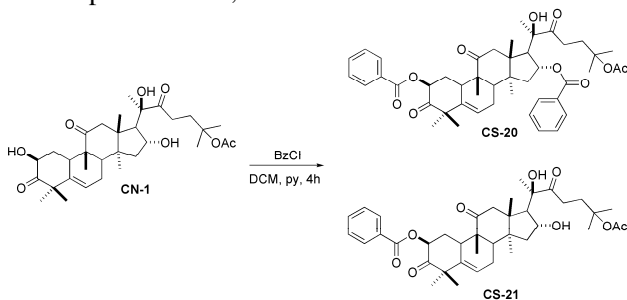
no espectro RMN ^1H , além do surgimento de sinais adicionais neste e no espectro RMN ^{13}C .

O produto **CS-16** corresponde ao derivado 2 β ,16 α -di-hemissuccinila de **CN-1**, estando os dois hidrogênios carbinólicos deslocados [5,53 ppm (H-2) e 5,36 ppm (H-16)]. Observa-se também o surgimento de quatro sinais na região entre 2,4 e 2,6 ppm, relativos aos hidrogênios metilênicos dos substituintes succinila. O composto **CS-18** corresponde ao derivado 2 β ,16 α -di-ftaloila de **CN-1**, com as duas hidroxilas secundárias sofrendo esterificação [5,75 ppm (H-2) e 5,49 ppm (H-16)]. Nesse caso, também se observa nos espectros monodimensionais o surgimento de sinais relativos a hidrogênios e carbonos aromáticos (7,40 a 7,80 ppm e 128 a 135 ppm, respectivamente).

Os produtos **CS-17** e **CS-19** foram identificados através de seus espectros RMN e confirmados por espectrometria de massas, como os ésteres succínico e ftálico do derivado **CS-9** (Esquema 6).

De maneira geral, a reação com cloretos de ácido deu origem a produtos mono ou dissustituídos com rendimentos superiores a 90%. A formação dos produtos é dependente do tempo de reação, sendo que com maiores tempos obtém-se somente os produtos dissustituídos.

A reação de **CN-1** com cloreto de benzoíla (Esquema 7) originou como produto majoritário o diéster **CS-20**, ocorrendo formação também do composto **CS-21**, onde somente 2-OH foi convertido a éster.



Esquema 7: Síntese dos ésteres benzoílicos **CS-20** e **CS-21**.

No espectro RMN ^1H de **CS-20** (Figura 32) observa-se o deslocamento de H-2 e H-16 para região mais desblindada (5,74 e 5,53 ppm, respectivamente) e o surgimento de sinais referentes a dois anéis aromáticos na estrutura, na região entre 7,40 e 8,10 ppm. Na Figura 33, o espectro RMN ^1H de **CS-21** evidencia o deslocamento de H-2 (5,73 ppm), e a permanência do sinal referente a H-16 em 4,32 ppm,

confirmando, juntamente com os sinais quatro hidrogênios aromáticos entre 7,40 e 8,10 ppm, a esterificação somente de 2-OH.

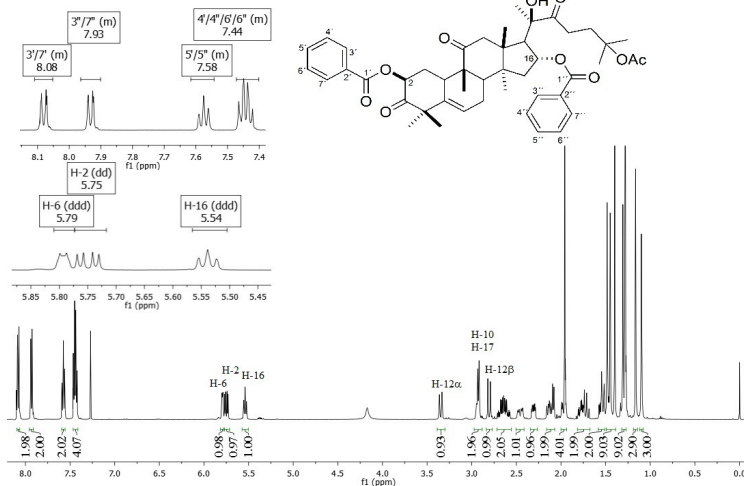


Figura 32: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura de **CS-20**, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2, H-16 e H-aromáticos.

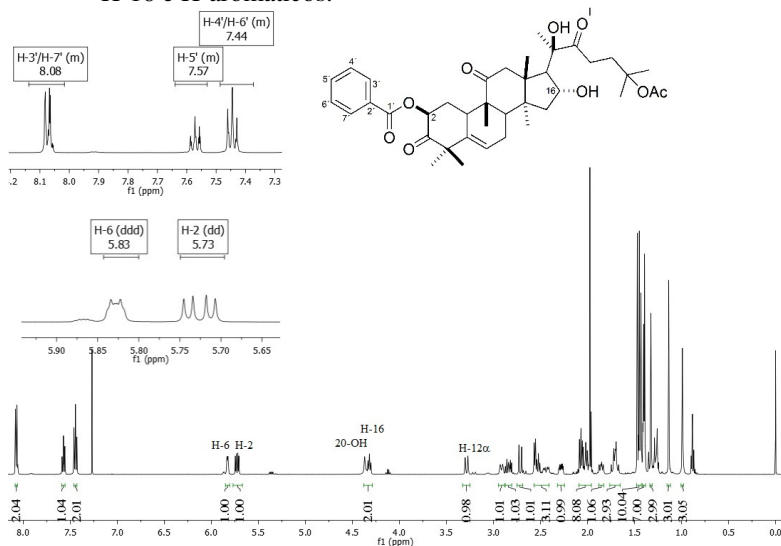
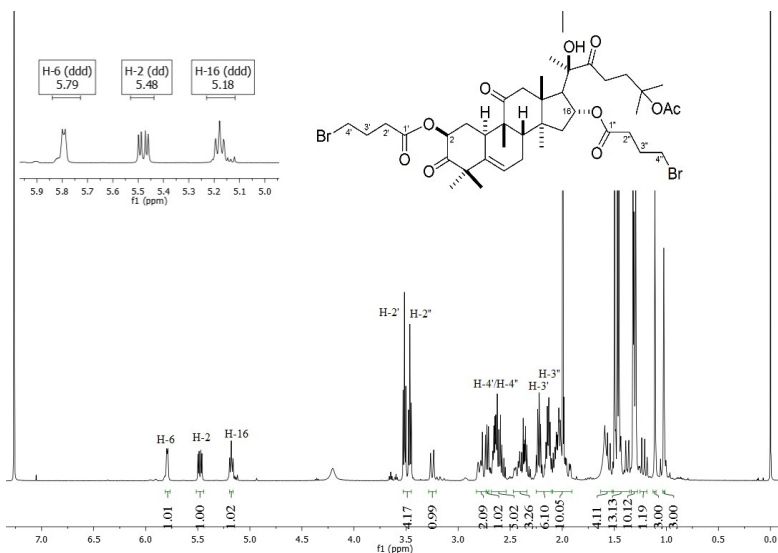
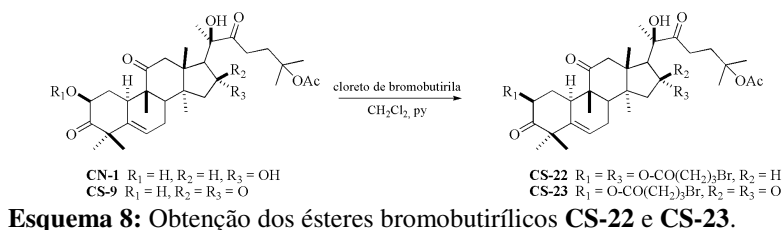


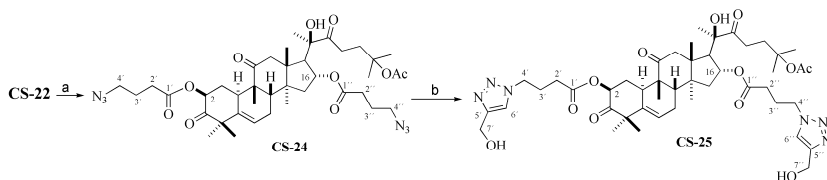
Figura 33: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura de **CS-21**, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-6, H-2 e H-aromáticos.

A reação de **CN-1** e **CS-9** com cloreto de bromobutirila originou os produtos **CS-22** e **CS-23**, respectivamente (Esquema 8). Da mesma forma que para as outras reações de esterificação, no espectro RMN ^1H do derivado **CS-22** (Figura 34), observa-se o deslocamento de H-2 (5,48 ppm) e H-16 (5,18 ppm), além do surgimento de novos sinais, entre 2,0 e 3,5 ppm, referentes aos metilenos dos substituintes bromobutirila. Já no espectro RMN ^1H de **CS-23**, observa-se o deslocamento de H-2 (5,50 ppm) e a inexistência do sinal referente a H-16.



O produto **CS-22** foi utilizado como intermediário para a reação de cicloadição 1,3-dipolar conhecida como “click”. Nesse tipo de reação, um alcino, geralmente terminal, reage com uma azida orgânica utilizando cobre (Cu(I)) como catalisador, para formação de um anel triazólico. O 1,2,3-triazol é relevante para a química medicinal, pois pode não só atuar como um grupo farmacofórico (MANETSCH et al., 2004, WHITING et al., 2006) mas também como uma conexão entre duas ou mais substâncias de interesse, em uma estratégia de hibridação molecular, por exemplo. Além disso, o anel triazólico funciona como um bioisótero do grupo amida por apresentar propriedades físico-químicas semelhantes (FREITAS et al., 2011).

Inicialmente **CS-22** foi convertido a azida (ODLO; HOYDAHL; HANSEN, 2007) através da reação com NaN_3 (**CS-24**), utilizando micro-ondas (100 W, 2 min., 70 °C). Após conversão total do composto de partida, controlada por CCD, adicionaram-se os demais reagentes e a mistura foi irradiada por mais 5 minutos para formação do produto final **CS-25** (Esquema 9).



a) NaN_3 , DMF, MW, 2 min.; b) álcool propargílico, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ascorbato de sódio, MW, 5 min.

Esquema 9: Obtenção do derivado triazólico **CS-25**.

No espectro RMN ^1H de **CS-25** (Figura 35) evidencia-se a presença de dois hidrogênios aromáticos, em 7,83 e 7,84 ppm, correspondentes aos hidrogênios do anel triazólico (H-9'' e H-9'). Adicionalmente, o simpleto em 4,58 ppm possui integração para quatro hidrogênios e apresenta correlação no espectro HMBC com os carbonos dos anéis triazólico (124,2, 124,4, 149,0 e 149,2 ppm), podendo assim ser associado aos hidrogênios metilênicos H-10' e H-10''.

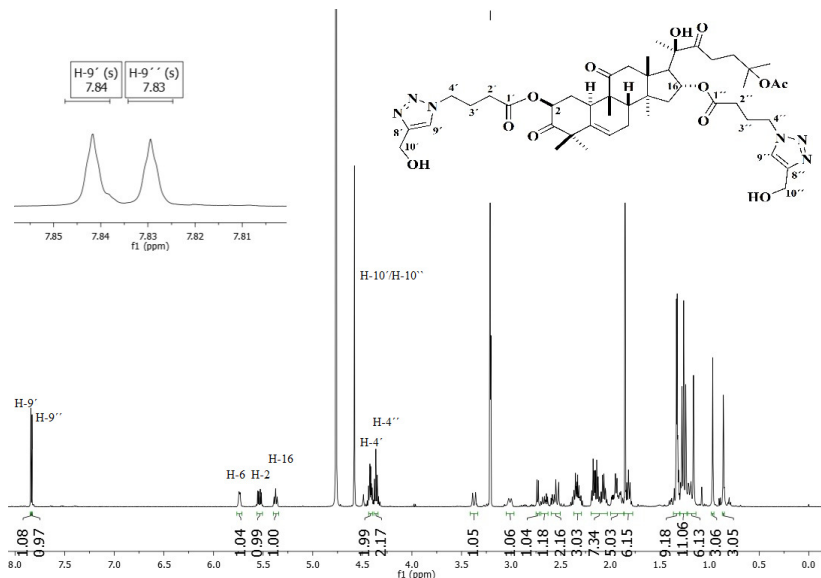
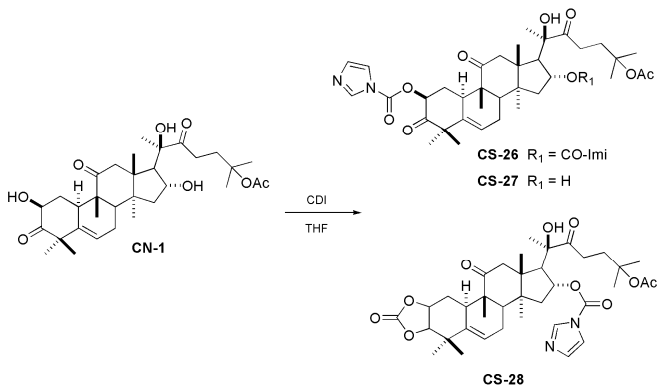


Figura 35: Espectro RMN ^1H (500 MHz, MeOD) e estrutura de CS-25, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios H-9' e H-9''

Nos últimos anos vários carbamatos foram sintetizados e apresentaram atividade promissora como agentes antitumorais, diretamente como fármacos ou ainda como pró-fármacos (BANDYOPADHYAY et al., 2001). Alguns carbamatos são descritos como inibidores da proliferação de células endoteliais e de tumor de próstata, *in vitro*, e de crescimento tumoral e angiogênese induzida, em camundongos (RAY; CHATRURVEDI, 2004, MOREIRA et al., 2008).

Na tentativa de obter derivados carbamatos de cucurbitacinas foram empregadas duas diferentes metodologias. Inicialmente, conforme descrito por Bandyopadhyay e col. (2001), a reação foi conduzida com clorossulfonilisocianato em CHCl_3 , porém não foi possível isolar nenhum produto da mistura complexa formada. Já a tentativa de obtenção de carbonilimidazóis a partir da reação de CN-1 com 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (SANTOS et al., 2009) deu origem a três diferentes produtos, os carbamatos CS-26 e CS-27 e o carbonato cíclico CS-28 (Esquema 10).



Esquema 10: Síntese dos carbamatos **CS-26**, **CS-27** e **CS-28**.

O composto **CS-26** foi identificado através da análise de seu espectro RMN ¹H (Figura 36) como o derivado 2β,16α-dicarbonilimidazólico de **CN-1**. Observam-se em região mais desblindada (7,08 a 8,17 ppm) os sinais referentes a dois imidazóis e o deslocamento dos sinais de H-2 e H-16 para região de desblindagem (5,64 ppm, sobrepostos), indicando a modificação dessas duas posições.

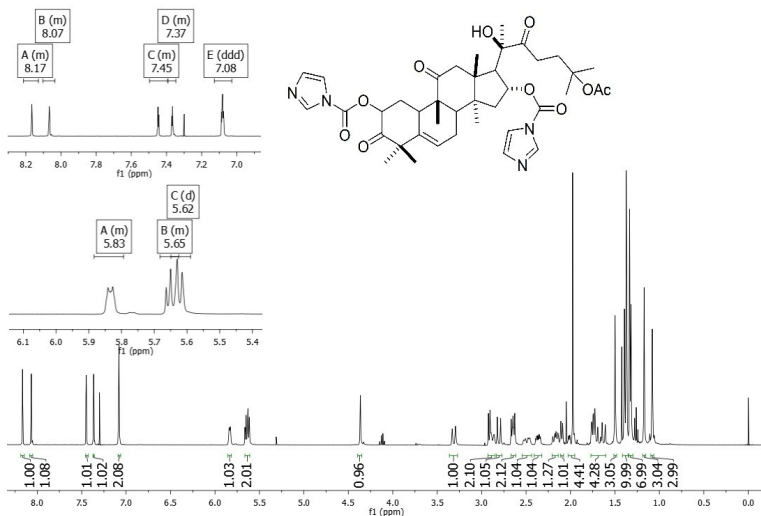


Figura 36: Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **CS-26**, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, H-6, H-2 e H-16.

Observa-se no espectro RMN ^1H de **CS-27** (Figura 37) que a reação aconteceu apenas na posição 2, uma vez que o sinal de H-2 aparece deslocado para 5,63 ppm e H-16 (4,32 ppm) não apresentou variação em seu deslocamento químico. A incorporação de apenas um carbonilimidazol na estrutura é confirmada pela presença de apenas três sinais correspondentes a hidrogênios imidazólicos no espectro [8,16 ppm (H-4'), 7,44 ppm (H-6') e 7,08 ppm (H-5')].

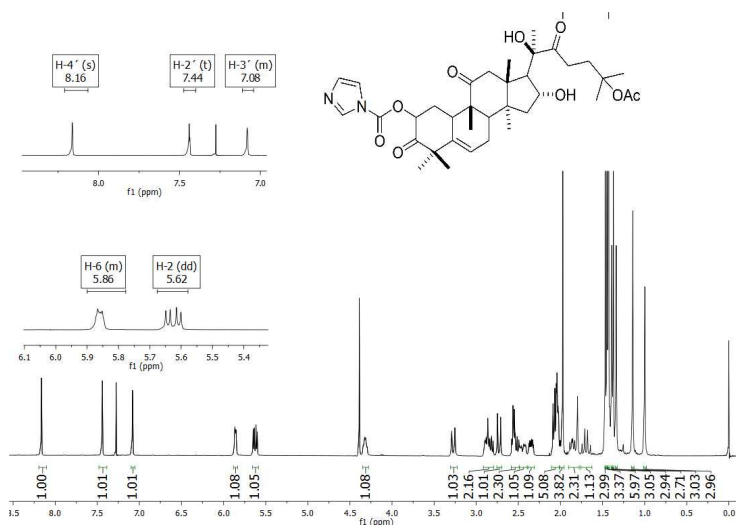


Figura 37: Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **CS-27**, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos (a) e H-6 e H-2 (b).

O terceiro produto da reação de **CN-1** com CDI (**CS-28**) corresponde a um composto bastante atípico para esta reação. Inicialmente o espectro RMN ^1H (Figura 38) chama atenção em três aspectos: ausência do sinal correspondente a H-2 (usualmente em 4,42 ppm), deslocamento para região mais desblindada de H-16 (5,58 ppm) e sinais de hidrogênios aromáticos que indicam a presença de somente um anel imidazólico. O espectro RMN ^{13}C (Figura 39) tem destaque pela presença de apenas duas carbonilas cetônicas, presença de três carbonos adicionais (153,4 ppm, 141,5 pm e 134,6 ppm) e ausência do sinal correspondente a C-2 (região de 71,0 ppm), quando hidroxilado. A comparação com os dados espectroscópicos de **CS-26** permitiu

confirmar que a posição 16 foi convertida a éster e que alterações importantes aconteceram no anel A, com modificação tanto em C-2 como em C-3.

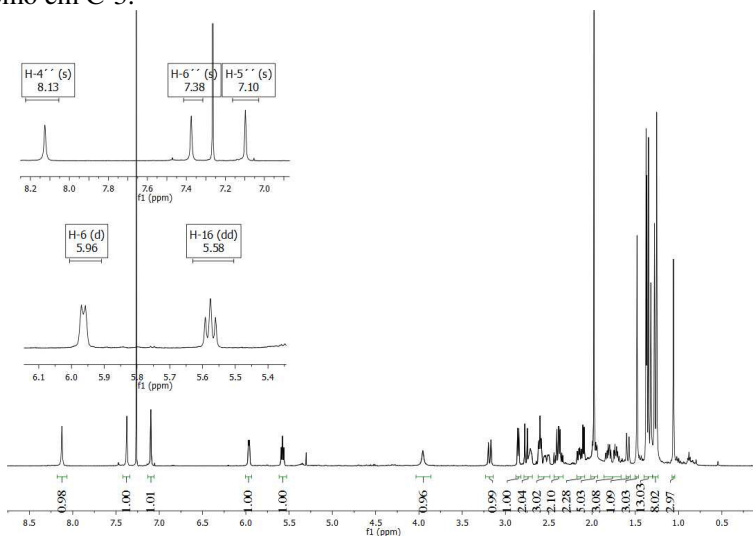


Figura 38: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CS-28, com destaque para os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, H-6 e H-2.

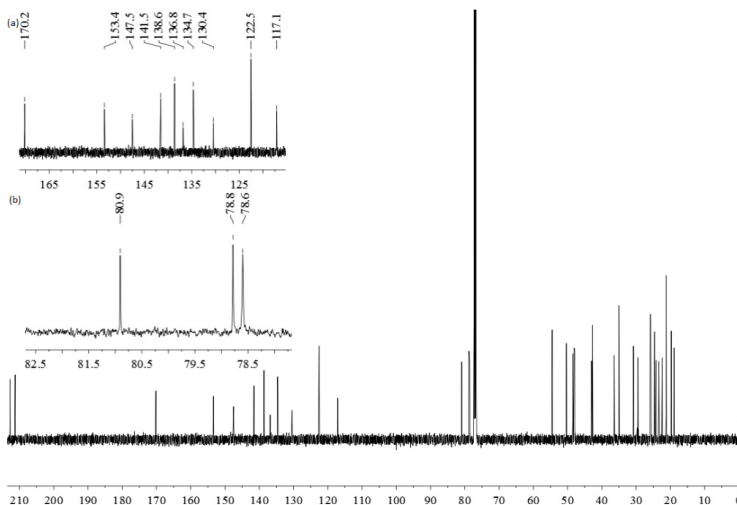


Figura 39: Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3) de CS-28, com destaque para a região de 170 a 115 ppm (a) e de 81 a 78 ppm (b).

Com o auxílio de espectros bidimensionais e a confirmação do espectro de massas foi possível apontar a formação de um carbonato cíclico conjugado ao anel A para **CS-28** (Figura 40).

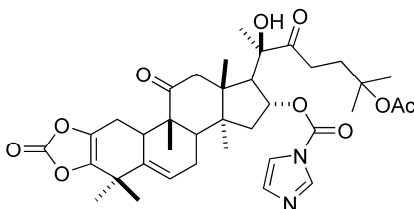


Figura 40: Estrutura molecular de **CS-28**.

A formação de um produto semelhante foi descrita por Datta e col. (1994) a partir do tratamento da 7,10-di-trocacatina III com *t*-butóxido de potássio (Figura 41).

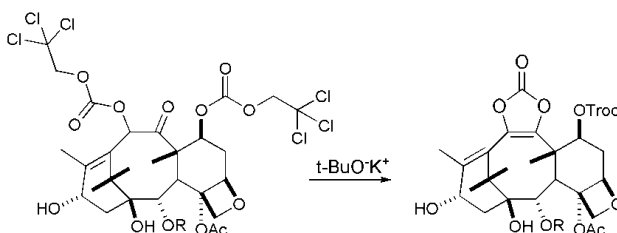
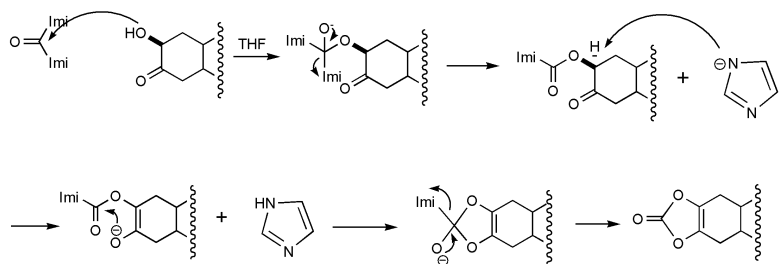


Figura 41: Obtenção de carbonato cíclico a partir de 7,10-di-trocacatina III.

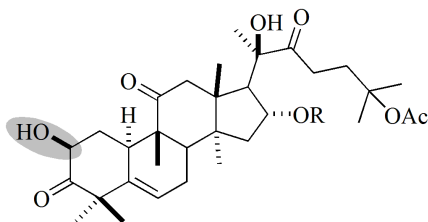
Com relação a **CS-28**, o mecanismo de obtenção do carbonato pode ser explicado pelo ataque nucleofílico inicial do álcool sobre a carbonila do reagente carbonildimidazol. Forma-se um intermediário tetraédrico que sofre eliminação de imidazol e leva consigo um próton dando origem a um enolato. A formação do enolato é seguida pelo ataque intramolecular deste à carbonila do carbonilimidazol, levando à formação do carbonato cíclico (Esquema 11).



Esquema 11: Provável mecanismo para formação do carbonato CS-28.

4.3.4. OBTENÇÃO DE DERIVADOS VIA SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA

Em uma molécula ativa, a substituição de um átomo de hidrogênio por um substituinte ou um grupo funcional pode modificar profundamente a potência, a duração ou até mesmo a natureza do efeito farmacológico. Da mesma maneira, qualquer mudança na estereoquímica relativa de uma determinada molécula pode modificar drasticamente sua forma geral e, conseqüentemente, o seu perfil biológico (WERMUTH, 2008). Nesse sentido procurou-se obter uma série de derivados de cucurbitacinas através de reações de substituição nucleofílica especialmente na posição 2 do anel cucurbitano a fim de avaliar a importância biológica de 2-OH livre e da orientação desse substituinte.



A primeira etapa consistiu na obtenção de um intermediário com bom grupo abandonador, a fim de viabilizar reações de substituição nucleofílica. Com esse objetivo, foram empregadas metodologias de mesilação e tosilção.

A mesilação resultou em um produto instável, sendo abandonada como intermediário sintético. Para a tosilção foram empregadas duas diferentes metodologias, com variação da base empregada.

Utilizando cloreto de tosil, piridina e DMAP (GÁRATE; MAGALHÃES; ROMEIRO, 1998) o grupo 2 β -OH de **CN-1** e de **CN-7** foi convertido em tosilato com 48% (**CS-29**) e 45% (**CS-30**) de rendimento, respectivamente. Apesar de ter sido possível isolar e identificar os produtos desejados, as reações deram origem a uma série de produtos minoritários, o que dificultou a purificação dos compostos. Por esse motivo, uma metodologia alternativa utilizando DABCO em substituição à piridina (HARTUNG et al., 1997) foi aplicada, com tosilção seletiva da posição 2, sem formação de produtos secundários e com rendimento superior a 75% para ambos os precursores. Para

obtenção de alguns derivados de **CN-1**, a hidroxila em C-16 foi acetilada com anidrido acético dando origem ao produto **CS-31**.

Nos espectros de IV das 2-O-tosil cucurbitacinas **CS-29** - **CS-31** são observadas as duas bandas características do grupo tosila na região de 1180 e 1370 cm^{-1} . A incorporação do grupo tosila às estruturas é confirmada nos espectros de RMN ^1H , onde são observados simpletos referentes aos hidrogênios metílicos do grupo tosila (CH_3) na região de 2,45 ppm, bem como dupletos em 7,85 e 7,34 ppm, referentes aos hidrogênios metínicos aromáticos (CH). A Figura 42, relativa ao espectro RMN ^1H de **CS-29**, ilustra tais sinais, presentes também nos espectros de **CS-30** e **CS-31**.

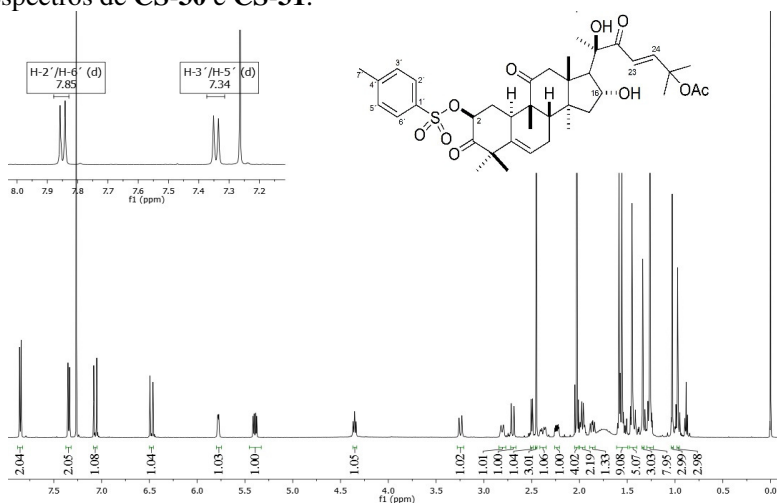


Figura 42: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de **CS-29**, com destaque para os hidrogênios aromáticos do grupo tosila.

Nas reações de substituição procurou-se obter derivados com a maior variedade possível de substituintes, de acordo com a disponibilidade de reagente no laboratório.

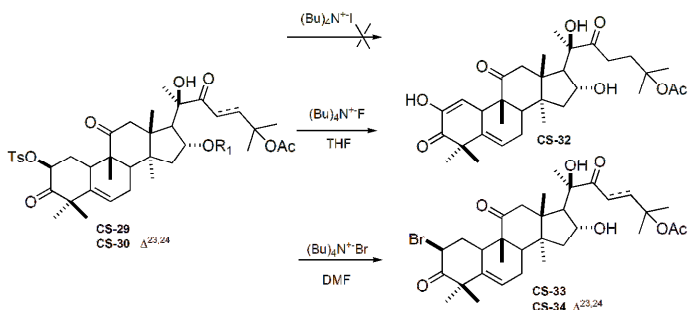
Inicialmente, utilizando acetato de céσιο (10 equivalentes) em DMF, tentou-se inverter a configuração de 2-OH, porém o método resultou em uma mistura complexa de produtos.

Visando a obtenção de cucurbitacinas com halogênios em C-2, reações foram conduzidas com fluoreto, brometo e iodeto de tetrabutilamônio em DMF (Esquema 12) (AMER et al., 2010). Atualmente um em cada três fármacos possui halogênio em sua

estrutura (majoritariamente F e I), sendo estes elementos encontrados em exemplares de praticamente todas as classes terapêuticas (WERMUTH, 2008).

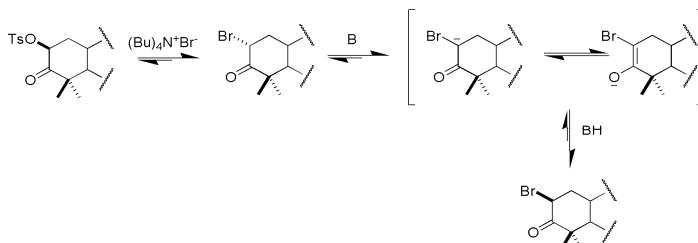
A reação das 2-O-tosil cucurbitacinas **CS-29** e **CS-30** com iodeto de tetrabutilamônio, tanto a temperatura ambiente quanto com aquecimento (50 °C), originou uma mistura de produtos e permitiu a recuperação de parte do produto de partida. Já a reação de **CS-29** com fluoreto de tetrabutilamônio, tanto a temperatura ambiente quando a 0 °C, resultou no composto **CS-32**. Acredita-se que a formação deste produto seja devida a basicidade do reagente, havendo competição entre o fluoreto e a hidroxila, gerando novamente a hidroxil-cetona que se oxida a diosfenol.

Quando submetidos à reação com brometo de tetrabutilamônio em DMF, os intermediários **CS-29** e **CS-30** deram origem aos produtos bromados **CS-33** e **CS-34**, respectivamente (Esquema 12).



Esquema 12: Obtenção de derivados halogenados de cucurbitacinas.

Surpreendentemente, o que se observou tanto no espectro RMN ^1H de **CS-33** (Figura 43) quanto no de **CS-34** foi a manutenção da estereoquímica do substituinte em 2- β , uma vez que não houve modificação nas constantes de acoplamento de H-2 ($J_{1\alpha-2} = 6 \text{ Hz}$ e $J_{1\beta-2} = 13,5 \text{ Hz}$), como seria esperado com a inversão da configuração. Como observado no Esquema 13, a presença de uma carbonila vicinal em C-3 pode ser considerada responsável pelo resultado observado, levando a um intermediário mais estável com substituinte em posição pseudoequatorial, devido à enolização nas condições reacionais.



Esquema 13: Provável mecanismo de formação de derivados via substituição nucleofílica.

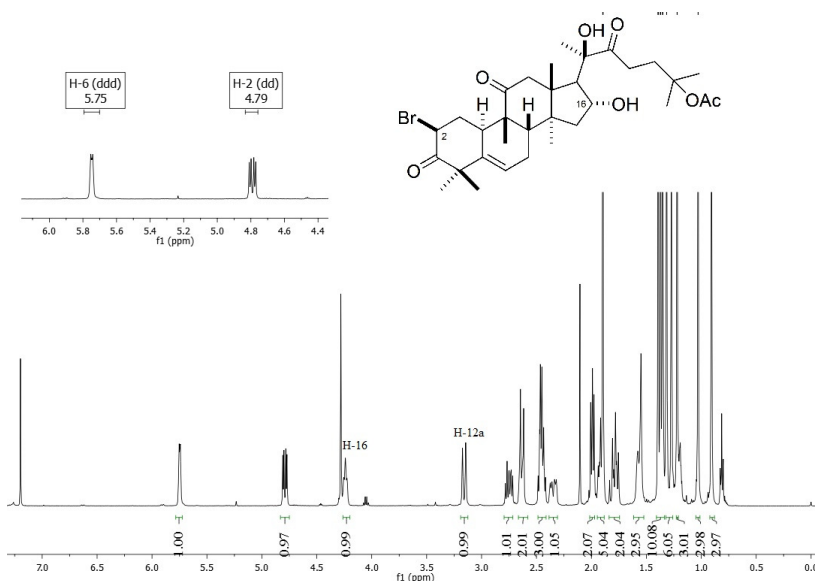
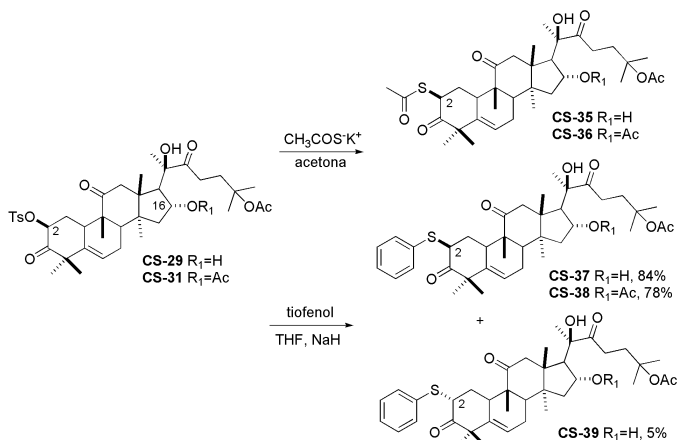


Figura 43: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de CS-33, com destaque para os sinais referentes a H-6 e H-2.

Os reagentes tioacetato de potássio e tienfol também foram empregados em reações para obtenção de derivados com variação do substituinte em C-2. A reação de CS-29 e CS-31 com tioacetato de potássio deu origem aos produtos CS-35 e CS-36, respectivamente, ambos com substituinte pseudoequatorial. Já a reação de CS-29 com tienfol originou os estereoisômeros CS-37 e CS-39 (Esquema 14).

Interessante observar que para a reação com tienfol foi possível obter tanto o produto com substituinte em alfa (α) quanto em beta (β). Na Figura 44, através da comparação entre os espectros RMN

^1H de **CN-1**, **CS-37** e **CS-39** observa-se, além do deslocamento do sinal relativo a H-2 para região mais blindada, a alteração da constante de acoplamento para $J_{1\alpha-2} = 5 \text{ Hz}$ e $J_{2-1\beta} = 7 \text{ Hz}$ em **CS-39**, ocasionada pela modificação do ângulo diedro do novo derivado.



Esquema 14: Obtenção de derivados sulfurados de cucurbitacinas **CS-35** – **CS-39**.

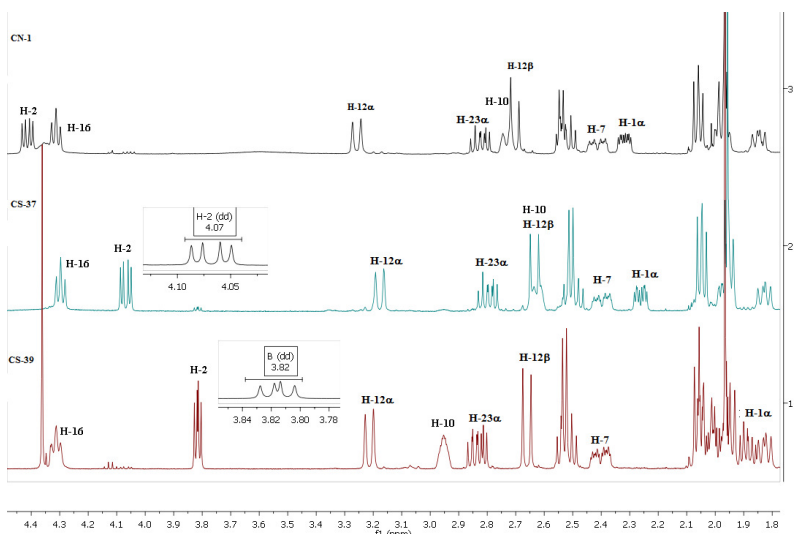


Figura 44: Comparação entre os espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **CN-1**, **CS-37** e **CS-39**.

Ainda com relação aos produtos **CS-37** e **CS-39**, os espectros NOESY mostram a correlação de H-2 α com a metila C-29 (**CS-37**) e de H-2 β com a metila C-18 (**CS-39**) (Figura 45), confirmando o que foi observado no espectro RMN ^1H .

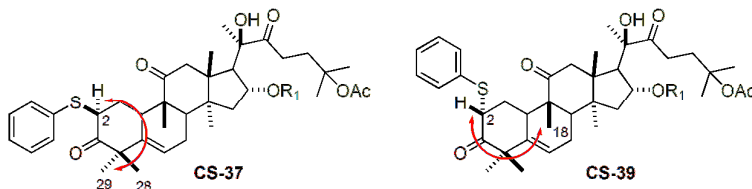
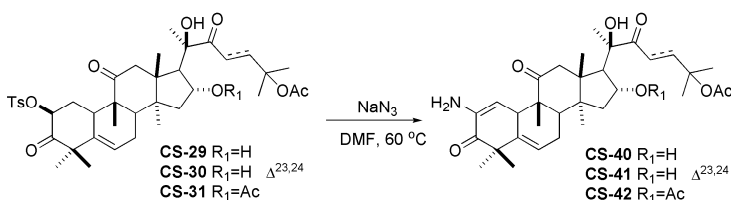


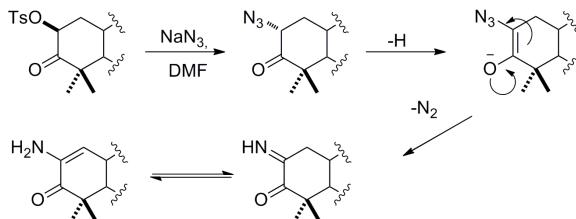
Figura 45: Correlações NOE para **CS-37** e **CS-39**.

Visando a obtenção de um novo intermediário azida, para a síntese de aminas através de hidrogenação catalítica, e de triazóis, através de reações do tipo “Click”, as 2-O-tosil cucurbitacinas **CS-29** - **CS-31** foram submetidas a reação de substituição utilizando NaN_3 , tanto a temperatura ambiente quando sob aquecimento. Todas as reações deram origem a produtos únicos que, quando analisados, revelaram tratar-se das enaminonas **CS-40**, **CS-41** e **CS-42** (Esquema 15) e não de azidas, como esperado.



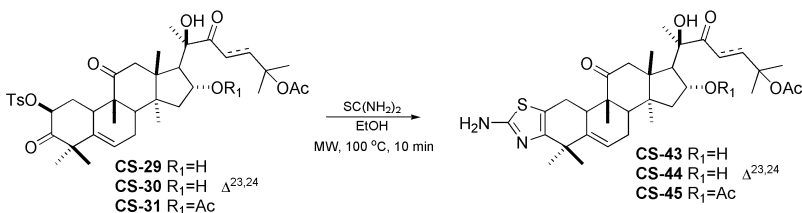
Esquema 15: Síntese das enaminonas **CS-40**, **CS-41** e **CS-42**

Acredita-se que o mecanismo de formação dos derivados **CS-40** - **CS-42** seja semelhante ao descrito por Drögemüller e col. (1998) na síntese de análogos de cefalostatinas. A substituição do grupo tosilato por azida aconteceria em uma primeira etapa, seguida da formação do enolato devido à perda do próton ácido H-2 com subsequente perda irreversível de N_2 , dando origem às enaminonas correspondentes (Esquema 16).



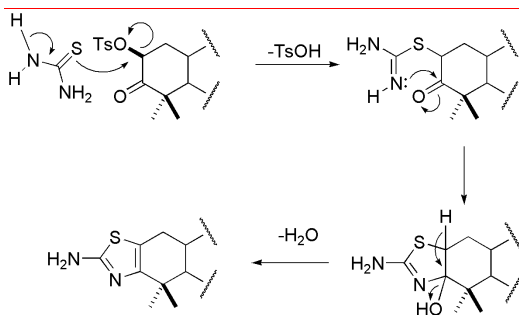
Esquema 16: Provável mecanismo de formação das enaminonas **CS-40** - **CS-42**.

Também foram obtidos três novos compostos através da reação das 2β-O-tosil cucurbitacinas **CS-29** - **CS-31** com tiourea, utilizando aparelho de micro-ondas, como mostrado no Esquema 17.



Esquema 17: Síntese dos aminotiazóis **CS-43**, **CS-44** e **CS-45**.

A formação dos aminotiazóis **CS-43** – **CS-45** ocorre devido ao ataque nucleofílico inicial da tiouréia sobre a 2-O-tosil cucurbitacina, fornecendo um intermediário que sofre ciclização seguida de desidratação para originar os produtos correspondentes (Esquema 18).



Esquema 18: Provável mecanismo de formação dos aminotiazóis **CS-43** - **CS-45**

No espectro de RMN ^1H dos três aminotiazóis observa-se o desaparecimento dos sinais relativos à tosilato e do duplo duplete característico de H-2, que no precursor tosilado encontra-se na região de 5,39 ppm.

No espectro RMN ^{13}C de **CS-45** (Figura 46) observa-se a ausência dos sinais relativos à C-2 e C-3 (região de 78,0 e 203,0 ppm, respectivamente) e presença dos sinais relativos ao aminotiazol, na região de 115,0 ppm (C-2), 150,0 ppm (C-3) e 166,0 ppm (C-1'). Os demais dados encontram-se descritos na parte experimental.

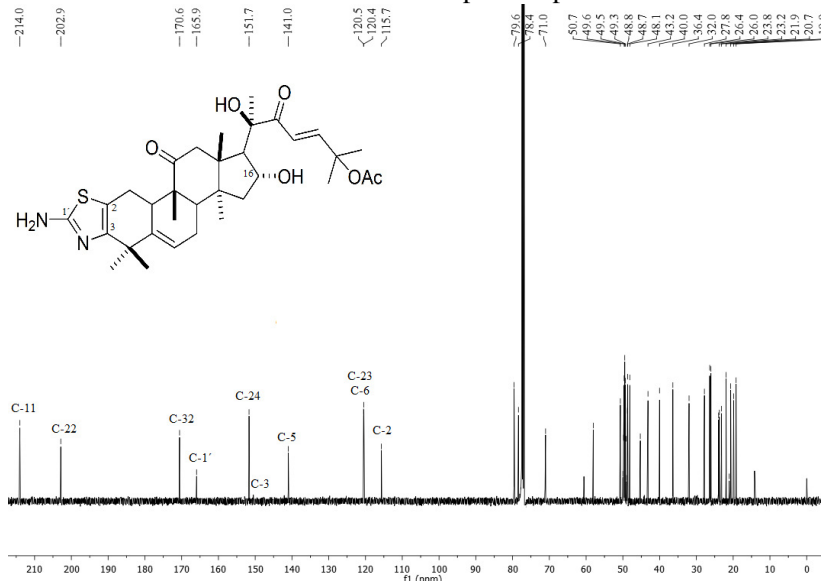
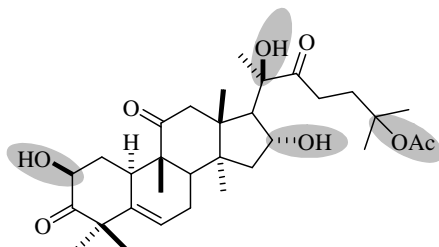


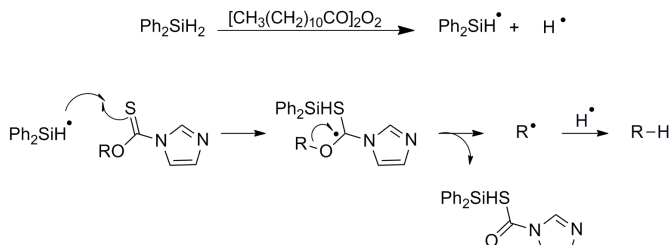
Figura 46: Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de **CS-45**.

4.3.5. OBTENÇÃO DE DERIVADOS VIA DESOXIGENAÇÃO OU DESIDRATAÇÃO

Seguindo o mesmo objetivo exposto no item anterior - avaliar a importância da modificação de grupos funcionais na atividade biológica de cucurbitacinas-, procurou-se sintetizar derivados desoxigenados/desidratados nas posições 2, 16, 20 e 25.



A substituição seletiva de grupos hidroxila por hidrogênios ($R-OH \rightarrow R-H$) é uma importante transformação química, especialmente em moléculas altamente funcionalizadas, como é o caso de grande parte dos compostos bioativos (CHATGILIALOGLU; FERRERI, 1993). Para cumprir essa proposta, visando a desoxigenação de álcoois secundários, foi escolhida inicialmente a metodologia desenvolvida por Barton e McCombie (1975). Esta reação consiste na redução radicalar de derivados tiocarbônicos (xantatos, tiocarbamatos, etc.) empregando agentes redutores, tais como hidreto de tributilestano (Bu_3SnH) ou hidretos de silício, na presença de um iniciador de radicais, como 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN) ou peróxido de lauroila (Esquema 19).

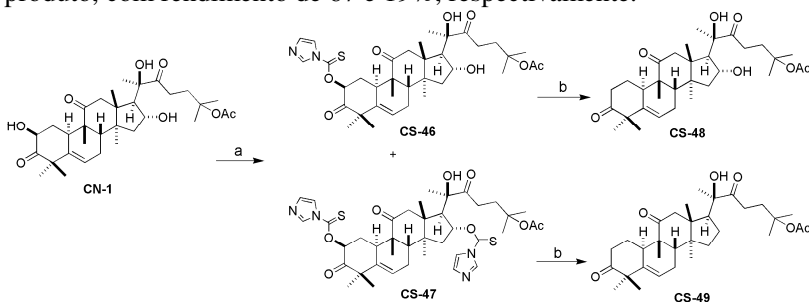


Esquema 19: Mecanismo de desoxigenação radicalar de tiocarbamatos descrito por Barton e McCombie (1975).

Partindo da di-hidrocurcubitacina B (**CN-1**), os tiocarbamatos **CS-46** e **CS-47** foram preparados utilizando excesso de 1,1'-

tiocarbonildiimidazol (TCDI) (Esquema 20). A estrutura dos dois derivados foi confirmada através de seus espectros de RMN ^1H , onde se observa a incorporação do grupamento tiocarbonilimidazólico através da presença de três hidrogênios imidazólicos ($\delta = 7,06, 7,66$ e $8,41$ ppm) em **CS-46** e de seis hidrogênios imidazólicos na mesma região do espectro RMN ^1H de **CS-47**. Os hidrogênios cabinólicos H-2 e H-16 aparecem acima de $6,0$ ppm, deslocamento químico típico para esses derivados, quando as hidroxilas geminais são convertidas a tiocarbonilimidazóis.

O passo seguinte foi a desoxigenação dos tiocarbamatos formados utilizando difenilsilano como redutor e peróxido de lauroila como iniciador radicalar. Em ambos os casos obteve-se apenas um produto, com rendimento de 67 e 19% , respectivamente.



a) TCDI, Et_2Cl_2 , 60°C ; b) $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO})_2\text{O}_2$, Ph_2SiH_2 , tolueno, 115°C

Esquema 20: Síntese dos derivados 2-desóxi e 2,16-di-desóxi-dihidrocurbitacina B **CS-48** e **CS-49**.

Os produtos **CS-48** e **CS-49** foram submetidos a análises espectroscópicas para comprovação das estruturas propostas. Nos espectros RMN ^1H , a informação que chama atenção é a ausência dos sinais correspondentes a H-2 (**CS-48**, Figura 47) e a H-2 e H-16 (**CS-49**, Figura 47). Nos espectros RMN ^{13}C observa-se o desaparecimento de sinais relativos aos carbonos metínicos C-2 e C-16 na região de $71,0$ ppm, com deslocamento dos mesmos para região mais blindada [$38,0$ ppm (C-2) e $21,5$ ppm (C-16)]. Os demais dados de RMN e os dados de IV e massas encontram-se descritos na parte experimental.

Tentativas de desidratação tanto das hidroxilas secundárias quanto das terciárias também foram realizadas. A 2β -tosil-dihidrocurbitacina B (**CS-29**) foi submetida a condições de eliminação utilizando DBU em DMF, a temperatura ambiente ou ainda com aquecimento em banho de silicone (70°C) ou irradiação por micro-

ondas (300 W, 5 min., 50 e 70 °C). À temperatura ambiente não houve formação de produto. Já com aquecimento, tanto de maneira convencional quanto com aparelho de micro-ondas, todo o produto de partida foi consumido, com formação de uma mistura complexa de difícil separação.

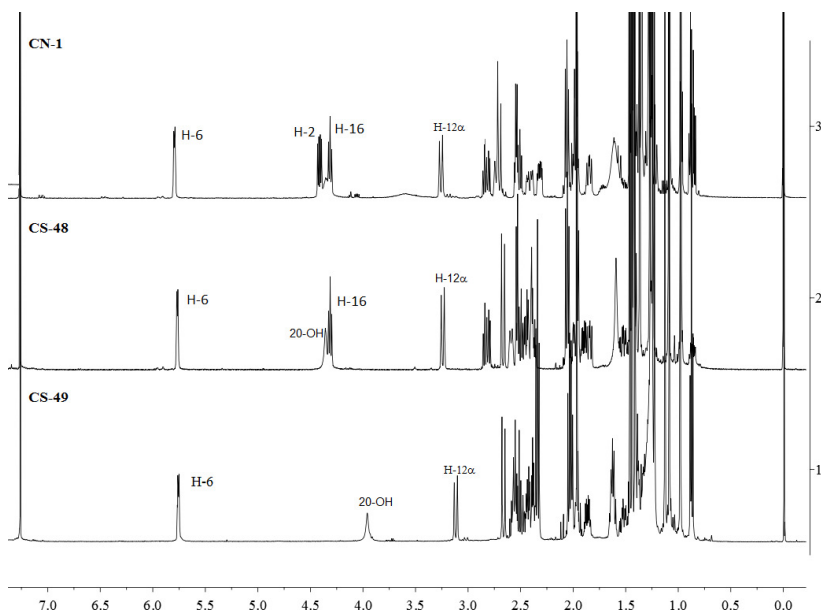
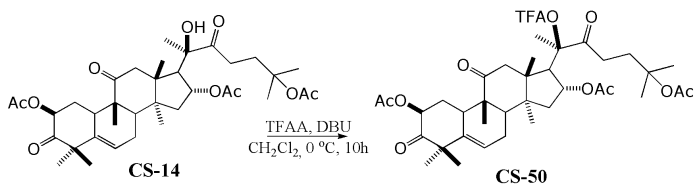


Figura 47: Comparação entre os espectros RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CN-1, CS-48 e CS-49.

Experimentou-se também a desidratação de 20-OH através da reação com os agentes desidratantes POCl₃, SOCl₂ e TFAA. Partindo de CS-14 em DCM, inicialmente a temperatura ambiente, os três reagentes foram testados (2 equivalentes). A reação com POCl₃ não aconteceu mesmo quando aquecida em banho de silicone a 70 °C; com SOCl₂ ocorreu a formação de uma mistura complexa de produtos, tanto a temperatura ambiente, quanto quando a reação foi realizada com resfriamento a 0, -10 ou -30 °C.

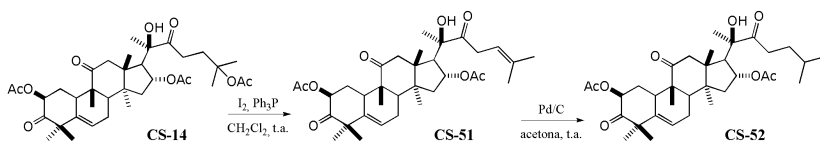
Na reação utilizando TFAA (Esquema 21) houve formação de um produto, que foi isolado e identificado como o derivado 20-trifluoroacetil-di-hidrocurbitacina B (CS-50).



Esquema 21: Síntese do trifluoroacetato **CS-50**.

A fim de eliminar o trifluoroacetato formado em **C-20**, o produto **CS-50** foi submetido a refluxo em DBU:xileno ou DBU:DCM, porém, em ambos os casos o resultado não foi satisfatório, não ocorrendo a eliminação.

Outra metodologia aplicada com o objetivo de eliminar a hidroxila terciária de **C-20** foi a desenvolvida por Alvarez-Manzaneda (ALVAREZ-MANZANEDA et al., 2004; 2005), na qual o complexo iodo-trifenilfosfina é utilizado para a conversão de álcoois e ésteres terciários a olefinas. A metodologia foi testada inicialmente com o composto **CN-1**, dando origem a uma mistura complexa de produtos, oriundos provavelmente de reações paralelas com as hidroxilas livres da molécula. Diante desse resultado, optou-se pela utilização do intermediário **CS-14**, que apresenta as hidroxilas secundárias em **C-2** e **C-16** acetiladas. Tal intermediário possui um éster terciário ao final da cadeia lateral, mas devido ao impedimento causado por duas metilas geminais acreditou-se que a reação não ocorreria nessa posição. Entretanto, quando submetido a análises espectroscópicas, foi possível observar que o produto de reação de **CS-14** com o iodo-trifenilfosfina tratava-se de uma olefina (Esquema 22), produto de eliminação do grupo acetila de **C-25** (composto **CS-51**), sem alteração de **C-20**, provavelmente devido ao impedimento estérico presente. Uma parte do composto **CS-51** foi submetida a hidrogenação com Pd/C, originando o produto **CS-52**.

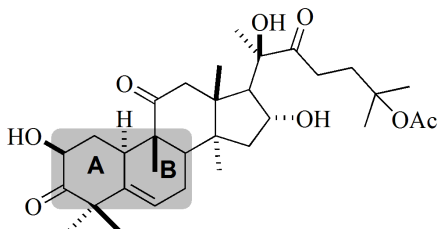


Esquema 22: Síntese dos derivados 25-deacetil-di-hidrocurbitacina B **CS-51** e **CS-52**.

Tentativas de desproteção das hidroxilas secundárias tanto de **CS-51** quanto de **CS-52** utilizando solução metanólica 1M de KOH, NaOH ou K₂CO₃ resultaram em misturas complexas de produtos.

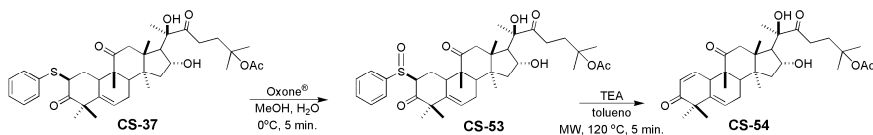
4.3.6. OBTENÇÃO DE DERIVADOS COM CETONA α,β -INSATURADA NOS ANÉIS A E B

A presença de uma cetona α,β -insaturada na cadeia lateral de algumas cucurbitacinas é apontada por muitos estudos como sendo a unidade responsável pela forte citotoxicidade observada para esses compostos (JAYAPRAKASAM; SEERAM; NAIR, 2003, BARTALIS; HALAWEISH, 2005; 2011). Dessa forma, com o objetivo de avaliar a atividade de cucurbitacinas contendo essa funcionalidade em outras partes da molécula, compostos contendo uma cetona α,β -insaturada no anel A (**CS-54**) e no anel B (**CS-55**), foram sintetizados.



Utilizando metodologia descrita por Trost e Curran (1981), o tioéter **CS-37** foi convertido a sulfóxido com a utilização de Oxone[®] (monoperoxissulfato de potássio). De maneira geral, o tratamento por tempos curtos (2 a 5 min.) e baixa temperatura origina o sulfóxido correspondente; o tratamento por períodos mais longos (acima de 5 horas) e a temperatura ambiente dá origem à sulfona correspondente.

Uma vez que o objetivo final era a obtenção de uma cetona α,β -insaturada no anel A, o tratamento com Oxone[®] foi conduzido a 0 °C por 5 minutos, dando origem ao sulfóxido **CS-53**, o qual foi submetido a irradiação com micro-ondas na presença de TEA (300 W, 5 min., 120 °C), originando o produto de eliminação **CS-54** (Esquema 23).



Esquema 23: Obtenção do derivado com cetona α,β -insaturada no anel A, **CS-54**.

No espectro RMN ^1H (Figura 48) do composto **CS-54** observa-se o aparecimento de dois sinais correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-1 (5,98 ppm) e H-2 (6,70 ppm), bem como a mudança da multiplicidade do sinal de H-10 (3,36 ppm). No espectro RMN ^{13}C , constata-se o surgimento de dois sinais correspondentes aos carbonos C-1 (127,3 ppm) e C-2 (145,7) além do desaparecimento do sinal correspondente a C-2, na região de 70 ppm.

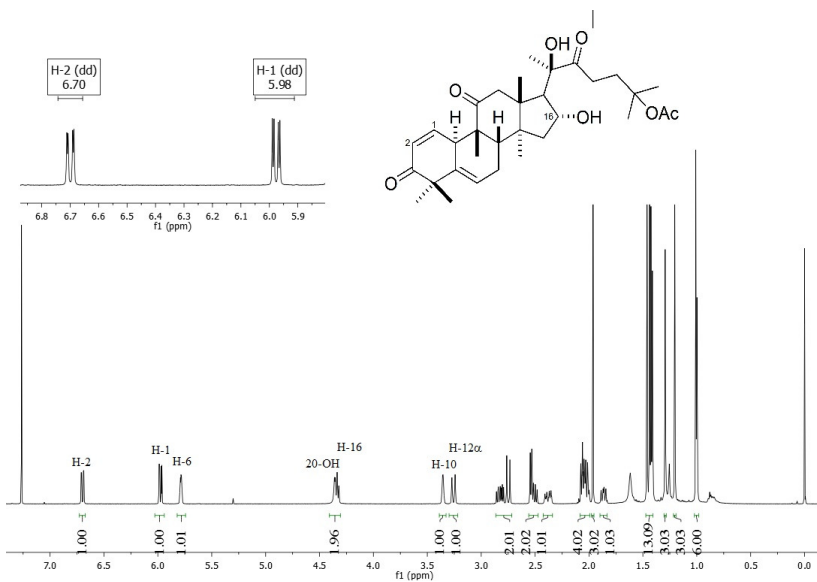


Figura 48: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de **CS-54**, com destaque para H-1 e H-2.

Com o objetivo de formar uma cetona α,β -insaturada também no anel B do esqueleto cucurbitano, **CS-14** foi submetido a condições oxidativas utilizando o complexo $\text{CrO}_3\cdot\text{Py}_2$ (reagente de Collins) (CUI et al., 2009) e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (MISHARIN et al., 2008). A reação com o sal de

croto originou uma mistura complexa de produtos, porém, com a utilização do reagente de Collins foi possível obter o produto desejado (**CS-55**).

No espectro RMN ^1H (Figura 49) de **CS-55** é possível observar que o sinal relativo a H-6 (6,23 ppm), agora aparece como um duplete, com $J_{6-10} = 2$ Hz e H-8, deslocado para 2,59 ppm, passa a ser um simples.

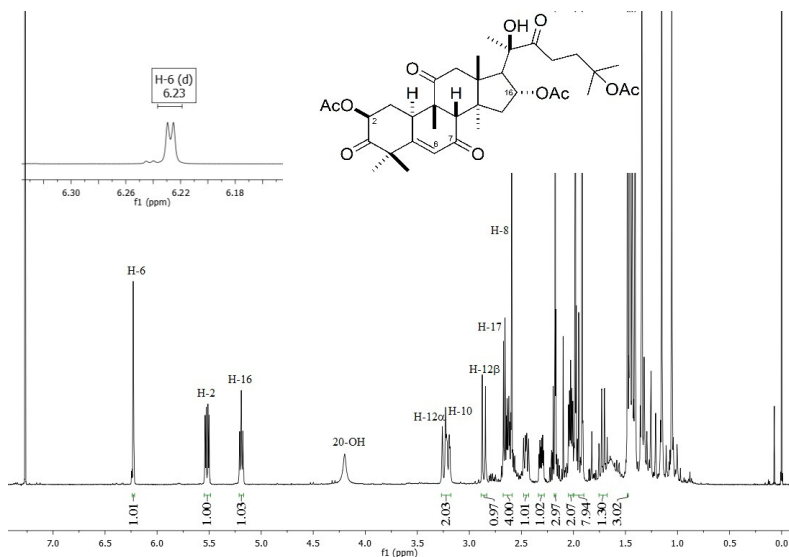


Figura 49: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de **CS-55**, com destaque para H-6.

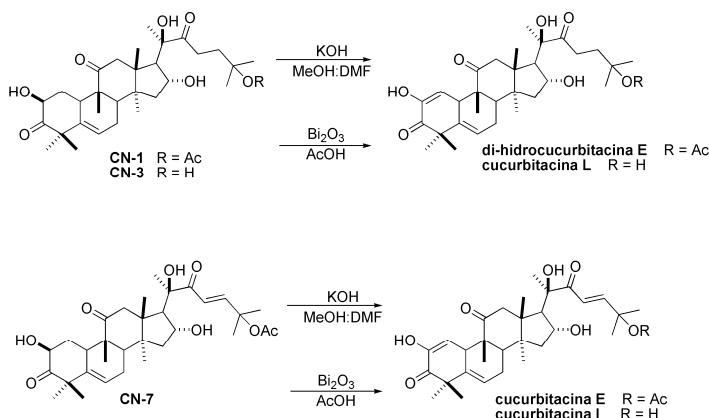
No espectro RMN ^{13}C de **CS-55** observa-se o surgimento de um novo sinal, relativo à carbonila em C-7 (198,3 ppm) e o deslocamento de C-8 para região mais desblindada (57,2 ppm). Os demais dados de RMN e os dados de IV e massas encontram-se descritos na parte experimental.

4.3.7. OBTENÇÃO SEMISSINTÉTICA DE CUCURBITACINAS NATURAIS

A fim de obter as cucurbitacinas L, E, I e di-hidrocurcubitacina E (Esquema 24), presentes nos extratos de *W. ebracteata* e *L. operculata* em quantidade reduzida, os precursores di-hidrocurcubitacina B (CN-1), cucurbitacina R (CN-3) e cucurbitacina B (CN-7) foram submetidos a reações para obtenção de diosfenol no anel A, através de duas diferentes metodologias.

Inicialmente, os três precursores foram submetidos à reação com hidróxido de potássio em DMF e metanol, seguindo metodologia descrita por Wen e col. (2006). Os produtos de reação foram identificados pela comparação entre os espectros RMN ^1H e dados da literatura e com padrões, quando disponíveis no laboratório.

O composto CN-1 deu origem a dois diferentes produtos, di-hidrocurcubitacina E (CS-32) e cucurbitacina L, formada devido à desacetilação da cadeia lateral de CS-32 (Esquema 24). A reação com CN-3 também originou a cucurbitacina L, e CN-7, quando submetido às condições descritas acima, originou uma mistura complexa de produtos, sendo possível identificar, através da comparação com padrões, a formação das cucurbitacinas I e E.



Esquema 24: cucurbitacinas contendo diosfenol no anel A.

Utilizando o método descrito por Rigby e col. (1951), empregando Bi_2O_3 em ácido acético, cada precursor deu origem a um produto único. O composto CN-1 originou somente o produto CS-32 e partindo de CN-3 foi possível obter novamente a cucurbitacina L,

identificada através da comparação com substância de referência. O melhor resultado foi observado na reação de **CN-7**, onde o produto obtido foi identificado como a cucurbitacina E através da comparação com substância de referência.

Seguindo o mesmo objetivo – a obtenção de cucurbitacinas minoritárias em fontes naturais –, além de avaliar a importância da cadeia lateral na atividade biológica dessa classe de compostos, uma rota semissintética envolvendo a estratégia de simplificação molecular foi desenvolvida para a obtenção de hexanorcucurbitacinas. Estas constituem um grupo diferenciado de compostos onde ocorre a perda parcial da cadeia lateral. De maneira geral, esses compostos são encontrados em concentrações reduzidas em plantas da família Cucurbitaceae, dificultando a realização de ensaios biológicos.

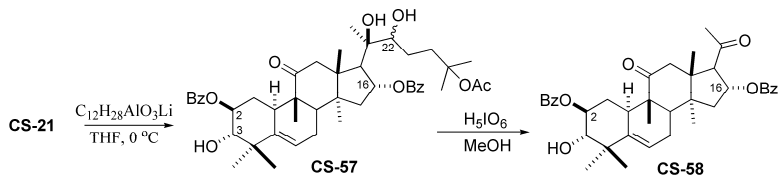
Inicialmente, **CN-1** foi submetido a reação com HIO_4 e NaIO_4 como descrito por Ryu e col. (1995) para clivagem da ligação C-20 – C-22, porém em nenhum dos casos ocorreu a formação de produtos. Optou-se então pela obtenção de um intermediário contendo um diol na cadeia lateral, através da redução da carbonila C-22, a fim de formar um substrato adequado para a clivagem oxidativa no tratamento com HIO_4 .

Para possibilitar a formação de um diol unicamente na cadeia lateral, foi necessária a proteção da hidroxila secundária em C-2, uma vez que o sistema α -hidroxi cetona está presente tanto na cadeia lateral quando no anel A de **CN-1**. Para isso, foram testadas diversas metodologias, que de maneira geral resultaram também na proteção de 16-OH.

As tentativas de proteção das hidroxilas secundárias com TBDS-Cl, TES-Cl e cloreto de benzila não foram eficientes, não ocorrendo formação de produtos nos dois primeiros casos, ou devido a formação de uma mistura complexa de produtos (na reação com cloreto de benzila). Já a acilação utilizando cloreto de benzoíla (**CS-21**) ou anidrido acético (**CS-14**), como apresentado no item 4.3.3., resultou na esterificação de ambas as hidroxilas com rendimento superior a 80%.

Os compostos **CS-14** e **CS-21** foram submetidos à redução com hidreto de *tert*-butoxialumínio, resultando na formação de um produto majoritário (**CS-57**) na reação de **CS-21** (Esquema 21). A redução de **CS-14**, mesmo com a utilização do hidreto volumoso, não foi estereosseletiva, sendo esse intermediário descartado para as próximas etapas.

No passo seguinte, a reação de **CS-57** com HIO_4 permitiu a clivagem oxidativa da ligação C-20 – C-22, com formação de **CS-58** (Esquema 25).



Esquema 25: Clivagem da cadeia lateral de **CS-57**.

No espectro RMN ^1H de **CS-58** (Figura 50) observa-se a presença de sinais correspondentes a seis metilas na estrutura [2,20 ppm (Me-21), 1,36 ppm (Me-30), 1,25 ppm (Me-28), 1,13 ppm (Me-19), 1,07 ppm (Me-29) e 0,76 ppm (Me-18)], não sendo observados os sinais das metilas Me-25 e Me-26, originalmente localizadas na porção terminal da cadeia lateral. Em 5,13 ppm ($J_{1\alpha-2} = 4,3\text{ Hz}$, $J_{2-3} = 10$ e $J_{1\beta-2} = 11,5\text{ Hz}$), o duplo duplo de dupletos correspondente ao H-2, juntamente com o duplo duplo em 3,34 ppm (H-3), semelhantes ao observado nos produtos de redução com hidretos metálicos, **CS-11** e **CS-13**, confirmam a configuração alfa da hidroxila formada em C-3.

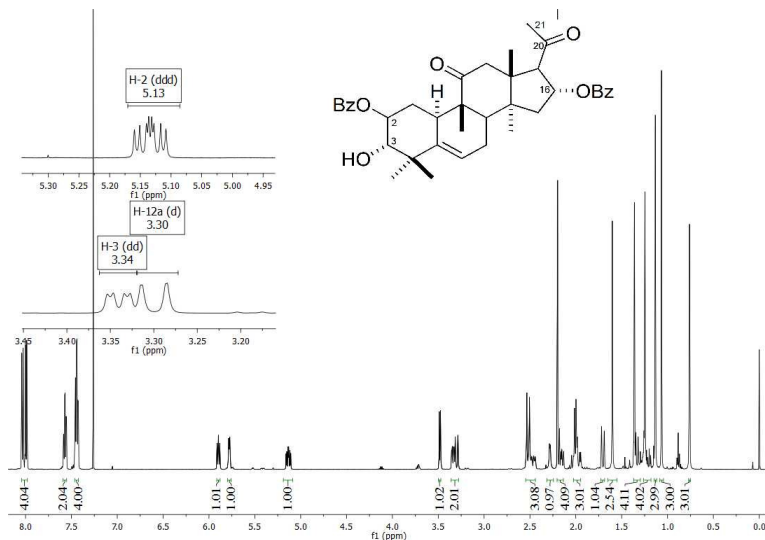
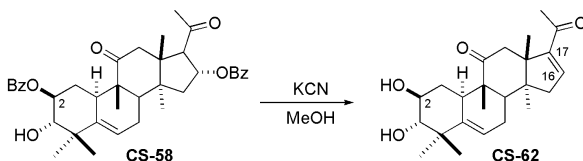


Figura 50: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e estrutura molecular de **CS-58**, com destaque para H-2, H-3 e H-12 α .

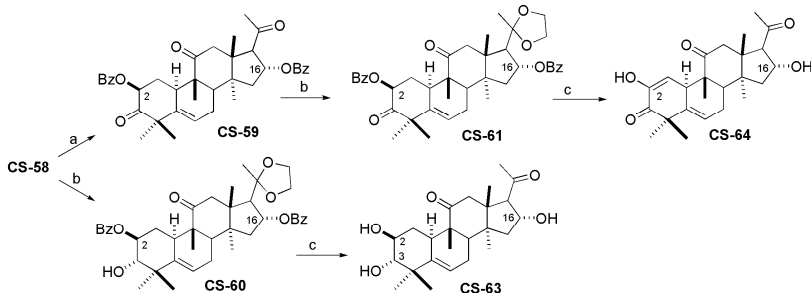
Na tentativa de restabelecer a α -hidroxi cetona no anel A, **CS-58** foi oxidado com PCC para obter o intermediário **CS-59** (Esquema 27). Nessa etapa também foram testados outros agentes oxidantes, como Jones, onde se observou a formação de uma mistura complexa, e Dess Martin, onde não ocorreu formação de produto.

Para evitar a isomerização de C-17, protegeu-se a carbonila C-20 de **CS-58** e **CS-59** com etilenoglicol, dando origem aos acetais **CS-60** e **CS-61** com 79 e 88% de rendimento, respectivamente (Esquema 27).

Para remoção dos grupos protetores foram testadas diversas metodologias, como por exemplo, KCN em MeOH ou DMSO (HERZIG et al., 1986); NaSCH₃ em DMF (DURÁN, 2005) ou ainda NaOH ou K₂CO₃ em MeOH (MASHIMO; SATO, 1970). Com exceção da reação com KCN/MeOH, que resultou na desproteção de 2-OH e eliminação de 16-OH (**CS-62**, Esquema 26), todos os outros métodos resultaram em uma mistura complexa de produtos. Ao final, a remoção dos grupos benzoíla de **CS-60** e **CS-61** foi possível utilizando solução metanólica 1M de KOH e em seguida a carbonila C-20 foi desprotegida com HCl 1M para obtenção dos produtos finais **CS-63** e **CS-64** (Esquema 27).



Esquema 26: Desproteção de **CS-58** com formação de **CS-62**.



a) PCC, BaCO₃, DCM; b) etilenoglicol, HC(OEt)₂, TsOH; c) i) KOH, MeOH, ii) HCl, Et₂O

Esquema 27: Obtenção das hexanorcucurbitacina F (**CS-63**) e I (**CS-64**).

No espectro RMN ^1H de **CS-64** (Figura 51) observa-se que remoção dos grupos protetores deu origem a um diosfenol no anel A, determinado pela presença do duplete em 5,91 ppm ($J_{1-10} = 2,4$ Hz) correspondente a H-1, sinal comum a cucurbitacinas naturais com esse tipo de anel.

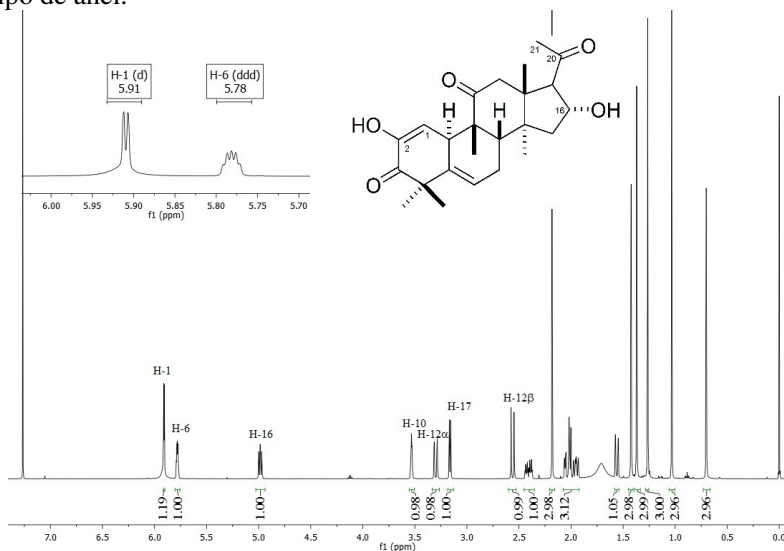
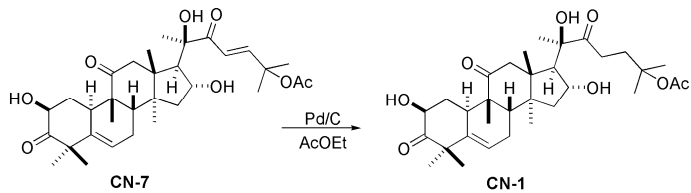


Figura 51: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **CS-64**, com destaque para os sinais referentes a H-1 e H-6.

Ao final, foi possível obter a hexanorcucurbitacina F (**CS-63**) e a hexanorcucurbitacina I (**CS-64**) com rendimento global de 22,5% e 39,6%, respectivamente.

Através de hidrogenação catalítica, utilizando Pd/C, foi possível converter a cucurbitacina B (**CN-7**) em di-hidrocucurbitacina B (**CN-1**) de maneira quantitativa (Esquema 28). A hidrogenação da dupla ligação da cadeia lateral de **CN-7** pode ser confirmada por RMN ^1H pelo desaparecimento dos hidrogênios olefínicos C-23 (6,48 ppm) e C-24 (7,06 ppm) e por RMN ^{13}C pelo desaparecimento dos sinais 120,3 ppm e 151,9 ppm, correspondentes a C-23 e C-24, respectivamente, com surgimento dos sinais 30,7 ppm e 34,8 ppm, referentes aos mesmos carbonos em **CN-1**.



Esquema 28: Obtenção de di-hidrocucurbitacina B (**CN-1**) através da hidrogenação de **CN-7**.

4.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A partir desse item são apresentados e discutidos os resultados da avaliação das atividades anti-herpética, citotóxica e anti-inflamatória das cucurbitacinas naturais e semissintéticas obtidas neste trabalho. Para facilitar a compreensão, essa parte é subdividida em subitens referentes a cada atividade biológica investigada, com uma introdução para atualização sobre o tema, seguida dos resultados biológicos obtidos e as discussões de relação estrutura-atividade.

4.4.1. ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA

4.4.1.1. Introdução

As doenças infecciosas virais, dentre as quais podem ser destacadas as causadas por vírus herpéticos, apresentam participação expressiva no contexto das doenças infectocontagiosas no mundo inteiro (HERGET et al., 2005). Os vírus herpéticos são altamente disseminados na natureza e fazem parte da família Herpesviridae, sendo divididos em três subfamílias: α , β e γ -Herpesvirinae. Atualmente, existem mais de 100 herpesvírus conhecidos, sendo que nove deles podem infectar o homem (DA SILVA, 2000, ROIZMAN, 2007).

Os vírus herpéticos tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) são patógenos comuns que causam infecções localizadas no epitélio da mucosa dos genitais, da cavidade oral, da faringe, do esôfago e dos olhos, dependendo do tipo de vírus envolvido. As infecções herpéticas também podem causar graves problemas aos indivíduos infectados, principalmente em imunocomprometidos (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Estes vírus possuem características particulares, como estabelecimento de infecções latentes, com a capacidade de reativação periódica; podem provocar graves infecções no sistema nervoso central, incluindo encefalite necrosante aguda e meningite, quadros que podem ser fatais em pacientes imunocomprometidos (DA SILVA, 2000).

A infecção causada pelo HSV-1 é resultante do contato de secreções ou tecidos lesados, que contem o vírus, de um indivíduo contaminado para um indivíduo sadio. Os principais sintomas manifestam-se na forma de gengivomastites, queratoconjuntivites, encefalites e lesões cutâneo-mucosas (STUDAHL; CINQUE; BERGSTROM, 2005). Após infectar o novo hospedeiro, o vírus

herpético pode originar um quadro assintomático ou ainda disseminar-se para células nervosas adjacentes ao local da infecção e ali permanecer em estado latente. Nesse último caso, o vírus permanece em latência até que fatores como estresse, febre e alterações hormonais ou situações de imunossupressão congênita, adquirida ou medicamentosa, desencadeiem sua reativação (KOTT et al., 1999, REISS, 2008).

A infecção viral inicia-se com o HSV-1 ligando-se especificamente aos receptores superficiais das células hospedeiras através das glicoproteínas que constituem o envelope viral. A penetração no hospedeiro pode acontecer através de endocitose ou da fusão com a membrana celular, culminando na liberação do material genético no citoplasma e início da replicação viral (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997, PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). A infecção pelo HSV-1 tem como característica principal o surgimento de vesículas com formação contínua de líquido intravesicular. O rompimento das vesículas ocorre entre 24 e 48h após seu surgimento e faz com que o líquido rico em vírus extravase, originando a lesão herpética e caracterizando a fase de maior transmissão viral. Em seguida inicia-se o processo de cicatrização, com formação de um tecido altamente queratinizado, que vai sendo progressivamente substituído pela mucosa labial sadia (MCCORMACK et al., 1996).

O atual arsenal terapêutico para infecções virais compreende cerca de 50 fármacos aprovados para uso clínico, sendo que mais da metade deles é utilizado para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os demais antivirais são utilizados contra o vírus influenza, os vírus das hepatites B e C, vírus respiratório sincicial e vírus herpéticos, incluindo neste último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os HSV-1 e 2 (ROTTINGHAUS, 2007, DE CLERCQ, 2009).

O tratamento das infecções por HSV consiste principalmente de análogos de nucleosídeos (Figura 52), que são substratos para a polimerase viral. Neste grupo encontram-se aciclovir (Zovirax[®], **4**), valaciclovir (Valtrex[®], **36**), penciclovir (Famvir P[®], **37**) e famciclovir (Famvir[®], **38**) (DE CLERCQ, 2004). A administração oral dos fármacos aciclovir e penciclovir na forma dos pró-fármacos valaciclovir e famciclovir, respectivamente, resulta em maiores níveis plasmáticos e aumento da disponibilidade do fármaco ativo (VISALLI; VAN ZEIJL, 2003).

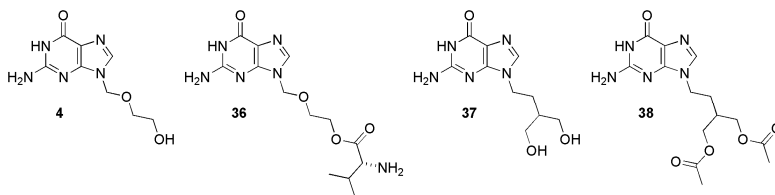


Figura 52: Análogos de nucleosídeos utilizados no tratamento de infecções herpéticas.

O aciclovir é o fármaco de primeira escolha para infecções herpéticas, pois atua seletivamente na replicação viral, sem interferir nos processos bioquímicos das células hospedeiras em doses terapêuticas (LUPI; PEREIRA JR, 2000, BRADY; BERNSTEIN, 2004, ROTTINGHAUS, 2007). Embora seja considerado de baixa toxicidade, altas doses foram associadas com nefrotoxicidade (WAGSTAFF; FAULDS; GOA, 1994) e encefalopatia (ORMROD; SCOTT; PERRY, 2000). Por consequência, a busca por novos agentes anti-herpéticos eficazes, com baixa toxicidade e com estrutura química e mecanismo de ação diferenciado dos fármacos anti-herpéticos atualmente disponíveis é necessária e relevante.

4.4.1.2. Ação antiviral de cucurbitacinas

Em relação à atividade antiviral, são poucos os trabalhos na literatura relacionados às cucurbitacinas, não sendo encontrados relatos de atividade anti-herpética associada a estes compostos.

Algumas cucurbitacinas são citadas como ativas frente ao vírus Epstein-Barr, como a cucurbitacina F e derivados (Figura 53a), isolados de *Cowania mexicana* (KONOSHIMA et al., 1993, KONOSHIMA et al., 1994a, KONOSHIMA et al., 1994b), os glicosídeos de 29-norcucurbitacinas: cayaponosídeos B, B₃, D e C₂ (Figura 53b), isolados de *Cayaponia taiuia* (KONOSHIMA et al., 1995) e os glicosídeos denominados mogrosídeos (Figura 53c), isolados de *Momordica grosvenori* (UKIYA et al., 2002).

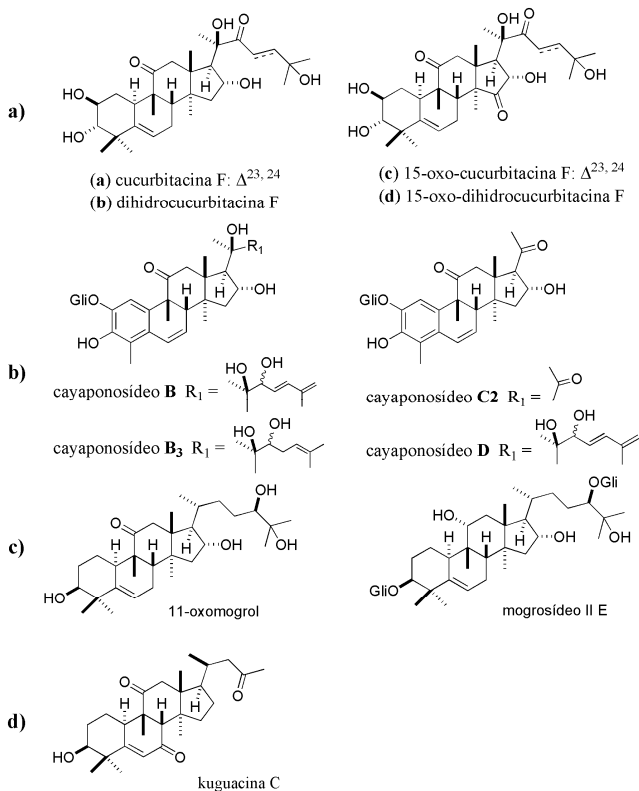


Figura 53: Cucurbitacinas ativas frente ao vírus Epstein-Barr descritas por Konoshima e col. (1993; 1994a,b; 1995) e Ukiya e col. (2002).

A cucurbitacina F e derivados também apresentaram atividade anti-HIV (KONOSHIMA et al., 1993) com índice de seletividade (CC_{50}/CI_{50}) entre 11 e 17. A cucurbitacina B (CN-7) (CHEN et al., 2008a) e a kuguacina C (Figura 53d) (CHEN et al., 2008b), também apresentaram atividade significativa, com IS = 16,7 e 23,7, respectivamente.

Em nosso grupo de pesquisa, ensaios preliminares com o extrato metanólico de *W. ebracteata* revelaram significativa atividade do contra a replicação dos vírus herpéticos HSV-1 e HSV-2 (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005), com IS > 60 para as frações acetato de etila e butanol, o que motivou a investigação complementar dessa atividade.

4.4.1.3. Avaliação da atividade anti-herpética de cucurbitacinas naturais e semissintéticas

A citotoxicidade é definida como um conjunto de alterações da homeostase celular que levam a uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas (NARDONE, 1977). Os atuais programas de busca e desenvolvimento de fármacos envolvem, além da pesquisa das atividades farmacológicas, o estudo da toxicidade dos mesmos, pois ambos são importantes para caracterizar sua eficácia terapêutica e segurança (WILSON, 2000).

Qualquer efeito biológico de um composto frente a um micro-organismo deve ser diferenciado da sua toxicidade em relação às células permissivas ao vírus em estudo. Dessa forma, a citotoxicidade de 33 cucurbitacinas naturais e semissintéticas foi avaliada pelo ensaio do MTT em células VERO, que resultou na determinação dos valores de CC_{50} para cada amostra testada. Em seguida, a avaliação da potencial atividade antiviral dos compostos, utilizando as cepas KOS (sensível ao aciclovir) e 29R (resistente ao aciclovir) do vírus herpético tipo 1, foi realizada pelo ensaio de placas de lise. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 1.

O sal de tetrazólio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que o reduzem em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto conhecido por formazana de coloração roxa, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT é um método sensível e quantitativo, que mede a quantidade de formazana formada, por espectrofotometria, onde o valor da absorbância obtido é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Tabela 1: Citotoxicidade sobre células vero e potencial atividade anti-herpética de cucurbitacinas naturais e semissintéticas

Composto:	Céls. Vero	HSV-1 (KOS)	HSV-1 (29R)
	CC ₅₀ ± D.P. (µM)	CI ₅₀ ± D.P. (µM) (IS)	CI ₅₀ ± D.P. (µM) (IS)
CN-1	83,30 ± 1,59	SA	AS
CN-3	17,60 ± 0,46	SA	AS
CN-4	197,82 ± 5,97	SA	AS
CN-5	10,02 ± 1,96	SA	AS
CN-6	23,93 ± 2,43	SA	AS
CN-7	0,12 ± 0,09	SA	AS
CS-9	587,53 ± 4,03	SA	AS
CS-11	1.070,26 ± 70,26	SA	AS
CS-12	294,60 ± 0,68	SA	AS
CS-13	225,74 ± 16,79	SA	AS
CS-14	> 1.500	SA	AS
CS-15	2,46 ± 0,21	SA	AS
CS-16	> 1.500	SA	AS
CS-20	> 1.500	SA	AS
CS-21	> 1.500	SA	AS
CS-22	> 1.500	SA	AS
CS-23	> 1.500	SA	AS
CS-26	53,63 ± 6,66	SA	AS
CS-27	> 250	SA	AS
CS-36	> 1.500	SA	AS
CS-38	784,42 ± 4,01	SA	AS
CS-42	353,11 ± 0,19	SA	AS
CS-46	53,32 ± 1,03	45,71 ± 2,13 (1,17)	27,68 ± 1,38 (1,93)
CS-49	224,49 ± 0,06	SA	AS
CS-50	> 500	SA	AS
CS-51	292,08 ± 14,39	SA	AS
CS-58	> 500	SA	AS
CS-63	> 500	SA	AS
ACV	> 2.500	0,51 ± 0,02 (> 4.902)	AS

ACV= aciclovir; CC₅₀= Concentração tóxica a 50% das células; CI₅₀= Concentração inibitória a 50%; D.P. = Desvio padrão; IS= Índice de seletividade; SA = Sem atividade. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos, expressos como média ± desvio padrão.

O componente intrínseco da avaliação da atividade antiviral de uma amostra é a determinação do seu índice de seletividade (IS), que indica quão promissora é a atividade antiviral de cada material testado, e é calculado através da razão entre a concentração que causa citotoxicidade a 50% das células (CC_{50}) e a concentração que inibe a multiplicação viral na mesma proporção (CI_{50}), ou seja, quanto maior for o valor do IS, mais seletivo será o material-teste ao vírus e não à célula hospedeira (COS et al., 2006).

Como pode ser observado na Tabela 1, somente o composto **CS-46** inibiu a replicação das cepas KOS (sensível ao aciclovir) e 29R (resistente ao aciclovir) do HSV-1, porém em concentração muito próxima de sua concentração citotóxica, com baixo valor de IS, o que não o caracteriza como um composto anti-herpético promissor.

4.4.2. ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.4.2.1. Introdução

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2011).

Por muito tempo o câncer foi considerado uma doença de países desenvolvidos e com recursos financeiros. No entanto, este panorama vem sendo modificado nas últimas quatro décadas, quando se passou a observar que a maior parte do ônus global do câncer estava associada a países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos. Dessa forma, a patologia ganhou uma dimensão maior nas últimas décadas, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial (INCA, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano 2030, podem ser esperados 27 milhões de novos casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (WHO, 2012). No Brasil, o câncer é a segunda maior causa de mortes, tendo vitimado 7,8 milhões de pessoas em 2008 e com estimativa de afetar 520 mil brasileiros em 2012 (INCA, 2011).

Na década de setenta, as formas clássicas de tratamento para o câncer, que consistiam na associação da remoção cirúrgica dos tumores ao tratamento radioterápico, e/ou a quimioterapia, sofreram alterações significativas com a introdução do conceito de tratamento adjuvante. O emprego intensivo de protocolos pós-cirúrgicos, que incluem a associação de quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação à radioterapia e, mais recentemente, a associação destes aos anticorpos monoclonais, trouxe melhoras nos resultados do tratamento de alguns tipos de cânceres. Infelizmente, muitos tumores ainda apresentam respostas modestas aos protocolos clínicos, limitando a indicação e a eficácia do tratamento adjuvante tanto para os tumores primários quanto para as metástases (KUMAR et al., 2009). Nesse contexto, a busca por novas estratégias terapêuticas mais eficientes, menos tóxicas e invasivas torna-se imperativa para que se possa oferecer ao número crescente de pacientes com doenças malignas, oportunidades reais de controle e/ou cura do câncer.

O século XX apresentou um grande avanço na pesquisa de produtos naturais, e os metabólitos secundários representaram uma importante ferramenta na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos em função da variedade estrutural única neles encontrada (NICOLAOU; CHEN; DALBY, 2009). Segundo levantamentos recentes, mais de 60% dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007, BUTLER, 2008, HARVEY, 2008). Dentre estes, podem ser destacados fármacos como vimblastina (**39**, Velban®) e vincristina (**40**, Oncovin®) e os análogos vindesina (**41**, Eldisine®) e vinorelbina (**42**, Navelbine®); paclitaxel (**43**, Taxol®) e o análogo docetaxel (**44**, Taxotere®); e camptotecina (**45**) e os análogos topotecano (**46**, Hycamtin®) e irinotecano (**47**, Camptosar®) (Figura 54).

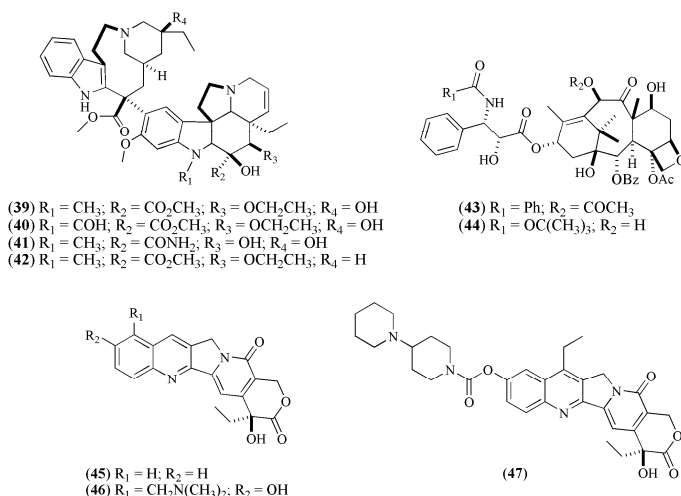


Figura 54: Metabólitos secundários e derivados utilizados na terapia do câncer

A pesquisa de novos fármacos tem tido avanços significativos, principalmente após a introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais podem avaliar várias amostras, em um curto período de tempo, propiciando uma análise estatística consistente dos resultados. Nesse contexto, os métodos de screening *in vitro* utilizando células tumorais humanas são ferramentas importantes para pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos. Eles

permitem que compostos naturais ou sintéticos sejam testados frente a várias linhagens de células cancerosas, possibilitando a descoberta de medicamentos com alta especificidade. Outra vantagem é a rapidez e eficiência do método, já que em poucos dias um número elevado de compostos pode ser avaliado, conferindo agilidade na busca por novos candidatos a fármacos (MONKS et al., 1991, ITHARAT et al., 2004).

4.4.2.2. Ação citotóxica e antitumoral de cucurbitacinas

Cucurbitacinas foram objeto de intensa investigação química e farmacológica nas décadas de 50 e 60, especialmente em relação à atividade antitumoral. No entanto, alguns estudos indicaram elevada toxicidade, o que trouxe consigo, na época, uma redução do interesse nessa classe de substâncias como possíveis fármacos ou protótipos de fármacos.

No final dos anos 80, o NCI (*National Cancer Institute*, EUA) estabeleceu um protocolo para a triagem de novos compostos citotóxicos utilizando 60 linhagens de células tumorais (SHOEMAKER, 2006), impulsionando, dessa forma, a busca por novos compostos naturais com potencial para tornarem-se fármacos antitumorais (LEE; IWANSKI; THOENNISSEN, 2010). A partir desse programa, na década de 1990 observou-se o ressurgimento do interesse na atividade citotóxica/antitumoral de cucurbitacinas, incluindo a análise do mecanismo molecular da ação citotóxica, tanto que são muitos os trabalhos atuais sobre o tema.

Encontra-se na literatura diversas referências da atividade citotóxica de cucurbitacinas frente a vários tipos de células de tumores sólidos, como pâncreas (THOENNISSEN et al., 2009), melanoma (SIQUEIRA et al., 2009, ZHANG et al., 2011), mama (JAYAPRAKASAM; SEERAM; NAIR, 2003, TANNIN-SPITZ et al., 2007, YANG et al., 2007, WAKIMOTO et al., 2008, DUANGMANO et al., 2010), próstata (MUSZA et al., 1994, DUNCAN et al., 1996, CHAU; BANERJEE, 2008), ovário (SADZUKA et al., 2008), pulmão (JAYAPRAKASAM; SEERAM; NAIR, 2003, HSU et al., 2011), rim (FULLER et al., 1994), fígado (CHAN et al., 2010), pele (CHEN et al., 2010), intestino (JAYAPRAKASAM et al., 2003), cérebro (FULLER et al., 1994, JAYAPRAKASAM et al., 2003), laringe (LIU et al., 2008, LIU et al., 2010) e ainda sobre linhagens de células de leucemia (HARITUNIANS et al., 2008, MATSUDA et al., 2010, DING et al., 2011, ISHDORJ; JOHNSTON; GIBSON, 2011). Alguns estudos *in vivo*

comprovam a atividade citotóxica observada *in vitro* para cucurbitacinas no tratamento de tumores de ovário (SADZUKA et al., 2008), laringe (LIU et al., 2008, LIU et al., 2010), pâncreas (THOENNISSSEN et al., 2009, IWANSKI et al., 2010) e melanoma (SIQUEIRA et al., 2009). Outros trabalhos também apontam cucurbitacinas como potentes agentes anti-angiogênicos, inibindo a formação de novos capilares que alimentam os tumores (DUNCAN; DUNCAN, 1997, DONG et al., 2010).

A avaliação da atividade citotóxica de cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata* (descritas no item 4.2) frente a células de carcinoma de pulmão (A549), rabdomiocarcinoma (RD), carcinoma nasofaríngeo (KB) e adenocarcinoma ileocecal HCT-8 foi investigada por nosso grupo de pesquisa e publicada recentemente (LANG et al., 2011).

Apesar do longo e promissor histórico de propriedades citotóxicas/antitumorais, o uso clínico de cucurbitacinas apresenta muitos desafios, principalmente devido à toxicidade inespecífica observada para esses compostos. Uma alternativa interessante para o problema começou a ser avaliada há pouco tempo, através da combinação destas com agentes quimioterápicos conhecidos. Na terapia antineoplásica, muitos fármacos são utilizados em combinação, não somente para melhorar a eficácia do tratamento, mas também para reduzir o surgimento de células tumorais multirresistentes. Além disso, algumas combinações possuem um forte sinergismo, permitindo alcançar o mesmo efeito terapêutico com doses mais baixas e, portanto, com menor toxicidade (LIU et al., 2008). Nesse sentido, trabalhos recentes mostram que algumas cucurbitacinas apresentam forte efeito sinérgico com agentes quimioterápicos já estabelecidos no tratamento de diferentes tumores.

Sadzuka e col. (2008) descreveram, em estudo *in vivo*, que a cucurbitacina E (**9**, Figura 55) promove o acúmulo de doxorrubicina por facilitar o influxo e prevenir o efluxo do quimioterápico das células tumorais, possibilitando a redução da dose necessária para o efeito terapêutico no tratamento de sarcomas de ovário. O aumento da concentração de doxorrubicina também foi observado em células de linfoma resistente tratadas com cucurbitacinas isoladas de *Momordica balsamina* (**49-56**, Figura 56) (RAMALHETE et al., 2009). O sinergismo de cucurbitacina B (CN-7) com docetaxel (LIU et al., 2008) e cisplatina (LIU et al., 2010), no tratamento de tumores de laringe; com gencitabina, no tratamento de tumores de pâncreas (THOENNISSSEN et al., 2009, IWANSKI et al., 2010); e com metotrexato, no tratamento de

osteosarcomas (LEE et al., 2011) foi observado tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

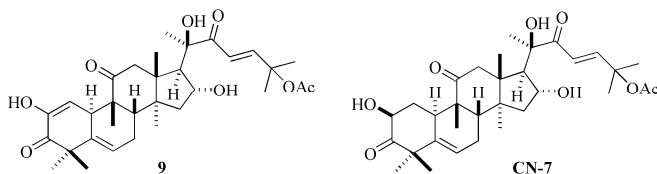


Figura 55: cucurbitacinas E (9) e B (CN-7)

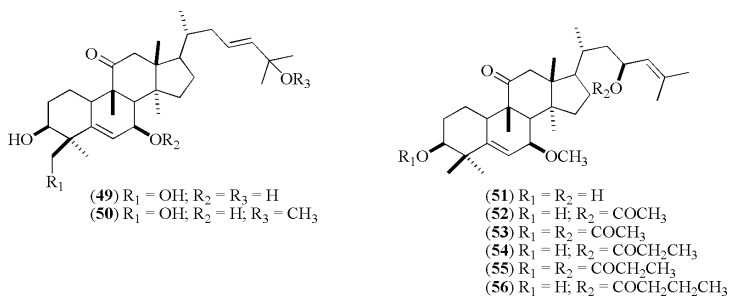


Figura 56: Cucurbitacinas citotóxicas isoladas de *M. balsamina*.

As cucurbitacinas induzem alterações, tanto morfológicas quanto fisiológicas, em células tumorais causando mudanças drásticas no formato das células, tais como arredondamento e inchaço, após poucas horas de exposição (LEE; IWANSKI; THOENNISSSEN, 2010). Algumas destas alterações podem ser explicadas pela desregulação da homeostasia do citoesqueleto causada pelas cucurbitacinas (MUSZA et al., 1994, DUNCAN et al., 1996, ESCANDELL et al., 2008, WAKIMOTO et al., 2008). Estudos recentes mostraram que a cucurbitacina B induziu a agregação dos filamentos de actina do citoesqueleto, em diversas linhagens de células tumorais humanas (HARITUNIANS et al., 2008, WAKIMOTO et al., 2008, YIN et al., 2008, KNECHT et al., 2010). Contudo, diferentemente do observado para os alcaloides da vinca e os taxois, até o momento não há evidências de que as cucurbitacinas afetem a rede de microtúbulos. Outra alteração morfológica relatada em culturas de células tumorais humanas expostas às cucurbitacinas é a formação de células multinucleadas (DUNCAN et al., 1996; SIQUEIRA et al., 2009). De acordo com Duncan e col. (1996), este processo está diretamente relacionado à capacidade destes

compostos de bloquearem a citocinese, uma vez que induzem a desagregação do citoesqueleto, mas não a cariocinese, dependente da ação dos microtúbulos, que não são afetados pelas cucurbitacinas. Além disso, o processo de formação de células multinucleadas pode ser resultado da interrupção do ciclo celular. Muitos trabalhos mostraram que as cucurbitacinas induzem parada de ciclo celular, sobretudo na fase G2/M (SHI et al., 2006, TANNIN-SPITZ et al., 2007, YIN et al., 2008, THOENNISSSEN et al., 2009, CHAN et al., 2010a,b, DUANGMANO et al., 2010, LI et al., 2010, SHAN et al., 2010), e também na fase S (HARITUNIANS et al., 2008). A parada do ciclo celular na fase G2/M ocorre logo após a exposição às cucurbitacinas e resulta em morte por apoptose das células tumorais (SHI et al., 2006).

Outro fator impeditivo para o avanço do desenvolvimento das cucurbitacinas como agentes anticâncer está relacionado à elucidação do mecanismo de ação de desses compostos, que só recentemente, com o avanço das técnicas de biologia molecular, começou a ser desvendado e atualmente vem sendo amplamente investigado. Muitas vias de sinalização de oncogenes estão comumente envolvidas na sobrevivência e na proliferação de células tumorais, tais como JAK-STAT, AKT-PKB e RAF-MEK-MAPK, sendo potenciais alvos para ação de agentes antitumorais, inclusive de cucurbitacinas (LEE et al., 2010). A via JAK-STAT induz a sinalização das Janus-kinases (JAKs) e dos sinais transdutores e ativadores de transcrição (STAT) e regula citocinas e fatores de crescimento. Sabe-se que em muitas células tumorais, a ativação constitutiva de STAT3 e STAT5 desempenha um papel importante na tumorigênese (YU et al., 2004; 2007). Os primeiros relatos do envolvimento da via JAK-STAT na atividade antiproliferativa de cucurbitacinas foi relatado para a cucurbitacina I (**JSI-124**, Figura 56), através da inibição de ambos, JAK2 e STAT3 (BLASKOVICH et al., 2003). Na sequência, muitos estudos confirmaram que a cucurbitacina I é um potente inibidor da via JAK-STAT por bloquear a fosforilação da tirosina do STAT3 e da JAK2, em várias linhagens tumorais (BLASKOVICH et al., 2003, SUN et al., 2005, SHI et al., 2006, SU et al., 2008, VAN KESTER et al., 2008). Além disso, estudos apontam que a cucurbitacina B inibe a fosforilação da tirosina de STAT3, STAT5 e JAK2, em células tumorais pancreáticas e em modelos xenográficos *in vivo* (THOENNISSSEN et al., 2009).

Estudos preliminares a respeito do mecanismo molecular de ação antiproliferativa de cucurbitacinas sugerem que a substituição da carbonila em C-3 por uma hidroxila, como ocorre em cucurbitacina Q

(57, Figura 57) estaria associado à perda da capacidade de inibição de JAK2, com manutenção do efeito inibitório sobre STAT3. Já a existência de uma hidroxila em C-19 (cucurbitacina A, 58), geraria o efeito inverso, com perda da capacidade de inibição de STAT3 e com manutenção do efeito inibitório sobre JAK2 (SUN et al., 2005), indicando que fatores estruturais estariam associados aos diferentes mecanismos moleculares de ação de cucurbitacinas.

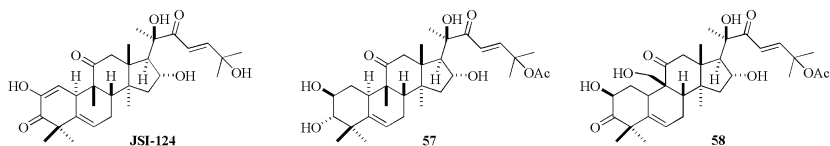


Figura 57: cucurbitacinas I (JSI-124), Q (57) e A (58).

Sabe-se que a STAT3 também apresenta um importante papel em processos inflamatórios, o que permite inferir que parte da atividade antitumoral das cucurbitacinas poderia estar, portanto, relacionada à sua atividade anti-inflamatória (LIN et al., 2007). Aparentemente, cucurbitacinas parecem afetar células tumorais e macrófagos de diferentes maneiras: em células tumorais, tais compostos atuam como inibidores da fosforilação do STAT3, tornando-as mais susceptíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio, durante o processo inflamatório (ESCANDELL et al., 2007a); já sobre macrófagos, as cucurbitacinas atuam como inibidores da via IKK-NFκB, resultando na inibição de enzimas-chave do processo inflamatório, como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que ao serem superexpressas, contribuem efetivamente para a tumorigênese (JAYAPRAKASAM et al., 2003; PARK et al., 2004).

4.4.2.3. Avaliação da atividade citotóxica de cucurbitacinas naturais e semissintéticas

A investigação da atividade citotóxica de cucurbitacinas naturais e semissintéticas faz parte do trabalho de tese de doutorado desenvolvido pela aluna Izabella Thais da Silva, no laboratório de Virologia Aplicada, CCB/UFSC.

O efeito citotóxico de cucurbitacinas isoladas do extrato DCM de *W. ebracteata* foi estudado, através do ensaio colorimétrico do MTT (descrito no item 5.4.2.), em cinco diferentes linhagens tumorais: A549 (carcinoma de pulmão), RD (rabiomiocarcinoma), KB (carcinoma

nasofaríngeo), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal) e N2A (neuroblastoma murino).

Na seqüência, optou-se por avaliar a atividade citotóxica das cucurbitacinas semissintéticas frente à linhagem A549, já que o carcinoma de pulmão de células não-pequenas encontra-se entre os mais frequentes em todo o mundo, apresentando respostas modestas a todos os esquemas quimioterápicos disponíveis (WHO, 2012). A cura para esse tipo de câncer não ultrapassa 50% dos casos (INCA, 2011), sendo, dessa forma, necessária a busca de novas alternativas para melhorar a eficácia do tratamento.

a) Avaliação da atividade de cucurbitacinas naturais em cinco linhagens de células tumorais

A viabilidade das cinco diferentes linhagens de células tumorais, na presença de cucurbitacinas em ao menos seis concentrações foi avaliada pelo método do MTT, após 72 h de tratamento. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Analisando os dados de CC_{50} observa-se que os compostos exibiram atividade significativa frente a todas as linhagens tumorais, com valores entre 0,01 e 33,44 μ M. As cucurbitacinas **CN-4** e **CN-5**, inéditas, apresentaram valores de CC_{50} significativos, na faixa de 2,06 a 6,35 μ M. Os compostos **CN-1** e **CN-6** foram os menos citotóxicos, com CC_{50} acima de 10 μ M, enquanto que **CN-3** e **CN-7** apresentaram elevada citotoxicidade, com valores comparáveis aos fármacos paclitaxel e doxorrubicina.

Tabela 2: Valores de CC_{50}^* de cucurbitacinas isoladas de *W. ebracteata* frente a cinco linhagens de células tumorais

Compostos	Linhagens de células tumorais				
	A549	KB	RD	HCT-8	N2A
CN-1	12,84 ±	14,72 ±	12,73 ±	10,57 ±	33,44 ±
	0,58	0,36	3,75	0,85	10,75
CN-3	1,45 ±	1,57 ±	1,07 ±	3,32 ±	7,22 ±
	0,11	0,21	0,08	0,02	0,80
CN-4	3,82	2,38 ±	2,06 ±	5,09 ±	3,88 ±
	±0,46	0,29	0,07	0,32	3,73
CN-5	4,81 ±	2,79 ±	2,15 ±	2,06 ±	6,35 ±
	0,02	0,86	0,04	0,64	0,97
CN-6	19,51 ±	16,27 ±	13,50 ±	12,80 ±	15,21 ±
	1,92	0,69	1,09	1,56	5,40
CN-7	0,03 ±	0,03 ±	0,010 ±	0,02 ±	0,12 ±
	0,01	0,01	0,001	0,01	0,11
PACLI	0,05 ±	0,006 ±	0,024 ±	0,017 ±	0,170 ±
	0,01	0,001	0,003	0,001	0,055
DOX	1,459 ±	0,335 ±	0,788 ±	1,726 ±	N.D.
	0,159	0,005	0,089	1,131	

* CC_{50} = Concentração tóxica a 50% das células expressos como CC_{50} ± D.P. (μ M); N.D.= Não determinado; Valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Os resultados sugerem que a atividade citotóxica observada para as cucurbitacinas avaliadas poderia estar relacionada com características estruturais presentes na cadeia lateral dos compostos, o que, de fato, já foi descrito por outros autores (VAN DANG; RODE; STUPPNER, 1994, RIOS; ESCANDELL; RECIO, 2005, CHEN et al., 2009, BARTALIS; HALAWEISH, 2005, 2011). Nestes trabalhos afirma-se que a presença da cetona α,β -insaturada seria o fator estrutural mais importante para a atividade de cucurbitacinas. Aqui, confirma-se que a presença desse grupo funcional é importante para a atividade, visto que a cucurbitacina B (CN-7) foi o composto mais citotóxico dentre os testados. No entanto, observa-se que as novas cucurbitacinas, CN-4 e CN-5, apesar de não possuírem insaturação conjugada à carbonila C-22, apresentaram atividade significativa, indicando que ainda não é possível chegar a conclusões seguras sobre as características estruturais que influenciam a citotoxicidade dessa classe.

Mesmo que o número de compostos testados nessa etapa tenha sido reduzido, parece que a atividade citotóxica observada pode não estar correlacionada com a presença ou ausência de um grupo funcional específico, sendo influenciada, provavelmente, por uma combinação de fatores, incluindo a estrutura tridimensional das moléculas.

b) Avaliação da atividade de cucurbitacinas naturais e semissintéticas em células de carcinoma de pulmão A549

Aqui são discutidos os resultados obtidos com a linhagem de células de carcinoma de pulmão A549, objetivando identificar elementos estruturais determinantes da atividade e viabilizar um estudo quantitativo de relação estrutura-atividade.

Métodos *in vitro* de avaliação de atividade citotóxica utilizando células tumorais humanas são ferramentas de grande valor para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, pois possibilitam a triagem de uma grande quantidade de material, de maneira rápida e confiável, possibilitando a descoberta de novos compostos com alta especificidade (ITHARAT et al., 2004).

Em vista do exposto anteriormente - alta incidência e tratamento ineficiente do câncer de pulmão - escolheu-se a linhagem de células A549 para avaliar a atividade citotóxica dos derivados obtidos. Utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, a viabilidade de 32 cucurbitacinas semissintéticas, além das 7 cucurbitacinas naturais, foi avaliada frente às células A549, em 48 e 72 h de tratamento. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

Como pode ser observado, a esterificação das hidroxilas 2-OH e 16-OH de CN-1 (CS-14, CS-16, CS-20, CS-21 e CS-22) e a formação dos carbamatos CS-26 e CS-27 resultaram na perda da atividade citotóxica dos compostos. A oxidação de 16-OH (composto CS-9) levou a um composto menos citotóxico que o precursor CN-1 (26,49 μM vs. 12,09 μM) e a atividade foi perdida quando 2-OH deste derivado foi esterificada (CS-23) ou convertida a enol (CS-10). A influência destas duas hidroxilas também pode ser observada através da obtenção de derivados desoxigenados. A desoxigenação de C-2 (CS-48) resultou na redução da atividade citotóxica, enquanto a desoxigenação de C-2 e C-16 (CS-49) conduziu a um composto com CI_{50} semelhante ao do precursor CN-1.

Os derivados de cucurbitacina B (CN-7) com diferentes substituintes em C-2 (CS-34, CS-41 e CS-44) apresentaram efeito citotóxico promissor, apesar de inferior ao do precursor natural. O derivado 2-bromo de CN-1 (CS-33) apresentou atividade moderada, porém cerca de duas vezes menor que seu precursor (29,09 μ M vs. 12,09 μ M). Apesar de menos ativos, derivados nitrogenados (CS-40 e CS-41) em C-2 abrem caminho para a síntese de compostos com maior solubilidade em meios biológicos, já que muitas cucurbitacinas apresentam solubilidade limitada, dificultando sua avaliação.

Tabela 3: Valores de CC_{50}^* de cucurbitacinas semissintéticas frente a linhagem de células tumorais A549.

Composto	* CI_{50}				(CC_{48}/CC_{72})
	48 h	Intervalo de confiança 95%	72 h	Intervalo de confiança 95%	
CN-1	19,91	16,32 - 24,87	12,09	10,26 - 14,25	1,6
CN-2	37,99	30,88 - 46,75	48,55	36,12 - 65,28	0,8
CN-3	9,585	6,67 - 13,78	1,88	1,14 - 3,08	5,1
CN-4	14,65	10,90 - 19,69	4,1	3,26 - 5,14	3,6
CN-5	11,41	9,01 - 14,46	4,93	4,02 - 6,05	2,3
CN-6	24,64	19,09 - 31,80	21,61	14,72 - 31,72	1,1
CN-7	0,13	0,09 - 0,19	0,04	0,03 - 0,07	3,3
CS-9	54,42	35,65 - 83,09	26,49	19,80-35,45	2,1
CS-10	>100	-	>100	-	-
CS-11	>200	-	>200	-	-
CS-13	121,28	107,96 - 136,23	110,34	91,90 - 132,48	1,1
CS-14	>100	-	72,52	53,46 - 98,38	-
CS-15	14,65	10,90 - 19,70	2,64	1,89 - 3,70	5,5
CS-16	>200	-	>200	-	-
CS-20	>200	-	>200	-	-
CS-21	>200	-	>200	-	-
CS-22	117,53	58,67 - 235,40	112,4	55,86 - 226,16	1,0
CS-23	>100	-	>100	-	-
CS-26	>100	-	>100	-	-
CS-27	>100	-	>100	-	-
CS-32	>100	-	>100	-	-

CS-33	34,93	31,40 - 38,85	29,09	25,21 - 33,58	1,2
CS-34	1,33	0,452 - 3,94	0,12	0,07 - 0,20	11,1
CS-36	>200	-	>200	-	-
CS-38	>200	-	174,37	95,73 - 317,59	-
CS-40	>100	-	>100	-	-
CS-41	0,42	0,16 - 1,13	0,12	0,06 - 0,23	3,5
CS-43	>100	-	>100	-	-
CS-44	28,8	18,98 - 43,71	11,52	6,80 - 19,52	2,5
CS-46	14,65	10,90 - 19,69	6,90	4,49 - 10,60	2,1
CS-48	>100	-	66,74	51,56 - 86,39	-
CS-49	>100	-	11,47	8,99 - 14,62	-
CS-50	>200	-	>200	-	-
CS-51	>100	-	42,6	26,33 - 68,93	-
CS-54	87,77	75,08 - 102,62	77,74	62,83 - 96,18	1,1
CS-55	>100	-	>100	-	-
CS-58	>200	-	>200	-	-
CS-63	>200	-	>200	-	-
CS-64	>100	-	>100	-	-
PACLI	3,69	2,34 - 5,82	1,18	0,89 - 1,55	3,1
DOX	1,16	0,73 - 1,84	0,19	0,11 - 0,32	6,1

*CC₅₀: concentração citotóxica para 50% das células (µM); Para determinação de CC₅₀, os dados experimentais de citotoxicidade foram analisados por regressão não linear e calculados utilizando log(composto) comparado com a resposta normalizada (slope variável), através do software GraphPad Prism.

Como já mencionado, na literatura existem diversos relatos de atividade citotóxica e antitumoral de cucurbitacina B, inclusive em associação com agentes quimioterápicos (SADZUKA et al., 2008, LIU et al., 2008, 2010, RAMALHETE et al., 2009, THOENNISSSEN et al., 2009, IWANSKI et al., 2010, LEE et al., 2011). Estudos preliminares de relação estrutura-atividade apontam a cetona α,β -insaturada, presente na cadeia lateral desse composto, como unidade responsável pela citotoxicidade observada (MUSZA et al., 1994, VAN DANG; RODE; STUPPNER, 1994, RECIO et al., 2004). De fato, esse grupo atua como aceptor de Michael, reagindo com nucleófilos essenciais (p.e. macromoléculas biológicas) que desempenham importante papel no crescimento celular (KUPCHAN et al., 1970). Com o objetivo de explorar essa funcionalidade, foram sintetizados dois derivados com

cetona α,β -insaturada em outras regiões do esqueleto cucurbitano: no anel A (**CS-54**) e no anel B (**CS-55**). O derivado **CS-54** apresentou fraca citotoxicidade enquanto **CS-55** apresentou-se inativo, confirmando a importância da cetona α,β -insaturada na cadeia lateral. Da mesma maneira, a eliminação dessa função (**CS-13**) também resultou em um composto sem atividade.

A acetilação de **CN-7** levou a um composto menos citotóxico, porém a atividade permaneceu elevada (2,64 μM vs. 0,04 μM). Outras modificações foram realizadas na cadeia lateral, como para obtenção de **CS-50** e **CS-51**, porém somente o último composto apresentou atividade moderada (42,6 μM).

Levando em consideração a aparente importância da cadeia lateral para a citotoxicidade de cucurbitacinas, foram obtidos os derivados **CS-63** e **CS-65**, com eliminação de parte da cadeia lateral. Esses compostos, denominados nor-cucurbitacinas, podem ser encontrados em fontes naturais, mas, de maneira geral, estão presentes em baixa concentração, o que dificulta a investigação de suas propriedades biológicas. Quando a citotoxicidade de ambos os derivados foi avaliada frente às células A549, observou-se a perda completa da atividade, sugerindo mais uma vez que a cadeia lateral exerce forte influência sobre a citotoxicidade dessa classe de compostos.

O composto **CS-32** (di-hidrocucurbitacina E) também pode ser encontrado em fontes naturais e já foi descrito como ativo frente a linhagens de linfoma (U937) (MATSUDA et al., 2010), tumor de estômago (NUCG-3) e de pele (HONE-1) (WU et al., 2004), porém frente às células A549, tal composto mostrou-se inativo.

A partir dos resultados apresentados fica evidente que pequenas modificações estruturais podem alterar significativamente a atividade citotóxica de cucurbitacinas. Dentre as 32 cucurbitacinas semissintéticas testadas, algumas apresentaram atividade citotóxica potente a moderada frente às células A549, em particular os derivados da cucurbitacina B **CS-15**, **CS-34**, **CS-41** e **CS-44**.

Os estudos a respeito do mecanismo de atividade citotóxica das cucurbitacinas naturais e semissintéticas estão sendo conduzidos no Laboratório de Virologia Aplicada (CCB/UFSC) e resultados preliminares apontam a morte por apoptose como causa principal da atividade observada para os compostos estudados.

4.4.2.4. Estudo de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR)

O estudo de QSAR aqui apresentado foi realizado através de cooperação com o Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste).

Vinte e dois compostos que apresentaram atividade citotóxica foram utilizados para a construção de um modelo de predição dentro dos objetivos dos estudos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR). Esta metodologia é uma das abordagens englobadas pelo planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, *Computer-Aided Drug Design*), e baseia-se na hipótese de que o comportamento de uma classe de compostos análogos em um sistema biológico *in vitro* ou *in vivo* pode ser quantitativamente descrito por modelos matemáticos multivariados (FERREIRA; MONTANARI; GAUDIO, 2002, DAYAM; NEAMATI, 2003, TAVARES, 2004). Estes modelos devem ser capazes de explicar as relações entre descritores moleculares que codificam aspectos estruturais e propriedades físico-químicas de interesse (variáveis independentes *X*) e uma ou mais atividades biológicas em estudo (variáveis dependentes *Y*). As equações obtidas podem ser utilizadas para realizar a predição dos *Y* de outros compostos (JURS; DIXON; EGOLF, 1994, FERREIRA; MONTANARI; GAUDIO, 2002, ERIKSSON et al., 2003, CARBÓ-DORCA; GIRONÉS, 2004), o que pode ajudar a decidir pela síntese de um novo análogo. O modelo e as informações obtidas são apresentados na Tabela 4.

Dentre os seis descritores selecionados, três são relacionados à distribuição eletrônica e três à geometria da molécula. Um modelo QSAR deve apresentar uma interpretação mecanística. Porém, deve ser considerado que isto nem sempre é possível, especialmente quando o mecanismo de ação biológica pela qual os compostos agem não é exatamente conhecido, e caso o modelo apresente boa capacidade de predição, ele pode ser utilizado (OECD, 2007).

No caso em questão, diversos mecanismos podem estar influenciando na citotoxicidade observada pelos derivados de cucurbitacinas frente às linhagens de células tumorais testadas. De modo geral, substâncias citotóxicas, ou seus metabólitos, podem participar de reações com material genético (DNA) ou estruturas celulares como aceptores de elétrons (LEÃO et al., 2005). Dentre os descritores selecionados, EIGs [*Electrophilicity Index gs (ground state)*], SPP (*Submolecular Polarity Parameter*) e G3p (*3st component symmetry directional WHIM directional index/weighted by atomic polarizabilities*)

podem ser relacionados com este fenômeno: enquanto a presença dos dois primeiros descritores em um modelo QSAR o relaciona à capacidade de uma molécula realizar ataques eletrofílicos (TALETE, 2011), o terceiro foi selecionado em um estudo de Koba e Baczek (2011) associado à capacidade de formação de adutos covalentes com DNA pelo compostos estudados. Já o descritor R5s+ pode apresentar uma relação indireta com este efeito, já que Stachulski e col. (2011) o selecionaram em um estudo QSAR do efeito antiviral (HCV) de tiazolidas, onde foi observado que os compostos em análise poderiam agir como receptores de ânions.

A hipótese de que o modelo QSAR obtido pode estar relacionado com realização de ataques eletrofílicos pela cucurbitacinas encontra certo suporte em outros trabalhos da literatura, em especial estudos QSAR com compostos não relacionados entre si e com as cucurbitacinas, mas onde o fenômeno biológico estudado era a apoptose celular: Afantitis e col. (2006) selecionaram a energia do orbital molecular desocupado mais baixo (E_{LUMO}) e relacionaram sua presença no modelo com uma característica de mais fácil aceitação de elétrons pelos compostos que induzem a apoptose. Este descritor também foi selecionado por Takano e col. (2009) como relacionado à capacidade dos compostos estudados em fragmentar DNA. Qin e col. (2011) obtiveram um modelo com descritores eletrônicos que foram relacionados com a capacidade dos compostos interagirem mais facilmente com o DNA. Finalmente, Hansch e col. (2003a; 2003b) relacionaram a presença dos descritores refratividade molar (RM) e logaritmo do coeficiente de partição 1-octanol/água (LogP) com a interação com o DNA.

O descritor q10, a carga parcial atômica do átomo 10 do anel A, é relacionado à modificação da distribuição eletrônica desta região dos derivados. Apesar de não ser relacionado com a hipótese levantada, sua presença no modelo obtém suporte em outros estudos QSAR relacionados à toxicidade de cucurbitacinas, onde também foram selecionadas cargas parciais desta parte da molécula (BARTALIS; HALAWEISH, 2011, VAN DANG; RODE; STUPPNER, 1994).

Tabela 4. Modelo QSAR obtido e suas respectivas informações estatísticas.
 $\text{Log1/CI}_{50}^{(1)}=4,701-29,830(\text{G3p})+42,984(\text{G2v})-18,126(\text{q10})-$
 $3,717(\text{R5s+})10,737(\text{SPP})+59,750 (\text{Eigs})$

Parâmetro	Definição	Resultado recomendado	Resultado encontrado
Validação interna (n=18⁽²⁾)			
R^2	Coefficiente de determinação	$R^2 > 0,6$	0,887
SEC	Erro padrão da calibração	Menor possível	0,395
$F_{(p,n-p-1)}$	Teste F	Maior que o valor de referência (F crítico, com 95% de confiança)	36,542
Q^2_{LOO}	Coefficiente de determinação da validação cruzada <i>leave-one-out</i> (LOO)	$Q^2_{\text{LOO}} > 0,5$	0,709
SEV	Erro padrão da validação LOO	Menor possível	0,556
$r^2_{\text{m}}(\text{LOO})$	Coefficiente de correlação ao quadrado entre os valores preditos e observado: na validação cruzada modificado por Roy	$r^2_{\text{m}}(\text{LOO}) > 0,5$	0,714
Validação externa (n=5⁽³⁾)			
R^2_{pred}		$R^2_{\text{pred}} > 0,5$	0,811
SEP	Erro padrão da validação externa	Menor possível	0,299
$r^2_{\text{m}}(\text{pred})$	Coefficiente de correlação ao quadrado entre os valores preditos e observado: na validação externa modificado por Roy	$r^2_{\text{m}}(\text{pred}) > 0,5$	0,531
$ R^2_0 - R^2_0 $	Estatística de Gobraikh-Tropsha – diferença entre os	$ R^2_0 - R^2_0 < 0,3$	0,077

coeficientes de determinação dos valores de $y_{pred}-y_{obs}$ e $y_{obs}-y_{pred}$ centrados na origem			
k	Estatística de Gobraikh-Tropska – inclinação da reta y_{pred}	$-0,85 \leq k \leq 1,15$	0,984
k'	Estatística de Gobraikh-Tropska – inclinação da reta y_{obs}	$-0,85 \leq k' \leq 1,15$	1,012

(1) atividade citotóxica (CI_{50}) convertida em seu correspondente valor logarítmico inverso; (2) corresponde ao número de compostos efetivamente utilizado para a construção do modelo; (3) corresponde ao número de compostos utilizados para testar a capacidade de predição do modelo e que não foram utilizados em sua obtenção (compostos **CN-7**, **CS-13**, **CS-38**, **CS-41** e **CS-51**).

Já o descritor $G2v$ (*2nd component symmetry directional WHIM directional index/weighted by Van der Waals volumes*), não apresenta uma relação (ao menos, visível ou suportada por outros dados) com o mecanismo biológico em estudo. Porém, observando que uma atividade biológica é um fenômeno multivariado, sua presença no modelo pode estar descrevendo algum outro fenômeno relevante (por exemplo, a partição através das membranas celulares). Como este descritor é ponderado pelo volume de Van der Waals, pode então estar descrevendo que o tamanho da molécula também é relevante para a atividade citotóxica.

Assim, é possível sugerir que o modelo indica que o mecanismo de ação dos compostos estudados é relacionado principalmente a ataques eletrofílicos em estruturas celulares ou material genético, um mecanismo de citotoxicidade clássico. Dados de estudos independentes encontrados na literatura da área dão suporte a esta possibilidade.

4.4.3. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.4.3.1. Introdução

A inflamação é um processo que envolve uma série de eventos gerados por estímulos tais como micro-organismos, isquemia, interações antígeno-anticorpo e injúrias químicas, térmicas ou mecânicas. A resposta inflamatória ocorre em três fases distintas, mediada por diferentes mecanismos: um agudo caracterizado por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, uma fase subaguda caracterizada por infiltração de leucócitos e células fagocíticas e uma fase proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração do tecido e fibrose (ROTELLI et al., 2003).

A reação inflamatória envolve o reconhecimento do agente ou do estímulo lesivo, para sua posterior destruição e formação de um novo tecido. O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune, resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores inflamatórios que são responsáveis pelos cinco sinais clássicos da inflamação: dor, rubor, calor, edema e perda da função (SCHMID-SCHONBEIN, 2006, MEDZHITOV, 2008).

O sistema fagócito mononuclear é composto por dois tipos de células que participam na defesa do sistema imune do hospedeiro, desenvolvendo funções distintas: macrófagos e monócitos. Os macrófagos tem a função de remover antígenos particulados e atuar como células apresentadoras de antígeno, internalizando e apresentando antígenos aos linfócitos T (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Os monócitos encontram-se circulando no sangue e, quando necessário, migram para diferentes órgãos e cavidades do corpo em resposta a um estímulo lesivo, diferenciando-se em macrófagos (KIS-TOTH; TSOKOS, 2010)

A inflamação é desencadeada pela liberação de mediadores químicos originados nos tecidos lesados e nas células migratórias, que provocam distúrbios na membrana celular ocasionando a ativação da fosfolipase A2 e liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos, PAF-acéter (fator ativador de plaquetas) e enzimas lisossômicas. Essas enzimas têm potente atividade citotóxica e destroem células vizinhas, liberando assim novas enzimas. O metabolismo do ácido araquidônico dá origem a inúmeras substâncias biologicamente ativas como prostaglandinas, tromboxanos, ácido hidroxieicosatetraenóicos e hidroperoxieicosatetraenóicos, leucotrienos, lipoxinas e ácidos

epoxideicosatetraenóicos, que tem importante papel na fisiopatologia da inflamação.

A lesão inicial do tecido ocasiona a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, entre outros. Também são de grande importância a citocina pró-inflamatória interleucina-1 (IL-1) e as citocinas inflamatórias IL-2, IL-6, IL-8, o fator de necrose tumoral, o fator ativador de plaquetas, o fator complemento, entre outros (BURQUE; SMYTH; FITZGERALD, 2006, SERHAN; CHIANG; VAN DYKE , 2008).

As citocinas possuem um importante papel na regulação do processo inflamatório, induzindo a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos, promovendo o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação, na resposta inflamatória aguda (TAYAL; KALRA, 2008). A presença de elevadas concentrações de citocinas estimula a produção de óxido nítrico (NO) nos tecidos, o qual está envolvido em várias etapas dos mecanismos humorais e celulares que acontecem durante uma resposta inflamatória. No processo inflamatório agudo o NO é essencial devido a duas ações principais, a de vasodilatação, que tem papel fundamental em tal processo, e a sua ação como agente citotóxico, contra micro-organismos. O NO também interfere no processo inflamatório agudo por inibição da adesão/agregação plaquetária e a adesão leucocitária (MEDZHITOV, 2008).

A ação anti-inflamatória de grande parte dos fármacos empregados atualmente é devida a atuação sobre o metabolismo do ácido araquidônico. Conhecidos como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), esses fármacos tem como ação principal a inibição da síntese das PGs. Em graus variáveis, todos os AINEs são também analgésicos, antipiréticos e inibidores da agregação plaquetária. Além disso, grande parte está associada a efeitos adversos em diversos sistemas do organismo, com destaque para o gastrointestinal e o cardiovascular (BURQUE; SMYTH; FITZGERALD, 2006).

Como exposto, as doenças inflamatórias são caracterizadas por vários fatores que agregados a diferentes causas constituem diversos alvos para seu tratamento. Dessa maneira, a busca contínua por alternativas terapêuticas mais eficientes e com diferentes mecanismos de ação para seu tratamento mostra-se relevante diante das opções terapêuticas atuais.

4.4.3.2. Ação anti-inflamatória de cucurbitacinas

Muitas plantas utilizadas tradicionalmente para tratar condições inflamatórias possuem triterpenos em sua constituição e a investigação de suas propriedades farmacológicas em diferentes ensaios, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, indica que os mecanismos de atividade vão desde a supressão de prostanoídes e citocinas até a peroxidação lipídica (SAFAYHI; SAILER, 1997).

Estudos biológicos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, realizados com a fração DCM de *W. ebracteata*, rica em cucurbitacinas, revelaram uma potente ação antiedematogênica e analgésica. Especificamente, foi observado que tal fração causa diminuição do edema de pata induzido pela carragenina, redução da dor induzida pela formalina e das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos (PETERS; FARIAS; RIBEIRO-DO-VALLE, 1997). Outros estudos demonstraram a atividade anti-inflamatória da fração DCM na pleurisia induzida por carragenina (PETERS et al., 1999), em camundongos, bem como na artrite induzida por zimozana, em ratos (PETERS et al., 2003).

Estudos recentes com a di-hidrocucurbitacina B (CN-1), substância majoritária na fração DCM de *W. ebracteata*, mostraram inibição do edema de pata induzido por carragenina, em ratos, na dose de 3 mg/kg (i.p.) e inibição da migração de células para a cavidade pleural, no teste da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, em doses de 10 mg/kg (i.p.) (SIQUEIRA et al, 2007). A avaliação tanto do extrato quanto de CN-1 apontou a participação das vias das enzimas NO sintase e ciclooxigenase, como principais responsáveis pela atividade anti-inflamatória observada (PETERS et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2007).

Um diglicosídeo da cucurbitacina R (CN-3) (posições 2 e 25), isolado das raízes de *Bryonia alba* L., inibiu a elevação da concentração plasmática de PGE₂ de ratos submetidos a estresse por imobilização. Também foi constatada inibição da liberação de ácido araquidônico, o que diminui a biossíntese de eicosanóides, e aumenta a biossíntese e secreção de corticosteróides. Estes estudos foram realizados objetivando a caracterização de plantas adaptógenas, considerando que o estresse aumenta os níveis plasmáticos de eicosanóides e diminui os de PGE₂. Segundo os autores, esses achados podem explicar por que plantas que contém cucurbitacinas são utilizadas em doenças que podem ser tratadas estimulando-se o córtex da adrenal como inflamação e alergia

(PANOSSIAN; GABRIELIAN; WAGNER, 1997, WAGNER; NORR; WINTERHFF, 1994).

As cucurbitacinas R (CN-3) e di-hidrocurcubitacina B (CN-1) apresentaram importante atividade anti-inflamatória frente a diversos modelos de inflamação, induzidos por diferentes agentes flogísticos, causando redução de edema e de infiltração celular além da redução da migração de diferentes citocinas envolvidas no processo inflamatório (RECIO et al., 2004). Adicionalmente, em modelo de artrite adjuvante, esses compostos modificaram a evolução dos sintomas clínicos de artrite com redução dos sinais observados através de exames histopatológicos. Nesse mesmo estudo, observou-se uma redução significativa da expressão de enzimas e de mediadores pró-inflamatórios no local da inflamação, sendo que para a di-hidrocurcubitacina B, um estudo mais detalhado mostrou a redução da síntese, liberação e atividade dessas enzimas assim como de outros mediadores (ESCANDELL et al., 2006, 2007).

As cucurbitacinas B (CN-7) e E (9, Figura 55) isoladas das raízes de *W. ebracteata* apresentaram atividade anti-inflamatória na dose de 1 mg/kg quando administradas por via intraperitoneal (i.p.), no modelo de edema de pata induzido por carragenina, em ratos (PETERS; FARIAS; RIBEIRO-DO-VALLE, 1997). A cucurbitacina E também foi investigada no teste da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, apresentando, na dose de 1 mg/kg, via i.p., 50% de inibição do extravasamento plasmático e da migração celular. Peters e col. (1999), buscando possíveis mecanismos da ação anti-inflamatória da cucurbitacina B, observaram, *in vivo*, a inibição da produção de prostaglandina PGE₂ na dose de 0,1 mg/kg; i.p., Ainda, foi observado que há participação das vias das enzimas NO sintase e ciclooxigenase, com maior ênfase em um efeito inibitório sobre a ciclooxigenase-2. (PETERS et al, 2003). Corroborando com esses resultados, Jayaprakasam e col. (2003), avaliaram a ação inibitória das cucurbitacinas B, D, E e I sobre as isoformas 1 (COX-1) e 2 (COX-2) da enzima ciclooxigenase. Os 4 compostos apresentaram significativa inibição da COX-2, sem inibição significativa da COX-1. Dessa forma, pode-se sugerir que as vias do óxido nítrico e das ciclooxigenases seriam as responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade anti-inflamatória exibida pelas cucurbitacinas testadas.

4.4.3.3. Avaliação da potencial atividade anti-inflamatória *in vitro* de cucurbitacinas naturais e semissintéticas

A avaliação da potencial atividade anti-inflamatória de cucurbitacinas naturais e semissintéticas foi realizada através de colaboração com a empresa Trial Pharma, Florianópolis, SC.

Inicialmente, avaliou-se a citotoxicidade dos compostos em culturas celulares de macrófagos (J774, ATCC), na concentração de 10 μM (Tabela 5, coluna 2), sendo selecionados para a segunda etapa apenas os compostos menos tóxicos às células (viabilidade > 85%), além de **CN-1**. Esses compostos foram testados quando a inibição de NO (CI_{50}), através da quantificação de nitrito nas mesmas células iniciais, estimuladas com LPS, metodologia que confere um indicativo de atividade anti-inflamatória. A concentração tóxica (CL_{50}) para 50% das células também foi estimada e uma relação entre a $\text{CL}_{50}/\text{CI}_{50}$ permitiu definir os compostos mais promissores, com maior eficácia e menor citotoxicidade, para estudos futuros de atividade anti-inflamatória.

Na Tabela 5, percebe-se que os derivados da cucurbitacina B, **CS-34** e **CS-44**, são os mais potentes, com $\text{CI}_{50} = 0,66$ e $1,04 \mu\text{M}$, respectivamente. O primeiro (**CS-34**) é o mais promissor dentre os compostos testados, com relação entre a concentração citotóxica e efetiva ($\text{CL}_{50}/\text{CI}_{50}$) de 313,18. O composto **CS-33**, 23, 24-di-hidro derivado de **CS-34**, também apresentou CI_{50} significativo, apesar de cerca de 10 vezes menor, sugerindo que a cadeia lateral possa ter influência tanto na atividade quanto na toxicidade desses derivados.

A obtenção de derivados com maior rigidez estrutural também parece exercer influência na atividade. Compostos como **CS-43** e **CS-54**, apesar de possuírem potência moderada, apresentaram citotoxicidade reduzida, abrindo caminho para a síntese de análogos estruturais. Outros compostos que apresentaram reduzida citotoxicidade foram **CS-35** e **CS-48**, derivados de **CN-1** com substituinte tioacetila ou ainda desoxigenados na posição 2.

Tabela 5: Viabilidade celular* valores de $CI_{50}^{\#}$ e CL_{50}^{\ddagger} de cucurbitacinas naturais e semissintéticas, em culturas de macrófagos (J774)

Composto	Viabilidade 10μM	CI_{50}	CL_{50}	CL_{50}/CI_{50}
CN-1	61,7	34,70	390	11,24
CN-2	> 100	73,64	2153	29,24
CN-3	48,8	n.d.	n.d.	-
CN-4	44,0	n.d.	n.d.	-
CN-5	46,0	n.d.	n.d.	-
CN-7	7,90	n.d.	n.d.	-
CS-9	76,3	n.d.	n.d.	-
CS-13	88,2	n.d.	n.d.	-
CS-14	81,3	n.d.	n.d.	-
CS-15	14,9	n.d.	n.d.	-
CS-16	90,4	n.d.	n.d.	-
CS-18	70,6	n.d.	n.d.	-
CS-21	82,8	n.d.	n.d.	-
CS-22	81,4	n.d.	n.d.	-
CS-23	71,1	n.d.	n.d.	-
CS-26	54,3	n.d.	n.d.	-
CS-27	89,8	n.d.	n.d.	-
CS-32	92,4	57,5	420	7,30
CS-33	90,5	7,48	177,5	23,73
CS-34	86,4	0,66	206,7	313,18
CS-35	> 100	18,48	1100	59,5
CS-36	90,1	19,20	184	9,58
CS-38	66,1	n.d.	n.d.	-
CS-40	79,9	n.d.	n.d.	-
CS-41	7,7	n.d.	n.d.	-
CS-43	> 100	28,17	3600	127,79
CS-44	64,8	1,04	15,5.	14,90
CS-48	> 100	49,2	2250	45,73
CS-49	34,3	n.d.	n.d.	-
CS-50	> 100	n.d.	n.d.	-
CS-51	38,2	n.d.	n.d.	-
CS-54	> 100	50,91	4100	80,53
CS-58	70,1	n.d.	n.d.	-
CS-63	> 100	171,5	599,8	3,50
CS-64	> 100	78,46	1600	20,39
dexametasona	-	118	1090	9,24

*Viabilidade celular de macrófagos após o tratamento com 10 μ M dos diferentes compostos por 24h (média de 3 experimentos realizados)

separadamente em triplicata); [#]CI₅₀= Concentração inibitória a 50% das células (μM); [±]CL₅₀= Concentração tóxica a 50% das células (μM); N.D.= Não determinado; Valores representam a media de três experimentos independentes.

Diante dos resultados obtidos, observa-se que modificações no anel A do esqueleto cucurbitano podem originar compostos com promissora atividade anti-inflamatória, porém, a cadeia lateral também parece exercer importante influência tanto na atividade quanto na toxicidade desses compostos. Faz-se necessária a avaliação de um maior número de derivados, com maior variedade de modificações estruturais, a fim de estabelecer com maior precisão os requisitos estruturais associados à atividade.

5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1. TÉCNICAS GERAIS

5.1.1. INSTRUMENTAÇÃO

O ponto de fusão não corrigido dos compostos foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão MQAPF-301, Microquímica Equipamentos Ltda.

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos por refletância difusa, em espectrofotômetro Shimadzu modelo Prestige 2.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C foram realizados em equipamentos Bruker AC-200 (200 MHz para ^1H e 50,3 MHz para ^{13}C), Varian Oxford AS-400 (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) e Bruker Avance 2 (500 MHz para ^1H e 125,8 MHz para ^{13}C e bidimensionais COSY, NOESY, HSQC e HMBC), tendo como referência interna tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou metanol deuterado (MeOD). Os valores de deslocamento químico (δ) são expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Os espectros de massas de alta resolução (ESI-HR-MS) foram obtidos em espectrômetro do tipo Bruker-Daltonics MicroTOF – Q II.

As reações assistidas por micro-ondas foram realizadas em tubos de vidro Pyrex de 10 mL em um reator monomodo CEM Explorer com medida de temperatura por infravermelho e medidor de pressão não invasivo.

5.1.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Todas as reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 da Merck®, visualização em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) e/ou revelação através de pulverização com vanilina fosfórica seguida de aquecimento.

Para obtenção dos precursores foram realizadas inicialmente colunas a vácuo em funil de vidro sinterizado, utilizando sílica gel 60 Merck como suporte e mistura de solventes hexano: AcOEt em ordem crescente de polaridade.

A purificação dos precursores e dos produtos de reação foi realizada através de cromatografia em coluna utilizando sílica gel Merck

(0,04-0,063 mm) como suporte e diferentes solventes orgânicos, puros ou em mistura, como fase móvel.

5.1.3. SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes utilizados foram adquiridos da empresa Tedia Brazil e purificados por destilação fracionada. Todos os demais reagentes foram comprados da empresa Sigma-Aldrich®. Quando necessário, solventes e reagentes foram purificados seguindo métodos descritos por Perrin e Armarego (1988).

5.2. ISOLAMENTO DAS CUCURBITACINAS CN-1 – CN-7

As raízes de *W. ebracteata* foram adquiridas da empresa Lohmann Ltda, situada em Nova Petrópolis – RS. Análises por cromatografia em camada delgada (CCD) indicaram composição semelhante ao material coletado previamente com exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS (ICN 95292).

Os frutos de *L. operculata* foram adquiridos íntegros no comércio local. Por serem muito característicos sua identificação botânica foi realizada por comparação com dados literatura.

5.2.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Cerca de 8 kg de raízes de *W. ebracteata* foram moídas em moinho de facas e submetidas a maceração com DCM. Após 4 dias o extrato foi filtrado e o solvente removido sob pressão reduzida e temperatura inferior a 40 °C, sendo o processo repetido por mais três vezes.

Cerca de 5 kg de frutos de *L. operculata* foram cortados com o auxílio de uma tesoura e submetidos a maceração com DCM, por 7 dias. Após esse período o extrato foi filtrado e o solvente removido sob pressão reduzida e temperatura inferior a 40 °C, sendo o processo repetido por mais três vezes.

5.2.2. ISOLAMENTO DE CUCURBITACINAS

5.2.2.1. A partir de *W. ebracteata*

O isolamento de cucurbitacinas a partir do extrato DCM de *W. ebracteata* foi iniciado com um primeiro fracionamento através de colunas cromatográficas do tipo “flash” em funil com placa de vidro sinterizado G4, utilizando como fase estacionária gel de sílica para CCD G60. Foram realizadas colunas utilizando cerca de 10 g de extrato e a fase móvel consistiu em frações de 300 mL da mistura de solventes hexano:AcOEt, com proporção crescente de AcOEt, até 100%. Nessa etapa inicial foram obtidas 9 frações (F1-F9), que, com exceção de F1 e F2, foram agrupadas de acordo com sua semelhança cromatográfica.

As frações F3 e F4 foram reunidas e submetidas à coluna cromatográfica clássica, utilizando sílica gel (63-200 µm) como fase estacionária e a combinação hexano:AcOEt (6:4, v/v) como fase móvel. A partir dessa coluna foi possível isolar di-hidroisocucurbitacina B (CN-2) e uma nova cucurbitacina denominada CN-4.

De maneira similar, as frações F5, F6 e F7 foram reunidas e submetidas à coluna cromatográfica clássica, utilizando sílica gel (63-200 µm) como fase estacionária e a combinação hexano:AcOEt (55:45, v/v) como fase móvel. A partir dessa coluna foi possível isolar di-hidrocucurbitacina B (CN-1) e uma nova cucurbitacina denominada CN-5.

As frações F8 e F9 foram agrupadas e submetidas à coluna cromatográfica clássica, utilizando sílica gel (63-200 µm) como fase estacionária e a combinação hexano:AcOEt (3:7, v/v) como fase móvel. A partir dessa coluna foi possível isolar cucurbitacina R (CN-3) e isocucurbitacina R (CN-6).

5.2.2.2. A partir de *L. operculata*

Da mesma forma que para *W. ebracteata*, o isolamento de cucurbitacinas a partir do extrato DCM de *L. operculata* iniciou com o fracionamento do extrato através de colunas cromatográficas do tipo “flash” (cerca de 10 g/coluna) em funil com placa de vidro sinterizado G4, utilizando como fase estacionária a mistura carvão ativado: gel de sílica para CCD G60 (4:1). A fase móvel consistiu em uma fração inicial de 500 mL de EtOH, seguida do mesmo volume de AcOEt.

A fração AcOEt foi submetida à coluna cromatográfica clássica, utilizando sílica gel (63-200 μm) como fase estacionária e a combinação hexano:AcOEt (5:5, v/v) como fase móvel para o isolamento de cucurbitacina B (**CN-7**).

5.2.3. IDENTIFICAÇÃO DAS CUCURBITACINAS **CN-1** – **CN-7**

Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C das cucurbitacinas **CN-1**, **CN-2**, **CN-3**, **CN-6** e **CN-7**, já descritas para as plantas em estudo, são apresentados nas Tabelas 6 e 7. Os dados completos dos compostos inéditos, **CN-4** e **CN-5**, são descritos na sequência.

Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) das cucurbitacinas naturais CN-1 – CN-3, CN-6 e CN-7

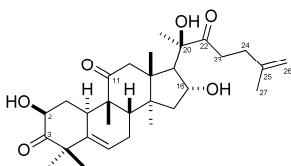
^{13}C	CN-1 δ_{C}	CN-3 δ_{C}	CN-6 δ_{C}	CN-7 δ_{C}
1	36,1	36,0	38,9	35,9
2	71,7	71,6	210,6	71,6
3	213,1	212,1	80,2	213,1
4	50,3	50,3	46,7	50,2
5	140,6	140,4	138,2	140,5
6	120,5	120,4	121,8	120,4
7	23,9	23,9	23,8	23,8
8	42,3	42,4	42,8	42,3
9	48,4	48,4	48,2	48,4
10	33,8	33,8	36,4	33,7
11	212,1	213,4	211,9	212,2
12	48,7	48,7	48,6	48,6
13	48,4	50,7	48,3	48,1
14	50,7	48,3	50,6	50,6
15	45,5	45,4	45,4	45,3
16	71,1	70,9	71,0	71,2
17	57,8	57,8	57,8	58,2
18	19,8	19,8	19,8	19,8
19	20,1	20,0	20,1	20,0
20	78,9	79,2	79,2	78,2
21	24,5	24,5	24,5	23,9
22	213,9	215,50	215,5	202,4
23	30,7	30,9	30,9	120,3
24	34,8	37,0	36,9	151,9
25	81,3	70,3	70,4	79,3
26	26,2	29,9	29,8	26,4
27	25,8	28,7	28,8	25,8
28	21,3	21,3	20,9	21,3
29	29,4	29,3	24,1	29,4
30	18,8	18,9	18,9	18,8
31	170,4			170,3
32	22,4			21,9

Tabela 7: Dados de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) das cucurbitacinas naturais **CN-1 – CN-3, CN-6 e CN-7.**

¹ H	CN-1	CN-2	CN-3	CN-6	CN-7
	δ _H (J em Hz)	δ _H (J em Hz)	δ _H (J em Hz)	δ _H (J em Hz)	δ _H (J em Hz)
1α	2,32 ddd (13,0, 6,0, 3,0)	2,41 (13,0, 5,0)	2,32 ddd (13,0, 6,0, 3,0)	2,40 (13,0, 5,0)	2,32 ddd (13,0, 6,0, 3,0)
1β	1,27 ddd (13,0, 13,0, 13,0)	2,23 (1,0, 13,0, 13,0)	1,23 ddd (13,0, 13,0, 13,0)	2,23 (1,0, 13,0, 13,0)	1,24 ddd (13,0, 13,0, 13,0)
2	4,41 dd (6,0, 13,0)	-	4,42 dd (11,5, 5,2)	-	4,42 dd (6,0, 13,0)
3	-	3,94 dd (1,0, 5,0)	-	3,90 dd (1,0, 5,0)	-
6	5,79 ddd (6,0, 2,0, 2,0)	5,95 ddd (6,0, 2,0, 2,0)	5,79 ddd (6,0, 2,0, 2,0)	5,94 ddd (6,0, 2,0, 2,0)	5,79 ddd (6,0, 2,0, 2,0)
7α	1,98 m	2,0 m	2,0 m	2,04 m	1,99 m
7β	2,41 ddd (20,0, 8,0, 3,0, 2,0)	2,45 m	2,40 ddt (20,0, 8,0, 3,0, 2,0)	2,48 dddd (2,0, 3,0, 8,0, 20,0)	2,41 ddd (20,0, 8,0, 3,0, 2,0)
8	1,97 d (8,0)	2,04 (7,0)	1,96 d (8,0)	2,0 (7,0)	1,97 d (8,0)
10	2,73 m	2,74 m	2,74 m	2,74 m	2,74 m
12α	3,26 d (14,5)	3,12 d (15,0)	3,25 d (14,5)	3,12 d (15,0)	3,25 d (14,5)
12β	2,70 d (14,5)	2,65 d (15,0)	2,68 d (14,5)	2,64 d (15,0)	2,69 d (14,5)
15α	1,40 dd (14,0, 1,0)	1,40 m	1,40 dd (14,0, 1,0)	1,42 m	1,43 dd (14,0, 1,0)
15β	1,85 dd (14,0, 9,0)	1,83 (13,0, 9,0)	1,83 dd (14,0, 9,0)	1,82 (13,0, 9,0)	1,88 dd (14,0, 9,0)
16	4,31 ddd (9,0, 7,0, 1,0)	4,29 ddd (9,0, 7,0, 1,0)	4,32 ddd (9,0, 7,0, 1,0)	4,30 ddd (9,0, 7,0, 1,0)	4,36 ddd (9,0, 7,0, 1,0)
17	2,55 d (7,0)	2,49 d (7,0)	2,62 d (7,0)	2,57 d (7,0)	2,50 d (7,0)
18	0,98 s	0,96 s	0,98 s	0,96 s	0,97 s
19	1,08 s	1,18 s	1,07 s	1,02 s	1,07 s
21	1,43 s	1,40 s	1,43 s	1,41 s	1,44 s
23α	2,82 (17,0, 9,0, 6,0)	2,80 ddd (17,0, 9,0, 6,0)	2,96 ddd (17,0, 9,0, 6,0)	2,90 m	6,48 d (15,6 Hz)
23β	2,53 m	2,51 m	2,65 m	2,61 m	-

24α	2,06 m	2,04 m	1,83 m	1,80 m	7,06 d (15,6 Hz)
24β	2,34 m	2,03 m	1,83 m	1,80 m	-
26	1,44 s	1,43 s	1,23 s	1,21 s	1,54 s
27	1,46 s	1,45 s	1,25 s	1,24 s	1,57 s
28	1,35 s	1,33	1,35 s	0,80 s	1,28 s
29	1,29 s	0,80	1,28 s	1,33 s	1,34 s
30	1,37 s	1,27	1,38 s	1,27 s	1,35 s
32	1,96 s	1,96 s			1,96 s

2β,16α,20R-tri-hidroxi-10α,17α-cucurbit-5,25-dien-3,11,22-triona (CN-4)



$[\alpha]_D^{25}$: +38,8 (*c* 1,60, CHCl₃);

IV (KBr): 3452, 1710, 1693, 1651, 1373, 1259, 1211, 1089, 985, 887, 736 cm⁻¹;

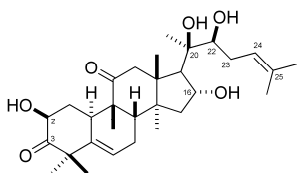
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,80 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0 Hz, H-6), 4,35 (1H, ddd, *J* = 9,0, 7,0, 1,0 Hz, H-16), 4,76,

(1H, d, *J* = 0,8, H-26α), 4,70 (1H, d, *J* = 0,8, H-26β), 4,42 (1H, dd, *J* = 13,0, 6,0 Hz, H-2), 3,26 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,91 (1H, ddd, *J* = 17,0, 10,0, 5,5 Hz, H-23α), 2,74 (1H, m, H-10), 2,74 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,66 (1H, ddd, *J* = 17,0, 10,0, 5,5 Hz, H-23β), 2,56 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H-17), 2,42 (1H, dddd, *J* = 20,0, 8,0, 3,0, 2,0 Hz, H-7β), 2,32 (1H, ddd, *J* = 13,0, 6,0, 3,0, H-1α), 2,43 (2H, m, H-24), 2,0 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), 1,97 (1H, ddd, *J* = 20,0, 6,0, 2,0, H-7α), 1,86 (1H, dd, *J* = 14,0, 9,0 Hz, H-15β), 1,75 (3H, s, Me-27), 1,43 (3H, s, Me-21), 1,40 (1H, dd, *J* = 2,0, 14,0 Hz, H-15α), 1,38 (3H, s, Me-30), 1,35 (3H, s, Me-28), 1,28 (3H, s, Me-29), 1,23 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0, H-1β), 1,09 (3H, s, Me-19), 0,98 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,9 (C-22), 213,0 (C-3), 212,1 (C-11), 144,5 (C-25), 140,5 (C-5), 120,4 (C-6), 110,4 (C-26), 78,8 (C-20), 71,6 (C-2), 71,6 (C-16), 57,6 (C-17), 50,7 (C-14), 50,3 (C-4), 48,6 (C-12), 48,4 (C-9), 48,3 (C-13), 45,4 (C-15), 42,3 (C-8), 36,0 (C-1), 34,4 (C-23), 33,8 (C-10), 31,6 (C-24), 29,3 (C-29), 24,3 (C-21), 23,9 (C-7), 22,6 (C-27), 21,2 (C-28), 20,1 (C-19), 19,8 (C-18), 18,8 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₃₀H₄₅O₆, 501,321; obtido 501,3193 [M + H]⁺.

2β,16α,20R,22S-tetrahidroxi-10α,17α-cucurbit-5,24-dien-3,11-diona (CN-5)



$[\alpha]_D^{25}$: +62,08 (*c* 1,78, CHCl₃);

IV (KBr): 3445, 1712, 1693, 1681, 1643, 1384, 1222, 1062, 985, 619 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,80 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0 Hz, H-6), 5,21 (1H, m, H-24), 4,60 (1H, ddd, *J* = 9,0, 7,0, 1,0 Hz, H-16), 4,40 (1H, dd, *J* = 13,0, 6,0 Hz, H-), 3,35 (1H, dd, *J* = 10,0, 1,0 Hz, H-22), 3,15 (1H, d, *J* = 14,5, H-12α), 2,73 (1H, m, H-10),

2,62 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-12 β), 2,43 (1H, dddd, $J = 20,0, 8,0, 3,0, 2,0$ Hz, H-7 β), 2,36 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-17), 2,31 (1H, m, H-23 α), 2,27 (1H, ddd, $J = 13,0, 6,0, 3,0$ Hz, H-1 α), 2,18 (1H, m, H-23 β), 2,03 (1H, $J = 20,0, 6,0, 2,0$, H-7 α), 1,98 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8), 1,92 (1H, dd, $J = 14,0, 9,0$, H-15 β), 1,55 (1H, m, H-15 α), 1,74 (3H, s, Me-26) 1,65 (3H, s, Me-27), 1,38 (3H, s, Me-30), 1,34 (3H, s, Me-28), 1,32 (3H, s, Me-21), 1,28 (3H, s, Me-29), 1,22 (1H, ddd, $J = 13,0, 13,0, 13,0$ Hz, H-1 β), 1,07 (3H, s, Me-19), 0,97 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 213,1$ (C-3), 212,7 (C-11), 140,4 (C-5), 135,1 (C-25), 120,6 (C-24), 120,4 (C-6), 82,3 (C-22), 75,7 (C-20), 71,6 (C-2), 71,4 (C-16), 55,2 (C-17), 51,3 (C-14), 50,2 (C-4), 48,8 (C-12), 48,3 (C-9), 47,8 (C-13), 44,6 (C-15), 42,4 (C-8), 36,0 (C-1), 33,7 (C-10), 30,7 (C-23), 29,4 (C-29), 25,8 (C-26), 24,9 (C-21), 23,9 (C-7), 21,2 (C-28), 19,9 (C-19), 19,7 (C-18), 18,7 (C-30), 18,0 (C-27);

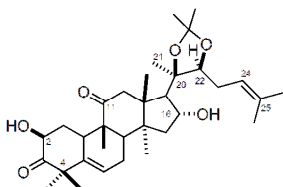
ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{NaO}_6$, 525,3187; obtido 525,3200 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.3. PROCEDIMENTOS PARA SEMISSÍNTESE DE CUCURBITACINAS

5.3.1. PREPARAÇÃO DE CS-8

A uma solução de **CN-1** (30 mg, 0,06 mmol) dissolvida em 1 mL de acetona anidra adicionou-se 2,2-dimetoxipropano (0,3 mL) seguido de ácido p-toluenossulfônico (2,0 mg, 1,05 mmol). A reação foi mantida sob agitação a 20°C por 3 horas, sendo terminada com a adição de 1,0 mL de NH_4OH 25% e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por coluna de sílica gel (hexano: AcOEt, 8:2) para obtenção do produto **CS-8**.

2 β ,16 α -di-hidroxi-20R,22S-[(1-metiletiliden)bis(oxi)]-10 α ,17 α -cucurbit-5,24-dien-3,11-diona (CS-8)



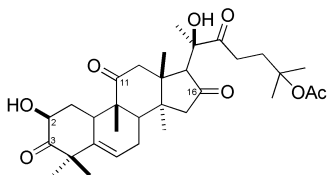
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,80$ (1H, dd, $J = 3,5, 2,0$ Hz, H-6), 5,12 (1H, dd, $J = 6,7$ Hz, H-24), 4,60 (1H, dd, $J = 9,6, 7,7$ Hz, H-16), 4,41 (1H, ddd, $J = 13,0, 6,0, 4,0$ Hz, H-2), 3,88 (1H, dd, $J = 8,8, 5,6$ Hz, 1H, H-22), 3,0 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, 1H, H-12 α),

2,70 (1H, m, H-23 α), 2,69 (1H, m, H-10) 2,59 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, H-12 β), 2,40 (1H, m, H-23 β), 2,40 (1H, m, H-7 α), 2,33 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, H-17), 2,27 (1H, ddd, $J = 13,0, 6,0, 3,0$ Hz, H-1 α), 2,0 (1H, dd, $J = 20,0, 5,0$ Hz, H-7 β), 1,97 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-8), 1,95 (1H, m, H-15 α), 1,74 (3H, s, Me-26), 1,66 (3H, s, Me-27), 1,54 (3H, s, Me-32), 1,49 (1H, m, H-15 β), 1,43 (3H, s, Me-33), 1,40 (3H, s, Me-21), 1,35 (3H, s, Me-28), 1,33 (3H, s, Me-30), 1,27 (3H, s, Me-29), 1,22 (1H, ddd, $J = 13,0, 13,0, 13,0$ Hz, H-1 β), 1,05 (3H, s, Me-19), 0,9 (3H, s, Me-18).

5.3.2. PREPARAÇÃO DE CS-9 E CS-10

A um balão de 25 mL adicionou-se clorocromato de piridínio (PCC) (582 mg, 3,57 mmol), carbonato de bário (706 mg, 3,57 mmol) e DCM seco (2,0 mL). A mistura permaneceu sob agitação por 5 minutos e em seguida CN-1 (500 mg, 0,89 mmol) foi adicionada, dissolvida em 2 mL de DCM, mantendo-se a agitação por 3h. A mistura foi então diluída com éter etílico, vertida sobre uma coluna de vidro sinterizado preenchida com Florisil[®] e eluída com 200 mL da mistura de solventes hexano:AcOEt (1:1). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 1:1), levando ao isolamento de CS-9 (240 mg, 48%) e CS-10 (10 mg, 2%), como sólidos brancos.

2 β ,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-3,11,16,22-tetraona (CS-9)



Ponto de fusão: 108 – 109 °C;

IV (KBr): 3445, 2975, 1367, 1266, 1254, 1206, 1125 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,81$ (1H, m, H-6), 4,45 (1H, dd, $J = 5,9, 13,0$ Hz, H-2), 3,61 (1H, s, H-17), 3,36 (1H,

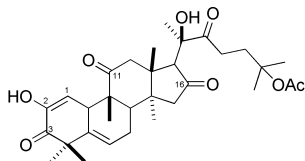
d, $J = 15,0$ Hz, H-12 α), 2,80 (1H, m, H-10), 2,75 (1H, d, $J = 15,0$ Hz, H-12 β), 2,74 (2H, m, H-23), 2,52 (1H, m, H-7 β), 2,34 (1H, ddd, $J = 13,0, 6,1, 3,6$ Hz, H-1), 2,25 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8), 2,14 (1H, d, $J = 18$ Hz, H-15 β), 2,06 (1H, d, $J = 18$ Hz, H-15 α), 2,04 (2H, m, H-24), 1,98 (3H, s, Me-32), 1,97 (1H, m, H-7 α), 1,47 (3H, s, Me-26), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,36 (3H, s, Me-28), 1,34 (3H, s, Me-30), 1,29 (3H, s,

Me-21), 1,28 (3H, s, Me-29), 1,28 (1H, ddd, $J = 13,0, 13,0, 13,0$ Hz, H-1 β), 1,16 (3H, s, Me-19), 1,13 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 216,1$ (C-16), 213,9 (C-22), 212,6 (C-3), 210,3 (C-11), 170,4 (C-31), 140,7 (C-5), 119,9 (C-6), 81,4 (C-25), 80,0 (C-20), 71,5 (C-2), 61,7 (C-17), 50,3 (C-4), 49,5 (C-9), 48,8 (C-15), 47,7 (C-13), 47,0 (C-12), 44,5 (C-14), 42,0 (C-8), 35,9 (C-1), 34,9 (C-24), 33,7 (C-10), 30,2 (C-23), 29,3 (C-28), 25,9 (C-26), 25,8 (C-27), 24,0 (C-7), 23,4 (C-21), 22,4 (C-32), 21,2 (C-29), 20,0 (C-19), 19,6 (C-18), 19,2 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{O}_8$ 557,3119; obtido 557,3143 [M-H].

2,20R-di-hidroxi-25-acetloxi-10 α ,17 α -cucurbit-1,5-dien-3,11,16,22-tetraona (CS-10)



Ponto de fusão: 97-98 °C;

IV (KBr): 3444, 3974, 1738, 1731, 1714, 1693, 1665, 1397, 1368, 1267, 1252, 1228, 1206, 1127, 1044 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,96$ (1H, dd, $J = 0,4, 2,7$ Hz, H-1), 5,79 (1H,

m, H-6), 3,60 (1H, s, H-17), 3,54 (1H, m, H-10), 3,34 (1H, dd, $J = 0,9, 14,8$ Hz, H-12 α), 2,78 (1H, d, $J = 14,8$ Hz, H-12 β), 2,73 (2H, dt, $J = 8,5, 6,0$ Hz, H-23), 2,49 (1H, ddt, $J = 19,5, 8,5, 2,5$ Hz, H-7 β), 2,30 (1H, d, $J = 8,5$, H-8), 2,15 (1H, d, $J = 18$ Hz, H-15 β), 2,09 (1H, d, $J = 18$ Hz, H-15 α), 2,05 (2H, m, H-24), 1,98 (1H, m, H-7 α), 1,97 (3H, s, Me-32), 1,47 (3H, s, Me-26), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,37 (3H, s, Me-29), 1,37 (3H, s, Me-30), 1,29 (3H, s, Me-20), 1,26 (3H, s, Me-28), 1,15 (3H, s, Me-19), 1,11 (3H, s, Me-18);

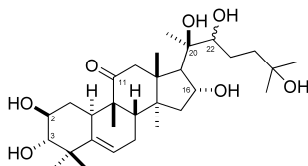
RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 216,1$ (C-16), 213,8 (C-22), 210,9 (C-11), 198,4 (C-3), 170,4 (C-31), 144,7 (C-2), 137,1 (C-5), 120,2 (C-6), 114,1 (C-1), 81,4 (C-25), 79,9 (C-20), 61,8 (C-17), 49,9 (C-9), 49,1 (C-15), 47,8 (C-13), 47,6 (C-4), 47,2 (C-12), 44,6 (C-14), 41,3 (C-8), 35,0 (C-24), 34,7 (C-10), 30,2 (C-23), 27,9 (C-28), 25,9 (C-26), 25,8 (C-27), 23,8 (C-7), 23,4 (C-20), 22,4 (C-32), 20,2 (C-29), 20,1 (C-18), 19,7 (C-19), 18,8 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{O}_8$ 555,2963; obtido 555,2984 [M-H].

5.3.3. PREPARAÇÃO DE CS-11

A uma solução de **CN-3** (100 mg, 0,19 mmol) dissolvido em 4 mL da mistura de solventes EtOH:DCM (1:1), a 0°C (banho de gelo) e sob agitação magnética, adicionou-se NaBH₄ (16 mg, 0,42 mmol). Após 40 minutos a reação foi acidificada a pH 4 através da adição de HCl 1M, diluída com AcOEt e lavada com H₂O. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (AcOEt) levando a purificação de **CS-11** (94 mg, 94%) como sólido branco.

2β,3α,16α,20R,22,25-hexa-hidroxi-10α,17α-cucurbit-5-en-11-ona (**CS-11**)



Ponto de fusão: 226-227 °C;

IV (KBr): 3398, 2960, 1686, 1376, 1063 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, MeOD): δ = 5,76 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 4,59 (1H, ddd, *J* = 9,0, 7,6, 1,2 Hz, H-16), 3,54 (1H, ddd, *J* = 11,5, 9,3, 4,2 Hz, H-2), 3,33 (1H, sbpost, H-22), 3,24 (1H, d, *J* = 14,7 Hz, H-12α), 2,86 (1H, d, *J* = 9,3 Hz, H-3), 2,53 (1H, d, *J* = 14,7 Hz, H-12β), 2,48 (1H, m, H-10), 2,44 (1H, m, H-7β), 2,42 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H-17), 2,0 (1H, m, H-7α), 1,96 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-8), 1,88 (1H, dd, *J* = 12,2, 9,0 Hz, H-15β), 1,80 (1H, m, H-23α), 1,78 (1H, sbpost, H-1α), 1,68 (1H, sbpost, H-24α), 1,51 (1H, sbpost, H-15α), 1,47 (1H, m H-23β), 1,46 (1H, m H-24β), 1,31 (3H, s, Me-30), 1,24 (3H, s, Me-20), 1,21 (3H, s, Me-26), 1,20 (3H, s, Me-27), 1,19 (3H, s, Me-28), 1,08 (3H, s, Me-19), 1,04 (1H, sbpost, H-1β), 0,96 (3H, s, Me-29), 0,95 (3H, s, Me-18);

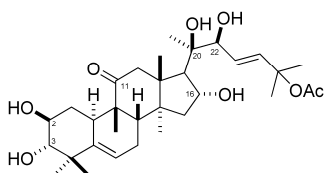
RMN ¹³C (125,8 MHz, MeOD): δ = 216,5 (C-11), 142,7 (C-5), 120,0 (C-6), 82,2 (C-22), 81,9 (C-3), 77,1 (C-20), 72,1 (C-16), 71,6 (C-2), 71,4 (C-25), 56,5 (C-17), 52,4 (C-13), 50,2 (C-12), 49,6 (C-9), 49,1 (C-14), 45,7 (C-15), 44,2 (C-8), 43,3 (C-4), 42,5 (C-23), 34,9 (C-10), 34,7 (C-1), 29,5 (C-26), 29,1 (C-27), 27,0 (C-24), 25,3 (C-28), 24,8 (C-7), 23,5 (C-20), 22,3 (C-29), 20,5 (C-19), 20,3 (C-18), 19,6 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₃₀H₅₀NaO₇ 545,3449; obtido 545,3464 [M+Na]⁺.

5.3.4. PREPARAÇÃO DE CS-13

A mistura de **CN-7** (100 mg, 0,18 mmol) e $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (200 mg, 0,537 mmol) em MeOH (2,5 mL) foi resfriada a $-30\text{ }^\circ\text{C}$, para adição de NaBH_4 (81 mg, 2,15 mmol). Após permanecer sob agitação por 2h a mesma temperatura inicial, a reação foi diluída com AcOEt e lavada com NaCl (sat.) e com H_2O . A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente removido sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna em gel de sílica (AcOEt), fornecendo **CS-13** (72 mg, 72%) como sólido branco.

2 β ,3 α ,16 α ,20R,22S-pentahidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-11-ona (**CS-13**)



Ponto de fusão: 199 - 200 $^\circ\text{C}$;

IV (KBr): 3448, 3279, 1732, 1717, 1698, 1567, 1556, 1403, 1281, 1128, 1081, 750 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 5,92 (1H, dd, J = 16,0, 1,2 Hz, H-24), 5,77 (1H, dd, J = 16,0, 6,0 Hz, H-23), 5,76 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 4,63 (1H, m, H-16), 3,97 (1H, dd, J = 6,0, 1,2 Hz, H-22), 3,55 (1H, ddd, J = 11,5, 9,3, 4,2 Hz, H-2), 3,24 (1H, d, J = 14,6 Hz, H-12 α), 2,86 (1H, d, J = 9,3, H-3), 2,49 (1H, m, H-10), 2,48 (1H, d, J = 14,6 Hz, H-12 β), 2,43 (1H, m, H-7 β), 2,37 (1H, d, J = 6,5 Hz, H-17), 2,0 (1H, sbpost, H-7 α), 1,96 (3H, s, Me-32), 1,95 (1H, d, J = 8,2 Hz, H-8), 1,89 (1H, dd, J = 12,2, 9,0 Hz, H-15 β), 1,78 (1H, dt, J = 12,4, 4,2 Hz, H-1 α), 1,53 (3H, s, Me-27), 1,52 (3H, s, Me-26), 1,50 (1H, sbpost, H-15 α), 1,30 (3H, s, Me-30), 1,23 (3H, s, Me-21), 1,18 (3H, s, Me-28), 1,07 (3H, s, Me-19), 0,96 (3H, s, Me-29), 0,94 (3H, s, Me-18);

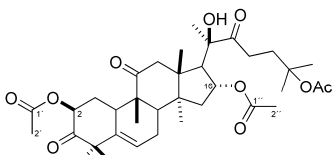
RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 216,6 (C-11), 171,9 (C-31), 142,7 (C-5), 137,4 (C-24), 128,8 (C-23), 120,0 (C-6), 81,9 (C-3), 81,5 (C-22), 77,2 (C-20), 72,3 (C-16), 71,6 (C-2), 56,4 (C-17), 52,5 (C-13), 50,0 (C-9), 49,6 (C-12), 49,1 (C-14), 45,6 (C-15), 44,2 (C-8), 43,4 (C-4), 34,9 (C-10), 34,7 (C-1), 27,5 (C-26), 27,3 (C-27), 25,3 (C-28), 24,8 (C-7), 24,2 (C-21), 22,3 (C-32), 22,3 (C-29), 20,4 (C-19), 20,3 (C-18), 19,6 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{O}_8$ 561.3433; obtido 561.3438 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

5.3.5. PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS ÉSTERES CS-14 - CS-19

A uma solução de CN-1 (100 mg, 0,18 mmol) dissolvida em DCM (3 mL) e piridina (0,15 mL, 1,8 mmol) adicionou-se o anidrido ou o cloreto de ácido específico e quantidade catalítica de DMAP (nas reações com anidridos). A mistura foi mantida sob agitação a 20°C durante 12 a 24h e em seguida diluída com DCM (20 mL) e lavada com HCl 1 M (2 x 20 mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi submetido à coluna de sílica gel para obtenção do éster correspondente.

2β,16α,25-triacetiloxi-20R-hidroxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-14)



2h, sólido branco, 84% de rendimento (97 mg);

Ponto de fusão: 131-132 °C;

IV (KBr): 3445, 2984, 1731, 1698, 1374, 1245, 1029 cm⁻¹;

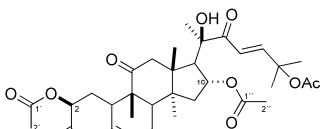
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,78 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,48 (1H, dd, *J* = 13,0, 5,5 Hz, H-2), 5,14 (1H, m, H-16), 3,25 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,80 (1H, m, H-10) 2,74 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,71 (1H, d, *J* = 7,5, H-17), 2,65 (2H, m, H-23α), 2,44 (1H, m, H-7β), 2,15 (3H, s, Me-2'), 2,12 (1H, sbpostto, H-1α), 2,04 (1H, sbpostto, H-15β), 2,04 (2H, m, H-24), 2,02 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-8), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,95 (3H, s, Me-2''), 1,93 (1H, m, H-7α), 1,52 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,49 (3H, s, Me-27), 1,46 (3H, s, Me-26), 1,45 (3H, s, Me-21), 1,41 (1H, m, H-15α), 1,31 (3H, s, Me-28), 1,31 (3H, s, Me-30), 1,29 (3H, s, Me-29), 1,10 (3H, s, Me-19), 1,02 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 212,3 (C-22), 211,7 (C-11), 205,6 (C-3), 170,1 (C-31), 170,1 (C-1'), 170,0 (C-1''), 139,7 (C-5), 120,4 (C-6), 81,0 (C-25), 78,6 (C-20), 74,0 (C-16), 73,2 (C-2), 54,0 (C-17), 51,2 (C-4), 49,9 (C-13), 48,6 (C-12), 48,4 (C-9), 47,9 (C-14), 43,2 (C-15), 42,0 (C-8), 35,1 (C-24), 34,3 (C-10), 32,0 (C-1), 30,4 (C-23), 28,7 (C-

28), 26,0 (C-26), 25,8 (C-27), 24,2 (C-21), 23,7 (C-7), 22,4 (C-32), 21,3 (C-29), 20,0 (C-19), 19,6 (C-18), 18,8 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{36}H_{51}O_{10}$ 643,3488; obtido 643,3511 $[M-H]^-$.

2β,16α,25-triacetiloxi-20R-hidroxi-10α,17α-cucurbit-5,23-dien-3,11,22-triona (CS-15)



2h, sólido branco, 80% de rendimento (92 mg);

Ponto de fusão: 121-122 °C;

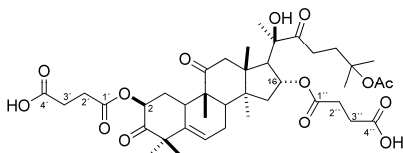
IV (KBr): 3439, 2979, 1738, 1728, 1690, 1633, 1367, 1241, 1131, 1024 cm^{-1} ;

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7,15 (1H, d, J = 15,6 Hz, H-24), 6,40 (1H, d, J = 15,6, H-23), 5,77 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,47 (1H, dd, J = 13,5, 5,2 Hz, H-2), 5,17 (1H, m, H-16), 3,24 (1H, d, J = 14,6 Hz, H-12 α), 2,80 (1H, m, H-10), 2,74 (1H, d, J = 14,6 Hz, H-12 β), 2,69 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-17), 2,41 (1H, ddt, J = 19,0, 8,0, 2,5 Hz, H-7 β), 2,14 (3H, s, Me-2'), 2,11 (1H, sbposto, H-1 α), 2,03 (3H, s, Me-32), 1,97 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 1,97 (1H, m, H-7 α), 1,91 (1H, sbposto, H-15 β), 1,86 (3H, s, Me-2''), 1,58 (3H, s, H-27), 1,57 (3H, s, H-26), 1,52 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,42 (3H, s, Me-21), 1,38 (1H, d, J = 13,0 Hz, H-15 α), 1,31 (3H, s, H-30), 1,30 (3H, s, H-28), 1,28 (3H, s, H-29), 1,09 (3H, s, H-19), 1,02 (3H, s, H-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, $CDCl_3$): δ = 211,8 (C-11), 205,6 (C-3), 200,8 (C-22), 170,3 (C-31), 170,1 (C-1'), 169,6 (C-1''), 152,7 (C-24), 139,7 (C-5), 120,4 (C-6), 119,2 (C-23), 79,1 (C-25), 77,6 (C-20), 73,5 (C-16), 73,3 (C-2), 54,1 (C-17), 51,2 (C-4), 49,9 (C-13), 48,6 (C-12), 48,4 (C-9), 48,0 (C-14), 43,1 (C-15), 42,1 (C-8), 34,3 (C-10), 31,9 (C-1), 28,8 (C-28), 26,6 (C-26), 26,3 (C-27), 23,7 (C-21), 23,6 (C-7), 21,9 (C-32), 21,3 (C-29), 20,7 (C-2'), 20,6 (C-2''), 19,9 (C-19), 19,7 (C-18), 18,7 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $C_{36}H_{54}NO_{10}$ 660,3742; obtido 660,3742 $[M+NH_4]^+$.

2β,16α-di-hemisucciniloxi-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-16)



24 h, sólido branco, 70% de rendimento (95 mg);

Ponto de fusão: 101 - 102 °C;

IV (KBr): 3450, 3200, 2978, 2669, 1746, 1729, 1713, 1370,

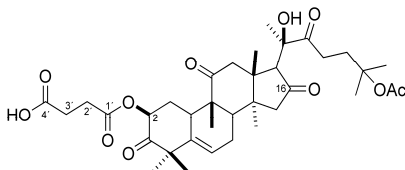
1250, 1164, 1017, 980 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,80 (1H, m, H-6), 5,51 (1H, dd, *J* = 13,5, 5,3 Hz, H-2), 5,23 (1H, m, H-16), 3,29 (1H, d, *J* = 14,8 Hz, H-12α), 2,84 (1H, m, H-10), 2,75 (1H, d, *J* = 14,8 Hz, H-12β), 2,74 (1H, d, *J* = 7,5, H-17), 2,72 (2H, m, H-23), 2,72 (2H, m, H-3'), 2,68 (2H, m, H-3''), 2,60 (2H, m, H-2') 2,45 (2H, m, H-2''), 2,43 (1H, m, H-7β), 2,12 (2H, m, H-1α), 2,03 (2H, m, H-24), 2,01 (1H, sbposto, H-15β), 2,02 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,95 (1H, m, H-7α), 1,53 (1H, ddd, *J* = 13,5, 13,5, 13,5 Hz, H-1β), 1,48 (3H, s, Me-27), 1,47 (3H, s, Me-26), 1,45 (3H, s, Me-21), 1,41 (1H, sbposto, H-15α), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,31 (3H, s, Me-30), 1,28 (3H, s, Me-28), 1,09 (3H, s, Me-19), 1,0 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,0 (C-22), 212,6 (C-11), 205,9 (C-3), 174,6 (C-4'), 174,4 (C-4''), 171,8 (C-1'), 171,7 (C-1''), 170,7 (C-31), 139,3 (C-5), 120,4 (C-6), 81,2 (C-25), 78,6 (C-20), 74,3 (C-16), 73,5 (C-2), 54,1 (C-17), 51,2 (C-4), 50,0 (C-13), 48,4 (C-12), 48,3 (C-9), 47,6 (C-14), 42,9 (C-15), 41,9 (C-8), 35,1 (C-24), 34,0 (C-10), 31,9 (C-1), 30,7 (C-23), 29,0 (C-3'), 28,8 (C-3''), 28,4 (C-28), 25,7 (C-2'), 25,6 (C-2''), 24,2 (C-21), 23,6 (C-7), 22,2 (C-32), 21,1 (C-29), 19,8 (C-19), 19,6 (C-18), 18,6 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo negativo): calc. para C₄₀H₅₅O₁₄ 759,3597; obtido 759,3612 [M-H]⁻.

2β-hemisucciniloxi-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,16,22-tetraona (CS-17)



24 h, sólido branco, 70% de rendimento (82 mg);

Ponto de fusão: 95 - 96 °C;

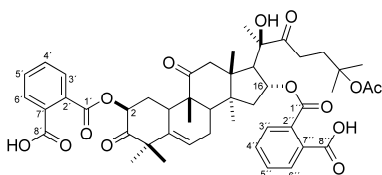
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,81 (1H, m, H-6), 5,52 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,2 Hz, H-2), 3,60

(1H, s, H-17), 3,36 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,87 (1H, m, H-10), 2,74 (2H, m, H-3'), 2,72 (1H, sbposto, H-1β) 2,70 (2H, sbposto, H-23),

2,68 (2H, m, H-2'), 2,52 (1H, m, H-7β), 2,24 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8), 2,19 (1H, sbpost, H-1α), 2,14 (2H, m H-15), 2,05 (2H, m, H-24), 1,98 (3H, s, Me-32), 1,95 (1H, m, H-7α), 1,56 (1H, ddd, $J = 13,0, 13,0, 13,0$ Hz, H-1β), 1,47 (3H, s, Me-27), 1,47 (3H, s, Me-26), 1,33 (3H, s, Me-30), 1,32 (3H, s, Me-28), 1,30 (3H, s, Me-29), 1,30 (3H, s, Me-21), 1,17 (3H, s, Me-19), 1,13 (3H, s, Me-18);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{36}H_{49}O_{11}$ 657,3314; obtido 657,3337 [M-H].

2β,16α-di-ftaloiloxi-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-18)



24 h, sólido branco, 61% de rendimento (93 mg);

Ponto de fusão: 199 – 200 °C;

IV (KBr): 3441, 2979, 1721, 1712, 1580, 1576, 1403, 1280, 1115 cm^{-1} ;

RMN 1H (500 MHz, MeOD): $\delta =$

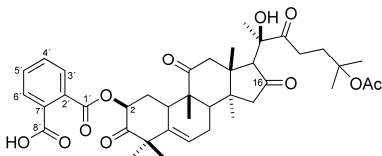
7,79 (2H, dd, $J = 7,5, 1,5$ Hz, H-6'/H-6''), 7,71 (2H, dd, $J = 7,5, 1,5$ Hz, H-3'/H-3''), 7,55 (2H, m, H-4'/H-4''), 7,45 (2H, dd, $J = 7,5, 1,2$ Hz, H-5'/H-5''), 5,76 (1H, sbpost, H-6), 5,75 (1H, dd, $J = 13,0, 5,5$ Hz, H-2), 5,49 (1H, ddd, $J = 9,3, 7,6, 1,2$ Hz, H-16), 3,45 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-12α), 3,09 (1H, m, H-10), 2,82 (1H, d, $J = 7,5$, H-17), 2,58 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-12β), 2,48 (2H, m, H-24), 2,38 (1H, sbpost, H-7β), 2,10 (1H, ddd, $J = 13,0, 5,5, 3,6$ Hz, H-1α), 2,01 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8), 2,0 (1H, sbpost, H-7α), 1,93 (1H, m, H-15β), 1,81 (1H, m, H-15α), 1,79 (3H, s, Me-32), 1,64 (1H, m, H-23α), 1,44 (1H, ddd, $J = 13,0, 13,0, 13,0$ Hz, H-1β), 1,34 (3H, s, Me-28), 1,31 (3H, s, Me-21), 1,31 (3H, s, Me-30), 1,28, 1,23 (1H, m, H-23β), 1,21 (3H, s, Me-29), 1,14 (3H, s, Me-26), 1,07 (3H, s, Me-27), 1,01 (3H, s, Me-19), 0,92 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, MeOD): $\delta = 215,6$ (C-22), 215,0 (C-11), 207,5 (C-3), 172,2 (C-31), 170,5 (C-8'), 169,8 (C-8''), 169,5 (C-1'), 168,7 (C-1''), 141,3 (C-5), 135,1 (C-2'), 133,6 (C-2''), 132,7 (C-4'), 132,5 (C-4''), 132,3 (C-5'), 132,3 (C-5''), 132,2 (C-6'), 131,8 (C-6''), 130,5 (C-7'), 130,2 (C-7''), 129,6 (C-3'), 129,5 (C-3''), 121,8 (C-6), 82,5 (C-20), 80,4 (C-25), 77,0 (C-16), 76,1 (C-2), 55,8 (C-17), (C-4), 51,5 (C-9), 49,8 (C-12), 49,5 (C-13), 49,3 (C-14), 43,9 (C-8), 42,4 (C-15), 36,0 (C-23), 34,9 (C-10), 33,2 (C-1), 32,2 (C-24), 29,0 (C-28), 26,1 (C-26), 25,7

(C-27), 25,1 (C-7), 24,8 (C-21), 22,3 (C-32), 21,8 (C-29), 20,5 (C-19), 20,2 (C-18), 19,3 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{48}H_{55}O_{14}$ 855,3597; obtido 855,3569 $[M-H]^-$.

2 β -ftaloiloxi-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-3,11,16,22-tetraona (CS-19)



24 h, sólido branco, 33% de rendimento (42 mg);

Ponto de fusão: 176-177 °C;

IV (KBr): 3440, 2977, 1729, 1712, 1370, 1281, 1254, 1128 cm^{-1} ;

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7,99 (1H, dd, J = 7,5, 1,5 Hz, H-6'), 7,83 (1H, dd, J = 7,5, 1,5 Hz, H-3'), 7,61 (1H, ddt, J = 21,0, 7,5, 1,5 Hz, H-4'), 7,57 (1H, ddt, J = 21,0, 7,5, 1,5 Hz, H-5'), 5,81 (1H, sbposto, H-6), 5,78 (1H, dd, J = 13,0, 5,5 Hz, H-2), 3,55 (1H, s, H-17), 3,31 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 α), 3,03 (1H, m, H-10), 2,74 (2H, m, H-24), 2,51 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 β), 2,49 (1H, sbposto, H-7 β), 2,26 (1H, m, H-1 α), 2,21 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 2,11 (2H, m, H-15), 2,09 (2H, m, H-23), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,96 (1H, dd, J = 19,0, 5,5 Hz, H-7 α), 1,61 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,48 (3H, s, Me-26), 1,48 (3H, s, Me-27), 1,40 (3H, s, Me-28), 1,34 (3H, s, Me-30), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,23 (3H, s, Me-20), 1,13 (3H, s, Me-19), 1,08 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, $CDCl_3$): δ = 216,1 (C-16), 213,8 (C-22), 210,9 (C-11), 205,4 (C-3), 170,4 (C-31), 168,8 (C-8'), 167,7 (C-1'), 140,1 (C-5), 133,0 (C-2'), 132,2 (C-4'), 130,9 (C-5'), 130,2 (C-6'), 129,9 (C-7'), 129,0 (C-3'), 120,0 (C-6), 81,4 (C-25), 79,9 (C-20), 74,5 (C-2), 61,7 (C-17), 51,5 (C-4), 49,5 (C-9), 48,9 (C-15), 47,7 (C-13), 47,1 (C-12), 44,5 (C-14), 42,1 (C-8), 35,0 (C-23), 33,9 (C-10), 31,8 (C-1), 30,3 (C-24), 28,7 (C-28), 25,9 (C-26), 25,9 (C-27), 24,0 (C-7), 23,5 (C-21), 22,5 (C-32), 21,3 (C-29), 20,0 (C-19), 19,8 (C-18), 19,2 (C-30);

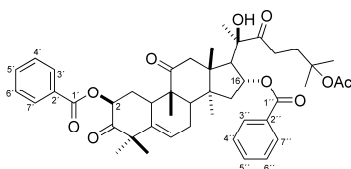
ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $C_{40}H_{50}NaO_{11}$ 724,3691; obtido 724,3694 $[M+Na]^+$.

5.3.6. PREPARAÇÃO DE CS-20 E CS-21

Em um balão de 50 mL, sob agitação magnética, atmosfera de N_2 e a 0 °C (banho de gelo), dissolveu-se 1 g (1,79 mmol) de CN-1 em

DCM (10 mL) e piridina (5 mL), adicionando-se em seguida cloreto de benzoíla (0,41 mL, 3,57 mmol). A reação permaneceu sob agitação a 20 °C por 4 h sendo então diluída com DCM e lavada com HCl 1M. Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3) para obtenção do éster dibenzoílico (**CS-20**) como produto majoritário (900 mg, 65%) e do éster monobenzoílico (**CS-21**) como produto minoritário (230 mg, 19%).

2β,16α-di-benzoiloxi-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-20)



Ponto de fusão: 122 – 123 °C;

IV (KBr): 2978, 1737, 1723, 1714, 1696, 1369, 1268, 1176, 1115, 1068, 1024, 978 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,07 (2H, dd, *J* = 8,5, 1,3 Hz, H-3'/H-7'),

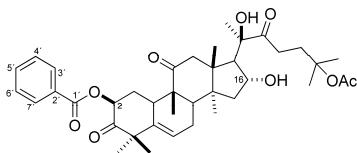
7,92 (2H, dd, *J* = 8,5, 1,3 Hz, H-3''/H-7''), 7,57 (2H, m, H-5'/H-5''), 7,44 (4H, m, H-4'/H-4''/H-6'/H-6''), 5,78 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,74 (dd, *J* = 13,0, 5,5 Hz, H-2), 5,53 (1H, m, H-16), 3,34 (1H, d, *J* = 14,7 Hz, H-12α), 2,93 (1H, m, H-10), 2,92 (2H, d, *J* = 7,2 Hz, H-17), 2,80 (1H, d, *J* = 14,6 Hz, H-12β), 2,63 (1H, ddd, *J* = 17,5, 10,0, 6,0 Hz, H-23α), 2,52 (1H, m, H-23β), 2,45 (1H, ddt, *J* = 19,0, 8,0, 2,5 Hz, H-7β), 2,30 (1H, ddd, *J* = 13,0, 5,5, 3,6 Hz, H-1α), 2,13 (1H, dd, *J* = 13,8, 9,0 Hz, H-15β), 2,08 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,96 (1H, dd, *J* = 19,0, 5,0 Hz, H-7α), 1,95 (3H, s, Me-32), 1,77 (1H, m, H-24α), 1,72 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,54 (1H, m, H-24b), 1,52 (1H, d, *J* = 13,8 Hz, H-15α), 1,47 (3H, s, H-30), 1,44 (3H, s, H-27), 1,39 (3H, s, H-26), 1,30 (3H, s, H-21), 1,27 (3H, s, H-28), 1,27 (3H, s, H-29), 1,16 (3H, s, H-19), 1,10 (3H, s, H-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 212,5 (C-22), 211,8 (C-11), 205,4 (C-3), 170,2 (C-31), 165,7 (C-1''), 165,5 (C-1'), 139,8 (C-5), 133,2 (C-5'/C-5''), 129,8 (C-3'/C-7'), 129,4 (C-3''/C-7''), 128,5 (C-4'/C-6'), 128,4 (C-4''/C-6''), 120,5 (C-6), 80,9 (C-25), 78,9 (C-20), 74,4 (C-16), 73,8 (C-2), 54,7 (C-17), 51,4 (C-4), 50,4 (C-13), 48,7 (C-12), 48,4 (C-9), 48,0 (C-14), 43,5 (C-15), 42,0 (C-8), 35,3 (C-24), 34,4 (C-10), 32,1 (C-1), 30,5 (C-23), 28,8 (C-28), 25,8 (C-26), 25,5 (C-27), 24,3 (C-21),

23,8 (C-7), 22,4 (C-32), 21,3 (C-29), 20,1 (C-19), 19,8 (C-18), 18,7 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{46}H_{55}O_{10}$ 767,3801; obtido 767,3803 $[M-H]^-$.

2β-benzoiloxi-16,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-21)



Ponto de fusão: 135 – 136 °C;

IV (KBr): 3526, 3440, 2975, 1736, 1698, 1370, 1316, 1270, 1208, 1177, 1123, 1027, 979, 713 cm^{-1} ;

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,07 (2H, dd, J = 8,4, 1,3 Hz, H-3'/H-7'), 7,56 (1H, m, H-5'), 7,44 (2H, t, J = 8,4 Hz, H-4'/H-6'), 5,82 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,72 (1H, dd, J = 13,6, 5,5 Hz, H-2), 4,31 (1H, m, H-16), 3,28 (1H, d, J = 14,6 Hz, H-12 α), 2,91 (1H, m, H-10), 2,83 (1H, m, H-23 α), 2,71 (1H, d, J = 14,6 Hz, H-12 β), 2,55 (1H, d, J = 6,9 Hz, H-17), 2,52 (1H, m, H-23 β), 2,43 (1H, ddt, J = 19,5, 8,0, 2,5 Hz, H-7 β), 2,27 (1H, ddd, J = 13,0, 5,5, 3,6 Hz, H-1 α), 2,06 (2H, m, H-24), 2,0 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 1,98 (1H, m, H-7 α), 1,96 (3H, s, Me-32), 1,85 (1H, dd, J = 13,0, 9,0 Hz, H-15 β), 1,69 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,44 (3H, s, Me-30), 1,42 (3H, s, Me-26), 1,40 (1H, m, H-15 α), 1,40 (3H, s, Me-21), 1,39 (3H, s, Me-28), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,13 (3H, s, Me-19), 0,98 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, $CDCl_3$): δ = 213,9 (C-22), 212,3 (C-11), 205,5 (C-3), 170,3 (C-31), 165,7 (C-1'), 139,8 (C-5), 133,2 (C-5'), 129,9 (C-3'/C-7'), 129,5 (C-2'), 128,3 (C-4'/6'), 120,6 (C-6), 81,3 (C-25), 78,9 (C-20), 73,9 (C-2), 71,0 (C-16), 57,8 (C-17), 51,4 (C-4), 50,7 (C-13), 48,8 (C-12), 48,5 (C-9), 48,4 (C-14), 45,5 (C-15), 42,4 (C-8), 34,8 (C-24), 34,4 (C-10), 32,1 (C-1), 30,7 (C-23), 28,8 (C-28), 26,2 (C-26), 25,9 (C-27), 24,5 (C-21), 23,9 (C-7), 22,4 (C-32), 21,3 (C-29), 20,0 (C-19), 19,9 (C-18), 18,7 (C-30);

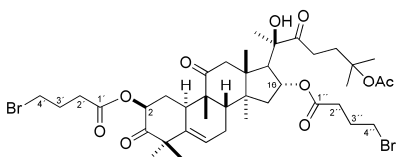
ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{39}H_{51}O_9$ 663,3539; obtido 663,3557 $[M-H]^-$.

5.3.7. PREPARAÇÃO DE CS-22 E CS-23

Em um balão de 15 mL, sob agitação magnética, dissolveu-se 200 mg (0,357 mmol) de CN-1 em DCM (2 mL) e piridina (0,2 mL). Em seguida adicionou-se cloreto de bromobutirila (376 mg, 3,57 mmol) e a reação permaneceu sob agitação a 20 °C por 4 h, sendo então diluída com DCM e lavada com HCl 1M. Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e o solvente foi removido sob pressão reduzida. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3) levou a CS-22 (156 mg, 72%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, CS-23 (82% de rendimento) foi obtido a partir de CN-9 como sólido branco.

2β,16α-di (4-bromo)-butiriloxi-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-22)



Ponto de fusão: 96 – 97 °C;

IV (KBr): 3455, 3975, 1730, 1372, 1250, 1204, 1130, 1020 cm⁻¹;

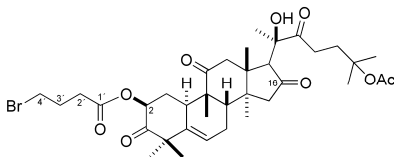
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,79 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,47 (1H, dd, *J* = 13,0, 5,5 Hz, H-2), 5,18 (1H, m, H-16), 3,51 (1H, m, H-4'), 3,46 (1H, m, H-4''), 3,25 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,79 (1H, m, H-10), 2,75 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,72 (1H, d, *J* = 7,5, H-17), 2,65 (2H, m, H-23), 2,60 (2H, m, H-2'), 2,43 (1H, m, H-7β), 2,36 (2H, m, H-2''), 2,22 (2H, m, H-3'), 2,15 (1H, ddd, *J* = 13,0, 5,5, 3,6 Hz, H-1α), 2,13 (2H, m, H-3''), 2,06 (2H, m, H-24), 2,03 (1H, dd, *J* = 13,0, 9,0 Hz, H-15β), 2,02 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,95 (1H, m, H-7α), 1,54 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,49 (3H, s, Me-27), 1,47 (3H, s, Me-26), 1,46 (3H, s, Me-21), 1,37 (1H, m, H-15α), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,31 (3H, s, Me-30), 1,29 (3H, s, Me-28), 1,10 (3H, s, Me-19), 1,02 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 212,4 (C-22), 211,7 (C-11), 205,4 (C-3), 171,7 (C-1'), 171,6 (C-1''), 170,4 (C-31), 139,6 (C-5), 120,5 (C-6), 81,0 (C-25), 78,5 (C-20), 74,2 (C-16), 73,4 (C-2), 54,0 (C-17), 51,2 (C-4), 49,9 (C-13), 48,6 (C-12), 48,4 (C-9), 47,9 (C-14), 43,3 (C-15), 42,0 (C-8), 35,2 (C-24), 34,3 (C-10), 32,8 (C-4''), 32,5 (C-4'), 32,2 (C-2'), 32,2 (C-2''), 31,9 (C-1), 30,4 (C-23), 28,7 (C-28), 27,8 (C-3'), 27,4

(C-3''), 26,0 (C-26), 25,9 (C-27), 24,2 (C-21), 23,7 (C-7), 22,4 (C-32), 21,3 (C-29), 20,0 (C-19), 19,6 (C-18), 18,8 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{40}H_{57}Br_2O_{10}$ 855,2324; obtido 855,2329 $[M-H]^-$.

2β-(4-bromo)-butiriloxi-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,16,22-tetraona (CS-23)



Ponto de fusão: 96 – 98 °C;

IV (KBr): 2977, 1738, 1730, 1368, 1254, 1202, 1127, 1020, 984 cm^{-1} ;

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,82 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,50 (1H, dd, J = 11,5, 5,2 Hz, H-2), 3,60 (1H, s, H-17), 3,51 (1H, t, H-4'), 3,35 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 α), 2,86 (1H, m, H-10), 2,76 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 β), 2,72 (2H, m, H-23), 2,60 (2H, m, H-2'), 2,53 (1H, m, H-7 β), 2,25 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 2,22 (2H, m, H-3'), 2,18 (1H, ddd, J = 13,0, 6,1, 3,6 Hz, H-1 α), 2,11 (2H, m, H-15), 2,05 (2H, m, H-24), 1,98 (3H, s, CH_3CO_2), 1,96 (1H, m, H-7 α), 1,58 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,47 (3H, s, Me-27), 1,46 (3H, s, Me-26), 1,34 (3H, s, Me-30), 1,33 (3H, s, Me-28), 1,31 (3H, s, Me-29), 1,29 (3H, s, Me-21), 1,17 (3H, s, Me-19), 1,14 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, $CDCl_3$): δ = 216,0 (C-16), 213,7 (C-22), 210,5 (C-11), 205,2 (C-3), 171,6 (C-1'), 170,4 (C-31), 139,9 (C-5), 120,1 (C-6), 81,4 (C-25), 79,9 (C-20), 73,3 (C-2), 61,6 (C-17), 51,3 (C-4), 49,4 (C-9), 48,8 (C-15), 47,7 (C-14), 47,1 (C-12), 44,5 (C-9), 42,0 (C-8), 34,9 (C-24), 34,3 (C-10), 32,5 (C-4'), 32,2 (C-2'), 31,9 (C-1), 30,2 (C-23), 28,6 (C-28), 27,8 (C-3'), 26,0 (C-26), 25,8 (C-27), 24,0 (C-7), 23,4 (C-21), 22,4 (C-32), 21,2 (C-29), 20,0 (C-19), 19,7 (C-18), 19,2 (C-30);

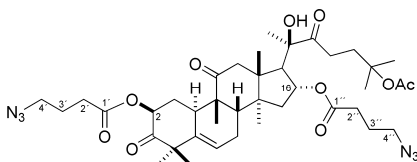
ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{36}H_{50}BrO_7$ 705,2644; obtido 705,2646 $[M-H]^-$.

5.3.8. PREPARAÇÃO DE CS-24 E CS-25

A um tubo de vidro de 10 mL contendo uma solução de **CS-22** (50 mg, 0,06 mmol) em DMF (0,6 mL), adicionou-se NaN_3 (19 mg, 0,3 mmol). O tubo foi selado com um septo, colocado dentro do reator de micro-ondas e irradiado com um pulso (potência máxima = 300 W, t = 1 min de rampa, 2 min de hold, T_{max} = 120 °C, agitação “ligada”). Após

resfriar até a t.a., controlou-se a reação por CCD e observou-se a conversão à **CS-24**. Na sequência, adicionou-se álcool propargílico (0,02 mL, 0,3 mmol), CuSO₄ (9 mg, 0,06 mmol) e ascorbato de sódio (6 mg, 0,03 mmol). O tubo foi novamente selado com um septo, e submetido às mesmas condições por mais 5 min. Após resfriar até a t.a., a mistura foi diluída com AcOEt, lavada com NaCl (sat.) e H₂O, seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3) levou a **CS-25** (24 mg, 50%) como sólido branco.

2β,16α-di (4-azido)-butiriloxi-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-24)

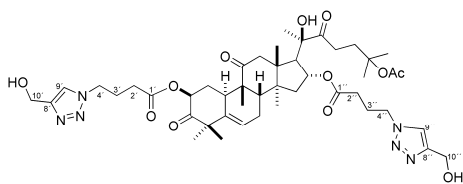


RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ = 5,80 (1H, m, H-6), 5,48 (1H, dd, *J* = 13,0, 5,5 Hz, H-2), 5,18 (1H, m, H-16), 3,40 (2H, t, H-4'/4''), 3,24 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,80 (1H, m, H-10),

2,74 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,71 (1H, d, *J* = 7,5, H-17), 2,65 (2H, m, H-23), 2,59 (4H, m, H-2'/H-2''), 2,40 (1H, m, H-7β), 2,26 (4H, m, H-3'/H-3''), 2,15 (1H, sbposto, H-1α), 2,07 (2H, m, H-24), 2,03 (1H, sbposto, H-15β), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,97 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,54 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,49 (3H, s, Me-27), 1,45 (3H, s, Me-26), 1,45 (3H, s, Me-21), 1,37 (1H, m, H-15α), 1,31 (3H, s, Me-19), 1,31 (3H, s, Me-30), 1,28 (3H, s, Me-28), 1,10 (3H, s, Me-19), 1,02 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ = 212,4 (C-22), 211,7 (C-11), 205,4 (C-3), 171,9 (C-1'), 171,8 (C-1''), 170,1 (C-31), 139,6 (C-5), 120,5 (C-6), 81,0 (C-25), 78,6 (C-20), 74,2 (C-16), 73,4 (C-2), 54,0 (C-17), 51,2 (C-4), 50,5 (C-13), 50,4 (C-4'), 49,9 (C-4''), 48,6 (C-12), 48,4 (C-9), 47,9 (C-13), 43,3 (C-15), 42,0 (C-8), 35,0 (C-24), 34,3 (C-10), 31,9 (C-1), 30,9 (C-2''), 30,9 (C-2'), 30,5 (C-23), 28,7 (C-28), 26,0 (C-26), 25,9 (C-27), 24,3 (C-3'), 24,2 (C-3''), 24,1 (C-21), 23,7 (C-7), 22,4 (C-32), 21,3 (C-29), 20,0 (C-19), 19,6 (C-18), 18,8 (C-30).

2β,16α-di-(8-hidroxi metil-4-triazoil)-butiriloxi-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-25)



IV (KBr): 3489, 3979, 1750, 1694, 1371, 1251, 1180, 1016 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, MeOD): δ = 7,84 (1H, s, H-9'), 7,83 (1H, s, H-9'), 5,74 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0

Hz, H-6), 5,54 (1H, dd, J = 13,0, 5,5 Hz, H-2), 5,37 (1H, ddd, J = 9,3, 7,6, 1,2 Hz, H-16), 4,58 (4H, s, H-10'/H-10''), 4,42 (1H, m, H-4'), 4,36 (1H, m, H-4''), 3,38 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 α), 3,01 (1H, m, H-10), 2,73 (1H, d, J = 7,5, H-17), 2,66 (1H, m, H-23 α), 2,57 (1H, m, H-23 β), 2,53 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 β), 2,34 (1H, m, H-2'), 2,34 (1H, sbpost, H-7 β), 2,17 (1H, m, H-2''), 2,14 (1H, m, H-3'), 2,06 (1H, m, H-3''), 1,98 (1H, sbpost, H-1 α), 1,95 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 1,93 (1H, sbpost, H-7 α), 1,89 (1H, sbpost, H-15 β), 1,85, 1,82 (2H, m, H-24), 1,36 (1H, sbpost, H-1 β), 1,33 (3H, s, Me-26), 1,33 (3H, s, Me-27), 1,31 (1H, sbpost, H-15 α), 1,28 (3H, s, Me-21), 1,26 (3H, s, Me-28), 1,24 (3H, s, Me-), 1,21 (3H, s, Me-30), 1,16 (3H, s, Me-29), 0,97 (3H, s, Me-19), 0,86 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, MeOD): δ = 216,8 (C-22), 214,9 (C-11), 208,0 (C-3), 173,4 (C-1'), 173,0 (C-1''), 172,3 (C-31), 149,2 (C-8'), 149,0 (C-8''), 141,2 (C-5), 124,4 (C-9'), 124,2 (C-9''), 121,7 (C-6), 82,8 (C-25), 80,6 (C-20), 75,7 (C-16), 75,4 (C-2), 56,5 (C-10'), 56,5 (C-10''), 56,2 (C-17), 52,4 (C-4), 51,4 (C-13), 50,3 (C-4'), 50,2 (C-4''), 49,8 (C-12), 49,7 (C-9), 49,6 (C-14), 44,5 (C-15), 43,7 (C-8), 35,6 (C-24), 34,9 (C-10), 33,3 (C-1), 33,0 (C-23), 31,9 (C-2''), 31,4 (C-2'), 29,0 (C-28), 26,7 (C-3'), 26,4 (C-3''), 26,4 (C-26), 26,3 (C-27), 25,3 (C-21), 24,7 (C-7), 22,3 (C-32), 21,8 (C-29), 20,4 (C-19), 20,2 (C-18), 19,2 (C-30);

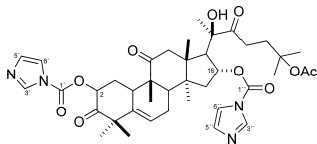
ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $\text{C}_{46}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_{12}$ 893,4700; obtido 893,4615 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

5.3.9. PREPARAÇÃO DE CS-26, CS-27 E CS-28

A uma solução de **CN-1** 100 mg (0,179 mmol) em THF (3 mL) a 25 °C, sob agitação magnética, adicionou-se CDI (116 mg, 0,716 mmol) e a reação foi refluxada por 6 h, sob atmosfera de N_2 . Após resfriar até t.a. a mistura foi vertida sobre água destilada e extraída com éter etílico. Após ser lavada com NaCl (sat.) e água destilada, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida, fornecendo um óleo amarelo. A purificação por coluna

cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 2:8) levou ao isolamento de **CS-26** (67 mg, 50%), **CS-27** (12 mg, 10%) e **CS-28** (5 mg, 4%) como sólidos brancos.

2β,16α-di-(1H-imidazol-1-carboniloxi)-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-26)



Ponto de fusão: 148-149 °C;

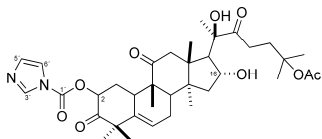
IV (KBr): 2935, 1758, 1727, 1395, 1370, 1316, 1289, 1240, 1223, 1172, 1041, 1002, 938 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,17 (1H, m, H-2'), 8,07 (1H, m, H-2''), 7,45 (1H, s, H-5'), 7,37 (1H, s, H-5''), 7,09 (2H, m, H-4'/ H-4''), 5,84 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,65 (1H, dd, *J* = 13,0, 5,0 Hz, H-2), 5,63 (1H, m, H-16), 3,31 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,91 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, H-17), 2,87 (1H, m, H-10), 2,80 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,65 (2H, m, H-23), 2,48 (1H, ddt, *J* = 19,0, 8,0, 2,5 Hz, H-7β), 2,37 (1H, ddd, *J* = 13,0, 5,5, 3,6 Hz, H-1α), 2,15 (1H, dd, *J* = 13,8, 9,0 Hz, H-15β), 2,10 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,99 (1H, dd, *J* = 19,0, 5,0 Hz, H-7α), 1,98 (3H, s, Me-32), 1,75 (1H, sbposto, H-15α), 1,73 (2H, m, H-24), 1,68 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,50 (3H, s, Me-30), 1,39 (3H, s, Me-27), 1,37 (3H, s, Me-26), 1,37 (3H, s, Me-21), 1,34 (3H, s, Me-29), 1,32 (3H, s, Me-28), 1,17 (3H, s, Me-19), 1,08 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,4 (C-22), 211,3 (C-11), 204,0 (C-3), 170,2 (C-31), 147,8 (C-1'), 147,7 (C-1''), 139,0 (C-5), 137,2 (C-3'), 136,8 (C-3''), 130,8 (C-5'), 130,6 (C-5''), 120,9 (C-6), 117,2 (C-6'), 117,0 (C-6''), 80,9 (C-25), 78,9 (C-20), 78,5 (C-2), 76,6 (C-16), 54,7 (C-17), 51,3 (C-4), 50,2 (C-13), 48,4 (C-12), 48,2 (C-9), 47,9 (C-14), 43,0 (C-15), 41,9 (C-8), 35,0 (C-24), 34,1 (C-10), 31,8 (C-1), 31,0 (C-23), 28,5 (C-28), 25,7 (C-26), 25,6 (C-27), 24,3 (C-21), 23,7 (C-7), 22,3 (C-32), 21,1 (C-29), 20,2 (C-19), 19,7 (C-18), 18,7 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₄₀H₅₃N₄O₁₀ 749,3756; obtido 749,3754 [M+H]⁺.

2β-(1H-imidazol-1-carboniloxi)-16,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-27)



Ponto de fusão: 135-136 °C;

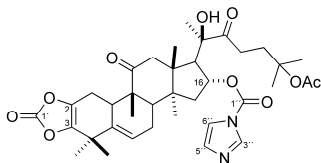
IV (KBr): 3453, 3936, 1770, 1732, 1715, 1694, 1396, 1284, 1241, 1178 cm⁻¹;

RMN ¹H(500 MHz, CDCl₃): δ = 8,16 (1H, m, H-2'), 7,45 (1H, s, H-5'), 7,09

(1H, m, H-4'), 5,86 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,62 (1H, dd, *J* = 13,0, 5,0 Hz, H-2), 4,32 (1H, m, H-16), 3,27 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,89 (1H, m, H-10), 2,82 (2H, m, H-23), 2,73 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,55 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H-17), 2,45 (1H, ddt, *J* = 19,0, 8,0, 2,5 Hz, H-7β), 2,35 (1H, ddd, *J* = 13,0, 5,5, 3,6 Hz, H-1α), 2,06 (2H, m, H-24), 2,05 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 2,03 (1H, sbpostto, H-7α), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,85 (1H, dd, *J* = 13,0, 9,0 Hz, H-15α), 1,70 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,47 (3H, s, Me-27), 1,45 (3H, s, Me-26), 1,43 (3H, s, Me-21), 1,40 (1H, sbpostto, H-15α), 1,39 (3H, s, Me-30), 1,37 (3H, s, Me-28), 1,34 (3H, s, Me-29), 1,14 (3H, s, Me-19), 1,0 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,8 (C-22), 212,3 (C-11), 204,3 (C-3), 170,3 (C-31), 147,9 (C-1'), 138,9 (C-5), 137,3 (C-3'), 130,7 (C-5'), 121,3 (C-6), 117,2 (C-6'), 81,3 (C-25), 78,9 (C-20), 76,7 (C-2), 70,8 (C-16), 57,8 (C-17), 51,3 (C-4), 50,5 (C-13), 48,8 (C-12), 48,3 (C-9), 48,3 (C-14), 45,4 (C-15), 42,3 (C-8), 34,8 (C-24), 34,1 (C-10), 31,9 (C-1), 30,7 (C-23), 28,6 (C-28), 26,2 (C-26), 25,8 (C-27), 24,5 (C-21), 23,8 (C-7), 22,4 (C-32), 21,2 (C-29), 20,1 (C-19), 19,9 (C-18), 18,7 (C-30);

2,3-[carbonil-bis(oxi)],16α-(1H-imidazol-1-carboniloxi)-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-2,5-dien-11,22-diona (CS-28)



Ponto de fusão: 132-133 °C;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,13 (1H, m, H-5'), 7,38 (1H, s, H-3''), 7,10 (1H, H-4''), 5,96 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,58 (1H, m, H-16), 3,18 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,85 (1H, d, *J* =

7,2 Hz, H-17), 2,76 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,71 (1H, m, H-10), 2,60 (2H, m, H-23), 2,52 (1H, ddt, *J* = 19,0, 8,0, 2,5 Hz, H-7β), 2,39 (2H, m, H-1), 2,15 (1H, dd, *J* = 15,0, 9,0 Hz, H-15β), 2,10 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,98 (3H, s, Me-32), 1,97 (1H, dd, *J* = 19,0, 5,0 Hz, H-7α), 1,81 (1H, m, H-24α), 1,72 (1H, m, H-24β), 1,59 (1H, d, *J* = 15 Hz, H-15α), 1,48 (3H, s, Me-30), 1,38 (3H, s, Me-27), 1,37 (3H, s, Me-26),

1,35 (3H, s, Me-21), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,28 (3H, s, Me-28), 1,25 (3H, s, Me-19), 1,06 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 212,7 (C-22), 211,2 (C-11), 170,2 (C-31), 153,4 (C-1'), 147,5(C-1''), 141,5 (C-3), 138,6 (C-5), 134,7 (C-3''), 130,4 (C-5''), 122,5 (C-2), 117,1 (C-6''), 80,9 (C-25), 78,8 (C-20), 78,6 (C-16), 54,5 (C-17), 50,4 (C-13), 48,5 (C-12), 48,1 (C-9), 47,9 (C-14), 43,0 (C-15), 42,7 (C-8), 36,4 (C-4), 35,0 (C-10), 35,0 (C-24), 30,8 (C-23), 29,5 (C-28), 25,9 (C-26), 25,7 (C-27), 24,6 (C-21), 24,2 (C-29), 23,4 (C-7), 22,4 (C-32), 21,2 (C-1), 21,2 (C-19), 19,7 (C-18), 18,9 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_{10}$ 681,3382; obtido 681,3387 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5.3.10. PREPARAÇÃO DE CS-29, CS-30 E CS-31

Método A:

A uma mistura de **CN-1** (100 mg, 0,18 mmol) e piridina (0,14 mL, 1,8 mmol) em DCM (1 mL), a 0 °C (banho de gelo) e sob agitação, adicionou-se TsCl (342 mg, 1,8 mmol) e a reação foi agitada a 0 °C por 3h. Em seguida, a mistura foi diluída com DCM, lavada com HCl 1 M e H_2O , seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um óleo incolor. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levou a **CS-29** (62 mg, 48%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-30** (45% de rendimento) foi obtido a partir de **CN-7** como sólido branco.

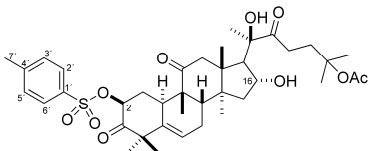
Método B:

A uma solução de **CN-1** (1 g, 1,79 mmol) em DCM (8 mL) adicionou-se DABCO (1g, 8,95 mmol) e a mistura, sob agitação, foi resfriada a 0 °C (banho de gelo). Adicionou-se então TsCl (3 x 450 mg a cada 15 min.; 7,16 mmol) e a mistura foi mantida a 0 °C por mais 30 minutos. Em seguida, a reação foi diluída com DCM, lavada com HCl 1 M e NaCl (sat.) gelados, seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um óleo incolor. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levou a **CS-29** (1,02 g, 80%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-30** foi obtido a partir de **CN-7** (77% de rendimento) como sólido branco.

Utilizando ácido acético (1,5 mL), piridina (1,5 mL) e DMAP (cat.), 400 mg (0,56 mmol) **CS-29** foi acetilada, dando origem a **CS-31** (403 mg, 95%)

2β-(4-toluenosulfonil)-16α,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-29)



Ponto de fusão: 122 – 123 °C;

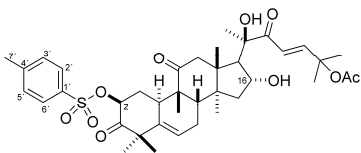
IV (KBr): 3549, 3449, 1279, 1732, 1697, 1598, 1370, 1357, 1179, 967, 889 cm⁻¹;

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,65 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-3' / H-5'), 7,35 (2H, *J* = 8,4 Hz, H-2' / H-6'), 5,79 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,39 (1H, dd, *J* = 13,0, 6,0 H-2), 4,31 (1H, m, H-16), 3,25 (1H, d, *J* = 14,5, H-12α), 2,82 (1H, m, H-23α), 2,81 (1H, m, H-10), 2,70 (1H, d, *J* = 14,5, H-12β), 2,54 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-17), 2,53 (1H, sbposto, H-23β), 2,45 (3H, s, Me-7'), 2,40 (1H, m, H-7β), 2,24 (1H, ddd, *J* = 13,0, 6,1, 3,6 Hz, H-1α), 2,06 (2H, m, H-24), 1,99 (1H, m, H-7α), 1,98 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-8), 1,96 (3H, s, Me-32), 1,55 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,85 (1H, dd, *J* = 13,0, 9,0 Hz, H-15β), 1,47 (3H, s, Me-27), 1,45 (3H, s, Me-26), 1,43 (3H, s, Me-21), 1,40 (1H, m, H-15α), 1,35 (3H, s, Me-30), 1,27 (3H, s, Me-28), 1,26 (3H, s, Me-29), 1,24 (1H, m, H-1α), 1,03 (3H, s, Me-19), 0,97 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,9 (C-22), 211,8 (C-11), 203,9 (C-3), 170,4 (C-31), 144,9 (C-4'), 138,9 (C-5), 133,9 (C-1'), 129,7 (C-3' / C-5'), 127,9 (C-2' / C-6'), 121,0 (C-6), 81,3 (C-25), 78,9 (C-2), 78,8 (C-20), 71,0 (C-16), 57,7 (C-17), 51,5 (C-4), 50,6 (C-13), 48,7 (C-12), 48,3 (C-9), 48,3 (C-14), 45,4 (C-15), 42,3 (C-8), 34,8 (C-24), 34,2 (C-10), 33,5 (C-1), 30,7 (C-23), 28,5 (C-28), 26,1 (C-26), 25,8 (C-27), 24,4 (C-21), 23,8 (C-7), 22,4 (C-32), 21,7 (C-29), 21,3 (C-2''), 19,9 (C-19), 19,8 (C-18), 18,6 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₃₉H₅₈NO₁₀S 749,3776; obtido 732,3780 [M+NH₄]⁺.

2β-(4-toluenosulfonil)-16α,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5,23-dien-3,11,22-triona (CS-30)



Ponto de fusão: 133 – 134 °C;

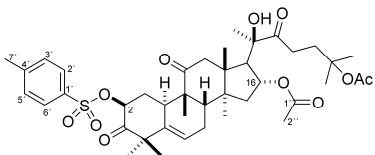
IV (KBr): 3450, 3279, 1738, 1730, 1693, 1632, 1368, 1250, 1175, 1126, 1092, 968, 891, 679, 560 cm^{-1} ;

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,85 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-3'/H-5'), 7,34 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-2'/H-6'), 7,07 (1H, d, J = 15,6 Hz, H-24), 6,48 (1H, d, J = 15,6 Hz, H-23), 5,78 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,40 (1H, dd, J = 13,0, 6,0 Hz, H-2), 4,35 (1H, m, H-16), 3,24 (1H, d, J = 14,7 Hz, H-12 α), 2,81 (1H, m, H-10), 2,70 (1H, d, J = 14,7 Hz, H-12 β), 2,50 (1H, d, J = 7,1 Hz, H-17), 2,45 (3H, s, H-7'), 2,38 (1H, ddt, J = 19,5, 8,2, 2,4 Hz, H-7 β), 2,24 (1H, ddd, 12,5, 5,5, 3,7 Hz, H-1 α), 2,03 (3H, s, Me-32), 1,97 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-8), 1,96 (1H, m, H-7 α), 1,86 (1H, dd, J = 13,3, 9,3, H-15 β), 1,58 (3H, s, Me-26), 1,56 (1H, sbpostto, H-1 α), 1,55 (3H, s, Me-26), 1,45 (3H, s, Me-26), 1,42 (1H, sbpostto, H-15 α), 1,42 (3H, s, Me-21), 1,26 (3H, s, Me-28), 1,26 (3H, s, Me-29), 1,03 (3H, s, Me-19), 0,97 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 211,8 (C-11), 203,9 (C-3), 202,4 (C-22), 170,2 (C-31), 152,0 (C-24), 144,8 (C-4'), 138,9 (C-5), 134,0 (C-1'), 129,6 (C-3'/C-5'), 127,9 (C-2'/C-6'), 121,1 (C-6), 120,2 (C-23), 79,3 (C-25), 78,8 (C-2), 78,1 (C-20), 71,3 (C-16), 58,2 (C-17), 51,5 (C-4), 50,6 (C-13), 48,7 (C-12), 48,4 (C-9), 48,0 (C-14), 45,3 (C-15), 42,3 (C-8), 34,2 (C-10), 33,5 (C-1), 28,5 (C-28), 26,4 (C-27), 25,9 (C-26), 23,9 (C-21), 23,8 (C-7), 22,0 (C-32), 21,7 (C-7'), 21,4 (C-29), 19,9 (C-18), 19,9 (C-19), 18,6 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{NO}_{10}\text{S}$ 730,3619; obtido 730,3613 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

2 β -(4-toluenossulfonil)-20R-hidroxi-16 α ,25-diacetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-31)



Ponto de fusão: 121 – 122 °C

IV (KBr): 3315, 2979, 1735, 1697, 1369, 1254, 1175, 1091, 1014, 970 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 7,85 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-3'/H-5'), 7,35 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-2'/H-6'), 5,77 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,70 (1H, dd, J = 13,0, 6,0 Hz, H-2), 5,14 (1H, m, H-16), 3,25 (1H,

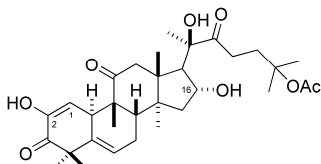
d, $J = 14,7$ Hz, H-12 α), 2,79 (1H, m, H-10), 2,75 (1H, d, $J = 14,7$ Hz, H-12 β), 2,71 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-17), 2,69 (2H, m, H-23), 2,45 (3H, s, Me-7'), 2,40 (1H, ddt, $J = 19,5, 8,5, 2,5$ Hz, H-7 β), 2,24 (1H, m, H-1 α), 2,04 (2H, m, H-24), 2,0 (1H, m, H-15 β), 2,0 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-8), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,94 (3H, s, Me-2''), 1,92 (1H, m, H-7 α), 1,50 (3H, s, Me-26), 1,47 (3H, s, Me-27), 1,45 (3H, s, Me-21), 1,40 (1H, dd, $J = 14,0, 1,0$ Hz, H-15 α), 1,29 (3H, s, Me-30), 1,25 (3H, s, Me-28), 1,25 (3H, s, Me-29), 1,04 (3H, s, Me-19), 1,01 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 212,5$ (C-22), 211,4 (C-11), 203,9 (C-3), 170,3 (C-31), 170,1 (C-1''), 145,0 (C-4'), 139,1 (C-5), 134,1 (C-1'), 129,8 (C-3'/ C-5'), 128,0 (C-2'/ C-6'), 121,1 (C-6), 81,2 (C-25), 78,8 (C-2), 78,7 (C-20), 74,2 (C-16), 54,2 (C-17), 51,7 (C-4), 50,0 (C-13), 48,8 (C-12), 48,4 (C-9), 48,0 (C-14), 43,3 (C-15), 42,1 (C-8), 35,3 (C-24), 34,4 (C-10), 33,6 (C-1), 30,6 (C-23), 28,6 (C-28), 26,2 (C-26), 26,0 (C-27), 24,4 (C-21), 23,8 (C-7), 22,5 (C-32), 21,9 (C-7'), 21,5 (C-29), 21,1 (C-2''), 20,1 (C-19), 19,8 (C-18), 18,9 (C-30);

5.3.11. PREPARAÇÃO DE CS-32

A 50 mg de CS-28 (0,07 mmol) sob atmosfera de N_2 e a 0°C (banho de gelo), adicionou-se $(\text{Bu})_4\text{N}^+\text{F}^-$ (0,7 mL, 0,7 mmol; solução 1M em THF) e a reação foi agitada a 0°C por 10 min. Em seguida, a mistura foi diluída com Et_2O , lavada com NaCl (sat.) e H_2O , seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levou a CS-32 (12 mg, 30%) como sólido branco.

2,16 α ,20R-tri-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-1,5-dien-3,11,22-triona (CS-32)



Ponto de fusão: 222-223 $^\circ\text{C}$

IV (KBr): 3547, 2978, 1729, 1712, 1693, 1666, 1660, 1371, 1261, 1231, 1124 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,95$ (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-1), 5,77 (1H, ddd, $J = 6,0, 2,0, 2,0$ Hz, H-6), 4,33 (1H, m, H-16), 3,51 (1H, m, H-10), 3,23 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-12 α), 2,82 (1H, ddd, $J = 17,5, 10,0, 6,0$ Hz), 2,73 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-12 β), 2,53, 2,51 (1H, d, $J = 6,9$ Hz, H-17),

2,52 (1H, m, H-23 β), 2,39 (1H, m, H-7 β), 2,05 (2H, m, H-24), 2,02 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8), 1,97 (1H, m, H-7 α), 1,96 (3H, Me-32), 1,86 (1H, dd, $J = 13,0, 9,0$ Hz, H-15 β), 1,46 (3H, Me-26), 1,44 (3H, Me-27), 1,42 (1H, sbposto, H-15 α), 1,42 (3H, Me-21), 1,40 (3H, Me-30), 1,36 (3H, Me-28), 1,25 (3H, Me-29), 1,03 (3H, Me-19), 0,99 (3H, Me-18),

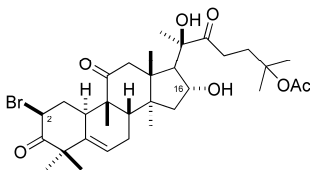
RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 213,9$ (C-22), 212,8 (C-11), 198,7 (C-3), 170,3 (C-31), 144,6 (C-5), 136,8 (C-2), 120,7 (C-6), 114,8 (C-1), 81,3 (C-25), 78,9 (C-20), 71,0 (C-16), 57,8 (C-17), 50,7 (C-4), 48,9 (C-13), 48,8 (C-9), 48,4 (C-12), 47,5 (C-14), 45,7 (C-15), 41,6 (C-8), 34,8 (C-24), 34,7 (C-10), 30,7 (C-23), 27,9 (C-28), 26,1 (C-27), 25,8 (C-26), 24,5 (C-21), 23,6 (C-7), 22,4 (C-32), 20,2 (C-29), 20,1 (C-19), 19,8 (C-18), 18,2 (C-30).

5.3.12. PREPARAÇÃO DE CS-33 E CS-34

A uma solução de **CS-29** (100 mg, 0,14 mmol) em DMF (1 mL), sob atmosfera de N_2 e sob agitação, adicionou-se $(\text{Bu})_4\text{N}^+\text{Br}^-$ (451 mg, 1,4 mmol) e a reação foi agitada por 72 h. Em seguida, a mistura foi diluída com Et_2O , lavada com NaCl (sat.) e H_2O , seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levou a **CS-33** (70 mg, 80%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-34** (86% de rendimento) foi obtido a partir de **CS-30** como sólido branco.

2 β -bromo-16 α ,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-3,11,22-triona (**CS-33**)



Ponto de fusão: 113 – 114 °C;

IV (KBr): 3289, 2978, 1730, 1697, 1368, 1260, 1218, 1128, 1021 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,81$ (1H, m, H-6), 4,85 (1H, dd, $J = 11,5, 5,2$ Hz, H-2), 4,31 (1H, m, Hz, H-16), 3,22

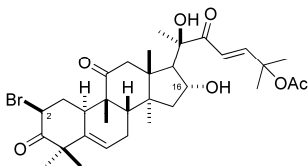
(1H, d, $J = 14,7$ Hz, H-12 α), 2,82 (1H, m, H-23 α), 2,70 (1H, m, H-10), 2,70 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-12 β), 2,52 (1H, m, H-23 β), 2,53 (1H, d, $J = 7,1$ Hz, H-17), 2,52 (1H, m, H-1 α), 2,41 (1H, m, H-7 β), 2,06 (2H, m, H-24), 2,01 (3H, s, Me-32), 1,98 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-8), 1,99 (1H, m, H-7 α), 1,86 (1H, ddd, $J = 13,0, 13,0, 13,0$ Hz, H-1 β), 1,85 (1H, dd, $J =$

13,0, 9,0 Hz, H-15 β), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,44 (3H, s, Me-26), 1,42 (3H, s, Me-21), 1,40 (1H, m, H-15 α), 1,34 (3H, s, Me-30), 1,38 (3H, s, Me-29), 1,29 (3H, s, Me-28), 1,10 (3H, s, Me-19), 0,97 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 213,9 (C-22), 212,2 (C-11), 203,6 (C-3), 170,3 (C-31), 139,4 (C-5), 120,8 (C-6), 81,3 (C-25), 78,9 (C-20), 71,0 (C-16), 57,8 (C-17), 52,8 (C-2), 51,9 (C-4), 50,6 (C-13), 48,8 (C-12), 48,5 (C-14), 48,3 (C-9), 45,5 (C-15), 42,4 (C-8), 37,9 (C-1), 37,1 (C-10), 34,8 (C-24), 30,7 (C-23), 28,9 (C-28), 26,2 (C-27), 25,9 (C-26), 24,5 (C-21), 23,8 (C-7), 23,2 (C-29), 22,4 (C-32), 20,0 (C-19), 19,9 (C-18), 18,7 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{BrO}_7$ 621,2432; obtido 621,2409 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

2 β -bromo-16 α ,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5,23-dien-3,11,22-triona (**CS-34**)



Ponto de fusão: 131 - 132 $^{\circ}\text{C}$;

IV (KBr): 3510, 2978, 1729, 1693, 1633, 1370, 1250, 1125 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 7,06 (1H, d, J = 15,6 Hz, H-24), 6,47 (1H, d, J = 15,6, H-23), 5,81 (1H, m, H-6), 4,86 (1H, dd, J = 13,0, 5,5 Hz, H-2), 4,36 (1H, m, H-16), 3,21 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 α), 2,72 (1H, m, H-10), 2,68 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 β), 2,51 (1H, ddd, J = 13,0, 6,1, 3,6 Hz, H-1 α), 2,49 (1H, d, J = 7,1 Hz, H-17), 2,41 (1H, m, H-7 β), 2,01 (3H, s, Me-32), 1,99 (1H, m, H-7 α), 1,97 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 1,88 (1H, dd, J = 13,0, 7,1 Hz, H-15 β), 1,86 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,57 (3H, s, Me-27), 1,55 (3H, s, Me-26), 1,44 (3H, s, Me-21), 1,43 (1H, d, J = 13,0 Hz, H-15 α), 1,38 (3H, s, Me-29), 1,33 (3H, s, Me-30), 1,29 (3H, s, Me-28), 1,09 (3H, s, Me-19), 0,98 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 212,1 (C-11), 203,7 (C-3), 202,4 (C-22), 170,2 (C-31), 152,0 (C-24), 139,4 (C-5), 120,9 (C-6), 120,3 (C-23), 79,3 (C-25), 78,2 (C-20), 71,3 (C-16), 58,2 (C-17), 52,8 (C-2), 51,9 (C-4), 50,6 (C-14), 50,2 (C-4), 48,7 (C-12), 48,5 (C-9), 48,1 (C-13), 45,3 (C-15), 42,5 (C-8), 37,9 (C-1), 37,1 (C-10), 28,9 (C-28), 26,4 (C-27), 26,0 (C-26), 24,0 (C-21), 23,8 (C-7), 23,3 (C-29), 22,0 (C-32), 20,0 (C-19), 19,9 (C-18), 18,8 (C-30);

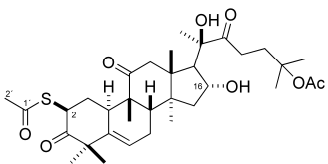
ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{32}H_{44}BrO_7$ 619,2276; obtido 619,2292 $[M-H]^-$.

5.3.13. PREPARAÇÃO DE CS-35 E CS-36

A uma solução de **CS-29** (100 mg, 0,14 mmol) em acetona (1 mL), sob atmosfera de N_2 e sob agitação, adicionou-se $CH_3COS^+K^+$ (160 mg, 1,4 mmol) e a reação foi agitada por 6 h. Em seguida, a mistura foi filtrada em funil sinterizado (G-4), seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido amarelo. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levou a **CS-35** (51 mg, 59%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-36** (73% de rendimento) foi obtido a partir de **CS-31** como sólido branco.

2 β -tioacetil-25-acetiloxi-16 α ,20R-di-hidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-3,11,22-triona (**CS-35**)



Ponto de fusão: 116-117°C;

IV (KBr): 3526, 3449, 2976, 2943, 1739-1682, 1367, 1254, 1219, 1175, 1120, 1021, 961, 732, 632 cm^{-1} ;

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): 5,80 (1H, ddd, $J = 6,0, 2,0, 2,0$ Hz, H-6), 4,59 (1H, dd,

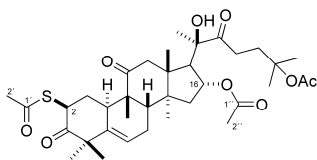
$J = 14,0, 5,0$ Hz, H-2), 4,32 (1H, ddd, $J = 9,0, 7,6, 1,2$ Hz, H-16), 3,31 (1H, $J = 14,6$ Hz, H-12 α), 2,87 (1H, m, H-10), 2,82 (1H, ddd, $J = 18,0, 9,1, 7,0$ Hz, H-23 α), 2,71 (1H, d, $J = 14,6$ Hz, H-12 β), 2,56 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-17), 2,52 (1H, m, H-23 β), 2,40 (1H, ddt, $J = 19,5, 8,0, 2,5$ Hz, H-7 β), 2,36 (3H, s, Me-2'), 2,13 (1H, ddd, $J = 13,0, 5,0, 4,0$ Hz, H-1 α), 2,06 (2H, m, H-24), 1,98 (3H, s, Me-32), 1,97 (1H, m, H-7 α), 1,96 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8), 1,84 (1H, dd, $J = 13,0, 9,0$ Hz, H-15 β), 1,51 (1H, ddd, $J = 13,0, 13,0, 13,0$ Hz, H-15 β), 1,47 (3H, s, Me-26), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,45 (3H, s, Me-21), 1,43 (3H, s, Me-28), 1,40 (1H, sbposto, H-15 α), 1,37 (3H, s, Me-30), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,05 (3H, s, Me-19), 0,97 (3H, sl, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 213,9$ (C-22), 212,3 (C-11), 206,8 (C-3), 194,6 (C-1'), 170,3 (C-1''), 140,1 (C-5), 120,3 (C-6), 81,2 (C-25), 78,9 (C-20), 71,0 (C-16), 57,7 (C-17), 52,0 (C-4), 50,7 (C-13), 50,6 (C-2), 48,8 (C-12), 48,7 (C-9), 48,3 (C-14), 45,5 (C-15), 42,4 (C-8), 36,5 (C-10), 34,8 (C-24), 33,8 (C-1), 30,7 (C-2'), 30,6 (C-23), 29,2 (C-

28), 26,1 (C-26), 25,8 (C-27), 24,4 (C-21), 23,9 (C-7), 22,4 (C-29), 22,2 (C-32), 19,8 (C-19), 19,8 (C-18), 18,7 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $C_{34}H_{50}NaO_8S$ 641,3119; obtido 641,3128 $[M+Na]^+$.

2β-tioacetil-16α,25-diacetiloxi-20R-hidroxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-36)



Ponto de fusão: 113-114 °C;

IV (KBr): 3479, 2978, 1737, 1730, 1714, 1693, 1682, 1369, 1249 cm^{-1} ;

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,78 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,14 (1H, ddd, J = 9,3, 7,6, 1,2 Hz, H-16), 4,58 (1H, dd, J = 14,0, 5,0 Hz, H-2), 3,30 (1H, dd, J = 14,6, 0,6 Hz, H-12 α), 2,85 (1H, m, H-10), 2,75 (1H, d, J = 14,6 Hz, H-12 β), 2,72 (1H, d, J = 7,6 Hz, H-17), 2,66 (2H, m, H-23), 2,41 (1H, ddt, J = 19,5, 8,0, 2,5 Hz, H-7 β), 2,36 (3H, s, Me-2'), 2,13 (1H, ddd, J = 13,0, 8,5, 5,0 Hz, H-1 α), 2,05 (2H, m, H-24), 2,01 (1H, sbpostto, H-15 β), 2,0 (3H, s, Me-32), 1,99 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 1,95 (3H, s, Me-2''), 1,93 (1H, m, H-7 α), 1,51 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,50 (3H, s, Me-26), 1,47 (3H, s, Me-27), 1,45 (3H, s, Me-21), 1,40 (1H, dd, J = 1,2, 14,2, H-15 α), 1,36 (3H, s, Me-28), 1,33 (3H, s, Me-30), 1,31 (3H, s, Me-29), 1,06 (3H, s, Me-19), 1,01 (3H, sl, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, $CDCl_3$): δ = 212,4 (C-22), 211,7 (C-11), 206,7 (C-3), 194,6 (C-1'), 170,1 (C-31), 170,0 (C-1''), 140,2 (C-5), 120,3 (C-6), 81,0 (C-25), 78,6 (C-20), 74,1 (C-16), 54,0 (C-17), 51,9 (C-4), 50,6 (C-2), 50,0 (C-13), 48,7 (C-12), 48,6 (C-9), 47,9 (C-14), 43,3 (C-15), 42,1 (C-8), 36,5 (C-10), 35,2 (C-24), 33,8 (C-1), 30,6 (C-2'), 30,4 (C-23), 29,3 (C-28), 26,0 (C-26), 25,8 (C-27), 24,2 (C-21), 23,8 (C-7), 22,4 (C-29), 22,3 (C-32), 20,9 (C-2''), 19,8 (C-19), 19,6 (C-18), 18,8 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{36}H_{51}O_9S$ 559,3259; obtido 659,3264 $[M-H]^-$.

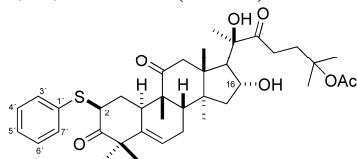
5.3.14. PREPARAÇÃO DE CS-37, CS-38 E CS-39

A uma solução de **CS-29** (200 mg, 0,28 mmol) em THF anidro (2,5 mL), sob atmosfera de N_2 e sob agitação, adicionou-se tiofenol (0,04 mL, 0,42mmol), quantidade catalítica de NaH e a reação foi

agitada por 2 h. Em seguida, a mistura foi diluída com DCM, lavada com NaOH 20% e H₂O, seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3) levou a **CS-37** (153 mg, 84%) e **CS-39** (9 mg, 5%) como sólidos brancos.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-38** (72 mg, 78% de rendimento) foi obtido a partir de **CS-31** como sólido branco.

2β-tiofenil-16α,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-37)



Ponto de fusão: 105 – 106 °C;

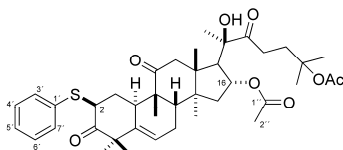
IV (KBr): 3454, 2976, 1730, 1713, 1704, 1694, 1470, 1462, 1366, 1252, 1210, 1174, 1128, 1022, 749, 692 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,40 (2H, m, H-2'/ H-6'), 7,30 (2H, m, H-3'/ H-5'), 7,26 (1H, m, H-4'), 5,78 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 4,30 (1H, m, H-16), 4,07 (1H, dd, *J* = 13,5, 5,3, Hz, H-2), 3,18 (1H, d, *J* = 14,6 Hz, H-12α), 2,80 (1H, m, H-23α), 2,63 (1H, d, *J* = 14,6 Hz, H-12β), 2,62 (1H, m, H-10), 2,51 (1H, d, *J* = 7,1 Hz, H-17), 2,50 (1H, m, H-23β), 2,40 (ddt, *J* = 19,6, 8,5, 2,9 Hz, H-7β), 2,26 (1H, ddd, *J* = 13,5, 5,3, 3,6 Hz, H-1α), 2,05 (2H, m, H-24), 1,97 (1H, sbpostto, H-7α), 1,96 (3H, s, Me-32), 1,95 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,83 (1H, dd, *J* = 9,5, 12,7 Hz, H-15β), 1,54 (1H, ddd, *J* = 13,5, 13,5, 13,5 Hz, H-1β), 1,45 (3H, s, Me-26), 1,43 (3H, s, Me-27), 1,39 (3H, s, Me-21), 1,37 (1H, d, *J* = 12,7 Hz, H-15α), 1,33 (3H, s, Me-29), 1,29 (3H, s, Me-28), 1,05 (3H, s, Me-19), 0,94 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,9 (C-22), 212,2 (C-11), 208,2 (C-3), 170,3 (C-31), 140,3 (C-5), 133,8 (C-1'), 132,5 (C-3'/ C-5'), 129,0 (C-2'/ C-6'), 127,5 (C-4'), 120,1 (C-6), 81,2 (C-25), 78,9 (C-20), 71,0 (C-16), 57,7 (C-2), 54,6 (C-17), 51,7 (C-4), 50,6 (C-13), 48,7 (C-9), 48,6 (C-12), 48,4 (C-14), 45,5 (C-15), 42,3 (C-8), 36,4 (C-10), 34,8 (C-24), 33,7 (C-1), 30,6 (C-23), 28,7 (C-28), 26,1 (C-26), 25,8 (C-27), 24,4 (C-21), 23,8 (C-7), 23,1 (C-29), 22,4 (C-32), 19,8 (C-19), 19,8 (C-18), 18,7 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₃₈H₅₂NaO₇S 675,3326; obtido 675,3349 [M+Na]⁺.

2β-tiofenil-20R-hidroxi-16α,25-diacetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-38)



Ponto de fusão: 101 – 102 °C;

IV (KBr): 2978, 1738, 1730, 1714, 1684, 1370, 1250, 1024 cm⁻¹;

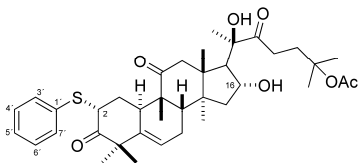
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,40 (2H, dd, *J* = 1,5, 8,0 Hz, H-2'/

H-6'), 7,30 (2H, m, H-3'/ H-5'), 7,26 (1H, m, H-4'), 5,76 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,12 (1H, m, H-16), 4,05 (1H, dd, *J* = 13,2, 5,3 Hz, H-2), 3,17 (1H, d, *J* = 14,6 Hz, H-12α), 2,68 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, H-17), 2,67 (1H, d, *J* = 14,6 Hz, H-12β), 2,58 (2H, m, H-23), 2,57 (1H, m, H-10), 2,40 (ddt, *J* = 19,6, 8,0, 2,9 Hz, H-7β), 2,26 (1H, ddd, *J* = 13,2, 5,3, 3,6 Hz, H-1α), 2,02 (2H, m, H-24), 2,0 (1H, sbpost, H-15β), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,97 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,96 (3H, s, Me-2''), 1,90 (1H, sbpost, H-7α), 1,54 (1H, ddd, *J* = 13,2, 13,2, 13,2 Hz, H-1β), 1,48 (3H, s, Me-26), 1,45 (3H, s, Me-27), 1,41 (3H, s, Me-21), 1,37 (1H, dd, *J* = 14,0, 1,0 Hz, H-15α), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,28 (3H, s, Me-28), 1,26 (3H, s, Me-30), 1,06 (3H, s, Me-19), 0,98 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 212,3 (C-22), 211,6 (C-11), 208,1 (C-3), 170,0 (C-31), 140,3 (C-5), 133,7 (C-1'), 132,6 (C-3'/ C-5'), 129,0 (C-2'/C-6'), 127,6 (C-4'), 120,1 (C-6), 81,0 (C-25), 78,6 (C-20), 74,0 (C-16), 54,5 (C-2), 54,0 (C-17), 51,6 (C-4), 49,9 (C-13), 48,6 (C-9), 48,5 (C-12), 47,9 (C-14), 43,2 (C-15), 42,1 (C-8), 36,4 (C-10), 35,1 (C-24), 33,6 (C-1), 30,4 (C-23), 28,6 (C-28), 26,0 (C-26), 25,8 (C-27), 24,2 (C-21), 23,7 (C-7), 23,2 (C-29), 22,3 (C-32), 20,9 (C-2''), 19,9 (C-19), 19,6 (C-18), 18,8 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo negativo): calc. para C₄₀H₅₃O₈S 693,3467; obtido 693,3459 [M-H].

2α-tiofenil-16α,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-39)



Ponto de fusão: 105 – 106 °C

IV (KBr): 3450, 2978, 1732, 1716, 1700, 1694, 1470, 1461, 1361, 1259, 1208, 1171, 1131, 1021, 749 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,46 (2H, m, H-2'/ H-6'), 7,35 (2H,

m, H-3'/ H-5'), 7,31 (1H, m, H-4'), 5,79 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-

6), 4,31 (1H, m, H-16), 3,83 (1H, dd, $J = 7,0, 5,0$ Hz, H-2), 3,22 (1H, d, $J = 14,8$ Hz, H-12 α), 2,95 (1H, m, H-10), 2,83 (1H, $J = 17,5, 9,0, 6,5$ Hz, H-23 α), 2,66 (1H, d, $J = 14,6$ Hz, H-12 β), 2,54 (1H, d, $J = 7,1$ Hz, H-17), 2,52 (1H, sbposto, H-23 β), 2,40 (1H, ddt, $J = 19,6, 8,5, 2,9$ Hz, H-7 β), 2,05 (2H, m, H-24), 2,0 (1H, sbposto, H-1 α), 1,99 (1H, sbposto, H-7 α), 1,96 (3H, s, Me-32), 1,95 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8), 1,89 (1H, m, H-1 β), 1,83 (1H, dd, $J = 13,0, 9,0$, H-15 β), 1,46 (3H, s, Me-26), 1,44 (3H, s, Me-27), 1,43 (3H, s, Me-21), 1,42 (1H, d, $J = 12,7$ Hz, H-15 α), 1,38 (3H, s, Me-30), 1,36 (3H, s, Me-28), 1,31 (3H, s, Me-29), 0,95 (3H, s, Me-19), 0,95 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 214,0$ (C-22), 212,7 (C-11), 210,0 (C-3), 170,3 (C-31), 139,1 (C-5), 133,7 (C-1'), 133,0 (C-3'/C-5'), 129,1 (C-2'/C-6'), 128,3 (C-4'), 120,7 (C-6), 81,2 (C-25), 78,9 (C-20), 71,1 (C-16), 57,7 (C-2), 55,1 (C-17), 50,7 (C-4), 50,0 (C-13), 49,2 (C-9), 48,7 (C-12), 48,4 (C-14), 45,7 (C-15), 42,2 (C-8), 34,8 (C-24), 32,4 (C-10), 30,7 (C-23), 29,9 (C-28), 28,0 (C-1), 26,1 (C-26), 25,9 (C-27), 24,9 (C-29), 24,5 (C-21), 24,0 (C-7), 22,4 (C-32), 19,8 (C-19), 18,5 (C-18), 18,4 (C-30);

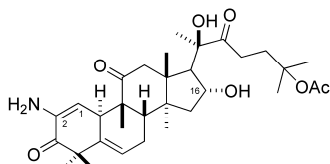
ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{NaO}_7\text{S}$ 675,3326; obtido 675,3343 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.3.15. PREPARAÇÃO DE **CS-40**, **CS-41**, **CS-42**

A uma solução de **CS-29** (100 mg, 0,14 mmol) em DMF (1,5 mL), sob agitação, adicionou-se NaN_3 (91 mg, 1,4 mmol) e a reação foi aquecida a 70 °C, em banho de silicone, por 10 min. Em seguida, a mistura foi diluída com Et_2O , lavada com NaCl (sat.) e H_2O , seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 1:1) levou a **CS-40** (47 mg, 60%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-41** e **CS-42** (51% e 54% de rendimento, respectivamente) foram obtidos a partir de **CS-30** e **CS-31** como sólidos brancos.

2-amino-16 α ,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-1,5-dien-3,11,22-triona (**CS-40**)



Ponto de fusão: 133 – 134 °C;

IV (KBr): 3452, 3347, 2925, 1727, 1694, 1582, 1368, 1260, 1022 cm⁻¹;

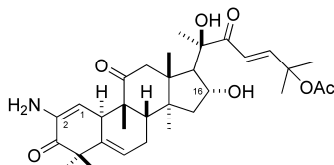
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,73 (1H, m, H-6), 5,64 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-1), 4,33 (1H, t, *J* = 7,1 Hz, H-16), 3,47

(1H, sl, H-10), 3,25 (1H, d, *J* = 14,7 Hz, H-12α), 2,83 (1H, ddd, *J* = 17,4, 10,0, 6,0, H-23α), 2,71 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,53 (1H, d, *J* = 7,1 Hz, H-17), 2,53 (1H, m, H-23β), 2,36 (1H, m, H-7β), 2,07 (2H, m, H-24), 2,02 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H-8), 1,96 (3H, s, Me-32), 1,99 (1H, m, H-7α), 1,85 (1H, dd, *J* = 13,0, 9,0 Hz, H-15β), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,44 (3H, s, Me-26), 1,43 (1H, m, H-15α), 1,42 (3H, s, Me-21), 1,40 (3H, s, Me-30), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,24 (3H, s, Me-28), 0,99 (3H, s, Me-19), 0,98 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,9 (C-22), 213,6 (C-11), 198,6 (C-3), 170,3 (C-31), 137,6 (C-5), 136,9 (C-2), 119,6 (C-6), 112,9 (C-1), 81,2 (C-25), 78,9 (C-20), 71,1 (C-16), 57,8 (C-17), 51,9 (C-4), 50,6 (C-13), 49,2 (C-9), 48,9 (C-12), 48,4 (C-14), 48,0 (C-4), 45,7 (C-15), 41,6 (C-8), 34,8 (C-24), 34,0 (C-10), 30,6 (C-23), 27,9 (C-28), 26,1 (C-27), 25,8 (C-26), 24,5 (C-21), 23,6 (C-7), 22,4 (C-32), 20,5 (C-29), 19,9 (C-19), 19,8 (C-18), 18,3 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo negativo): calc. para C₃₂H₄₆NO₇ 556,3280; obtido 556,3280 [M-H]⁻.

2-amino-16α,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-1,5,23-trien-3,11,22-triona (CS-41)



Ponto de fusão: 121-122 °C;

IV (KBr): 3468, 2979, 1733, 1695, 1651, 1371, 1254, 1127 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,06 (1H, d, *J* = 15,6 Hz, H-24), 6,47 (1H, d, *J* = 15,6, H-23), 5,80 (1H, m, H-6), 5,73

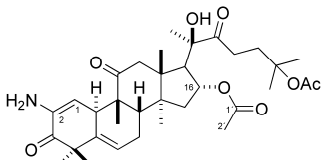
(1H, m, H-1), 4,37 (1H, m, H-16), 3,49 (1H, s, H-10), 3,25 (1H, d, *J* = 14,7 Hz, H-12α), 2,71 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,49 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H-17), 2,36 (1H, m, H-7β), 2,02 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H-8), 2,01 (1H, m, H-7α), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,88 (1H, dd, *J* = 13,0, 9,0 Hz, H-15β), 1,57 (3H, s, Me-27), 1,54 (3H, s, Me-26), 1,56 (1H, sbposto,

H-15 α), 1,44 (3H, s, Me-21), 1,39 (3H, s, Me-30), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,25 (3H, s, Me-28), 1,0 (3H, s, Me-19), 0,99 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 213,9 (C-11), 202,5 (C-22), 198,8 (C-3), 170,3 (C-31), 151,9 (C-24), 137,4 (C-5), 137,3 (C-2), 120,4 (C-23), 120,4 (C-6), 119,9 (C-1), 79,3 (C-25), 78,2 (C-20), 71,4 (C-16), 58,2 (C-17), 50,8 (C-14), 49,2 (C-9), 48,9 (C-12), 48,1 (C-13), 48,0 (C-4), 45,6 (C-15), 41,6 (C-8), 35,0 (C-10), 27,9 (C-28), 26,4 (C-27), 25,9 (C-26), 24,0 (C-21), 23,6 (C-7), 22,0 (C-32), 20,4 (C-29), 20,0 (C-19), 19,9 (C-18), 18,4 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{NO}_7$ 554,3123; obtido 554,3121 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

2-amino-16 α ,25-diacetiloxi-20R-hidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-1,5-dien-3,11,22-triona (CS-42)



Ponto de fusão: 129-130 °C;

IV (KBr): 3458, 3363, 2978, 1740-1640, 1372, 1260, 1022 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 5,71 (1H, ddd, J = 5,0, 2,5, 2,5, H-6), 5,64 (1H, d, J = 2,5 Hz, H-1), 5,16 (1H, m, H-

16), 3,45 (1H, m, H-10), 3,23 (1H, d, J = 14,3 Hz, H-12 α), 2,75 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 β), 2,71 (1H, d, J = 7,7 Hz, H-17), 2,64 (1H, ddd, J = 17,4, 10,0, 6,0, H-23 α), 2,37 (ddt, J = 19,6, 8,5, 2,9 Hz, H-7 β), 2,05 (2H, m, H-24), 2,04 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-8), 2,03 (1H, sbpostto, H-15 β), 1,98 (3H, s, Me-32), 1,95 (3H, s, H-2'), 1,96 (1H, m, H-7 α), 1,49 (3H, s, Me-26), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,45 (3H, s, Me-21), 1,44 (1H, sbpostto, H-15 α), 1,35 (3H, s, Me-30), 1,31 (3H, s, Me-29), 1,23 (3H, s, Me-28), 1,03 (3H, s, Me-18), 1,00 (3H, s, Me-19);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 213,0 (C-11), 212,3 (C-22), 198,4 (C-3), 170,1 (C-31), 170,0 (C-1'), 137,6 (C-5), 136,9 (C-2), 119,6 (C-6), 112,6 (C-1), 81,0 (C-25), 78,6 (C-20), 74,1 (C-16), 54,1 (C-17), 50,0 (C-4), 49,1 (C-9), 48,8 (C-12), 47,9 (C-13), 47,9 (C-14), 43,5 (C-15), 41,3 (C-8), 35,1 (C-24), 34,9 (C-10), 30,4 (C-23), 27,8 (C-28), 26,0 (C-27), 25,7 (C-26), 24,3 (C-21), 23,5 (C-7), 22,3 (C-32), 20,9 (C-2'), 20,5 (C-29), 19,9 (C-19), 19,6 (C-18), 18,4 (C-30);

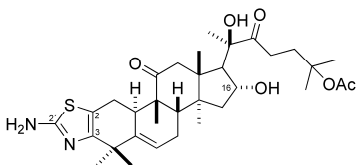
ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{NO}_8$ 598,3385; obtido 598,3391 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

5.3.16. PREPARAÇÃO DE CS-43, CS-44 E CS-45

A um tubo de vidro de 10 mL contendo uma solução de **CS-29** (100 mg, 0,14 mmol) em EtOH (1,5 mL), adicionou-se tiouréia (213 mg, 2,8 mmol). O tubo foi selado com um septo, colocado dentro do reator de micro-ondas e irradiado com um pulso (potência máxima = 300 W, t = 1 min de rampa, 10 min de hold, $T_{\max} = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitação “ligada”). Após resfriar até a t.a., o excesso de EtOH foi removido sob pressão reduzida e o resíduo purificado por coluna cromatográfica em Florisil[®] (hexano:AcOEt, 1:1), levando **CS-43** (64 mg, 76%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-44** e **CS-45** (62% e 53% de rendimento, respectivamente) foram obtidos a partir de **CS-30** e **CS-31** como sólidos brancos.

2'-amino-[3,2-d]tiazol-16 α ,20R-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-2,5-dien-3,11,22-triona (CS-43)



Ponto de fusão: 142 - 143 $^{\circ}\text{C}$;

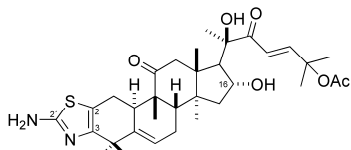
IV (KBr): 3445, 3354, 2978, 1730, 1713, 1693, 1681, 1652, 1534, 1531, 1372, 1262, 1208, 1128, 1024 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta =$ 5,76 (1H, ddd, $J = 6,0, 2,0, 2,0$, H-6),

4,31 (1H, m, H-16), 3,24 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-12 α), 2,82 (1H, ddd, $J = 17,5, 9,0, 6,8$ Hz, H-23 α), 2,67 (1H, $J = 14,5$ Hz, H-12 β), 2,59 (1H, m, H-10), 2,54 (d, $J = 7,5$ Hz, H-17), 2,51 (1H, m, H-23 β), 2,45 (1H, sbposto, H-2), 2,41 (1H, m, H-7 β), 2,39 (1H, sbposto, H-2), 1,98 (1H, m, H-7 α), 1,97 (3H, s, Me-32), 1,96 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-8), 1,89 (1H, ddd, $J = 14,0, 9,0, 4,5$ Hz, H-1 α), 1,84 (1H, m, H-15 β), 1,82 (1H, sbposto, H-15 α), 1,51 (1H, m, H-1 β), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,44 (3H, s, Me-26), 1,42 (3H, s, Me-21), 1,37 (3H, s, Me-30), 1,27 (3H, s, Me-29), 1,24 (3H, s, Me-28), 1,09 (3H, s, Me-19), 0,97 (3H, s, Me-18);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ 599,3160; obtido 599,3188 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

2'-amino-[3,2-d]tiazol-16 α ,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-2,5,23-trien-3,11,22-triona (CS-44)



Ponto de fusão: 198 - 199 °C;

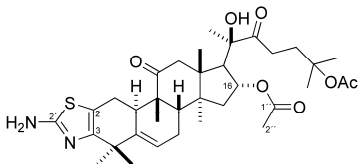
IV (KBr): 3642, 3467, 3363, 2972, 1727, 1691, 1613, 1537, 1370, 1289, 1257, 1127, 990 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,02 (1H, d, *J* = 15,6 Hz, H-24), 6,50 (1H, d, *J* = 15,6, H-23), 4,36 (1H, t, *J* = 7,1 Hz, H-16), 3,40 (2H, s, NH₂), 3,16 (1H, d, *J* = 14,8 Hz, H-12α), 2,62 (1H, m, H-10), 2,60 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,50 (1H, d, *J* = 7,1 Hz, H-17), 2,47 (1H, sbposto, H-1α), 2,46 (1H, sbposto, H-7β), 2,35 (1H, dd, *J* = 15,2, 11,5 Hz, H-1β) 2,02 (1H, m, H-7α), 2,01 (3H, s, Me-32), 1,98 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-8), 1,87 (1H, dd, *J* = 13,3, 9,3, H-15β), 1,55 (3H, s, Me-26), 1,54 (3H, s, Me-27), 1,43 (3H, s, Me-21), 1,41 (3H, s, Me-28), 1,37 (3H, s, Me-29), 1,33 (3H, s, Me-30), 1,33 (1H, sbposto, H-15α) 1,18 (3H, s, Me-19), 0,95 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 214,1 (C-11), 202,8 (C-22), 170,5 (C-32), 166,0 (C-2'), 151,3 (C-24), 150,6 (C-3), 141,0 (C-5), 120,3 (C-23), 120,2 (C-6), 115,3 (C-2), 79,5 (C-25), 78,3 (C-20), 70,7 (C-16), 57,8 (C-17), 50,4 (C-14), 48,5 (C-9), 48,0 (C-12), 47,9 (C-13), 45,0 (C-15), 43,0 (C-8), 39,8 (C-4), 36,1 (C-10), 31,8 (C-28), 27,6 (C-29), 26,7 (C-26), 26,1 (C-227), 25,8 (C-21), 23,7 (C-7), 23,5 (C-1), 22,9 (C-32), 21,7 (C-32), 20,4 (C-19), 19,6 (C-18), 18,9 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₃₃H₄₇N₂O₆S 599,3149; obtido 599,3135 [M+H]⁺.

2'-amino-[3,2-d]tiazol-20R-hidroxi-16α,25-diacetiloxy-10α,17α-cucurbit-2,5-dien-3,11,22-triona, 1'-amino,2,3-tiazol (CS-45)



Ponto de fusão: 142 - 143 °C;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,91 (1H, m, H-6), 5,13 (1H, *J* = 9,5, 8,2, 1,5 Hz, H-16), 3,18 (1H, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,71, 2,68 (1H, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,64 (1H, *J* = 8,2 Hz, H-

17), 2,63 (1H, sbposto, H-23α), 2,58 (1H, sbposto, H-10), 2,57 (1H, sbposto, H-23β), 2,52 (1H, sbposto, H-1α), 2,49 (1H, sbposto, H-7β), 2,37 (1H, dd, *J* = 15,3, 11,5 Hz, H-1β), 2,03 (1H, sbposto, H-15β), 2,02 (2H, sbposto, H-24), 1,99 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,96 (3H, s, Me-32), 1,95 (1H, sbposto, H-7α), 1,94 (3H, s, Me-2'), 1,47 (3H, s, Me-26), 1,45 (3H, s, Me-27), 1,42 (3H, s, Me-21), 1,41 (1H, sbposto, H-15α), 1,40 (3H, s, Me-29), 1,36 (3H, s, Me-28), 1,27 (3H, s, Me-30), 1,20 (3H, s, Me-19), 1,01 (3H, s, Me-18);

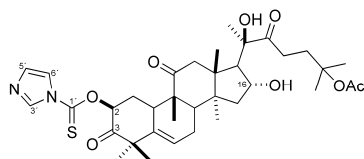
RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 212,8 (C-11), 212,4 (C-22), 170,2 (C-31), 170,1 (C-2'), 165,6 (C-1'), 149,2 (C-3), 140,6 (C-5), 120,6 (C-6), 115,6 (C-2), 81,0 (C-25), 78,6 (C-20), 74,1 (C-16), 54,0 (C-17), 50,0 (C-14), 48,7 (C-12), 48,4 (C-9), 47,9 (C-13), 43,2 (C-15), 42,7 (C-8), 39,9 (C-4), 36,3 (C-10), 35,2 (C-24), 32,0 (C-28), 30,4 (C-23), 27,8 (C-29), 26,0 (C-26), 25,8 (C-27), 24,2 (C-21), 23,6 (C-7), 23,1 (C-2'), 22,3 (C-32), 20,9 (C-), 20,7 (C-19), 19,6 (C-18), 19,1 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₃₅H₅₀N₂NaO₇S 665,3217; obtido 665, 3231 [M+Na]⁺.

5.3.17. PREPARAÇÃO DE CS-46 E CS-47

A uma solução de **CN-1** (400 mg, 0,71 mmol) em 1,2-dicloroetano (Et₂Cl₂), adicionou-se 1,1-tiocarbonildiimidazol (1 g, 5,68 mmol) e quantidade catalítica de DMAP. A mistura foi agitada por 6h, sob refluxo e atmosfera de N₂, sendo em seguida resfriada a t.a. e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 3:7) levando a **CS-46** (200 mg, 42%) e **CS-47** (250 mg, 45%) como sólidos amarelos.

2β-(1H-imidazol-1-tiocarboniloxi)-16α,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-46)



Ponto de fusão: 122-123 °C;

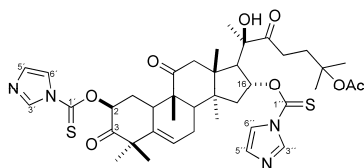
IV (KBr): 3140, 2974, 1733, 1712, 1700, 1464, 1388, 1334, 1286, 1234, 986 cm⁻¹;

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ = 8,41 (1H, s, H-3'), 7,66 (1H, s, H-6'), 7,06 (1H, s, H-5'), 6,22 (1H, dd, *J* = 13,6, 5,5 Hz, H-2), 5,85 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 4,32 (1H, m, H-16), 3,30 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,92 (1H, m, H-10), 2,83 (1H, m, H-23α), 2,71 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,52 (1H, d, *J* = 6,9 Hz, H-17), 2,52 (1H, m, H-23β), 2,43 (1H, m, H-7β), 2,37 (1H, m, H-1α), 2,05 (2H, m, H-24), 2,0 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,97 (3H, s, Me-32), 1,91 (1H, m, H-7α), 1,83 (1H, m, H-15β), 1,77 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,44 (3H, s, Me-30), 1,44 (3H, s, Me-26), 1,39 (3H, s, Me-21), 1,39 (3H, s, Me-28), 1,33 (3H, s, Me-29), 1,28 (1H, sbposto, H-15α), 1,14 (3H, s, Me-19), 0,89 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ = 213,7 (C-22), 212,3 (C-11), 203,3 (C-3), 183,2 (C-1'), 170,3 (C-31), 138,9 (C-5), 136,9 (C-3'), 130,3 (C-5'), 121,2 (C-6), 118,0 (C-6'), 81,2 (C-25), 81,2 (C-16), 78,9 (C-20), 70,6 (C-2), 57,7 (C-17), 51,5 (C-4), 50,5 (C-13), 48,7 (C-12), 48,3 (C-9), 48,2 (C-14), 45,4 (C-15), 42,2 (C-8), 34,7 (C-24), 34,2 (C-10), 31,9 (C-1), 30,7 (C-23), 28,1 (C-28), 26,1 (C-26), 25,8 (C-27), 24,5 (C-21), 23,8 (C-7), 22,4 (C-32), 21,1 (C-29), 20,0 (C-19), 19,9 (C-18), 18,6 (C-30);

ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₃₆H₅₁N₂O₈S 671,3361; obtido 671,3353 [M+H]⁺.

2β,16α-di-(1H-imidazol-1-tiocarboniloxi)-20R-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-47)



Ponto de fusão: 134-135 °C;

IV (KBr): 3130, 2974, 1728, 1712, 1697, 1464, 1393, 1329, 1286, 1246, 1231, 981, 734 cm⁻¹;

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ = 8,49 (1H, s, H-4''), 8,40 (1H, s, H-3'), 7,69 (1H, s, H-6''), 7,59 (1H, s, H-6'), 7,10 (2H, s, H-5'/ H-5''), 6,22 (1H, dd, *J* = 13,0, 5,0 Hz, H-2), 6,04 (1H, m, H-16), 5,83 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 3,37 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 3,08 (1H, d, *J* = 5,5 Hz, H-17), 2,92 (1H, m, H-10), 2,81 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,63 (2H, m, H-23α), 2,5 (1H, sbposto, H-7β), 2,45 (1H, sbposto, H-1α), 2,1 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 2,05 (2H, m, H-24), 1,97 (3H, s, Me-32), 1,91 (1H, m, H-7α), 1,83 (1H, m, H-15β), 1,73 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,97 (3H, s, Me-32), 1,50 (3H, s, Me-30), 1,39 (3H, s, Me-21), 1,39 (3H, s, Me-26), 1,35 (3H, s, Me-21), 1,33 (1H, sbposto, H-15α), 1,31 (3H, s, Me-28), 1,31 (3H, s, Me-29), 1,17 (3H, s, Me-19), 1,08 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ = 214,2 (C-22), 211,4 (C-11), 203,1 (C-3), 183,2 (C-1'), 182,4 (C-1''), 170,1 (C-31), 139,0 (C-5), 136,9 (C-3'), 136,9 (C-3''), 130,6 (C-5'), 130,5 (C-5''), 120,8 (C-6), 118,0 (C-6'), 117,4 (C-6''), 83,6 (C-2), 80,9 (C-16), 80,8 (C-25), 79,2 (C-20), 54,9 (C-17), 51,4 (C-4), 50,0 (C-13), 48,4 (C-12), 48,1 (C-9), 47,7 (C-14), 42,7 (C-15), 41,9 (C-8), 34,8 (C-24), 34,1 (C-10), 31,8 (C-1), 31,5 (C-23), 27,9 (C-28), 25,5 (C-26), 25,4 (C-27), 24,5 (C-21), 23,7 (C-7), 22,3 (C-32), 21,0 (C-29), 20,0 (C-19), 19,7 (C-18), 18,7 (C-30);

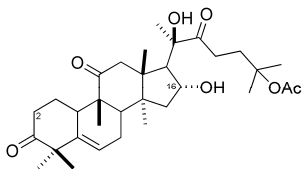
ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₄₀H₅₃N₄O₈S₂ 781,3299; obtido 781,3302 [M+H]⁺.

5.3.18. PREPARAÇÃO DE CS-48 E CS-49

O composto tiocarbonílico **CS-46** (190 mg, 0,28 mmol) foi dissolvido em tolueno anidro (7 mL), sob atmosfera de Ar. A mistura foi aquecida a 115 °C, adicionando-se em seguida difenilsilano (0,4 mL, 2,24 mmol), seguido de alíquotas (6 x 0,2 mL) de uma solução de peróxido de lauroila em tolueno anidro (0,160 g/mL), a cada 15 min. Após finalizada a reação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3) levando a **CS-48** (45 mg, 67%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-49** (19% de rendimento) foi obtido a partir de **CS-47** como óleo incolor.

16 α ,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-3,11,22-triona (**CS-48**)



Ponto de fusão: 108-109 °C;

IV (KBr): 3439, 2974, 1730, 1714, 1693, 1370, 1254, 1213, 1123, 1020, 950 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ = 5,77 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0 Hz, H-6), 4,31 (1H, m, H-16), 3,24 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 α), 2,82 (1H, m, H-23 α), 2,67 (1H, d, J = 14,3 Hz, H-12 β), 2,59 (1H, m, H-10), 2,53 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-17), 2,51 (1H, m, H-23 β), 2,46 (1H, sbpostto, H-2 α), 2,40 (1H, sbpostto, H-7 β), 2,39 (1H, sbpostto, H-2 β), 2,06 (2H, m, H-24), 1,98 (1H, ddd, J = 19,6, 5,0, 1,5 Hz, H-7 α), 1,96 (3H, s, Me-32), 1,96 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-8), 1,89 (1H, m, H-1 α), 1,85 (1H, dd, J = 13,3, 9,0 Hz, H-15 β), 1,53 (1H, m, H-1 β), 1,46 (3H, s, Me-26), 1,44 (3H, s, Me-27), 1,42 (3H, s, Me-21), 1,41 (1H, d, J = 13,3 Hz, H-15 α), 1,37 (3H, s, Me-30), 1,27 (3H, s, Me-29), 1,24 (3H, s, Me-28), 1,09 (3H, s, Me-19), 0,97 (3H, s, Me-18);

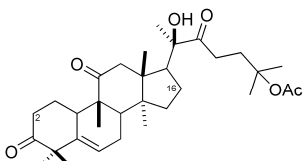
RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,9 (C-3), 213,6 (C-11), 213,0 (C-22), 170,3 (C-31), 140,7 (C-5), 119,7 (C-6), 81,2 (C-25), 78,9 (C-20), 71,1 (C-16), 57,7 (C-17), 50,9 (C-4), 50,7 (C-13), 49,0 (C-9), 48,8 (C-12), 48,4 (C-14), 45,6 (C-15), 42,3 (C-8), 38,0 (C-2), 36,0 (C-10), 34,8 (C-24), 30,6 (C-23), 28,5 (C-28), 26,1 (C-26), 25,8 (C-27), 24,5

(C-1), 24,5 (C-21), 23,9 (C-7), 22,9 (C-29), 22,4 (C-32), 19,8 (C-18), 19,6 (C-19), 18,7 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $C_{32}H_{47}O_7$ 543,3327; obtido 543,3353 $[M-H]^-$.

20R-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-49)

Ponto de fusão: 98-99 °C;



IV (KBr): 3439, 2974, 1730, 1714, 1693, 1370, 1254, 1213, 1123, 1020, 950 cm^{-1} ;

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,76 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 3,12 (1H, dd, J = 14,3, 0,8 Hz, H-12 α), 2,67 (1H, J = 14,3 Hz, H-12 β), 2,56 (1H, sbposto, H-10), 2,54 (2H, sbposto, H-23), 2,40 (2H, sbposto, H-2), 2,40 (1H, sbposto, H-7 β), 2,35 (1H, t, J = 7,5 Hz, H-17), 2,04 (2H, sbposto, H-24), 2,02 (1H, m, H-8), 1,99 (1H, m, H-7 α), 1,97 (3H, s, Me-32), 1,86 (1H, ddd, J = 14,0, 9,0, 4,5 Hz, H-1 α), 1,64 (1H, sbposto, H-16), 1,52 (1H, m, H-1 β), 1,47 (3H, s, Me-27), 1,44 (3H, s, Me-26), 1,42 (3H, s, Me-21), 1,39 (2H, m, H-15), 1,36 (1H, m, H-16), 1,27 (3H, s, Me-29), 1,23 (3H, s, Me-28), 1,13 (3H, s, Me-30), 1,09 (3H, s, Me-19), 0,99 (3H, sl, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, $CDCl_3$): δ = 213,9 (C-3), 213,7 (C-11), 213,1 (C-22), 170,4 (C-31), 140,8 (C-5), 120,1 (C-6), 81,3 (C-25), 80,1 (C-20), 51,0 (C-4), 50,5 (C-14), 49,1 (C-13), 49,0 (C-9), 49,0 (C-12), 48,8 (C-17), 42,5 (C-8), 38,2 (C-2), 36,2 (C-10), 35,3 (C-24), 34,1 (C-15), 30,3 (C-23), 28,5 (C-28), 26,1 (C-26), 26,0 (C-27), 24,7 (C-21), 24,5 (C-1), 24,0 (C-7), 23,2 (C-29), 22,5 (C-32), 21,5 (C-16), 19,6 (C-19), 19,0 (C-18), 18,4 (C-30).

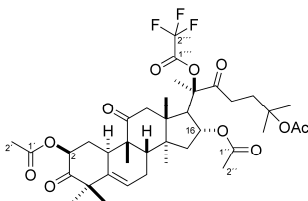
ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $C_{32}H_{48}NaO_6$ 551,3342; obtido 551,3343 $[M+Na]^+$.

5.3.19. PREPARAÇÃO DE CS-50

A uma solução de **CS-14** (100 mg, 0,15 mmol) em DCM (2 mL), a 0 °C (banho de gelo), adicionou-se DBU (1,16 mL, 7,75 mmol) e anidrido trifluoroacético (TFAA) (1,1 mL, 7,75 mmol) e a reação foi agitada a 20°C por 10h. Em seguida, adicionou-se água gelada e a fase aquosa foi extraída com DCM. A fase orgânica foi então lavada com

HCl 1M e NaCl (sat.), seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levando a **CS-50** (48 mg, 42%) como sólido branco.

20R-hidroxi,2β,16α-25-triacetiloxi-20-trifluoroacetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (CS-50)



Ponto de fusão: 86-87 °C;

IV (KBr): 2976, 1788, 1741, 1731, 1695, 1369, 1246, 1215, 1170, 1149, 1113, 1082, 1048, 1028, 977 cm⁻¹;

RMN ¹H(500 MHz, CDCl₃): δ = 5,79 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,48 (1H, dd, *J* = 13,0, 5,5 Hz, H-2), 5,28 (1H, m, H-16), 3,27 (1H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12α), 2,79 (1H, m, H-10) 2,75 (1H, d, *J* = 7,5, H-17), 2,66 (H, d, *J* = 14,5 Hz, H-12β), 2,60 (1H, m, H-23α), 2,53 (1H, m, H-23β), 2,45 (1H, m, H-7β), 2,15 (3H, s, Me-2'), 2,12 (1H, sbposto, H-1α), 2,06 (1H, sbposto, H-15β), 2,04 (2H, m, H-24), 2,02 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-8), 1,99 (3H, s, Me-32), 1,96 (1H, m, H-7α), 1,95 (3H, s, Me-2''), 1,94 (3H, s, Me-21), 1,54 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,48 (3H, s, Me-27), 1,46 (1H, m, H-15α), 1,45 (3H, s, Me-26), 1,32 (3H, s, Me-30), 1,31 (3H, s, Me-28), 1,29 (3H, s, Me-29), 1,10 (3H, s, Me-19), 1,02 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 210,8 (C-11), 205,4 (C-3), 202,1 (C-22), 170,2 (C-31), 170,1 (C-1'), 169,7 (C-1''), 155,5 (C-1'''), 139,7 (C-5), 120,3 (C-6), 114,3 (C-2'''), 90,6 (C-20), 80,9 (C-25), 73,1 (C-2), 73,1 (C-16), 55,0 (C-17), 51,2 (C-4), 50,2 (C-13), 48,6 (C-12), 48,3 (C-9), 47,6 (C-14), 43,1 (C-15), 42,1 (C-8), 34,6 (C-24), 34,3 (C-10), 32,1 (C-23), 31,9 (C-1), 28,7 (C-28), 26,0 (C-26), 25,8 (C-27), 23,6 (C-7), 22,3 (C-32), 21,3 (C-29), 21,0 (C-20), 20,9 (C-2''), 20,6 (C-2'), 20,0 (C-19), 19,8 (C-18), 18,4 (C-30);

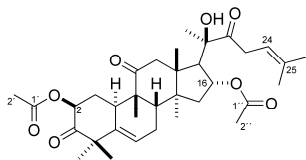
ESI-MS *m/z* (modo negativo): calc. Para C₃₈H₅₀F₃O₁₁ 739,3311; obtido 739,3280 [M-H].

5.3.20. PREPARAÇÃO DE CS-51

A uma solução de Ph₃P (81 mg, 0,31 mmol) em DCM (0,5 mL), a 20 °C, adicionou-se I₂ e a mistura foi agitada por 10 min. Em seguida, uma solução de **CS-14** (100 mg, 0,155 mmol) em DCM (1 mL) foi

adicionada e a mistura mantida sob agitação por 8h. Após o término da reação, controlado por CCD, adicionou-se NaHSO₃ 5% e a mistura foi agitada por mais 10 min. Ao final, diluiu-se com DCM e lavou-se a fase orgânica com H₂O e NaCl_(sat.). A fase orgânica foi então seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levando **CS-51** (32 mg, 35%) como sólido branco.

20R-hidroxi-2β,16α-diacetiloxi-10α,17α-cucurbit-5,24-dien-3,11,22-triona (CS-51)



Ponto de fusão: 119 - 120 °C;

IV (KBr): 3445, 2979, 1738, 1731, 1696, 1373, 1238, 1110, 1028 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,78 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,48 (1H, dd, *J* = 13,5, 5,5 Hz, H-2), 5,34 (1H, m, H-24), 5,13 (1H, ddd, *J* = 9,5, 8,2, 1,5 Hz, H-16), 3,37-3,29 (2H, m, H-23), 3,24 (1H, d, *J* = 15,0 Hz, H-12α), 2,80 (1H, m, H-10), 2,75 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-17), 2,74 (1H, d, *J* = 15,0 Hz, H-12β), 2,43 (1H, ddt, *J* = 19,5, 8,0, 2,5 Hz, H-7β), 2,15 (3H, s, Me-2'), 2,13 (1H, sbposto, H-1α), 2,02 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 2,0 (1H, m, H-15β), 1,95 (1H, m, H-7α), 1,90 (3H, s, Me-2''), 1,76 (3H, d, *J* = 1,5 Hz, Me-26), 1,67 (3H, sl, Me-27), 1,53 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,46 (3H, s, Me-21), 1,40 (1H, dd, *J* = 1,5, 14,0, H-15α), 1,32 (3H, s, Me-28), 1,31 (3H, s, Me-30), 1,29 (3H, s, Me-29), 1,10 (3H, s, Me-19), 1,02 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 211,8 (C-11), 211,3 (C-22), 205,6 (C-3), 170,2 (C-1'), 170,1 (C-1''), 139,7 (C-5), 135,5 (C-25), 120,4 (C-6), 115,5 (C-24), 78,5 (C-20), 73,9 (C-16), 73,3 (C-2), 54,0 (C-17), 51,3 (C-4), 49,9 (C-13), 48,6 (C-12), 48,4 (C-9), 47,9 (C-14), 43,2 (C-15), 42,1 (C-8), 35,2 (C-23), 34,3 (C-10), 32,0 (C-1), 28,7 (C-28), 25,7 (C-26), 24,0 (C-21), 23,7 (C-7), 21,3 (C-29), 20,8 (C-2''), 20,7 (C-2'), 20,0 (C-18), 19,6 (C-19), 18,9 (C-30), 18,3 (C-27);

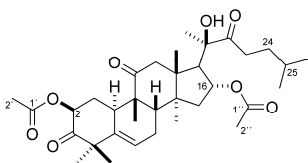
ESI-MS *m/z* (modo negativo): calc. para C₃₄H₄₉O₈ 585,3422; obtido 585,3421 [M-H].

5.3.21. PREPARAÇÃO DE CS-52

Em um recipiente para hidrogenação, dissolveu-se **CS-51** (20 mg, 0,03 mmol) em 1 mL de AcOEt, adicionando-se em seguida Pd/C

10% (2 mg). O frasco foi colocado em equipamento para hidrogenação catalítica, purgado três vezes com hidrogênio e mantido sob agitação por 3 h, a temperatura ambiente e pressão de 50 psi. Ao final, a mistura foi filtrada em funil sinterizado G4 preenchido com sílica gel e lavada com AcOEt. A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida levando **CS-52** (20 mg) como sólido branco.

20R-hidroxi-2β,16α-diacetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona
(CS-52)



RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,78 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,47 (1H, dd, *J* = 13,5, 5,5 Hz, H-2), 5,13 (1H, ddd, *J* = 9,5, 8,2, 1,5 Hz, H-16), 3,25 (1H, d, *J* = 15,0 Hz, H-12α), 2,79 (1H, m, H-10), 2,73 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-17),

2,72 (1H, d, *J* = 15,0 Hz, H-12β), 2,59 (2H, m, H-24), 2,43 (1H, ddt, *J* = 19,5, 8,0, 2,5 Hz, H-7β), 2,15 (3H, s, Me-2'), 2,13 (1H, sbpostto, H-1α), 2,04 (1H, m, H-15β), 2,02 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,99 (1H, m, H-7α), 1,92 (3H, s, Me-2''), 1,60 (1H, m, H-25), 1,55 (1H, m, H-23α), 1,52 (1H, ddd, *J* = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1β), 1,47 (1H, m, H-23β), 1,44 (3H, s, Me-21), 1,41 (1H, m, H-15α), 1,32 (3H, s, Me-28), 1,32 (3H, s, Me-30), 1,29 (3H, s, Me-29), 1,10 (3H, s, Me-19), 1,02 (3H, s, Me-18), 0,94 (3H, d, *J* = 4,3 Hz, 26), 0,92 (3H, d, *J* = 4,3 Hz, 27);

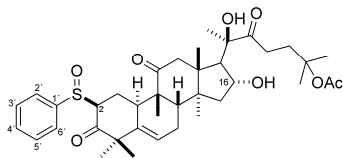
RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,0 (C-22), 211,8 (C-11), 205,6 (C-3), 170,1 (C-1'), 169,9 (C-1''), 139,8 (C-5), 120,4 (C-6), 78,4 (C-20), 74,1 (C-16), 73,3 (C-2), 54,0 (C-17), 51,3 (C-4), 49,9 (C-13), 48,6 (C-12), 48,4 (C-9), 47,9 (C-14), 43,3 (C-15), 42,1 (C-8), 34,3 (C-10), 33,8 (C-24), 32,8 (C-23), 32,0 (C-1), 28,7 (C-28), 27,7 (C-25), 23,7 (C-7), 22,7 (C-26), 22,5 (C-27), 22,2 (C-27), 21,3 (C-29), 20,9 (C-2''), 20,7 (C-2'), 20,0 (C-18), 19,6 (C-19), 18,9 (C-30).

5.3.22. PREPARAÇÃO DE **CS-53**

A uma solução do tioéter **CS-37** (150 mg, 0,22 mmol) em metanol (2 mL), a 0 °C (banho de gelo), adicionou-se uma suspensão de Oxone[®] (179 mg, 0,29 mmol) em H₂O (2 mL) e a reação foi agitada a 0 °C por 5 min. Em seguida, adicionou-se bissulfito de sódio_(sat.) (5 mL) e a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado

por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levando a **CS-53** (86 mg, 57%) como sólido branco.

2β-fenilsulfínil-16α,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10α,17α-cucurbit-5-en-3,11,22-triona (**CS-53**)



RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,65 (2H, dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, H-2'/ H-6'), 7,56 (2H, m, H-3'/ H-7'), 7,53 (1H, m, H-4'), 5,80 (1H, ddd, *J* = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 4,28 (1H, m, H-16), 6,43 (1H, dd,

J = 13,2, 6,0 Hz, H-2), 3,06 (1H, d, *J* = 14,6 Hz, H-12α), 2,78 (1H, m, H-23α), 2,56 (1H, d, *J* = 14,6 Hz, H-12β), 2,51 (1H, m, H-10), 2,49 (1H, sbposto, H-23β), 2,46 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, H-17), 2,41 (1H, sbposto, H-7β), 2,03 (2H, m, H-24), 1,96 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 1,96 (1H, m, H-7α), 1,95 (3H, s, Me-32), 1,91 (2H, m, H-1), 1,80 (1H, dd, *J* = 13,5, 9,0 Hz, H-15β), 1,44 (3H, s, Me-26), 1,42 (3H, s, Me-27), 1,37 (1H, m, H-15α), 1,35 (3H, s, Me-20), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,27 (3H, s, Me-30), 1,22 (3H, s, Me-28), 1,11 (3H, s, Me-19), 0,92 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,8 (C-22), 211,8 (C-11), 207,6 (C-3), 170,3 (C-31), 142,3 (C-1'), 139,3 (C-5), 131,2 (C-4'), 129,1 (C-3'/ C-5'), 124,6 (C-2'/ C-6'), 121,0 (C-6), 81,2 (C-25), 78,9 (C-20), 71,0 (C-16), 71,0 (C-2), 57,7 (C-17), 51,6 (C-4), 50,4 (C-13), 48,8 (C-12), 48,7 (C-9), 48,3 (C-14), 45,5 (C-15), 42,3 (C-8), 35,3 (C-10), 34,8 (C-24), 30,6 (C-23), 27,9 (C-28), 26,1 (C-26), 25,8 (C-27), 24,4 (C-20), 23,8 (C-7), 23,2 (C-29), 22,4 (C-32), 21,7 (C-1), 19,9 (C-20), 19,8 (C-18), 18,6 (C-30).

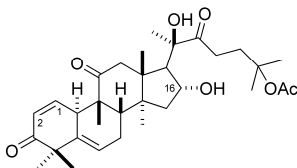
ESI-MS *m/z* (modo positivo): calc. para C₃₈H₅₃O₈S 669,3456; obtido 669,3470 [M+H]⁺.

5.3.23. PREPARAÇÃO DE **CS-54**

A um tubo de vidro de 10 mL contendo uma solução de **CS-53** (80 mg, 0,12 mmol) em tolueno (1,5 mL), a 25 °C, adicionou-se TEA (0,03 mL, 0,24 mmol). O tubo foi selado com um septo, colocado dentro do reator de micro-ondas e irradiado com um pulso (potência máxima = 300 W, *t* = 1 min de rampa, 5 min de hold, *T*_{max} = 120 °C, agitação “ligada”). Após resfriar até a t.a., o excesso de tolueno e TEA foi removido sob pressão reduzida e o resíduo purificado por coluna

cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4), levando **CS-54** (46 mg, 71%) como sólido branco.

16 α ,20R-di-hidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-1,5-dien-3,11,22-triona (**CS-54**)



Ponto de fusão: 133-134 °C;

IV (KBr): 3420, 1972, 1931, 1723, 1702, 1698, 1694, 1674, 1661, 1366, 1275, 1217, 1210, 1181, 1025 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 6,70 (1H, br dd, J = 10,4, 2,1 Hz, H-2), 5,98

(1H, dd, J = 10,4, 3,0 Hz, H-1), 5,79 (1H, ddd, J = 5,0, 2,5, 2,5 Hz, H-6), 4,34 (1H, m, H-16), 3,36 (1H, m, H-10), 3,26 (1H, d, J = 15,0 Hz, H-12 α), 2,83 (1H, ddd, J = 17,5, 9,0, 6,5 Hz, H-23 α), 2,75 (1H, d, J = 15,0 Hz, H-12 β), 2,54 (1H, d, J = 7,0 Hz, H-17), 2,52 (1H, m, H-23 β), 2,36 (1H, ddt, J = 19,5, 8,5, 3,0 Hz, H-7 β), 2,06 (2H, sbpost, H-24), 2,03 (1H, sbpost, H-7 α), 2,02 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-8), 1,96 (3H, s, Me-32), 1,87 (1H, J = 13,0, 9,0 Hz, H-15 β), 1,47 (1H, sbpost, H-15 α), 1,46 (3H, s, Me-26), 1,44 (3H, s, Me-27), 1,42 (3H, s, Me-21), 1,41 (3H, s, Me-30), 1,29 (3H, s, Me-29), 1,20 (3H, s, Me-28), 1,01 (3H, s, Me-19), 1,00 (3H, s, Me-18);

RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,8 (C-22), 213,1 (C-11), 202,4 (C-3), 170,3 (C-31), 145,7 (C-2), 137,2 (C-5), 127,3 (C-1), 120,5 (C-6), 81,2 (C-25), 78,9 (C-20), 71,0 (C-16), 57,8 (C-17), 50,6 (C-), 49,0 (C-12), 48,8 (C-4), 48,4 (C-14), 48,3 (C-9), 45,7 (C-15), 41,5 (C-8), 36,5 (C-10), 34,8 (C-24), 30,7 (C-23), 27,4 (C-28), 26,1 (C-27), 25,8 (C-26), 24,5 (C-21), 23,6 (C-7), 22,4 (C-32), 20,2 (C-29), 20,0 (C-19), 19,9 (C-18), 18,1 (C-30);

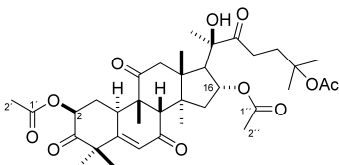
ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para C₃₂H₄₅O₇ 541,3171; obtido 541,3146 [M-H].

5.3.24. PREPARAÇÃO DE **CS-55**

CrO₃ (46 mg, 0,47 mmol) foi dissolvido em piridina (0,4 mL, 0,31 mmol) e DCM (1,0 mL), permanecendo sob agitação por 10 min. Adicionou-se lentamente uma solução de **CS-14** (100 mg, 0,16 mmol) em DCM (0,5 ml) e a reação foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente por 72h. Em seguida a mistura foi filtrada e o filtrado neutralizado com HCl 2M, lavado com NaCl (sat.), NaHCO₃ (sat.) e

água destilada. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 1:1) levando **CS-55** (20 mg, 30% de rendimento) como sólido branco e a recuperação de 65 mg do material de partida.

20R-hidroxi-2 β ,16 α -25-triacetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-3,7,11,22-tetraona (CS-55)



Ponto de fusão: 131-132 °C;

IV (KBr): 3445, 2984, 1731, 1698, 1374, 1245, 1029 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 6,23 (1H, d, J = 2,2 Hz, H-6), 5,52 (1H, dd, J = 13,0, 5,3 Hz, H-2), 5,19 (1H, m, H-

16), 3,24 (1H, d, J = 15,5 Hz, H-12 α), 3,19 (1H, ddd, J = 13,0, 3,8, 2,2 Hz, H-10), 2,86 (1H, d, J = 15,5 Hz, H-12 β), 2,66 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-17), 2,63 (2H, m, H-23), 2,59 (1H, s, H-8), 2,45 (1H, dd, J = 15,2, 9,0 Hz, H-15 β), 2,31 (1H, ddd, J = 13,0, 5,3, 3,8 Hz, H-1 α), 2,18 (3H, s, Me-32), 2,03 (2H, m, H-24), 1,98 (3H, s, Me-2'), 1,92 (3H, s, Me-2''), 1,72 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,48 (3H, s, Me-26), 1,46 (3H, s, Me-27), 1,45 (3H, s, Me-21), 1,44 (3H, s, Me-28), 1,41 (3H, s, Me-29), 1,34 (3H, s, Me-30), 1,33 (1H, sbposto, H-15 α), 1,15 (3H, s, Me-19), 1,05 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 212,0 (C-22), 209,5 (C-11), 202,9 (C-3), 198,3 (C-7), 170,4 (C-1'), 170,0 (C-31), 169,5 (C-1''), 163,9 (C-5), 125,1 (C-6), 81,0 (C-25), 78,5 (C-20), 73,6 (C-16), 72,4 (C-2), 57,2 (C-8), 53,9 (C-17), 52,0 (C-4), 49,5 (C-13), 48,8 (C-9), 48,6 (C-12), 47,5 (C-14), 43,1 (C-15), 36,5 (C-10), 35,2 (C-24), 30,5 (C-23), 30,2 (C-1), 29,7 (C-28), 26,0 (C-26), 25,8 (C-27), 24,3 (C-21), 22,4 (C-2'), 21,1 (C-29), 21,0 (C-19), 20,8 (C-2''), 20,6 (C-32), 19,7 (C-18), 19,2 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{NaO}_{11}$ 681,3245; obtido 681,3280 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.3.25. PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DIOSFENÓIS

Método A:

A uma solução 0,18 M da α -hidroxi-cetona dissolvida em MeOH:DMF (1:1) adiciona-se 10 equivalentes de KOH sob agitação, a 20 °C. Após 1h, o solvente orgânico é removido e o resíduo purificado por cromatografia em coluna de sílica gel.

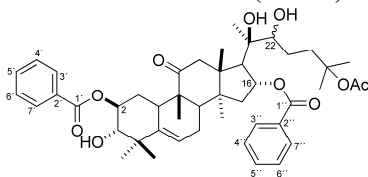
Método B:

A uma solução 0,05 M da α -hidroxi-cetona dissolvida em AcOH adiciona-se 2 equivalentes de Bi₂O₃ sob agitação, a 60 °C. Após 30 minutos, a reação é diluída com DCM, filtrada através de uma coluna de Celite[®], lavada com NaCl (sat.) e H₂O, seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida. A purificação por cromatografia em coluna de sílica gel dá origem ao diosfenol correspondente.

5.3.26. PREPARAÇÃO DE CS-57

A uma solução de CS-20 (800 mg, 1,04 mmol) em THF (15 mL), sob atmosfera de N₂ e a 0 °C (banho de gelo), adicionou-se C₁₂H₂₈AlO₃Li (1,59 g, 6,24 mmol) e a reação foi agitada a 0 °C por 1h. Em seguida, a mistura foi diluída com AcOEt, lavada com tartarato de Na⁺ e K⁺ (sat.), seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levou a purificação de CS-57 (747 mg, 93%) como sólido branco.

2 β ,16 α -dibenzoiloxi-3 α ,20R,22-trihidroxi-25-acetiloxi-10 α ,17 α -cucurbit-5-en-11-ona (CS-57)



Ponto de fusão: 137-138 °C;

IV (KBr): 3515, 2975, 1722, 1713, 1694, 1688, 1601, 1583, 1371, 1315, 1275, 1214, 1175, 1113, 1070, 1025, 966, 714 cm⁻¹;

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,02 (4H, m, H-3'/H-7'/H-3''/H-7''), 7,58 (2H, m, H-5'/H-5''), 7,45 (4H, m, H-4'/H-4''/H-6'/H-6''), 5,75 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,71 (1H, dd, J = 7,5, 7,5 Hz, H-16), 5,12 (1H, ddd, J = 11,5, 10,0, 4,3 Hz, H-2), 3,33 (1H, d, J = 10,0 Hz, H-3), 3,23 (1H, dd, J = 10,0, 1,3 Hz, H-22), 3,19 (1H, d, J = 12,7 Hz, H-12 α), 2,90 (1H, d, J = 7,7 Hz, H-17), 2,67 (1H, d, J = 12,7 Hz, H-12 β), 2,50 (1H, m, H-10), 2,43 (1H, ddt, J = 19,6, 8,5, 2,9 Hz, H-7 β), 2,12 (1H, dd, J = 14,0, 7,5 Hz,

H-15 β), 2,01 (1H, sbposto, H-1 α), 2,0 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-8), 1,94 (3H, s, Me-32), 1,93 (1H, sbposto, H-7 α), 1,74 (1H, m, H-23 α), 1,61 (1H, sbposto, H-23 β), 1,60 (1H, sbposto, H-24 α), 1,59 (1H, d, $J = 14$ Hz, H-15 α), 1,44 (1H, m, H-24b), 1,36 (3H, Me-26), 1,36 (3H, Me-27), 1,35 (3H, Me-30), 1,32 (1H, sbposto, H-1 β), 1,31 (3H, Me-21), 1,22 (3H, Me-28), 1,12 (3H, Me-19), 1,05 (3H, Me-29), 1,04 (3H, Me-18);

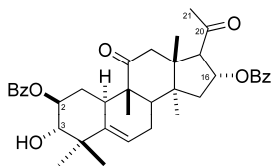
RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 212,6$ (C-11), 170,4 (C-31), 166,9 (C-1''), 166,0 (C-1'), 140,0 (C-5), 133,2 (C-5''), 133,2 (C-5'), 130,3 (C-2''), 130,0 (C-2'), 129,7 (C- C-3''/C-7''), 129,3 (C- C-3'/C-7'), 128,6 (C- C-4''/C-6''), 128,3 (C-4'/C-6'), 119,6 (C-6), 82,1 (C-25), 79,3 (C-22), 78,4 (C-3), 76,0 (C-20), 75,8 (C-16), 74,9 (C-2), 52,5 (C-17), 50,6 (C-13), 48,9 (C-12), 48,1 (C-9), 47,6 (C-14), 44,0 (C-15), 42,6 (C-8), 42,4 (C-4), 38,7 (C-23), 33,8 (C-10), 30,6 (C-1), 26,1 (C-26), 25,7 (C-27), 24,5 (C-28), 23,7 (C-7), 22,6 (C-32), 22,4 (C-21), 21,5 (C-29), 20,2 (C-19), 19,8 (C-18), 18,5 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{NaO}_{10}$ 795,4079; obtido 795,4088 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.3.27. PREPARAÇÃO DE CS-58

A uma solução de **CS-57** (700 mg, 0,91 mmol) em MeOH (14 mL), sob agitação, a 20 °C, adicionou-se H_5IO_6 (622 mg, 2,73 mmol) e a reação foi agitada por 5h. Em seguida, a mistura foi diluída com AcOEt e vertida sobre NaHCO_3 (sat.). As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com AcOEt. As fases orgânicas reunidas foram secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3) levou a purificação de **CS-58** (479 mg, 86%) como sólido branco.

2 β ,16 α -di-benzoiloxi-3 α -hidroxi-10 α ,17 α -hexanorcucurbit-5-en-11,20-diona (CS-58)



Ponto de fusão: 129 - 130 °C;

IV (KBr): 3449, 2979, 1737, 1730, 1714, 1693, 1368, 1247, 1118, 1022, 950 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,04$ (2H, dd, $J = 8,5, 1,3$ Hz, H-3'/H-7'), 7,99 (2H, dd, $J = 8,5, 1,3$ Hz, H-3''/H-7''), 7,59 (2H, m, H-

5'/H-5''), 7,44 (4H, m, H-4'/H-4''/H-6'/H-6''), 5,90 (1H, ddd, $J = 9,0, 6,5, 1,2$ Hz, H-16), 5,78 (1H, ddd, $J = 6,0, 2,0, 2,0$, H-6), 5,13 (1H, ddd, $J = 11,5, 10,0, 4,3$ Hz, H-2), 3,48 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-17), 3,34 (1H, dd, $J = 10,0, 3,5$ Hz, H-3), 3,30 (1H, dd, $J = 14,5, 0,8$ Hz, H-12 α), 2,52 (1H, m, H-10), 2,52 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-12 β), 2,47 (ddt, $J = 19,5, 7,8, 3,0$ Hz, H-7 β), 2,20 (3H, Me-21), 2,16 (1H, dd, $J = 14,0, 9,0$ Hz, H-15 β), 2,0 (1H, $J = 7,8$ Hz, H-8), 2,0 (1H, sbposto, H-1 α), 1,97 (1H, sbposto, H-7 α), 1,70 (1H, br d, $J = 14,0$ Hz, H-15 α), 1,36 (3H, Me-30), 1,33 (1H, ddd, $J = 13,0, 13,0, 13,0$ Hz, H-1 β), 1,25 (3H, Me-28), 1,13 (3H, Me-19), 1,07 (3H, Me-29), 0,76 (3H, Me-18);

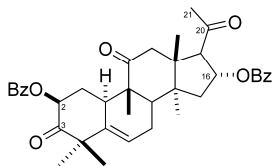
RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 210,9$ (C-11), 206,1 (C-20), 167,1 (C-1'), 166,0 (C-1''), 140,3 (C-5), 133,3 (C-5'), 133,3 (C-5''), 130,1 (C-2'), 130,1 (C-2''), 129,8 (C-3'/C-7'), 129,7 (C-3''/C-7''), 128,6 (C-4'/C-6'), 128,5 (C-4''/C-6''), 119,5 (C-6), 78,5 (C-3), 75,5 (C-16), 75,0 (C-2), 64,2 (C-17), 49,9 (C-13), 48,8 (C-9), 48,6 (C-14), 47,1 (C-12), 43,5 (C-15), 43,0 (C-8), 42,8 (C-4), 33,9 (C-10), 31,6 (C-21), 30,7 (C-1), 24,7 (C-28), 24,0 (C-7), 21,6 (C-29), 20,3 (C-19), 20,0 (C-18), 18,9 (C-30);

ESI-MS m/z (modo negativo): calc. para $\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{O}_7$ 611,3014; obtido 611,3014 [M-H].

5.3.28. PREPARAÇÃO DE CS-59

Uma mistura de PCC (200 mg, 1,23 mmol) e carbonato de bário (250 mg, 1,23 mmol) em DCM seco (5,0 mL) foi agitada por 5 minutos, a 20 °C. Em seguida, CS-58 (250 mg, 0,41 mmol) foi adicionado dissolvido em 2 mL de DCM, e a agitação foi mantida por 20h. A mistura foi então diluída com éter etílico, vertida sobre uma coluna de vidro sinterizado preenchida com Florisil® e eluída com hexano:AcOEt (50:50). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 7:3) levou a purificação de CS-59 (195 mg, 78%) como sólido branco.

2 β ,16 α -di-benzoiloxi-10 α ,17 α -hexanorcucurbit-5-en-3,11,20-triona
(CS-59)



Ponto de fusão: 156 - 157 °C;

IV (KBr): 2974, 1973, 1917, 1737, 1720, 1699, 1692, 1275, 1205, 1175, 1114, 1026, 978, 713 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,1 (2H, dd, J = 8,5, 1,3 Hz, H-3'/H-7'), 8,03 (2H, dd,

J = 8,5, 1,3 Hz, H-3''/H-7''), 7,60 (2H, m, H-5'/H-5''), 7,47 (4H, m, H-4'/H-4''/H-6'/H-6''), 5,91 (1H, ddd, J = 8,6, 6,5, 1,2 Hz, H-16), 5,82 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,75 (dd, J = 13,0, 5,5 Hz, H-2), 3,50 (1H, d, J = 6,5 Hz, H-17), 3,36 (1H, dd, J = 14,5, 0,9 Hz, H-12 α), 2,93 (1H, m, H-10), 2,61 (1H, d, J = 14,5 Hz, H-12 β), 2,49 (ddt, J = 19,6, 8,5, 2,9 Hz, H-7 β), 2,28 (1H, ddd, J = 13,0, 5,5, 3,5 Hz, H-1 α), 2,22 (3H, s, Me-21), 2,19 (1H, dd, J = 13,8, 9,0 Hz, H-15 β), 2,07 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 2,02 (1H, ddd, J = 19,5, 6,0, 1,1 Hz, H-7 α), 1,74 (1H, sbposto, H-15 α), 1,72 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,45 (3H, s, Me-30), 1,39 (3H, s, Me-28), 1,32 (3H, s, Me-29), 1,16 (3H, s, Me-19), 0,8 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 210,7 (C-11), 205,8 (C-20), 205,3 (C-3), 165,9 (C-1''), 165,7 (C-1'), 139,8 (C-5), 133,3 (C-5'), 133,2 (C-5''), 129,9 (C-2''), 129,9 (C-3''/C-7''), 129,5 (C-2'), 129,5 (C-3'/C-7'), 128,5 (C-4''/C-6''), 128,4 (C-4'/C-6'), 120,3 (C-6), 75,4 (C-16), 73,7 (C-2), 64,0 (C-17), 51,4 (C-4), 49,7 (C-14), 48,8 (C-9), 48,5 (C-13), 46,9 (C-12), 43,3 (C-15), 42,7 (C-8), 34,4 (C-10), 32,1 (C-1), 31,5 (C-21), 28,7 (C-28), 23,9 (C-7), 21,3 (C-29), 20,1 (C-19), 19,9 (C-18), 18,7 (C-30);

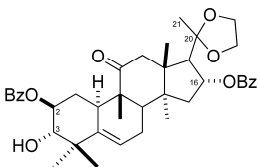
ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{NaO}_7$ 633,2823; obtido 633,2838 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.3.29. PREPARAÇÃO DE CS-60 E CS-61

Ao composto **CS-58** (180 mg, 0,29 mmol), sob agitação e a 20 °C, adicionou-se ortoformiato de trietila (0,96 mL, 5,8 mmol), etilenoglicol (0,65 mL, 11,6 mmol) e quantidade catalítica de ácido *p*-toluenosulfônico. Após 3h a mistura foi diluída com AcOEt, lavada com NaCl (sat.) e H_2O , seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 8:2) levou a purificação de **CS-60** (160 mg, 79%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-61** (164 mg, 88% de rendimento) foi obtido a partir de **CS-59**, como sólido branco.

2β,16α-di-benzoiloxi-3α-hidroxi-20,20-etilendioxi-10α,17α-hexanorcucurbit-5-en-11-ona (CS-60)



Ponto de fusão: 145 - 146 °C;

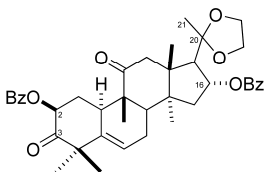
IV (KBr): 3563, 2978, 1713, 1694, 1601, 1581, 1378, 1314, 1278, 1177, 1114, 1068, 886, 711 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,04 (2H, dd, J = 8,5, 1,3 Hz, H-3'/H-7'), 8,03 (2H, dd, J = 8,5, 1,3 Hz, H-3''/H-7''), 7,56 (2H, m, H-5'/H-5''), 7,44 (4H, m, H-4'/H-4''/H-6'/H-6''), 5,76 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,73 (1H, m, H-16), 5,13 (1H, ddd, J = 13,0, 10,0, 4,5 Hz, H-2), 4,04 (2H, m, H-1''), 3,79 (2H, m, H-2'''), 3,32 (1H, d, J = 10,0 Hz, H-3), 3,11 (1H, d, J = 14,8, H-12 α), 2,91 (1H, d, J = 6,5 Hz, H-17), 2,61 (1H, d, J = 14,8 Hz, H-12 β), 2,50 (1H, m, H-10), 2,44 (ddt, J = 19,5, 8,0, 2,9 Hz, H-7 β), 2,10 (1H, dd, J = 14,0, 9,0 Hz, H-15 β), 2,0 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 1,99 (1H, sbpostto, H-1 α), 1,94 (1H, dd, J = 19,5, 5,5 Hz, H-7 α), 1,57 (1H, d, J = 14,0 Hz, H-15 α), 1,35 (3H, s, Me-30), 1,32 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,30 (3H, s, Me-21), 1,23 (3H, s, Me-28), 1,12 (3H, s, Me-19), 1,06 (3H, s, Me-29), 0,90 (3H, s, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 212,6 (C-11), 167,0 (C-1''), 166,2 (C-1'), 140,1 (C-5), 133,1 (C-5'), 132,9 (C-5''), 130,6 (C-2'), 130,0 (C-2''), 129,7 (C-3''/C-7''), 129,5 (C-3'/C-7'), 128,4 (C-4''/C-6''), 128,3 (C-4'/C-6'), 119,5 (C-6), 110,7 (C-20), 78,5 (C-3), 75,2 (C-16), 75,0 (C-2), 65,2 (C-1'''), 62,8 (C-2'''), 57,2 (C-17), 48,8 (C-13), 48,3 (C-14), 47,8 (C-12), 47,6 (C-9), 43,7 (C-15), 42,6 (C-8), 33,8 (C-10), 30,6 (C-1), 24,5 (C-21), 24,5 (C-28), 23,8 (C-7), 21,5 (C-29), 20,2 (C-19), 19,2 (C-18), 18,5 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{O}_8$ 657,3422; obtido 657,3441 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2β,16α-dibenzoiloxi-20,20-etilendioxi-10α-17α-hexanorcucurbit-5-en-3,11-diona (CS-61)



Ponto de fusão: 152 - 153 °C;

IV (KBr): 2983, 1721, 1714, 1696, 1271, 1173, 1115, 714 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,07 (2H, m, H-3'/H-7'), 8,03 (2H, m, H-3''/H-7''), 7,56 (2H, m, H-5'/H-5''), 7,44 (4H, m, H-4'/H-4''/H-6'/H-6''), 5,79 (1H, ddd, J = 6,0, 2,0, 2,0, H-6), 5,76 (1H, m, H-16), 5,75 (1H, dd, J = 13,0, 6,0 Hz, H-2), 4,04 (2H, m, H-1'''), 3,80 (2H, m, H-2'''), 3,18 (1H, d, J = 15,0, H-12 α), 2,93 (1H, d, J = 6,7 Hz, H-17), 2,91 (1H, m, H-10), 2,70 (1H, d, J = 14,8 Hz, H-12 β), 2,46 (ddt, J = 19,5, 8,0, 2,9 Hz, H-7 β), 2,29 (1H, ddd, J = 13,0, 6,0, 3,5 Hz, H-1 β), 2,14 (1H, dd, J = 14,0, 9,0 Hz, H-15 β), 2,08 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-8), 1,99 (1H, ddd, J = 20,0, 6,0, 1,5 Hz, H-7 α), 1,71 (1H, ddd, J = 13,0, 13,0, 13,0 Hz, H-1 β), 1,60 (1H, d, J = 14,0 Hz, H-15 α), 1,43 (3H, s, Me-30), 1,39 (3H, s, Me-28), 1,32 (3H, s, Me-21), 1,30 (3H, s, Me-29), 1,15 (3H, s, Me-19), 0,94 (3H, s, Me-18);

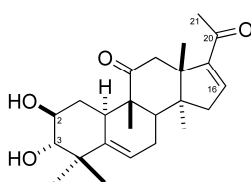
RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): δ = 212,5 (C-11), 205,5 (C-3), 166,1 (C-1''), 165,7 (C-1'), 139,8 (C-5), 133,2 (C-5'), 132,9 (C-5''), 130,5 (C-2'), 129,9 (C-3''/C-7''), 129,5 (C-3'/C-7'), 129,5 (C-), 128,4 (C-), 128,3 (C-), 120,5 (C-), 110,6 (C-20), 75,2 (C-16), 73,9 (C-2), 65,2 (C-1'''), 62,8 (C-2'''), 57,2 (C-17), 51,4 (C-4), 48,8 (C-12), 48,5 (C-13), 47,8 (C-14), 47,7 (C-9), 43,7 (C-15), 42,4 (C-8), 34,4 (C-10), 32,2 (C-1), 28,7 (C-28), 24,5 (C-21), 23,9 (C-7), 21,3 (C-29), 20,1 (C-19), 19,3 (C-18), 18,4 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_8$ 655,3265; obtido 655,3282 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5.3.30. PREPARAÇÃO DE CS-62

A uma solução de **CS-58** (50 mg, 0,08 mmol) em MeOH (1 mL), sob agitação e a 20 °C, adicionou-se KCN (8 mg, 0,13 mmol) e a reação foi agitada por 30 min. Em seguida, a mistura foi diluída com DCM e lavada com NaHCO_3 (sat.). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 1:1) levou a purificação de **CS-62** (11 mg, 35%) como sólido branco.

2 β ,3 α -di-hidroxi-10 α -hexanorcucurbit-5,16-dien-11,20-diona (CS-62)



RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 6,69 (1H, dd, *J* = 3,5, 2,0 Hz, H-16), 5,72 (1H, m, H-6), 3,58 (1H, ddd, *J* = 11,5, 9,5, 4,0 Hz, H-2), 3,07 (1H, d, *J* = 15,5 Hz, H-12α), 2,99 (1H, dd, *J* = 1,0, 15,5 Hz, H-12β), 2,97 (1H, d, *J* = 9,5 Hz, H-3), 2,48 (dddd, *J* = 19,0, 8,0, 3,0, 2,0 Hz, H-7β), 2,29 (1H, m, H-10), 2,28 (1H, sbpostto, H-15β), 2,27 (3H, s, Me-21), 2,21 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-8), 2,17 (1H, dd, *J* = 17,0, 3,5 Hz, H-15α), 2,07 (1H, ddd, *J* = 4,0, 4,0, 11,5), 1,98 (ddd, *J* = 19,0, 6,0, 1,0 Hz, H-7α), 1,19 (3H, s, Me-29), 1,16 (3H, s, Me-19), 1,11 (1H, ddd, *J* = 11,5, 11,5, 11,5 Hz, H-1β), 0,94 (3H, d, *J* = 1,0 Hz, Me-18), 0,91 (3H, s, Me-29);

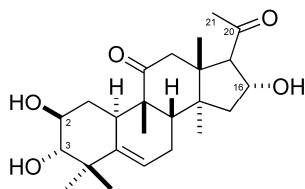
RMN ¹³C (125,8 MHz, CDCl₃): δ = 213,0 (C-11), 196,4 (C-20), 151,1 (C-17), 144,1 (C-16), 140,6 (C-5), 118,7 (C-6), 81,0 (C-3), 71,2 (C-2), 52,5 (C-13), 49,7 (C-14), 48,5 (C-9), 44,2 (C-12), 42,6 (C-15), 41,8 (C-4), 41,6 (C-8), 34,6 (C-10), 33,7 (C-1), 26,9 (Me-21), 24,8 (Me-28), 23,7 (C-7), 22,8 (Me-18), 21,1 (Me-29), 21,0 (Me-19), 20,0 (Me-30).

5.3.31. PREPARAÇÃO DE CS-63 E CS-64

O composto **CS-58** (100 mg, 0,14 mmol) foi dissolvido em 2 mL de solução metanólica de KOH (1 M) e mantido sob agitação a 20 °C. Após 1h, a reação foi diluída com AcOEt, lavada com NaCl (sat.), H₂O e solução HCl (1 M). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano:AcOEt, 6:4) levou a purificação de **CS-63** (30 mg, 52%) como sólido branco.

Seguindo a mesma metodologia, **CS-64** (60 mg, 64% de rendimento) foi obtido a partir de **CS-59**, como sólido branco.

2β,3α,16α-tri-hidroxi-10α,17α-hexanorcucurbit-5-en-11,20-diona (**CS-63**)



Ponto de fusão: 145 - 146 °C;

IV (KBr): 3491, 1695, 1681, 1363, 1267, 1192, 1092, 1058, 1028 cm⁻¹;

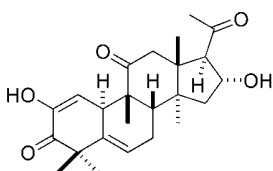
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 5,74 (1H, ddd, *J* = 2,0, 2,0, 6,0, H-6), 4,95 (1H, ddd, *J* = 9,1, 6,5, 1,6 Hz, H-16), 3,60 (1H,

ddd, $J = 9,2, 9,2, 4,3$ Hz, H-2), 3,25 (1H, dd, $J = 14,3, 1,15$ Hz, H-12 α), 3,15 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-17), 2,98 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, H-3), 2,45 (1H, d, $J = 14,3$ Hz, H-12 β), 2,42 (1H, m, H-7 β), 2,36 (1H, m, H-10), 2,16 (3H, s, Me-21), 1,95 (1H, m, H-7 α), 1,94 (1H, dd, $J = 13,0, 9,0$, Hz, H-15 β), 1,90 (1H, $J = 7,5$ Hz, H-8), 1,90 (1H, m, H-1 α), 1,50 (1H, dd, $J = 13,0, 7,1$ Hz, H-15 α), 1,30 (3H, s, Me-30), 1,21 (3H, s, Me-28), 1,10 (1H, m, H-1 β), 1,10 (3H, s, Me-19), 0,97 (3H, s, Me-29), 0,66 (3H, sl, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 211,6$ (C-11), 208,1 (C-20), 140,7 (C-5), 119,1 (C-6), 80,9 (C-3), 71,7 (C-16), 70,9 (C-2), 67,6 (C-17), 49,9 (C-13), 48,8 (C-9), 48,6 (C-14), 47,1 (C-12), 45,0 (C-15), 43,0 (C-8), 41,9 (C-4), 33,9 (C-10), 33,3 (C-1), 31,5 (C-21), 24,6 (C-28), 23,8 (C-7), 21,5 (C-29), 20,4 (C-19), 19,7 (C-18), 19,1 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_5$ 405,2635; obtido 405,2616 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2,16 α -di-hidroxi-10 α ,17 α -hexanorcucurbit-1,5-dien-3,11,20-triona (CS-64)



Ponto de fusão: 95 – 96 °C;

IV (KBr): 3563, 3458, 2978, 1704, 1692, 1650, 1399, 1362, 1219, 1191, 1100, 1089, 1039, 1025 cm^{-1} ;

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,90$ (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-1), 5,78 (1H, ddd, $J = 5,0, 2,5, 2,5$ Hz, H-6), 4,98 (1H, ddd, $J = 9,0, 6,5, 1,2$ Hz, H-16), 3,53 (1H, m, H-10), 3,29 (1H, dd, $J = 14,3, 1,1$ Hz, H-12 α), 3,16 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-17), 2,56 (1H, $J = 14,3$ Hz, H-12 β), 2,40 (ddd, $J = 19,6, 8,5, 2,9$ Hz, H-7 β), 2,18 (3H, s, Me-21), 2,02 (ddd, $J = 19,6, 4,9, 1,5$ Hz, H-7 α), 2,01 (d, $J = 8,5$ Hz, H-8), 1,95 (ddd, $J = 13,5, 9,2, 0,7$ Hz, C-15 β), 1,56 (dd, $J = 13,5, 1,2$ Hz, C-15 α), 1,42 (3H, s, Me-30), 1,36 (3H, s, Me-29), 1,26 (3H, s, Me-28), 1,03 (3H, s, Me-19), 0,7 (3H, sl, Me-18);

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3): $\delta = 211,8$ (C-11), 207,9 (C-20), 198,7 (C-3), 144,7 (C-2), 137,0 (C-5), 120,7 (C-1), 114,6 (C-6), 71,8 (C-16), 67,6 (C-17), 50,0 (C-9), 49,4 (C-13), 48,9 (C-14), 47,7 (C-4), 47,4 (C-12), 45,3 (C-15), 42,1 (C-8), 34,8 (C-10), 31,6 (C-21), 28,0 (C-28), 23,8 (C-7), 20,3 (C-29), 20,2 (C-19), 19,9 (C-18), 18,5 (C-30);

ESI-MS m/z (modo positivo): calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_5$ 401,2322; obtido 401,2324 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE CUCURBITACINAS NATURAIS E SEMISSINTÉTICAS

5.4.1. ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA

5.4.1.1. Células e Vírus

Para os ensaios de citotoxicidade e de atividade antiviral foram utilizadas células VERO (ATCC: CCL 81) originadas de culturas contínuas de fibroblastos de rins de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*). Essas células são comumente utilizadas por serem permissíveis à replicação *in vitro* do HSV-1, possibilitando sua multiplicação e visualização do efeito citopático ao microscópio invertido (HU; HSIUNG, 1989).

As células VERO foram cultivadas em meio MEM (*Minimal Essential Medium*, Cultilab[®]) e mantidas em frascos de cultura estéreis de 75 cm² a 37 °C, em atmosfera umedecida de 5% de CO₂.

Os compostos foram avaliados frente ao Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1), cepas KOS e 29-R (sensível e resistente ao aciclovir, respectivamente) (Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes, França). O preparo e a titulação das suspensões-estoque virais foram realizados conforme metodologias descritas a seguir.

a) Preparo das suspensões-estoques virais

As suspensões-estoque virais foram preparadas conforme metodologia descrita por Simões e col. (1999), com modificações.

Suspensões virais já existentes foram inoculadas em frascos de cultura de 75 cm² contendo uma monocamada de células VERO, tripsinizadas 24 h antes da infecção. Após a aspiração do meio de cultura e lavagem da monocamada celular por três vezes com solução de tampão fosfato (PBS), as células foram inoculadas com 1 mL da suspensão viral e o frasco foi incubado por 1 h a 37°C, em estufa de CO₂ para permitir a adsorção e a penetração viral. Após este período, o excesso de vírus foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL de meio MEM sem SFB (soro fetal bovino) foram adicionados. As condições de incubação foram as mesmas descritas acima. O efeito citopático viral

(ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação (18 h). Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C três vezes para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão foi centrifugada por 10 min a 350 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C para remoção dos fragmentos celulares. Alíquotas do sobrenadante foram distribuídas em tubos estéreis e armazenadas a -80°C até a sua utilização. A preparação das suspensões-estoques virais foi realizada rotineiramente a fim de se obter estoques com altos títulos infecciosos virais.

b) Determinação dos títulos infecciosos virais

Antes de se iniciar os ensaios para avaliação da potencial atividade antiviral das cucurbitacinas naturais e semissintéticas, foi necessário obter inóculos virais com infecciosidade conhecida. A infecciosidade do vírus pode usualmente ser determinada como unidades formadoras de placas (UFP). O título infeccioso dos estoques virais do HSV-1 (cepas KOS e 29R) foi determinado através do método de contagem das placas de lise (BURLESON et al., 1992), segundo o procedimento abaixo.

Todos os ensaios de placas de lise foram realizados em placas de 24 cavidades com culturas celulares preparadas da seguinte maneira: suspensões de células VERO, na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/cavidade, foram cultivadas em meio MEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de PSA [penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/ml) e anfotericina B (0,025 mg/ml) (Cultilab®)], e incubadas a 37°C em estufa de CO_2 até a confluência (24 h). Após esse período, o meio de cultura de cada cavidade foi aspirado cuidadosamente e a monocamada celular foi lavada com PBS. Essas células foram infectadas com 400 µL da suspensão-estoque viral diluída (razão 1:10), em meio MEM com 1% de PSA sem SFB (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas durante 1 h, tendo sido agitadas cuidadosamente a cada 15 min para uma melhor distribuição da suspensão viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e as células mais uma vez lavadas com PBS. A cada cavidade, foram

adicionados 500µL de uma solução de CMC² (carboximetilcelulose). As placas foram novamente incubadas por 72 h e então o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 200 µL do corante preto de naftaleno³ por 40 min, à temperatura ambiente, em agitador horizontal. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas de lise quantificadas através da visualização em microscópio estereoscópio. Para calcular o título, foram contados os focos de infecção na última diluição, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, chamadas de placas. O título viral foi calculado através da fórmula a seguir e expresso como sendo o número de unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL):

$$T \text{ (UFP/mL)} = N.d/V$$

Onde, N: número médio de placas da última diluição que contém placas

d: recíproca da última diluição, onde foram contadas as placas

V: volume do inóculo em mL (neste caso 0,4)

5.4.1.2. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade frente a células VERO

Suspensões de células VERO contendo aproximadamente 2,5 x 10⁵ células/mL, obtidas por tripsinização de um frasco de cultura celular, foram distribuídas em placas de 96 cavidades (100 µL/cavidade). As placas foram incubadas por 24 h, a 37°C, em estufa de CO₂. Após 24 h, o meio MEM foi substituído pelos materiais-teste, em diferentes concentrações, através de diluições sucessivas na razão 1:2, e as placas

² **Preparo da solução de carboximetilcelulose:** Meio MEM 2X + solução aquosa a 1,5% de carboximetilcelulose (Sigma[®]), na proporção 1:1, ambos previamente esterilizados e acrescidos de 1% de PSA.

³ **Preparo da solução de preto de naftaleno:** 100 mg do corante preto de naftaleno (Sigma[®]) foram dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v) (Merck[®]), sendo o pH ajustado, se necessário, para 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel filtro e estocada a 4°C, sendo aquecida em banho-maria a 37°C, antes de seu uso.

foram incubadas por 72 h. Após esse período, o meio de cada cavidade foi substituído por 50 µL de uma solução de MTT⁴ (1mg/mL), e as placas foram novamente incubadas por 4 h. A solução de MTT foi então removida e substituída por 100 µL de DMSO/cavidade (Nuclear[®]) para dissolver os cristais de formazana. As placas foram agitadas por 10 min à temperatura ambiente, e as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (Tecan[®], modelo Infinite 200 PRO), a 540 nm.

Os valores de absorvância medidos para cada concentração de cada material-teste foram transformados em porcentagens de viabilidade (X%), em relação aos controles celulares, considerados 100% viáveis, através da seguinte fórmula, onde DO= Densidade Óptica:

$$X\% = \frac{DO_{\text{material-teste}}}{DO_{\text{controle celular}}} \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos em um gráfico e, através de análise de regressão linear, foi possível calcular a CC₅₀, ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC₅₀ calculados representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

5.4.1.3. Triagem *in vitro* da potencial atividade anti-herpética

A avaliação da potencial atividade anti-herpética de cucurbitacinas naturais e semissintéticas foi realizada pelo ensaio de placas de lise (BURLESON et al., 1992). Células VERO foram cultivadas em placas de 24 cavidades (2,5 x 10⁵ células/cavidade) e incubadas a 37°C, 5% de CO₂. Após 24h removeu-se o sobrenadante e a monocamada celular foi lavada com PBS e infectada com 100 UFP/cavidade de HSV-1, exceto nos controles celulares. Após 1 h de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS e, então, adicionou-se 500 µL da solução de CMC contendo diferentes concentrações dos materiais-teste (diluição 1:2) e incubadas por 72 h a

⁴ **Preparo da solução-estoque de MTT:** foram utilizados 5 mg de MTT (Sigma[®]) para cada mL de PBS (p/v). Para uso, foi feita a diluição em meio MEM (1mg/mL).

37°C e 5% de CO₂. Passado este período, o meio contendo o material-teste foi aspirado e as células coradas com 200 µL de solução de preto de naftaleno, para visualização e contagem das placas de lise em microscópio estereoscópio. A porcentagem de inibição da replicação viral provocada por cada material-teste, com relação aos controles virais, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de placas}_{\text{material-teste}}}{\text{N}^{\circ} \text{ de placas}_{\text{material-teste}}} \times 100$$

Os percentuais calculados de inibição foram inseridos em um gráfico, e analisados por regressão linear, sendo possível calcular os valores de CI₅₀, ou seja, a concentração de cada amostra que inibiu 50% a infecção viral. Os valores de CI₅₀ representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

Com posse dos valores de CC₅₀ e de CI₅₀ foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra em relação à cepa viral utilizada, $IS = CC_{50} / CI_{50}$. Quanto maior este índice, mais promissora será a atividade detectada (COS et al., 2006). Como controle positivo, durante a avaliação da ação antiviral foi utilizado aciclovir (Sigma).

c) Delineamento experimental e análise estatística

Um delineamento de blocos completos casualizados (BCC) e um arranjo fatorial dos tratamentos foram empregados, tanto na avaliação da citotoxicidade como na avaliação da potencial atividade antiviral (SOKAL; ROHLF, 1995), em que cada cavidade da placa constituiu uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes concentrações das diferentes amostras testadas, frente ao vírus HSV-1. Os tratamentos e os controles foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa, e as repetições (três) ficaram em placas diferentes, pois foram realizadas em dias subsequentes, garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

Para calcular os valores de CC₅₀ e CI₅₀, realizou-se uma análise de regressão linear, a partir de curvas de concentração *versus* efeito, e, os experimentos foram realizados em triplicata, sendo os

resultados expressos como a média \pm desvio-padrão. As diferenças estatisticamente significativas ou não dos tratamentos, com relação aos controles, foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA) e para separação de médias foi empregado o teste de Tukey ou Dunnett, utilizando o programa GraphPad Prism[®].

5.4.2. ATIVIDADE CITOTÓXICA

5.4.2.1. Células

As cucurbitacinas naturais e semissintéticas foram inicialmente testadas quanto a sua atividade citotóxica, frente a cinco linhagens tumorais: A549 (carcinoma de pulmão) - Universidade de Barcelona, Espanha, via *European Collection of Cell Cultures* (ECACC); RD e KB (rabdmiocarcinoma e carcinoma nasofaríngeo, respectivamente) - Instituto Aldolfo Lutz, São Paulo, SP; HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal) - Texas A&M University System, USA e N2A (neuroblastoma murino), cedidas pelo Professor Carlos Roberto Zanetti, do Laboratório de Imunologia Aplicada, MIP/CCB/UFSC.

Após uma primeira triagem, selecionou-se a linhagem A549 para prosseguir com os testes de atividade citotóxica.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em Meio MEM (*Minimal Essential Medium*, Cultilab[®]), com exceção da HCT-8, que foi cultivada em Meio RPMI 1640 (Gibco[®]), suplementados com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco[®]), e mantidas em frascos de cultura estéreis de 75 cm² a 37 °C, em atmosfera umedecida de 5% de CO₂.

5.4.2.2. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada através do ensaio colorimétrico com MTT, descrito no item 5.4.1.2., com pequenas modificações: as suspensões de células de cada uma das linhagens tumorais usadas neste estudo continham aproximadamente 1,0 x 10⁵ células/mL e os tempos de incubação das placas com os compostos testados foram de 48 ou 72 h.

Como controles positivos, durante a avaliação da ação citotóxica foram utilizados paclitaxel (Sigma[®]) e doxorubicina (Zodiac[®]).

5.4.2.3. Estudo de relação estrutura-atividade quantitativa

Os descritores moleculares foram obtidos através das estruturas tridimensionais otimizadas no programa Gaussian 09. O nível de teoria utilizado para os cálculos mecânico quânticos, necessários para a obtenção das propriedades eletrônicas, foi o B3LYP/6-311G (d,p) (DUARTE; ROCHA, 2007). Os demais descritores (moleculares, topológicos, eletrotológicos e geométricos) foram derivados utilizando as geometrias otimizadas como arquivos de entrada no programa Dragon 6. A seleção de variáveis, visando obter o subconjunto de descritores que gerasse o melhor modelo QSAR, foi realizada utilizando a metodologia Seleção de Preditores Ordenados (OPS, *Ordered Predictors Selection*) (TEÓFILO; MARTINS; FERREIRA, 2009), implementado no programa QSAR Modeling (<http://lqta.iqm.unicamp.br>). A metodologia utilizada para a construção do modelo foi a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS, *Partial Least Squares*) (KIRALJ; FERREIRA, 2009). Assim, a partir de um total de 952 descritores, foi obtido um modelo QSAR com apenas seis descritores. O modelo foi matematicamente validado, seguindo as abordagens estatísticas atualmente recomendadas pela literatura.

5.4.3. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.4.3.1. Células

Para avaliação da potencial atividade de um determinado composto é interessante analisar previamente sua toxicidade frente a células saudáveis. Dessa maneira, inicialmente determinou-se a citotoxicidade das cucurbitacinas naturais e semissintéticas quando incubadas com macrófagos (J774, ATCC). Tais células foram cultivadas em meio de cultura RPMI⁵ (*Roswell Park Memorial Institute Medium* -

⁵ **Preparo do meio de cultura RPMI:** 10,4 g de RPMI, 2 g de NaHCO₃, 4,5 g de glicose, 100 mL de SFB, 2 mM de N-glutamina, 10 mg de estreptomicina e 10 mg de penicilina foram adicionados à 1L de água destilada e filtrados por uma membrana de nitrocelulose 0,02 µm (Millipore, MA, USA). O pH foi ajustado para 7,2 - 7,4.

Gibco, Brasil) e mantidas em frascos de cultura estéreis de 75 cm² a 37 °C, em atmosfera umedecida de 5% de CO₂.

5.4.3.2. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade frente a células JJ74

Com o objetivo de verificar se os compostos testados por si só não estavam sendo tóxicos para as células JJ74, foi realizado o ensaio colorimétrico do MTT, como descrito no item 5.4.1.2., com pequenas modificações: a suspensão de macrófagos utilizadas neste estudo continham aproximadamente 1,0 x 10⁵ células/mL e o tempo de incubação das placas com os compostos testados foi de 24 h.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os compostos que apresentaram menor citotoxicidade/menor viabilidade foram analisados quanto ao potencial efeito anti-inflamatório, avaliado através da inibição da síntese de NO.

5.4.3.3. Avaliação *in vitro* da potencial atividade anti-inflamatória

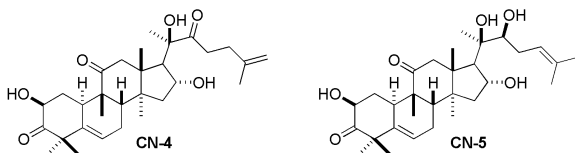
Os compostos com viabilidade superior a 85% foram avaliados quando a sua potencial atividade anti-inflamatória através do ensaio de inibição da síntese de nitrito. As células foram expostas a diferentes concentrações dos compostos testados e ao LPS (1µg/ml). Após 24h, 100 µl do sobrenadante celular foram misturados ao mesmo volume de reagente de Griess⁶. A absorbância da mistura foi determinada em leitor de ELISA (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) a 550 nm. A concentração de nitrito nas amostras foi calculada por regressão linear, utilizando uma solução padrão de nitrito de sódio preparada em RPMI⁷. Dessa maneira foi possível determinar a CI₅₀ (concentração inibitória capaz de reduzir 50% da síntese de nitrito) através da análise da curva de concentração dos compostos *versus* a produção de nitrito.

⁶ **Preparo do reagente de Griess:** Soluções de sulfanilamida (1% em H₂PO₄ 5%) e α-naftil-etilenodiamida (0,1% em água destilada) foram misturadas imediatamente antes do uso na proporção de 1:1.

⁷ A curva padrão de nitrito foi estabelecida com uma solução de NaNO₂, 0 - 150 µM.

6. CONCLUSÕES

- O estudo fitoquímico do extrato DCM de *W. ebracteata* levou ao isolamento de seis cucurbitacinas: di-hidrocucurbitacina B (**CN-1**), di-hidroisocucurbitacina B (**CN-2**), cucurbitacina R (**CN-3**), isocucurbitacina R (**CN-6**) e das inéditas, 2 β ,16 α ,20R-tri-hidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-5,25-dien-3,11,22-triona (**CN-4**) e 2 β ,16 α ,20R,22S-tetra-hidroxi-10 α ,17 α -cucurbit-5,24-dien-3,11-diona (**CN-5**).

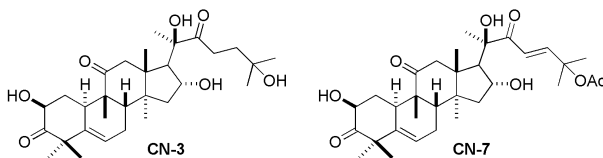


- As cucurbitacinas **CN-1**, **CN-3** e **CN-7**, majoritárias nos extratos DCM de *Wilbrandia ebracteata* e *Luffa operculata*, foram obtidas em quantidades entre 15 e 32 g e utilizadas como material de partida para a síntese de derivados.

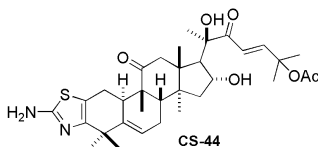
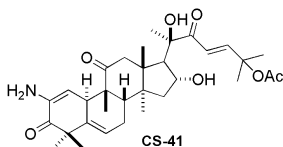
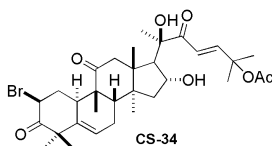
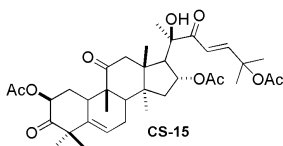
- Utilizando metodologias clássicas em química orgânica e estratégias de química medicinal, foram realizadas modificações estruturais envolvendo as posições 2, 3, 7, 16, 20, 22 e 25 do esqueleto cucurbitano, que levaram a obtenção de cinquenta e cinco (55) derivados semissintéticos:

- No anel A foram obtidos derivados com alterações no grupo α -hidroxi-cetona através de reações de substituição nucleofílica (**CS-33** – **CS-45**) e desoxigenação da posição 2 (**CS-48** e **CS-49**), além de esterificação (**CS-14** – **CS-28**) e eliminação de 2-OH (**CS-54**).
- No anel B, foi introduzida uma cetona α,β -insaturada através da oxidação alílica da dupla ligação em C-5 (**CS-55**).
- No anel D, a posição 16 foi oxidada (**CS-9**), desoxigenada (**CS-49**) ou convertida a éster (**CS-14** – **CS-28**).
- A cadeia lateral foi clivada, o que permitiu a obtenção das hexanorcucurbitacinas F (**CS-63**) e I (**CS-64**), produtos naturais encontrados em quantidade reduzida na natureza.

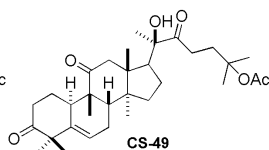
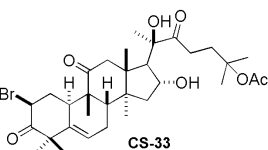
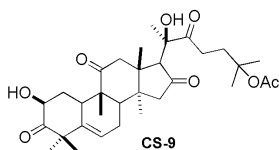
- Outras modificações na cadeia lateral envolveram a alteração da cetona α,β -insaturada (**CS-13**) e a eliminação da acetila C-25 (**CS-51**).
- Todas as estruturas foram caracterizadas por IV, RMN ^1H , ^{13}C e espectrometria de massas de alta resolução. Quando necessário foram obtidos espectros de correlação mononucleares (COSY e NOESY) e heteronucleares (HSQC e HMBC).
- Vinte e oito cucurbitacinas, seis naturais e vinte e duas semissintéticas, foram avaliadas quanto a atividade anti-herpética, porém nenhum dos compostos apresentou índice de seletividade significativo.
- Seis cucurbitacinas isoladas dos extratos DCM de *W. ebracteata* e *L. operculata* foram avaliadas quanto ao seu efeito citotóxico frente as linhagens de células tumorais A549 (carcinoma de pulmão), RD (rabiomiocarcinoma), KB (carcinoma nasofaríngeo), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal) e N2A (neuroblastoma murino). As cucurbitacinas B (**CN-7**), R (**CN-3**), **CN-4** e **CN-5** apresentaram atividade em concentrações na faixa de 0,01 a 7,22 μM , o que as caracteriza como candidatos promissores nos estudos de atividade antitumoral.



- Em vista da alta incidência e tratamento ineficiente disponível atualmente para o tratamento de câncer de pulmão, a linhagem de células A549 foi selecionada para a avaliação da atividade citotóxica de trinta e dois (32) derivados semissintéticos.
- Os derivados da cucurbitacina B **CS-15**, **CS-34**, **CS-41** e **CS-44** apresentaram resultado bastante promissor, com CI_{50} variando entre 0,12 e 11,5 μM para a linhagem A549.



• Dentre os derivados da di-hidrocurbitacina B, os resultados mais promissores foram observados para os compostos **CS-9**, **CS-33** e **CS49**, com CI_{50} 26,49, 29,09 e 11,47 μ M, respectivamente.



• O estudo de QSAR permite sugerir que a atividade dos compostos estudados está relacionada ao mecanismo clássico de ataque eletrofílico em estruturas celulares ou material genético, bem como a modificações que alteram a distribuição eletrônica no anel A.

• Trinta e cinco cucurbitacinas, seis naturais e 29 semissintéticas foram avaliadas quanto a inibição da síntese de nitrito em uma linhagem celular de macrófagos (JSS4). Dentre os compostos testados, os derivados da cucurbitacina B **CS-34** e **CS-44** apresentaram atividade promissora, com CI_{50} 0,66 e 1,04 μ M, respectivamente. Dentre todos, **CS-34** é o composto mais promissor para a continuidade das investigações, pois além da potência elevada, este apresentou reduzida citotoxicidade ($CL_{50}/CI_{50} = 313,18$).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; HORN, K.; DOMINGUEZ, X. A.; ROMBOLD, C.; GÓMEZ LÓPEZ, E. G. Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonorae*. *Phytochemistry*, v. 33, n. 2, p. 437-445, 1993.

AFANTITIS, A.; MELAGRAKI, G.; SARIMVEIS, H.; KOUTENTIS, P. A.; MARKOPOULOS, J.; IGGLESSI-MARKOPOULOU, O. A novel QSAR model for predicting induction of apoptosis by 4-aryl-4H-chromenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 19, p. 6686-6694, 2006.

AFIFI, M. S.; ROSS, S. A.; ELSOHLY, M. A.; NAEEM, Z. E.; HALAWEISH, F. T. Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum* and *Cucumis prophetarum*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 25, n. 4, p. 847-859, 1999.

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; KIMURA, Y.; TAKIDO, M.; C.M.C. KOKKE, W.; TAMURA, T. 7-oxo-10 α -cucurbitadienol from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* and its anti-inflammatory effect. *Phytochemistry*, v. 36, n. 1, p. 153-157, 1994.

ALVAREZ-MANZANEDA, E. J.; CHAHBOUN, R.; CABRERA TORRES, E.; ALVAREZ, E.; ALVAREZ-MANZANEDA, R.; HAIDOUR, A.; RAMOS, J. Triphenylphosphine-iodine: an efficient reagent for the regioselective dehydration of tertiary alcohols. *Tetrahedron Letters*, v. 45, n. 23, p. 4453-4455, 2004.

ALVAREZ-MANZANEDA, E. J.; CHAHBOUN, R.; CABRERA TORRES, E.; ALVAREZ, E.; ALVAREZ-MANZANEDA, R.; HAIDOUR, A.; RAMOS, J. Synthesis of alkenes from tertiary esters utilizing the triphenylphosphine & iodine system. *Tetrahedron Letters*, v. 46, n. 7, p. 1075-1077, 2005.

AMER, H.; MEREITER, K.; STANETTY, C.; HOFINGER, A.; CZOLLNER, L.; BESEDA, I.; JORDIS, U.; KUEENBURG, B.; CLÁYEN-HOUBEN, D.; KOSMA, P. Synthesis and crystal structures of ring A modified glycyrrhetic acid derivatives derived from 2,3-oxirane and 2,3-thiirane intermediates. *Tetrahedron*, v. 66, n. 24, p. 4390-4402, 2010.

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.
- AUDIER, H. E.; DAS, B. C. Mass spectrometry of tetracyclic triterpenes part I - the cucurbitacin group. *Tetrahedron Letters*, v. 7, n. 20, p. 2205-2210, 1966.
- BANDYOPADHYAY, P.; JANOUT, V.; ZHANG, L. H.; REGEN, S. L. Ion conductors derived from cholic acid and spermine: Importance of facial hydrophilicity on Na⁺ transport and membrane selectivity. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, n. 31, p. 7691-7696, 2001.
- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Química Nova*, v. 25, p. 1172-1180, 2002.
- BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, p. 9, 2009.
- 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 & Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 8, p. 2757-2766, 2011.
- BARTON, D. H. R.; MCCOMBIE, S. W. A new method for the deoxygenation of secondary alcohols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, v. n. 16, 1975.
- BAUER, R.; TITTEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. *Phytomedicine*, v. 2, n. 3, p. 193-198, 1996.
- BAUER, R.; WAGNER, H. Cucurbitacin containing drugs. Analysis and standardization of medicinal drugs and plant preparations by high-performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic methods II. *Dtsch. Apoth. Ztg*, v. 123, n. 27, p. 1313-1321, 1983.

BAUGHMAN, T. W.; SWOREN, J. C.; WAGENER, K. B. The facile preparation of alkenyl metathesis synthons. *Tetrahedron*, v. 60, n. 48, p. 10943-10948, 2004. BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. J. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*, v. 61, p. 73 - 81, 2004.

BLASKOVICH, M. A.; SUN, J.; CANTOR, A.; TURKSON, J.; JOVE, R.; SEBTI, S. D. M. Discovery of JSI-124 (Cucurbitacin I), a Selective Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signaling Pathway Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Human and Murine Cancer Cells in Mice. *Cancer Research*, v. 63, n. 6, p. 1270-1279, 2003.

BURQUE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Analgésicos-antipiréticos: Farmacoterapia da gota. In: (Ed.). *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p.1821.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, v. 25, n. 3, p. 475-516, 2008.

CAMOZZATO, A. C.; TENIUS, B. S. M.; OLIVEIRA, E. R. D.; JR., C. V.; VICTOR, M. M.; SILVEIRA, L. G. D. Diastereosseletividade na redução de enonas bicíclicas com hidretos volumosos. *Química Nova*, v. 31, n. 4, p. 7, 2008.

CARBÓ-DORCA, R.; GIRONÉS, X. Quantum similarity and quantitative structure-activity relationships. In: BULTINCK, P.; DE WINTER, H.; LANGENAEKER, W.; TOLLENAERE, J. P. (Ed.). *Computational medicinal chemistry for drug design*. New York: Marcel Dekker Inc, 2004.

CHAN, K. T.; LI, K.; LIU, S. L.; CHU, K. H.; TOH, M.; XIE, W. D. Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. *Cancer Letters*, v. 289, n. 1, p. 46-52, 2010.

CHATGILIALOGLU, C.; FERRERI, C. Progress of the Barton-McCombie methodology: from tih hydrides to silanes. *Research on Chemical Intermediates*, v. 19, n. 8, p. 20, 1993.

CHAU, M. N.; BANERJEE, P. P. Development of a STAT3 reporter prostate cancer cell line for high throughput screening of STAT3

activators and inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 377, n. 2, p. 627-631, 2008.

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, C.; QIANG, S.; LOU, L.; ZHAO, W. Cucurbitane-Type Triterpenoids from the Stems of *Cucumis melo*. *Journal of Natural Products*, v. 72, n. 5, p. 824-829, 2009.

CHEN, J.-C.; ZHANG, G.-H.; ZHANG, Z.-Q.; QIU, M.-H.; ZHENG, Y.-T.; YANG, L.-M.; YU, K.-B. Octanorcucurbitane and Cucurbitane Triterpenoids from the Tubers of *Hemsleya endecaphylla* with HIV-1 Inhibitory Activity. *Journal of Natural Products*, v. 71, n. 1, p. 153-155, 2008a.

CHEN, J.; TIAN, R.; QIU, M.; LU, L.; ZHENG, Y.; ZHANG, Z. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. *Phytochemistry*, v. 69, n. 4, p. 1043-1048, 2008b.

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.

CHEN, W.; LEITER, A.; DONG, Y.; MEIRING, M.; LOUW, V. J.; KOEFFLER, H. P. Cucurbitacin B inhibits growth, arrests the cell cycle, and potentiates antiproliferative efficacy of cisplatin in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines. *International Journal of Oncology*, v. 37, n. 3, p. 737-743, 2010.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

CROVETTO, R. M. Revisión crítica del género *Wilbrandia* (Cucurbitaceae). *Darwiniana*, v. 12, n. 1, p. 25, 1960.

CUI, J.; FAN, L.; HUANG, Y.; XIN, Y.; ZHOU, A. Synthesis and evaluation of some steroidal oximes as cytotoxic agents: Structure/activity studies (II). *Steroids*, v. 74, n. 12, p. 989-995, 2009.

DA SILVA, A. G. Propriedade gerais dos herpesvírus. In: LUPI, O. D. S., A.G.; PEREIRA JR, A.C. (Ed.). *Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p.1-14.

DATTA, A.; AUBE, J.; GEORG, G. I.; MITSCHER, L. A.; JAYASINGHE, L. R. ChemInform Abstract: The First Synthesis of a C-9 Carbonyl Modified Baccatin III Derivative and Its Conversion to Novel Taxol and Taxotere Analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 4, n. 15, p. 1831-1834, 1994.

DAYAM, R.; NEAMATI, N. Small-molecule HIV-1 integrase inhibitors: the 2001-2002 update. *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, p. 1789 - 1802, 2003.

DE CLERCQ, E. Antiviral Drugs in Current Clinical Use. *Journal of Clinical Virology*, v. 30, p. 115-133, 2004.

DE CLERCQ, E. Antiviral chemotherapy in 2009: quo vadis? *Future Medicine*, v. 4, p. 313-315, 2009.

DELPORTE, C.; MUÑOZ, O.; ROJAS, J.; FERRÁNDIZ, M.; PAYÁ, M.; ERAZO, S.; NEGRETE, R.; MALDONADO, S.; SAN, F. A.; BACKHOUSE, N. Pharmaco-toxicological study of *Kageneckia oblonga*, Rosaceae. *Z Naturforsch C*, v. 57, n. 1-2, p. 100-108, 2002.

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.

DING, N.; YAMASHITA, U.; MATSUOKA, H.; SUGIURA, T.; TSUKADA, J.; NOGUCHI, J.; YOSHIDA, Y. Apoptosis induction through proteasome inhibitory activity of cucurbitacin D in human T-cell leukemia. *Cancer*, v. 117, n. 12, p. 2735-2746, 2011.

DONG, Y.; LU, B.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; LAI, L.; LI, D.; WU, Y.; SONG, Y.; LUO, J.; PANG, X.; YI, Z.; LIU, M. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak-STAT3 signaling pathway. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 12, p. 2097-2104, 2010.

DROGEMULLER, M.; FLESSNER, T.; JAUTELAT, R.; SCHOLZ, U.; WINTERFELDT, E. Synthesis of Cephalostatin Analogues by

Symmetrical and Non-Symmetrical Routes. *European Journal of Organic Chemistry*, v. n. 12, p. 2811-2831, 1998.

DUANGMANO, S.; DAKENG, S.; JIRATCHARIYAKUL, W.; SUKSAMRARN, A.; SMITH, D. R.; PATMASIRIWAT, P. Antiproliferative Effects of Cucurbitacin B in Breast Cancer Cells: Down-Regulation of the c-Myc/hTERT/Telomerase Pathway and Obstruction of the Cell Cycle. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, n. 12, p. 5323-5338, 2010.

DUARTE, H. A.; ROCHA, W. R. Teoria do funcional de densidade. In: MORGON, N. H. C., K. (Ed.). *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. São Paulo: Livraria da Física, 2007. p.73-112.

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.

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

DURÁN, F. J. *Síntesis de 6-tia, aziridino y sulfamido pregnanos análogos de esteroides neuroactivos*. 2005. 292 p Química Orgânica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2005.

DUTT, B.; ROY, R. P. Cytogenetics of the old world species of *Luffa*. In: BATES, D. M.; ROBINSON, R. W.; JEFFREY, C. (Ed.). *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Ithaca and London: Cornell University, 1990. p.134-140.

ERIKSSON, L.; JAWORSKA, J.; WORTH, A. P.; CRONIN, M. T. D.; MCDOWELL, R. M.; GRAMÁTICA, P. Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs. *Environmental Health Perspectives*, v. 111, p. 1361-1374, 2003.

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

ESCANDELL, J. M.; RECIO, M. C.; MÁNEZ, S.; GINER, R. M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. L. Cucurbitacin R Reduces the Inflammation and Bone Damage Associated with Adjuvant Arthritis in Lewis Rats by Suppression of Tumor Necrosis Factor- α in T Lymphocytes and Macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 320, n. 2, p. 581-590, 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.

FERREIRA, M. M. C.; MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A. C. Seleção de variáveis em QSAR. *Química Nova*, v. 25, p. 439-448, 2002.

FREITAS, L. B. D. O.; RUELA, F. A.; PEREIRA, G. R.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. D.; SANTOSI, L. J. D. A reação "click" na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Química Nova*, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

FUJIMOTO, H.; HAGIWARA, H.; SUZUKI, K.; YAMAZAKI, M. New Toxic Metabolites from a Mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. II. Isolation and Structures of Hebevinosides VI, VII, VIII, IX, X, and XI. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 35, n. 6, p. 2254-2260, 1987.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

FULLER, R. W.; CARDELLINA II, J. H.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. Cucurbitacins: Differential cytotoxicity, dereplication and first isolation from *Gonystylus keithii*. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 10, p. 1442-1445, 1994.

GÁRATE, J. L. M.; MAGALHÃES, G. C. D.; ROMEIRO, L. A. S. Síntese de análogo de brassinoesteróide a partir da vespertilina. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 5, 1998.

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.

GÓMEZ, R.; KOLENDER, A.A.; VARELA, O. Synthesis of polyhydroxy amino acids based on D- and L-alanine from D-glycero-D-gulo-heptono-1,4-lactone. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 1498-1504, 2006

HANSCH, C.; JAZIREHI, A.; MEKAPATI, S. B.; GARG, R.; BONAVIDA, B. QSAR of apoptosis induction in various cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 13, p. 3015-3019, 2003a.

HANSCH, C.; BONAVIDA, B.; JAZIREHI, A. R.; COHEN, J. J.; MILLIRON, C.; KURUP, A. Quantitative structure & Activity relationships of phenolic compounds causing apoptosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 4, p. 617-620, 2003b.

HARITUNIANS, T.; GUELLER, S.; ZHANG, L.; BADR, R.; YIN, D.; XING, H.; FUNG, M. C.; KOEFFLER, H. P. Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. *Leukemia Research*, v. 32, n. 9, p. 1366-1373, 2008.

HARTUNG, J.; HÜNIG, S.; KNEUER, R.; SCHWARZ, M.; WENNER, H. 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) - an Efficient Reagent in the Synthesis of Alkyl Tosylates or Sulfenates. *Synthesis*, v. 12, p. 6, 1997.

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

HERGET, G. W.; RIEDE, U. N.; SCHMITT-GRÄFF, A.; LÜBBERT, M.; D., N.-H.; KÖHLER, G. Generalized herpes simplex virus infection in an immunocompromised patient-report of a case and review of the literature. *Pathology Research Practice*, v. 201, n. 2, p. 123-129, 2005.

HERSCOVICI, J.; ANTONAKIS, K. Molecular sieve-assisted oxidations: New methods for carbohydrate derivative oxidations. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n. 12, p. 561-562, 1980.

HERZIG, J.; NUDELMAN, A.; GOTTLIEB, H. E.; FISCHER, B. Studies in sugar chemistry. 2. A simple method for O-deacylation of polyacylated sugars. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 51, n. 5, p. 727-730, 1986.

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

HSU, H. S.; HUANG, P. I.; CHANG, Y. L.; TZAO, C.; CHEN, Y. W.; SHIH, H. C.; HUNG, S. C.; CHEN, Y. C.; TSENG, L. M.; CHIOU, S. H. Cucurbitacin I inhibits tumorigenic ability and enhances radiochemosensitivity in nonsmall cell lung cancer-derived CD133-positive cells. *Cancer*, v. 117, n. 13, p. 2970-2985, 2011.

HUANG, Y.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; MA, Y.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. Complement-Inhibiting Cucurbitacin Glycosides from *Picria fel-terrae*. *Journal of Natural Products*, v. 61, n. 6, p. 757-761, 1998.

HYLANDS, P. J.; KOSUGI, J. Bryonoside and bryoside new triterpene glycosides from *Bryonia dioica*. *Phytochemistry*, v. 21, n. 6, p. 1379-1384, 1982.

HYLANDS, P. J.; MAGD, M. S. Cucurbitacins from *Acanthosicyos horridus*. *Phytochemistry*, v. 25, n. 7, p. 1681-1684, 1986.

IARC 2012. *World Cancer Report 2008*. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfsonline/wcr/2008/index.php>> e http://www.iarc.fr/en/publications/pdfsonline/wcr/2008/wcr_2008.pdf>. Acesso em: 16 janeiro 2012.

INCA- Instituto Nacional de Câncer. *TNM: classificação de tumores malignos*. Tradução de Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2012 – Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118P.

ISHDORJ, G.; JOHNSTON, J.; GIBSON, S. Cucurbitacin-I (JSI-124) activates the JNK/c-Jun signaling pathway independent of apoptosis and cell cycle arrest in B Leukemic Cells. *BMC Cancer*, v. 11, n. 1, p. 268, 2011.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, n. 1, p. 33-38, 2004.

IWANSKI, G. B.; LEE, D. H.; EN-GAL, S.; DOAN, N. B.; CASTOR, B.; VOGT, M.; TOH, M.; BOKEMEYER, C.; SAID, J. W.; THOENNISSSEN, 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.

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.

JOHNSON, L. B.; REESE, P. B.; ROBERTS, E. V.; LAM, L. K. P.; VEDERAS, J. C. Structure elucidation of cordifolin A, a novel cucurbitacin from *Fevillea cordifolia*, using one and two dimensional n.m.r. techniques. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, v. 11, p. 2111-2116, 1989.

JOHNSON, L. B. N.; GRIFFITHS, W. J.; ROBERTS, E. V.; LAM, L. K. P.; VEDERAS, J. C.; REID, C. J.; BALLANTINE, J. A. A Mass Spectral Analysis of Some Cucurbitacins Isolated from *Fevillea cordifolia*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, p. 2583-2588, 1991.

JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998.

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.

JURS, P. C.; DIXON, S. L.; EGOLF, L. M. Molecular Concepts. In: WATEBEEND, H. (Ed.). *Chemometrics Methods in Molecular Design*. Weinheim: VCH, 1994. p.15-38.

KALSI, P. S. *Spectroscopy of organic compounds*. 6. ed. New Delhi: New Age International, 2004. 631 p.

KANCHANAPOOM, T.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Cucurbitane, hexanorcucurbitane and octanorcucurbitane glycosides from fruits of *Trichosanthes tricuspidata*. *Phytochemistry*, v. 59, n. 2, p. 215-228, 2002.

KAWAHARA, N.; KURATA, A.; HAKAMATSUKA, T.; SEKITA, S.; SATAKE, M. Two novel cucurbitacins, neocucurbitacins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*) and their effect on PEBPalphaA and OCIF gene expression in a human osteoblast-like Saos-2 cell line. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 49, n. 10, p. 1377-1379, 2001.

KAWAHARA, N.; KURATA, A.; HAKAMATSUKA, T.; SEKITA, S.; SATAKE, M. Two new cucurbitacin glucosides, opercurins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 52, n. 8, p. 1018-1020, 2004.

KIRALJ, R.; FERREIRA, M. R. M. C. Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies: theory and application. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 770-787, 2009.

KIS-TOTH, K.; TSOKOS, G. C. Dendritic cell function in lupus: Independent contributors or victims of aberrant immune regulation. *Autoimmunity*, v. 43, n. 2, p. 9, 2010.

KNECHT, D. A.; LAFLEUR, R. A.; KAHSAI, A. W.; ARGUETA, C. E.; BESHIR, A. B.; FENTEANY, G. Cucurbitacin I inhibits cell motility by indirectly interfering with actin dynamics. *PLoS ONE*, v. 5, p. 1-11, 2010.

KOBA, M.; BĄCZEK, T. Physicochemical interaction of antitumor acridinone derivatives with DNA in view of QSAR studies. *Medicinal Chemistry Research*, v. 20, n. 8, p. 1385-1393, 2011.

KONOSHIMA, T.; KASHIWADA, Y.; TAKASAKI, M.; KOZUKA, M.; YASUDA, I.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. H. Cucurbitacin F

derivatives, anti-HIV principles from *Cowania mexicana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 4, n. 11, p. 1323-1326, 1994a.

KONOSHIMA, T.; TAKASAKI, M.; KOZUKA, M.; HARUNA, M.; ITO, K.; ESTES, J. R.; LEE, K. H. Constituents of rosaceous plants. I. Structures of new triterpenoids from *Cowania mexicana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 41, n. 9, p. 1612-1615, 1993.

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

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, 1994b.

KOREEDA, M.; BROWN, L. Chirality transfer in stereoselective synthesis. A highly stereoselective synthesis of optically active vitamin e side chains. *JOC*, v.48, n. 12, p.2122-2124, 1983
KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUAÑES, M.; MUÑOZ, J. D. D.; VIVOT, E.; CRUAÑES, J.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, n. 1, p. 79-84, 1999.

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.

KUMAR, V.; ASTER, J.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. K. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8. ed: Elsevier - Health Sciences Division, 2009. 1464 p.

KUPCHAN, S. M.; SMITH, R. M.; AYNEHCHI, Y.; MARUYAMA, M. Tumor inhibitors. LVI. Cucurbitacins O, P, and Q, the cytotoxic

principles of *Brandegea bigelovii*. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 35, n. 9, p. 2891-2894, 1970.

KUSUMOTO, K.; NAGAO, T.; OKABE, H.; YAMAUCHI, T. Studies on the constituents of *Luffa operculata* Cogn. I. Isolation and structure of luperosides A-H, dammarane-type triterpene glycosides in the herb. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 37, n. 1, p. 4, 1989.

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. M. O.; CARO, M. S. B.; SCHENKEL, E. P. New cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Planta Medica*, v. 77, n. 14, p. 1648-1651, 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, L.; WILLNER, D. The constituents of *Ecballium elaterium* L. VII. A side chain of elatericin A and Elaterin. *Journal of American Chemical Society*, v. 81, p. 3062-3064, 1958.

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

LAVIE, D.; WILLNER, D. T. The Constituents of *Ecballium elaterium* L. XI. Proposed Structures for Elaterin and its Degradation Products. *Journal of American Chemical Society*, v. 82, n. 7, p. 1668-1673, 1960.

LEÃO, M. B. C.; PAVÃO, A. C.; ESPINOZA, V. A. A.; TAFT, C. A.; BULNES, E. P. A multivariate model of chemical carcinogenesis. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 719, n. 1-3, p. 129-135, 2005.

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.

- LENG, T.; ZHANG, J.; XIE, J.; ZHOU, S.; HUANG, Y.; ZHOU, Y.; ZHU, W.; YAN, G. Synthesis and anti-glioma activity of 25(R)-spirostan-3b,5a,6b,19-tetrol. *Steroids*, v. 75, n. 3, p. 224-229, 2010.
- LIU, T.; PENG, H.; ZHANG, M.; DENG, Y.; WU, Z. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *European Journal of Pharmacology*, v. 641, n. 1, p. 15-22, 2010.
- LIU, T.; ZHANG, M.; ZHANG, H.; SUN, C.; YANG, X.; DENG, Y.; JI, W. Combined antitumor activity of cucurbitacin B and docetaxel in laryngeal cancer. *European Journal of Pharmacology*, v. 587, n. 1-3, p. 78-84, 2008.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Plantarum, 2002.
- LUPI, O.; PEREIRA JR, A. C. Herpes simples. In: UPI, O.; DA SILVA, A. G.; PEREIRA JR, A. C. (Ed.). *Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p.43 - 70.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Biology of Microorganisms* 11. ed. New jersey: Simon & Schuster, 1997.
- MANETSCH, R.; KRASINSKI, A.; RADIC, Z.; RAUSHEL, J.; TAYLOR, P.; SHARPLESS, K. B.; KOLB, H. C. In Situ Click Chemistry: Enzyme Inhibitors Made to Their Own Specifications. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, n. 40, p. 12809-12818, 2004.
- MARCH, J.; SMITH, M. B. *March's Advanced Organic Chemistry – reactions, mechanisms and structure*. Ed. Wiley-Interscience, 6th edition, Canada, 2007.
- MASHIMO, K.; SATO, Y. Synthesis of isoajmaline. *Tetrahedron*, v. 26, n. 3, p. 803-812, 1970.
- MATOS, F. J.; GOTTLIEB, O. R. Isocucurbitacina B, constituinte citotóxico de *Luffa operculata*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 39, n. 2, p. 2, 1960.
- MATOS, F. J. A. Farmacognosia de *Luffa operculata* Cogn. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 60, n. 7, 1979.

MATOS, F. J. A. E. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*. 2. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2000.

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 & Pharmaceutical Bulletin*, v. 58, n. 5, p. 747-751, 2010.

MCCORMACK, S.; KIFFER, C. R. V.; WALSH, J. C.; BARTON, S. E. Herpes Simples. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Ed.). *Tratado de Infectologia* São Paulo: Atheneu, 1996.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MENGUE, S. S.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A.; SCHMIDT, M. I. Especies Vegetales Utilizadas por Embarazadas con el objeto de Provocar la Menstruación (Encuesta a 6109 Mujeres en Siete Ciudades de Brasil). *Acta Farm. Bonaerense*, v. 16, n. 4, p. 7, 1997.

MENON-MIYAKE, M. A.; CARVALHO DE OLIVEIRA, R.; LORENZI-FILHO, G.; SALDIVA, P. H. N.; BUTUGAN, O. *Luffa operculata* affects mucociliary function of the isolated frog palate. *American Journal of Rhinology*, v. 19, n. 4, p. 353-357, 2005.

MILJKOVIC, M. *Carbohydrates Synthesis, Mechanisms and Stereoelectronic Effects*. New York: Springer, 2010. 539 p.

MISHARIN, A. Y.; MEHTIEV, A. R.; MOROZEVICH, G. E.; TKACHEV, Y. V.; TIMOFEEV, V. P. Synthesis and cytotoxicity evaluation of 22,23-oxygenated stigmastane derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 3, p. 1460-1473, 2008.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

- MOREIRA, V. M. A.; VASAITIS, T. S.; GUO, Z.; NJAR, V. C. O.; SALVADOR, J. A. R. Synthesis of novel C17 steroidal carbamates. Studies on CYP17 action, androgen receptor binding and function, and prostate cancer cell growth. *Steroids*, v. 73, n. 12, p. 1217-1227, 2008.
- 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*, v. 57, n. 11, p. 1498-1502, 1994.
- NARDONE, R. M. Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. In: ROTBBLAT, G. H. C., V.J. (Ed.). *Toxicity testing in vitro.*: New York: Academic, 1977.
- NES, W. D.; WONG, R. Y.; BENSON, M.; AKIHISA, T. Conformational analysis of 10[small alpha]-cucurbitadienol. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, v. n. 18, 1991.
- 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.
- ODLO, K.; HOYDAHL, E. A.; HANSEN, T. V. One-pot synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles from terminal acetylenes and in situ generated azides. *Tetrahedron Letters*, v. 48, n. 12, p. 2097-2099, 2007.
- OECD. Guidance document on the validation of (quantitative) structure activity relationship [(Q)SAR] models. *Organization for Economic Co-Operation and Development*, Paris, 2007.
- OKABE, H.; MIYAHARA, Y.; YAMAUCHI, T.; MIYAHARA, K.; KAWASAKI, T. Studies on the Constituents of *Momordica charantia* L. I. Isolation and Characterization of Momordicosides A and B, Glycosides of a Pentahydroxy-cucurbitane Triterpene. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 9, p. 2753-2762, 1980.

OKABE, H.; NAGAO, T.; HACHIYAMA, S.; YAMAUCHI, T. Studies on the constituents of *Luffa operculata* Cogn. II. Isolation and structure elucidation of saponins in the herb. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 37, n. 4, p. 5, 1989.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 1991.

ORMROD, D.; SCOTT, L. J.; PERRY, C. M. Valaciclovir: a review of its long term utility in the management of genital herpes simplex virus and cytomegalovirus infections. *Drugs*, v. 59, n. 4, p. 839-863, 2000.

PAGOTTO, C. L. A. C.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R. Cucurbitacins: Pharmaceuticals or toxins? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 77, n. 3, p. 113-124, 1996.

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

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiology: concepts and applications*. São Paulo: Makron Books, 1997.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. *Purification of laboratory chemicals*; 3a ed.; Pergamon Press Oxford, 1988.

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.; 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.

PETERS, R. R.; SALEH, T. F.; LORA, M.; PATRY, C.; DE BRUM-FERNANDES, A. J.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Ant-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.

PORTO, M. L. *Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul*. v. 8, 1974.

QIN, Y.; DENG, H.; YAN, H.; ZHONG, R. An accurate nonlinear QSAR model for the antitumor activities of chloroethylnitrosoureas using neural networks. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 29, n. 6, p. 826-833, 2011.

RAIKHLIN-EISENKRAFT, B.; BENTUR, Y. *Ecbalium elaterium* (squirting cucumber) - Remedy or poison? *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, v. 38, n. 3, p. 305-308, 2000.

RAMALHETE, C.; MOLNÁR, J.; MULHOVO, S.; ROSÁRIO, V. E.; FERREIRA, M. J. U. New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 19, p. 6942-6951, 2009.

RAY, S.; CHATRURVEDI, D. Application of organic carbamates in drug design. Part 1: Anticancer agents - Recent reports. *Drugs of the Future*, v. 29, n. 4, p. 343-357, 2004.

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.

REISS, C. S. *Neurotropic Viral Infections*: Cambridge University Press, 2008. 484 p.

RIGBY, W. 172. A new reagent for the oxidation of acyloins to diketones. *Journal of the Chemical Society*, v., p. 793-795, 1951.

RÍOS, J. L.; ESCANDELL, J. M.; RECIO, M. C.; ATTA UR, R. New insights into the bioactivity of cucurbitacins. In: (Ed.). *Studies in Natural Products Chemistry*: Elsevier, v. 32, parte L, 2005. p.429-469.

RODRIGUEZ, N.; VASQUEZ, Y.; HUSSEIN, A. A.; COLEY, P. D.; SOLIS, P. N.; GUPTA, M. P. Cytotoxic Cucurbitacin Constituents from *Sloanea zuliaensis*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 11, p. 1515-1516, 2003.

ROIZMAN, B. K., D.M.; WHITLEY, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D. M. H., P.M.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (Ed.). *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.2502 – 2601.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; DE LA ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research on Chemical Intermediates*, v. 48, p. 601-606, 2003.

ROTTINGHAUS, S. T. W., R. J. Current non-AIDS antiviral chemotherapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 5, n. 2, p. 217-230, 2007.

RYU, S.; CHOI, S.; LEE, S.; LEE, C.; NO, Z.; AHN, J. Cytotoxicity of Cucurbitacins *in vitro*. *Archives of Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 1, p. 60-61, 1995.

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.

SAFAYHI, H.; SAILER, E. R. Antiinflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Medica*, v. 63, p. 487-493, 1997.

SALVADOR, J. A. R.; SAÉ MELO, M. L.; CAMPOS NEVES, A. S. Oxidations with potassium permanganate - metal sulphates and nitrates. B-Selective epoxidation of delta-5-unsaturated steroids. *Tetrahedron Letters*, v. 37, n. 5, p. 687-690, 1996.

SANTOS, R. C.; SALVADOR, J. A. R.; MARÃN, S.; CASCANTE, M. Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 17, p. 6241-6250, 2009.

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.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 8, p. 58, 2006.
- SCHLEGEL, W.; MELERA, A.; NOLLER, C. R. Reduction and Oxidation Products of Cucurbitacin B. *Journal of American Chemical Society*, v. 26, p. 1206-1210, , 1960.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 5, p. 349-361, 2008.
- SHI, X.; FRANKO, B.; FRANTZ, C.; AMIN, H. M.; LAI, R. JSI-124 (cucurbitacin I) inhibits Janus kinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells. *British Journal of Haematology*, v. 135, n. 1, p. 26-32, 2006.
- SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer*, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.
- SIMÕES, C. M. O. S., E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (ORGS.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2000.
- 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, 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.

STACHULSKI, A. V.; PIDATHALA, C.; ROW, E. C.; SHARMA, R.; BERRY, N. G.; LAWRENSON, A. S.; MOORES, S. L.; IQBAL, M.; BENTLEY, J.; ALLMAN, S. A.; EDWARDS, G.; HELM, A.; HELLIER, J.; KORBA, B. E.; SEMPLE, J. E.; ROSSIGNOL, J.-F. Thiazolides as Novel Antiviral Agents. 2. Inhibition of Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, n. 24, p. 8670-8680, 2011.

STASTNA, E.; CERNÝ, I.; POUZAR, V.; CHODOUNSKÁ, H. Stereoselectivity of sodium borohydride reduction of saturated steroidal ketones utilizing conditions of Luche reduction. *Steroids*, v. 75, n. 10, p. 721-725, 2010.

STUDAHL, M.; CINQUE, P.; BERGSTROM, T. *Herpes Simplex Viruses (Infectious Disease and Therapy)*: Informa Healthcare, 2005. 440 p.

STUPPNER, H. New cucurbitacin glycosides from *Picrorhiza kurroa*. *Planta Medica*, v. 56, n. 6, p. 551-552, 1990.

STUPPNER, H.; KAHLIG, H.; SELIGMANN, O.; WAGNER, H. Minor cucurbitacin glycosides from *Picrorhiza kurroa*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 5, p. 1633-1637, 1990.

STUPPNER, H.; MÜLLER, E. P.; WAGNER, H. Cucurbitacins from *Picrorhiza kurroa*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 1, p. 305-310, 1991.

STURM, S.; STUPPNER, H. Analysis of cucurbitacins in medicinal plants by high-pressure liquid chromatography and mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, v. 11, n. 2, p. 121-127, 2000.

SU, Y.; LI, G.; ZHANG, X.; GU, J.; ZHANG, C.; TIAN, Z.; ZHANG, J. JSI-124 inhibits glioblastoma multiforme cell proliferation through G2/M cell cycle arrest and apoptosis augmentation. *Cancer Biology & Therapy*, v. 7, n. 8, p. 1243-1249, 2008.

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.

TALETE srl. Dragon. Version 6, 2001. Disponível em: <<http://www.talete.mi.it/>>.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. *Química Nova*, v. 27, p. 631-639, 2004.

TAKANO, A.; HASHIMOTO, K. E. N.; OGAWA, M.; KOYANAGI, J.; KURIHARA, T.; WAKABAYASHI, H.; KIKUCHI, H.; NAKAMURA, Y.; MOTOHASHI, N.; SAKAGAMI, H.; YAMAMOTO, K.; TANAKA, A. Tumor-specific Cytotoxicity and Type of Cell Death Induced by Naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and Related Compounds in Human Tumor Cell Lines: Relationship to Electronic Structure. *Anticancer Research*, v. 29, n. 1, p. 455-464, 2009.

TAYAL, V.; KALRA, B.S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – an update. *European Journal of Pharmacology*, 579, 1-12, 2008.

THOENNISSSEN, N. H.; IWANSKI, G. B.; DOAN, N. B.; OKAMOTO, R.; LIN, P.; ABBASSI, S.; SONG, J. H.; YIN, D.; TOH, M.; XIE, W. D.; SAID, J. W.; KOEFFLER, H. P. Cucurbitacin B Induces Apoptosis by Inhibition of the JAK/STAT Pathway and Potentiates Antiproliferative Effects of Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research*, v. 69, n. 14, p. 5876-5884, 2009.

TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. *Journal of Chemometrics*, v. 23, n. 1, p. 32-48, 2009.

TOJO, G.; FERNANDEZ, M. *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones*. v 1. New York: Springer Science-BusinessMedia, 2006. 387 p.

TROST, B. M.; DONG, G.; VANCE, J. A. Cyclic 1,2-Diketones as core building blocks: A strategy for the total synthesis of (-)-terpestacin. *Chemistry - A European Journal*, v. 16, n. 21, p. 6265-6277, 2010.

TROST, B. M.; CURRAN, D. P. Chemoselective oxidation of sulfides to sulfones with potassium hydrogen persulfate. *Tetrahedron Letters*, v. 22, n. 14, p. 1287-1290, 1981.

UKIYA, M.; AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; TORIUMI, M.; MUKAINAKA, T.; BANNO, N.; KIMURA, Y.; HASEGAWA, J. I.; NISHINO, H. Inhibitory effects of cucurbitane glycosides and other triterpenoids from the fruit of *Momordica grosvenori* on Epstein-Barr virus early antigen induced by tumor promoter 12-O-

tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 23, p. 6710-6715, 2002.

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

VALENTE, L. M. M.; GUNATILAKA, A. A. L.; GLASS, T. E.; KINGSTON, D. G. I.; PINTO, A. C. New Norcucurbitacin and Heptanorcucurbitacin Glucosides from *Fevillea trilobata*. *Journal of Natural Products*, v. 56, n. 10, p. 1772-1778, 1993.

VALENTE, L. M. M.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; PINTO, A. C. Norcucurbitacin Gentiobiosides from *Fevillea trilobata*. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 11, p. 1560-1563, 1994.

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.

VAN KESTER, M. S.; OUT-LUITING, J. J.; VON DEM BORNE, P. A.; WILLEMZE, R.; TENSEN, C. P.; VERMEER, M. H. Cucurbitacin I Inhibits Stat3 and Induces Apoptosis in Sezary Cells. *J Invest Dermatol*, v. 128, n. 7, p. 1691-1695, 2008.

VASQUES, C. A.; VASQUES, N. V.; ARRAES, L. A.; GELLER, M. Revisão farmacognóstica da cabacinha (*Luffa operculata* Cogn.). *Folha Médica*, v. 93, n. 3, p. 185-187, 1982.

VELDE, V. V.; LAVIE, D. ¹³C NMR spectroscopy of cucurbitacins. *Tetrahedron*, v. 39, n. 2, p. 317-321, 1983.

VISALLI, R. J.; VAN ZEIJL, M. DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy. *Antiviral Research* v. 59, p. 73-87, 2003.

VLACHOS, P.; KANITSAKIS, N. N. Fatal cardiac and renal failure due to *Ecbalium elaterium* (squirting cucumber). *Clinical toxicology*, v. 32, n. 2, p. 737-738, 1994.

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

WAGSTAFF, A. J.; FAULDS, D.; GOA, K. L. Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, v. 47, n. 1, p. 153-205, 1994

WAKIMOTO, N.; YIN, D.; O'KELLY, J.; HARITUNIANS, T.; KARLAN, B.; SAID, J.; XING, H.; KOEFFLER, H. P. Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Science*, v. 99, n. 9, p. 1793-1797, 2008.

WEN, X.; ZHANG, P.; LIU, J.; ZHANG, L.; WU, X.; NI, P.; SUN, H. Pentacyclic triterpenes. Part 2: Synthesis and biological evaluation of maslinic acid derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, n. 3, p. 722-726, 2006.

WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3. ed. Illkirch: Elsevier Science, 2008.

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 5, p. 14, 1998.

WHITING, M.; MULDOON, J.; LIN, Y.-C.; SILVERMAN, S. M.; LINDSTROM, W.; OLSON, A. J.; KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B.; ELDER, J. H.; FOKIN, V. V. Inhibitors of HIV-1 Protease by Using In Situ Click Chemistry. *Angewandte Chemie*, v. 118, n. 9, p. 1463-1467, 2006.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. herpes simplex virus infection. *Lancet*, v. 357, p. 1513-1518, 2001.

WHO. *Who/ Cancer*. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 16 de janeiro de 2012.

WILSON, A. P. Animal Cell Culture. In: MASTERS, J. R. W. (Ed.). *Cytotoxicity and viability assays*. 3 ed. Oxford: Oxford University, 2000. p.175 – 219.

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.

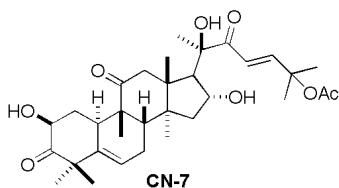
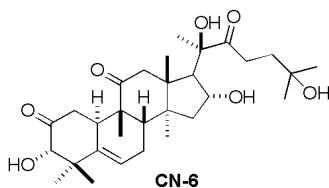
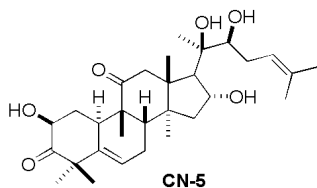
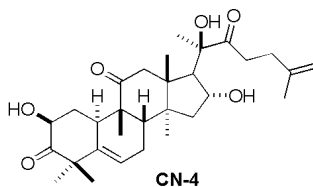
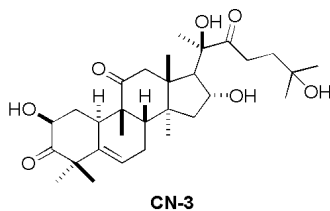
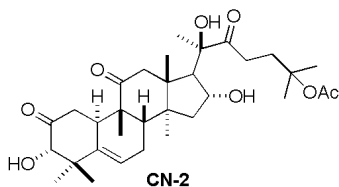
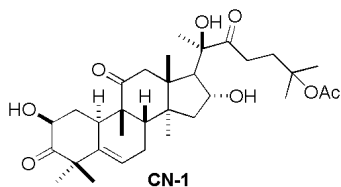
YANUKA, Y.; KATZ, R.; SAREL, S. Bile acid chemistry. III. Stepwise side-chain shortening by way of sodium per-iodate oxidation of α -hydroxy bile acids into corresponding aldehydes. *Tetrahedron Letters*, v. 9, n. 14, p. 1725-1728, 1968.

YIN, D.; WAKIMOTO, N.; XING, H.; LU, D.; HUYNH, T.; WANG, X.; BLACK, K. L.; KOEFFLER, H. P. Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. *International Journal of Cancer*, v. 123, n. 6, p. 1364-1375, 2008.

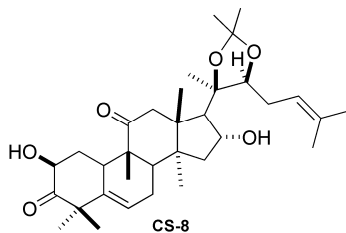
ZHANG, Y.; OUYANG, D.; XU, L.; JI, Y.; ZHA, Q.; CAI, J.; HE, X. Cucurbitacin B induces rapid depletion of the G-actin pool through reactive oxygen species-dependent actin aggregation in melanoma cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 43, n. 7, p. 556-567, 2011.

ANEXO 1- RESUMO DAS ESTRUTURAS

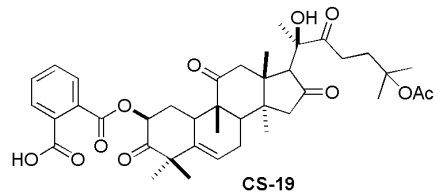
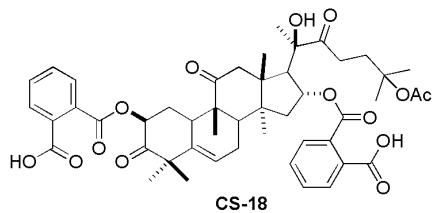
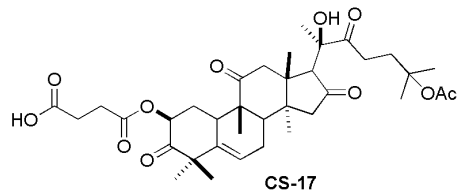
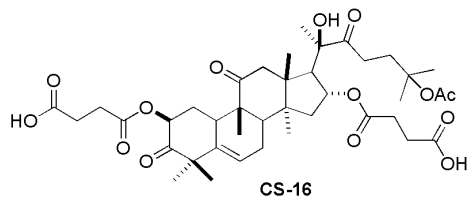
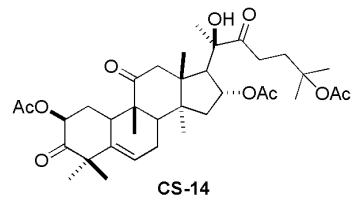
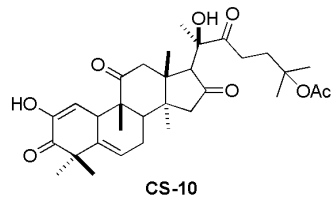
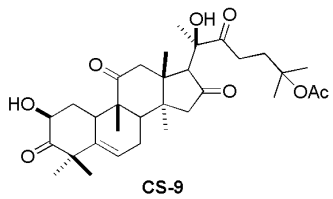
Cucurbitacinas isoladas dos extratos DCM de *W. ebracteata* e *L. operculata*

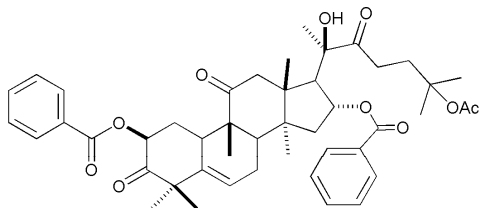


Derivado de **CN-5**

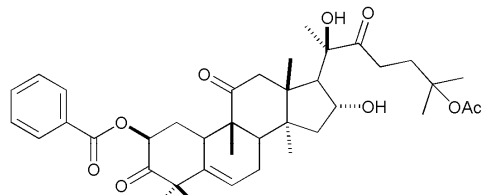


Derivados de CN-1

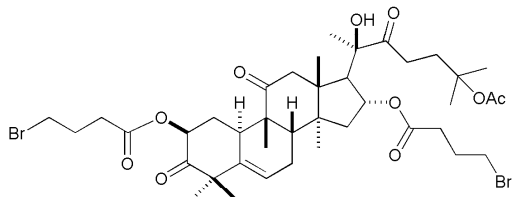




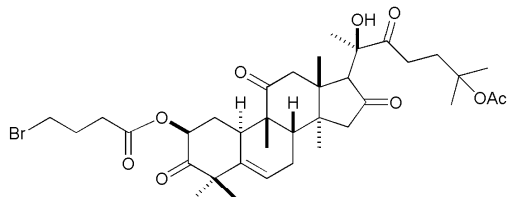
CS-20



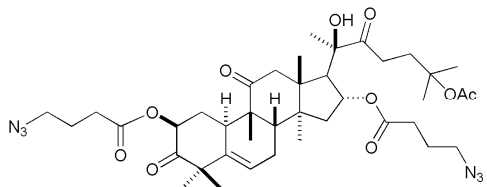
CS-21



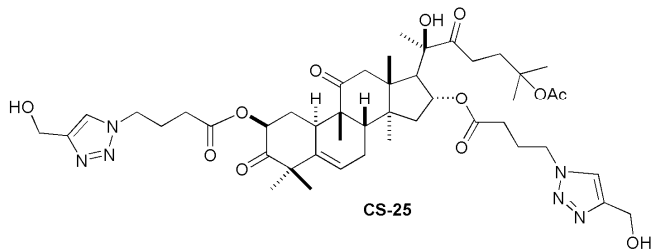
CS-22



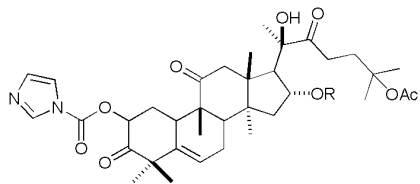
CS-23



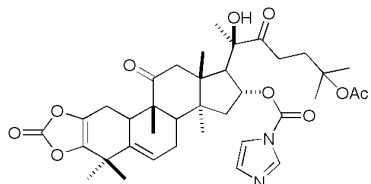
CS-24



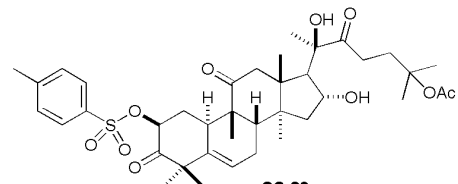
CS-25



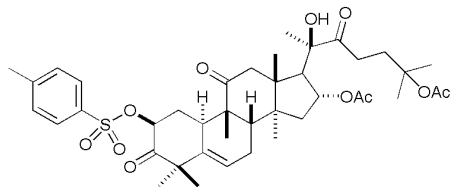
CS-26 R = COImi
CS-27 R = H



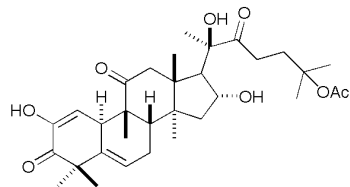
CS-28



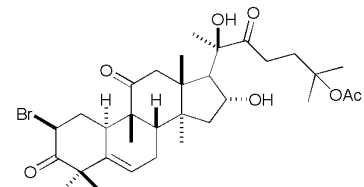
CS-29



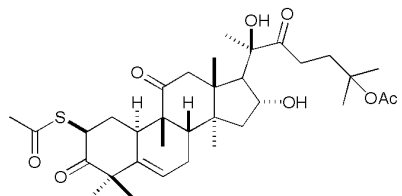
CS-31



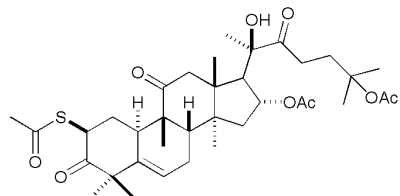
CS-32



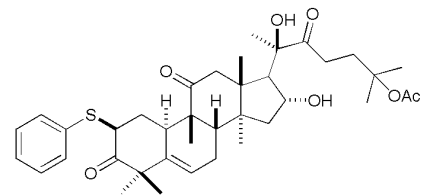
CS-33



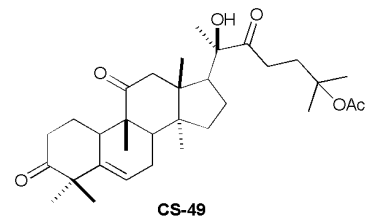
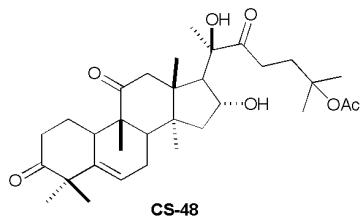
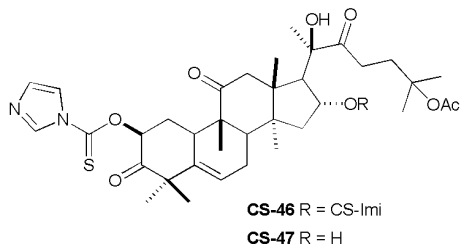
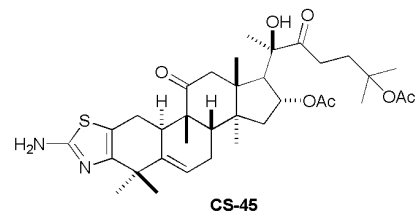
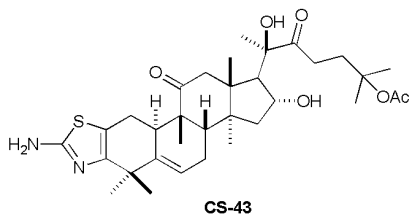
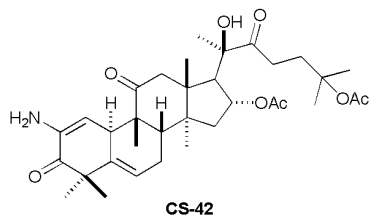
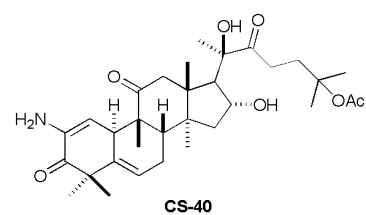
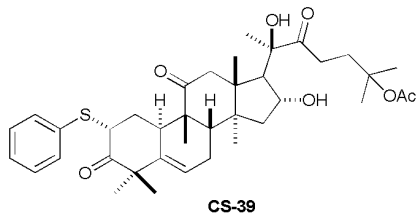
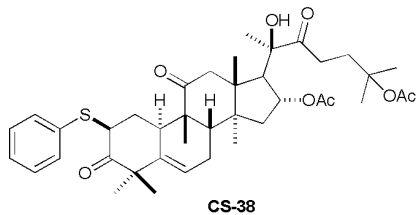
CS-35

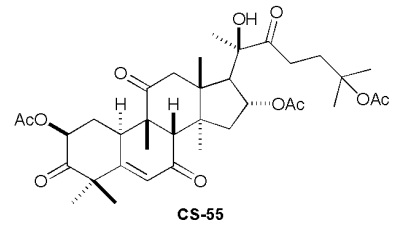
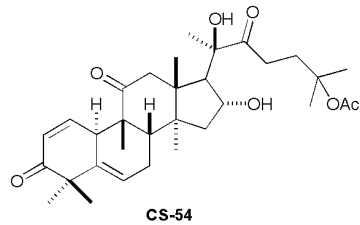
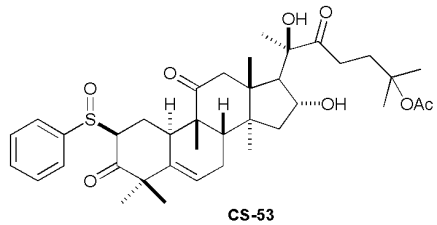
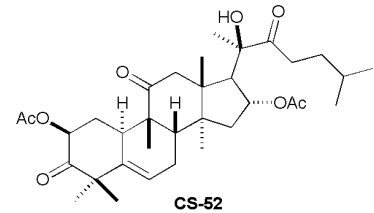
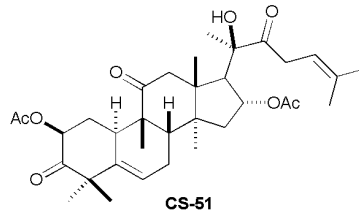
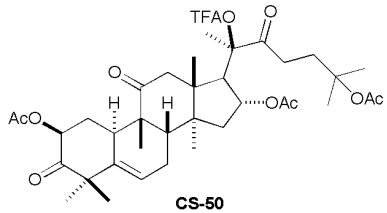


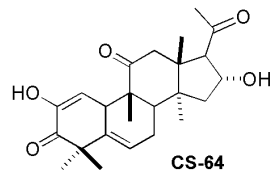
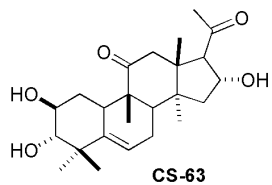
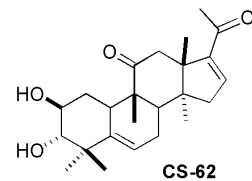
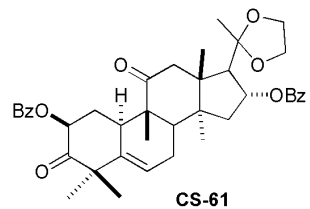
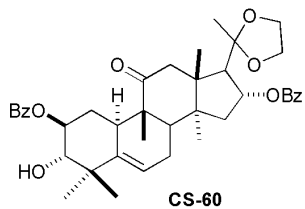
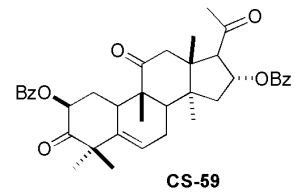
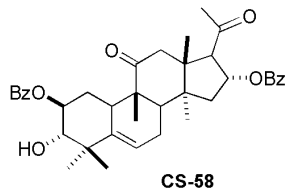
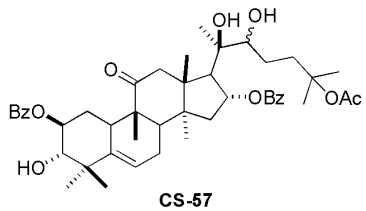
CS-36



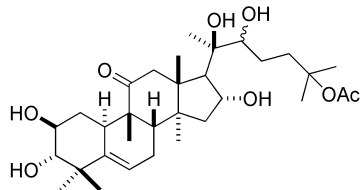
CS-37





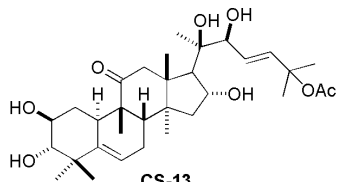


Derivado de CN-3

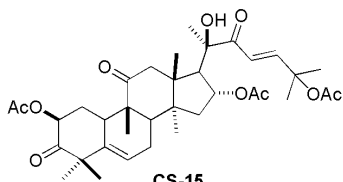


CS-11

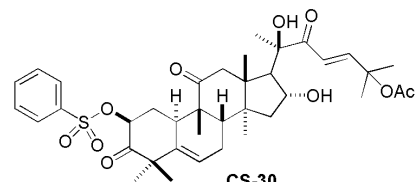
Derivados de CN-7



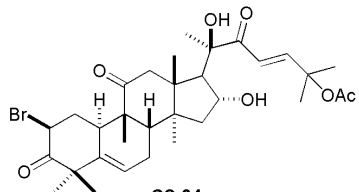
CS-13



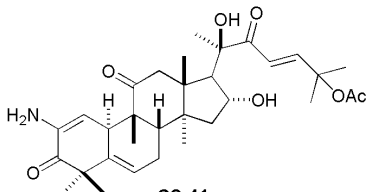
CS-15



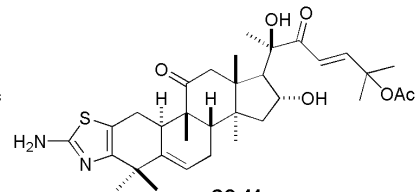
CS-30



CS-34

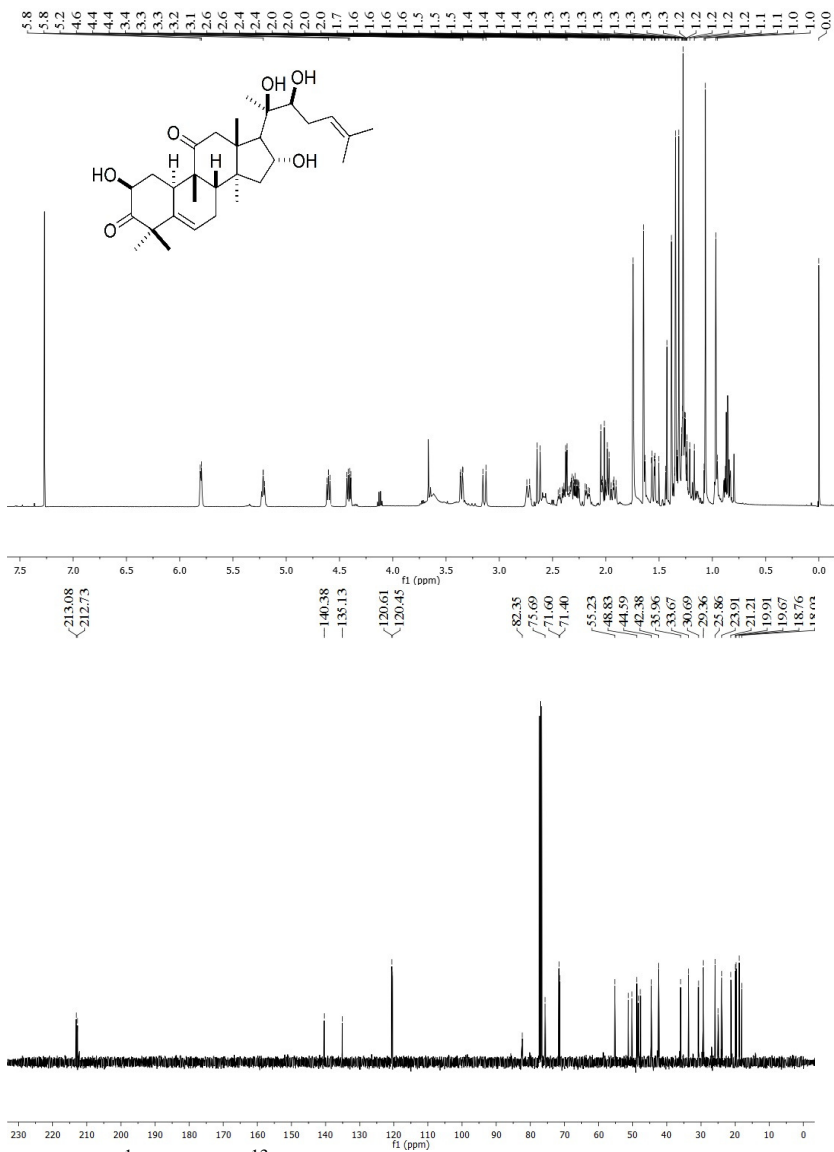


CS-41

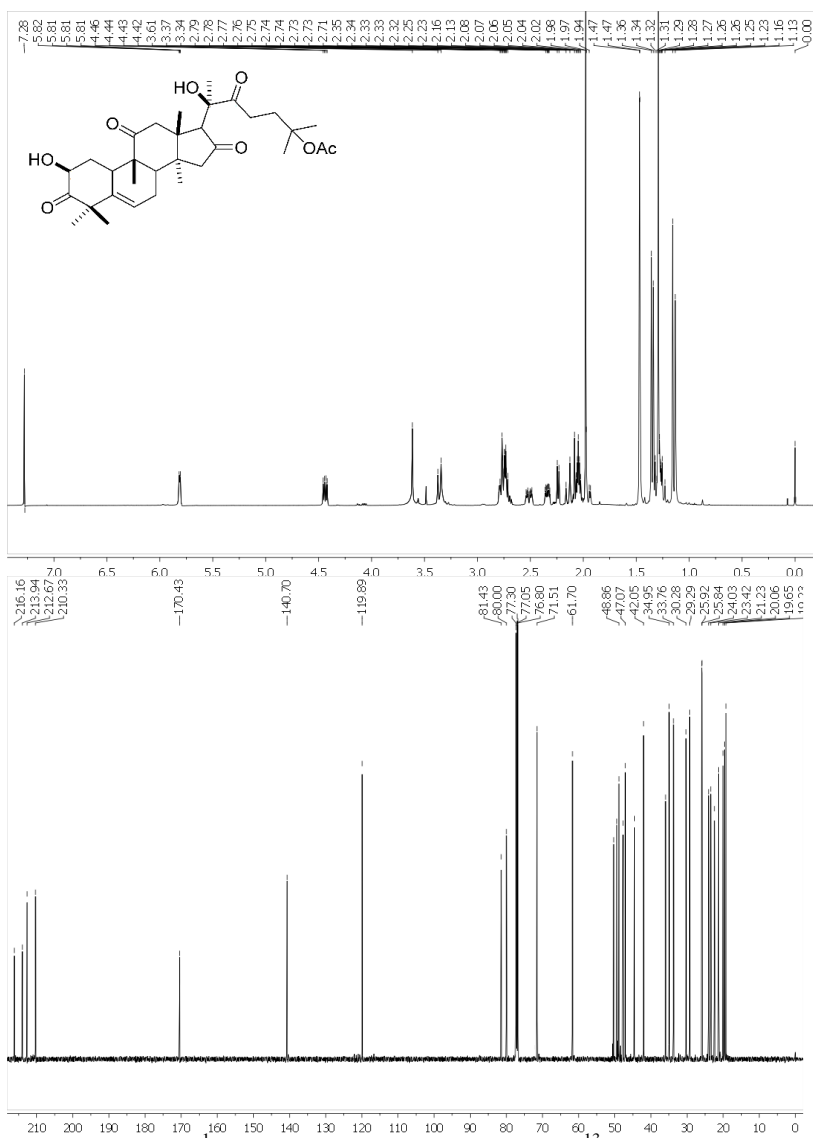


CS-44

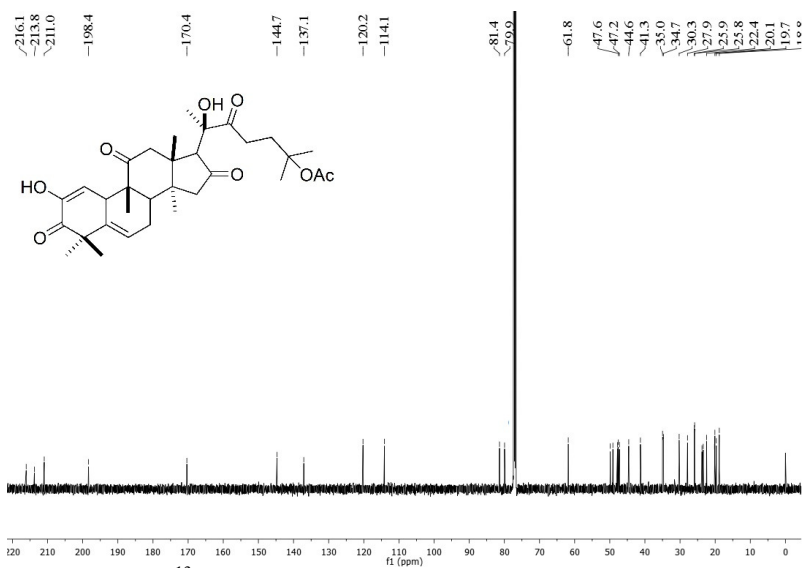
**ANEXO 2-
ESPECTROS DE RMN ¹H E ¹³C**



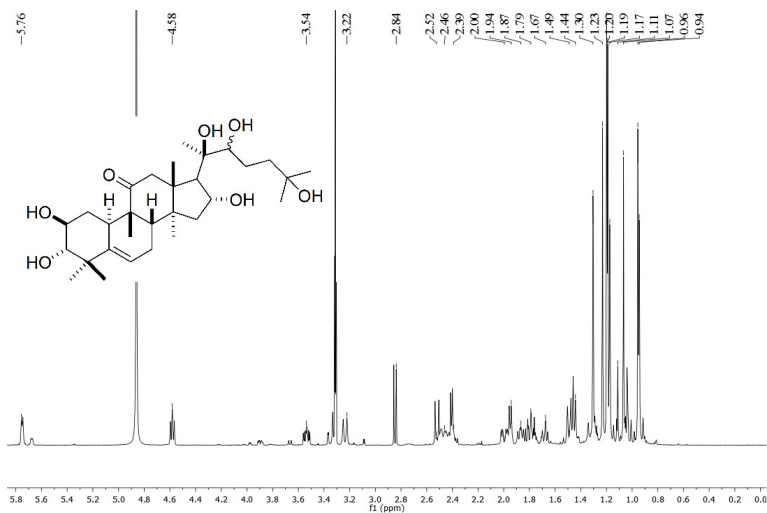
Espectros ¹H RMN e ¹³C RMN (500 MHz, CDCl₃) do composto CN-5.



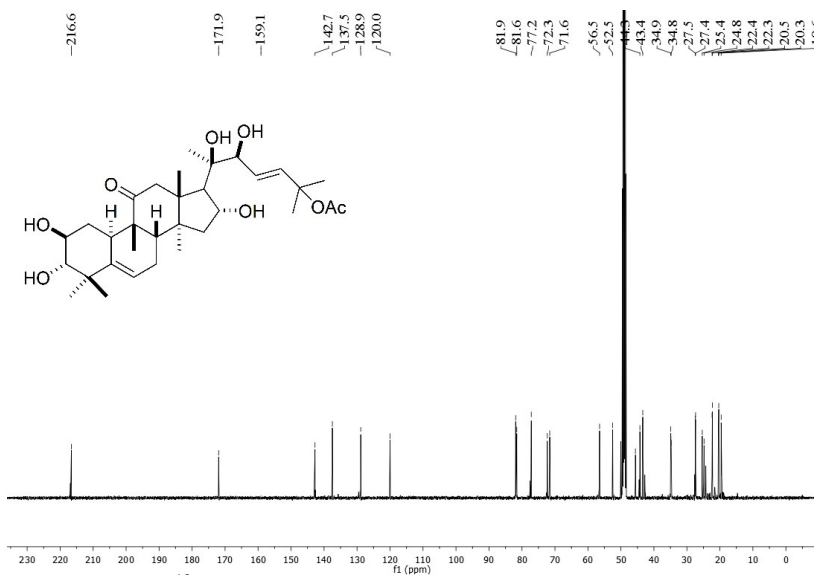
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-9.



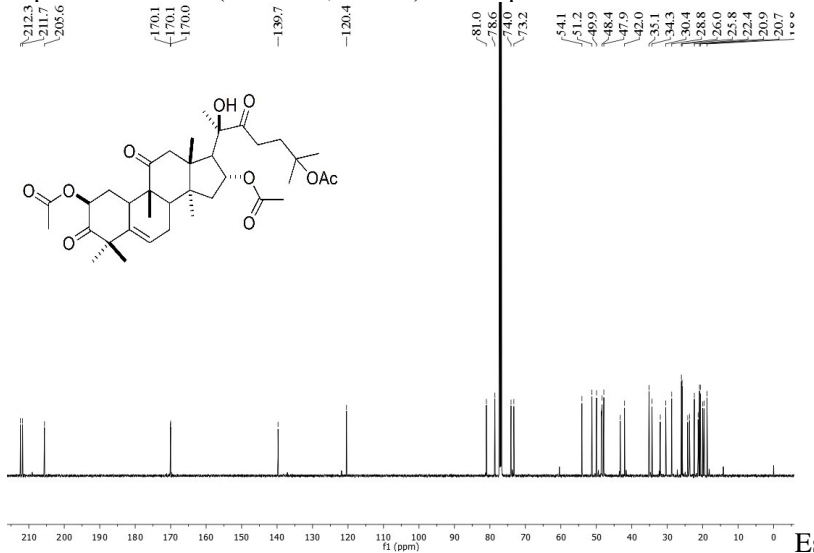
Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do composto CS-10.



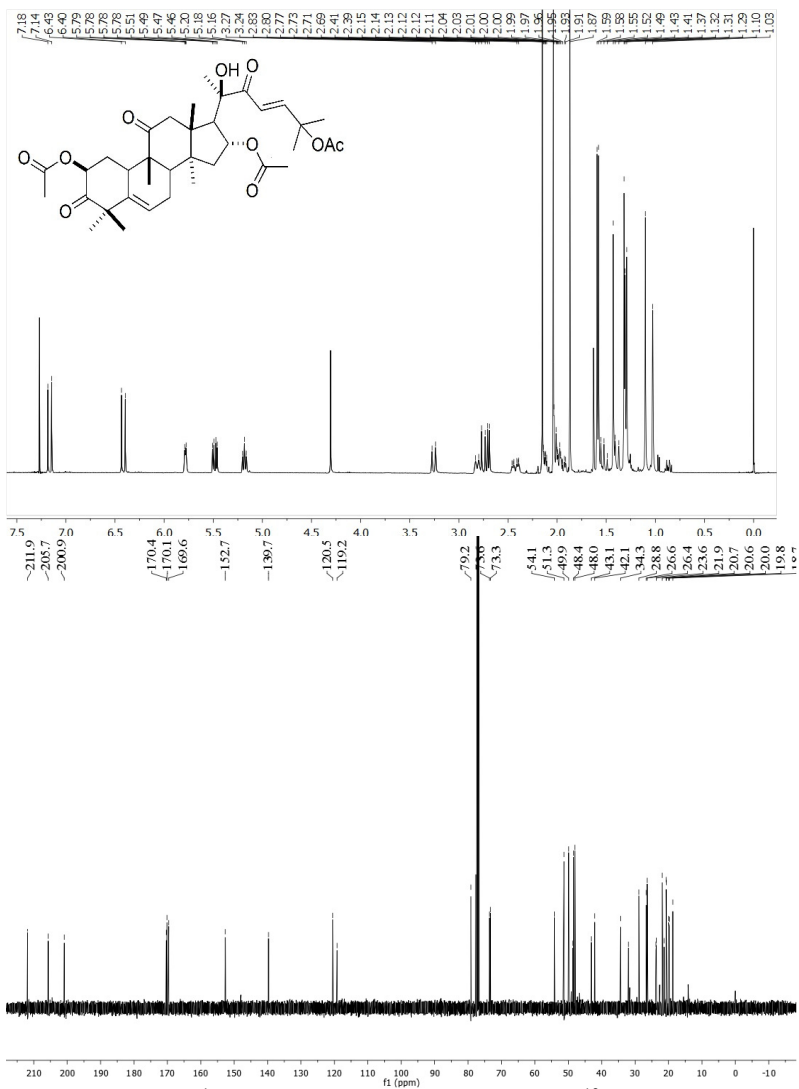
Espectro RMN ^1H (500 MHz, MeOD) do composto CS-11.



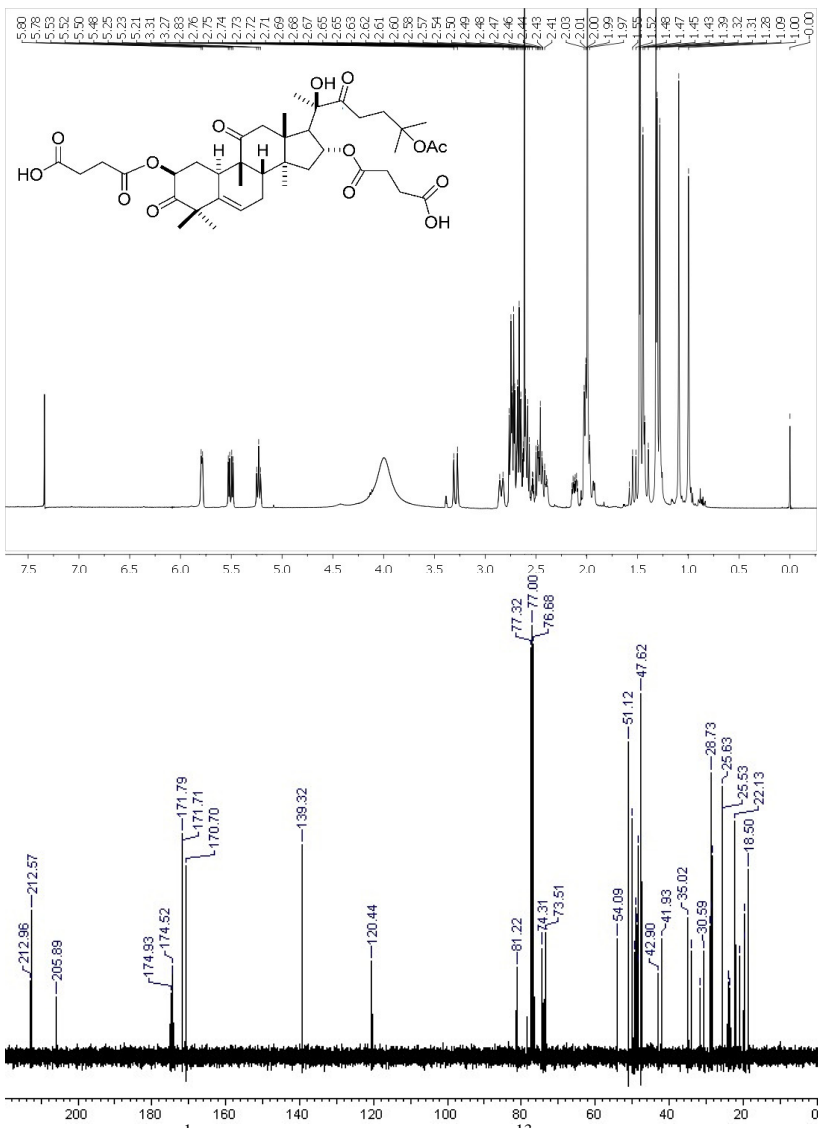
Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, MeOD) do composto **CS-13**.



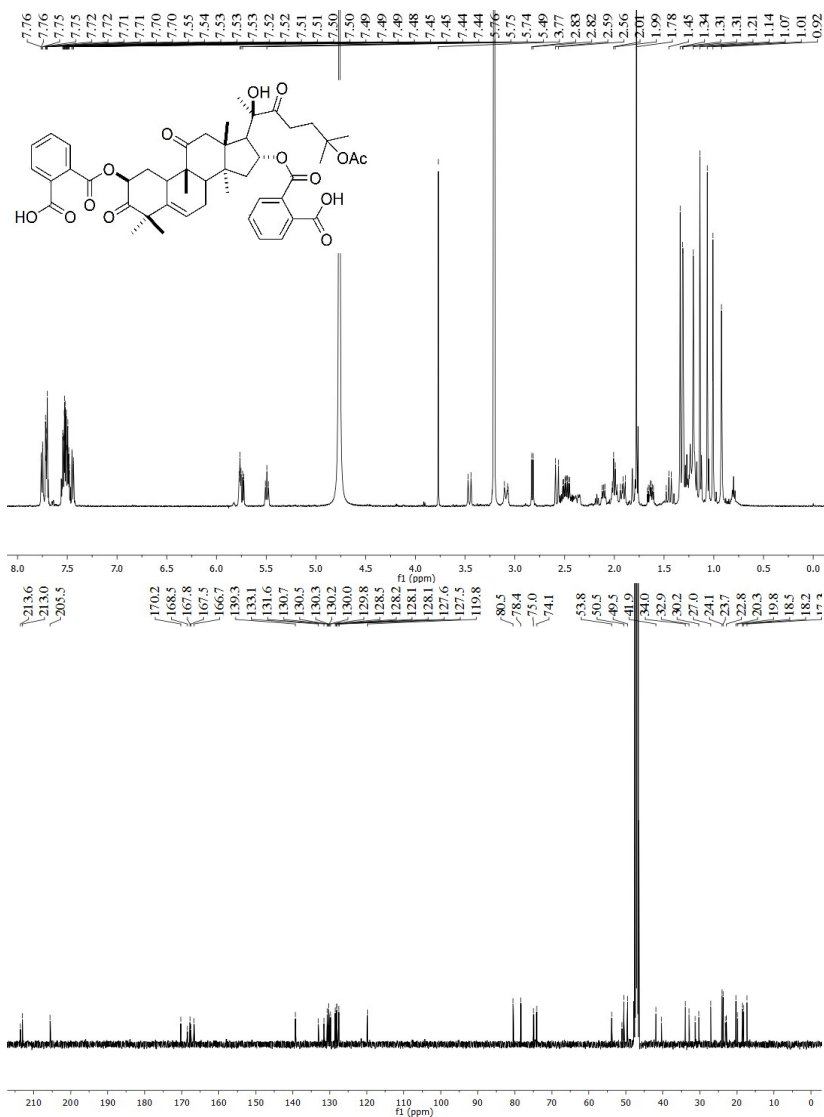
Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-14**.



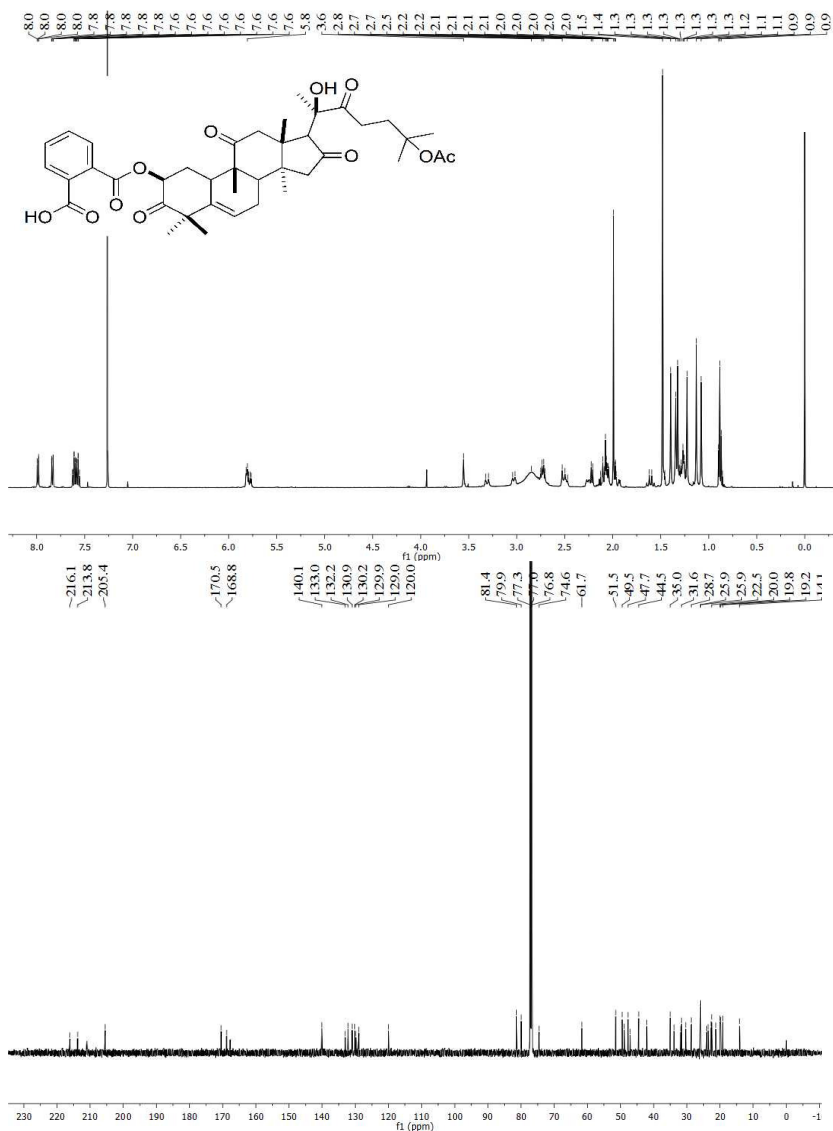
Espetros RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (125,8 MHz) do composto CS-15.



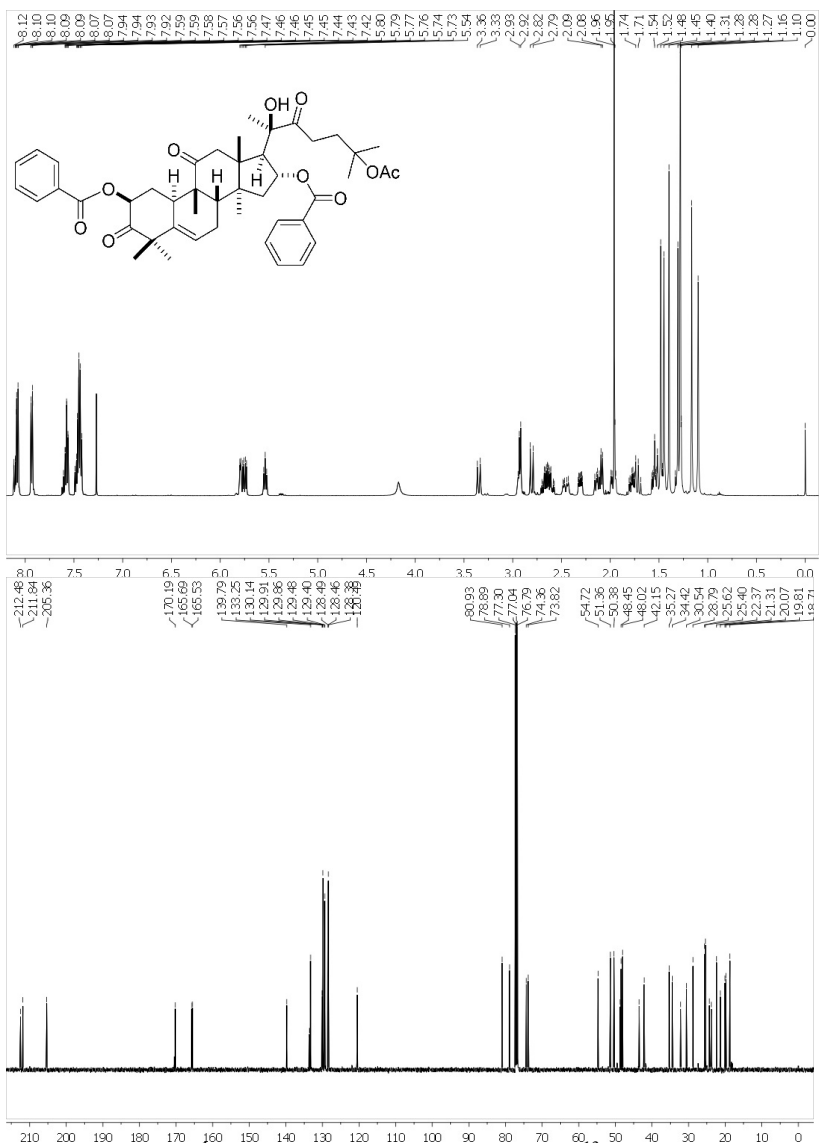
Espectros RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (100 MHz) do composto CS-16.



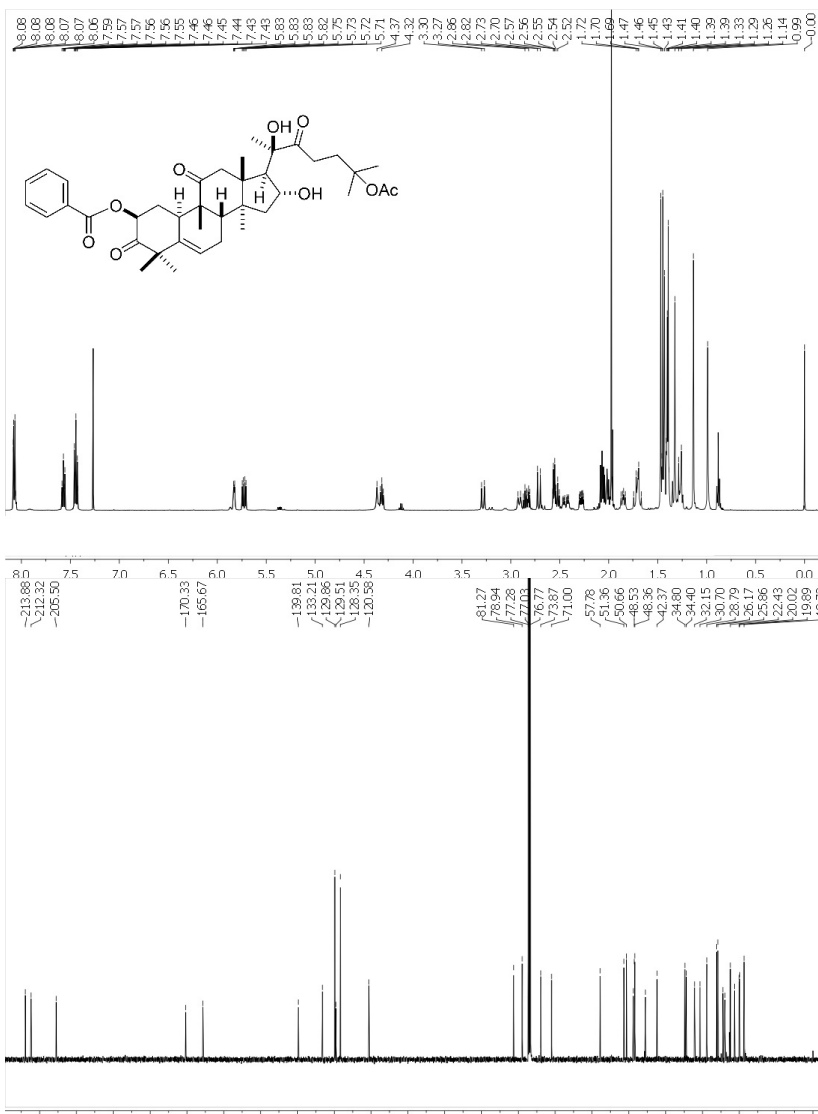
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-18.



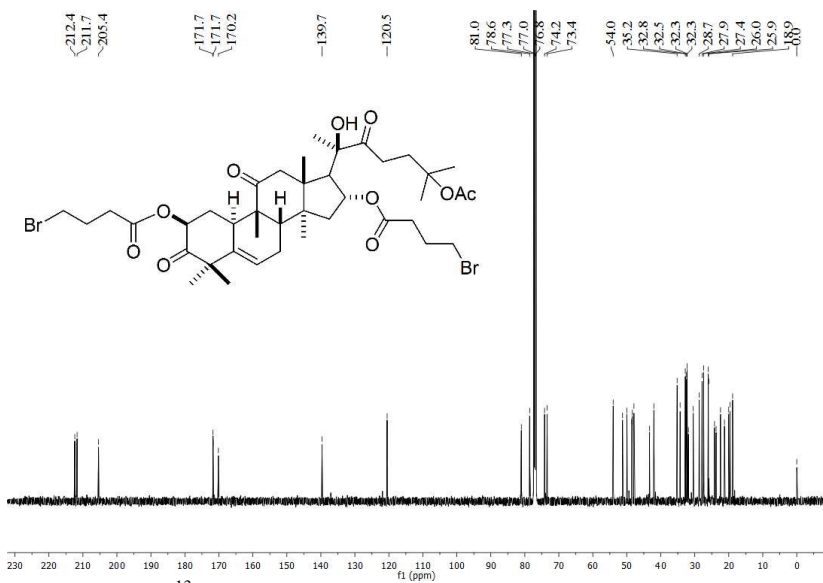
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-19.



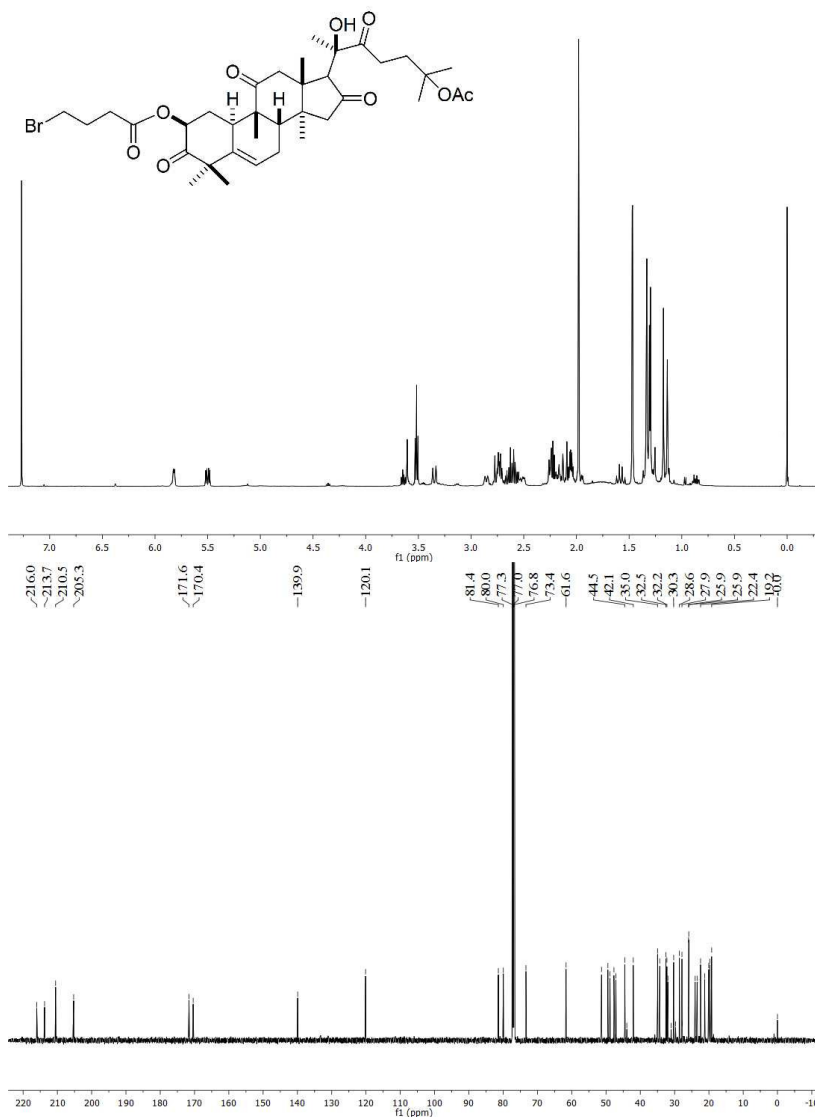
Espetros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-20.



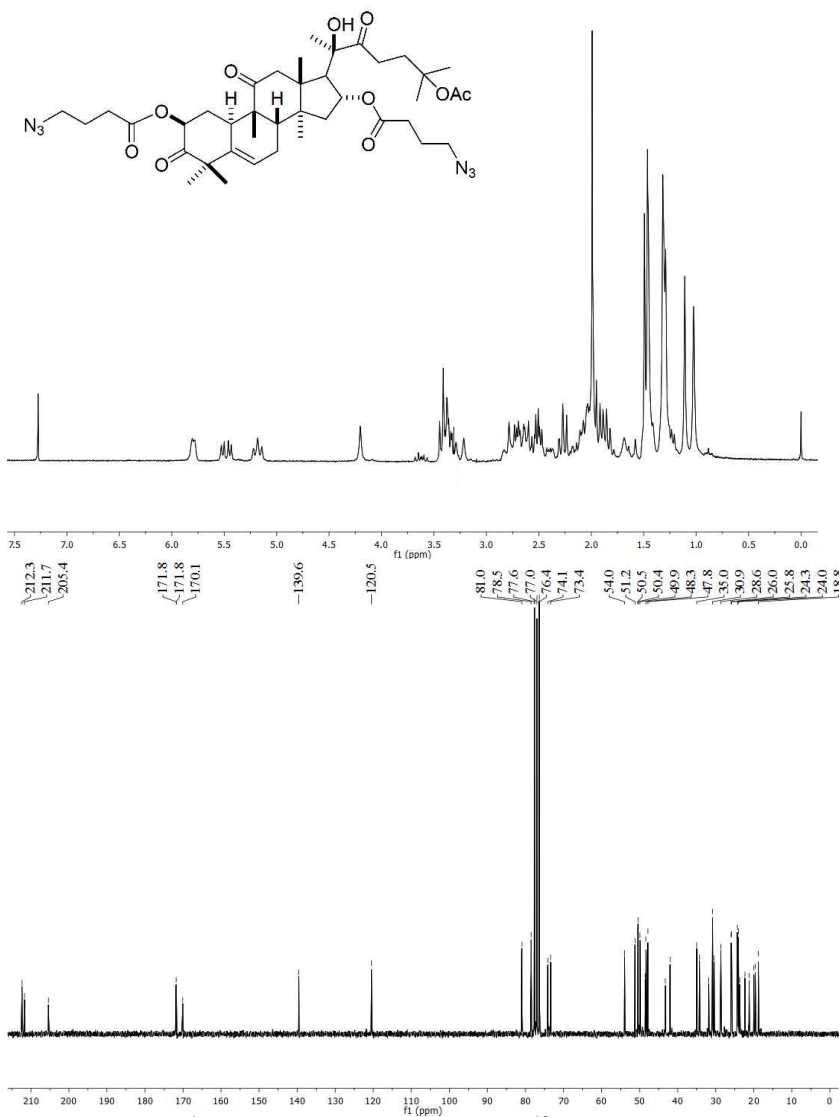
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-21.



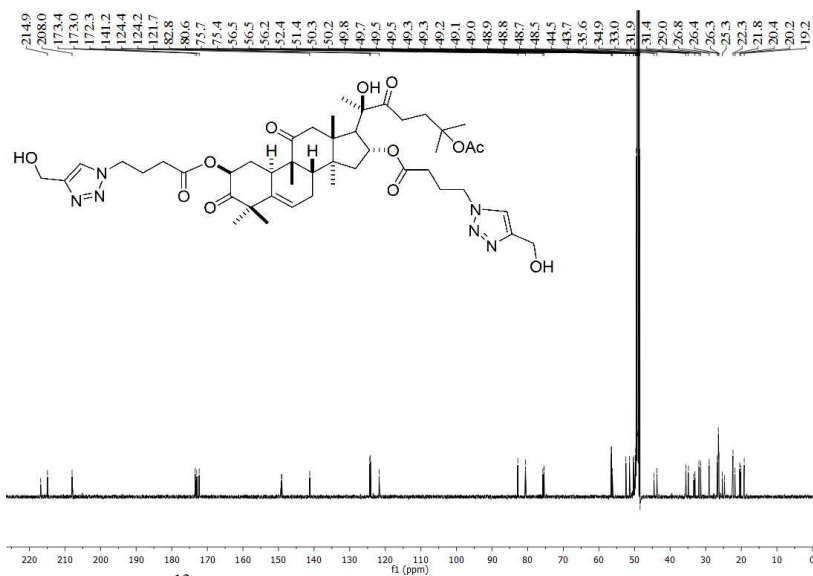
Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-22**.



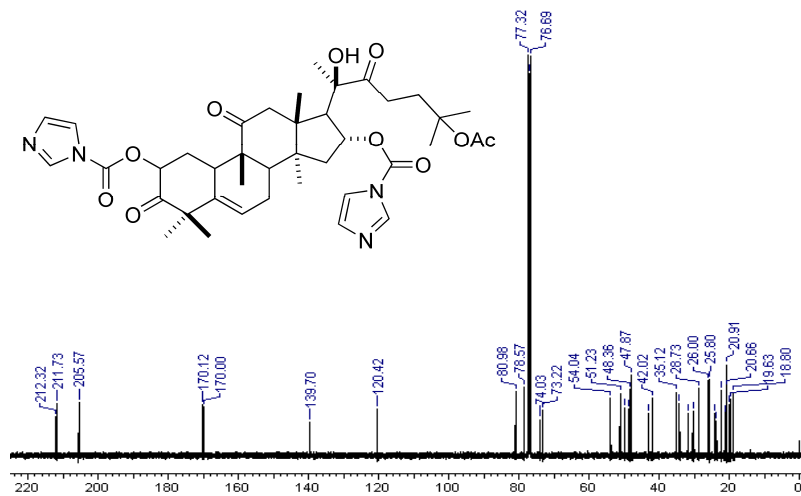
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-23.



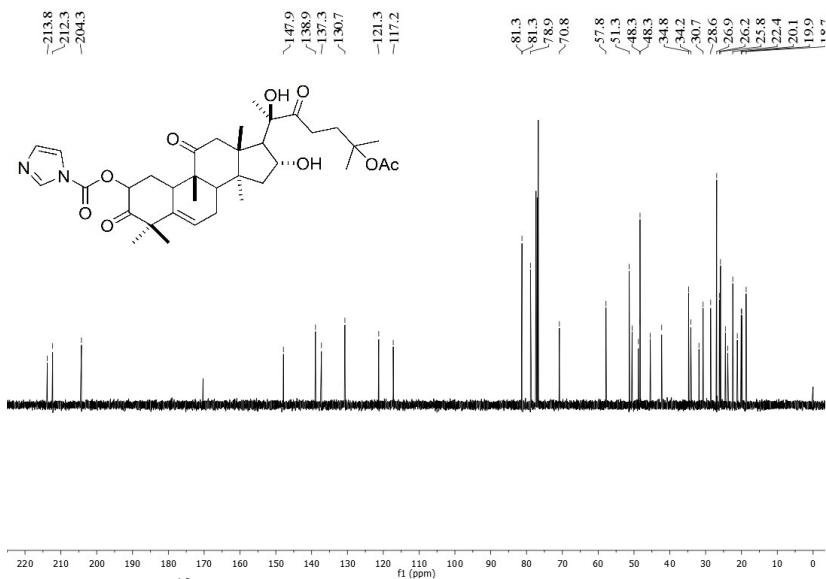
Espectros RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (50 MHz) do composto CS-24.



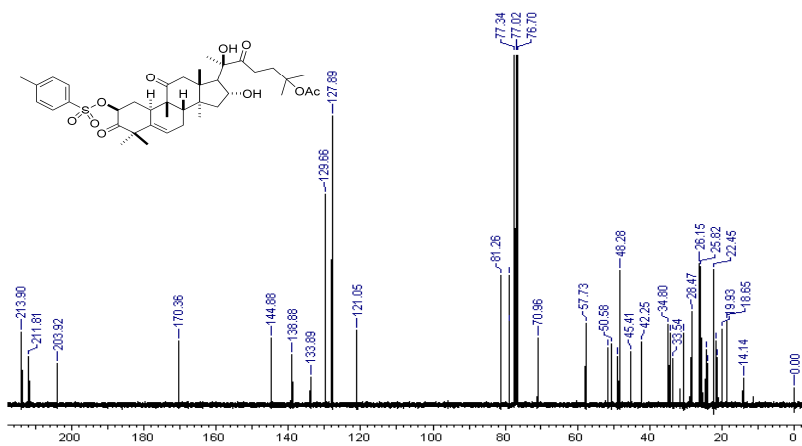
Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do composto CS-25.



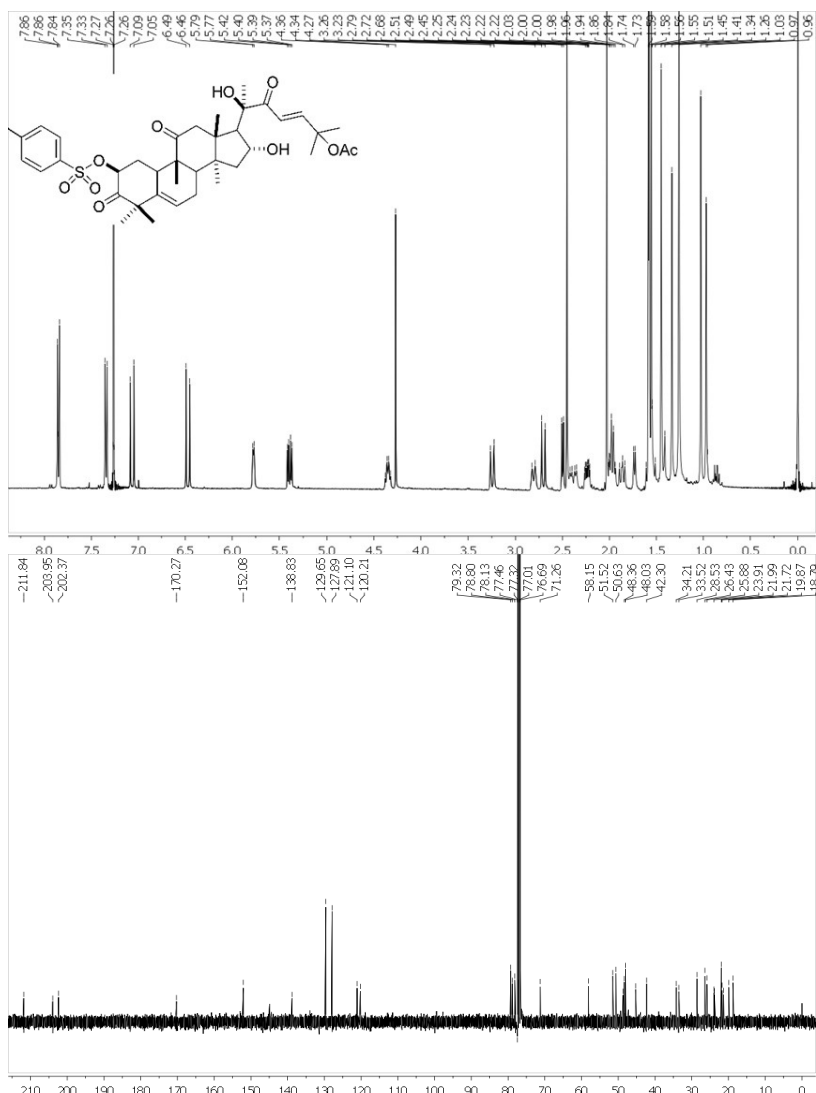
Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do composto CS-26.



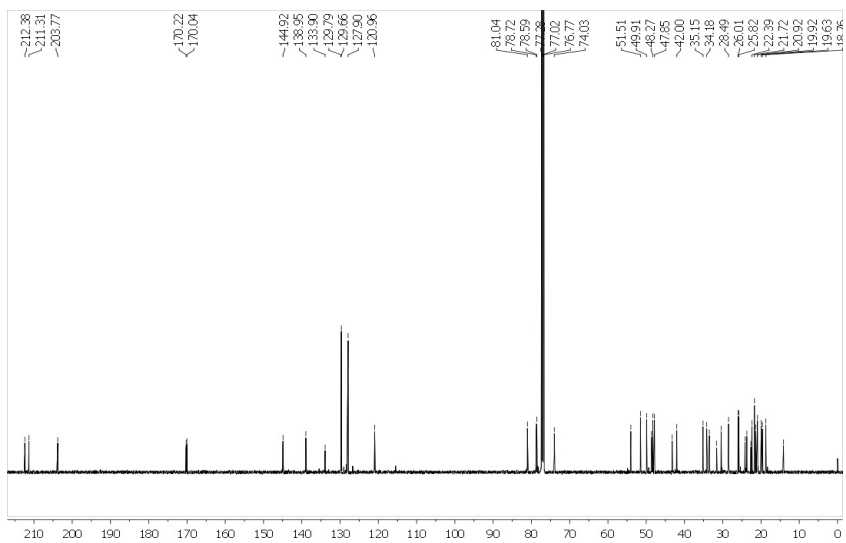
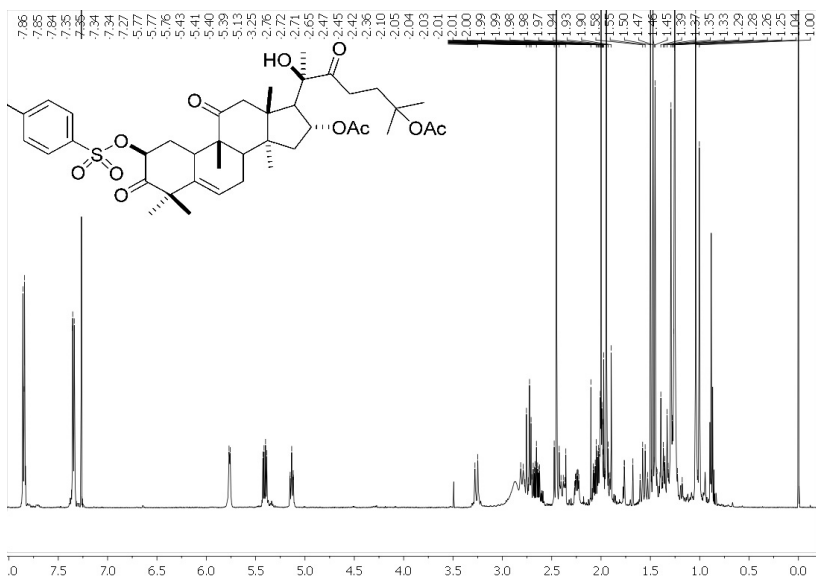
Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-27**.



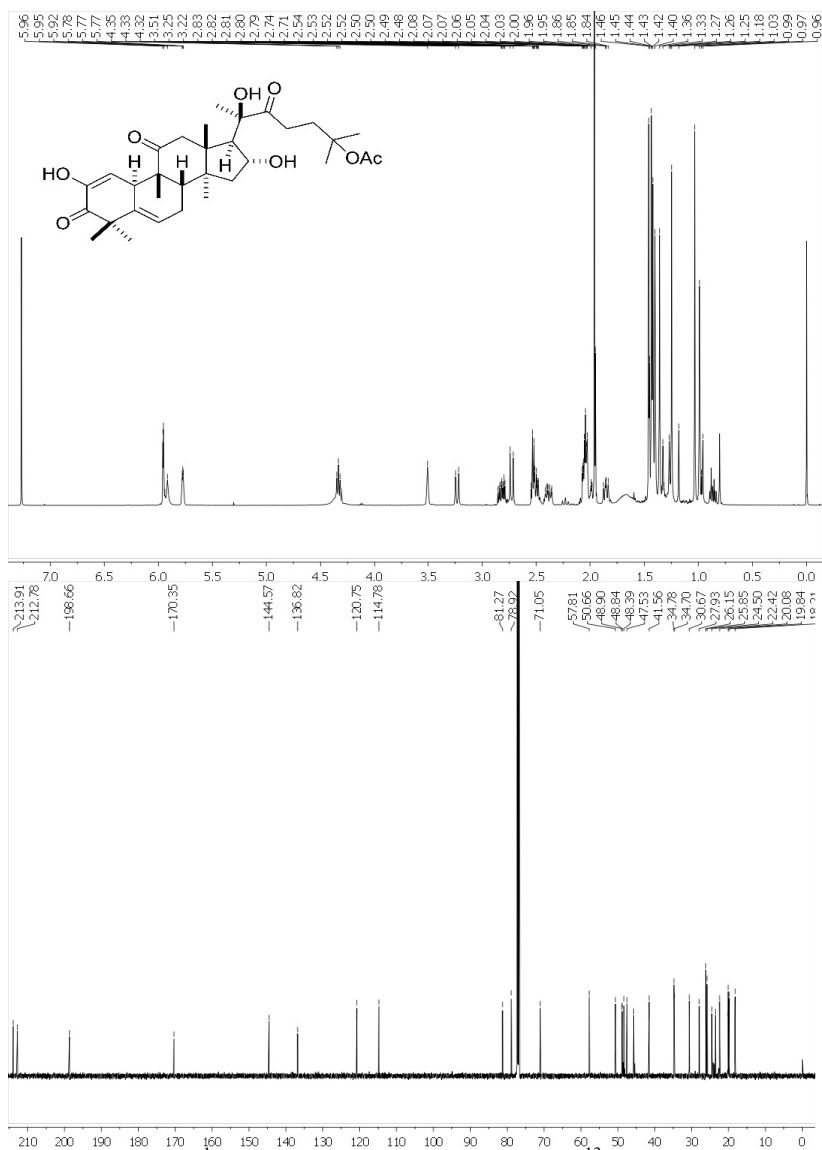
Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-29**.



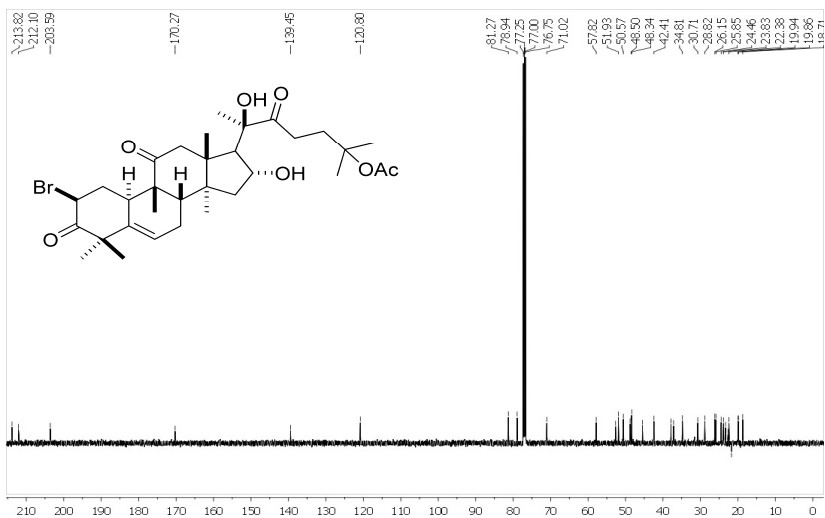
Espectros RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (100 MHz) do composto CS-30.



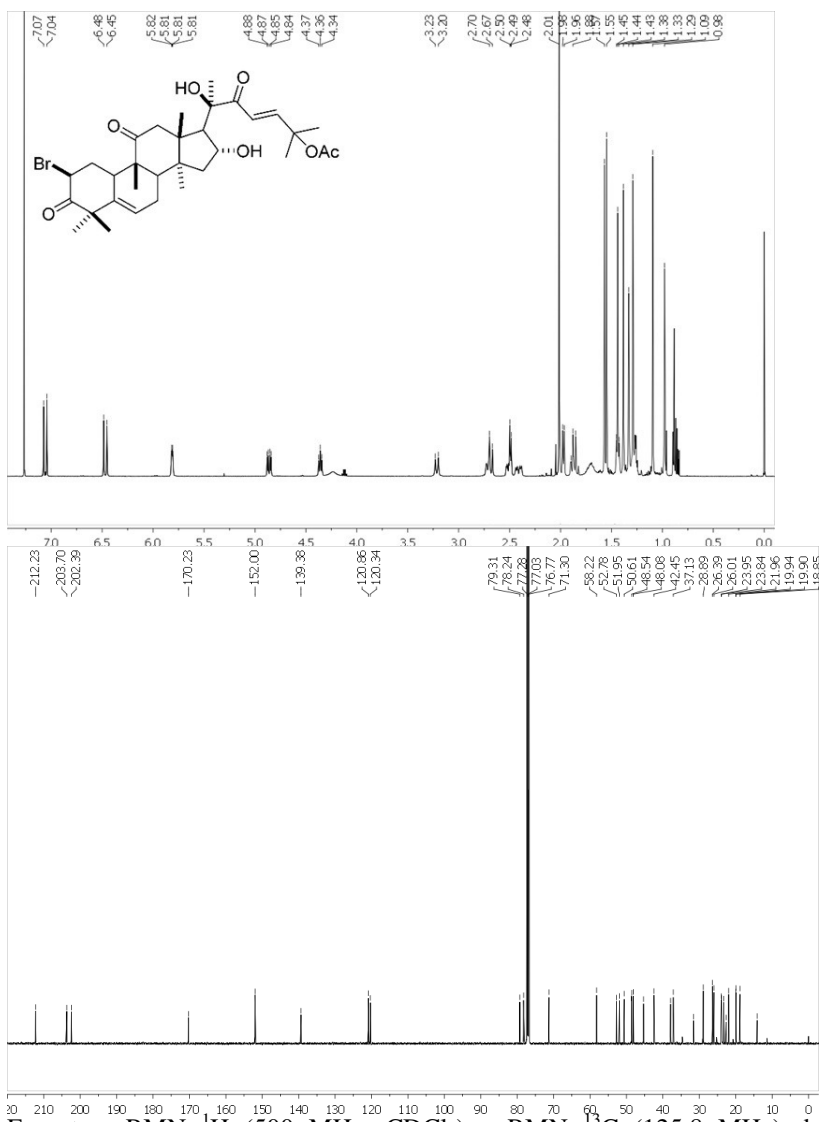
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-31.



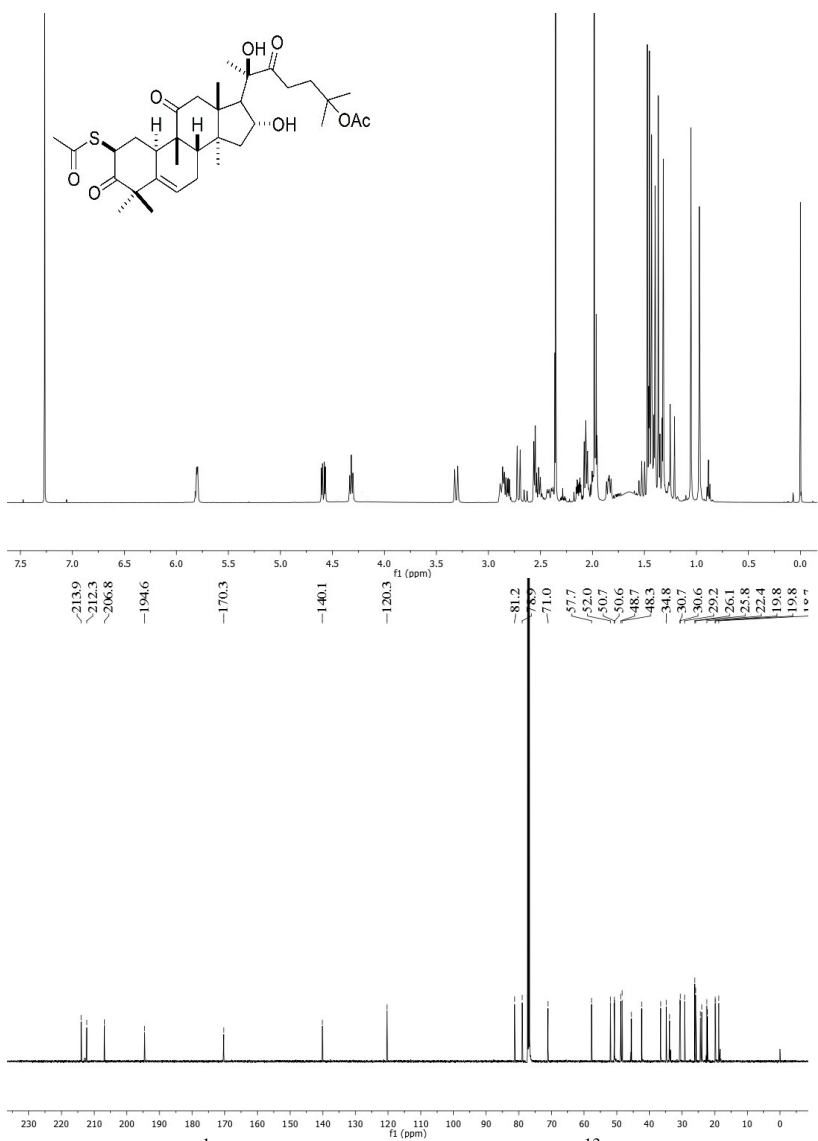
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-32.



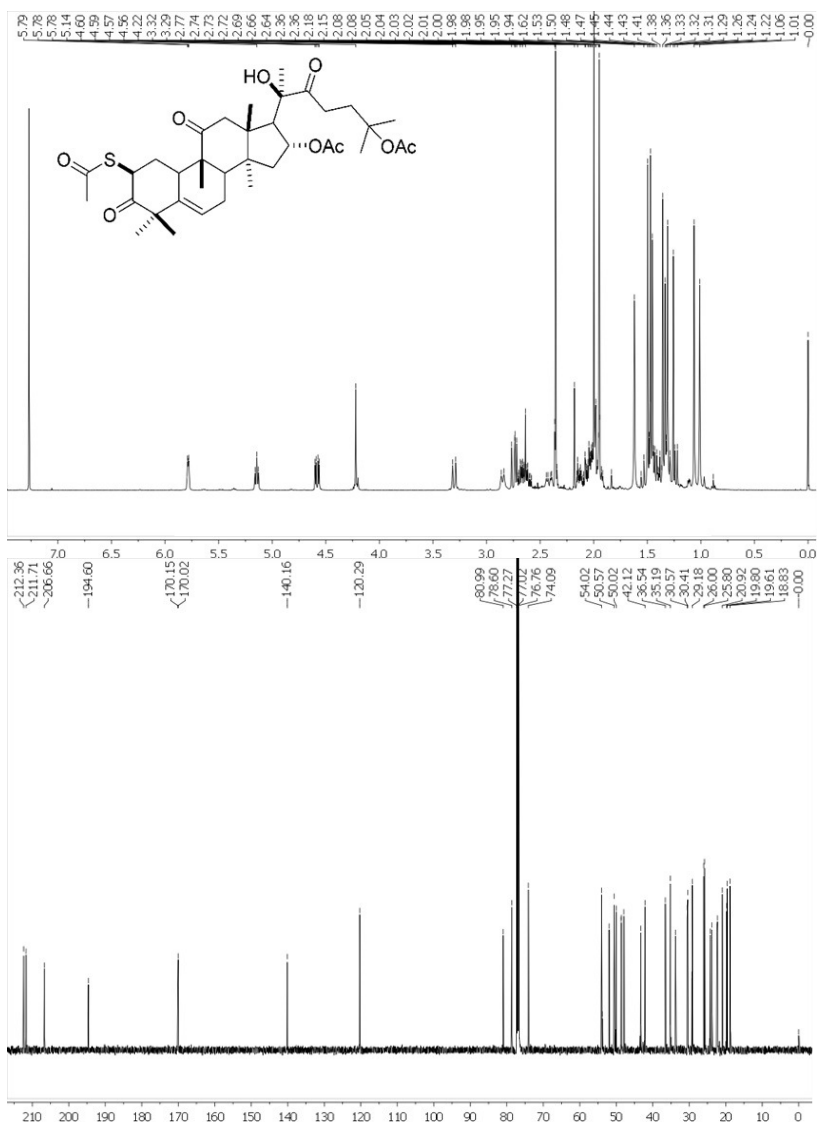
Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz, CDCl_3) do composto CS-33.



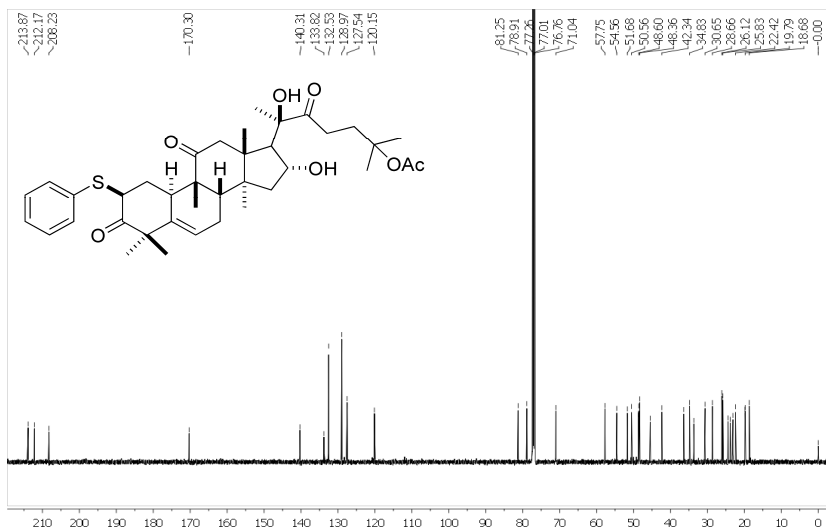
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-34.



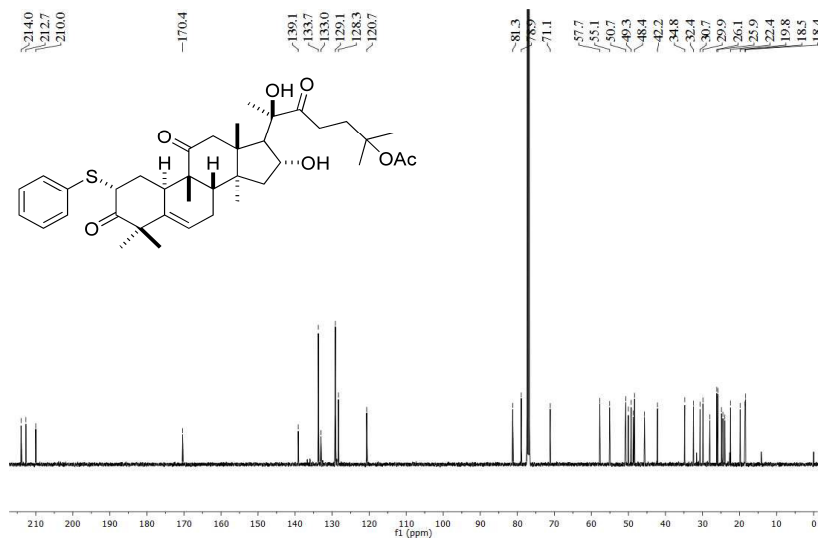
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-35.



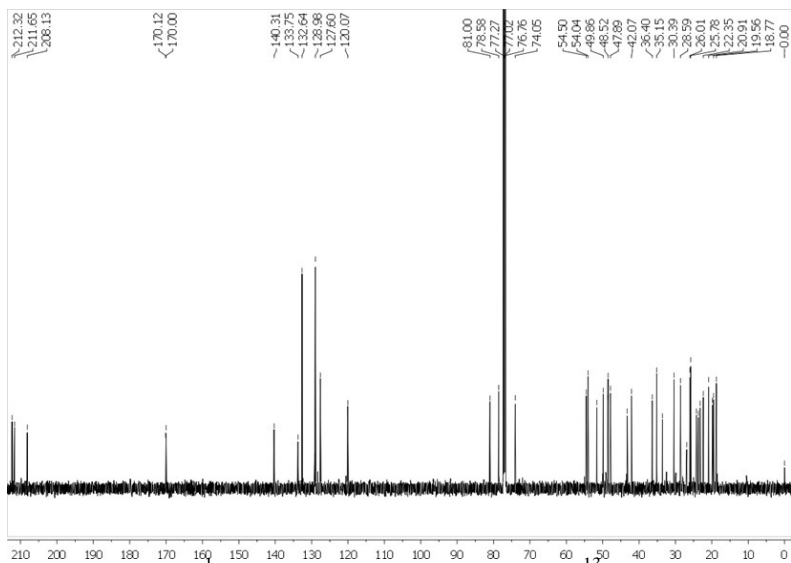
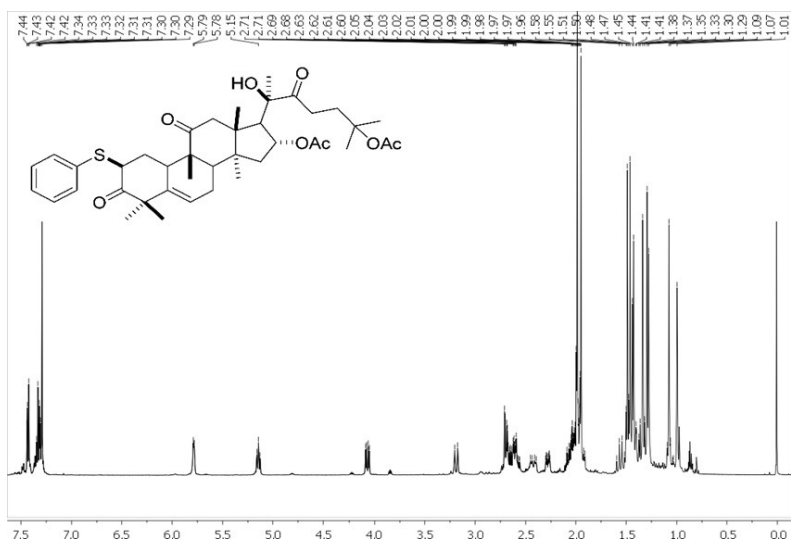
Espectros RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (125,8 MHz) do composto CS-36.



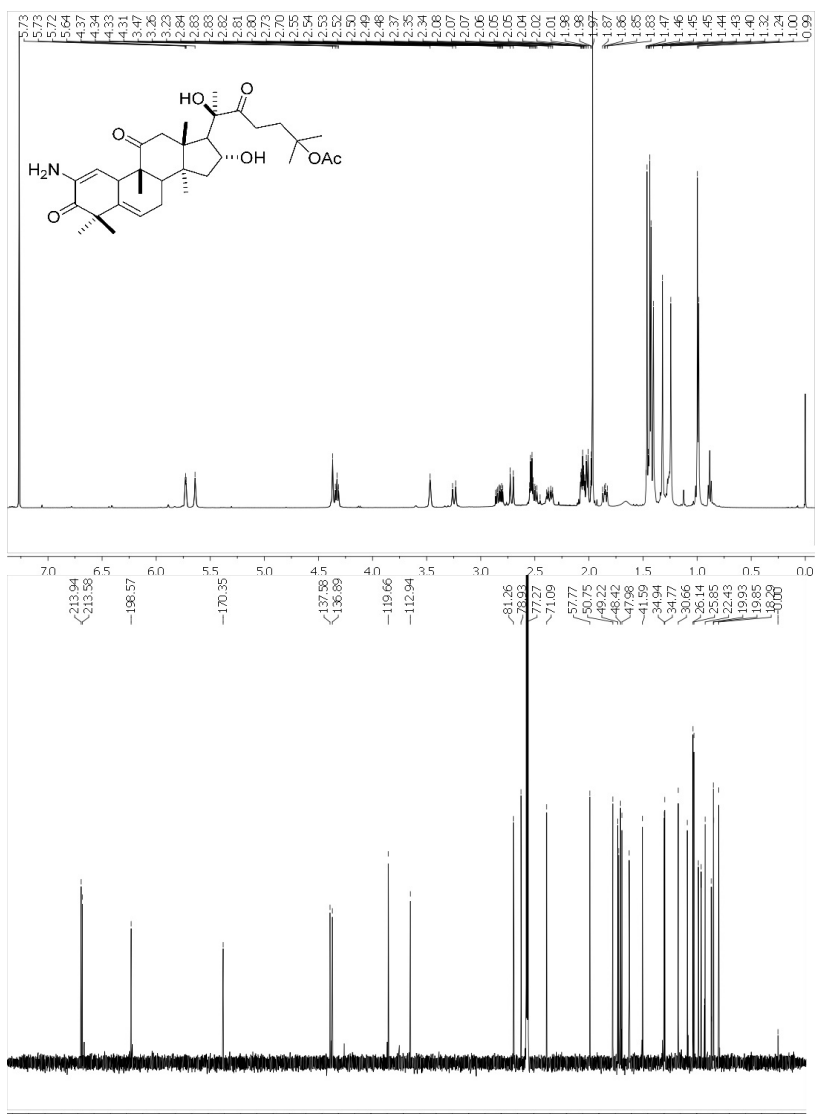
Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto **CS-37**.



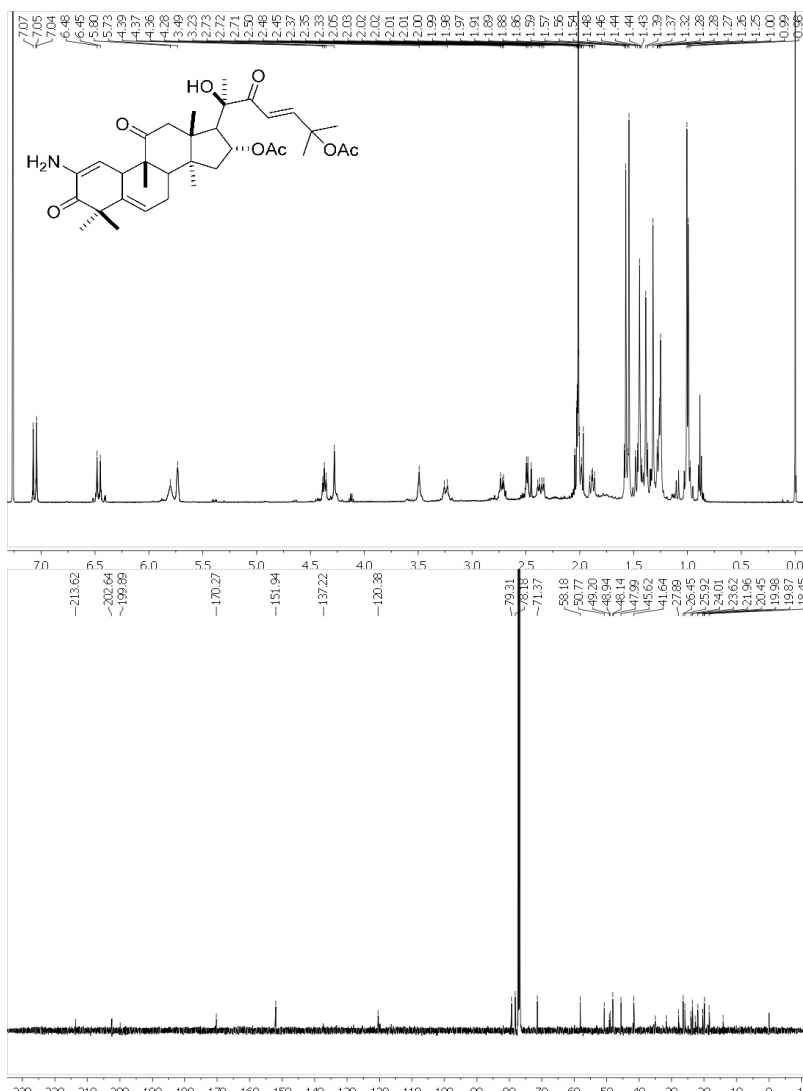
Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto **CS-39**.



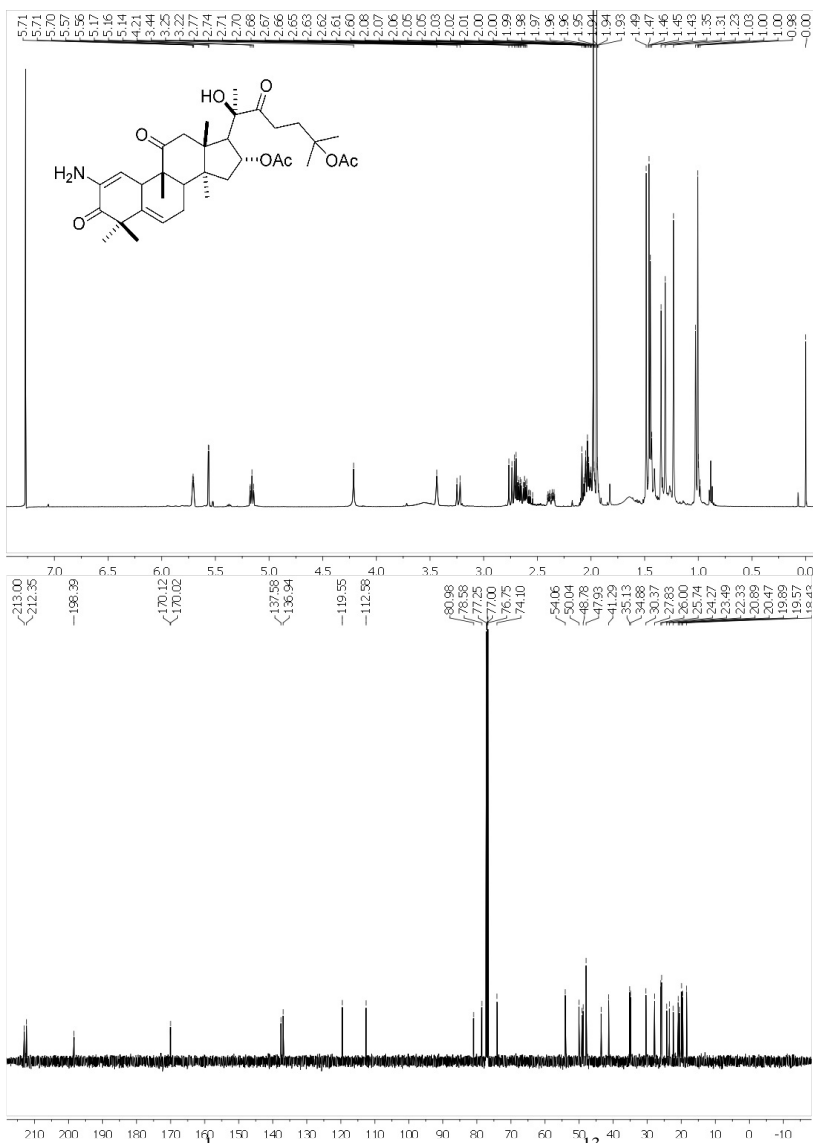
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-38.



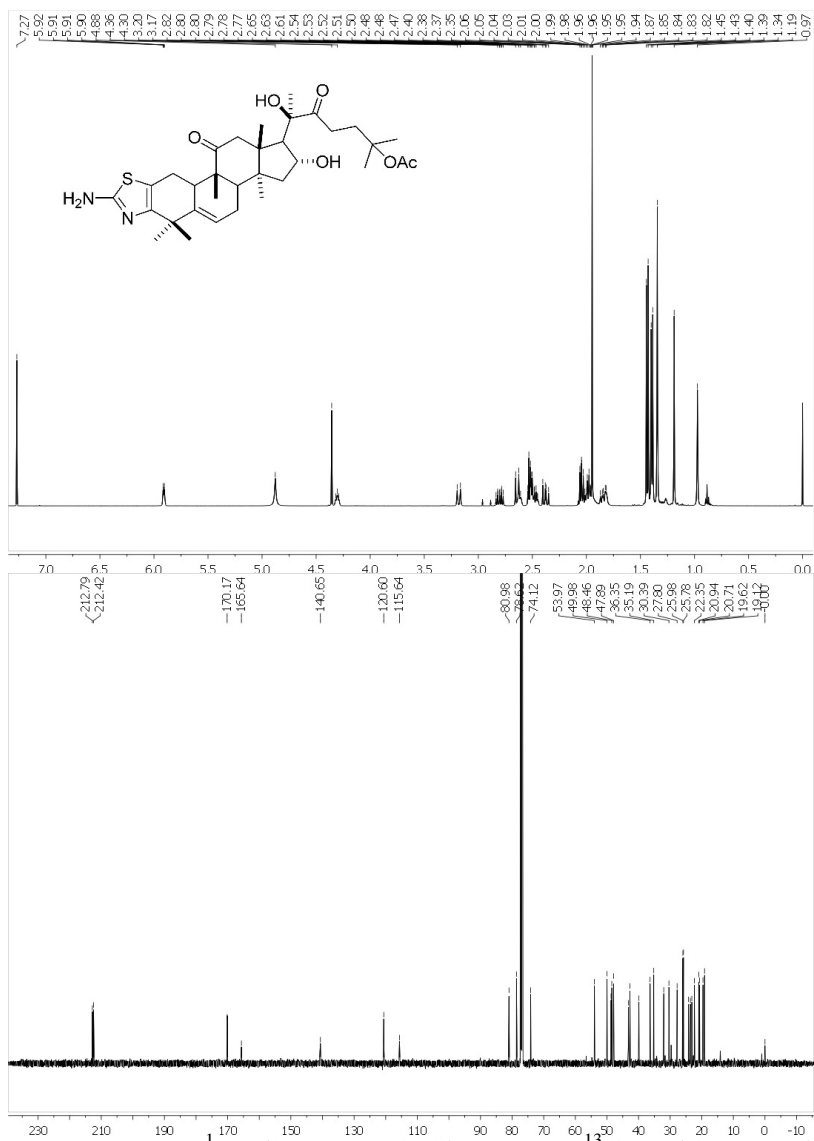
Espetros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-40.



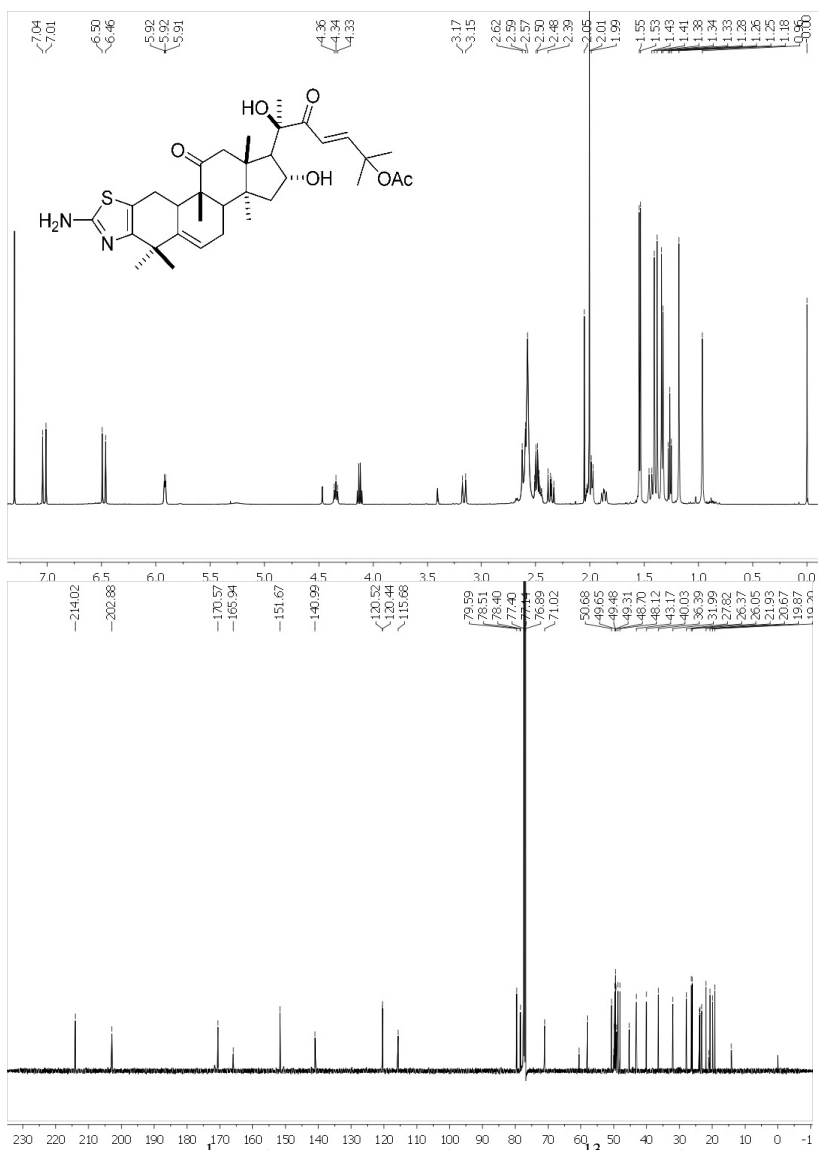
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-41.



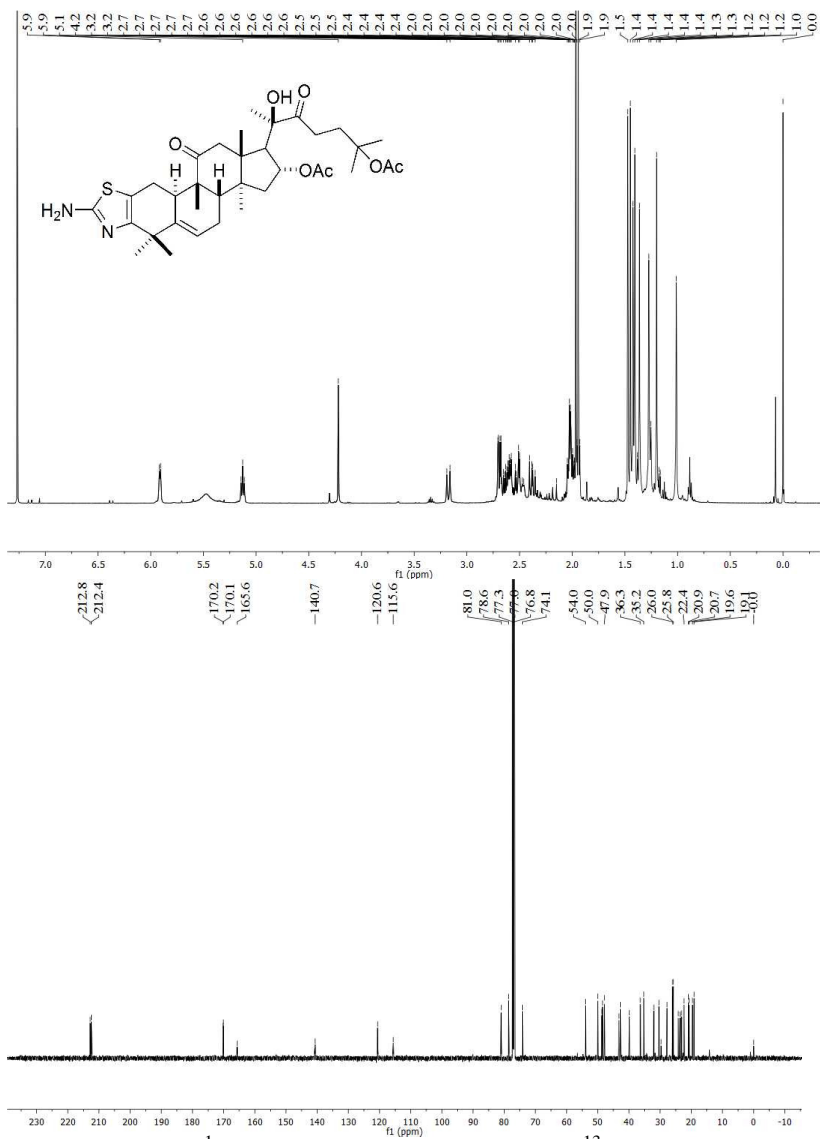
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-42.



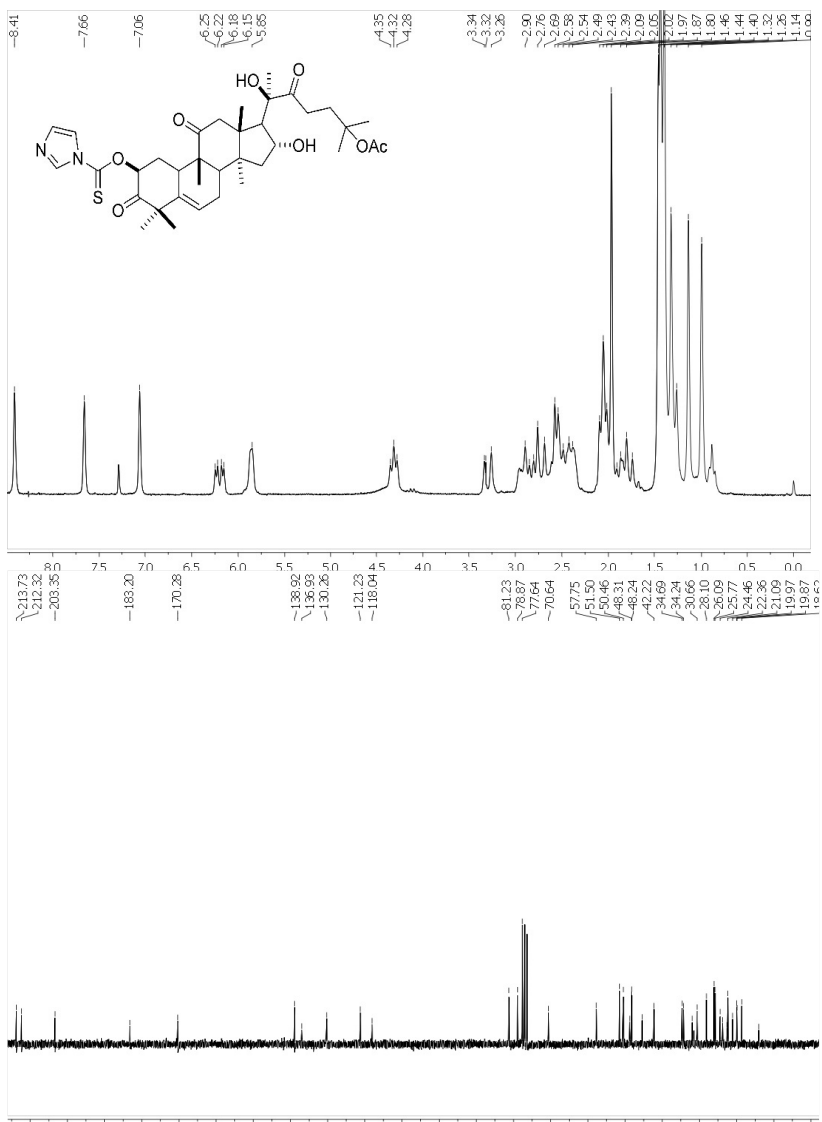
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-43.



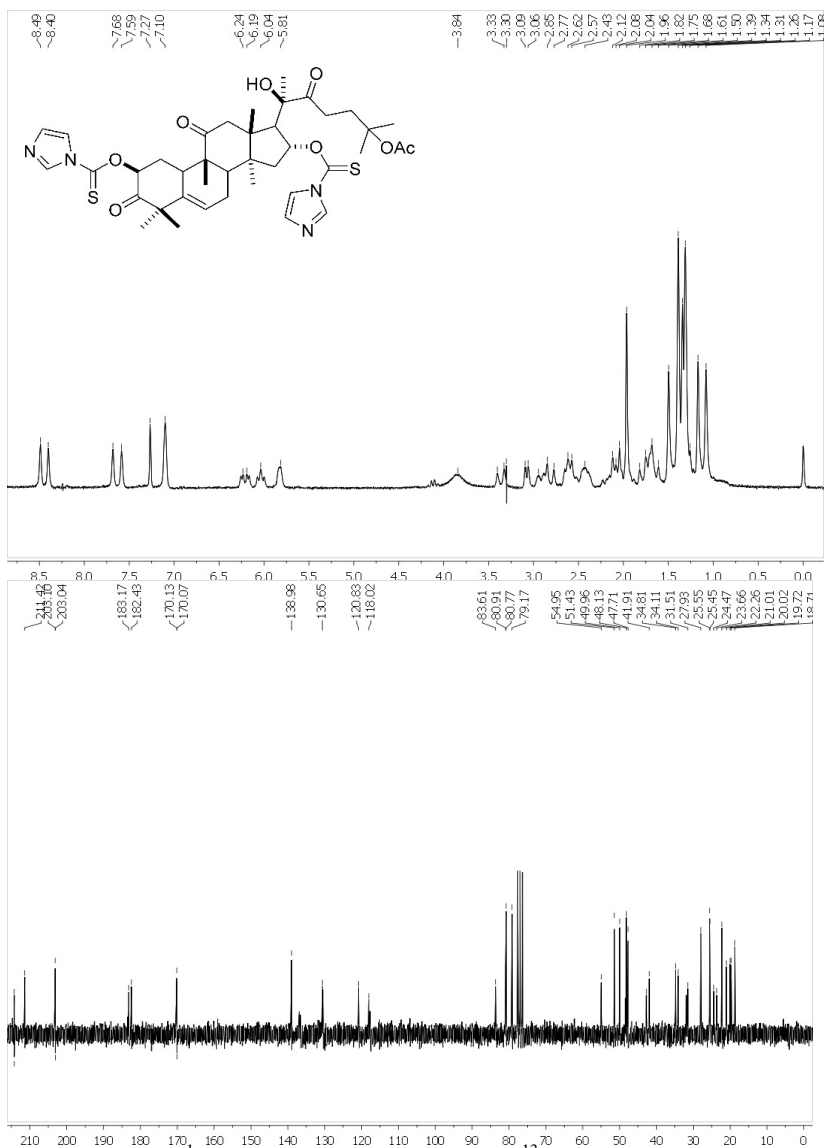
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-44.



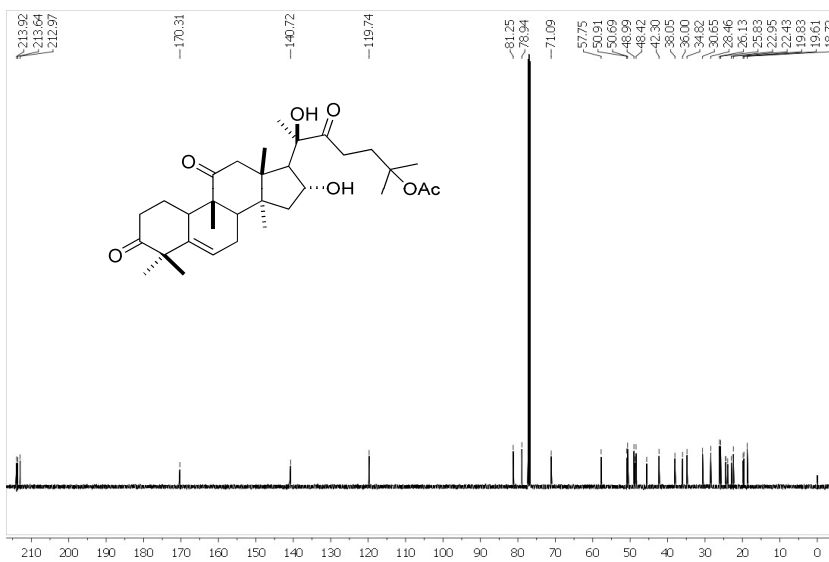
Espectros RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (125,8 MHz) do composto CS-45.



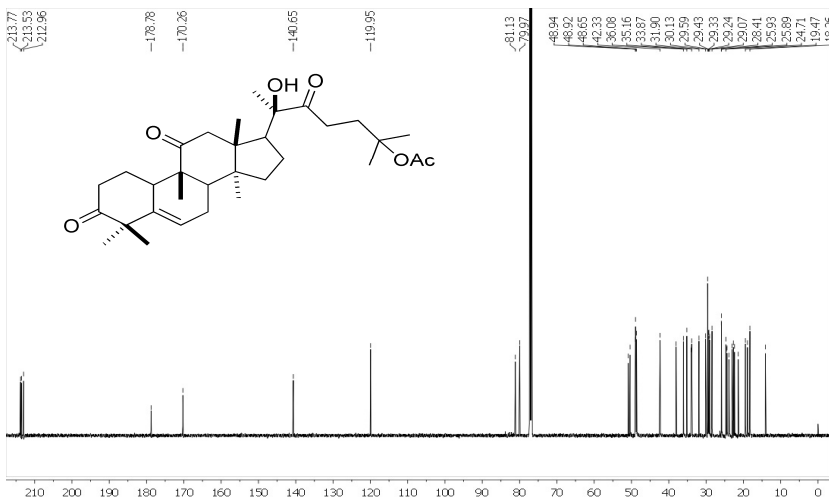
Espectros RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (50 MHz) do composto CS-46.



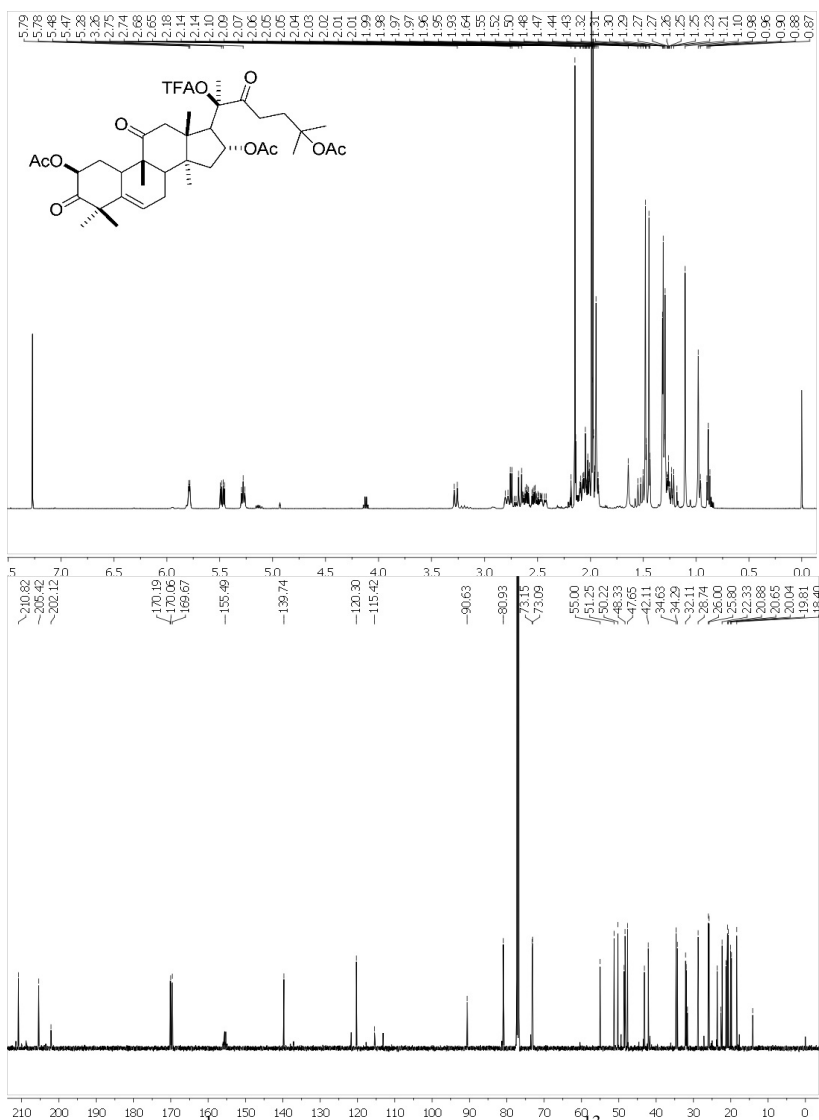
Espectros RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (50 MHz) do composto CS-47.



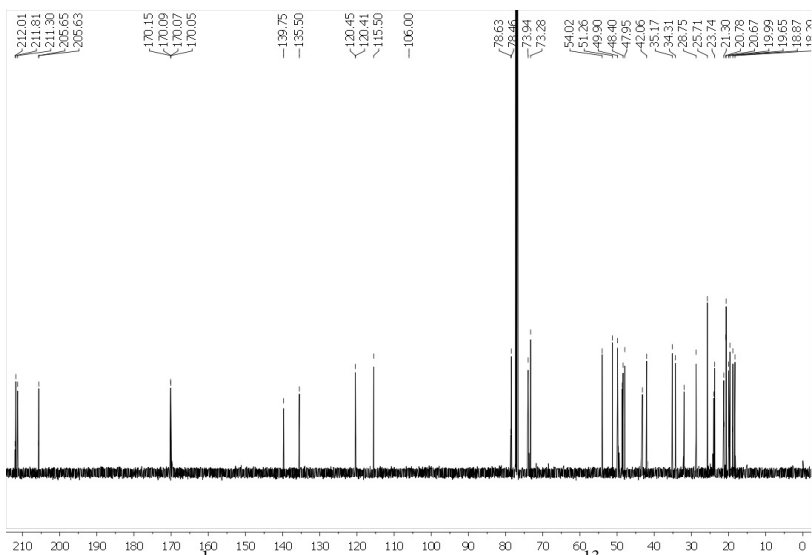
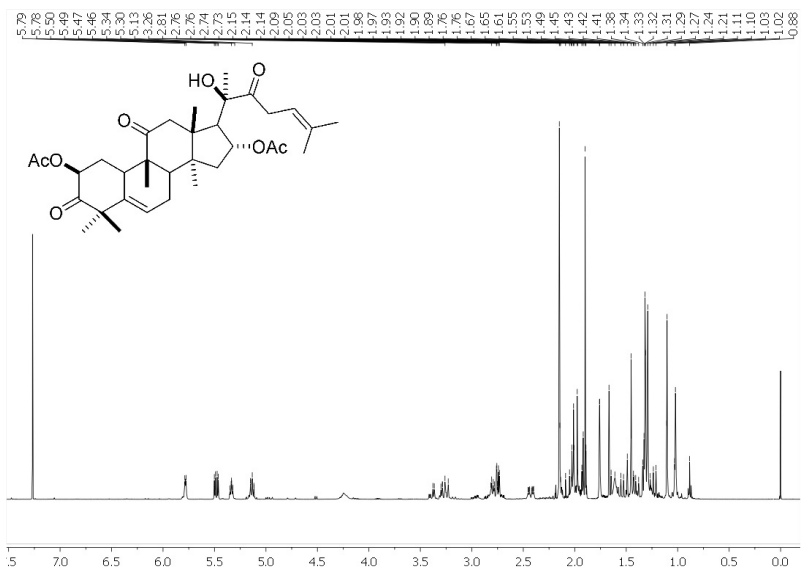
Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto **CS-48**.



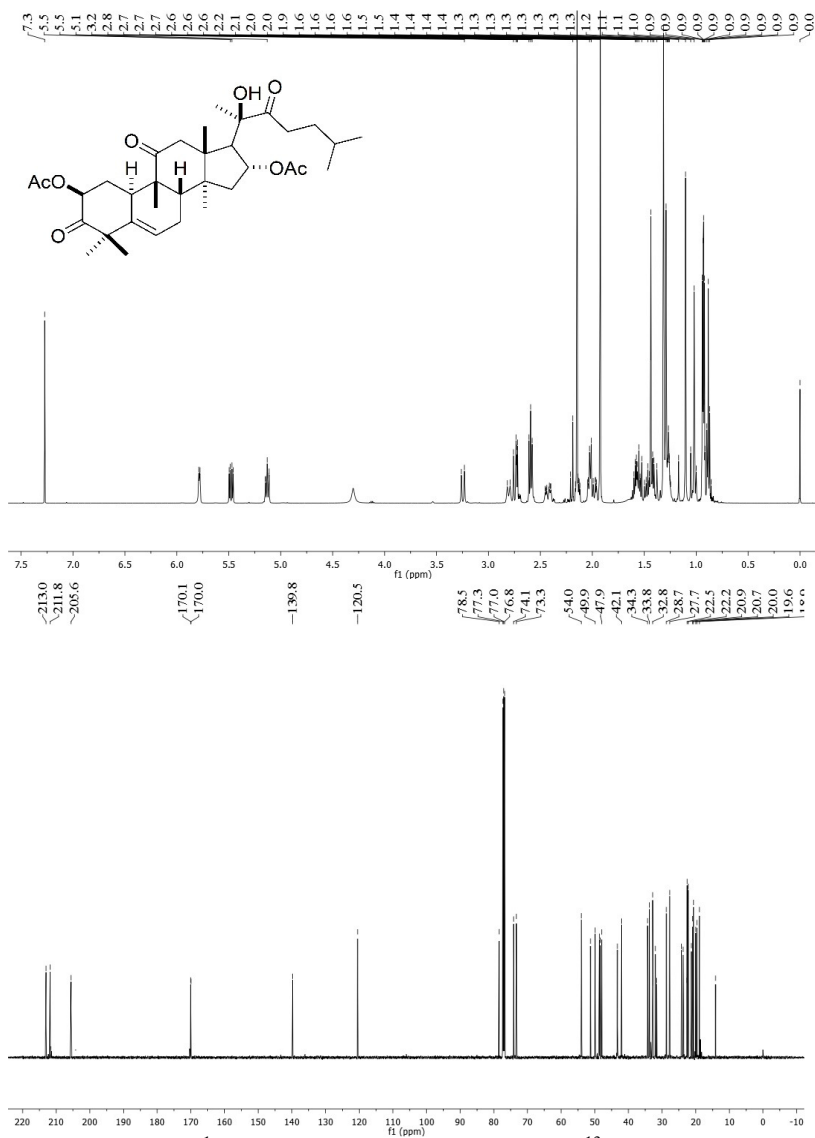
Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto **CS-49**.



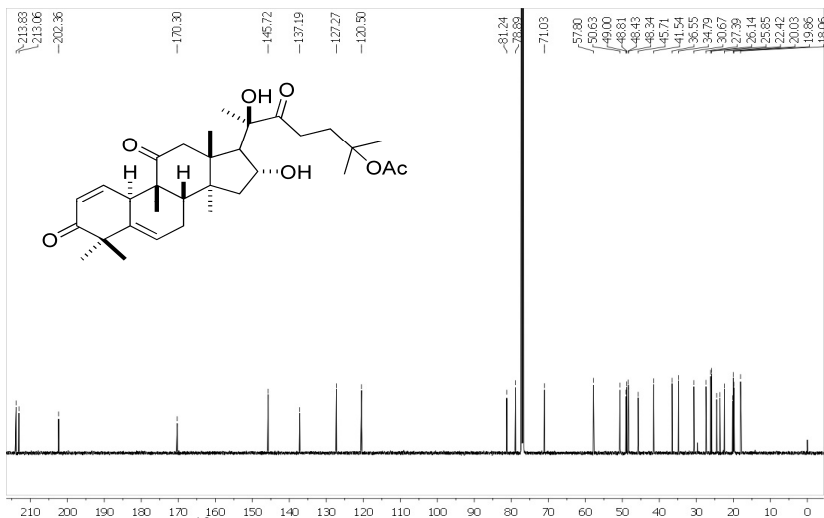
Espetros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto **CS-50**.



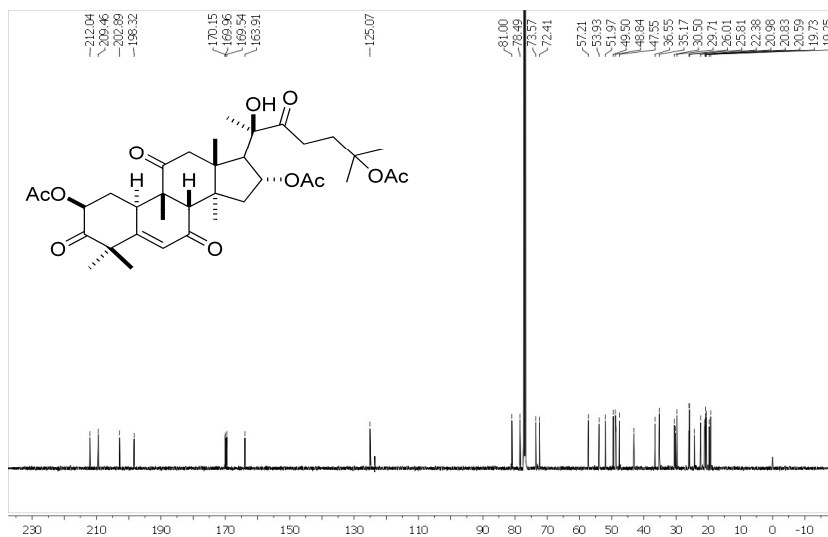
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-51.



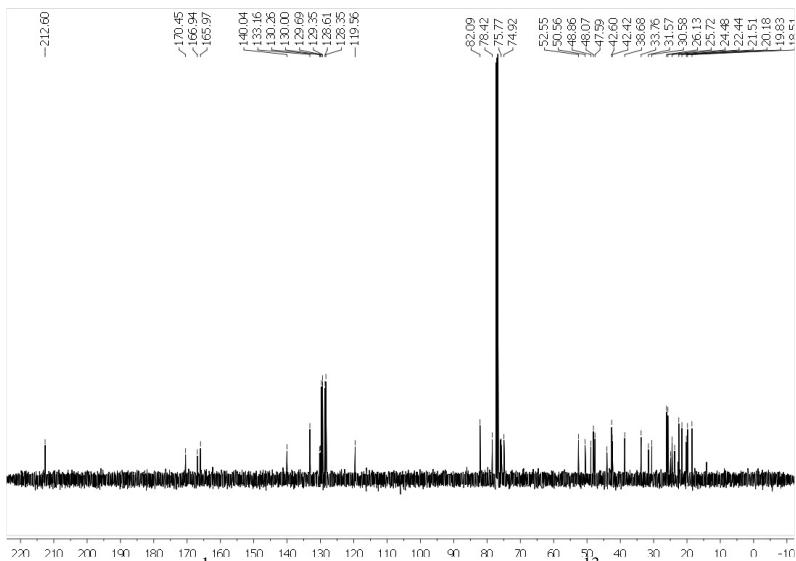
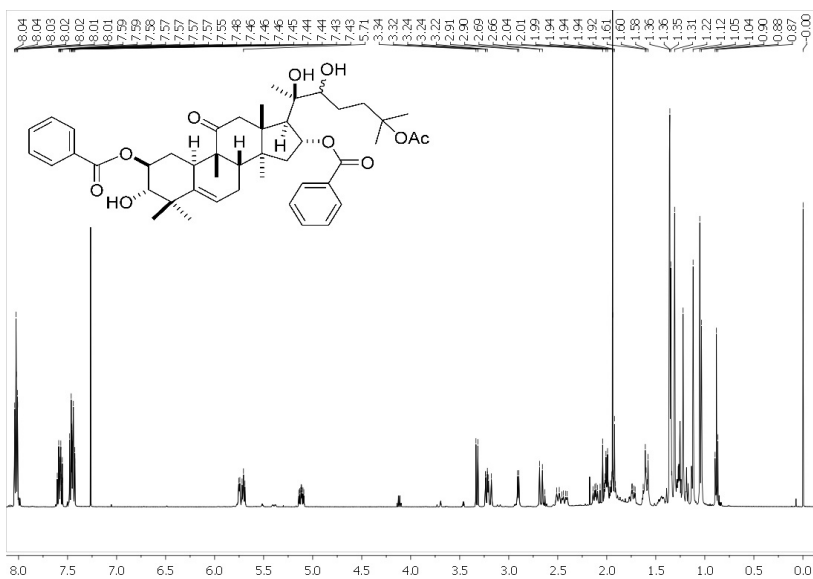
Espectros RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (125,8 MHz) do composto CS-52.



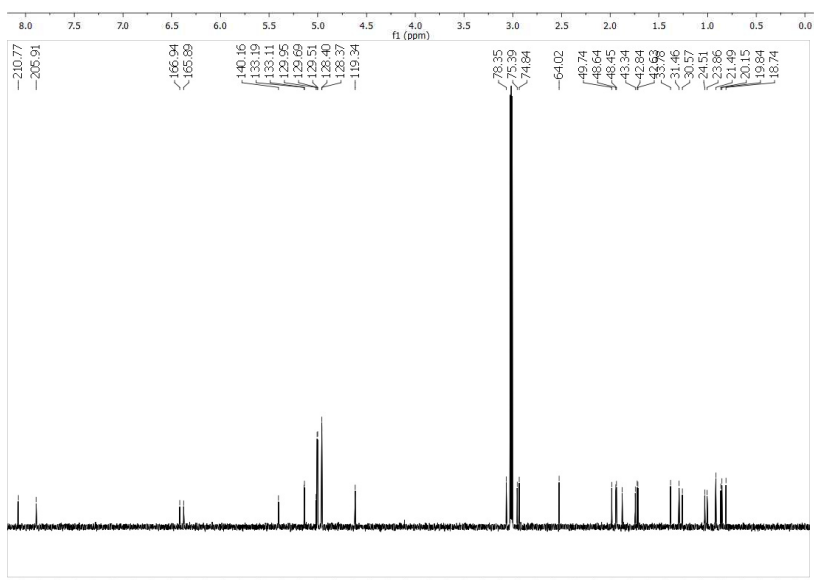
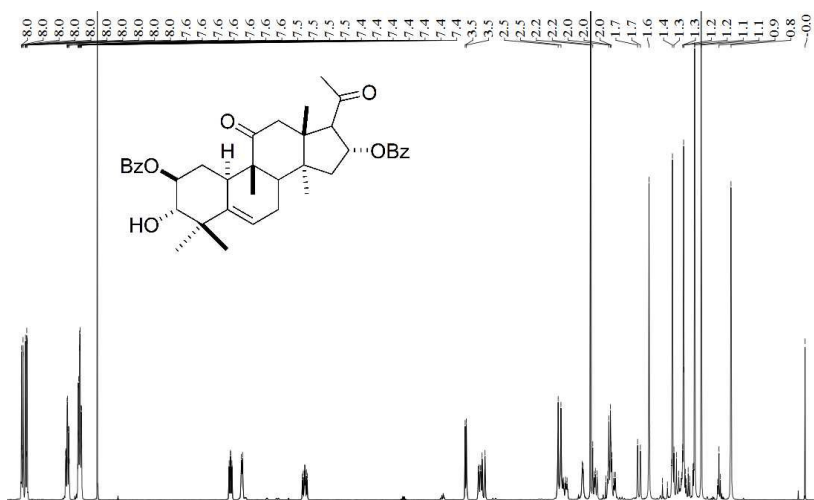
Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto **CS-54**.



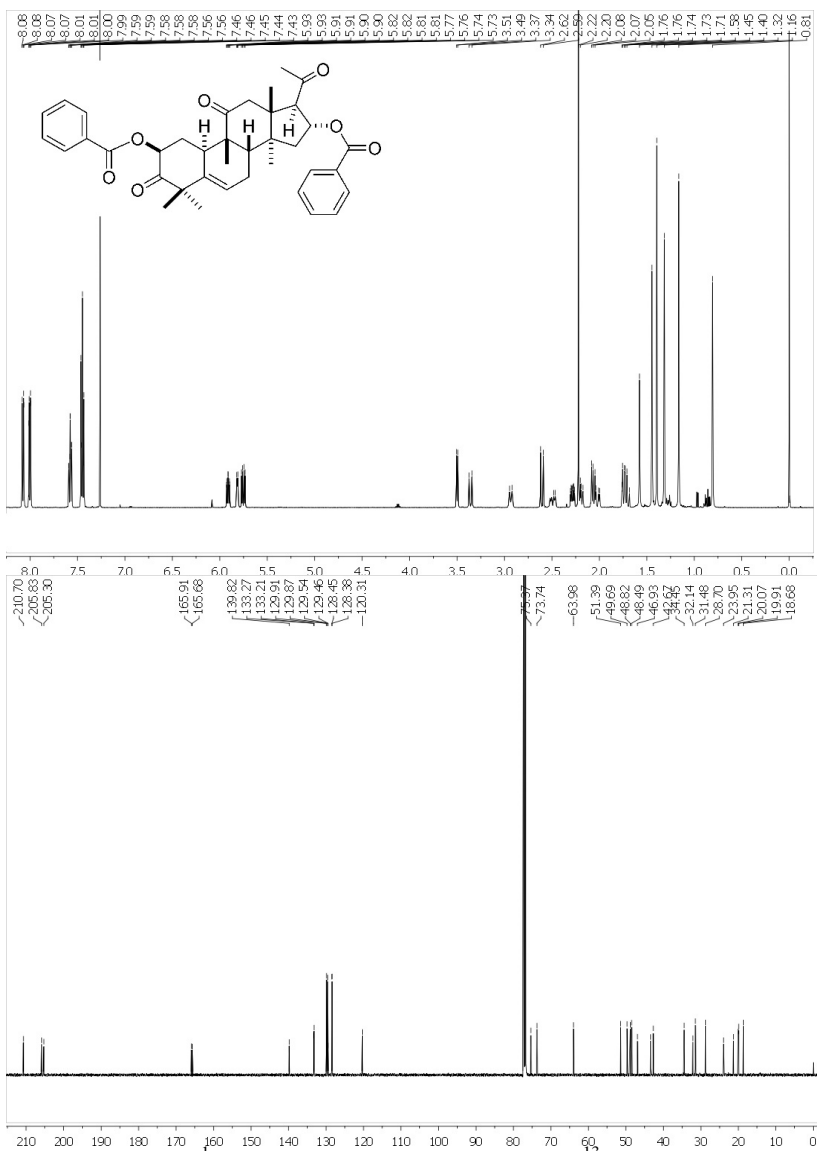
Espectro RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto **CS-55**.



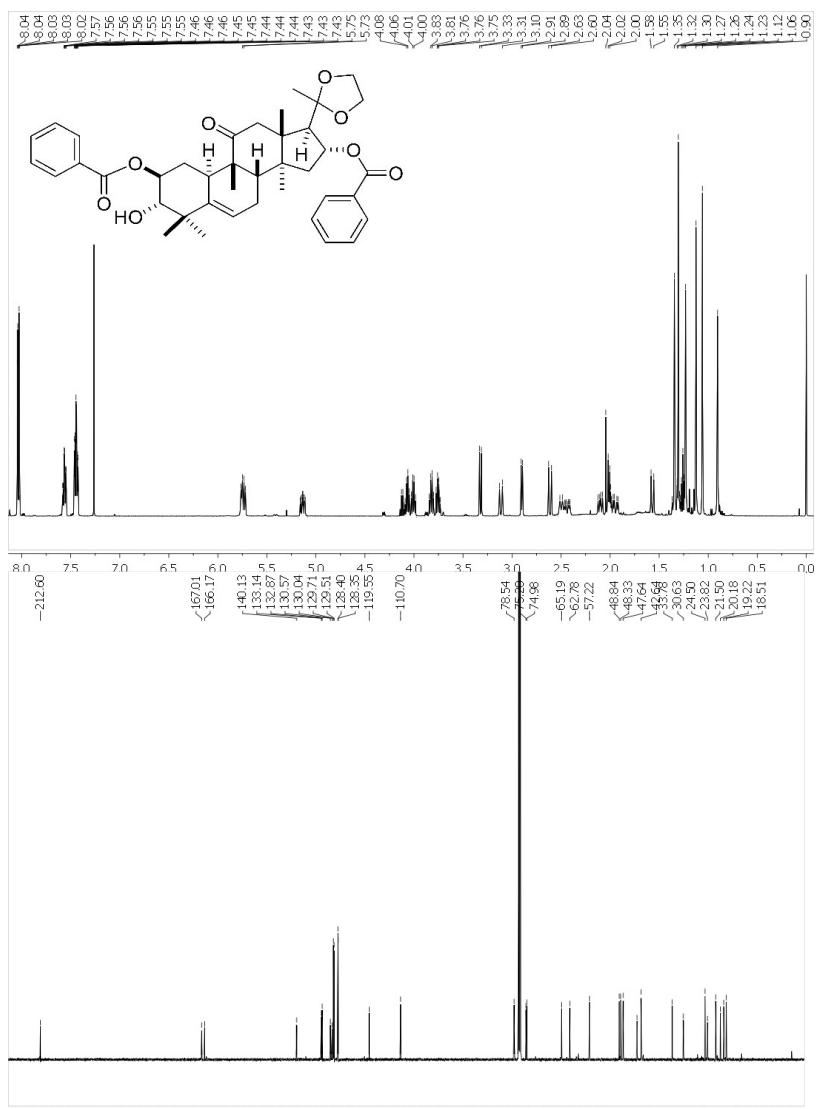
Espectros RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (125,8 MHz) do composto CS-57.



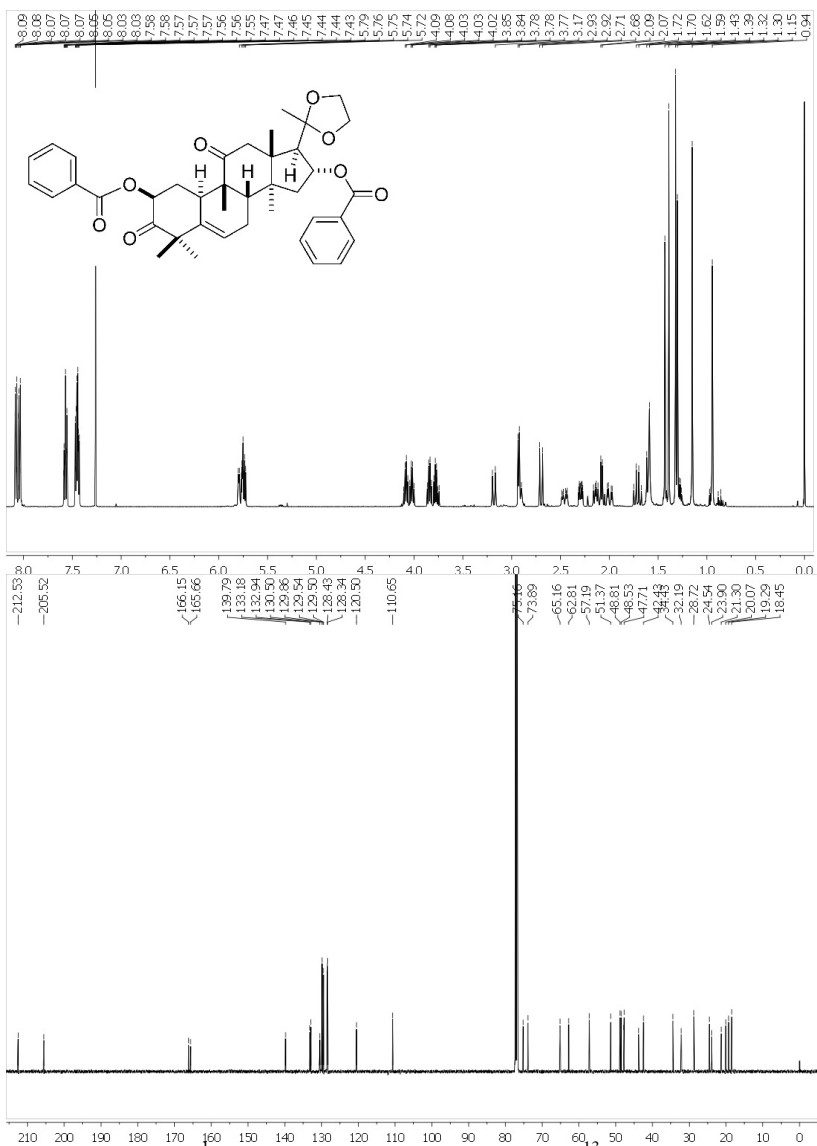
Espectros RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (125,8 MHz) do composto CS-58.



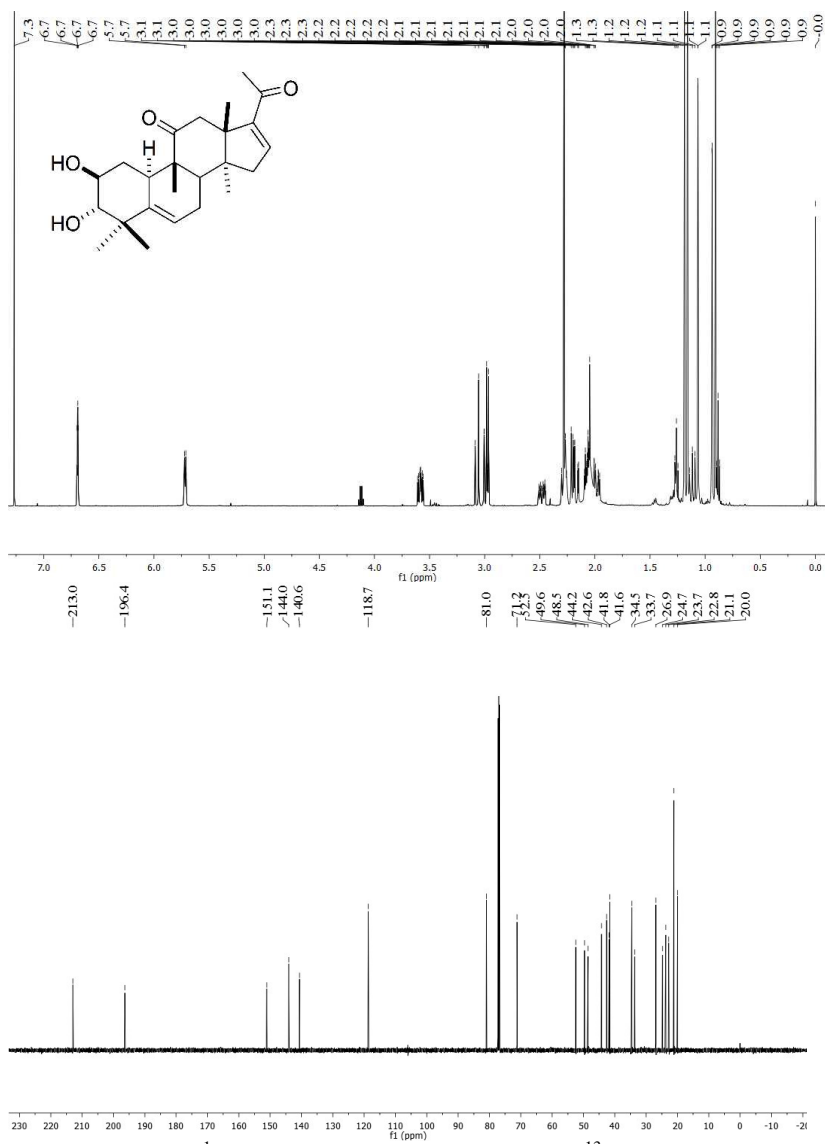
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-59.



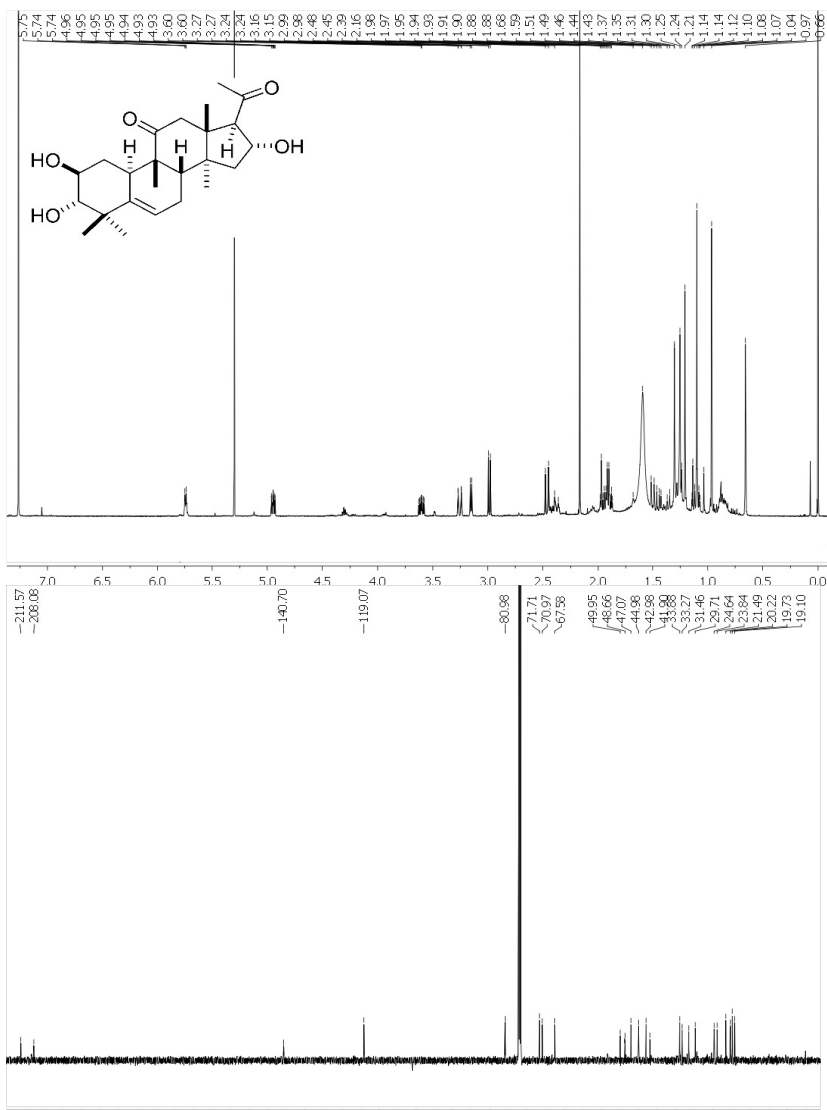
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-60.



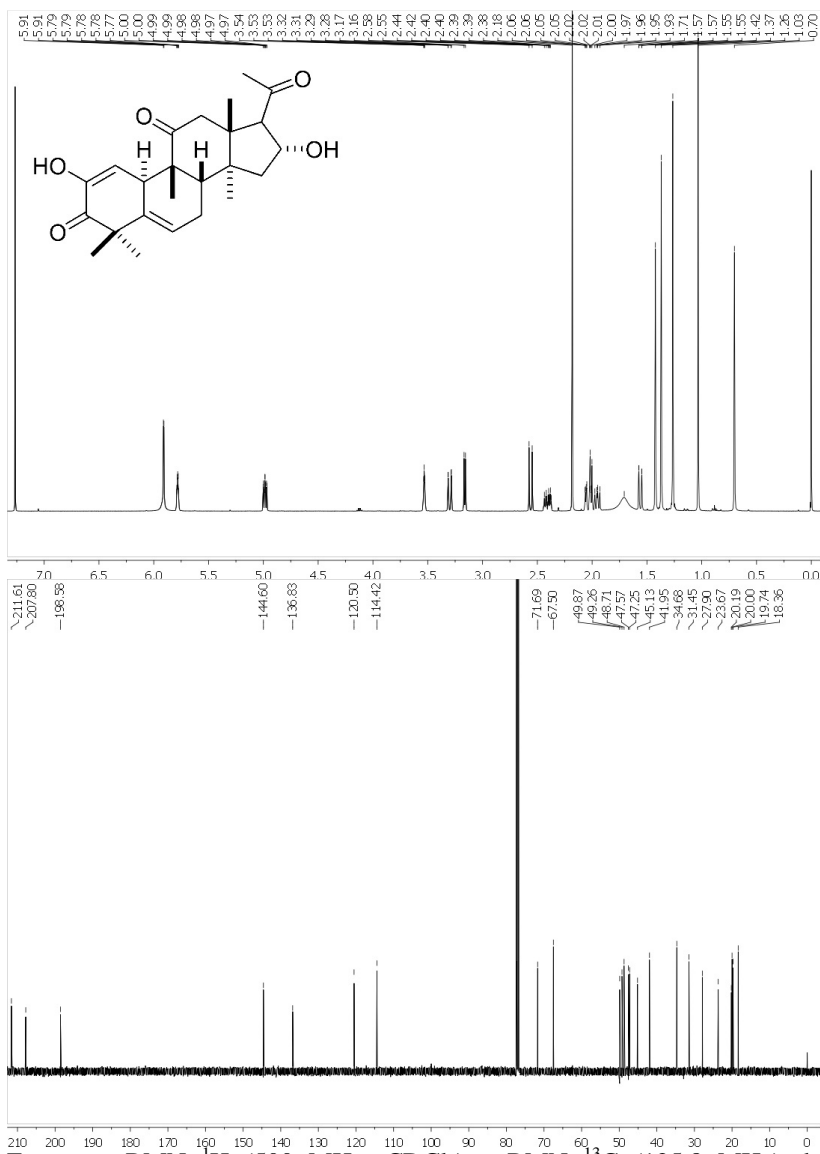
Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-61.



Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-62.

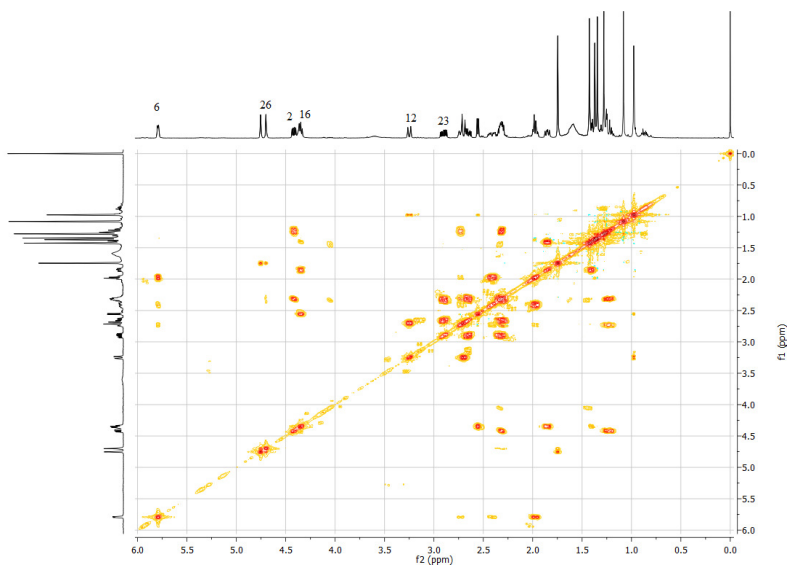


Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-63.

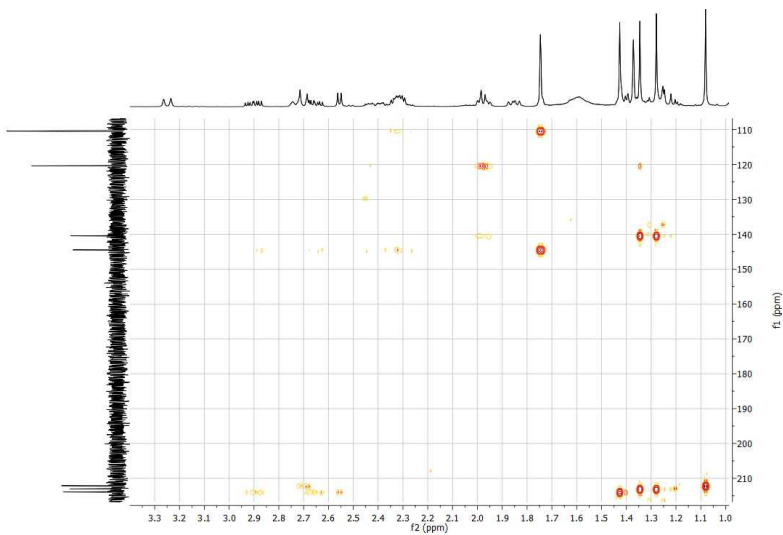


Espectros RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (125,8 MHz) do composto CS-64.

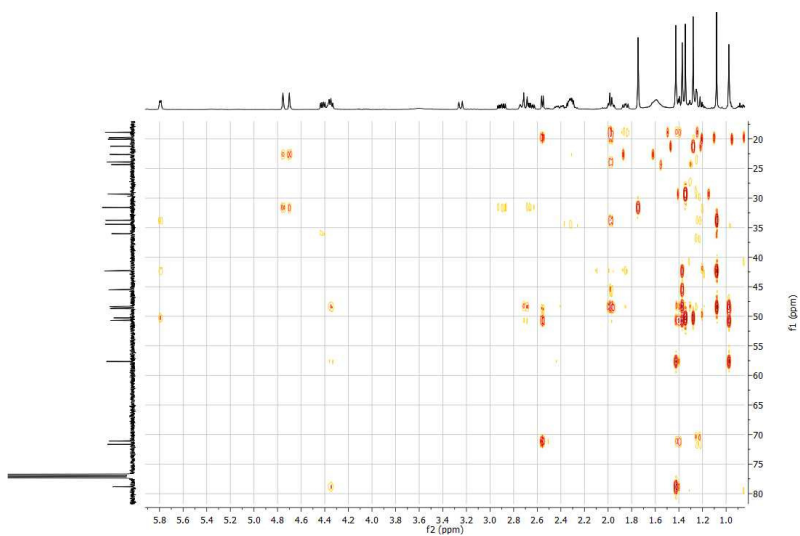
ANEXO 3- ESPECTROS BIDIMENSIONAIS



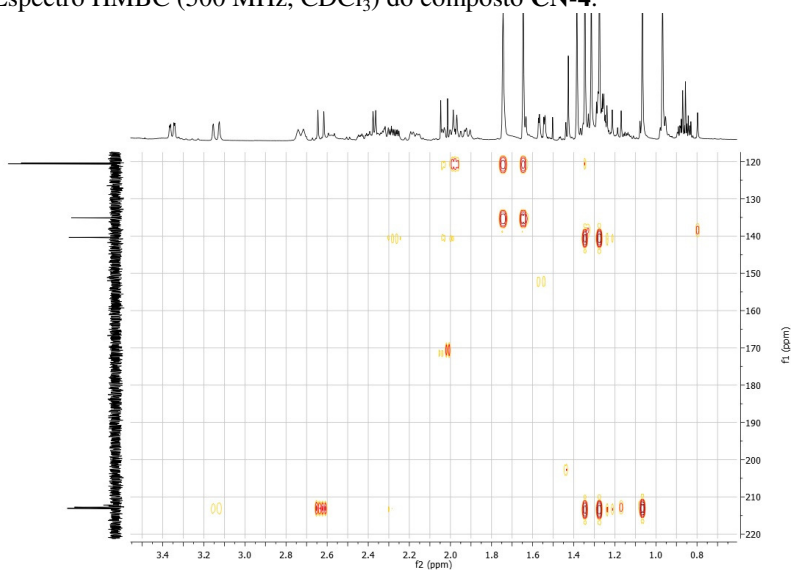
Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto **CN-4**.



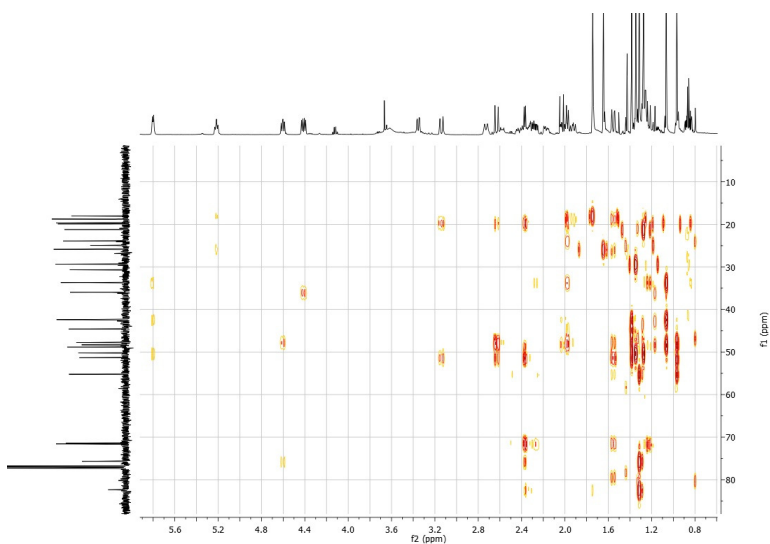
Espectro HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **CN-4**.



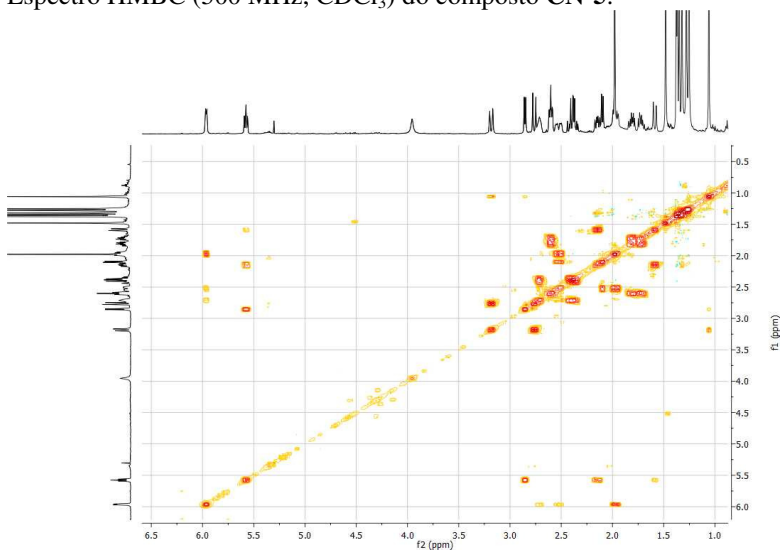
Espectro HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto CN-4.



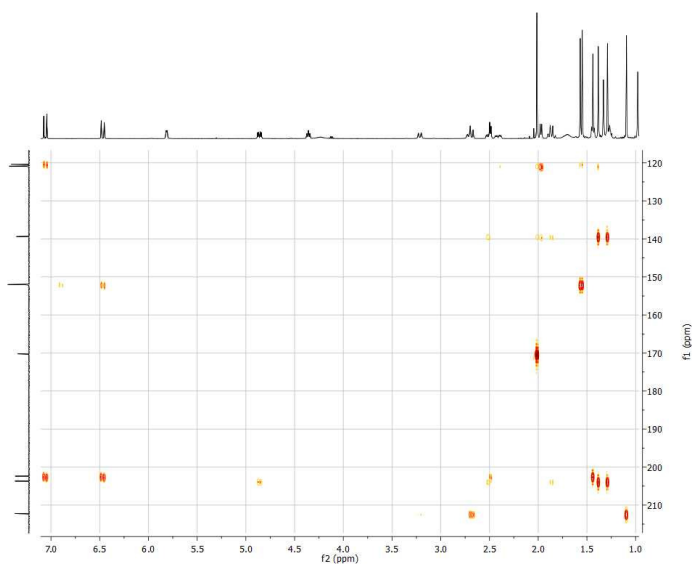
Espectro HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto CN-5.



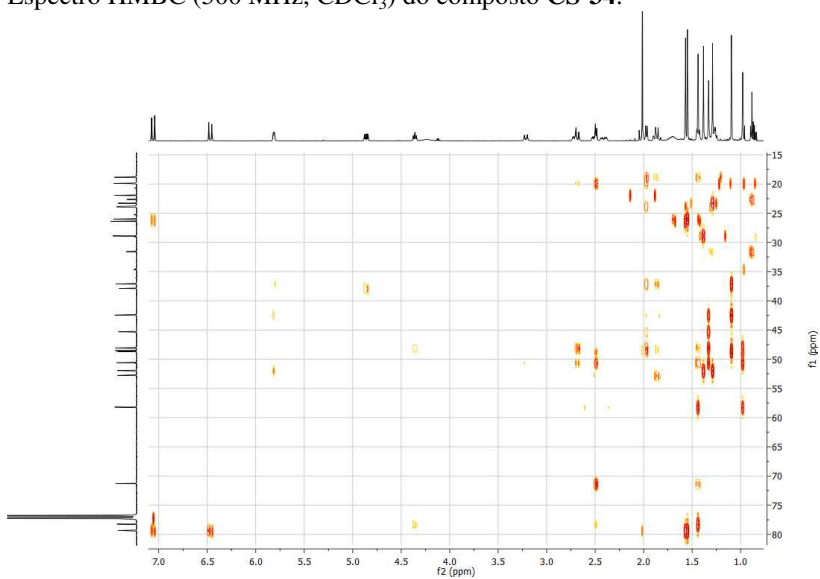
Espectro HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **CN-5**.



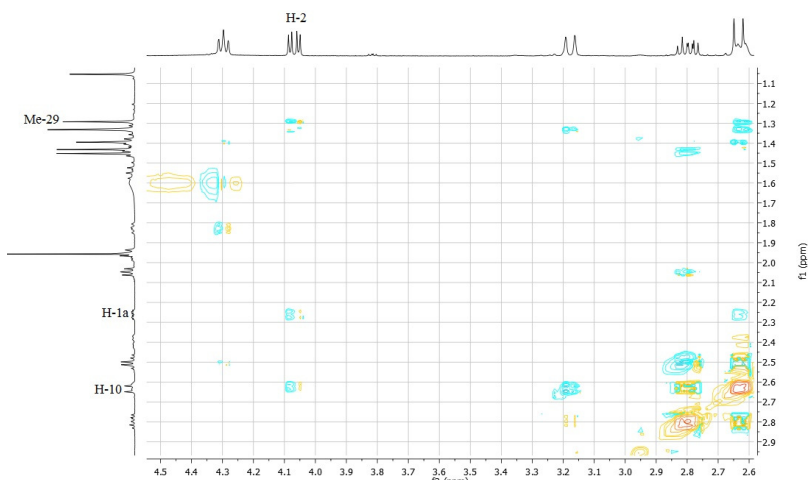
Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-28**.



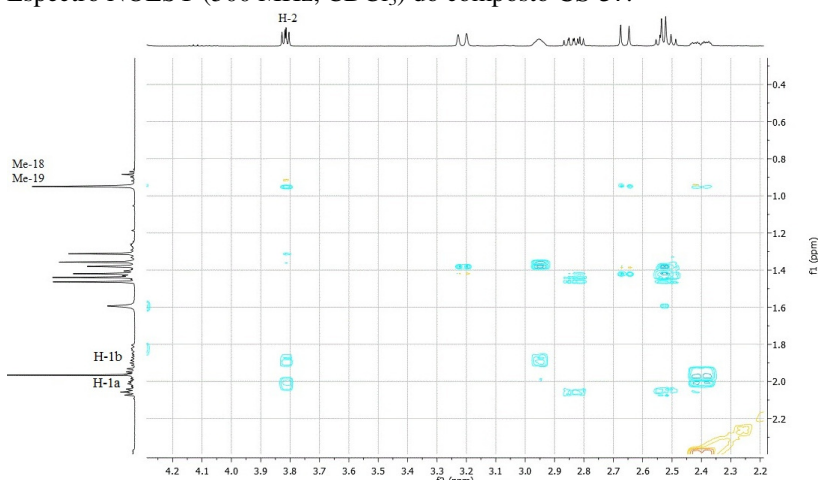
Espectro HMBC (500 MHz, CDCl₃) do composto CS-34.



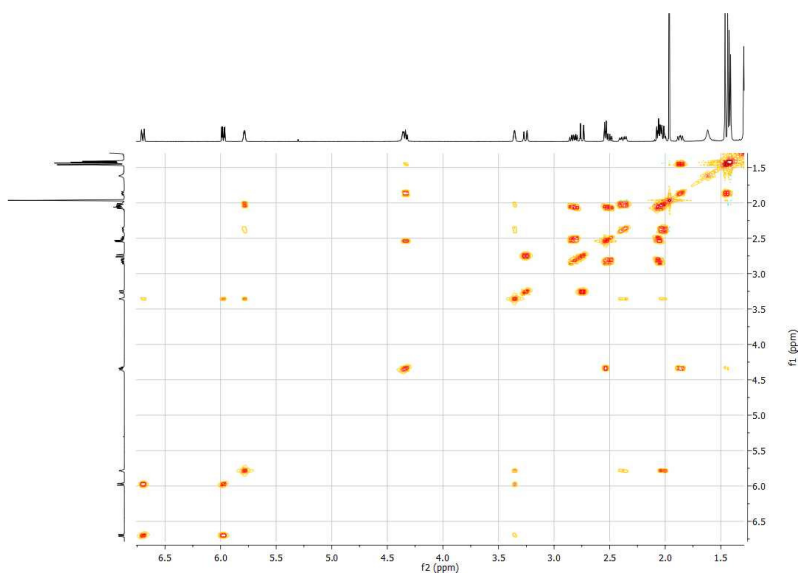
Espectro HMBC (500 MHz, CDCl₃) do composto CS-34.



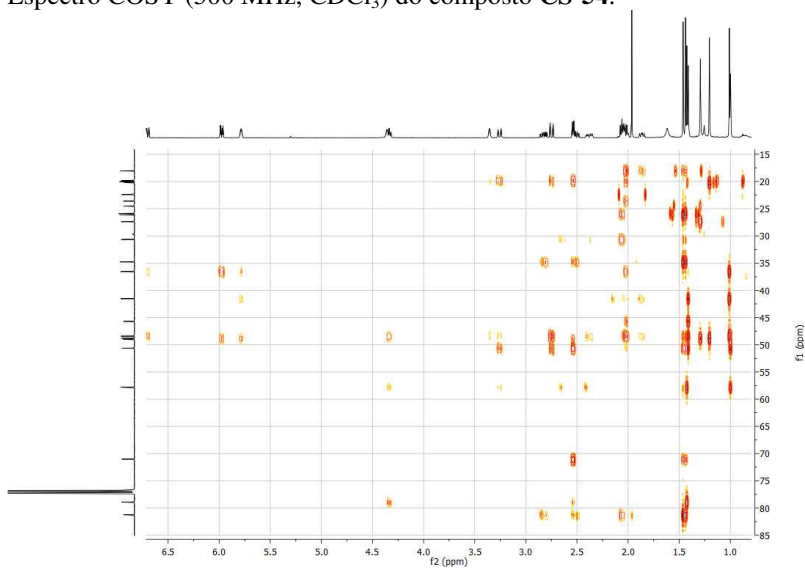
Espectro NOESY (500 MHz, CDCl₃) do composto CS-37.



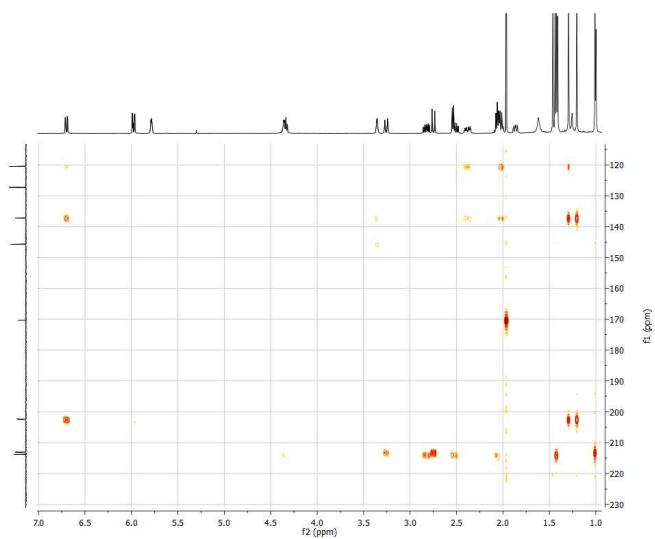
Espectro NOESY (500 MHz, CDCl₃) do composto CS-39.



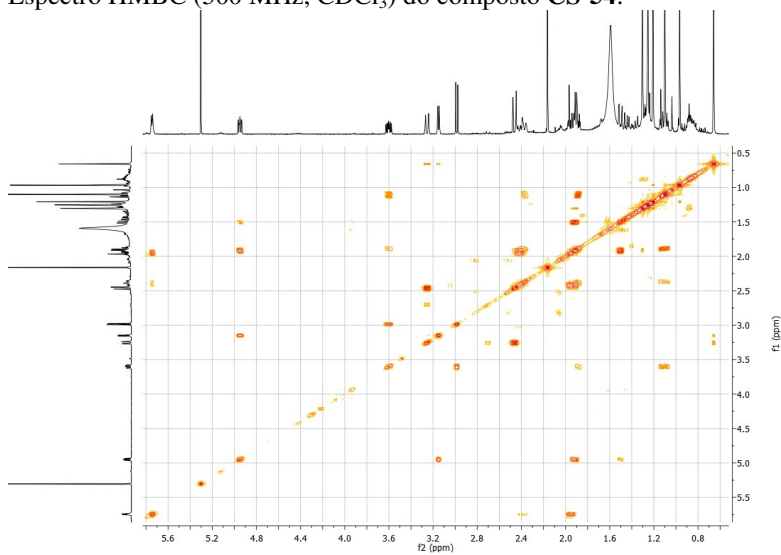
Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-54**.



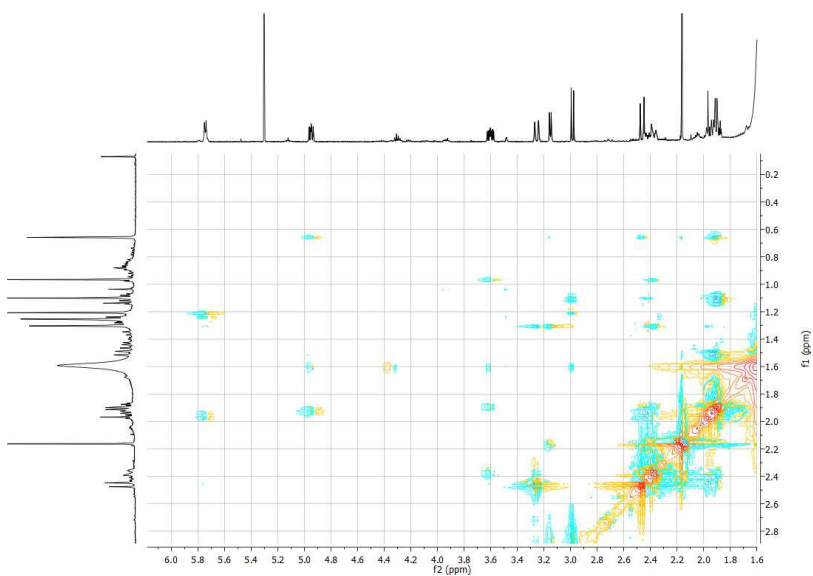
Espectro HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-54**.



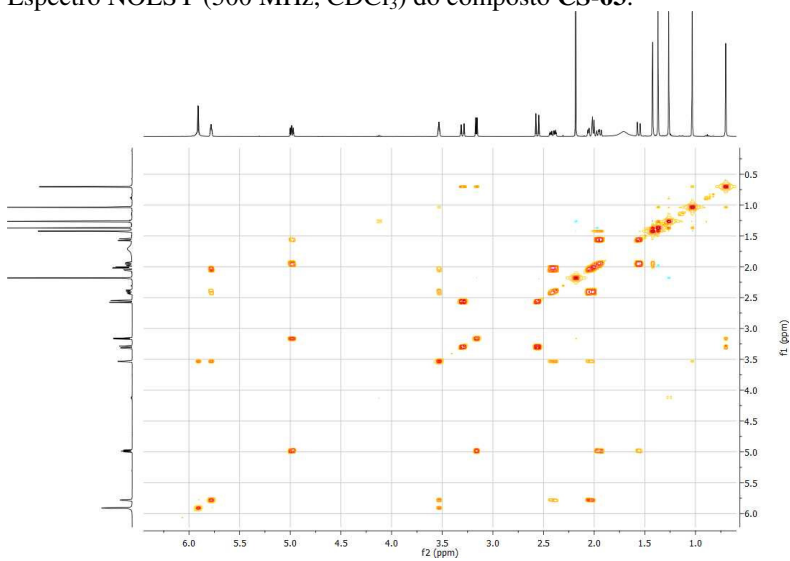
Espectro HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-54**.



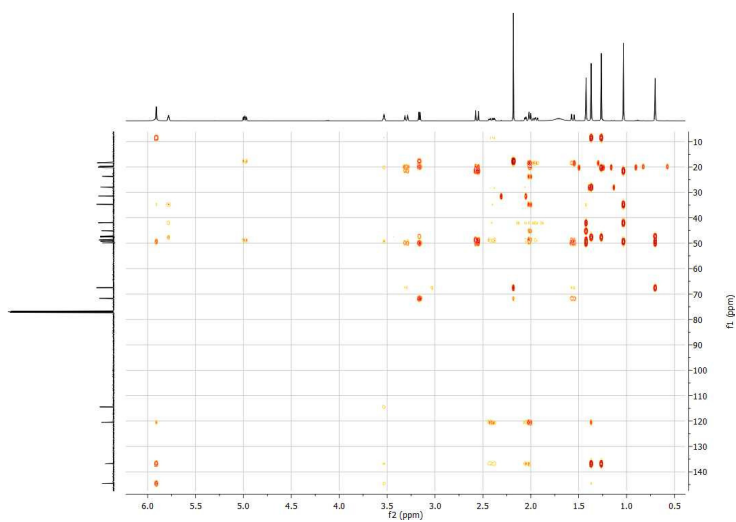
Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-63**.



Espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-63**.



Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-64**.



Espectro HMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **CS-64**.

**ANEXO 4-
TRABALHOS PUBLICADOS E
APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

ARTIGOS

LANG, K. L.; GUIMARÃES, T. R.; MACHADO, V. R.; ZIMMERMANN, L. A.; SILVA, I. T.; TEIXEIRA, M. R.; DURÁN, F. J.; SIMÕES, C. M. O.; CARO, M. S. B.; SCHENKEL, E. P. New cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Planta Medica*, v. 77, n. 14, p. 1648-1651, 2011.

LANG, K.L.; SILVA, I. T.; ZIMMERMANN, L. A.; MACHADO, V.; TEIXEIRA, M. R.; LAPUH, M. I.; GALETTI, M. A.; PALERMO, J. A.; CABRERA, G.; BERNARDES, L. S. C.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; CARO, M. S. B.; DURÁN, F. J. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 9, p. 3016-3030, 2012.

RESUMOS

1. SILVA, I. T.; TEIXEIRA, M. R.; LANG, K. L.; SCHENKEL, E. P.; CARO, M. S. B.; SIMOES, C. M. O. Cytotoxic screening of natural and synthetic cucurbitacin derivatives. In: 8a International Congress of Pharmaceutical Sciences - CIFARP, 2011, Ribeirão Preto. Resumos, 2011.

2. ZIMMERMANN, L. A.; LANG, K. L.; MACHADO, V. R.; DURAN, F. J.; PALERMO, J.; CARO, M. S. B.; SCHENKEL, E. P.. Novas cucurbitacinas a partir das raízes de *Wilbrandia ebracteata* Cong. In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa, PB. Anais do XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010.

3. MACHADO, V. R.; BERNARDES, L. S. C.; LANG, K. L.; CARO, M. S. B.; DURAN, F. J.; PALERMO, J.; SCHENKEL, E. P. Synthesis of glycosides derivatives of dihydrocucurbitacin B. In: The 5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2010, Ouro Preto, MG. Resumos, 2010.

4. LANG, K. L.; ZIMMERMANN, L. A.; MACHADO, V. R.; DURAN, F. J.; SHENKEL, E. P.; CARO, M. S. B. Semisynthetic analogues of dihydrocucurbitacin B. In: The 5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2010, Ouro Preto, MG. . Resumos, 2010.
5. LANG, K. L.; MACHADO, V. R.; DURAN, F. J.; CARO, M. S. B.; SCHENKEL, E. P. Síntese e caracterização de derivados da dihidrocucurbitacina B. In: 7o. Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2009, Maringá. Anais do 7o. Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2009.
6. MACHADO, V. R.; LANG, K. L.; CARO, M. S. B.; SCHENKEL, E. P. Isocucurbitacina R: uma nova cucurbitacina para a espécie *Wilbrandia ebracteata* Cogn.. In: 7o. Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2009, Maringá-PR. Anais do 7o. Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2009.
7. LANG, K. L.; MACHADO, V. R.; SCHENKEL, E. P.; PALERMO, J.; CARO, M. S. B.; DURAN, F. J. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE DIHIDROCUCURBITACINA B. In: Simpósio Argentino de Química Orgánica, 2009, Mendoza. Anais do Simpósio, 2009.
8. LANG, K. L.; SILVA, I. T.; MASCARELLO, A.; BARARDI, C.R.M.; SIMOES, C. M. O. EVALUATION OF ANTI-HSV-1 ACTIVITY OF PENTYL AND ISOPENTYL GALLATES. In: XX Encontro Nacional de Virologia, 2009, Brasilia. Anais do XX Encontro Nacional de Virologia, 2009.