

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

**ESTUDO QUÍMICO DAS RAÍZES E FOLHAS DE *Wilbrandia*
ebracteata COGN.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
ANDRESSA CÓRNEO GAZOLA

Florianópolis

2008

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

**ESTUDO QUÍMICO DAS RAÍZES E FOLHAS DE *Wilbrandia
ebracteata* COGN.**

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-graduação em Farmácia por
Andressa Córneo Gazola como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Farmácia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Florianópolis

2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Geraldo e Sestina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre foi uma base sólida nos momentos de angústia e preocupação, além de estar sempre presente nos momentos felizes.

Agradeço a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Eloir Schenkel, pela sua orientação, compreensão, incentivo e principalmente, pela sua contribuição em minha formação científica e humana;

Profa. Dra. Marení Rocha Farias, pela orientação e o carinho dados durante minha iniciação científica, além de despertar em mim o interesse nessa área;

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, pelo auxílio no trabalho, especialmente com o cromatógrafo líquido, além de sempre “sair” com ótimas sugestões;

À Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva e à aluna de mestrado Poliane Folador, pela realização dos experimentos para determinação da atividade anti-hiperglicêmica de extratos e substâncias isoladas de *Wilbrandia ebracteata*;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo carinho e atenção;

Ao Prof. Dr. Sérgio A. L. Bordignon pela identificação do material vegetal;

Aos meus pais, Geraldo e Sestina por todo esforço que fizeram para eu concluir a faculdade e o mestrado. Muito obrigada! Amo vocês!

Ao meu irmão e minha cunhada, Anderson e Erica, por todos os momentos de apoio e carinho. Amo vocês!

Ao meu namorado André, por todo carinho, cumplicidade, apoio, dedicação e paciência. Te amo!

Às técnicas do laboratório Solange e Claudinha que me ajudaram em vários apuros, além de compartilharem dos lanchinhos e das conversas. Agradeço muito pela amizade e dedicação;

À amiga Silvana, agradeço pela amizade e pela grande ajuda durante todo o mestrado, tanto no lado profissional quanto pessoal.

Aos amigos, Karen, Cíntia, Maria Isabel, Flora, Clara, Leopoldo, Samanta, Geison, Fernanda, Carize, Rodrigo e Caroline, por toda atenção dispensada, pelas brincadeiras, conversas e ajudas que tornaram muito mais fácil a realização deste trabalho. Muitos de vocês são amigos para a vida inteira.

Aos demais amigos de outros laboratórios em especial: Izabella, Débora, Thiago, Mônica, Rafael, Fábio, Amarílis, Jarbas além de outros, pela companhia, amizade e auxílio na realização do trabalho.

Às minhas amigas que dividiram ou dividem apartamento comigo, por todas as horas de descontração, em especial: Lia e Juliana que tornaram mais fácil minha adaptação em Florianópolis. Adoro todas!

*“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos
e o que estamos nos tornando,
mas sim a maneira com que respondemos ao desafio (...)
E, enquanto acreditamos no nosso sonho, nada é por acaso.”*

Henfil

RESUMO

Wilbrandia ebracteata pertence à família Cucurbitaceae e é popularmente conhecida no Brasil como taiuiá. Muitas outras espécies também são conhecidas com essa denominação, sendo que *Cayaponia tayuya* é a espécie que consta na Farmacopéia Brasileira I. No presente trabalho, as análises cromatográficas indicaram a presença de flavonóides C-glicosídeos nas raízes e folhas de *Wilbrandia ebracteata*, sendo que as cucurbitacinas foram observadas apenas nas raízes da espécie. Repetidos processos cromatográficos realizados com a fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata* possibilitaram o isolamento de uma mistura dos isômeros identificados como 16 α ,23 α -epoxi-2-O- β -glicopiranosil-3 β ,20 β -diidroxio-10 α ,23 β -cucurbit-5,24-dien-11-ona e 16 α ,23 α -epoxi-2-O- β -glicopiranosil-3 β ,20 β -diidroxio-10 α ,23 α -cucurbit-5,24-dien-11-ona, além do 2-O- β -glicopiranosídeo da diidrocucurbitacina B. Da fração butanólica também das raízes foram isoladas e identificadas através de comparação com amostras autênticas as C-glicosilflavonas spinosina e isovitexina, enquanto que para swertisina e um O-glicosídeo da isoswertisina, denominado BRIV, foram necessários métodos espectroscópicos. Já para as folhas de *Wilbrandia ebracteata* foram isolados da fração butanólica os flavonóides C-glicosídeos spinosina e o composto BRIV, identificados por comparação com amostras autênticas, enquanto para a fração insolúvel em água foi isolada uma 4',5-diidroxio-7-metoxi-flavona, cuja estrutura não foi elucidada totalmente. Cromatograficamente, as frações butanólicas obtidas das raízes e das folhas de *Wilbrandia ebracteata* são compostas principalmente de flavonóides C-glicosídeos, sendo identificados em ambas as frações os compostos: vitexina, orientina, isovitexina, swertisina, isorientina, spinosina e a substância BRIV.

Palavras chave: *Wilbrandia ebracteata*, cucurbitacinas, flavonóides C-glicosídeos

ABSTRACT

Wilbrandia ebracteata belongs to the Cucurbitaceae family and is popularly known in Brazil as taiuiá. Many other species are also known by this denomination in the popular medicine, but *Cayaponia tayuya* is the only specie included in the Brazilian Pharmacopoeia I (1926). In the present work, the composition of roots and aerial parts are compared considering the flavonoids C-glycosides and cucurbitacin profiles. The chromatographic analyses indicated the presence of flavonoids C-glycosides in the roots and leaves of *Wilbrandia ebracteata*, while the cucurbitacins were observed only in the roots of the specie. Repeated chromatographic processes with the dichloromethane fraction of the roots allowed the isolation of the 2-O- β -glycopyranoside of the dihydrocucurbitacin B and of a mixture of the isomers 16 α ,23 α -epoxy-2-O- β -glycopyranosyl-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α ,23 β -cucurbit-5,24-dien-11-one and 16 α ,23 α -epoxy-2-O- β -glycopyranosyl-3 β ,20 β -dihydroxy-10 α ,23 α -cucurbit-5,24-dien-11-one. The presence of the C-glycosylflavones spinosin, isovitexin, swertisin and a O-glycoside of isoswertisin (named BRIV) were identified in the butanolic fraction of the roots by chromatographic comparison with authentic samples and spectroscopic methods. For the leaves of *Wilbrandia ebracteata* the flavonoids C-glycosides spinosin and the substance BRIV were isolated from the butanolic fraction, while for the insoluble fraction in water was isolated 4',5-dihydroxy-7-methoxy-flavon, whose the structure was not totally elucidated. Chromatographically, the butanolic fractions from the roots and leaves of *Wilbrandia ebracteata* are composed mainly of flavonoids C-glycosides. Were identified in both fractions the substances: vitexin, orientin, isovitexin, swertisin, isoorientin, spinosin and the substance BRIV.

Keywords: *Wilbrandia ebracteata*, cucurbitacins, flavonoids C-glycosides

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	<i>Wilbrandia ebracteata</i> Cogn.	20
2.1.1	Classificação botânica	20
2.1.2	Constituintes químicos descritos para <i>Wilbrandia ebracteata</i>	21
2.1.2.1	Cucurbitacinas descritas para <i>Wilbrandia ebracteata</i>	21
2.1.2.2	Flavonóides descritos para <i>Wilbrandia ebracteata</i>	24
2.1.3	Propriedades farmacológicas descritas para <i>Wilbrandia ebracteata</i>	26
2.2	<i>Cayaponia tayuya</i> (Vell.) Cogn.	29
2.2.1	Classificação botânica	29
2.2.2	Constituintes químicos descritos para <i>Cayaponia tayuya</i>	30
2.2.3	Propriedades farmacológicas descritas para <i>Cayaponia tayuya</i>	34
2.3	Cucurbitacinas	35
2.3.1	Atividades farmacológicas descritas para cucurbitacinas	36
2.4	Flavonóides C-glicosídeos	37
2.4.1	Atividades farmacológicas descritas para flavonóides C-glicosídeos	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Procedimentos gerais	42
4.1.1	Acetilação de substâncias isoladas	43
4.1.2	Hidrólise ácida de substâncias isoladas	43
4.2	Material Vegetal	44
4.3	Obtenção dos Extratos e Frações das Raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	44
4.3.1	Obtenção dos extratos a partir das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	44
4.3.2	Obtenção das frações a partir das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	45
4.4	Análise química da fração diclorometano das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	47
4.4.1	Isolamento das substâncias DRI e DRII a partir da fração diclorometano das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	47
4.5	Análise química da fração butanólica das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	50
4.5.1	Isolamento das substâncias BRI, BRII, BRIII e BRIV a partir da fração butanólica das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	50
4.5.2	Análise cromatográfica de compostos da fração butanólica das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	51

4.6	Obtenção do extrato e das frações das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	52
4.6.1	Obtenção do extrato a partir das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	52
4.6.2	Obtenção das frações a partir das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	52
4.7	Análise química da fração butanólica das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	54
4.7.1	Isolamento das substâncias BFI e BFII a partir da fração butanólica das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	54
4.7.2	Análise cromatográfica de compostos da fração butanólica das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	55
4.8	Análise química da fração insolúvel das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	56
4.8.1	Isolamento da substância IFI a partir da fração insolúvel em água das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	56
4.9	Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas	57
4.10	Análise cromatográfica comparativa entre as frações butanólicas das raízes e das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	Análise química das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	59
5.1.1	Análise química da fração diclorometano das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	59
5.1.1.1	Isolamento das substâncias DRI e DRII a partir da fração diclorometano das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	59
5.1.1.2	Identificação e elucidação estrutural das substâncias DRI e DRII a partir da fração diclorometano das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	60
5.1.1.2.1	Identificação e elucidação estrutural de DRI	60
5.1.1.2.2	Identificação e elucidação estrutural de DRII	77
5.1.2	Análise da presença das substâncias DRI e DRII na fração diclorometano das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i> do material adquirido da indústria Lohman	90
5.1.3	Análise química da fração butanólica das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	91
5.1.3.1	Isolamento das substâncias BRI, BRII, BRIII e BRIV a partir da fração butanólica das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	92
5.1.3.2	Identificação e elucidação estrutural das substâncias BRI, BRII, BRIII e BRIV isoladas a partir da fração butanólica das raízes de <i>W. ebracteata</i>	93
5.1.3.2.1	Identificação de BRI	93
5.1.3.2.2	Identificação de BRII	95
5.1.3.2.3	Identificação de BRIII	98
5.1.3.2.4	Elucidação estrutural de BRIV	101
5.1.4	Análise cromatográfica de compostos da fração butanólica das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	112
5.2	Estudo químico das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	115
5.2.1	Análise química da fração butanólica das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	115
5.2.1.1	Isolamento das substâncias BFI e BFII a partir da fração butanólica das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	115
5.2.1.2	Identificação das substâncias BFI e BFII isoladas a partir da fração butanólica das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	116
5.2.1.2.1	Identificação de BFI	116
5.2.1.2.2	Identificação de BFII	118
5.2.1.3	Análise cromatográfica de compostos da fração butanólica das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	120
5.2.2	Análise química da fração insolúvel em água das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	123
5.2.2.1	Isolamento da substância IFI da fração insolúvel em água das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	123
5.2.2.2	Elucidação estrutural da substância IFI isolada da fração insolúvel das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	123

5.2.2.2.1	Elucidação estrutural de IFI	123
5.3	Análise cromatográfica comparativa entre as frações butanólicas das raízes e das folhas de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	129
6	CONCLUSÕES	130
7	REFERÊNCIAS	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar da espécie <i>Wilbrandia ebracteata</i> Cogn.	20
Figura 2: Partes aéreas e raiz de <i>Cayaponia tayuya</i> (Vell.) Cogn.	29
Figura 3: Estrutura geral das cucurbitacinas, núcleo cucurbitano	36
Figura 4: Obtenção dos extratos das raízes de <i>W. ebracteata</i> e das frações após o fracionamento do extrato metanólico	46
Figura 5: Esquema representativo da CCD realizada pela Prof ^a . Dr ^a . Marení Rocha Farias	47
Figura 6: Isolamento das substâncias DRI e DRII a partir da fração diclorometano das raízes de <i>W. ebracteata</i>	49
Figura 7: Isolamento das substâncias BRI, BRII, BRIII e BRIV a partir da fração butanólica das raízes de <i>W. ebracteata</i>	51
Figura 8: Obtenção do extrato e das frações a partir das folhas de <i>W. ebracteata</i> .	53
Figura 9: Isolamento das substâncias BFI e BFII a partir da fração butanólica das folhas de <i>W. ebracteata</i>	55
Figura 10: Isolamento da substância IFI a partir da fração insolúvel das folhas de <i>W. ebracteata</i>	57
Figura 11: Espectro IV da substância DRI	61
Figura 12: Espectro ¹ H-RMN da substância DRI em CDCl ₃	67
Figura 13: Espectro COSY da substância DRI em CDCl ₃	68
Figura 14: Espectro ¹ H-RMN da substância DRI acetilada em CDCl ₃	71
Figura 15: Espectro ¹ H-RMN ampliado da substância DRI acetilada em CDCl ₃	72
Figura 16: Espectro ¹ H-RMN ampliado da substância DRI acetilada em CDCl ₃	73
Figura 17: Espectro ¹ H-RMN ampliado da substância DRI acetilada em CDCl ₃	74
Figura 18: Espectro COSY ampliado da substância DRI acetilada em CDCl ₃	75
Figura 19: Fórmulas estruturais das substâncias denominadas DRI	76
Figura 20: Espectro IV da substância DRII	78
Figura 21: Espectro ¹³ C-RMN da substância DRII em CDCl ₃	83
Figura 22: Espectro ¹ H-RMN da substância DRII em CDCl ₃	84
Figura 23: Espectro ¹ H-RMN ampliado da substância DRII em CDCl ₃	85
Figura 24: Espectro COSY da substância DRII em CDCl ₃	86
Figura 25: Espectro COSY ampliado da substância DRII em CDCl ₃	87

Figura 26: Espectro HSQC da substância DRII em CDCl_3	88
Figura 27: Espectro HSQC ampliado da substância DRII em CDCl_3	89
Figura 28: Fórmula estrutural da 2-O- β -glicopiranosídeo da diidrocucurbitacina B .	90
Figura 29: Cromatografia em camada delgada apresentando o perfil cromatográfico da fração diclorometano das raízes de <i>W. ebracteata</i> adquiridas na indústria Lohmman e das substâncias DRI e DRII	91
Figura 30: Cromatografia em camada delgada apresentando o perfil cromatográfico das frações butanólicas das raízes de <i>W. ebracteata</i> realizadas por Farias (1991) e com o material vegetal adquirido na indústria Lohmman	92
Figura 31: Fórmula estrutural do núcleo genkwanina	94
Figura 32: Co-cromatografia em camada delgada realizada com a substância BRI e spinosina	95
Figura 33: Fórmula estrutural da spinosina	95
Figura 34: Fórmula estrutural do núcleo apigenina	96
Figura 35: Co-cromatografias entre BRII e isovitexina	97
Figura 36: Fórmula estrutural da isovitexina	97
Figura 37: Espectro ^1H -RMN da substância BRIII em CD_3OD	100
Figura 38: Fórmula estrutural da swertisina	101
Figura 39: Espectro ^1H -RMN da substância BRIV acetilada em CDCl_3	105
Figura 40: Espectro ^1H -RMN ampliada da substância BRIV acetilada em CDCl_3 .	106
Figura 41: Espectro ^1H -RMN ampliado da substância BRIV acetilada em CDCl_3 .	107
Figura 42: Espectro ^1H -RMN ampliado da substância BRIV acetilada em CDCl_3 .	108
Figura 43: Espectro COSY da substância BRIV acetilada em CDCl_3	109
Figura 44: Espectro COSY ampliado da substância BRIV acetilada em CDCl_3	110
Figura 45: Espectro HSQC da substância BRIV acetilada em CDCl_3	111
Figura 46: CCD comparativa entre a fração butanólica das raízes de <i>W. ebracteata</i> e padrões de flavonóides C-glicosídeos	113
Figura 47: CLAE comparativo entre a fração butanólica das raízes de <i>W. ebracteata</i> e padrões de flavonóides C-glicosídeos	114
Figura 48: Co-cromatografia realizada com BFI e spinosina	117
Figura 49: Co-cromatografia entre BFII e a substância BRIV isolada a partir da fração butanólica das raízes de <i>W. ebracteata</i> neste trabalho	119
Figura 50: CCD comparativa entre a fração butanólica das folhas de <i>W. ebracteata</i> e padrões de flavonóides C-glicosídeos	121

Figura 51: CLAE comparativo entre a fração butanólica das folhas de <i>W. ebracteata</i> e padrões de flavonóides C-glicosídeos	122
Figura 52: Espectro ¹ H-RMN da substância IFI em CD ₃ OD	126
Figura 53: Espectro ¹ H-RMN ampliado da substância IFI em CD ₃ OD	127
Figura 54: Espectro COSY da substância IFI em CD ₃ OD	128
Figura 55: CCD comparativa entre as frações butanólicas das raízes e das folhas de <i>W. ebracteata</i>	129
Figura 56: CLAE comparativo entre as frações butanólicas das raízes e das folhas de <i>W. ebracteata</i>	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies conhecidas popularmente como Taiuiá segundo a literatura ...	19
Tabela 2: Estruturas e nomenclatura dos compostos descritos por Schenkel e colaboradores (1992)	22
Tabela 3: Estruturas dos compostos descritos por Farias e colaboradores (1993) .	23
Tabela 4: Estruturas dos compostos descritos por Santos; Santos; Schenkel (1996)	24
Tabela 5: Estruturas dos flavonóides descritos por Coelho (2004)	25
Tabela 6: Substâncias descritas por Bauer e colaboradores (1983; 1985)	31
Tabela 7: Glicosídeos de nor-cucurbitacinas com anel A aromático descritas por Himeno e colaboradores (1992; 1993; 1994a; 1994b; 1994c)	33
Tabela 8: Glicosídeos de nor-cucurbitacinas não aromáticos descritos por Himeno e colaboradores (1992, 1993, 1994a; 1994b; 1994c)	34
Tabela 9: Massas e rendimentos dos extratos obtidos das raízes de <i>W. ebracteata</i>	45
Tabela 10: Massas e rendimentos das frações obtidas a partir do extrato MeOH das raízes de <i>W. ebracteata</i>	45
Tabela 11: Massa e rendimento do extrato bruto das folhas de <i>W. ebracteata</i>	52
Tabela 12: Massas e rendimentos das frações obtidas das folhas de <i>W. ebracteata</i>	53
Tabela 13: Comparação dos dados espectrais de ¹ H-RMN da substância DRI com a substância W-6 descritas por Farias (1991)	63
Tabela 14: Comparação dos dados espectrais de ¹ H-RMN da substância DRI com a substância W-7 descritas por Farias (1991)	65
Tabela 15: Comparação entre os sinais de hidrogênio do açúcar para matesaponina 2 peracetilada (GOSMANN et al., 1995) e DRI acetilada	69
Tabela 16: Comparação dos dados espectrais de ¹³ C-RMN da substância DRII com diidroisocucurbitacina B descrita por Farias (1991)	80
Tabela 17: Comparação dos dados espectrais de ¹ H-RMN da substância DRII com diidroisocucurbitacina B descrita por Farias (1991)	81
Tabela 18: Dados espectrais de ¹ H-RMN e ¹³ C-RMN para DRII	82

Tabela 19: Massas e rendimento dos quatro flavonóides C-glicosídeos isolados a partir da fração butanólica das raízes de <i>W. ebracteata</i>	93
Tabela 20: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BRI	94
Tabela 21: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BRII	96
Tabela 22: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BRIII	98
Tabela 23: Valores de ¹ H-RMN obtidos para BRIII confrontados com a literatura ...	99
Tabela 24: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BRIV	102
Tabela 25: Dados espectrais de RMN para a região dos açúcares de BRIV	104
Tabela 26: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BFI	116
Tabela 27: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BFII	118
Tabela 28: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância IFI	124

LISTA DE ABREVIATURAS

- NP: reagente natural A (1%)
- PEG: solução alcoólica de polietilenoglicol-4000 (5%)
- CCD: cromatografia em camada delgada
- CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
- UV: ultravioleta
- IV: infravermelho
- ^1H -RMN: ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- ^{13}C -RMN: ressonância magnética nuclear de carbono 13
- COSY: correlated spectroscopy
- HMBC: heteronuclear multiple bond correlation
- i.p.: administração intra-peritonial
- v.o.: administração via oral
- COX: enzima ciclooxigenase
- HSV-1: vírus herpético simples tipo 1

1 INTRODUÇÃO

Na medicina popular, o nome taiuiá tem sido utilizado para designar algumas espécies de trepadeiras da família Cucurbitaceae Juss, que apresentam raízes de amargor característico. O uso de plantas com essa denominação remonta à medicina indígena, sendo provável que o vocábulo “*Tay-Ubá*” do tupi tenha originado o termo “*tayuya*” ou “*taiuiá*”. Peckolt (1937) menciona que o nome indígena se refere ao fruto, já que *tay* significa pimenta e *ubá* corresponde a fruto, ou seja, “fruto de pimenta”.

Publicações dos séculos XIX e XX sobre plantas medicinais citam como taiuiá várias espécies dos gêneros *Cayaponia*, *Trianosperma*, *Dermophylla*, *Druparia*, *Bryonia*, *Melothria*, *Momordica*, *Apodanthera* e *Wilbrandia* (MARTIUS, 1854; MOREIRA, 1862; D’ÁVILA, 1910; HOEHNE, 1920; 1939; PIO CORRÊA, 1926-1978; PECKOLT, 1937; ORTH, 1937; LIMA, 1941). Entre as décadas de 30 e 80 do século passado, as publicações a respeito do emprego de taiuiá tornaram-se raras, entretanto, materiais vegetais com essa denominação eram e ainda são comercializados. Esses produtos, quando registrados como medicamentos, portam, de modo geral, a declaração de conteúdo como sendo *Cayaponia tayuya*, espécie esta declarada como taiuiá na Farmacopéia Brasileira I (1926). Porém, estudos cromatográficos comparando a composição química de alguns produtos comercializados mostraram diferentes composições em relação ao perfil de cucurbitacinas e de flavonóides (Farias et al., 1986). Isso levou ao aprofundamento da investigação quanto à efetiva identidade das espécies vegetais utilizadas industrialmente sob o nome *Cayaponia tayuya*. Com esse objetivo, ainda na década e 80, foram coletadas espécies de Cucurbitáceas popularmente designadas como taiuiá na região sul do Brasil, bem como foram realizadas consultas* aos responsáveis pelos herbários do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco e Ceará acerca da existência de registros de coletas de *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn, no intuito de obter material vegetal autêntico. As respostas fornecidas sugeriram que essa espécie é de ocorrência rara. Essas informações levam a uma questão: alguns autores estrangeiros afirmam que realizam seus estudos utilizando com matéria-prima vegetal *Cayaponia tayuya*, porém esses trabalhos não apresentam declaração quanto aos locais e época de coleta, nem a herbarização de material testemunho. Alguns desses trabalhos ainda citam que o

* Eloir Paulo Schenkel: informação pessoal

material vegetal foi enviado do Brasil, porém existem evidências de que algumas empresas brasileiras comercializam raízes de *Wilbrandia ebracteata* com a declaração de *Cayaponia tayuya*.

O gênero *Wilbrandia* é composto por espécies tropicais e subtropicais, próprias da América do Sul, cuja área de dispersão estende-se do Rio Grande do Sul até o Espírito Santo. Muito provavelmente, o centro de origem desse grupo compreende os estados de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro. *Wilbrandia ebracteata* é uma espécie da família cucurbitaceae que habita a parte austral do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), leste do Paraguai e nordeste da Argentina (região das Missões) (CROVETTO, 1960). Assim como outras plantas denominadas taiuiá *Wilbrandia ebracteata* é citada na medicina popular como purgativa, no tratamento da sífilis, úlceras gástricas, furúnculos, entre outros (CORRÊA, 1978).

Cabe aqui ressaltar que as plantas apresentam uma ampla variedade e complexidade de substâncias químicas que são responsáveis pelos mais diversos efeitos biológicos (GUERRA; NODARI, 2003; GOTTLIEB; BORIN, 2003). A pesquisa destes compostos é tida como uma rica fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos, sejam eles na forma de substância isolada (fármaco) ou na forma de extratos (fitoterápico) (ELISABETSKY, 1991; SCHENKEL; GOSSMANN; PETROVICK, 2003). Newman, Cragg e Snader (2003) afirmam que 52% de todos os novos fármacos descobertos e em processo de desenvolvimento entre 1981 e 2002 são produtos naturais ou derivados desses. Ainda mais estimulante é observar que decorridos quatro anos os produtos naturais e seus derivados continuam responsáveis por mais da metade de todas as novas entidades químico-farmacêuticas (Newman; Cragg, 2007).

Duas classes de substâncias encontradas em grande quantidade nas frações de *Wilbrandia ebracteata* são as cucurbitacinas e os flavonóides C-glicosídeos. Cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos poli-hidroxiados encontrados tanto na forma de agliconas, quanto como heterosídeos, as quais conferem sabor amargo às plantas da família cucurbitaceae (LAVIE; GLOTTER, 1971; SCHENKEL et al., 1992). Flavonóides C-glicosídeos diferenciam dos demais flavonóides por apresentar a ligação açúcar-genina diretamente a um carbono do núcleo aglicônico a qual se dá principalmente entre o carbono C-1 (anomérico) do açúcar e os

carbonos 6 e/ou 8 do anel A do flavonóide. (CHOPIN; BOUILLANT, 1975; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

O presente trabalho está centrado no isolamento e identificação de flavonóides C-glicosídeos e cucurbitacinas com caráter mais polar do que as descritas por Farias e colaboradores (1993) a partir das raízes e das folhas de *Wilbrandia ebracteata*. O isolamento dos flavonóides C-glicosídeos a partir da fração butanólica das folhas e raízes da espécie em questão foi realizado com o intuito de promover estudos acerca das propriedades biológicas/farmacológicas dessas substâncias. Já para as cucurbitacinas, a finalidade foi verificar a presença de novos compostos ainda não isolados das raízes de *Wilbrandia ebracteata*.

O presente trabalho está organizado da seguinte forma: inicialmente será apresentada uma revisão da literatura sobre *Wilbrandia ebracteata*, *Cayaponia tayuya* e as classes de compostos cucurbitacinas e flavonóides C-glicosídeos. Após serão apresentados os objetivos e materiais e métodos, seguidos pelos resultados e as discussões referentes à análise das raízes e das folhas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Muitas são as espécies que recebem o nome popular Taiuiá, geralmente espécies pertencentes aos gêneros *Ceratosanthes*, *Melothria*, *Wilbrandia*, *Cayaponia* e *Cyclanthera*, como se pode visualizar na tabela 1:

Tabela 1: Espécies conhecidas popularmente como Taiuiá segundo a literatura

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

Fonte: FARIAS, 1991.

Das espécies apresentadas na tabela 1, *Wilbrandia ebracteata* e *Cayaponia tayuya* são as mais citadas na literatura, seja aquela por sua grande utilização na medicina popular ou essa por estar presente na Farmacopéia Brasileira I (1926) como sendo a droga vegetal Taiuiá. Além disso, em 1986, Farias e colaboradores descreveram que algumas amostras comerciais onde o fabricante declarava tratar-se de *Cayaponia tayuya* apresentavam o mesmo perfil cromatográfico, em relação às frações diclorometano (cucurbitacinas) e butanólica (flavonóides C-glicosídeos), de *Wilbrandia ebracteata*. Desta forma, esta revisão está direcionada aos constituintes químicos e às atividades biológicas/farmacológicas dessas duas espécies.

2.1 *Wilbrandia ebracteata* Cogn.

O gênero *Wilbrandia* é composto por espécies tropicais e subtropicais, próprias da América do Sul, cuja área de dispersão estende-se do Rio Grande do Sul até o Espírito Santo. Muito provavelmente, o centro de dispersão desse grupo compreende os estados de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro. A espécie *Wilbrandia ebracteata* habita a parte austral do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), leste do Paraguai e nordeste da Argentina (região das Missões) (CROVETTO, 1960).

2.1.1 Classificação botânica

Ordem: *Cucurbitales*

Família: *Cucurbitaceae*

Subtribo: *Melothriinae*

Gênero: *Wilbrandia* Manso

Seção: *Euwilbrandia*

Espécie: *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (Fig. 1)

Variedades: *pedunculata*, *ebracteata*, *bracteata*



Figura 1: Exemplar da espécie *Wilbrandia ebracteata* Cogn.

Foto: Andressa Córneo Gazola

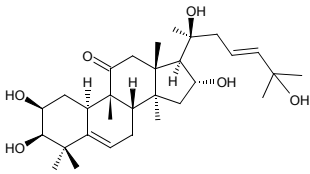
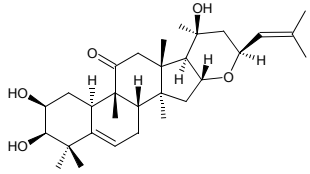
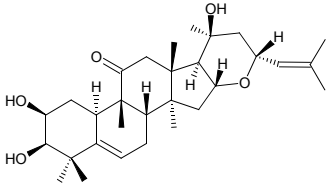
2.1.2 Constituintes químicos descritos para *Wilbrandia ebracteata*

Ao verificar que alguns produtos comerciais declarados como provenientes de *Cayaponia tayuya* na verdade eram provenientes de *Wilbrandia ebracteata* o grupo liderado por Schenkel realizou uma grande coleta de raízes de *W. ebracteata* na década de 80, identificadas pelo Prof. Dr. Sérgio A. L. Bordignon com base nas flores e frutos da espécie, a qual deu origem a quase totalidade dos estudos químicos e a maior parte dos estudos farmacológicos até hoje publicados para as raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Com outro material vegetal, Coelho (2004) apresenta o isolamento e a identificação de substâncias a partir das folhas de *W. ebracteata*. Até o presente momento, duas classes de compostos foram descritas: as cucurbitacinas e os flavonóides.

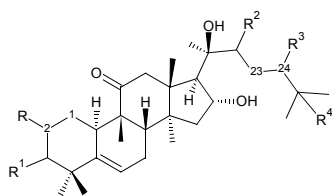
2.1.2.1 Cucurbitacinas descritas para *Wilbrandia ebracteata*

Schenkel e colaboradores (1992) descrevem o isolamento e identificação de três 22-deoxo-cucurbitacinas a partir da fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Dessas três novas cucurbitacinas, duas delas se diferenciam apenas na posição do radical ligado ao carbono 23. Suas estruturas estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Estruturas e nomenclatura dos compostos descritos por Schenkel e colaboradores (1992)

<p>$2\beta,3\beta,16\alpha,20,25$-pentaidroxi-$10\alpha$- cucurbit-5,23-dien-11-ona</p>	
<p>$16\alpha,23\alpha$-epoxi-$2\beta,3\beta,20\beta$-triidroxi- $10\alpha,23\alpha$-cucurbit-5,24-dien-11-ona</p>	
<p>$16\alpha,23\alpha$-epoxi-$2\beta,3\beta,20\beta$-triidroxi- $10\alpha,23\beta$-cucurbit-5,24-dien-11-ona</p>	

Em 1993, Farias e colaboradores descreveram o isolamento de mais algumas cucurbitacinas provenientes da mesma fração diclorometano. Dentre elas encontram-se 22-deoxo-cucurbitacinas, diidrocucurbitacinas, diidroisocucurbitacinas, isocucurbitacinas e uma 29-nor-cucurbitacina. Essa última foi descrita posteriormente por Himeno e colaboradores (1994c) com o nome de cayaponosídeo A_5 (ver compostos descritos para *Cayaponia tayuya*). Na tabela 3 são apresentadas as fórmulas estruturais dos compostos descritos por Farias e colaboradores (1993).

Tabela 3: Estruturas dos compostos descritos por Farias e colaboradores (1993)

	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Outros
Diidrocurbitacina E	—OH	=O	=O	—H	—O-Acetila	$\Delta^{1,2}$
Diidrocurbitacina B	◀OH	=O	=O	—H	—O-Acetila	
Diidroisocurbitacina B	=O	⋯⋯OH	=O	—H	—O-Acetila	
Cucurbitacina B	◀OH	=O	=O	—H	—O-Acetila	$\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina E	—OH	=O	=O	—H	—O-Acetila	$\Delta^{1,2}$ $\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina D	◀OH	=O	=O	—H	—OH	$\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina R	◀OH	=O	=O	—H	—OH	
3-epi-isocurbitacina G	=O	◀OH	=O	⋈OH	—OH	
Cucurbitacinas G e H	◀OH	=O	=O	⋈OH	—OH	
Cucurbitacinas J e K	—OH	=O	=O	⋈OH	—OH	$\Delta^{1,2}$
22-deoxo-cucurbitacina D	◀OH	=O	—H	—H	—OH	
Cucurbitacina P	◀OH	◀OH	=O	—H	—OH	
Diidrocurbitacina E-2-glicosídeo	—O-Glicose	=O	=O	—H	—O-Acetila	$\Delta^{1,2}$
Diidroisocurbitacina B-3-glicosídeo	=O	⋯⋯O-Glicose	=O	—H	—O-Acetila	
Diidrocurbitacina B-2-glicosídeo	◀OH	◀O-Glicose	=O	—H	—O-Acetila	
Cayaponosídeo A ₅						

2.1.2.2 Flavonóides descritos para *Wilbrandia ebracteata*

O isolamento e a identificação de flavonóides C-glicosídeos a partir da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata* foram descritos em 1996 por Santos, Santos e Schenkel. Nesse trabalho os autores verificaram a presença de spinosina, swertisina, isoswertisina, vitexina, isovitexina, vicenina-2, orientina e isoorientina, cujas estruturas são apresentadas na tabela 4.

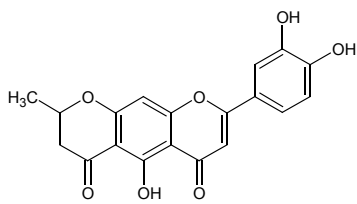
Tabela 4: Estruturas dos compostos descritos por Santos; Santos; Schenkel (1996)

	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Flavonóides C-glicosídeos					
Spinosina	—OCH ₃	—Glucose-O-Glucose	—H	—H	—OH
Swertisina	—OCH ₃	—Glucose	—H	—H	—OH
Isoswertisina	—OCH ₃	—H	—Glucose	—H	—OH
Vitexina	—OH	—H	—Glucose	—H	—OH
Isovitexina	—OH	—Glucose	—H	—H	—OH
Vicenina-2	—OH	—Glucose	—Glucose	—H	—OH
Orientina	—OH	—H	—Glucose	—OH	—OH
Isoorientina	—OH	—Glucose	—H	—OH	—OH

No único trabalho sobre a composição das folhas de *Wilbrandia ebracteata*, Coelho (2004) descreve o isolamento de oito flavonóides, dos quais

quatro deles são C-glicosídeos que também ocorrem nas raízes da espécie. As fórmulas estruturais das substâncias isoladas por Coelho (2004) são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Estruturas dos flavonóides descritos por Coelho (2004)

	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavonóides						
3',4',5,6,7,8-hexaidroxiflavonol	—OH	—OH	—OH	—OH	—OH	—OH
Luteolina	—H	—OH	—H	—H	—OH	—OH
3',4',5,6-tetraidroxi-7-metoxi-flavona	—OH	—OCH ₃	—H	—H	—OH	—OH
Vitexina	—H	—OH	—Glucose	—H	—H	—OH
Isovitexina	—Glucose	—OH	—H	—H	—H	—OH
Orientina	—H	—OH	—Glucose	—H	—OH	—OH
Isoorientina	—Glucose	—OH	—H	—H	—OH	—OH
Proposta para we5						

2.1.3 Propriedades farmacológicas descritas para *Wilbrandia ebracteata*

A partir de frações e substâncias provenientes de raízes de *Wilbrandia ebracteata* cuja coleta foi citada no item 2.1.2 foram realizados estudos quanto às atividades antiinflamatória, analgésica, antiviral e mutagênica, as quais são descritas abaixo.

A investigação da atividade analgésica foi realizada através do teste de contorção induzido por injeção intra-peritoneal (i.p.) de ácido acético 0,6% em camundongos. A fração diclorometano foi testada e o controle positivo utilizado foi ácido acetilsalicílico, todos administrados i.p. Os autores verificaram que a fração diclorometano mostrou atividade significativa na dose de 10 mg/Kg. Além disto, ainda foi realizado o teste da formalina induzindo a dor e do edema de pata induzido pela carragenina. A fração diclorometano foi eficaz nas doses de 1; 3 e 10 mg/Kg i.p. e 3; 10 e 30 mg/Kg v.o. no teste da formalina. Para o edema de pata de ratos induzido pela carragenina foram testados além da fração diclorometano a fração acetato de etila e as cucurbitacinas B e E. A fração diclorometano inibiu o edema em 90% e 60% quando administrados 10 mg/Kg (i.p.) e 30 mg/Kg (v.o.), respectivamente. A fração acetato de etila inibiu apenas 10% do edema quando administrados 10 mg/Kg (i.p.). As cucurbitacinas B e E na dose de 1 mg/Kg (i.p.) inibiram 61% e 58%, respectivamente (PETERS; FARIAS; RIBEIRO-DO-VALLE, 1997).

Em outro trabalho (PETERS et al., 1999) é descrita a atividade antiinflamatória da fração diclorometano e da cucurbitacina B no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. A fração diclorometano (0,3 mg/Kg, i.p. e 3 mg/Kg, v.o.) inibiu o influxo de células e o exsudato para dentro da cavidade pleural, além de reduzir significativamente o nível de prostaglandina-E₂ no exsudato quando administrada i.p. (0,01 – 10 mg/Kg) e v.o. (0,1 – 10 mg/Kg). Cucurbitacina B inibiu 53% do nível dessa prostaglandina quando administrada na dose de 0,1 mg/Kg, i.p.

No teste de contorções abdominais induzidas pelo zimosan (i.p.) Peters e colaboradores (2003) verificaram atividade da fração diclorometano nas doses de 1, 3 e 10 mg/Kg (v.o.). O teste *rota-rod* comprovou que a fração diclorometano nas doses de 10 e 30 mg/Kg, v.o. não afetou a coordenação motora dos camundongos.

No modelo da artrite induzida pela zimosan em ratos a fração diclorometano reduziu a incapacidade articular nas doses de 1, 3 e 10 mg/Kg (v.o.), sendo que na dose de 10 mg/Kg (v.o.) também foi capaz de reduzir o influxo de células para dentro da cavidade articular e a liberação de nitrito, efeito esse também observado na dose de 3 mg/Kg (v.o.). Foi realizado também um ensaio para avaliar o efeito ulcerogênico na mucosa do estômago de ratos. Nesse teste, a fração diclorometano (30 mg/Kg, v.o.) ao contrário da indometacina (30 mg/Kg, v.o.) e do ácido acetilsalicílico (100 mg/Kg, v.o.) não provocou lesões gástricas hemorrágicas. Para elucidar o mecanismo da ação antiinflamatória, os autores realizaram um teste *in vitro* para verificar se a fração diclorometano tinha atividade sobre as enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) humanas. Em relação à COX-1 não foi observada alteração, porém quando as células foram expostas a 1 e 10 µg/mL da fração diclorometano houve inibição da atividade de COX-2.

No modelo de edema de pata de camundongo induzido pela carragenina, diidrocucurbitacina B inibiu 26%, 44% e 56% do pico de resposta da carragenina nas doses de 0,3; 1 e 3 mg/Kg, i.p., respectivamente. No teste da pleurisia induzida pela carragenina ficou evidente que a diidrocucurbitacina B inibiu o acúmulo de leucócitos na cavidade pleural, diminuiu o influxo de células (10 mg/Kg, i.p.) e inibiu a produção de leucotrieno B₄ (3 e 10 mg/Kg, i.p.). Diidrocucurbitacina B (10 µg/mL) ainda inibiu 72% da produção de prostaglandina-E₂ pela enzima COX-2 humana *in vitro*. Os autores afirmaram que o efeito antiinflamatório *in vivo* da diidrocucurbitacina B ocorre através da inibição da enzima COX-2 (SIQUEIRA et al., 2007).

A atividade antiviral também foi avaliada para as frações acetato de etila e butanólica do mesmo material vegetal. A fração acetato de etila inibiu 50% do efeito citopático viral (CE₅₀) nas doses de 62 µg/mL para o vírus herpético simples tipo 1 (HSV-1) cepa KOS e 25 µg/mL para o HSV-1 cepa 29-R. A fração butanólica apresentou CE₅₀ nas doses de 125 µg/mL para HSV-1 cepa KOS e 12 µg/mL para HSV-1 cepa 29-R. Não foi constatada atividade para o poliovírus tipo 2 (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005).

Em relação à toxicidade, os extratos metanol e metanol:água – 1:1 assim como as frações diclorometano, acetato de etila, butanólica e o resíduo aquoso, realizados com o mesmo material vegetal, foram testados quanto a sua capacidade mutagênica frente às cepas TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*.

Nenhuma das frações apresentou toxicidade, porém para os extratos foi observada mutagenicidade espontânea (PEREIRA; FARIAS; VARGAS, 1996).

Abaixo serão apresentados trabalhos cujos materiais vegetais são diferentes do citado no item 2.1.2.

Pereira, Gonçalves e Pereira (1992) relataram que o extrato aquoso de raízes de *W.ebracteata* (1 g/Kg, v.o.) foi capaz de inibir 30% do edema de pata de camundongos induzido pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

Através do ensaio de captação de radicais livres (DPPH) foi observado que o extrato aquoso, proveniente de raízes de *Wilbrandia ebracteata* coletadas no estado do Paraná, reduziu 50% dos radicais livres na dose de 170 µg/mL (MENEZES; SCHWARZ; SANTOS, 2004).

Todos os trabalhos citados anteriormente foram realizados com raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Com material proveniente das folhas da espécie foi observado que a fração hidrometanólica inibiu 73% das lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos, porém não foi eficaz nas lesões induzidas por indometacina. A fração hidrometanólica não apresentou qualquer efeito analgésico nos testes de contorções induzidas pelo ácido acético e imersão da cauda (GONZALEZ; STASI, 2002).

2.2 *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn.

Cayaponia é um gênero com mais de 60 espécies, sendo assim, provavelmente é o maior gênero da família Cucurbitaceae. Ele está distribuído através da América tropical e subtropical, sendo que poucas espécies ocorrem no sudeste dos Estados Unidos e uma espécie ocorre na África (MONRO, 1996).

2.2.1 Classificação botânica

Ordem: *Cucurbitales*

Família: *cucurbitaceae*

Gênero: *Cayaponia*

Espécie: *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. (Fig. 2)



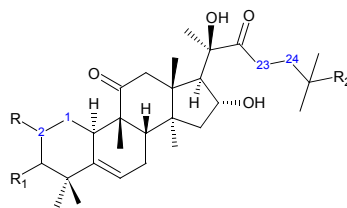
Figura 2: Partes aéreas e raiz de *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn.

Foto: Sérgio A. L. Bordignon

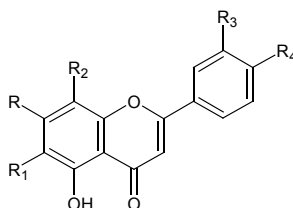
2.2.2 Constituintes químicos descritos para *Cayaponia tayuya*

Os trabalhos citados a seguir foram realizados por grupos de pesquisadores da Alemanha, do Japão e da Espanha. Cabe destacar que em nenhum desses trabalhos é relatado o local e a época de coleta.

Bauer e colaboradores (1983) relatam que as raízes de *Cayaponia tayuya* foram adquiridas da empresa alemã F.G. Celo. No segundo trabalho (1985) eles descrevem que a matéria-prima vegetal foi adquirida no comércio e também obtida através do Prof. Luis H. Berganza, do Paraguai. Nesses trabalhos são descritos os isolamentos de cucurbitacinas e de flavonóides C-glicosídeos a partir da fração clorofórmio e do extrato metanol:água, respectivamente. As substâncias obtidas foram as agliconas e os C-2 glicosídeos das cucurbitacinas R, B e da diidrocucurbitacina B, além dos flavonóides C-glicosídeos swertisina, spinosina, vitexina, isovitexina, vicenina-2, orientina e isoorientina, cujas estruturas são apresentadas na tabela 6. Essas mesmas cucurbitacinas foram também descritas para *Wilbrandia ebracteata* (FARIAS et al, 1993), assim como os C-glicosilflavonóides que são os mesmos descritos por Santos, Santos e Schenkel (1996) também para raízes de *Wilbrandia ebracteata*.

Tabela 6: Substâncias descritas por Bauer e colaboradores (1983; 1985)

		R	R ₁	R ₂	outros
Cucurbitacinas					
1	cucurbitacina B	◀OH	=O	—OCOCH ₃	Δ ^{23,24}
2	cucurbitacina R	◀OH	=O	—OH	
3	cucurbitacina B-glicosídeo	◀O-Glicose	=O	—OCOCH ₃	Δ ^{23,24}
4	cucurbitacina R-glicosídeo	◀O-Glicose	=O	—OH	
5	diidrocucurbitacina B	◀OH	=O	—OCOCH ₃	
6	diidrocucurbitacina B-2-β-D-glicosídeo	◀O-Glicose	=O	—OCOCH ₃	Δ ^{23,24}
7	diidroisocucurbitacina B	=O	⋯OH	—OCOCH ₃	

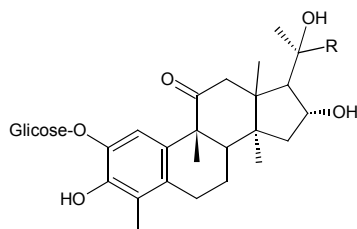


		R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Flavonóides C-glicosídeos						
8	spinosina	—OCH ₃	—Glicose-O-Glicose	—H	—H	—OH
9	swertisina	—OCH ₃	—Glicose	—H	—H	—OH
10	vitexina	—OH	—H	—Glicose	—H	—OH
11	isovitexina	—OH	—Glicose	—H	—H	—OH
12	vicenina-2	—OH	—Glicose	—Glicose	—H	—OH
13	orientina	—OH	—H	—Glicose	—OH	—OH
14	isoorientina	—OH	—Glicose	—H	—OH	—OH

Ríos e colaboradores (1990) isolaram os flavonóides C-glicosídeos vicenina-2 e spinosina do extrato butanólico das raízes de *Cayaponia tayuya*. O único dado apresentado quanto à origem do material vegetal foi: “Raízes de *C. tayuya* foram coletadas no Brasil em 1984”.

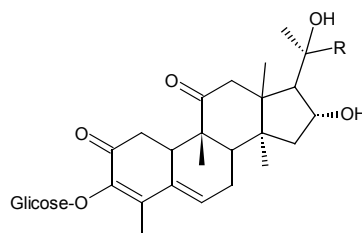
Um grupo de pesquisa do Japão (HIMENO et al., 1992; 1993; 1994a; 1994b; 1994c) realizou uma série de trabalhos visando à obtenção de compostos químicos mais polares que os descritos por Bauer e colaboradores (1983; 1985). Ao todo, foram obtidos 24 compostos, todos 29-nor-cucurbitacinas na forma de glicosídeos com a glicose nas posições 2 ou 3, denominados como cayaponosídeos. As estruturas dos compostos isolados por Himeno e colaboradores (1992; 1993; 1994a; 1994b; 1994c) são apresentadas nas tabelas 7 e 8 considerando a presença ou ausência de anel A aromático.

Tabela 7: Glicosídeos de nor-cucurbitacinas com anel A aromático descritas por Himeno e colaboradores (1992; 1993; 1994a; 1994b; 1994c)



		R	Outros			R	Outros
15	Cayaonosídeo A			16	Cayaonosídeo A ₃		
17	Cayaonosídeo A ₄			18	Cayaonosídeo A ₅		$\Delta^{6,7}$
19	Cayaonosídeo A ₆			20	Cayaonosídeo B		
21	Cayaonosídeo B ₂			22	Cayaonosídeo B ₃		
23	Cayaonosídeo B ₄			24	Cayaonosídeo B ₅		$\Delta^{6,7}$
25	Cayaonosídeo C			26	Cayaonosídeo C _{5a}		
27	Cayaonosídeo C _{5b}		$\Delta^{6,7}$	28	Cayaonosídeo D		
29	Cayaonosídeo D ₁			30	Cayaonosídeo D ₂		$\Delta^{6,7}$
31	Cayaonosídeo C ₂			32	Cayaonosídeo C ₄		

Tabela 8: Glicosídeos de nor-cucurbitacinas não aromáticos descritos por Himeno e colaboradores (1992, 1993, 1994a; 1994b; 1994c)



		R			R
33	Cayaponosídeo A ₁		34	Cayaponosídeo B _{6a}	
35	Cayaponosídeo B _{6b}		36	Cayaponosídeo C ₃	
37	Cayaponosídeo D _{3a}		38	Cayaponosídeo D _{3b}	

2.2.3 Propriedades farmacológicas descritas para *Cayaponia tayuya*

Em 1995, Konoshima e colaboradores relataram que os vinte e quatro cayaponosídeos isolados por Himeno e colaboradores (1992; 1993; 1994a; 1994b; 1994c) inibiram a ativação do vírus Epstein-Barr induzida por TPA *in vitro*. Esse trabalho ainda relata que os cayaponosídeos B, D e C₂ inibiram o segundo estágio da carcinogênese em tumores de pele em camundongos observados através da diminuição da porcentagem dos papilomas nas primeiras 10 semanas e da diminuição do número de papilomas por camundongos.

Ríos e colaboradores (1990) avaliaram a atividade antiinflamatória dos extratos clorofórmio e metanol, das frações acetato de etila e butanólica e dos flavonóides C-glicosídeos vicenina-2 e spinosina no modelo de edema plantar induzido pela carragenina em camundongos. Os extratos, as frações, bem como vicenina-2 e spinosina foram eficazes quando administrados i.p, porém apenas o extrato clorofórmio foi eficaz por v.o.

Em um modelo *in vitro* foi avaliada a capacidade da vicenina-2 e da spinosina em inibir a redução do azul de tetrazólio pelo ânion superóxido. Os

compostos na concentração de 100 μ M inibiram a redução do azul de tetrazólio em 25% e 21%, respectivamente (HUGUET; MÁÑES; ALCARAZ, 1990).

Cucurbitacina R e diidrocurbitacina B foram eficazes nos modelos de edema de pata de camundongo induzido pela carragenina (v.o.), edema de orelha de camundongo (v.o. e tópico) e edema de pata de camundongo induzido pela carragenina (subcutâneo), no entanto apenas a cucurbitacina R inibiu o edema de pata de camundongo induzido pela fosfolipase A₂ quando administrada i.p. Com relação à atividade analgésica, nenhum dos compostos (5 mg/Kg, v.o.) apresentou ação significativa no teste de contorção induzida pelo ácido acético em camundongos (Recio et al., 2004).

Escandell e colaboradores (2006; 2007) demonstraram que a cucurbitacina R e a diidrocurbitacina B auxiliam na diminuição do processo inflamatório e de outros sintomas presentes em modelo artrítico em ratos. Alguns efeitos após a administração dessas cucurbitacinas (1 mg/Kg, v.o.) são redução na perda de peso, redução da inflamação e do edema, decréscimo da expressão de COX-2 e óxido nítrico sintetase-2, inibição da produção de prostaglandina-E₂ e fator de necrose tumoral- α *in vivo* além de diminuição do dano causado na articulação.

2.3 Cucurbitacinas

Cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos poli-hidroxiados caracterizados pelo núcleo cucurbitano (Fig.3), denominado 19-(10 \rightarrow 9b)-abeo-10a-lanost-5-eno (também conhecido como 9b-metil-19-norlanosta-5-eno) que pode ser encontrado livre ou glicosilado. Além de serem as substâncias referidas como os princípios amargos da família Cucurbitaceae essas são encontradas, com menor representatividade, em outras famílias de Angiospermas, tais como Begoniaceae, Cruciferae, Datisceae, Desfontainiaceae, Elaeocarpaceae, Euphorbiaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae e Sterculiaceae, sendo as cucurbitacinas B e E as mais frequentemente relatadas (NEUWINGER, 1994; MIRÓ, 1995; PAGOTO; KAPLAN; GOTTLIEB, 1996; CHEN et al., 2005). Para maiores informações estruturais ver as revisões recentes de Chen e colaboradores (2005) e Valente (2004).

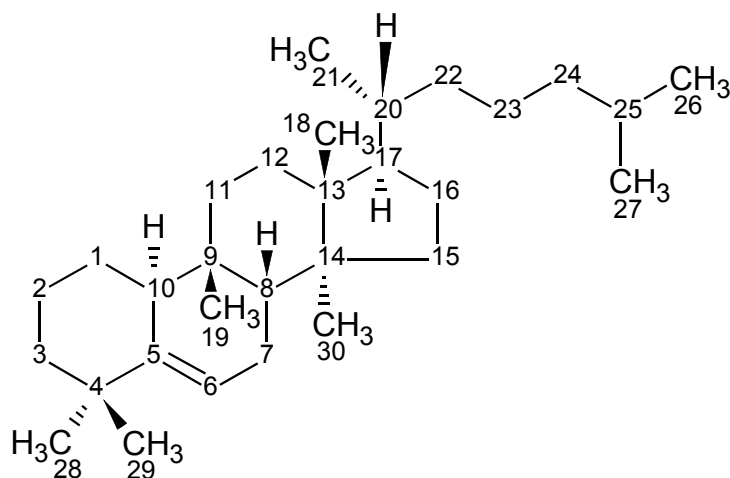


Figura 3: Estrutura geral das cucurbitacinas, núcleo cucurbitano

2.3.1 Atividades farmacológicas descritas para cucurbitacinas

Além das atividades já descritas para as cucurbitacinas provenientes de *Wilbrandia ebracteata* e de *Cayaponia tayuya*, abaixo são descritas outras atividades farmacológicas desse grupo de substâncias.

Plantas da família Cucurbitaceae têm sido usadas desde a antigüidade como vermífugos e eméticos devido às propriedades tóxicas das cucurbitacinas (LAVIE; GLOTTER, 1971; GUHA; SEM, 1975; NEUWINGER, 1994; MIRÓ, 1995). Essas substâncias também são conhecidas por suas atividades citotóxica e anti-tumoral (DUNCAN et al., 1996; DUNCAN; DUNCAN; 1997; GUHA; SEN, 1975; KONOSHIMA et al., 1995; LAZARIS et al, 1998; MIRÓ, 1995; RAO et al., 1991; RYU et al., 1995). Witkowski e Konopa (1981) relataram a competição entre as cucurbitacinas B, I, J e R com o cortisol, sendo a ligação com o receptor reversível e dose-dependente. As cucurbitacinas B, D, I e R têm a capacidade de inibir a biossíntese de DNA, RNA e proteínas em células HeLa S3, levando à inibição da proliferação celular (WITKOWSKI; WOYANAROWSKA; KONOPA, 1984).

Edey, Schatzber-Porath e Gitter (1961) realizaram diversos testes farmacológicos com a cucurbitacina D isolada de *Ecballium elaterium*. Foram registrados o aumento da permeabilidade capilar, edema pulmonar, queda na

pressão arterial, ausência de liberação de histamina e aumento na motilidade gastrointestinal.

Um di-glicosídeo (posições 2 e 25) da cucurbitacina R, isolado das raízes de *Bryonia alba*, induziu elevação dos níveis plasmáticos de prostaglandina-E₂ em ratos submetidos a estresse por imobilização. Também foi constatada inibição da liberação de ácido araquidônico, o que diminuiu a biossíntese de eicosanóides (mediadores da inflamação) e aumento na biossíntese e secreção de corticoesteróides (PANOSSIAN; GABRIELIAN; WAGNER, 1997; 1999; WAGNER; NORR; WINTERHFF, 1994).

Shohat e colaboradores (1972) descreveram efeito contraceptivo para a diidrocucurbitacina D em estudo com camundongos, sendo que não foi observado efeito antagônico ou sinérgico com estrogênio. Em ovários maduros foram constatados inibição da ovulação e hiperplasia das glândulas.

2.4 Flavonóides C-glicosídeos

Flavonóides C-glicosídeos são flavonóides cujo açúcar está ligado diretamente à aglicona por uma ligação carbono-carbono. Devido a essa ligação, normalmente não ocorre hidrólise ácida, o observado é que prolongado tratamento ácido resulta em isomerização parcial da molécula (HARBORNE; MABRY; MABRY, 1975). Esse grupo de compostos está presente em briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas mono e dicotiledôneas, sendo que grande parte das espécies são pertencentes às angiospermas dicotiledôneas (JAY; VIRICEL; GONNET, 2006). Para mais informações a respeito de flavonóides podem-se consultar Andersen e Markham (2006), Grotewold (2006) ou ainda Harborne e Willians (2000).

2.4.1 Atividades farmacológicas descritas para flavonóides C-glicosídeos

Neste item serão apresentados alguns trabalhos para exemplificar as atividades farmacológicas descritas para flavonóides C-glicosídeos. Devido ao grande número de publicações apenas um trabalho será apresentado para cada atividade.

A atividade hipoglicemiante da isoorientina foi descrita por Andrade-Cetto e Wiedenfeld (2001) em modelo de diabetes induzido pela estreptozotocina. Após administração oral de isoorientina, as concentrações de glicose plasmática foram avaliadas nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas. O composto mostrou boa atividade na dose de 15 mg/Kg após 1 hora da administração, continuando com atividade nas duas horas seguintes. Esses efeitos são comparáveis aos efeitos mostrados em animais após a administração de glibenclamida.

Em relação à atividade antifúngica, isoorientina apresentou efeito contra *Trichophyton mentagrophytes* (SANTHIAMOORTHY et al., 2007).

Li e colaboradores (2002) avaliaram a atividade antiviral para orientina e vitexina contra a cepa parainfluenza tipo 3. Ambos os flavonóides C-glicosídeos exibiram atividade antiviral para essa cepa, sendo os valores de CE₅₀ iguais a 11,7 e 20,8 µg/mL e os índices de seletividade iguais a 32,1 e 16,0, respectivamente.

Estudos para observar atividade antiinflamatória acerca de flavonóides são muito encontrados. Para flavonóides C-glicosídeos foram encontrados artigos que apresentam testes *in vivo* e *in vitro* para essa atividade, sendo que o trabalho *in vivo* será apresentado. Quando administrada oralmente, vicenina-2 mostrou significativa atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata de rato induzido pela carragenina nas doses de 15 e 90 mg/Kg. Na dose de 15 mg/Kg, o composto inibiu o edema da pata na terceira e quarta horas, enquanto na dose de 90 mg/Kg a inibição começou na segunda hora e permaneceu por todo o experimento como o controle positivo (indometacina, 5 mg/Kg) (GOBBO-NETO et al., 2005).

A atividade anti-oxidante para isovitexina foi demonstrada por Lin e colaboradores (2005), nesse trabalho, isovitexina foi capaz de reduzir a produção de

peróxido de hidrogênio induzido pelo lipopolisacarídeo (LPS) em macrófagos de camundongos RAW264.7.

Há trabalhos que demonstram efeito radio-protetor para esse grupo de substâncias. Hien e colaboradores (2002) avaliaram o efeito radio-protetor de Vitexina, um produto contendo a C-glicosilflavona vitexina como composto majoritário. Pacientes em estágio II e III de câncer de mama foram incluídos no estudo e foram alocados em dois grupos: pacientes tratados com Vitexina e pacientes do grupo placebo. O grupo da Vitexina recebia 4 cápsulas (400 mg de composto ativo) diariamente, durante seis semanas da radioterapia, os pacientes do grupo placebo receberam 4 cápsulas sem o composto ativo. A dose total de radiação (Cobalto-60) foi 5000 rad. Efeitos adversos frequentemente encontrados em pacientes expostos à radiação, tais como dores de cabeça, fadiga, falta de sono e apetite não foram notáveis nos pacientes do grupo da Vitexina. Também não houve perda de peso relevante, ou até mesmo ocorreu aumento de peso em 70% dos pacientes do grupo da Vitexina, enquanto isso, 73% do grupo placebo perderam de 1 a 2 Kg após as seis semanas de radioterapia. Em relação aos exames hematológicos, o grupo da Vitexina apresentou vantagem em eritrócitos, leucócitos, plaqueta e hemoglobina em relação ao grupo placebo.

O efeito anti-espasmódico da isoorientina foi demonstrado por Afifi, Khalil e Abdalla (1999) em aorta, íleo, traquéia e útero isolados de rato e em útero de cobaia. Esse composto não apresentou efeito significativo no íleo, traquéia e aorta de rato, porém houve decréscimo da frequência e da amplitude das contrações em segmentos uterinos isolados de rato e cobaia.

Vicenina-2 mostrou significativa atividade *in vitro* contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* na concentração de 500 µg/mL (GRAEL; ALBUQUERQUE; LOPES, 2005).

Isoorientina exibiu significativo efeito hepatoprotetor quando a hepatotoxicidade era induzida por tetracloreto de carbono com administração de 15 mg/Kg v.o. (ORHAM et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar quimicamente as raízes e folhas de *Wilbrandia ebracteata* Cogn.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata* para o isolamento de glicosídeos de cucurbitacinas;
- Isolar flavonóides C-glicosídeos da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*;
- Isolar substâncias a partir das frações obtidas das folhas de *Wilbrandia ebracteata*;
- Caracterizar cromatograficamente os constituintes químicos presentes nas frações butanólicas das raízes e folhas de *Wilbrandia ebracteata*;
- Comparar os constituintes químicos presentes nas frações butanólicas das raízes e das folhas de *Wilbrandia ebracteata* através de métodos cromatográficos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Procedimentos gerais

Os solventes e reagentes de grau P.A. para análise fitoquímica foram de procedências variadas: Nuclear[®], Merck[®] e CRQ[®]. A água utilizada nos experimentos foi destilada no laboratório. O etanol empregado nas macerações foi o comercial com graduação alcoólica de 92,8°. Para as análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) os solventes empregados foram de procedência Nuclear[®] grau HPLC e água milli Q.

As cromatografias em coluna foram realizadas em gel de sílica 60 de procedência Merck[®] (tamanho de partícula 0,04–0,063 mm, quando utilizado o tamanho de partícula 0,05-0,2mm será mencionado no texto), gel de permeação molecular Sephadex[®] LH-20 de procedência Pharmacia[®] e sílica gel de fase reversa 60 G RP-18 de procedência EMD[®] e tamanho de partícula 0,040-0,063 mm. As cromatografias tipo *flash* foram realizadas em gel de sílica 60 G para CCD de procedência Vetec[®].

Os extratos e as frações obtidas das colunas cromatográficas foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida em temperatura inferior a 60 °C.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio, gel de sílica 60 F₂₅₄ de procedência Macherey-Nagel[®] e Merck[®]. Para a detecção dos flavonóides foram utilizados Reagente Natural A (1%) (NP) e solução etanólica de polietilenoglicol-4000 (5%) (PEG), enquanto que para as cucurbitacinas os agentes cromogênicos utilizados foram vanilina-fosfórica e solução alcoólica de cloreto férrico 2,5%.

Os equipamentos utilizados nesta dissertação foram:

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: cromatogramas obtidos em equipamento Shimadzu SCL-10A, bombas do modelo LC-10AD e detector ultravioleta SPD-10AV.
- Ponto de Fusão: obtidos em equipamento Microquímica MQAPF-301.

- Espectroscopia na região do ultra-violeta: espectros obtidos em equipamento Perkin Elmer UV/VIS espectrometer Lambda 10.
- Espectroscopia na região do infra-vermelho: espectros obtidos em equipamento Shimadzu IRPrestige-21 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer.
- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: espectros obtidos em equipamento Bruker AM 500 MHz[†] e em equipamento Varian AS 400 MHz[‡].

4.1.1 Acetilação de substâncias isoladas

A acetilação de compostos isolados foi realizada do modo tradicional, com dissolução da amostra em piridina e adição de anidrido acético (1:3, v/v). Após 3 dias de reação em temperatura ambiente, foi adicionada água destilada gelada.

4.1.2 Hidrólise ácida de substâncias isoladas

A amostra seca foi solubilizada com solução aquosa de ácido clorídrico 1% e refluxada a 100 °C por 1 hora. Essa solução foi particionada com diclorometano, resultando na porção aglicona (fração diclorometano) e a porção açúcar (resíduo aquoso) do composto.

A porção aglicona foi cromatografada em cromatografia em camada delgada de gel de sílica, eluente éter de petróleo: acetato de etila:isopropanol (20:5:0,8; v/v/v) com padrões de cucurbitacinas. A detecção foi realizada através de observação sob luz UV 254 nm e revelação com vanilina fosfórica e aquecimento.

A porção açúcar foi cromatografada em cromatografia em camada delgada em gel de sílica, eluente clorofórmio:etanol:ácido acético (8:6:0,2; v/v/v) com

[†] Pelos espectros realizados agradecemos ao Prof. Dr. Jorge Palermo do Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade de Buenos Aires, Argentina.

[‡] Pelos espectros realizados agradecemos ao Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro do Departamento de Química do Centro de Física e Matemática da Universidade Federal de Santa Catarina. Brasil.

padrões autênticos de açúcar. A detecção foi realizada com solução de anisaldeído sulfúrico e aquecimento.

4.2 Material Vegetal

- a. Para os procedimentos de isolamento a partir das raízes de *Wilbrandia ebracteata* foram utilizadas frações cedidas pela Prof. Dr^a. Marení Rocha Farias obtidas durante sua tese de doutorado (Farias, 1991). O material vegetal com flores e frutos foi coletado em dezembro de 1987 em Nova Petrópolis-RS, identificado pelo Prof. Dr. Sérgio A. L. Bordignon cuja exsicata está depositada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- b. Alternativamente em 2007 foram adquiridas na empresa Lohmman de Nova Petrópolis-RS raízes de *Wilbrandia ebracteata* para verificação da estabilidade das frações citadas no item a.
- c. Para o estudo fitoquímico das folhas de *Wilbrandia ebracteata*, as partes aéreas da espécie foram coletadas no município de Siderópolis-SC em Outubro de 2006. O material foi identificado pelo Prof. Dr. Sérgio A. L. Bordignon (Exsicata: herbário ICN do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina, FLOR 35829). As folhas foram separadas das demais partes aéreas e secas em estufa de ar circulante com temperatura igual a 35°C por três dias. Com esse material foram realizadas as frações para a investigação química das folhas de *Wilbrandia ebracteata*.

4.3 Obtenção dos Extratos e Frações das Raízes de *Wilbrandia ebracteata*

4.3.1 Obtenção dos extratos a partir das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

A extração das raízes de *Wilbrandia ebracteata* foi realizada através da maceração de aproximadamente 500 g de raízes com éter de petróleo. Após, o material vegetal que foi macerado com álcool metílico por 5 dias, na proporção 50 g (droga vegetal) / 100 mL (líquido extrator). Os extratos éter de petróleo e metanólico foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida à temperatura inferior a 60 °C sendo seus rendimentos avaliados com base na quantidade de raízes moídas maceradas (tabela 9).

Tabela 9: Massas e rendimentos dos extratos obtidos das raízes de *W. ebracteata*

Extratos	Massa	Rendimento*
Éter de petróleo	2,7 g	0,5 %
Metanol	73,9 g	14,8 %

*Rendimento em relação ao material vegetal seco e moído

4.3.2 Obtenção das frações a partir das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

As frações foram obtidas a partir do fracionamento do extrato metanólico com solventes de polaridade crescente. O extrato metanólico foi ressuspensionado em água e particionado com éter de petróleo (3 x 100 mL), diclorometano (4 x 100 mL), acetato de etila (4 x 100 mL) e n-butanol (3 x 100 mL). As frações obtidas foram secas com auxílio de evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura inferior a 60°C. Os rendimentos das frações foram calculados em relação ao extrato metanólico e à matéria-prima vegetal (tabela 10).

Tabela 10: Massas e rendimentos das frações obtidas a partir do extrato MeOH das raízes de *W. ebracteata*

Frações	Massa	Rendimento MP*	Rendimento EB[#]
Éter de petróleo	54,6 mg	0,01 %	0,07 %
Diclorometano	3,5 g	0,7 %	4,7 %
Acetato de etila	1,6 g	0,3 %	2,2 %
Butanol	33,6 g	6,7 %	45,5 %
Resíduo aquoso	18,3 g	3,7 %	24,8 %

*Rendimento em relação ao material vegetal seco e moído

[#]Rendimento em relação ao extrato metanólico

Na figura 4 é demonstrada a obtenção dos extratos e das frações a partir das raízes de *Wilbrandia ebracteata*.

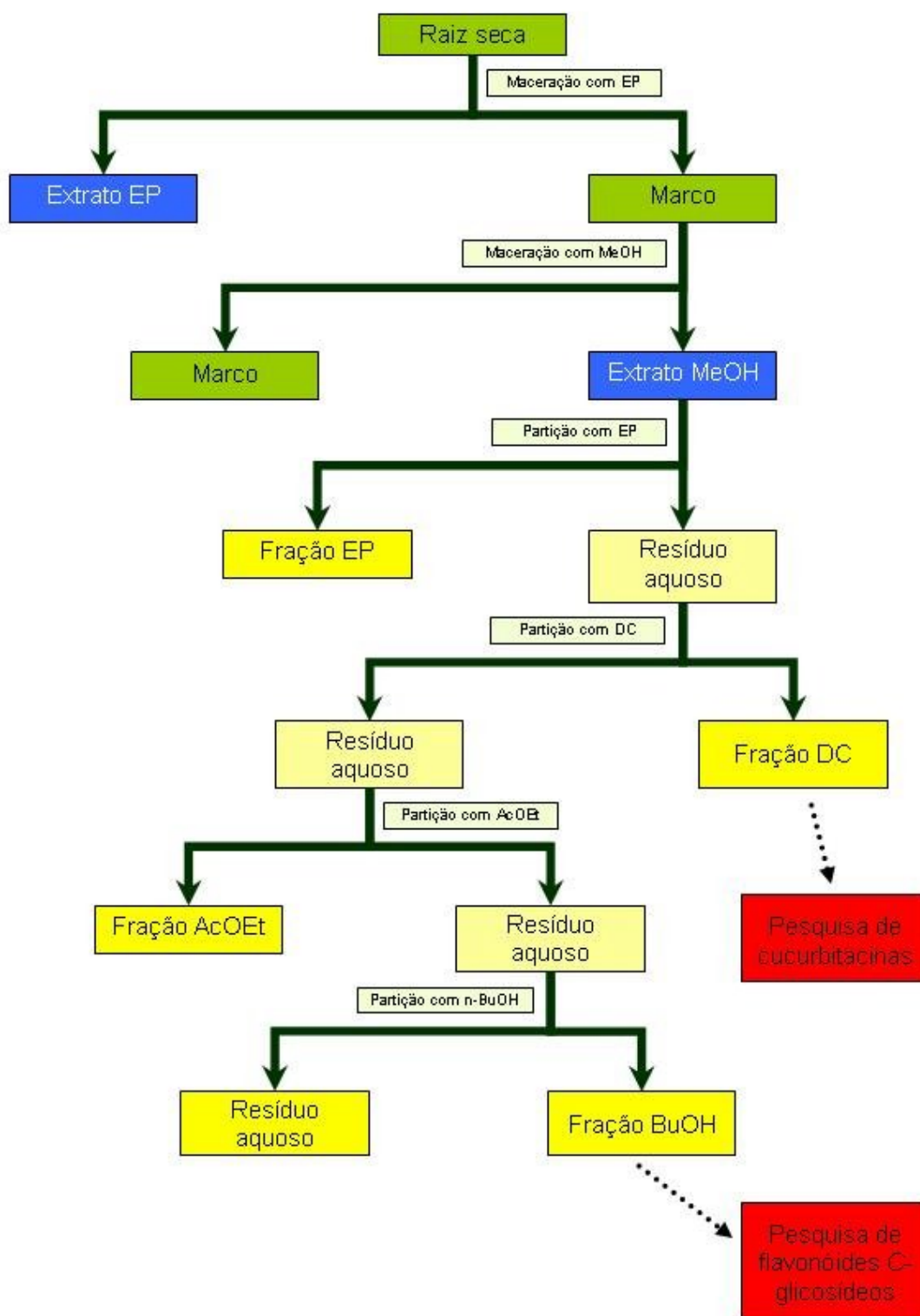


Figura 4: Obtenção dos extratos das raízes de *W. ebracteata* e das frações após o fracionamento do extrato metanólico

4.4 Análise química da fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

4.4.1 Isolamento das substâncias DRI e DRII a partir da fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

O processo de isolamento das substâncias DRI e DRII (Fig. 6) foi realizado a partir de frações cedidas pela Prof^a. Dr^a. Mareni Rocha Farias codificadas como MC₂XII e MC₂XIII (Fig. 5) provenientes da fração diclorometano que foi cromatografada em coluna em gel de sílica (0,063-0,2 mm), eluente éter de petróleo:acetato de etila (1:3,5; v/v) (Farias, 1991). Essas duas frações foram utilizadas porque são compostas pelas substâncias mais polares da fração diclorometano, o que sugere a presença de glicosídeos de cucurbitacinas.

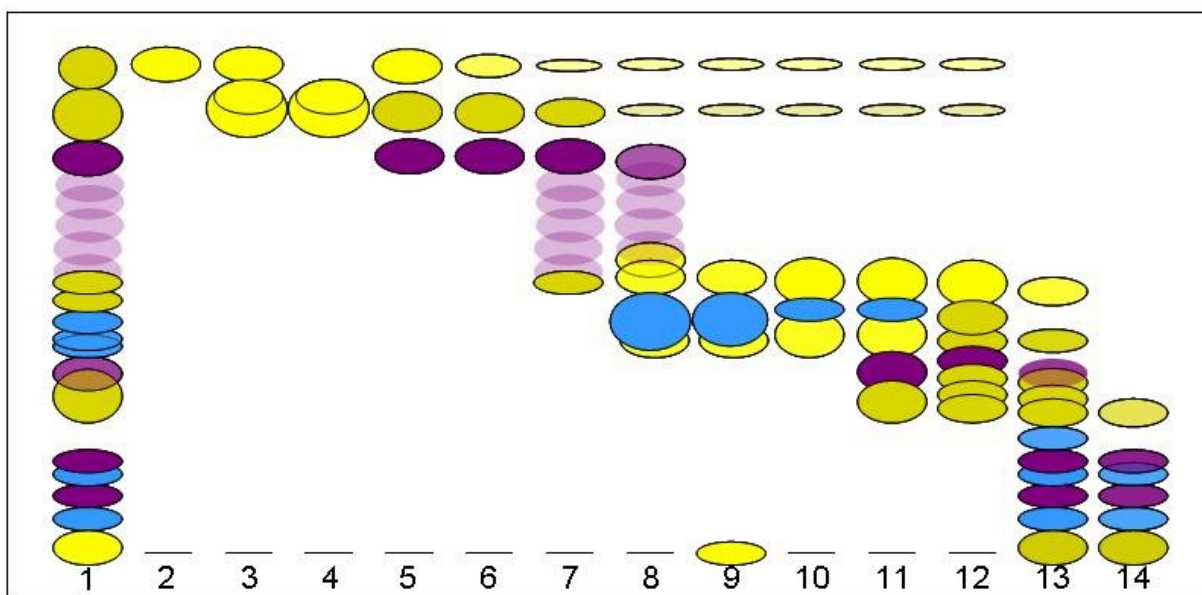


Figura 5: Esquema representativo da CCD realizada pela Prof^a. Dr^a. Mareni Rocha Farias com a fração diclorometano e suas subfrações obtidas após cromatografia em coluna.

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄

Eluente: EP:AcOEt (1:3,5; v/v)

Amostras: 1- fração diclorometano

2- fração MC₂I

3- fração MC₂II

4- fração MC₂III

5- fração MC₂IV

6- fração MC₂V

7- fração MC₂VI

8- fração MC₂VII

9- fração MC₂VIII

10- fração MC₂IX

11- fração MC₂X

12- fração MC₂XI

13- fração MC₂XII

14- fração MC₂XIII

Com a fração MC₂XIII (471 mg) foi realizada cromatografia em coluna em gel de sílica (0,063-0,2 mm), eluente acetato de etila:metanol em polaridade crescente resultando nas frações CC2B (275 mg) e CC2C (132 mg). A fração CC2C foi cromatografada em coluna cromatográfica em gel de sílica, eluente clorofórmio:etanol:água (30:5:0,1; v/v/v) obtendo dessa forma as frações CC3B (31 mg) e CC3E (38 mg). A fração CC3E foi cromatografada em coluna em sílica de fase reversa, eluente acetonitrila:metanol:água (1:1:1; v/v/v) resultando na fração RPC1B (24 mg) que foi cromatografada nas mesmas condições da coluna em sílica de fase reversa descrita resultando no isolamento de DRI (12 mg).

Uma coluna cromatográfica em gel de sílica (0,063-0,2 mm) foi empregada na purificação da fração MC₂XII (378 mg) com eluentes de polaridade crescente compostos por acetato de etila:metanol. Dessa coluna foi obtida a fração CC1B (275 mg) que juntamente com as frações CC2B e CC3B foram cromatografadas através de coluna cromatográfica em gel de sílica, eluente clorofórmio:metanol (5:1; v/v). Essa coluna forneceu a fração CC5B (416 mg) a qual foi cromatografada em coluna em gel de sílica com clorofórmio:etanol:água (30:5:0,1; v/v/v) resultando na fração CC6B (366 mg). A fração CC6B foi cromatografada em cromatografia em coluna em gel de sílica, eluente éter de petróleo:acetato de etila:isopropanol (1:1:0,5; v/v/v) resultando na fração CC8C (429 mg). Aproximadamente metade da fração CC8C (220 mg) foi cromatografada em coluna em sílica de fase reversa, eluente acetonitrila:metanol:água (1:1:1; v/v/v) resultando no isolamento de DRII (78 mg).

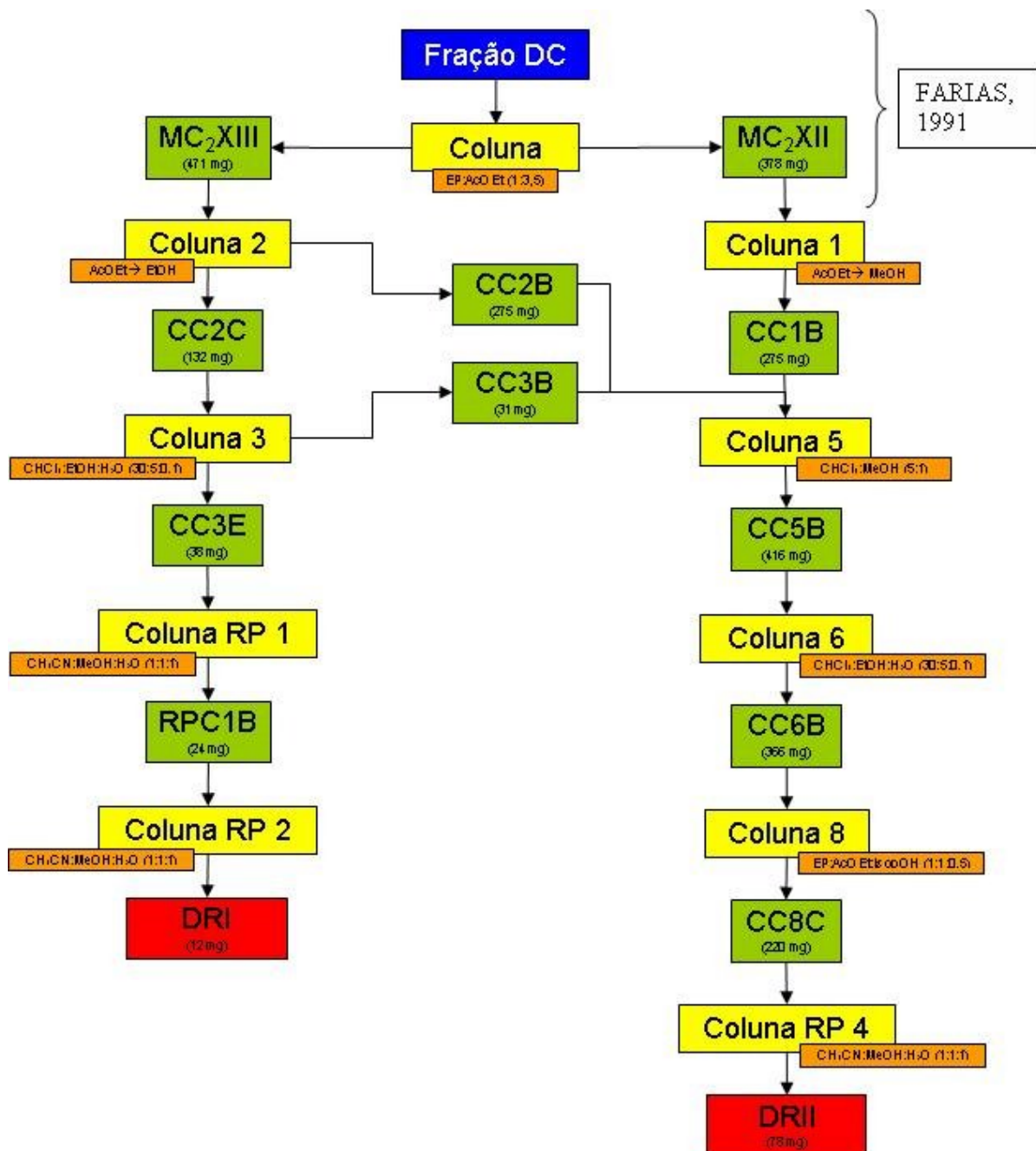


Figura 6: Isolamento das substâncias DRI e DRII a partir da fração diclorometano das raízes de *W. ebracteata*

4.5 Análise química da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

4.5.1 Isolamento das substâncias BRI, BRII, BRIII e BRIV a partir da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

A partir de 5 g da fração butanólica das raízes de *W. ebracteata* foi realizada cromatografia tipo *flash* em sílica para CCD, eluentes diclorometano:metanol com polaridade crescente. Dessa coluna foram obtidas duas frações de interesse, sendo elas V1D e V1E.

A fração V1D (564 mg) foi re-cromatografada em coluna em gel de sílica com acetato de etila:metanol:água (100:16,5:13,5; v/v/v) onde foi obtida a substância BRI (194 mg).

A fração V1E (1,7 g) foi cromatografada em coluna tipo *flash* em gel de sílica com eluentes de polaridade crescente compostos por acetato de etila e metanol. Dessa coluna foi obtida a fração V3C (1,3 g) a qual foi re-cromatografada em coluna tipo *flash* nas mesmas condições cromatográficas resultando a fração V4B (1,0 g). A fração V4B foi cromatografada em coluna em gel de sílica, eluente acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1; v/v/v) resultando 3 substâncias isoladas denominadas BRII (143 mg), BRIII (148 mg) e BRIV (270 mg).

Na figura 7 é demonstrado o processo de isolamento de substâncias BRI, BRII, BRIII e BRIV a partir da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*.

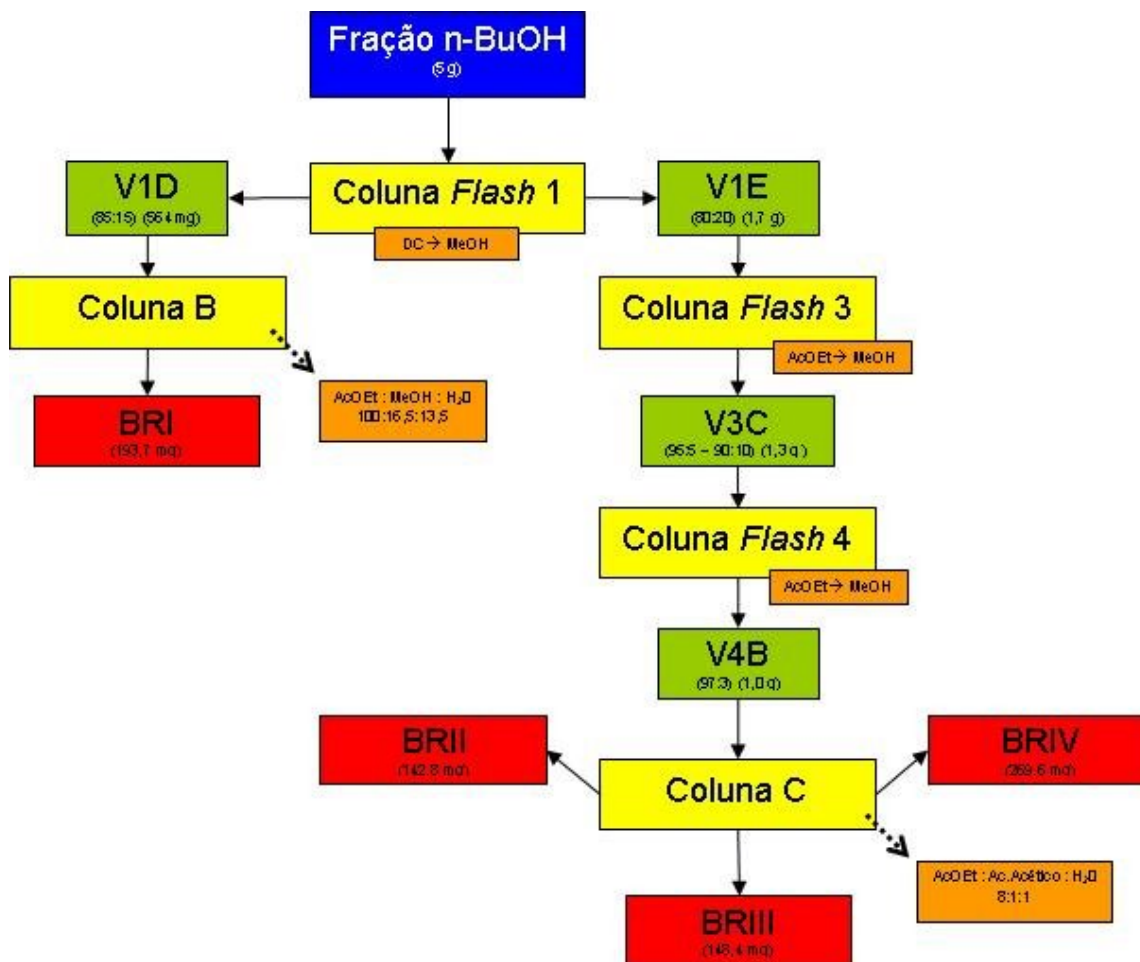


Figura 7: Isolamento das substâncias BRI, BRII, BRIII e BRIV a partir da fração butanólica das raízes de *W. ebracteata*

4.5.2 Análise cromatográfica de compostos da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

As cromatografias em camada delgada foram desenvolvidas em cromatoplacas em gel de sílica 60 F₂₅₄, eluente acetato de etila:ácido fórmico:água (8:1:1; v/v/v) no caso dos compostos com características menos polares, para compostos mais polares foi utilizado acetato de etila:metanol:ácido acético (11:4:0,3; v/v/v). As cromatografias foram reveladas com reagente natural A (1 %) e solução etanólica de polietilenoglicol e observadas sob luz UV 366 nm.

A análise por CLAE da fração butanólica foi realizada através da utilização de uma coluna fenila Bondclone 10 (300 X 3,9 mm; 10 µm), fase móvel acetonitrila na bomba A e solução aquosa de ácido acético 1% (ajuste para pH 3,0 com NaOH)

na bomba B. O gradiente de eluição seguia os seguintes parâmetros: 85 % de B nos primeiros 15 min, 85 – 60 % de B nos 10 min subseqüentes e 60 % de B nos últimos 9 min de análise. A detecção das substâncias ocorreu por absorção UV em 330 nm e o fluxo do eluente foi igual a 1,0 mL/min.

4.6 Obtenção do extrato e das frações das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

4.6.1 Obtenção do extrato a partir das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

A extração foi realizada com cerca de 290 g de folhas secas moídas de *W. ebracteata*, por maceração em etanol comercial, durante o período de 5 dias, na proporção 10 g (droga vegetal) / 100 ml (líquido extrator). O macerado foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida à temperatura inferior a 60 °C. O rendimento do extrato etanólico, também denominado extrato bruto, foi avaliado com base na quantidade de folhas secas e moídas (tabela 11).

Tabela 11: Massa e rendimento do extrato bruto das folhas de *W. ebracteata*

Extrato	Massa	Rendimento*
Etanólico (bruto)	50 g	17,2%

*Rendimento calculado em relação ao material vegetal seco e moído.

4.6.2 Obtenção das frações a partir das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

As frações foram obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto com solventes de polaridade crescente. O extrato bruto foi ressuspenso em água, porém uma porção desse extrato não foi solúvel, a qual foi separada e denominada fração insolúvel em água. A parte solúvel foi particionada com diclorometano (6 x 300 mL) e n-butanol (9 x 300 mL). As frações obtidas foram secas com auxílio de

evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura inferior a 60°C. Os rendimentos das frações foram calculados em relação ao extrato bruto e à matéria-prima vegetal (tabela 12).

Tabela 12: Massas e rendimentos das frações obtidas das folhas de *W. ebracteata*

Frações	Massa	Rendimento MP*	Rendimento EB [#]
Insolúvel em água	14 g	4,8 %	28,0 %
Diclorometano	681 mg	0,2 %	1,4 %
Butanólica	5 g	1,7 %	10,0 %
Resíduo aquoso	8 g	2,8 %	16,0 %

*Rendimento em relação à matéria-prima seca e moída

[#]Rendimento em relação ao extrato bruto

Na figura 8 é demonstrada a obtenção dos extratos e das frações a partir das folhas de *Wilbrandia ebracteata*.

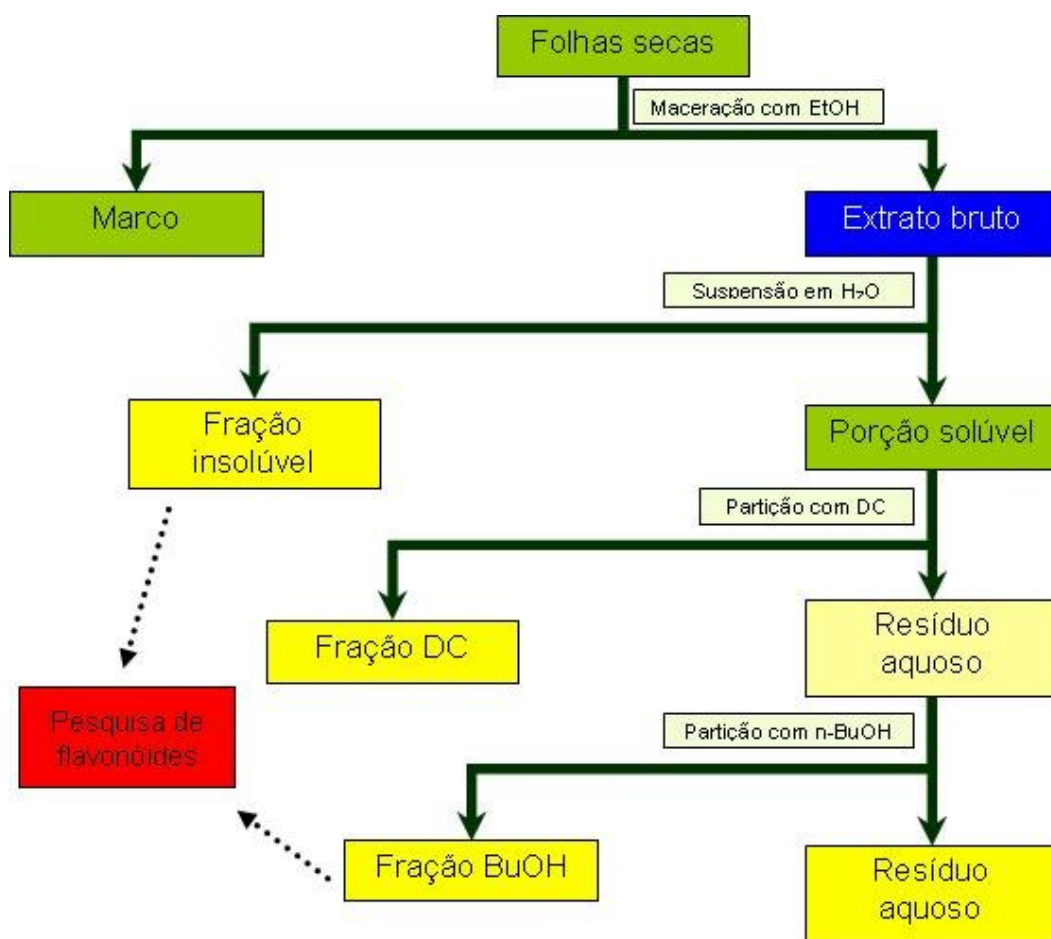


Figura 8: Obtenção do extrato e das frações a partir das folhas de *W. ebracteata*

4.7 Análise química da fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

4.7.1 Isolamento das substâncias BFI e BFII a partir da fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

A partir de 5 g da fração butanólica das folhas de *W. ebracteata* foi realizada cromatografia tipo *flash* em sílica para CCD, eluentes diclorometano:metanol com polaridade crescente, resultando na fração VF1E (1,2 g). Aproximadamente metade da massa obtida dessa fração (486 mg) foi cromatografada em coluna em gel de sílica com acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1,1; v/v/v) resultando nas frações CFA4 (126 mg) e CFA6 (98 mg).

Uma coluna cromatográfica em gel de sílica foi empregada na purificação da fração CFA6, eluente diclorometano:metanol:água (70:20:3; v/v/v), resultando na substância denominada BFI (10 mg).

A fração CFA4 foi cromatografada através de coluna cromatográfica em gel de sílica, eluente clorofórmio:metanol:água (70:20:3; v/v/v). Essa coluna forneceu a fração CFC7 (31 mg), a qual foi cromatografada em coluna em Sephadex[®] LH-20 com metanol, resultando assim na substância BFII (17 mg).

Na figura 9 é apresentado o processo de isolamento de substâncias BFI e BFII a partir da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*.

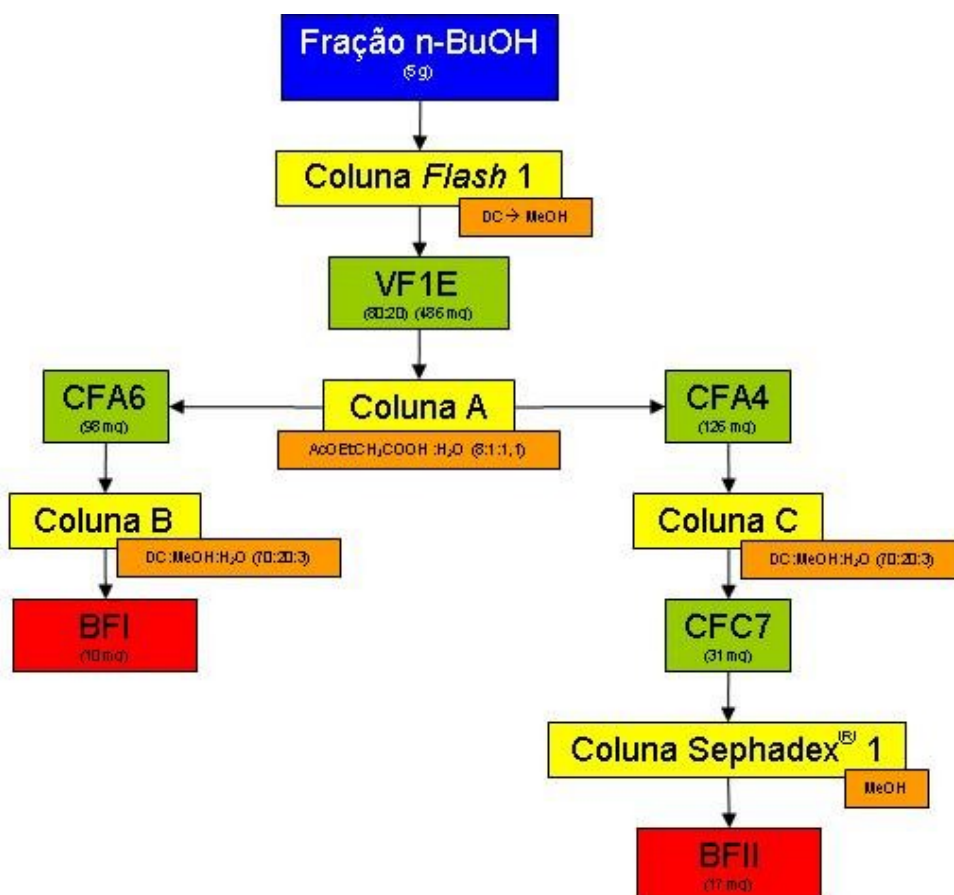


Figura 9: Isolamento das substâncias BFI e BFII a partir da fração butanólica das folhas de *W. ebracteata*

4.7.2 Análise cromatográfica de compostos da fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

As cromatografias em camada delgada foram desenvolvidas em cromatoplasmas em gel de sílica 60 F₂₅₄, eluente acetato de etila:ácido fórmico:água (8:1:1; v/v/v) no caso dos compostos com características menos polares e acetato de etila:metanol:ácido acético (11:4:0,3; v/v/v) para compostos mais polares. As cromatografias foram reveladas com reagente natural A (1 %) e solução etanólica de polietilenoglicol e observadas sob luz UV 366 nm.

A análise por CLAE da fração butanólica foi realizada através da utilização de uma coluna fenila Bondclone 10 (300 X 3,9 mm; 10 µm), fase móvel acetonitrila na bomba A e solução aquosa de ácido acético 1% (ajuste para pH 3,0 com NaOH) na bomba B. O gradiente de eluição seguia os seguintes parâmetros: 85 % de B nos primeiros 15 min, 85 – 60 % de B nos 10 min subsequentes e 60 % de B nos últimos

9 min de análise. A detecção das substâncias ocorreu por absorção UV em 330 nm e o fluxo do eluente foi igual a 1,0 mL/min.

4.8 Análise química da fração insolúvel das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

4.8.1 Isolamento da substância IFI a partir da fração insolúvel em água das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

A partir de 5 g da fração insolúvel em água das folhas de *Wilbrandia ebracteata* foi realizada cromatografia tipo *flash* em sílica para CCD, eluentes clorofórmio:metanol com polaridade crescente. Dessa coluna foi obtida a fração VIF1E (214 mg) que foi cromatografada em coluna em gel de sílica com clorofórmio:metanol (5:1; v/v) onde foi obtida a fração CIF1A (70 mg). Essa por sua vez foi cromatografada em coluna em Sephadex[®] LH-20 com metanol, resultando na substância IFI (10 mg).

Na figura 10 é apresentado o processo de isolamento da substância IFI a partir da fração insolúvel em água da folhas de *Wilbrandia ebracteata*.

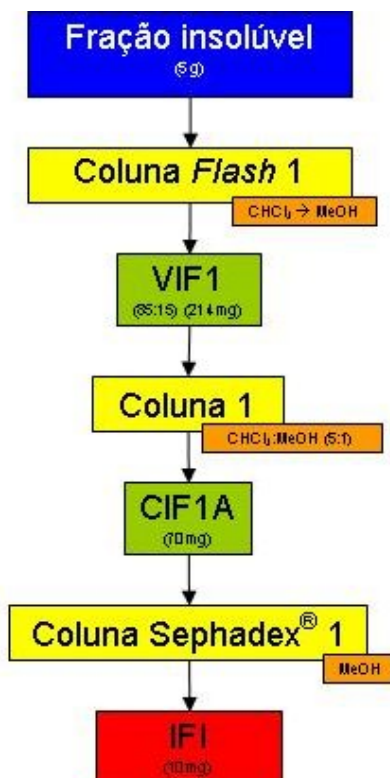


Figura 10: Isolamento da substância IFI a partir da fração insolúvel das folhas de *W. ebracteata*

4.9 Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas

Devido às suas características cromatográficas as substâncias BRI, BRII, BRIII, BRIV, BFI, BFII e IFI foram analisadas através de espectros UV com o auxílio de reagentes de deslocamento para a elucidação da porção aglicônica de flavonóides como descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970) e Markham (1982). Além disso, as substâncias BRI, BRII, BFI e BFII foram comparadas cromatograficamente com amostras autênticas de flavonóides C-glicosídeos e as substâncias BRIII, BRIV e IFI foram analisadas através de seus espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).

Para as substâncias DRI e DRII foram importantes seus espectros na região do infravermelho (IV), suas características cromatográficas, em especial as colorações quando reveladas com os reagentes cromogênicos vanilina-fosfórica e cloreto-férrico (2,5 %) além de seus espectros de RMN.

Para análise dos espectros de RMN foram utilizados como material bibliográfico, além de artigos que serão descritos para cada substância, as seguintes

referências: BREIATMAIER (1993); AGRAWAL (1989); RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS (2001) e SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE (2005).

4.10 Análise cromatográfica comparativa entre as frações butanólicas das raízes e das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

As frações butanólicas das raízes e das folhas de *Wilbrandia ebracteata* foram comparadas cromatograficamente através da utilização de cromatografia em camada delgada e CLAE.

A cromatografia em camada delgada foi desenvolvida em cromatoplaça em gel de sílica 60 F₂₅₄, eluente acetato de etila:ácido fórmico:água (8:1:1; v/v/v), revelada com reagente natural A (1 %) e solução etanólica de polietilenoglicol observada sob luz UV 366 nm.

As análises das frações butanólicas por CLAE foram realizadas através da utilização de uma coluna fenila Bondclone 10 (300 X 3,9 mm; 10 µm), fase móvel acetonitrila na bomba A e solução aquosa de ácido acético 1% (ajuste para pH 3,0 com NaOH) na bomba B. O gradiente de eluição seguia os seguintes parâmetros: 85 % de B nos primeiros 15 min, 85 – 60 % de B nos 10 min subseqüentes e 60 % de B nos últimos 9 min de análise. A detecção das substâncias ocorreu por absorção UV em 330 nm e o fluxo do eluente foi igual a 1,0 mL/min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho é descrita a análise de raízes e folhas de *Wilbrandia ebracteata*. Das raízes foram analisadas as frações diclorometano e butanólica com o intuito de isolar cucurbitacinas e flavonóides C-glicosídeos, respectivamente. Das folhas foram analisadas as frações, diclorometano, butanólica e insolúvel em água.

5.1 Análise química das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

As frações diclorometano e butanólica obtidas a partir do extrato metanólico foram analisadas buscando o isolamento de cucurbitacinas e flavonóides C-glicosídeos, respectivamente. Nesta seção serão descritos os resultados e as discussões referentes à fração diclorometano, seguidos pelos da fração butanólica.

5.1.1 Análise química da fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

5.1.1.1 Isolamento das substâncias DRI e DRII a partir da fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

A presente análise foi realizada visando o isolamento de compostos mais polares dos até então descritos para essa fração das raízes de *Wilbrandia ebracteata* (FARIAS et al., 1993; SCHENKEL et al., 1992) com a hipótese da possível presença de glicosídeos de cucurbitacinas com anel A aromático similares àqueles descritos por Himeno e colaboradores (1992; 1993; 1994a; 1994b; 1994c). Após a realização de diferentes processos cromatográficos foi possível isolar das raízes de *Wilbrandia ebracteata* duas substâncias, denominadas DRI (15 mg) e DRII (78 mg).

5.1.1.2 Identificação e elucidação estrutural das substâncias DRI e DRII a partir da fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

5.1.1.2.1 Identificação e elucidação estrutural de DRI

A substância DRI apresentou Rf igual a 0,57 quando cromatografada em placas de gel de sílica, eluente clorofórmio:metanol (5:1; v/v). Essa substância não apresenta extinção de fluorescência quando observada na luz UV 254 nm e adquire coloração azul quando revelada com vanilina fosfórica. Esses dados sugeriram que o composto isolado pudesse ser uma cucurbitacina com cadeia lateral saturada. Estruturas com grupamentos α,β -insaturados na cadeia lateral geralmente apresentam coloração violeta quando revelados com vanilina fosfórica, enquanto que a coloração azul normalmente indica uma 22-deoxo-cucurbitacina (GMELIN, 1964; ZIELINSKI; KONOPA, 1968; SNATZKE et al., 1967).

O espectro IV (Fig. 11) apresenta uma banda alargada em 3404 cm^{-1} sugerindo a presença ligações O-H de álcool, o que é confirmado por duas bandas alargadas em 1080 e 1033 cm^{-1} provenientes de estiramentos C-O de álcool. Esse dado somado a polaridade da substância na cromatografia em camada delgada sugere a presença de açúcar na molécula. Além disso, na região de 1685 cm^{-1} ocorre apenas uma banda característica de carbonila de cetona e em 1375 cm^{-1} uma banda característica de metilas (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 1996), o que é compatível com o núcleo cucurbitano (VALENTE, 2004; CHEN et al., 2005).

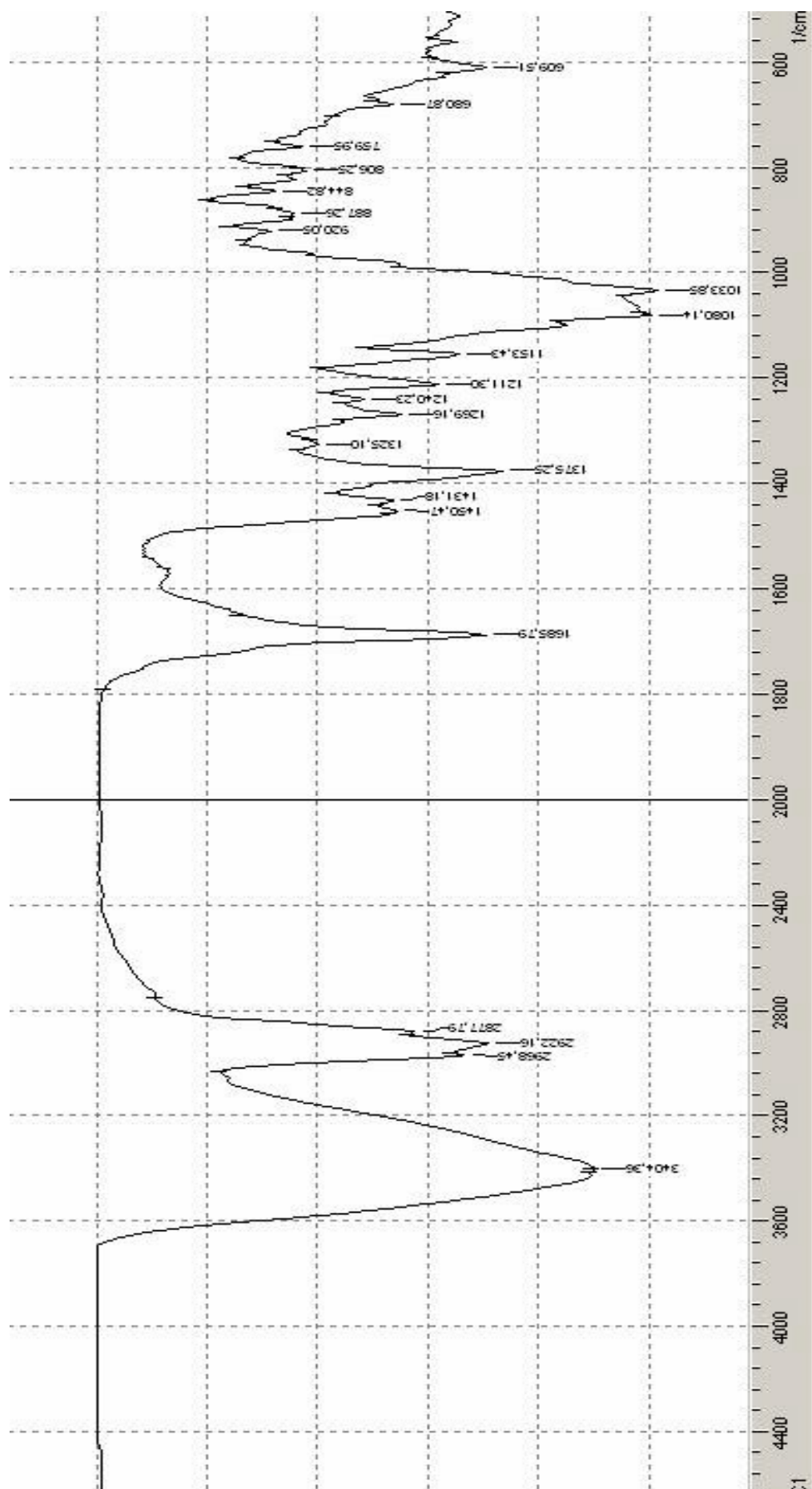


Figura 11: Espectro IV da substância DR1

Para a elucidação estrutural foram obtidos espectros de ^1H -RMN e COSY da substância em sua forma original (Figs. 12 e 13) e acetilada, essa última por apresentar resultado melhor na região dos hidrogênios do açúcar. O espectro obtido com a substância original foi comparado com espectros da literatura (FARIAS, 1991) para cucurbitacinas com as características citadas. Nas tabelas 13 e 14 são apresentadas as comparações entre DRI e as substâncias $16\alpha,23\alpha$ -epoxi- $2\beta,3\beta,20\beta$ -triidroxí- $10\alpha,23\alpha$ -cucurbit-5,24-dien-11-ona e $16\alpha,23\alpha$ -epoxi- $2\beta,3\beta,20\beta$ -triidroxí- $10\alpha,23\beta$ -cucurbit-5,24-dien-11-ona, codificadas como W-6 e W-7, respectivamente no trabalho de Farias (1991). Nessas tabelas estão destacados em cinza os valores diferentes entre W-6 e W-7.

Tabela 13: Comparação dos dados espectrais de ^1H -RMN da substância DRI com a substância W-6 descritas por Farias (1991)

H	M	W-6 (300 MHz; CDCl_3)			DRI (400 MHz; CDCl_3)		
		δ (ppm)	J (Hz)	COSY	δ (ppm)	J (Hz)	COSY
1 α	m	1,64	12 4 4 1	H-1 β H-2 H-10 H-3	1,64		H-1 β H-2 H-10 H-3
1 β	ddd	1,44	12 12 11	H-1 α H-10 H-2	1,39		H-1 α
2	ddd	3,90	11 4 3	H-1 α H-1 β H-3	3,91		H-1 α H-3
3	dd	3,45	3 1	H-2 H-1 α	3,86		H-2 H-1 α
6	ddd	5,71	6 2 2	H-7 α H-7 β H-10	5,66		H-7 α
7 α	m	1,90	19 6 2	H-7 β H-6 H-10	1,86		H-7 β H-6
7 β	m	2,43	19 8 3 2	H-7 α H-8 H-10 H-6	2,38		H-7 α H-8 H-10
8	d	1,97	8 1	H-7 β Me-32	1,97		H-7 β
10	m	2,27	12 4 3 2 2	H-1 α H-1 β H-7 α H-7 β H-6	2,29		H-1 α
12 α	dd	3,00	14 1,5	H-12 β Me-18	3,04	14 1,5	H-12 β
12 β	d	2,43	14	H-12 α	2,44	14	H-12 α
15 α	dd	1,37	13 3,5	H-15 β H-16	1,37		H-15 β H-16
15 β	m	1,83	13 10	H-15 α H-16 Me-32	1,83		H-15 α H-16
16	ddd	4,55	10 10 3,5	H-17 H-15 β H-15 α	4,55		H-17 H-15 β H-15 α
17	d	1,96	10	H-16 Me-18	1,95		H-16 Me-18
22 α	dd	1,89	14 7	H-22 β H-23	1,86		H-22 β H-23
22 β	dd	1,48	14 2	H-22 α H-23	1,47		H-22 α

Tabela 13: Comparação dos dados espectrais de ^1H -RMN da substância DRI com a substância W-6 descritas por Farias (1991)

H	M	W-6 (300 MHz; CDCl_3)			DRI (400 MHz; CDCl_3)		
		δ (ppm)	J (Hz)	COSY	δ (ppm)	J (Hz)	COSY
23	ddd	4,68	8 7 2	H-24 H-22 α H-22 β	4,68	7 2	H-24 H-22 α
24	d sept	5,91	8 1,5	H-23 Me-26 Me-27	5,91	8 1,5	H-23
Me-18	d	0,94	1,5	H-12 α H-17	0,92	1,5	H-12 α H-17
Me-19	s	1,13			1,11		
Me-21	s	1,29			1,30		
Me-26	d	1,65	1,5	H-24	1,67		H-24
Me-27	d	1,72	1,5	H-24	1,72		H-24
Me-30	s	0,99		Me-31	0,97		Me-31
Me-31	s	1,22		Me-30	1,25		Me-30
Me-32	br s	1,18		H-17 H-8	1,19		

M = multiplicidade

Estão destacados os valores diferentes entre as substâncias W-6 e W-7 (cinza)

Tabela 14: Comparação dos dados espectrais de ^1H -RMN da substância DRI com a substância W-7 descritas por Farias (1991)

H	M	W-7 (300 MHz; CDCl_3)			DRI (400 MHz; CDCl_3)		
		δ (ppm)	J (Hz)	COSY	δ (ppm)	J (Hz)	COSY
1 α	m	1,64	12 4 4 1	H-1 β H-2 H-10 H-3	1,64		H-1 β H-2 H-10 H-3
1 β	ddd	1,44	12 12 11	H-1 α H-10 H-2	1,39		H-1 α
2	ddd	3,90	11 4 2,5	H-1 α H-1 β H-3	3,91		H-1 α H-3
3	dd	3,45	2,5 1	H-2 H-1 α	3,86		H-2 H-1 α
6	ddd	5,71	6 2 2	H-7 α H-7 β H-10	5,66		H-7 α
7 α	m	1,90	19 6 2	H-7 β H-6	1,86		H-7 β H-6
7 β	m	2,43	19 8 3 2	H-7 α H-8 H-6	2,38		H-7 α H-8 H-10
8	d	1,97	8 1	H-7 β Me-32	1,97		H-7 β
10	m	2,27	12 4 3 2 2	H-1 α H-1 β H-6	2,29		H-1 α
12 α	dd	3,00	14 1,5	H-12 β Me-18	3,04	14 1,5	H-12 β
12 β	d	2,44	14	H-12 α	2,44	14	H-12 α
15 α	dd	1,46	14 4	H-15 β H-16	1,50		H-15 β
15 β	m	1,84	14 10	H-15 α H-16 Me-32	1,83		H-15 α H-16
16	ddd	4,35	10 10 4	H-17 H-15 β H-15 α	4,35		H-17 H-15 β
17	d	1,93	10	H-16 Me-18	1,95		H-16 Me-18
22 α	dd	1,45	14 11	H-22 β H-23	1,45		H-22 β H-23
22 β	dd	1,35	14 3	H-22 α H-23	1,36		H-22 α H-23

Tabela 14: Comparação dos dados espectrais de ^1H -RMN da substância DRI com a substância W-7 descritas por Farias (1991)

H	M	W-7 (300 MHz; CDCl_3)			DRI (400 MHz; CDCl_3)		
		δ (ppm)	J (Hz)	COSY	δ (ppm)	J (Hz)	COSY
23	ddd	4,53	11 8 3	H-24 H-22 α H-22 β	4,55		H-24 H-22 α H-22 β
24	d sept	5,13	8 1,5	H-23 Me-26 Me-27	5,15	8 1,5	H-23 Me-26 Me-27
Me-18	d	0,90	1,5	H-12 α H-17	0,92	1,5	H-12 α H-17
Me-19	s	1,13			1,11		
Me-21	s	1,30			1,30		
Me-26	d	1,67	1,5	H-24	1,67		H-24
Me-27	d	1,70	1,5	H-24	1,72		H-24
Me-30	s	0,99		Me-31	0,97		Me-31
Me-31	s	1,22		Me-30	1,25		Me-30
Me-32	br s	1,17		H-17 H-8	1,19		

M = multiplicidade

Estão destacados os valores diferentes entre as substâncias W-6 e W-7 (cinza)

A comparação indica deslocamentos químicos e multiplicidades similares para a maioria dos sinais. Dessa forma, a aglicona de DRI foi identificada como sendo a mistura de dois isômeros anteriormente descritos por Farias (1991), porém na forma de heterosídeos.

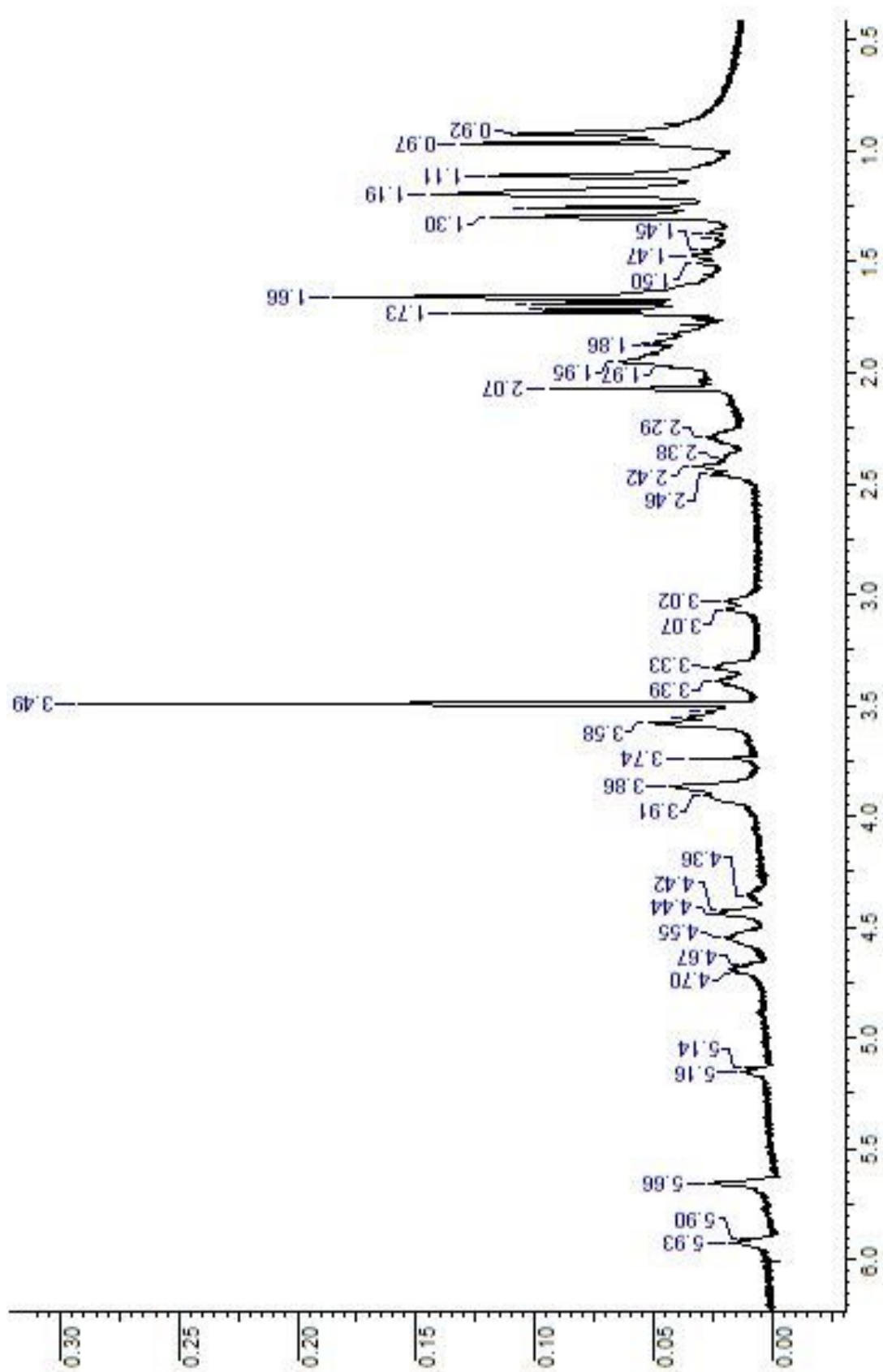


Figura 12: Espectro $^1\text{H-NMR}$ da substância DRI em CDCl_3

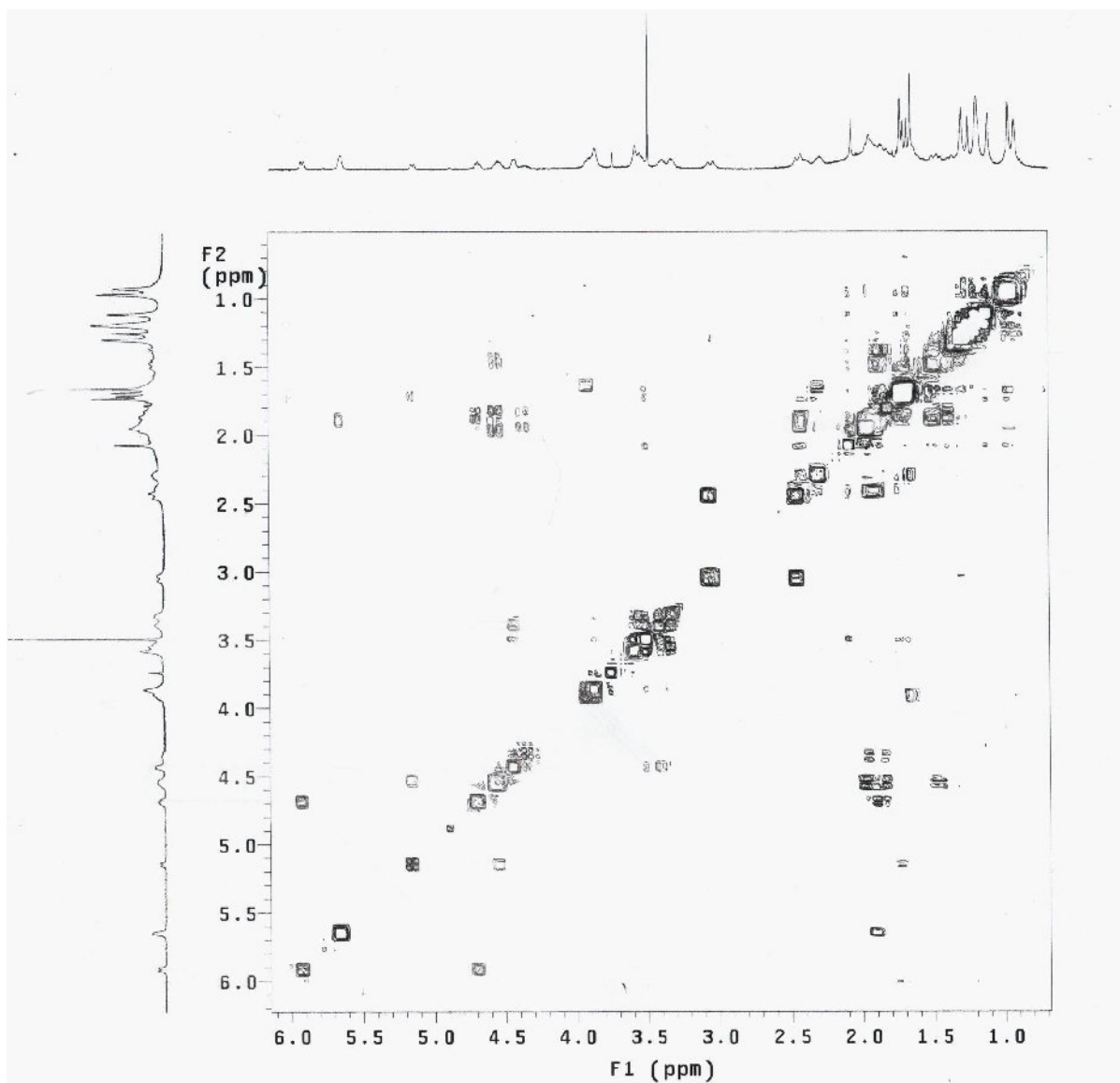


Figura 13: Espectro COSY da substância DRI em CDCl₃

Os espectros ^1H -RMN e COSY (Figs. 14-18) de DRI acetilada foram analisados para verificar qual o tipo de açúcar e em que posição esse se liga à aglicona. Na região próxima a 2,0 ppm podem ser visualizados cinco sinais que sugerem a presença de metilas ligadas à carbonila de éster, ou seja, os sinais correspondentes às acetilas. Quatro dessas acetilas apresentam valores próximos, enquanto uma delas está mais afastada, o que sugere um açúcar com quatro hidroxilas, sendo a outra acetila proveniente da hidroxila da aglicona. Para as cucurbitacinas glicosiladas encontradas na literatura (Chen et al., 2005) glicose é o açúcar mais frequentemente ligado a aglicona, sendo assim, foi admitido glicose como o açúcar ligado as geninas. Na tabela 15 é mostrada a comparação entre sinais de hidrogênios da região de açúcar obtidos para DRI acetilada e para matesaponina 2 peracetilada (GOSMANN et al., 1995).

Tabela 15: Comparação entre os sinais de hidrogênio do açúcar para matesaponina 2 peracetilada (GOSMANN et al., 1995) e DRI acetilada

H	M	Matesaponina 2 peracetilada (300 MHz; CDCl_3)	DRI acetilada (400 MHz; CDCl_3)	
		δ (ppm)	δ (ppm)	COSY
1'	d	4,63	4,63 ($J = 7,93$ Hz)	H-2'
2'	t	4,92	4,92	H-1' H-3'
3'	t	5,0-5,4	5,16	H-2' H4'
4'	t	5,0-5,4	5,06	H-3' H-5'
5'	m	3,48	3,70	H-4' H-6a' H-6b'
6a'	dd	4,21	4,29	H-5' H-6b'
6b'	dd	4,05	4,12	H-5' H6a'

M = Multiplicidade

A similaridade dos sinais obtidos para DRI com a glicose, juntamente com as correlações observadas através do COSY, sugerem que o açúcar ligado às geninas é a glicose. Além disso, a constante de acoplamento observada para H-1' ($J = 7,93$ Hz) sugere configuração β para a glicopiranosose (LEMIEUX; KOTO, 1974; AGRAWAL, 1992).

Ainda no espectro ^1H -RMN da substância DRI acetilada ocorre um singlete em 4,97 ppm que não ocorria no espectro ^1H -RMN da substância em sua forma original. Esse singlete não está correlacionado através do COSY com nenhum sinal correspondente aos hidrogênios da porção açúcar da molécula, sendo então atribuído à aglicona da mesma. Os hidrogênios que podem sofrer deslocamento químico após a reação de acetilação da substância são aqueles ligados aos carbonos que apresentam uma hidroxila ligada a eles. Na porção aglicônica da molécula ocorrem hidroxilas nas posições 2, 3 e 20, sendo que as hidroxilas mais reativas são as ligadas aos carbonos 2 e 3, o que sugere que o açúcar da molécula e a reação de acetilação ocorrem nessas posições. Por ser um singlete, o sinal em 4,97 ppm pode ser atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 3. Dessa forma, foi possível concluir que a hidroxila em 3 estava na forma livre antes da reação de acetilação com a substância DRI, sendo assim, foi possível afirmar que a glicose está ligada à aglicona na posição 2.

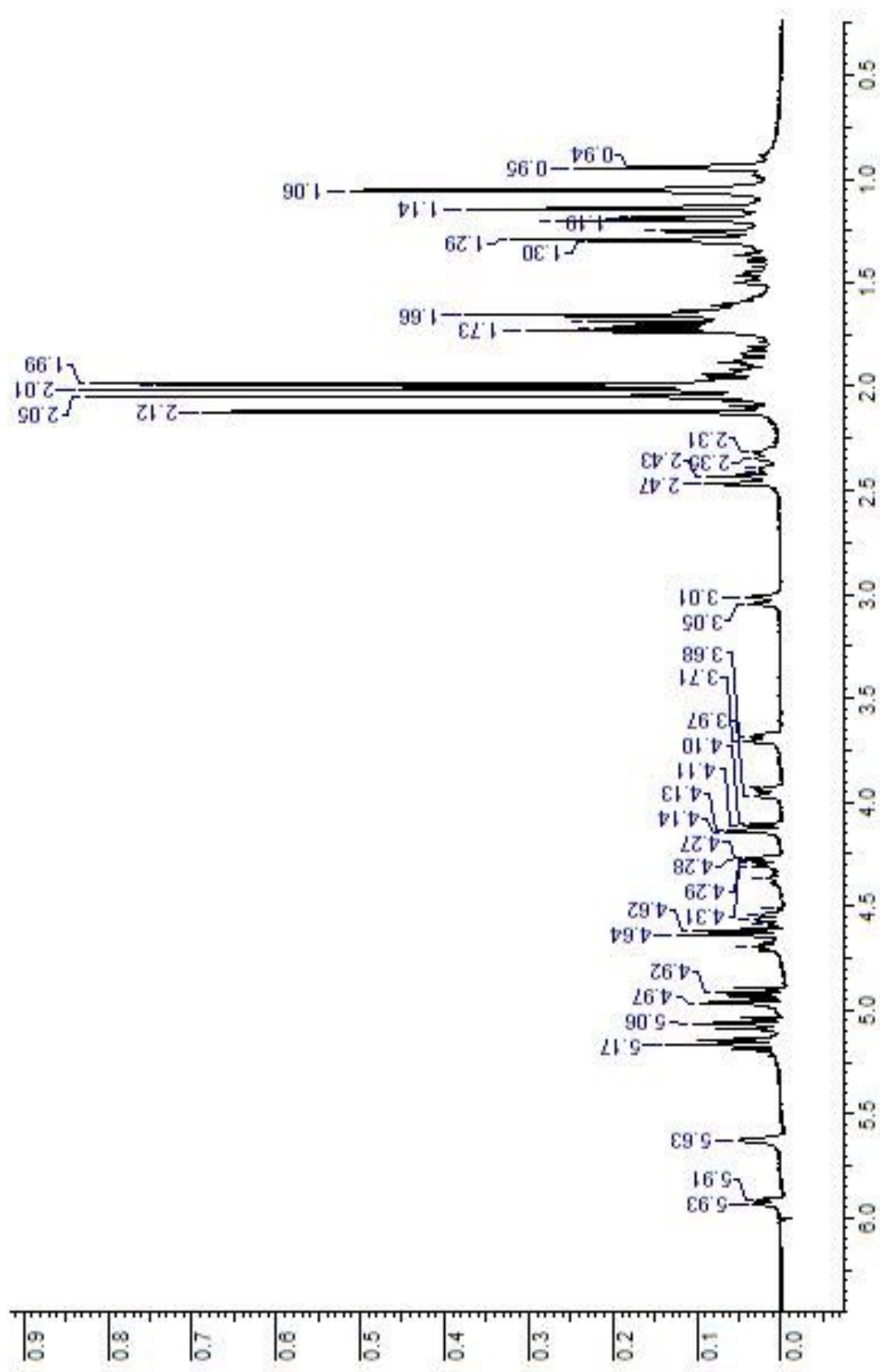


Figura 14: Espectro $^1\text{H-NMR}$ da substância DRI acetilada em CDCl_3

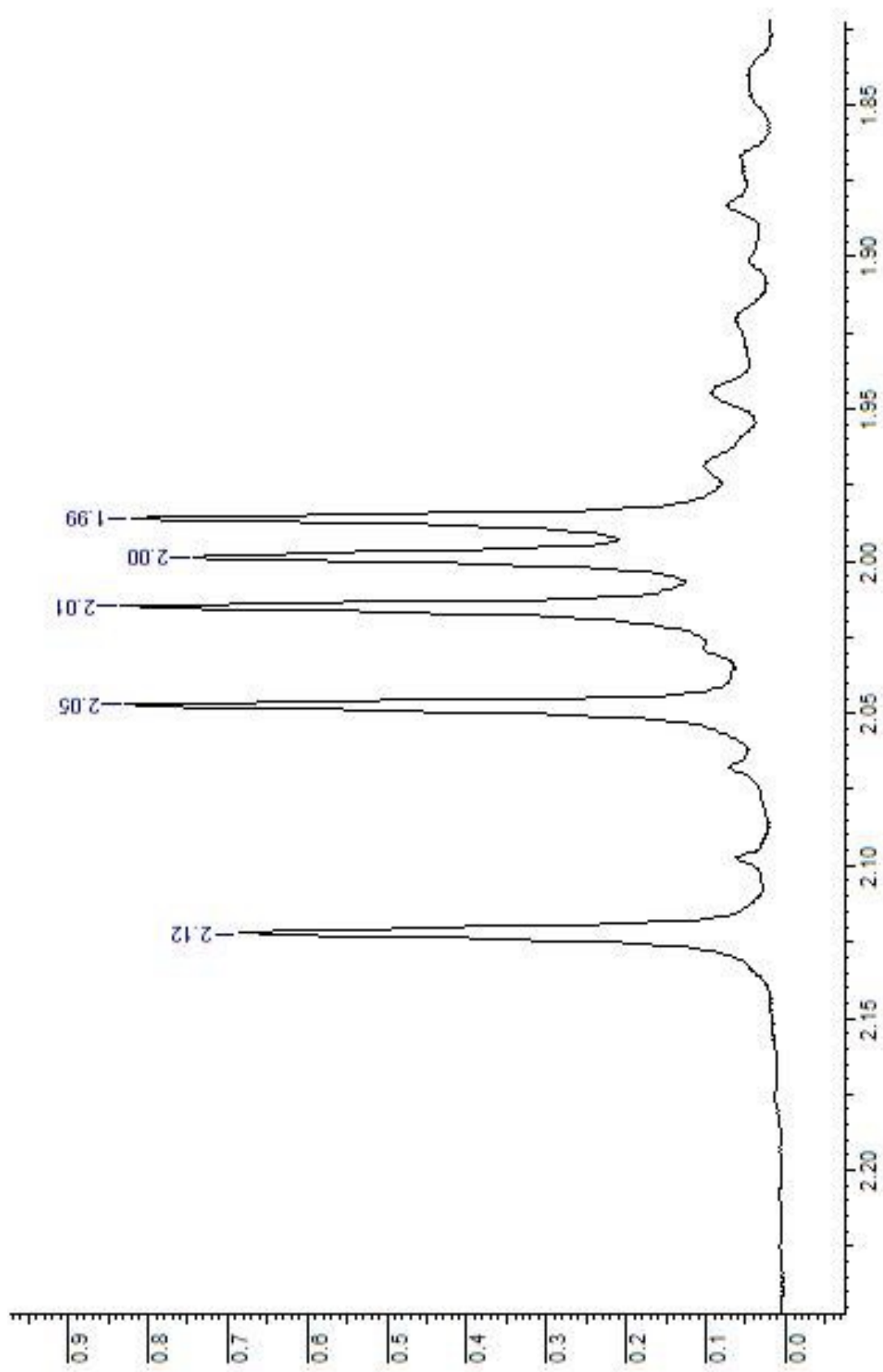


Figura 15: Espectro ^1H -RMN ampliado da substância DRI acetilada em CDCl_3

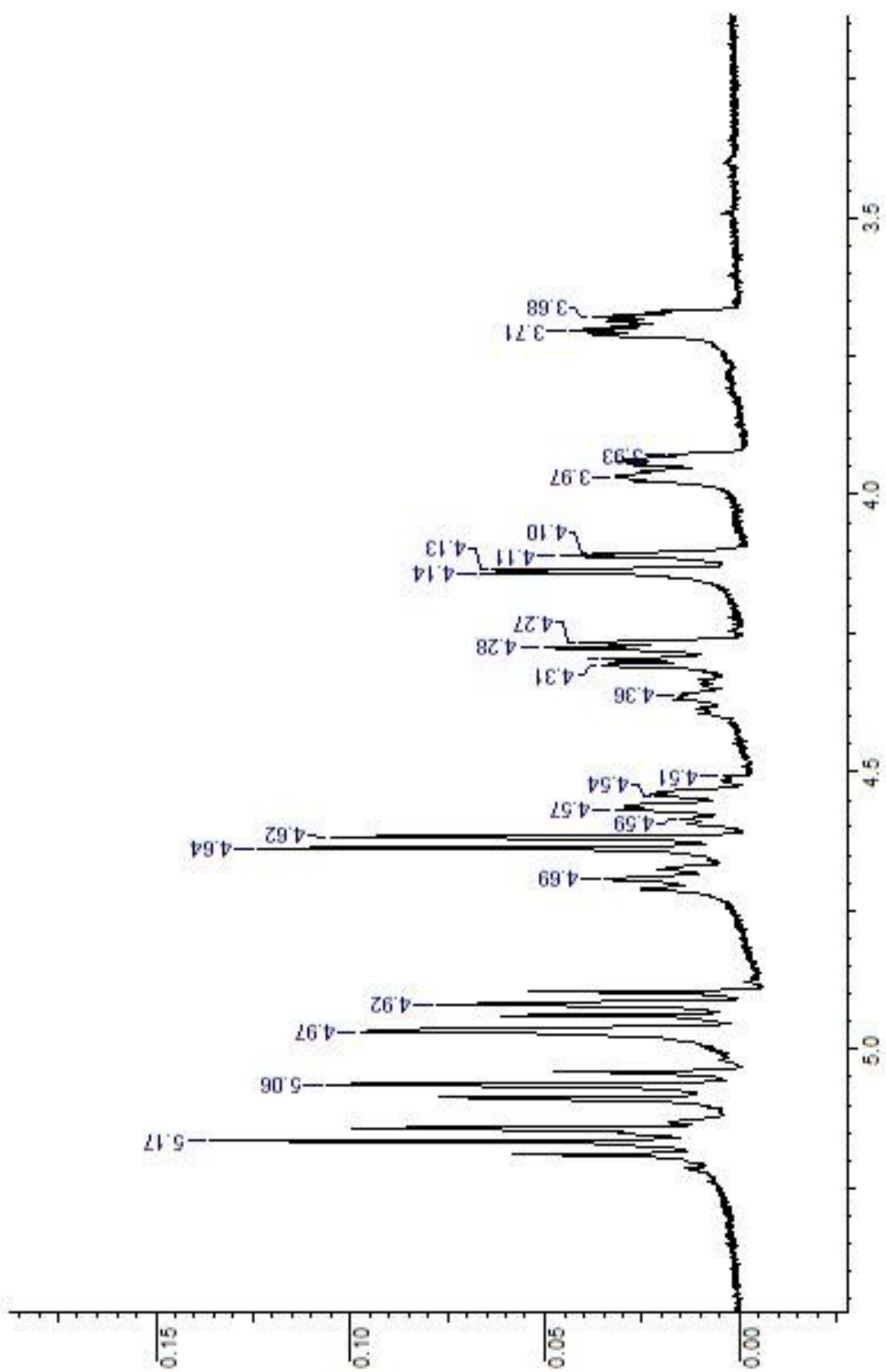


Figura 16: Espectro $^1\text{H-NMR}$ ampliado da substância DRI acetilada em CDCl_3

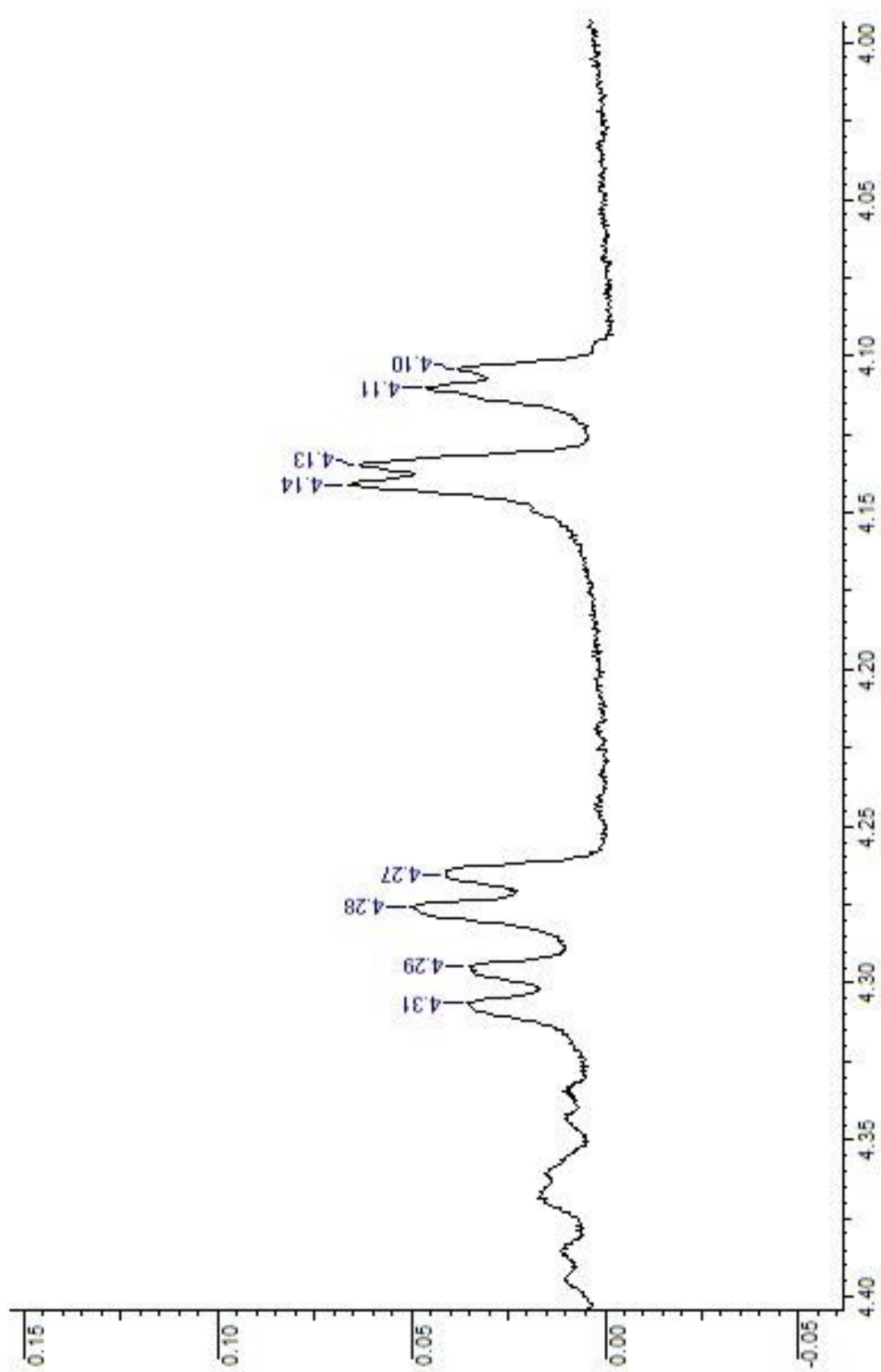


Figura 17: Espectro $^1\text{H-NMR}$ ampliado da substância DRI acetilada em CDCl_3

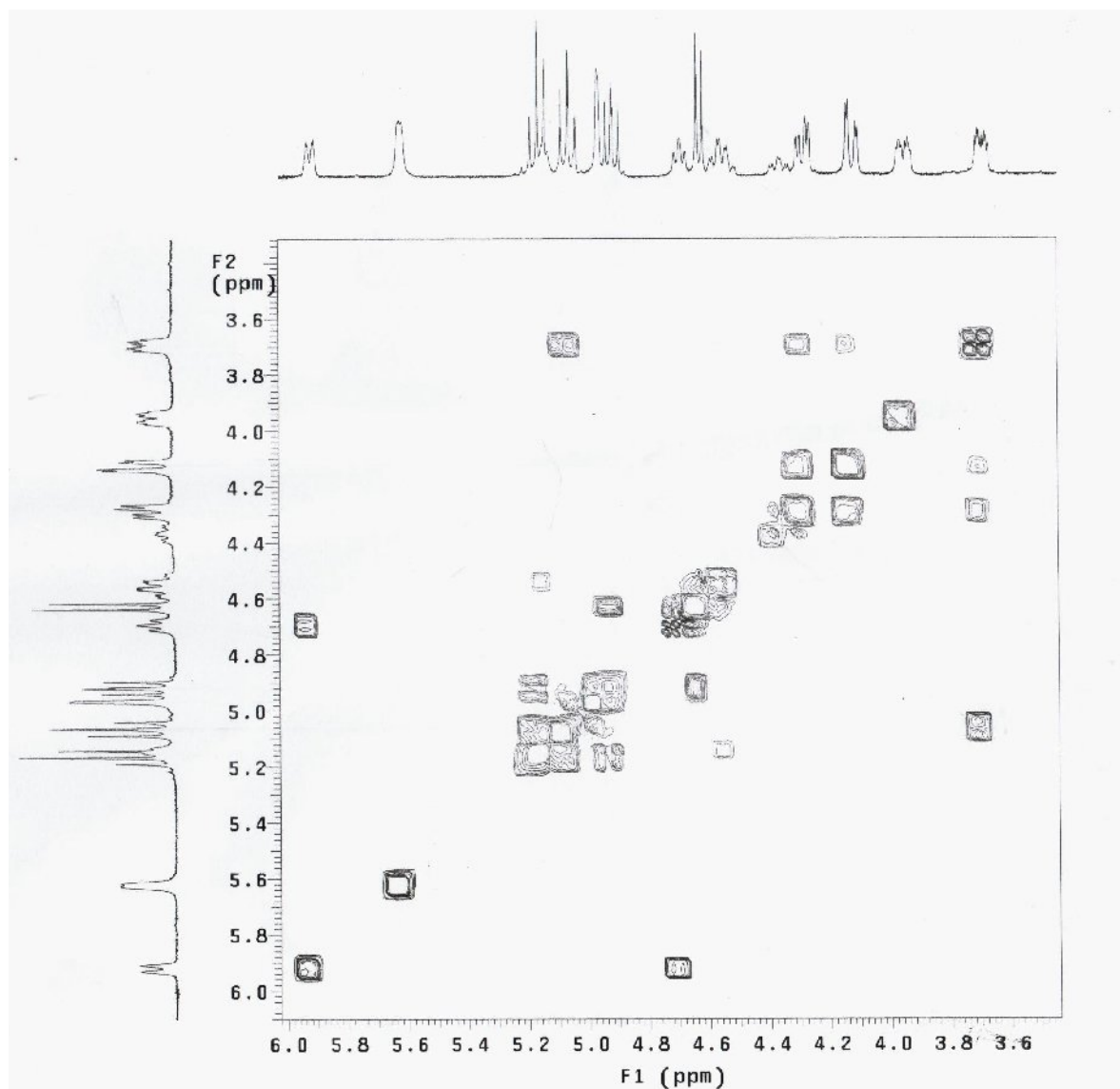


Figura 18: Espectro COSY ampliado da substância DRI acetilada em CDCl_3

Frente aos resultados e discussões é possível afirmar que a substância DRI é uma mistura dos isômeros descritos por Farias (1991) e Schenkel e colaboradores (1992) na forma de 2-O- β -glicopiranosídeo, são elas: 16 α ,23 α -epoxi-2-O- β -glicopiranosil-3 β ,20 β -diidroxil-10 α ,23 β -cucurbit-5,24-dien-11-ona e 16 α ,23 α -epoxi-2-O- β -glicopiranosil-3 β ,20 β -diidroxil-10 α ,23 α -cucurbit-5,24-dien-11-ona (Fig. 19). Não há na literatura qualquer menção sobre o isolamento dessas cucurbitacinas na forma glicosilada.

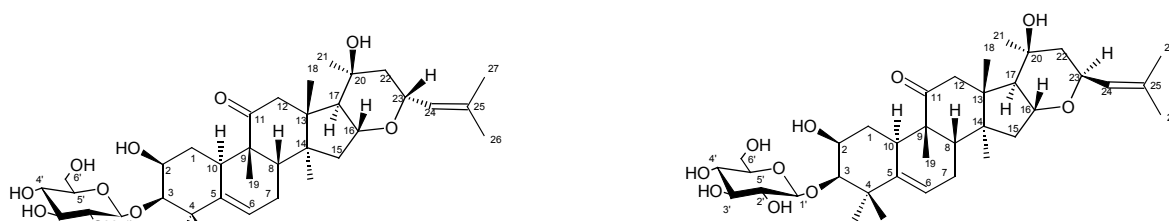


Figura 19: Fórmulas estruturais das substâncias denominadas DRI

5.1.1.2.2 Identificação e elucidação estrutural de DRII

A substância DRII fundiu entre 150,5 – 151,2 °C e apresentou Rf igual a 0,69 quando cromatografada em placas de gel de sílica, eluente clorofórmio:metanol (5:1; v/v). Essa substância não apresenta extinção de fluorescência quando observada na luz UV 254 nm, adquire coloração amarela quando revelada com vanilina fosfórica e não reage quando revelada com solução alcoólica de cloreto férrico 2,5 %. Devido às colorações adquiridas com os reagentes cromogênicos, foi possível sugerir que a estrutura apresenta cadeia lateral saturada, já que cucurbitacinas com insaturação na cadeia lateral apresentam coloração violeta quando reveladas com vanilina fosfórica, além de não apresentar sistema diosfenol no anel, pois se assim houvesse reagiria com cloreto férrico (GMELIN, 1964; ZIELINSKI; KONOPA, 1968).

O espectro IV (Fig. 20) apresenta uma banda alargada em 3421 cm^{-1} sugerindo a presença de ligações O-H de álcool, o que é confirmado por três bandas alargadas em 1024, 1056 e 1078 cm^{-1} provenientes de estiramentos C-O de álcool. Esse dado somado a polaridade da substância na cromatografia em camada delgada sugere a presença de açúcar na molécula. Além disso, na região das carbonilas (1800 – 1685 cm^{-1}) ocorrem duas ou mais bandas, sendo a banda em 1710 cm^{-1} característica de carbonila de éster, o que indica a presença de uma acetila. Segundo a literatura (CHEN et al., 2005) as posições mais comuns para as acetilas nas cucurbitacinas ocorrem nos carbonos 25 e 16. Em 1369 cm^{-1} ocorre banda característica de metilas (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 1996), que são estruturas compatíveis com o núcleo cucurbitano (VALENTE, 2004; CHEN et al., 2005).

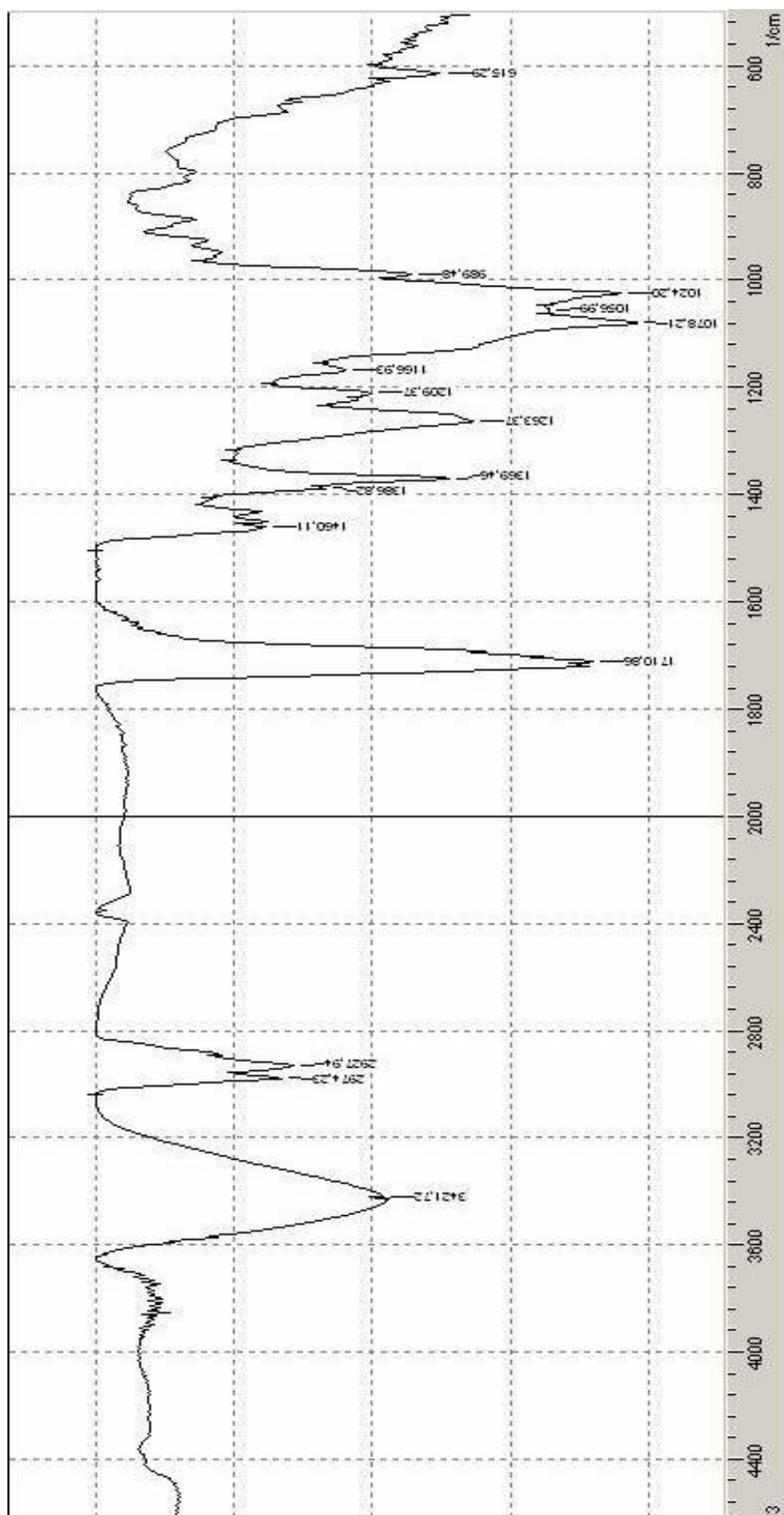


Figura 20: Espectro IV da substância DR II

Com a hipótese de tratar-se de um glicosídeo, DRII foi hidrolisada em meio ácido e as porções aglicona e açúcar provenientes da hidrólise foram cromatografadas em cromatografias de camada delgada. O observado foi que a aglicona degradou formando seis compostos com coloração roxa após revelação com vanilina fosfórica e aquecimento. Na porção açúcar foi observada apenas uma mancha quando revelada com anisaldeído sulfúrico e aquecimento cujo Rf e coloração eram idênticos aos apresentados pelo padrão de glicose.

Para a elucidação estrutural foram obtidos espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY e HSQC da substância em sua forma original (Figs. 21-27). Os espectros obtidos foram comparados com espectros da literatura para cucurbitacinas com características similares (FARIAS, 1991).

O espectro ^{13}C -RMN apresenta quatro sinais característicos de carbonilas. Os sinais em 215, 214 e 211 ppm podem ser provenientes de carbonilas de cetonas saturadas, grupo funcional presente nas cucurbitacinas (VALENTE, 2004; CHEN et al., 2005). O sinal em 170,7 ppm pode ser devido à presença de carbonila de éster que segundo a literatura (VALENTE, 2004; CHEN et al., 2005) é facilmente encontrada nas cucurbitacinas que contém acetila. Ainda no espectro ^{13}C -RMN ocorrem dois sinais de carbonos de ligação dupla (140 e 120 ppm) e um sinal em 104 ppm típico de carbono anomérico de glicose (YAMADA; HAGIWARA; IGUCHI, 1977; ROTHENBURGER; HASLINGER, 1995). Outro dado relevante é a presença de oito sinais em campo alto do espectro ^{13}C -RMN que apresentam correlação no HSQC com oito sinais de hidrogênios na região de metilas. Essas oito metilas são características essenciais para o esqueleto cucurbitano (VALENTE, 2004; CHEN et al., 2005) que juntamente com os demais dados descritos acima confirma que este composto é uma cucurbitacina.

Os dados descritos acima sugeriram que DRII pudesse ser um glicosídeo da diidrocurbitacina B ou um de seus derivados, tais como a diidroisocucurbitacina B. Os espectros ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foram comparados aos dados obtidos por Farias (1991) para essas cucurbitacinas. Os deslocamentos químicos observados para DRII são muito semelhantes aos da diidrocurbitacina B. Nas tabelas 16 e 17 os deslocamentos químicos obtidos nos espectros ^{13}C -RMN e ^1H -RMN da substância DRII são confrontados com da diidrocurbitacina B (FARIAS, 1991). Também são mostradas as correlações entre os sinais dos carbonos com os sinais

de seus respectivos hidrogênios através do HSQC e a correlação entre hidrogênios vizinhos através do COSY.

Tabela 16: Comparação dos dados espectrais de ^{13}C -RMN da substância DRII com diidroisocucurbitacina B descrita por Farias (1991)

C	Diidroisocucurbitacina B (75 MHz; CDCl_3)	DRII (100 MHz; CDCl_3)	
	δ (ppm)	δ (ppm)	HSQC
1	36,0	42,5	
2	71,6	68,9	
3	211,8	211,3	
4	50,2	50,7	
5	140,3	140,0	
6	120,2	120,5	5,77 ppm
7	23,9	26,2	
8	42,3	45,7	1,42 ppm
9	48,4	48,5	
10	33,8	34,3	2,79 ppm
11	212,7	214,3	
12	48,7	48,9	2,70 ppm
13	48,4	48,6	
14	50,6	51,5	
15	45,5	46,5	
16	70,9	71,2	4,38 ppm
17	57,8	58,2	2,55 ppm
18	19,8	20,1	0,95 ppm
19	20,1	20,2	1,06 ppm
20	78,9	79,9	
21	24,5	24,6	1,43 ppm
22	213,6	214,8	
23	30,7	29,7	
24	34,8	35,0	~2,0 ppm
25	81,2	81,5	
26	26,2	29,2	1,28 ppm
27	25,9	26,4	1,46 ppm
30	29,4	31,0	1,25 ppm
31	21,3	21,5	1,28 ppm
32	18,8	19,0	1,36 ppm
CH_3CO	22,4	22,7	1,97 ppm
CH_3CO	170,1	170,7	

Tabela 17: Comparação dos dados espectrais de ^1H -RMN da substância DRII com diidrocurbitacina B descrita por Farias (1991)

H	M	Diidrocurbitacina B (300 MHz; CDCl_3)			DRII (400 MHz; CDCl_3)		
		δ (ppm)	J (Hz)	COSY	δ (ppm)	J (Hz)	COSY
1 α	ddd	2,29	13 6 3		2,37		H-1 β H-2 H-10
1 β	ddd	1,21	13 13 13		1,42		H-1 α H-2 H-10
2	ddd	4,40	13 6 4		4,62	13 6 4	H-1 α H-1 β
6	ddd	5,78	6 2 2		5,77		H-7 α
7 α	m	~1,9			2,0		H-6 H-7 β
7 β	m	2,40	20 8 3 3		2,43		H-7 α H-8
8	d	~2,0			1,42		H-7 α H-7 β
10	m	2,72	13		2,79	14	H-1 α H-1 β
12 α	dd	3,25	14,5 1		3,36	14	H-12 β Me-18
12 β	d	2,75	14,5		2,70	14,5	H-12 α
15 α	dd	1,39	14		1,43		H-15 β
15 β	m	1,82	14 8,5		1,84		H-15 α H-16
16	dd	4,27	8,5 7		4,38	9,5 7	H-15 β H-17
17	d	2,52	7		2,55	7	H-16
23a	dd	2,81	17 8 7		2,85	17 8 7	H-24a H-24b H-23b
23b	dd	2,50	17 8 7		2,50	17 8 7	H-23a H-24a H-24b
24a	dd	2,03	8 7		2,04	8 7	H-23a H-23b H-24b
24b	dd	2,03	8 7		2,06	8 7	H-24a H-23a H-23b
Me-18	br s	0,95		H-12 α	0,95		H-12 α
Me-19	s	1,06			1,06		
Me-21	s	1,40		H-12 β	1,43		
Me-26	s	1,42			1,28		H-23 ^a
Me-27	s	1,44			1,46		
Me-30	s	1,32			1,25		
Me-31	s	1,27			1,28		
Me-32	br s	1,35		H-8 H-15 β	1,36		
CH ₃ CO	s	1,94			1,97		

M = Multiplicidade

A comparação com a literatura juntamente com a análise dos espectros de correlação possibilitou identificar a aglicona de DRII como diidrocurbitacina B.

A análise dos deslocamentos químicos observados na região do açúcar e suas correlações são apresentados na tabela 18. Farias e colaboradores (1993) identificaram o 2-glicosídeo da diidrocurbitacina B nas raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Essa informação associada à desproteção do carbono 1 observada pela mudança do deslocamento químico desse carbono para campo mais baixo propõe que a glicose está ligada à genina na posição 2.

Tabela 18: Dados espectrais de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN para DRII

DRII							
(400 MHz; CDCl_3)							
Carbono	δ (ppm)	HSQC	Hidrogênio	M	δ (ppm)	J (Hz)	COSY
1'	103,8	4,35 ppm	1'	d	4,35	8	H-3 H-2'
2'	74,0	3,44 ppm	2'	t	3,44	8 9	H-1' H-3'
3'	76,5	3,56 ppm	3'	t	3,56	8 9	H-2' H-4'
4'	70,2	3,50 ppm	4'	t	3,50	8 9	H-3' H-5'
5'	76,5	3,37 ppm	5'	m	3,37		H-4' H-6a' H-6b'
6'	62,5	3,93 ppm 3,83 ppm	6a'	dd	3,93	11 7	H-5'
			6b'	dd	3,83	11 7	H-5'

M = Multiplicidade

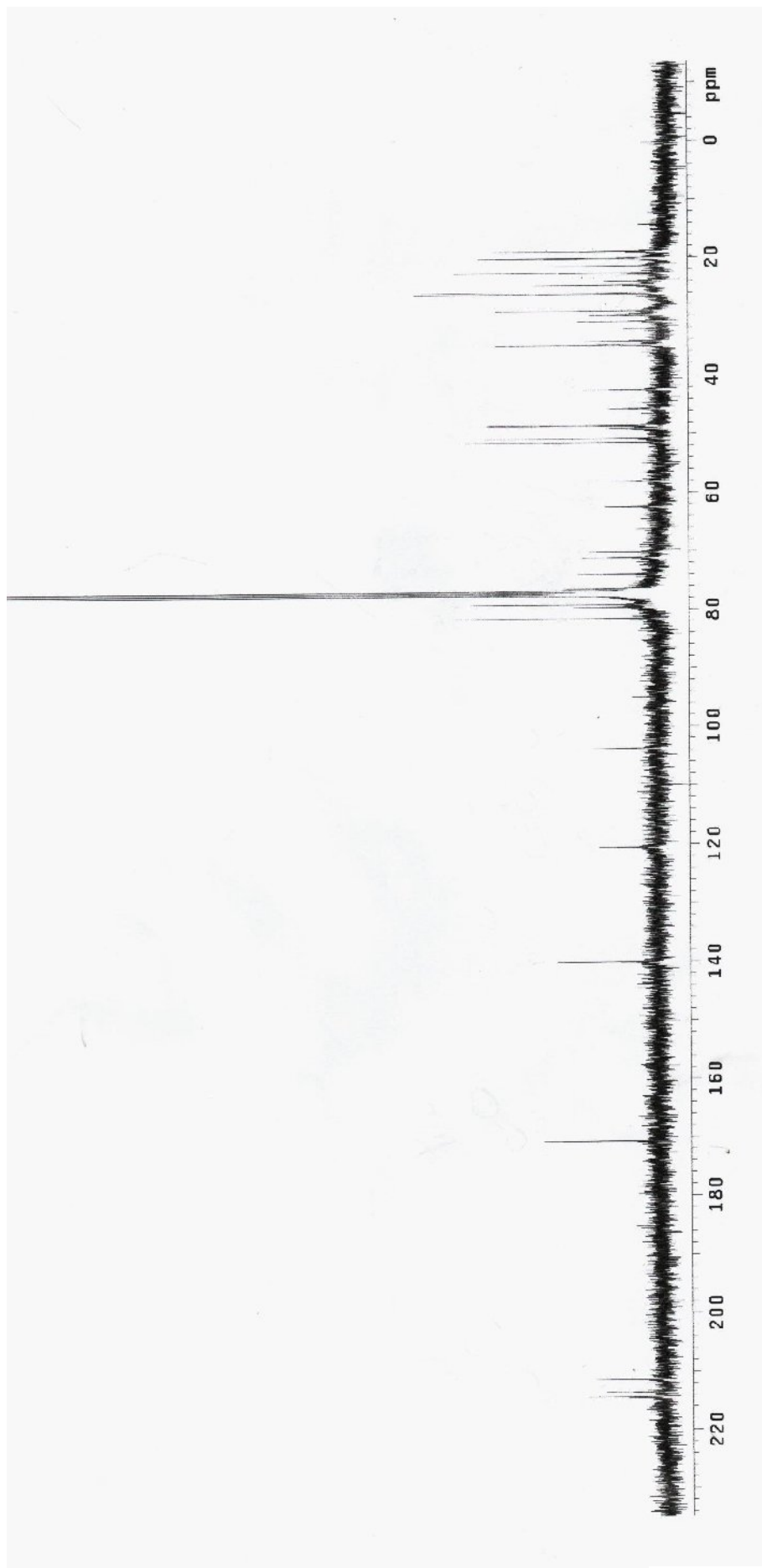
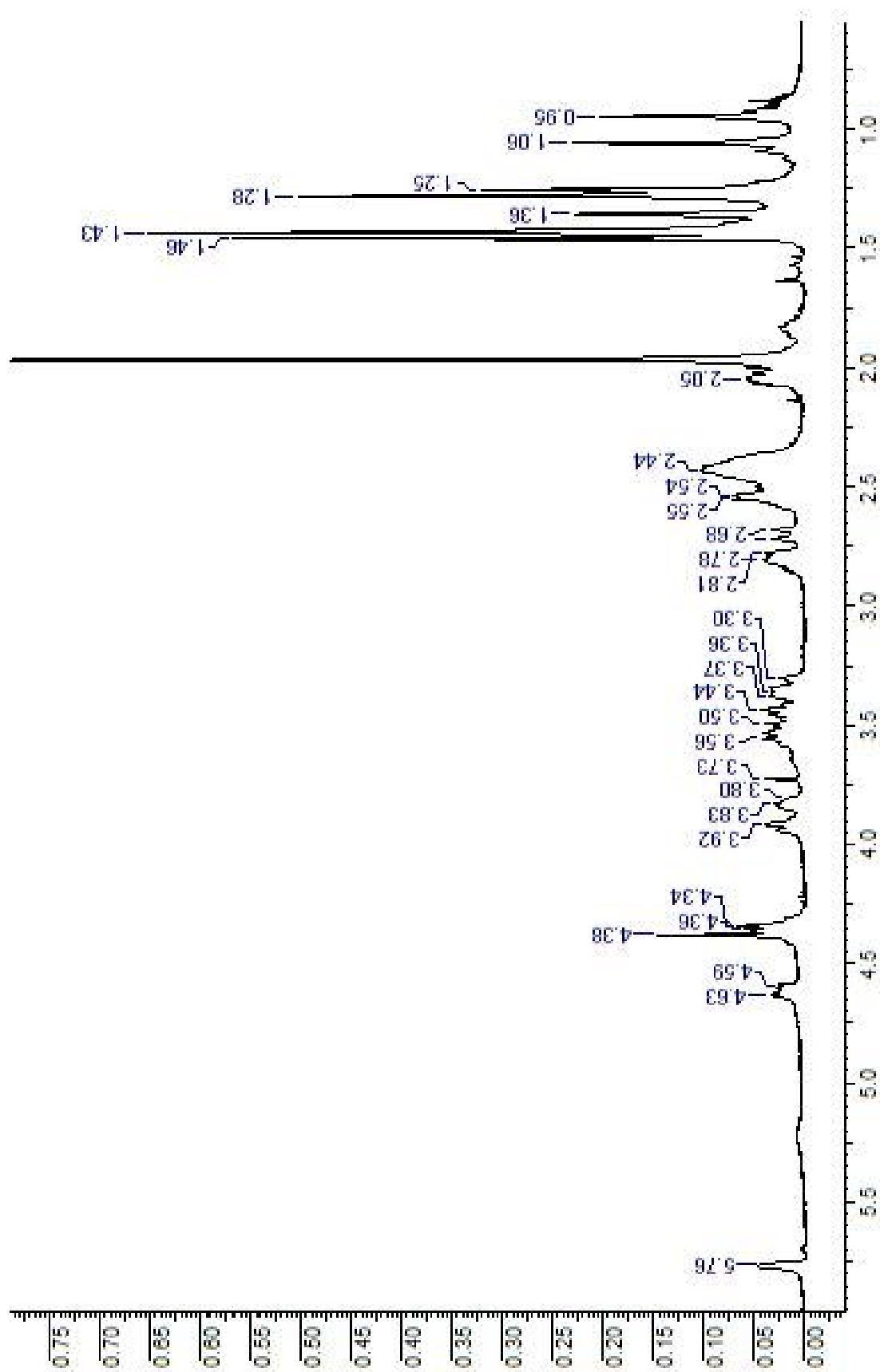


Figura 21: Espectro ^{13}C -RMN da substância DR11 em CDCl_3

Figura 22: Espectro $^1\text{H-NMR}$ da substância DR11 em CDCl_3

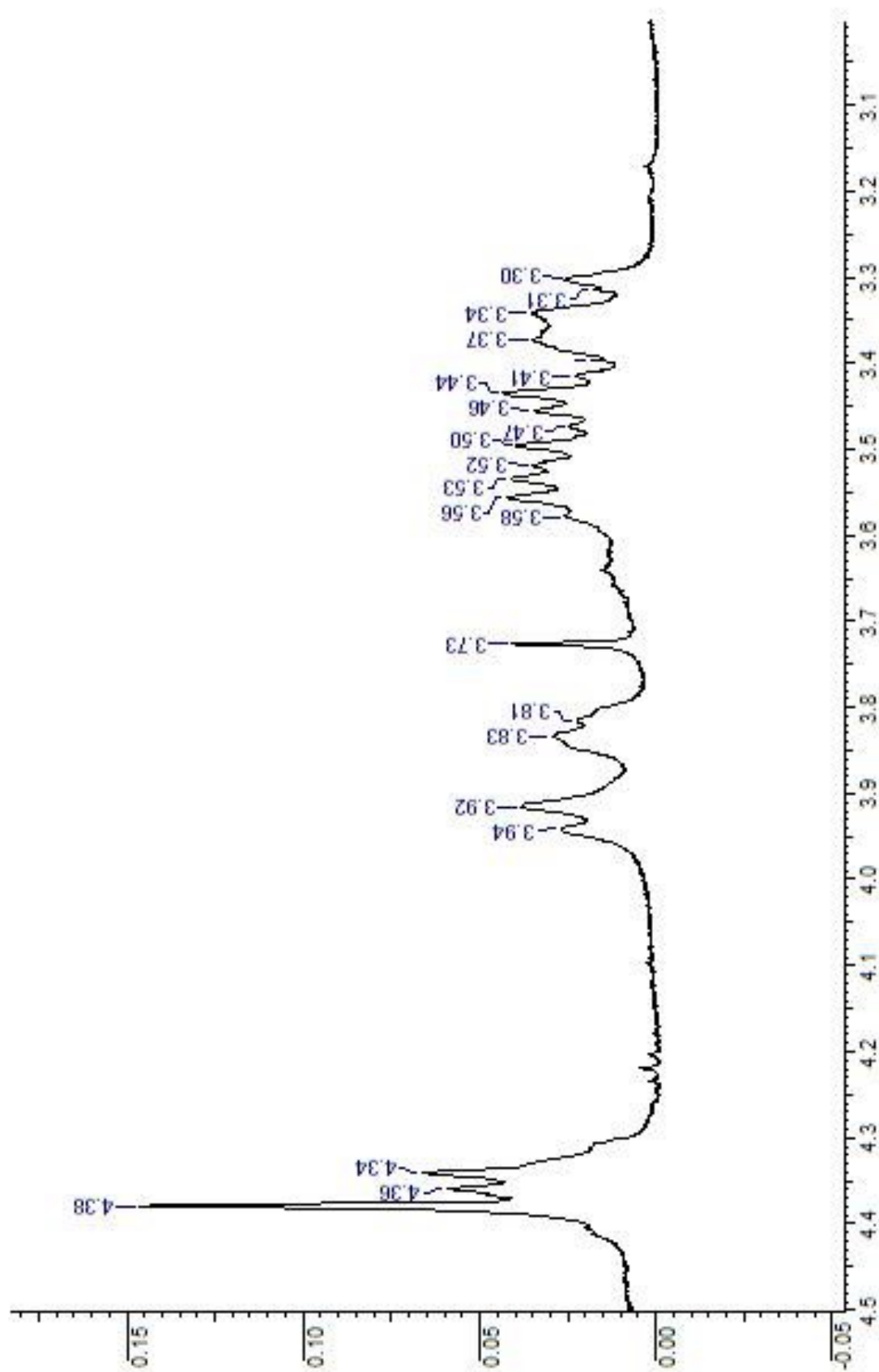


Figura 23: Espectro $^1\text{H-NMR}$ ampliado da substância DR11 em CDCl_3

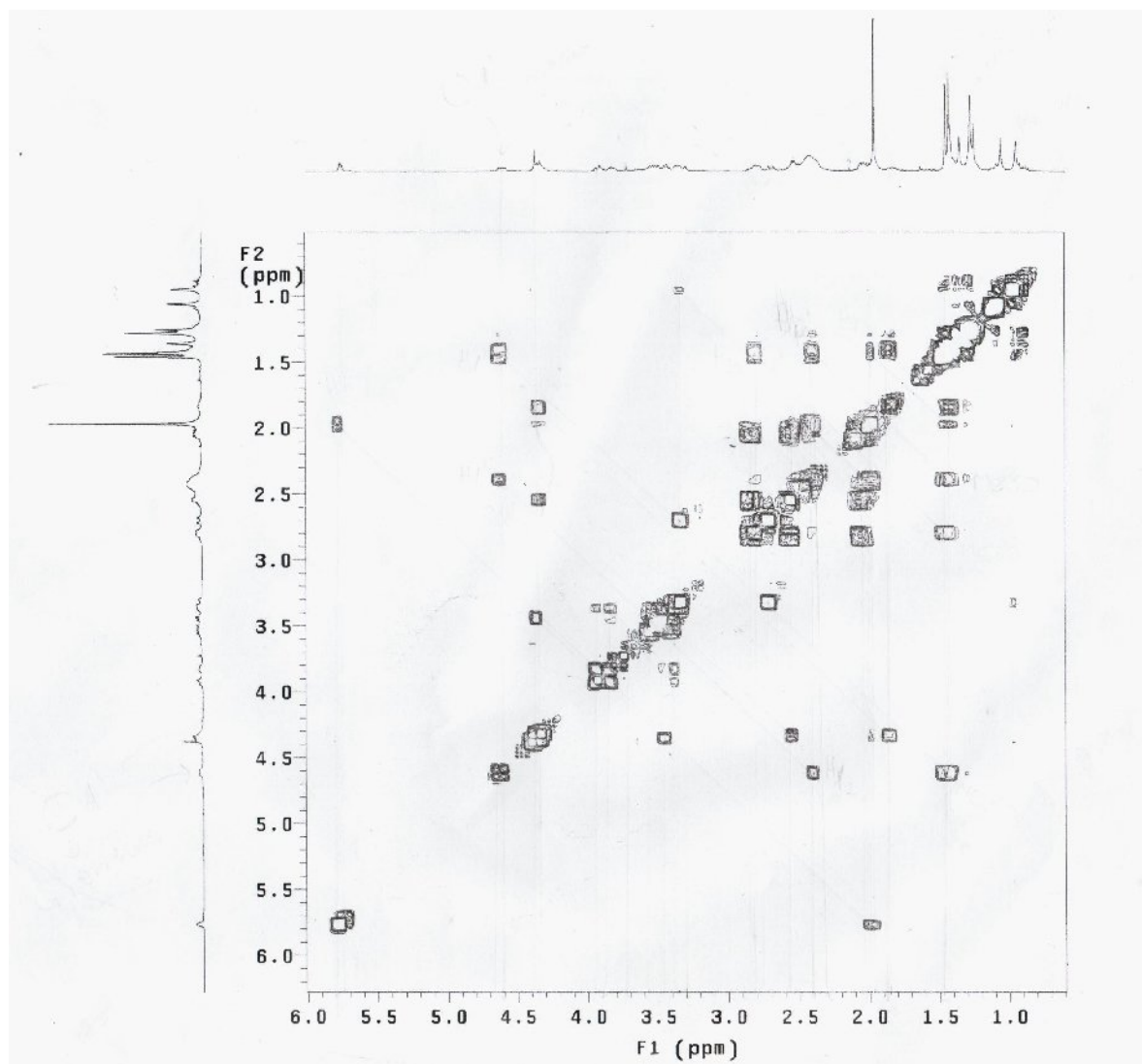


Figura 24: Espectro COSY da substância DR11 em CDCl_3

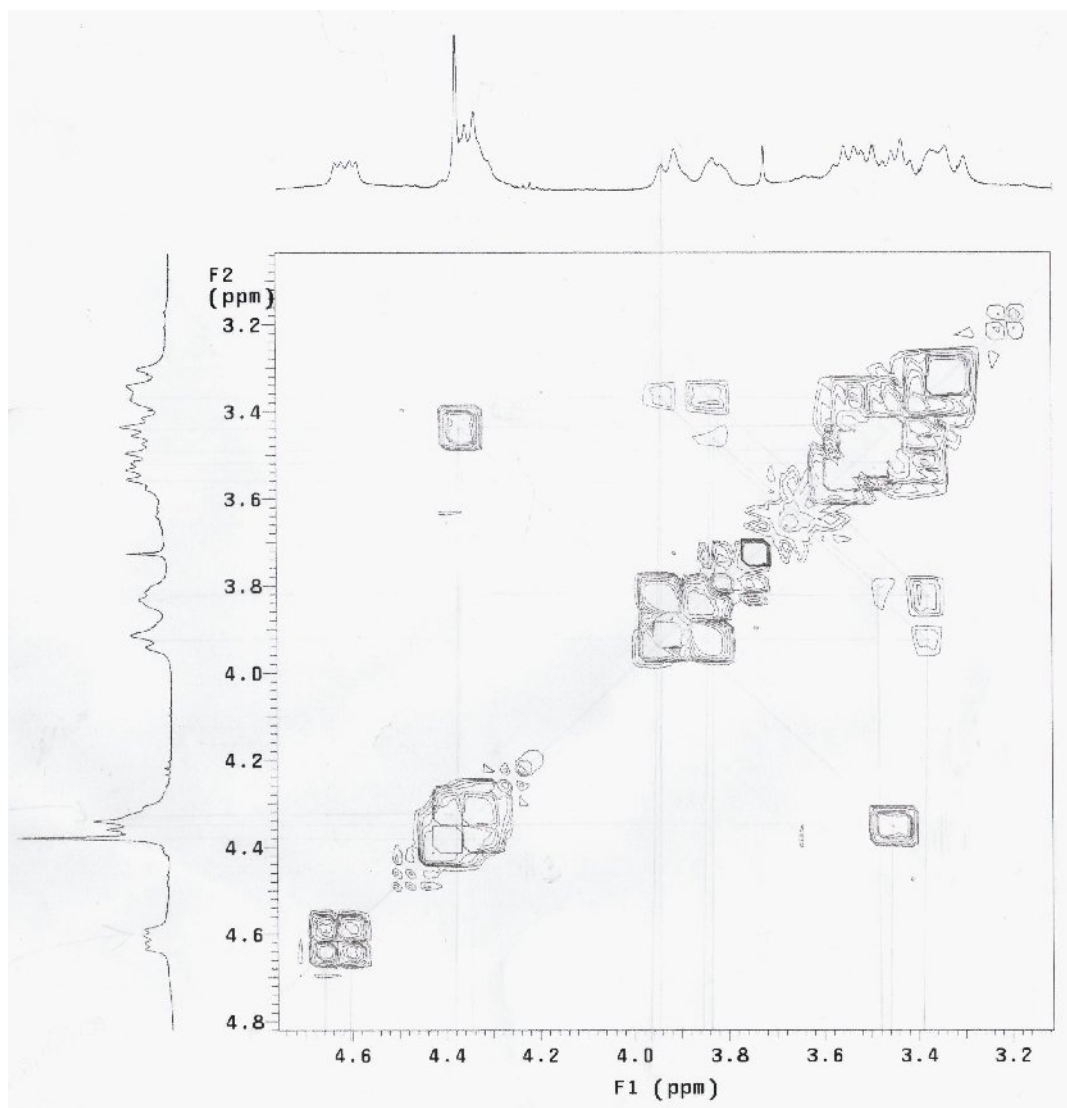


Figura 25: Espectro COSY ampliado da substância DR11 em CDCl_3

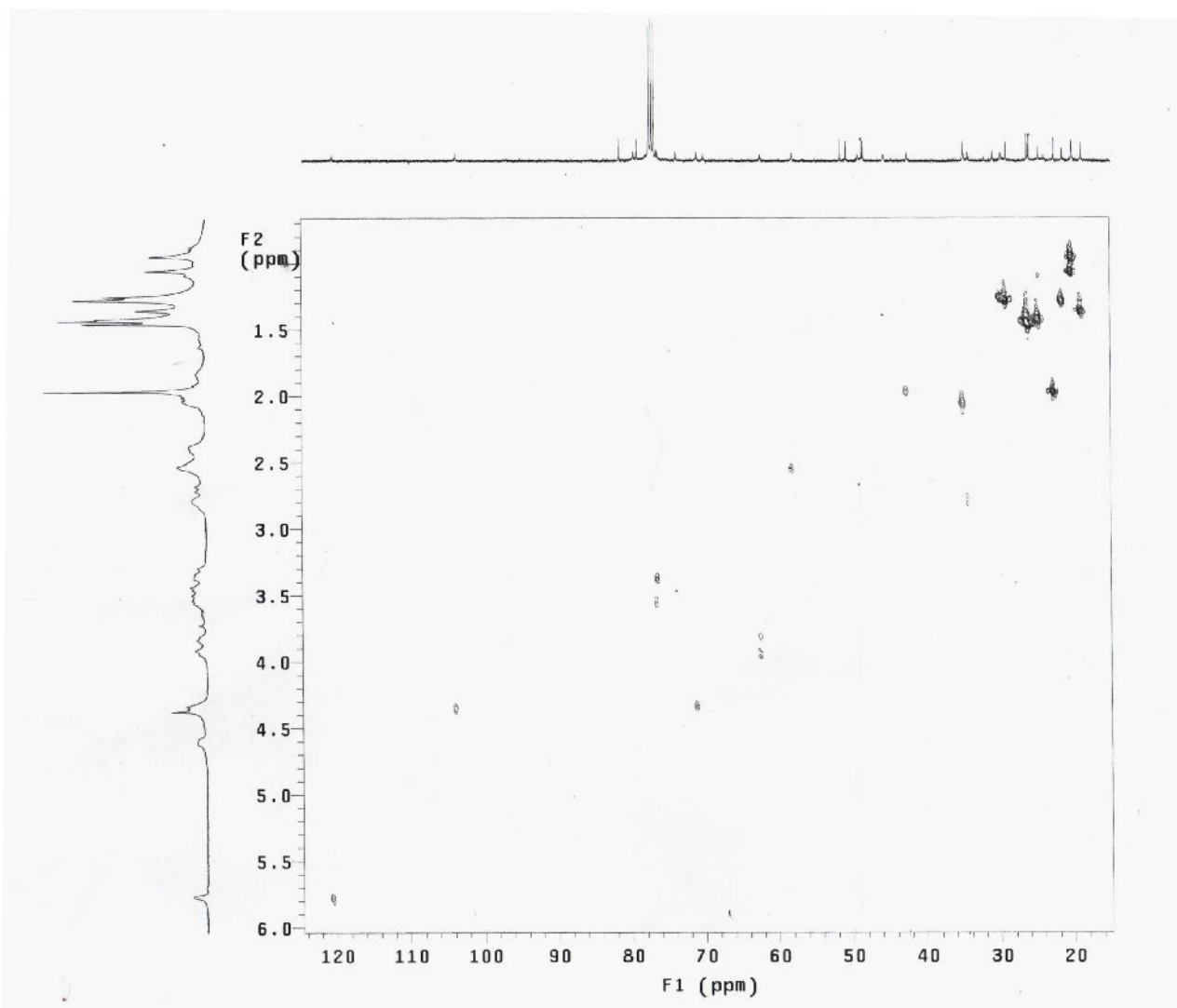


Figura 26: Espectro HSQC da substância DR11 em CDCl₃

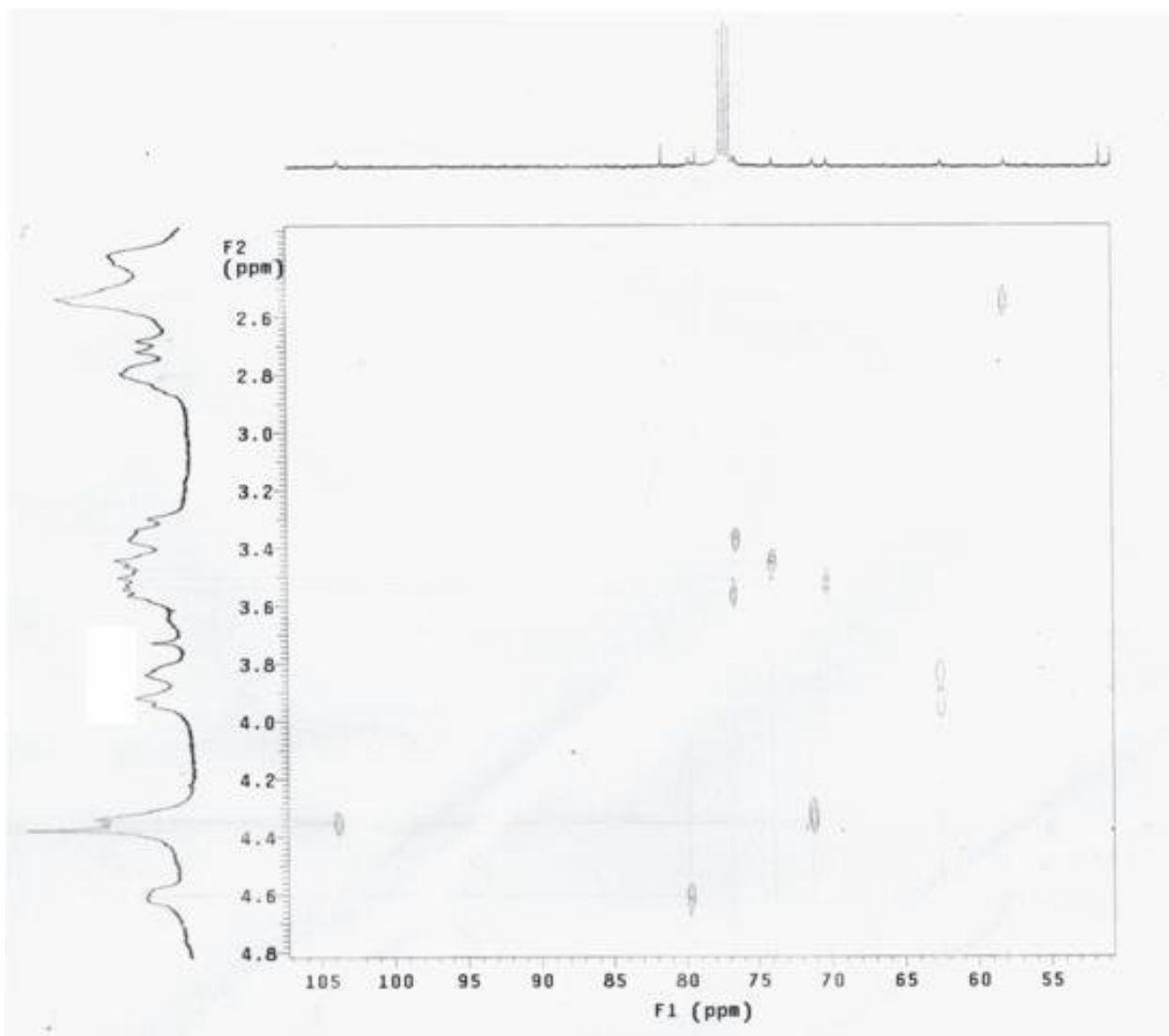


Figura 27: Espectro HSQC ampliado da substância DR11 em CDCl_3

Levando em consideração os resultados e as discussões abordadas juntamente com a constante de acoplamento do hidrogênio anomérico igual a 8,0 Hz que sugere configuração β para a glicopiranosose (LEMIEUX; KOTO, 1974; AGRAWAL, 1992), foi possível identificar DRII como o 2-O- β -glicopiranosídeo da diidrocurbitacina B (Fig. 28).

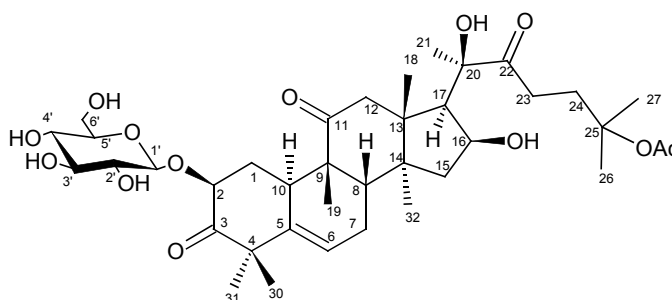


Figura 28: Fórmula estrutural da 2-O- β -glicopiranosídeo da diidrocurbitacina B

Krepiski (2003) demonstrou que existem 65 mg de diidrocurbitacina B para cada 100g de raízes de *Wilbrandia ebracteata*. A autora utilizou métodos de espectroscopia na região do UV para realizar o doseamento. Provavelmente o glicosídeo da diidrocurbitacina B, que é o glicosídeo de cucurbitacina majoritário das raízes da espécie, também deve ter sido dosado como diidrocurbitacina B.

Não há relatos sobre o isolamento dessa cucurbitacina glicosilada a partir da fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Farias (1991) relatou a identificação da mesma e seu isolamento em mistura com outras duas cucurbitacinas glicosiladas através de cromatografia em camada delgada por comparação das agliconas provenientes da hidrólise enzimática com padrões.

5.1.2 Análise da presença das substâncias DRI e DRII na fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata* do material adquirido da indústria Lohmman

A fração diclorometano obtida das raízes de *Wilbrandia ebracteata* adquiridas na indústria Lohmman em 2007 foi cromatografada através de cromatografia em camada delgada (fig. 29) com as substâncias DRI e DRII isoladas

a partir das frações MC₂XII e MC₂XIII cedidas pela Prof^a. Dr^a. Mareni Rocha Farias (Farias, 1991) para verificar a presença dessas duas cucurbitacinas em material recém coletado. Como adsorvente foi utilizado gel de sílica 60 F₂₅₄, eluente clorofórmio:metanol (5:1, v/v) e observação após a revelação das substâncias com o agente cromogênico vanilina fosfórica. O observado foi que ambas as substâncias apresentavam Rfs e colorações idênticas aos de substâncias presentes na fração diclorometano, comprovando dessa forma que ambas estão presentes na fração em material recém coletado.

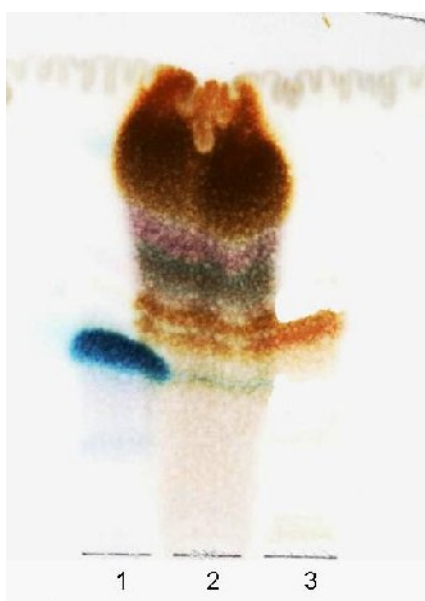


Figura 29: Cromatografia em camada delgada apresentando o perfil cromatográfico da fração diclorometano das raízes de *W. ebracteata* adquiridas na indústria Lohmman (2) e das substâncias DRI (1) e DRII (3)

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄
Eluente: CHCl₃:MeOH (5:1, v/v)
Detecção: Vanilina fosfórica e aquecimento.

5.1.3 Análise química da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

Para verificar a estabilidade da fração butanólica cedida pela Prof. Dra. Mareni Rocha Farias, foi realizado o mesmo processo de extração apresentado por Farias (1991) com o material vegetal descrito no item 4.2 b. Abaixo, é apresentada a comparação entre as frações butanólicas através de cromatografia em camada

delgada (Fig. 30). As frações apresentaram o mesmo perfil cromatográfico o que confirma a grande estabilidade da fração butanólica cedida por Farias. Como fase estacionária para a cromatografia foi utilizado gel de sílica 60 F₂₅₄, eluente acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1, v/v/v) e observação sob luz UV 366 nm após a revelação com NP/PEG.

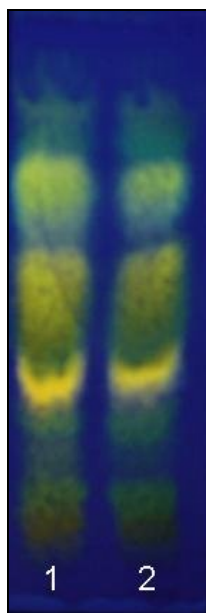


Figura 30: Cromatografia em camada delgada apresentando o perfil cromatográfico das frações butanólicas das raízes de *W. ebracteata* realizadas por Farias (1991) (1) e com o material vegetal adquirido na indústria Lohmman (2)

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄
Eluente: AcOEt:CH₃COOH:H₂O (8:1:1, v/v/v)
Detecção: NP/PEG e aquecimento/UV 366 nm

5.1.3.1 Isolamento das substâncias BRI, BRII, BRIII e BRIV a partir da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

O isolamento de flavonóides do tipo C-glicosídeos das raízes de *Wilbrandia ebracteata* não foi realizado com o objetivo principal de encontrar novas moléculas, tendo em vista o trabalho anteriormente realizado por Santos em 1989. Buscou-se a obtenção de flavonóides C-glicosídeos objetivando realizar estudos biológicos dessas substâncias em parceria com outros laboratórios além de identificar compostos não descritos anteriormente.

O isolamento das substâncias majoritárias a partir de 5 g da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata* foi realizado por cromatografias tipo *flash* e colunas em gel de sílica. As substâncias isoladas foram denominados BRI, BRII, BRIII e BRIV, suas massas e rendimentos estão na tabela 19.

Tabela 19: Massas e rendimento dos quatro flavonóides C-glicosídeos isolados a partir da fração butanólica das raízes de *W. ebracteata*

Substâncias	Massa	Rendimento*
BRI	194 mg	3,9 %
BRII	270 mg	5,4 %
BRIII	143 mg	2,9 %
BRIV	148 mg	3,0 %

*Rendimento em relação à fração butanólica

5.1.3.2 Identificação e elucidação estrutural das substâncias BRI, BRII, BRIII e BRIV isoladas a partir da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

5.1.3.2.1 Identificação de BRI

A substância BRI apresentou ponto de fusão em 228,3 °C com decomposição e valor de R_f 0,62 no sistema Acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1, v/v/v). Após revelação com NP/PEG e aquecimento ela apresentou fluorescência verde-azulada sob luz UV 366 nm.

Os espectros UV obtidos em solução metanólica e também após a adição dos reagentes de deslocamento descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970) e Markham (1982) sugerem aglicona 4',5-diidroxiflavona, com ausência de hidroxila em 7, o que é compatível ao núcleo genkwanina (Fig. 31), ou seja, uma 5,4'-diidroxí-7-metoxi-flavona. Os valores dos máximos de absorção e os deslocamentos observados encontram-se na tabela 20.

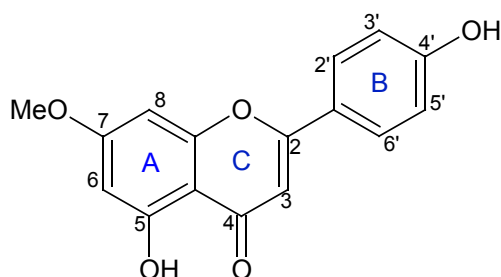


Figura 31: Fórmula estrutural do núcleo genkwanina

Tabela 20: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BRI

Solvente/ Reagente	λ máximo (nm)		deslocamento (nm)		Informações estruturais
	banda I	banda II	banda I	banda II	
MeOH	332	272			flavona ou flavonol 3-O-subst.
NaOMe	389	277	+57 nm (s/ decrec. intensidade)		com -OH livre em C-4'
NaOAc	389 348	271		sem + 5-20 nm	sem -OH livre em C-7
NaOAc + H ₃ BO ₃	339	272	sem + 12-36 nm		sem o-diidroxi
AlCl ₃	380 347	302 284	sem deslocamento + em relação AlCl ₃ + HCl		sem o-diidroxi nos anéis A e B
AlCl ₃ + HCl	380 350	300 283	+ 48 nm		com -OH livre em C-5

Levando em consideração os dados cromatográficos que sugeriram tratar-se de um glicosídeo e o núcleo fundamental indicado pelo espectro UV, BRI foi co-cromatografada com spinosina, uma C-glicosilflavona di-glicosilada descrita anteriormente por Santos (1989) para as raízes de *Wilbrandia ebracteata* cuja polaridade e o núcleo fundamental eram compatíveis. Através dessa co-cromatografia realizada em gel de sílica 60 F₂₅₄, eluente acetato de etila:metanol:ácido acético (11:4:0,3; v/v/v) e a detecção com reagente natural A e aquecimento (Fig. 32) foi possível confirmar a identidade de BRI como spinosina.



Figura 32: Co-cromatografia em camada delgada realizada com a substância BRI e spinosina

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄

Eluente: AcOEt: MeOH:CH₃COOH (11:4:0,3; v/v/v)

Deteção: Reagente natural A e aquecimento

Amostras: 1- BRI

2- BRI + spinosina

3- spinosina

Dessa forma foi possível afirmar que BRI é spinosina. A fórmula estrutural da mesma é apresentada na figura 33.

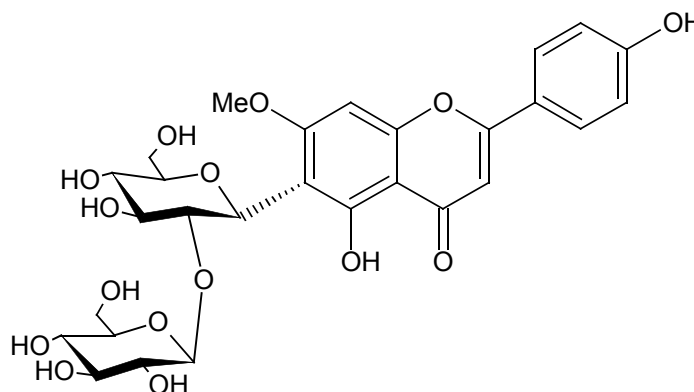


Figura 33: Fórmula estrutural da spinosina

5.1.3.2.2 Identificação de BRII

A substância BRII fundiu no intervalo de 208,6 – 209,8 °C e apresentou valor de R_f 0,43 no sistema Acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1, v/v/v). Após revelação com NP/PEG e aquecimento ela apresentou fluorescência verde-amarelada sob luz UV 366 nm.

Os espectros UV obtidos em solução metanólica e também após a adição dos reagentes de deslocamento descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970) e Markham (1982) sugerem uma 4',5,7-triidroxi-flavona, o que é compatível com o núcleo apigenina (Fig. 34). Os valores dos máximos de absorção e os deslocamentos observados encontram-se na tabela 21.

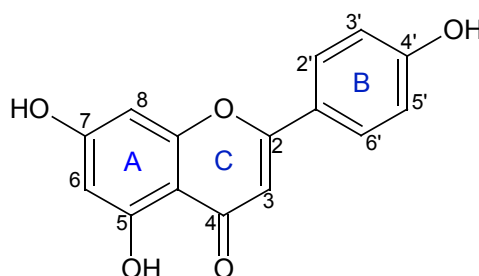


Figura 34: Fórmula estrutural do núcleo apigenina

Tabela 21: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BR11

Solvente/ Reagente	λ máximo (nm)		deslocamento (nm)		Informações estruturais
	banda I	banda II	banda I	banda II	
MeOH	337	272			flavona ou flavonol 3-O-subst.
NaOMe	395 331	279	+58 nm (s/ decrec. intensidade)		com -OH livre em C-4'
NaOAc	343	275		+ 3 nm	com -OH livre em C-7
NaOAc + H ₃ BO ₃	335	272	sem + 12-36 nm		sem o-diidroxi
AlCl ₃	380 349	304 279	sem deslocamento + em relação AlCl ₃ + HCl		sem o-diidroxi nos anéis A e B
AlCl ₃ + HCl	380 350	303 280	+ 43 nm		com -OH livre em C-5

Levando em consideração os dados cromatográficos que sugeriram tratar-se de um glicosídeo e os deslocamentos observados nos espectros UV, BR11 foi inicialmente cromatografada com vitexina e isovitexina, duas C-glicosilflavonas do tipo apigenina anteriormente descritas por Santos (1989) cuja polaridade e o núcleo fundamental eram compatíveis. Após revelação com reagente natural A e

aquecimento, foi observado que BR11 apresentava Rf muito semelhante à isovitexina. Dessa forma, a identidade de BR11 foi confirmada através de co-cromatografia com isovitexina realizada em gel de sílica 60 F₂₅₄, eluente acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1; v/v/v) e a detecção com reagente natural A e aquecimento (Fig.35).

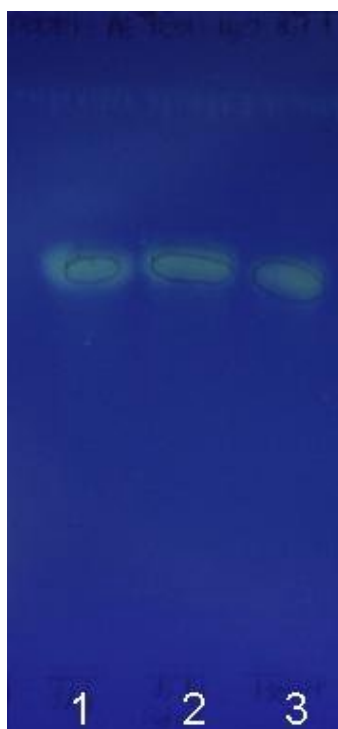


Figura 35: Co-cromatografias entre BR11 e isovitexina

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄
 Eluente: AcOEt:CH₃COOH:H₂O (8:1:1; v/v/v)
 Detecção: Reagente natural A e aquecimento/UV 366 nm
 Amostras: 1- BR11
 2-BR11 + isovitexina
 3-isovitexina

Dessa forma foi possível afirmar que BR11 é isovitexina. A fórmula estrutural da mesma é apresentada na figura 36.

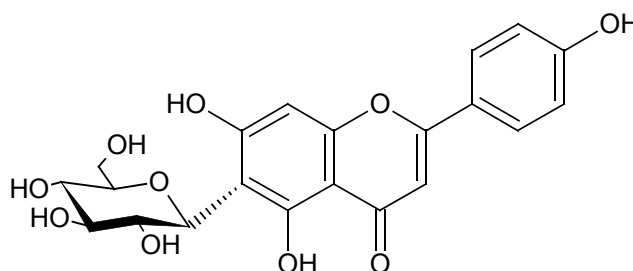


Figura 36: Fórmula estrutural da isovitexina

5.1.3.2.3 Identificação de BRIII

A substância BRIII apresentou ponto de fusão em 227,5 °C com decomposição e valor de Rf 0,40 no sistema acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1, v/v/v). Após revelação com NP/PEG e aquecimento ela apresentou fluorescência azul sob luz UV 366 nm.

Os espectros UV obtidos em solução metanólica e também após a adição dos reagentes de deslocamento descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970) e Markham (1982) sugerem uma 4',5-diidroxiflavona substituída em 7, o que é compatível com o núcleo genkwanina (Fig. 31). Os valores dos máximos de absorção e os deslocamentos observados encontram-se na tabela 22.

Tabela 22: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BRIII

Solvente/ Reagente	λ máximo (nm)		deslocamento (nm)		Informações estruturais
	banda I	banda II	banda I	banda II	
MeOH	333	270			flavona ou flavonol 3-O-subst.
NaOMe	390	269 241	+57 nm (s/ decrec. intensidade)		com -OH livre em C-4'
NaOAc	338	271		sem + 5-20 nm	sem -OH livre em C-7
NaOAc + H ₃ BO ₃	336	271	sem + 12-36 nm		sem o-diidroxí
AlCl ₃	380 350	300 280 243	sem deslocamento + em relação AlCl ₃ + HCl		sem o-diidroxí nos anéis A e B
AlCl ₃ + HCl	380 350	300 280 242	+ 47 nm		com -OH livre em C-5

Levando em consideração os dados cromatográficos do composto BRIII, principalmente a proximidade de seu Rf ao do composto BRII (isovitexina), juntamente com a estrutura proposta através da análise dos dados espectrais obtidos por UV foi possível sugerir que BRIII pudesse ser um derivado da isovitexina

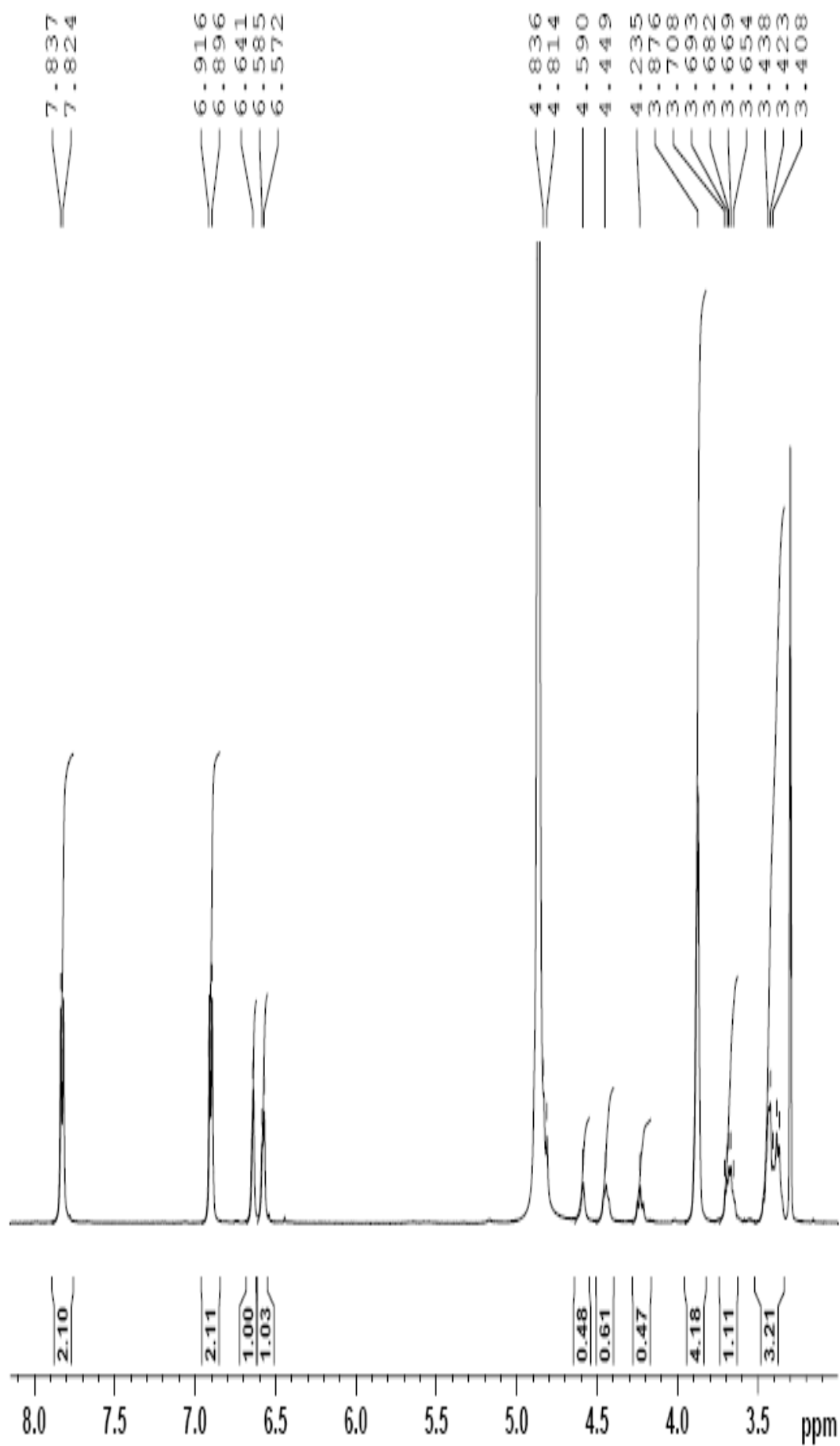
com a presença de uma metoxila ligada ao carbono 7 da aglicona, ou seja, que BRIII pudesse ser swertisina.

Como não havia disponibilidade de amostra autêntica para confirmar a identidade dessa substância, foi obtido espectro de ^1H -RMN da substância BRIII. Na tabela 23 são comparados os valores obtidos experimentalmente e encontrados na literatura para swertisina (KUMARASAMY et al., 2004). Logo abaixo é apresentado o espectro de ^1H -RMN da substância BRIII (Fig. 37).

Tabela 23: Valores de ^1H -RMN obtidos para BRIII confrontados com a literatura (KUMARASAMY et al., 2004)

H	M	Swertisina 400 MHz CD ₃ OD	BRIII 500 MHz CD ₃ OD
		δ (ppm)	δ (ppm)
3	s	6,54	6,58
7-OMe	s	3,90	3,87
8	s	6,60	6,64
2'	d	7,78	7,83
3'	d	6,87	6,91
5'	d	6,87	6,91
6'	d	7,78	7,83
1''		4,86 (sobreposto)	4,83 (sobreposto)
2''	t	4,13	4,23
3''		3,56 (encoberto)	3,49 (encoberto)
4''		3,51 (encoberto)	3,48 (encoberto)
5''		3,41 (encoberto)	3,47 (encoberto)
6a''		3,72 (encoberto)	3,71
6b''		3,90 (encoberto)	3,90 (sobreposto)

M = Multiplicidade

Figura 37: Espectro $^1\text{H-NMR}$ da substância BR III em CD_3OD

O espectro apresentou sinais compatíveis para quatro hidrogênios no anel B (7,78 ppm, 2 H e 6,87 ppm, 2 H), um hidrogênio no carbono 8 (6,60 ppm), além de uma metoxila (3,90 ppm). A comparação detalhada com dados da literatura confirmou que BRIII é swertisina (Fig. 38).

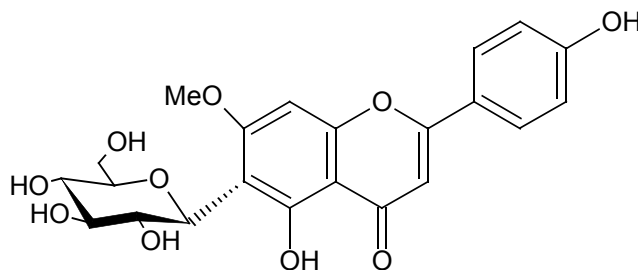


Figura 38: Fórmula estrutural da swertisina

5.1.3.2.4 Elucidação estrutural de BRIV

A substância BRIV apresentou ponto de fusão em 214,2 °C com decomposição e valor de R_f 0,18 no sistema acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1, v/v/v). Após revelação com NP/PEG e aquecimento ela apresentou fluorescência verde-azulada sob luz UV 366 nm. Cromatograficamente, BRIV encontra-se na região dos flavonóides C-glicosídeos di-glicosilados, como é o caso da vitexina-2-O-ramnosídeo, cujo R_f é 0,16 nesse sistema. Como essa substância não corresponde às anteriormente descritas por Santos (1989), aqui é apresentada sua elucidação estrutural.

Os espectros UV obtidos em solução metanólica e também após a adição dos reagentes de deslocamento descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970) e Markham (1982) sugerem que a parte aglicônica da molécula seja proveniente do núcleo genkwanina (Fig. 31). Os valores dos máximos de absorção e os deslocamentos observados encontram-se na tabela 24.

Tabela 24: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BRIV

Solvente/ Reagente	λ máximo (nm)		deslocamento (nm)		Informações estruturais
	banda I	banda II	banda I	banda II	
MeOH	335	273			flavona ou flavonol 3-O-subst.
NaOMe	390	271 233	+55 nm (s/ decrec. intensidade)		com -OH livre em C-4'
NaOAc	385 339	272		sem + 5-20 nm	sem -OH livre em C-7
NaOAc + H ₃ BO ₃	338	272	sem + 12-36 nm		sem o-diidroxí
AlCl ₃	380 351	304 283	sem deslocamento + em relação AlCl ₃ + HCl		sem o-diidroxí nos anéis A e B
AlCl ₃ + HCl	380 352	302 283	+ 45 nm		com -OH livre em C-5

Foram realizados os espectros ¹H-RMN, COSY e HSQC com a substância BRIV acetilada. No espectro ¹H-RMN foi possível verificar um duplete em 7,92 ppm atribuído aos hidrogênios 3' e 5'; em 7,29 ppm ocorre outro duplete proveniente dos hidrogênios 2' e 6', confirmando a presença de apenas uma hidroxila no anel B. Esses dois dubletos apresentam correlação no COSY entre eles e no HSQC com os carbonos 128 e 122 ppm, respectivamente. No espectro ¹H-RMN há um singlete em 6,59 ppm que se correlaciona pelo HSQC com o sinal do carbono em 106 ppm esses foram atribuídos ao hidrogênio e ao carbono 3, respectivamente e confirma a flavona sugerida nos espectros UV. Ainda em 3,95 ppm ocorre um singlete típico de metoxila, esse sinal está correlacionado no HSQC com o sinal do carbono em 56,4 ppm e confirma o núcleo genkwanina proposto a partir dos espectros UV. O singlete em 6,49 ppm pode ser devido à presença ou do hidrogênio ligado ao carbono 8 ou ao carbono 6, o que juntamente com a hipótese de que BRIV seja uma C-glicosilflavona di-glicosilada sugerem que esses dois açúcares devem estar ligados entre si, ou seja, BRIV é um O-glicosídeo de um flavonóide C-glicosídeo. Pelo HSQC foi possível observar uma correlação entre o sinal em 6,49 ppm com o sinal do carbono em 89 ppm. Na região entre 1,63 – 2,35 ppm é possível observar oito singletos que devido às integrações dos mesmos correspondem aos hidrogênios de

nove acetilas. Dois desses sinais são provenientes da acetilação das hidroxilas do núcleo flavônico da molécula, dessa forma restam sete acetilas que sugerem dois açúcares do tipo piranose. No HSQC se observa doze sinais de carbonos correlacionados com 14 sinais de hidrogênios na região de açúcares, ou seja, existem dois CH₂ o que sugere que esses dois açúcares sejam duas glicoses. Através da comparação com dados da literatura para O-glicosídeos de flavonóides C-glicosídeos (AGRAWAL, 1989; CHENG et. al., 2000) foi possível concluir qual glicose está ligada à aglicona e qual está ligada ao primeiro açúcar devido aos valores obtidos para os carbonos anoméricos. O observado é que o carbono anomérico ligado através de uma ligação C-C apresenta deslocamento químico em torno de 70 ppm, enquanto na ligação do tipo C-O o deslocamento químico observado é de aproximadamente 104 ppm. Na tabela 25 os valores de deslocamento dos sinais relativos aos carbonos e aos hidrogênios dos açúcares da substância BRIV são listadas juntamente com as correlações observadas no COSY e HSQC. Nas figuras 39-45 são apresentados os espectros obtidos em clorofórmio deuterado para a substância BRIV acetilada.

Tabela 25: Dados espectrais de RMN para a região dos açúcares de BRIV

BRIV acetilada (100 MHz; CDCl ₃)			BIV acetilada (400 MHz; CDCl ₃)			
C	δ (ppm)	HSQC	H	M	δ (ppm)	COSY
1''	72,2	4,96 ppm	1''	d	4,96	H-2''
2''	73,2	4,99 ppm	2''	t	4,99	H-1'' H-3''
3''	77,2	5,29 ppm	3''	t	5,29	H-2'' H-4''
4''	69,1	5,19 ppm	4''	t	5,19	H-3'' H-5''
5''	76,0	3,79 ppm	5''	m	3,79	H-4'' H-6a''
6''	62,4	3,92 ppm 3,62 ppm	6a''	dd	4,30	H-5' H-6b''
			6b''	dd	4,16	H-5' H-6a''
1'''	102,0	4,59 ppm	1'''	d	4,59	H-2'''
2'''	71,2	4,72 ppm	2'''	t	4,72	H-1''' H-3'''
3'''	74,2	4,97 ppm	3'''	t	4,97	H-2''' H-4'''
4'''	68,0	4,77 ppm	4'''	t	4,77	H-3''' H-5'''
5'''	71,6	3,45 ppm	5'''	m	3,45	H-4''' H-6a'''
6'''	61,8	4,30 ppm 4,16 ppm	6a'''	dd	3,92	H-5''' H-6b'''
			6b'''	dd	3,65	H-6a'''

M = Multiplicidade

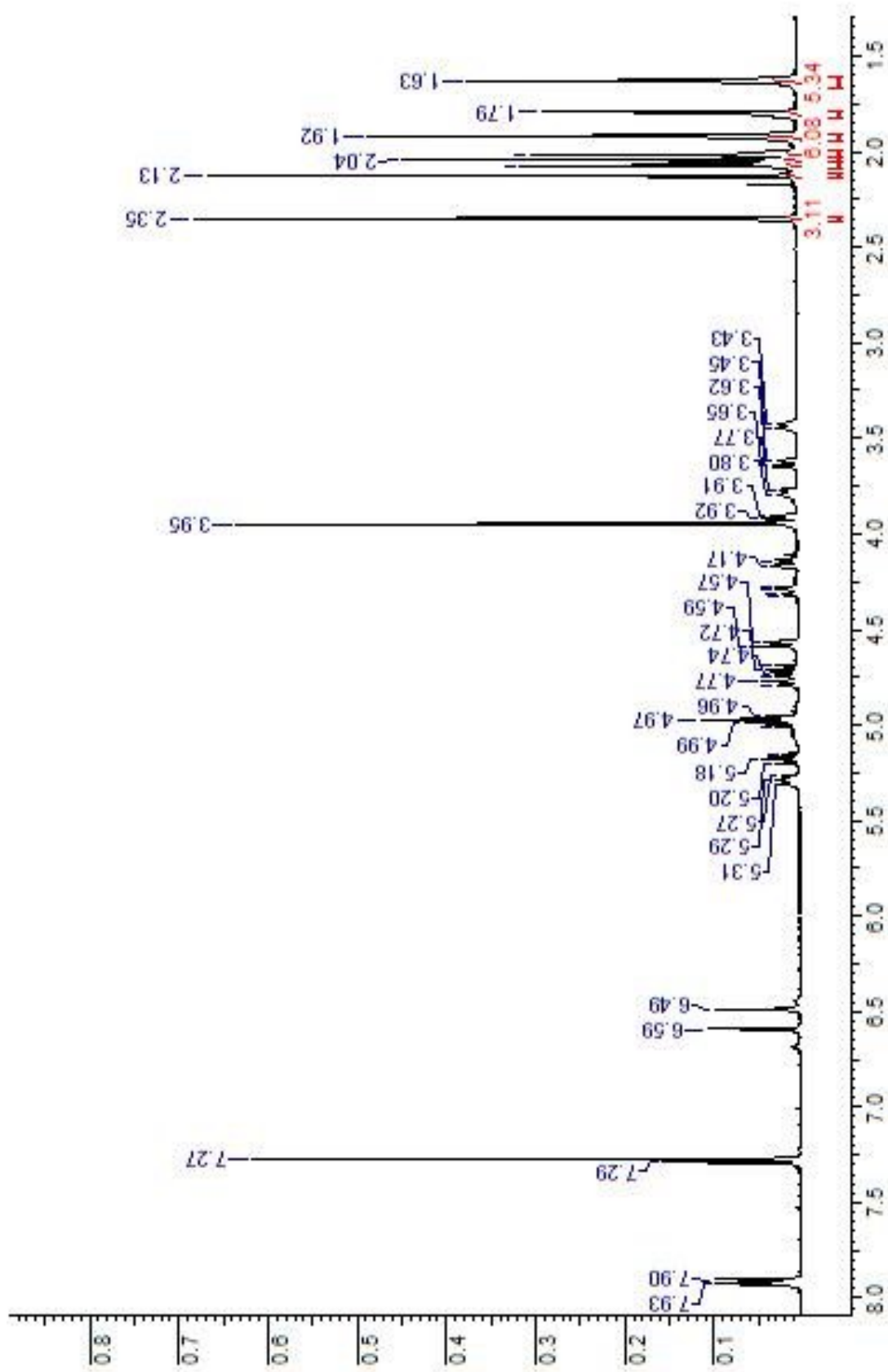


Figura 39: Espectro ^1H -RMN da substância BRIV acetilada em CDCl_3

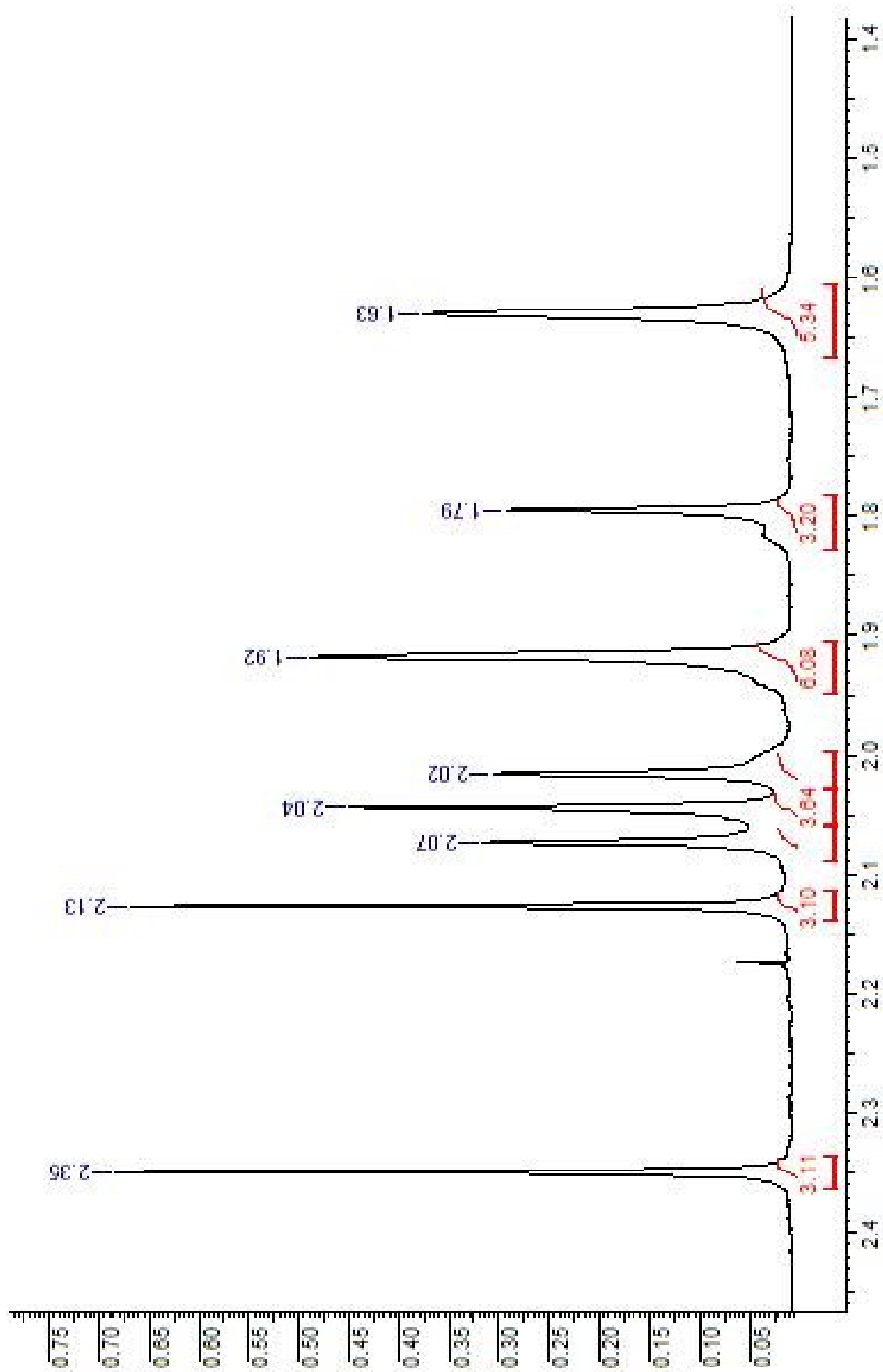


Figura 40: Espectro $^1\text{H-NMR}$ ampliada da substância BRIV acetilada em CDCl_3

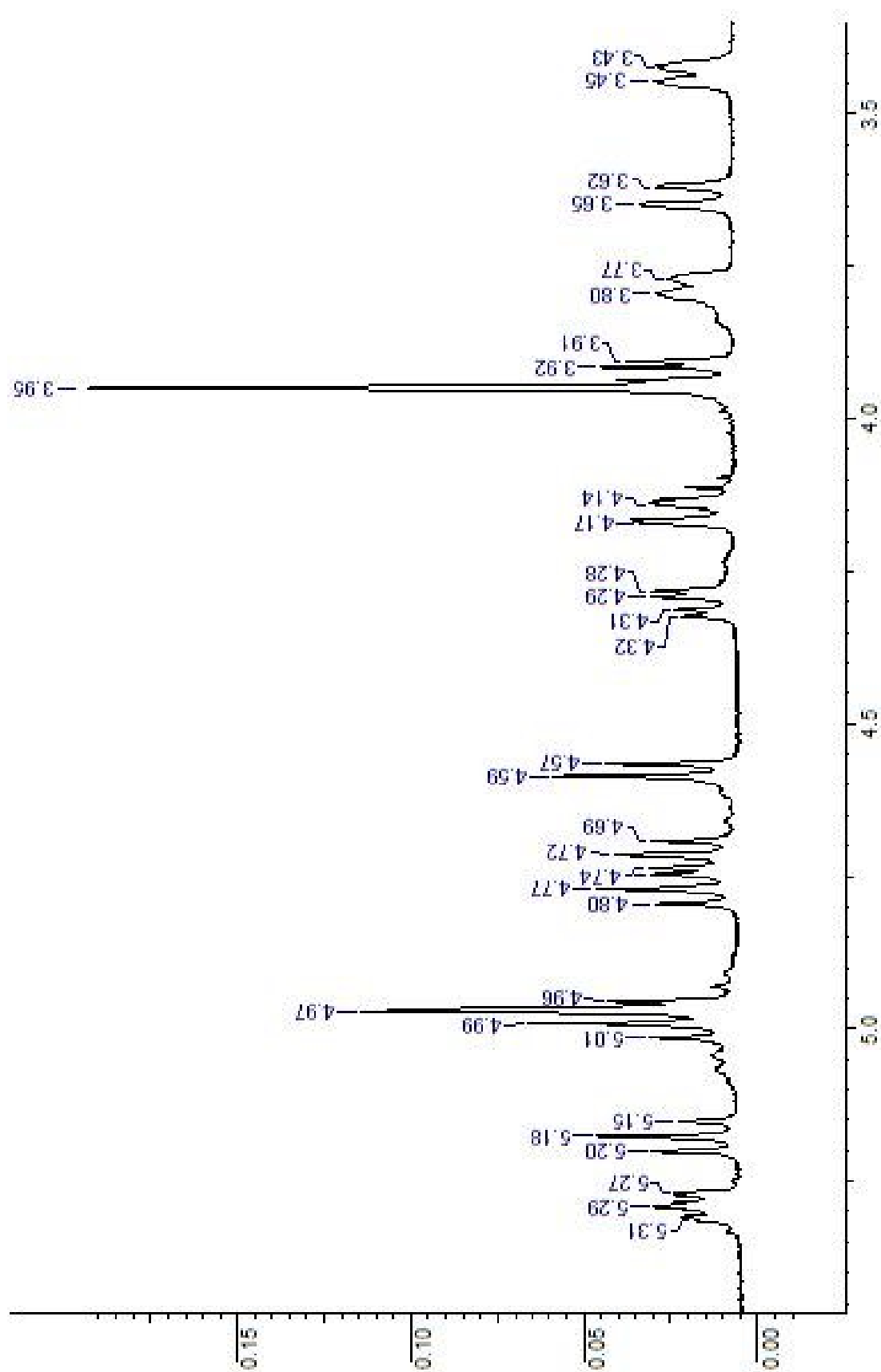


Figura 41: Espectro $^1\text{H-NMR}$ ampliado da substância BRIV acetilada em CDCl_3

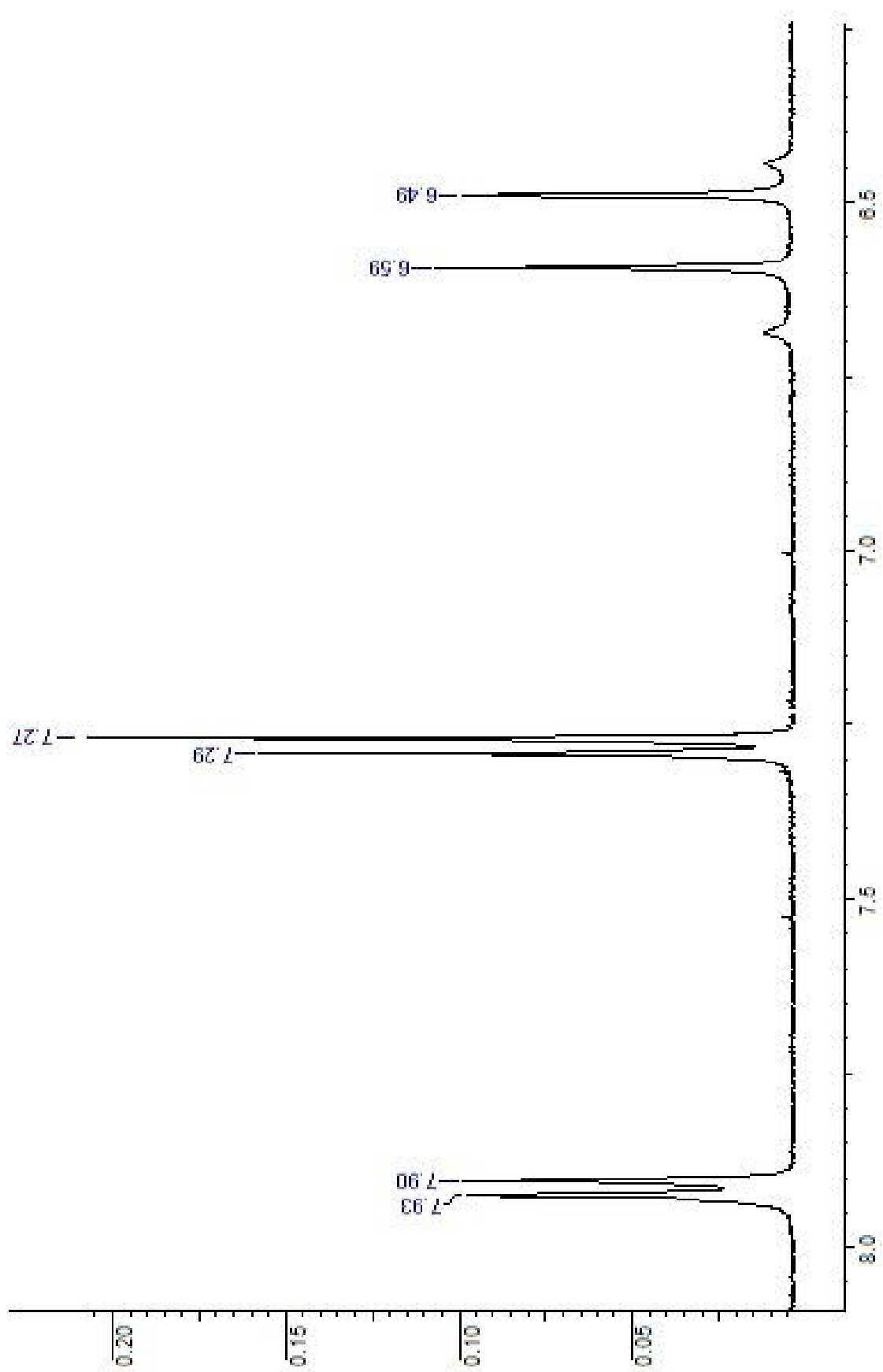


Figura 42: Espectro ^1H -RMN ampliado da substância BRIV acetilada em CDCl_3

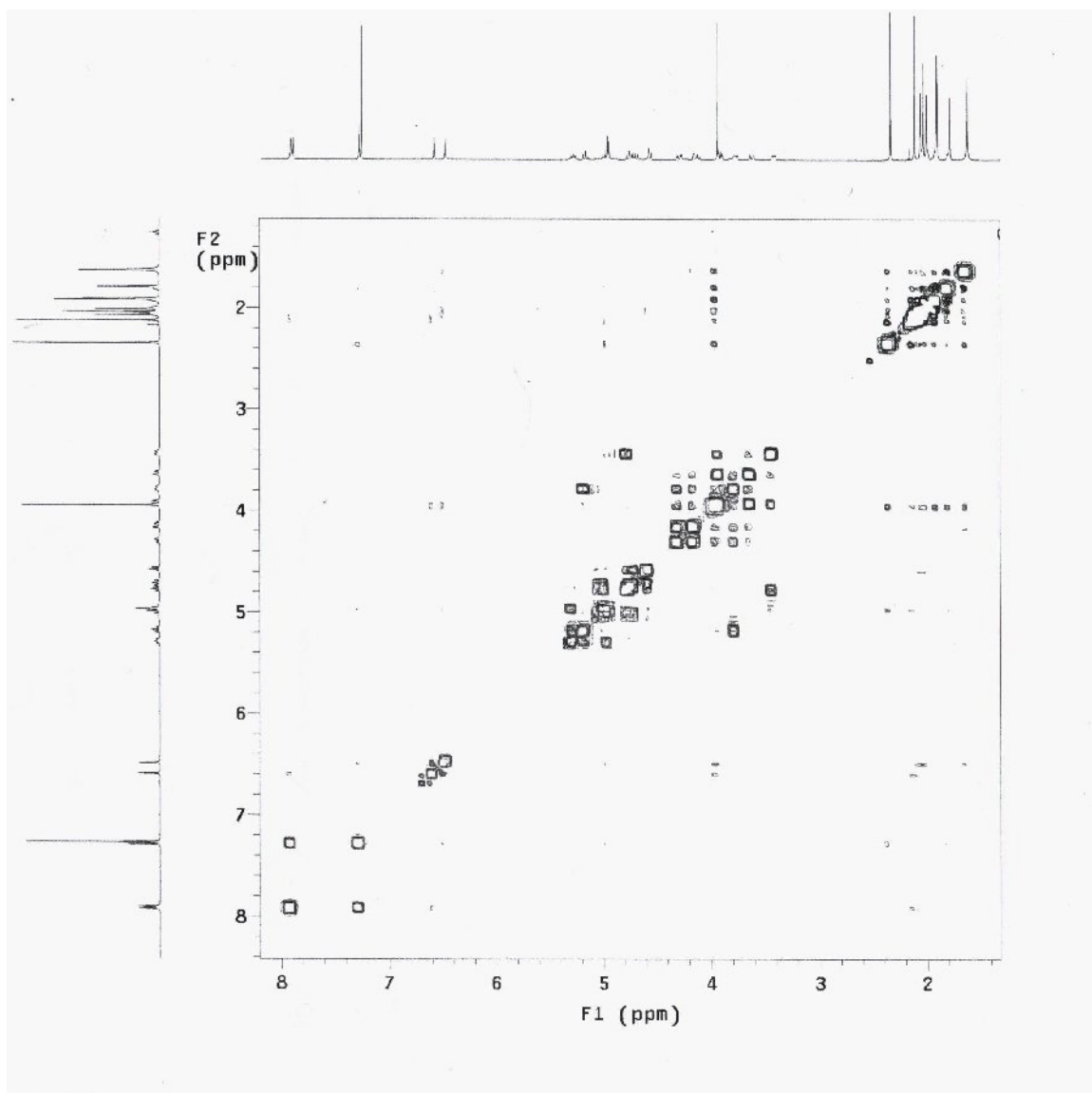


Figura 43: Espectro COSY da substância BRIV acetilada em CDCl_3

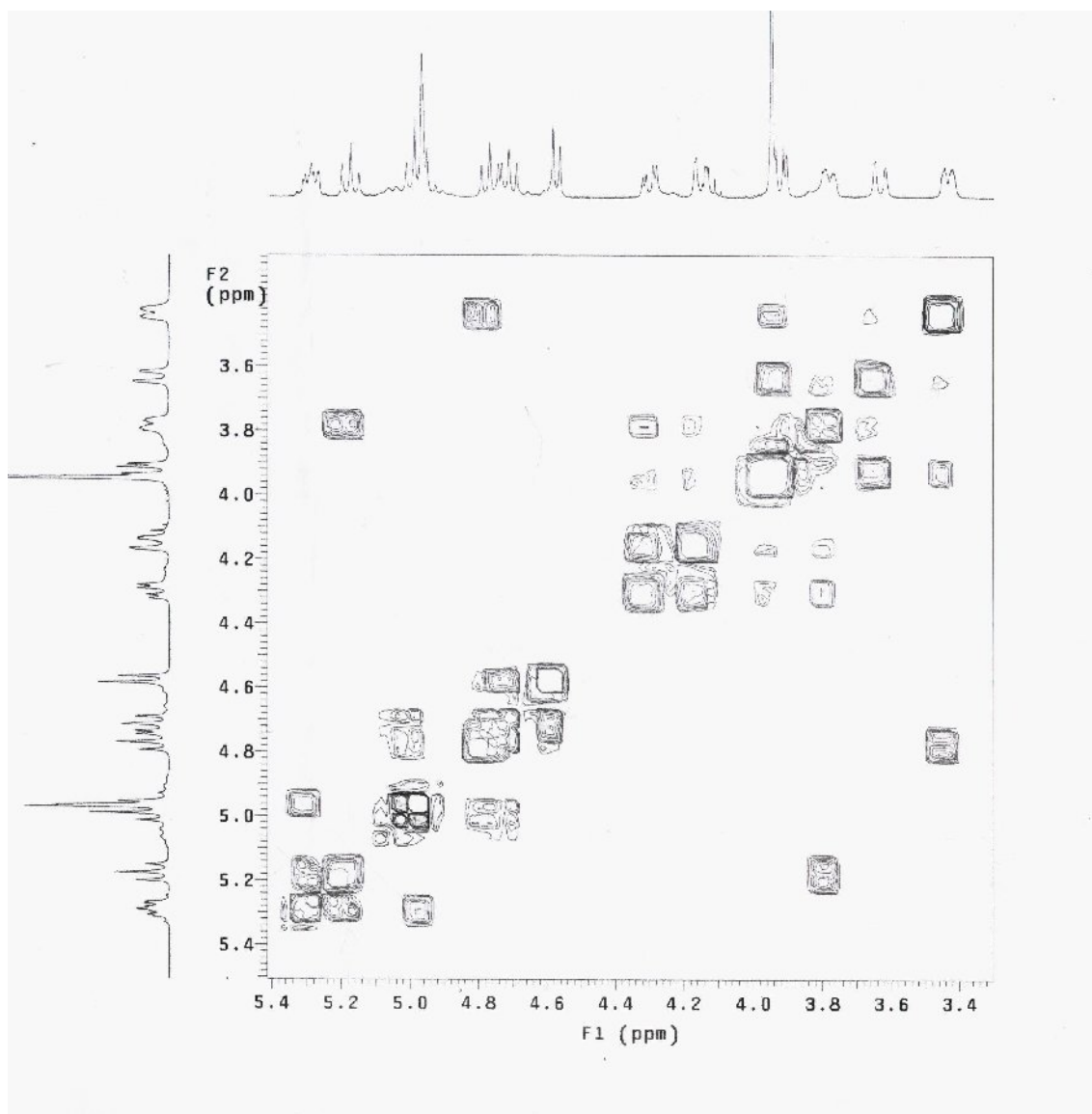


Figura 44: Espectro COSY ampliado da substância BRIV acetilada em CDCl_3

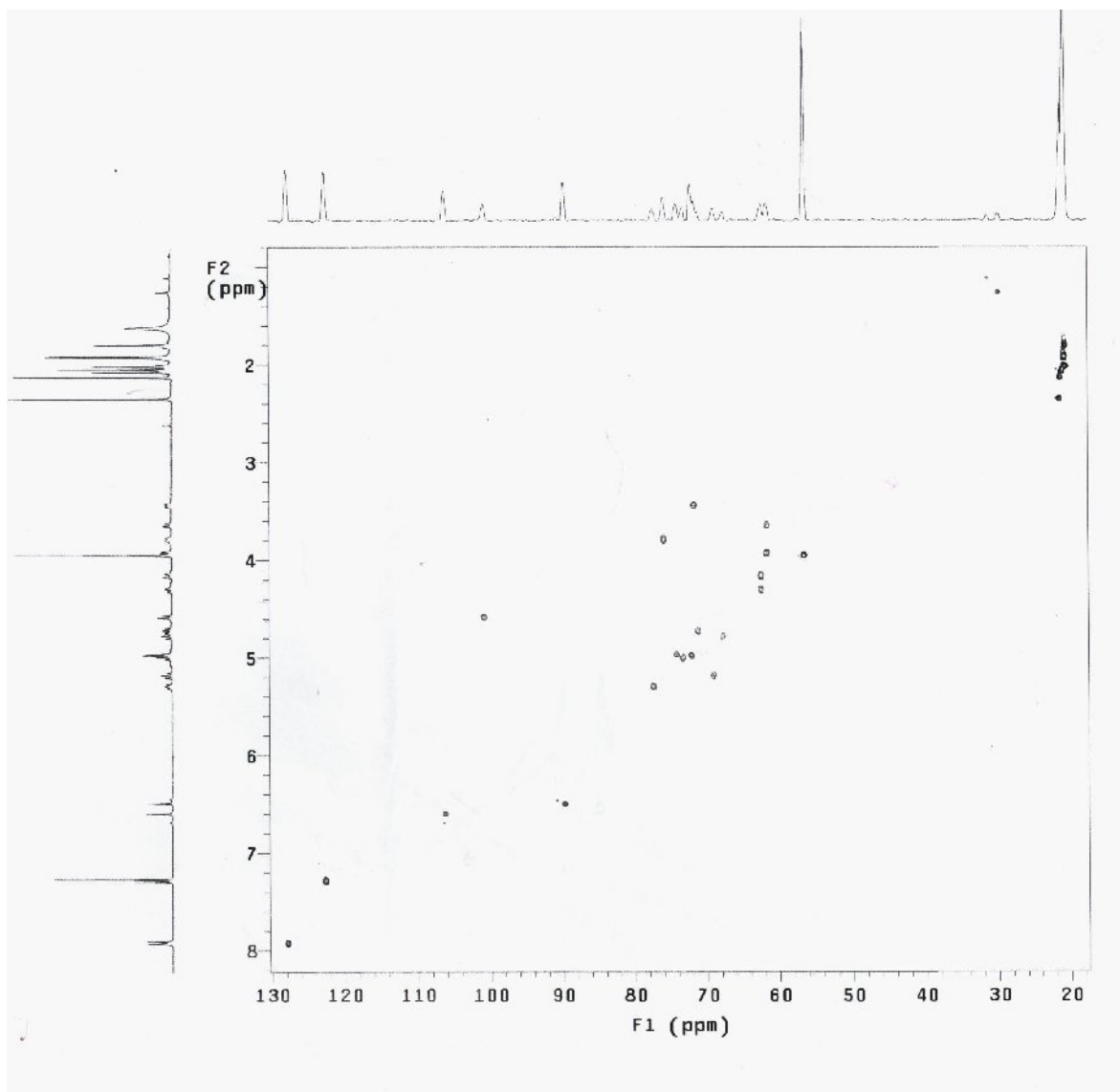


Figura 45: Espectro HSQC da substância BRIV acetilada em CDCl_3

Uma forma de elucidar a ligação açúcar-açúcar é por comparação dos valores dos sinais dos carbonos da primeira glicose com os mesmos valores na literatura, sendo que a maior diferença entre os deslocamentos químicos é onde ocorre a ligação. Nesse caso, porém, não foi possível, pois os espectros foram realizados com a substância acetilada o que já modifica os valores de deslocamento. Devido ao exposto será necessário realizar o espectro de correlação HMBC da substância acetilada ou o espectro de carbono da substância em sua forma original.

BRIV foi elucidada como sendo um O-glicosídeo de um flavonóide C-glicosídeo com o núcleo fundamental genkwanina, sendo a cadeia de açúcares formada por duas glicoses. Os açúcares possivelmente estão ligados ao carbono 8 da aglicona, pois se estivessem ligados ao carbono 6 poderia ser spinosina ou um derivado da mesma, o que não condiz com os dados cromatográficos. Além disso, Mabry, Markham e Thomas (1970) e Wagner e Bladt (1996) demonstram que flavonóides C-glicosídeos cujo açúcar está ligado à posição 8 apresentam RF maior que seus derivados com açúcar ligado ao carbono 6, como é o caso entre BRIV e spinosina. BRIV foi elucidada parcialmente como um di-glicosídeo da 4',5-diidroxi-7-metoxi-flavona.

5.1.4 Análise cromatográfica de compostos da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*

Devido ao perfil cromatográfico das substâncias encontradas na fração butanólica e também por ser essa uma fração conhecidamente rica em flavonóides, a mesma foi comparada cromatograficamente através da utilização de cromatografia em camada delgada e CLAE com padrões de flavonóides C-glicosídeos disponíveis no laboratório: orientina[§], vitexina^{**}, isovitexina², swertisina^{††}, isoorientina¹, vitexina-2-O-ramnosídeo², spinosina^{††} e crisina-6,8-di-C-glicosídeo^{§§}, sendo os cinco primeiros mono-glicosídeos e os três últimos di-glicosídeos.

[§] Extrasynthèse

^{**} Fluka

^{††} Isolada e identificada nesta dissertação

^{††} Isolada a partir das raízes de *Wilbrandia ebracteata* e identificada por Santos (1989)

^{§§} Isolada a partir das folhas de *Lichnophora ericoides*, cedida pelo Prof. Dr. Norberto Penorino I ones

Nas cromatografias em camada delgada (Fig. 46) foi observada a predominância de oito compostos com características de flavonóides do tipo C-glicosídeos, sendo que a comparação com compostos referência demonstrou que essa fração apresenta vitexina, orientina, isovitexina, swertisina, isoorientina e spinosina. Apesar de uma das substâncias apresentar valor de Rf muito semelhante ao da vitexina-2-O-ramnosídeo na cromatografia em camada delgada foi possível verificar através de CLAE que nem ela nem crisina-6,8-di-C-glicosídeo estão presentes na fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Através de CLAE (Fig. 47) também foi possível observar que os compostos majoritários são as C-glicosilflavonas isovitexina, swertisina, spinosina e a substância BRIV.

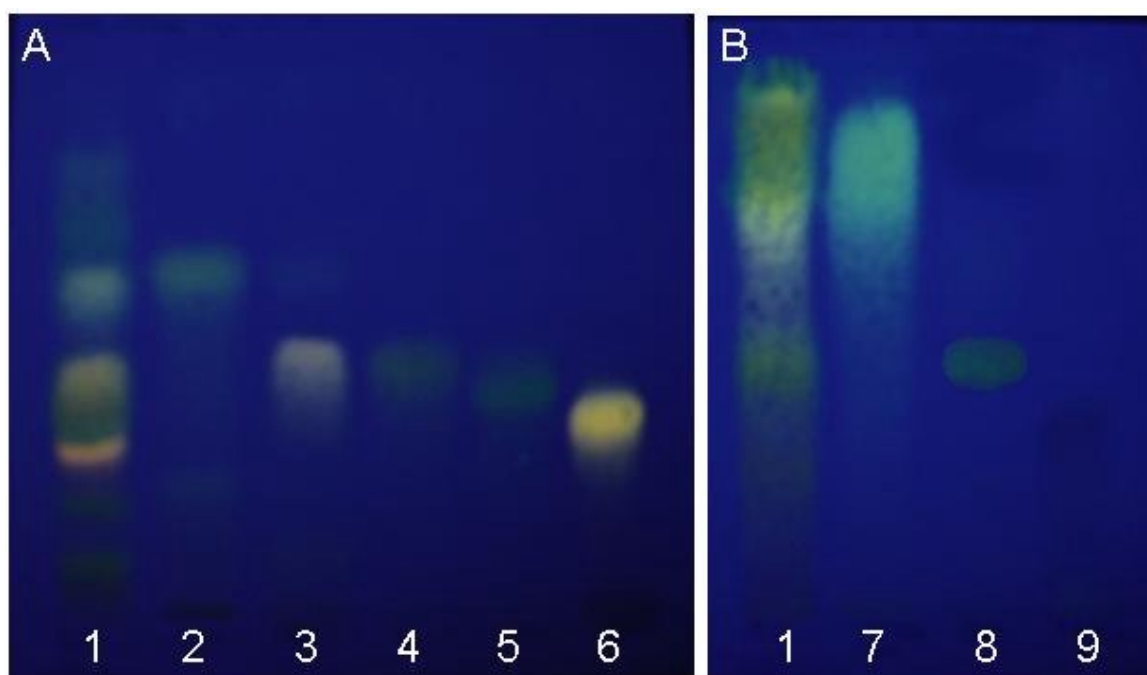


Figura 46: CCDs comparativas entre a fração butanólica das raízes de *W. ebracteata* e padrões de flavonóides C-glicosídeos

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄

Eluente: A - AcOEt:CH₃COOH:H₂O (8:1:1, v/v/v)

B - AcOEt: MeOH:CH₃COOH (11:4:0,3, v/v/v)

Deteção: NP/PEG e aquecimento/UV 366 nm

Amostras: 1- fração butanólica das raízes de *W. ebracteata*

2- vitexina

3- orientina

4- isovitexina

5- swertisina

6- isoorientina

7- vitexina-2-O-ramnosídeo

8- spinosina

9- crisina-6,8-di-C-glicosídeo

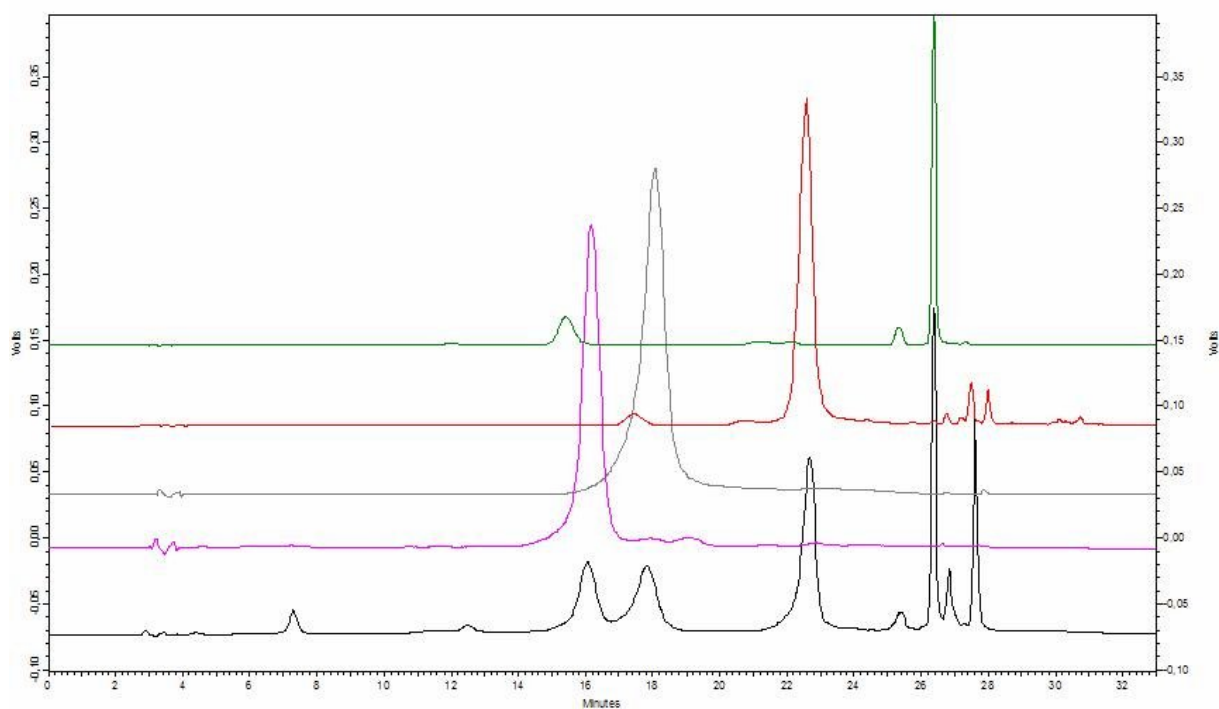


Figura 47: CLAE comparativo entre a fração butanólica das raízes de *W. ebracteata* e padrões de flavonóides C-glicosídeos

Adsorvente: Fenila

Eluente: CH₃CN:CH₃COOH 1% - gradiente

Deteção: 330 nm

Fluxo: 1 mL/min

Amostras: Preto- fração butanólica das raízes de *W. ebracteata*

Rosa- spinosina

Cinza- isovitexina

Vermelho- swertisina

Verde- BRIV

Os resultados encontrados estão de acordo com os descritos por Santos; Santos e Schenkel (1996), diferindo-se apenas pela presença de BRIV, não descrita anteriormente.

5.2 Estudo químico das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

As frações butanólica e insolúvel em água obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de *Wilbrandia ebracteata* foram analisadas buscando o isolamento de flavonóides. Nesta seção serão descritos os resultados e as discussões referentes à fração butanólica, seguidos pelos da fração insolúvel em água. A cromatografia em camada delgada realizada em gel de sílica, eluente diclorometano:metanol (12:1) e revelada com vanilina fosfórica/aquecimento da fração diclorometano das folhas de *Wilbrandia ebracteata* não apresentou manchas características para cucurbitacinas, dessa forma essa fração não foi estudada neste trabalho.

5.2.1 Análise química da fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

5.2.1.1 Isolamento das substâncias BFI e BFII a partir da fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

Após o emprego de diversos métodos cromatográficos foram isolados a partir de 5 g da fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata* dois compostos denominados BFI (36 mg) e BFII (17 mg).

5.2.1.2 Identificação das substâncias BFI e BFII isoladas a partir da fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

5.2.1.2.1 Identificação de BFI

A substância BFI apresentou ponto de fusão em 230,1 °C com decomposição e valor de Rf 0,62 no sistema acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1, v/v/v). Após revelação com reagente natural A e aquecimento ela apresentou fluorescência verde-azulada sob luz UV 366 nm.

Os espectros UV obtidos em solução metanólica e também após a adição dos reagentes de deslocamento descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970) e Markham (1982) sugerem que para a aglicona uma 4',5-diidroxiflavona o que condiz com o núcleo genkwanina (Fig. 31). Os valores dos máximos de absorção e os deslocamentos obtidos encontram-se na tabela 26.

Tabela 26: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BFI

Solvente/ Reagente	λ máximo (nm)		deslocamento (nm)		Informações estruturais
	banda I	banda II	banda I	banda II	
MeOH	333	273			flavona ou flavonol 3-O-subst.
NaOMe	390	271 235	+57 nm (s/ decrec. intensidade)		com -OH livre em C-4'
NaOAc	355	271		sem + 5-20 nm	sem -OH livre em C-7
NaOAc + H ₃ BO ₃	335	272	sem + 12-36 nm		sem o-diidroxí
AlCl ₃	380 352	301 281	sem deslocamento + em relação AlCl ₃ + HCl		sem o-diidroxí nos anéis A e B
AlCl ₃ + HCl	380 353	297 283	+ 47 nm		com -OH livre em C-5

Levando em consideração os dados cromatográficos e o núcleo aglicônico sugerido pelo UV, BFI foi co-cromatografada com spinosina (cujas características eram compatíveis) através de cromatografia em camada delgada em gel de sílica 60 F₂₅₄, eluente acetato de etila:metanol:ácido acético (11:4:0,3; v/v/v) e a detecção com reagente natural A e aquecimento (Fig. 48).

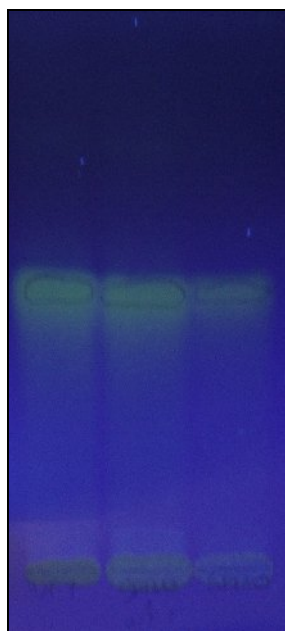


Figura 48: Co-cromatografia realizada com BFI e spinosina

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄
Eluente: AcOEt: MeOH:CH₃COOH (11:4:0,3; v/v/v)
Detecção: Reagente natural A e aquecimento/366 nm
Amostras: 1- BFI
 2-BFI + spinosina
 3-spinosina

A co-cromatografia permitiu identificar BFI como spinosina, cuja fórmula estrutural é apresentada na figura 33.

O único estudo realizado com as folhas de *Wilbrandia ebracteata* que apresentou enfoque químico foi realizado por Coelho (2004). Nesse trabalho, a autora isolou flavonóides não glicosilados e os flavonóides C-glicosídeos monoglicosilados orientina, isorientina, vitexina e isovitexina. Dessa forma, este é o primeiro relato sobre isolamento e identificação de spinosina proveniente das folhas de *Wilbrandia ebracteata*.

5.2.1.2.2 Identificação de BFII

A substância BFII apresentou ponto de fusão em 215,8 °C com decomposição e valor de Rf 0,18 no sistema acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1, v/v/v). Após revelação com reagente natural A e aquecimento ela apresentou fluorescência verde-azulada sob luz UV 365 nm.

Os espectros UV obtidos em solução metanólica e também após a adição dos reagentes de deslocamento descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970) e Markham (1982) sugerem uma 4',5-diidroxiflavona o que condiz com o núcleo genkwanina (Fig. 31). Os valores dos máximos de absorção e os deslocamentos obtidos encontram-se na tabela 27.

Tabela 27: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância BFII

Solvente/ Reagente	λ máximo (nm)		deslocamento (nm)		Informações estruturais
	banda I	banda II	banda I	banda II	
MeOH	335	273			flavona ou flavonol 3-O-subst.
NaOMe	391	272 233	+56 nm (s/ decrec. intensidade)		com -OH livre em C-4'
NaOAc	386 338	272		sem + 5-20 nm	sem -OH livre em C-7
NaOAc + H ₃ BO ₃	336	272	sem + 12-36 nm		sem o-diidroxí
AlCl ₃	380 351	302 279	sem deslocamento + em relação AlCl ₃ + HCl		sem o-diidroxí nos anéis A e B
AlCl ₃ + HCl	380 353	300 280	+ 45 nm		com -OH livre em C-5

Levando em consideração os dados cromatográficos e o núcleo sugerido pela espectroscopia UV, BFII foi co-cromatografada com a substância BRIV, descrita nesta dissertação isolada a partir da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*, através de cromatografia em camada delgada em gel de sílica 60 F₂₅₄,

eluente acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1; v/v/v) e detecção com NP/PEG e aquecimento (Fig. 49).

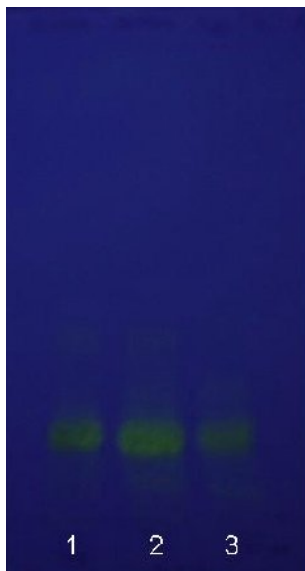


Figura 49: Co-cromatografia entre BFII e a substância BRIV isolada a partir da fração butanólica das raízes de *W. ebracteata* neste trabalho

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄
Eluente: AcOEt:CH₃COOH:H₂O (8:1:1; v/v/v)
Detecção: NP/PEG e aquecimento/366 nm
Amostras: 1- BFII
2- BFII + substância BRIV
3- substância BRIV

Dessa forma foi possível afirmar que BFII é a substância BRIV. Assim como nas raízes o isolamento de BRIV proveniente das folhas de *Wilbrandia ebracteata* é inédito.

5.2.1.3 Análise cromatográfica de compostos da fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

Devido ao perfil cromatográfico das substâncias encontradas na fração butanólica e também por ser essa uma fração conhecidamente rica em flavonóides, a mesma foi comparada cromatograficamente através da utilização de cromatografia em camada delgada e CLAE com padrões de flavonóides C-glicosídeos disponíveis no laboratório: orientina^{***}, vitexina^{†††}, isovitexina², swertisina^{‡‡‡}, isoorientina¹, vitexina-2-O-ramnosídeo², spinosina^{§§§} e crisina-6,8-di-C-glicosídeo^{****}, sendo os cinco primeiros mono-glicosídeos e os três últimos di-glicosídeos.

Nas cromatografias em camada delgada (Fig. 50) foi observada a predominância de sete compostos com características de flavonóides do tipo C-glicosídeos, sendo que a comparação com compostos referência demonstrou que essa fração apresenta vitexina, isovitexina, swertisina, isoorientina e spinosina, enquanto apenas traços de orientina foram identificados. Apesar de uma das substâncias apresentar valor de Rf muito semelhante ao da vitexina-2-O-ramnosídeo na cromatografia em camada delgada, foi possível verificar através de CLAE que nem ela nem crisina-6,8-di-C-glicosídeo estão presentes na fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata*. Através de CLAE (Fig. 51) também foi possível observar que os compostos majoritários são as C-glicosilflavonas swertisina, spinosina e a substância BRIV.

*** Extrasynthèse

††† Fluka

‡‡‡ Isolada e identificada nesta dissertação

§§§ Isolada a partir das raízes de *Wilbrandia ebracteata* e identificada por Santos (1989)

**** Isolada a partir das folhas de *Lichnophora ericoides*, cedida pelo Prof. Dr. Norberto Peporino Lopes

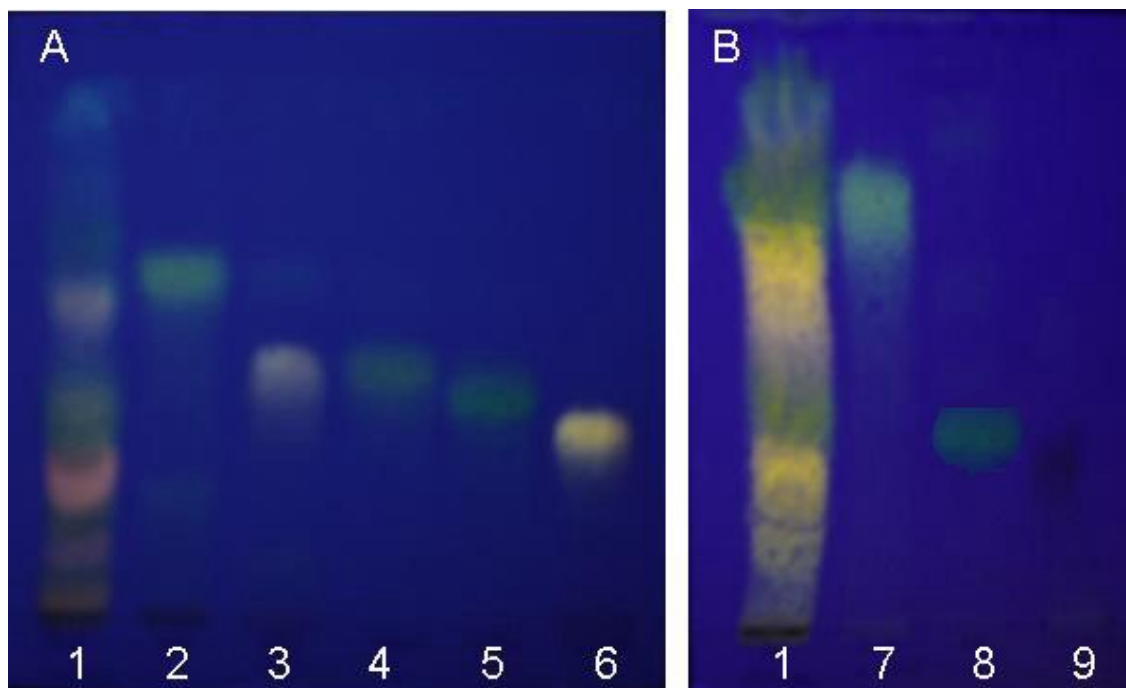


Figura 50: CCDs comparativas entre a fração butanólica das folhas de *W. ebracteata* e padrões de flavonóides C-glicosídeos

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄

Eluente: A - AcOEt:CH₃COOH:H₂O (8:1:1, v/v/v)

B - AcOEt: MeOH:CH₃COOH (11:4:0,3, v/v/v)

Deteção: NP/PEG e aquecimento/UV 366 nm

Amostras: 1- fração butanólica das raízes de *W. ebracteata*

2- vitexina

3- orientina

4- isovitexina

5- swertisina

6- isoorientina

7- vitexina-2-O-ramnosídeo

8- spinosina

9- crisina-6,8-di-C-glicosídeo

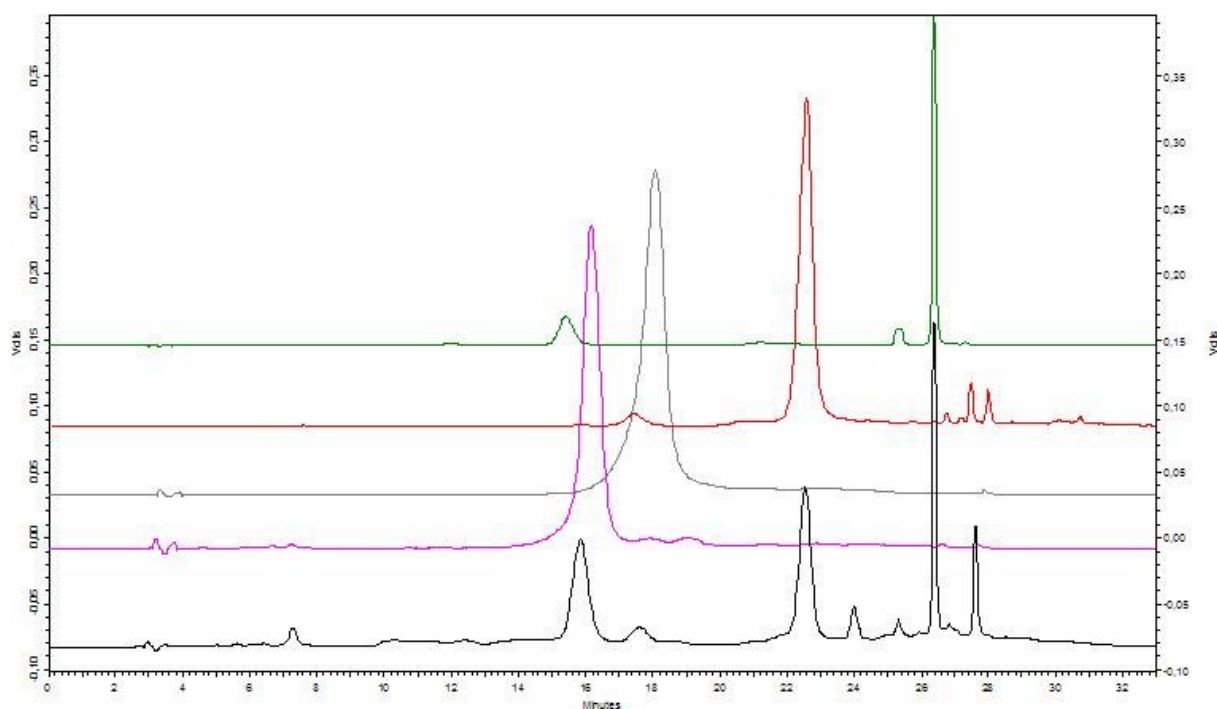


Figura 51: CLAE comparativo entre a fração butanólica das folhas de *W. ebracteata* e padrões de flavonóides C-glicosídeos

Adsorvente: Fenila

Eluente: CH₃CN:CH₃COOH 1% - gradiente

Deteção: 330 nm

Fluxo: 1 mL/min

Amostras: Preto- fração butanólica das folhas de *W. ebracteata*

Rosa- spinosina

Cinza- isovitexina

Vermelho- swertisina

Verde- BRIV

Os resultados são compatíveis aos de Coelho (2004), diferindo-se pela presença de swertisina, spinosina e a substância BRIV que não foram isoladas anteriormente da folhas de *Wilbrandia ebracteata*.

5.2.2 Análise química da fração insolúvel em água das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

5.2.2.1 Isolamento da substância IFI da fração insolúvel em água das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

Após o emprego de métodos cromatográficos foram isoladas a partir de 5 g da fração insolúvel em água das folhas de *Wilbrandia ebracteata* 10 mg da substância IFI.

5.2.2.2 Elucidação estrutural da substância IFI isolada da fração insolúvel das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

5.2.2.2.1 Elucidação estrutural de IFI

A substância IFI apresentou valor de Rf 0,61 no sistema acetato de etila:ácido acético:água (8:1:1, v/v/v). Após revelação com reagente natural A e aquecimento ela apresentou fluorescência verde-azulada sob luz UV 366 nm.

Os espectros UV obtidos em solução metanólica e também após a adição dos reagentes de deslocamento descritos por Mabry, Markham e Thomas (1970) e Markham (1982) sugerem para a parte aglicônica uma 4',5-diidroxi-flavona o que condiz com o núcleo genkwanina (Fig. 31). Os valores dos máximos de absorção e os deslocamentos obtidos encontram-se na tabela 28.

Tabela 28: Máximos de absorção e deslocamentos observados após a adição de reagentes nos espectros UV da substância IFI

Solvente/ Reagente	λ máximo (nm)		deslocamento (nm)		Informações estruturais
	banda I	banda II	banda I	banda II	
MeOH	331	271			flavona ou flavonol 3-O-subst.
NaOMe	388	270 234	+57 nm (s/ decrec. intensidade)		com -OH livre em C-4'
NaOAc	332	270		sem + 5-20 nm	sem -OH livre em C-7
NaOAc + H ₃ BO ₃	331	270	sem + 12-36 nm		sem o-diidroxí
AlCl ₃	372 346	302 280	sem deslocamento + em relação AlCl ₃ + HCl		sem o-diidroxí nos anéis A e B
AlCl ₃ + HCl	371 344	300 280	+ 40 nm		com -OH livre em C-5

Com a amostra em sua forma original foram realizados espectros ¹H-RMN e COSY (Figs. 52-54). Na região dos hidrogênios aromáticos, ou seja, entre 8,5 - 5,9 ppm foi possível observar dois dubletos em campo mais baixo e dois singletos em campo mais alto. Os dubletos em 7,87 e 6,93 ppm estão correlacionados pelo COSY e são característicos dos hidrogênios 2', 6' e 3', 5', respectivamente do anel aromático B presente no núcleo flavonoídico. O singlete em 6,67 ppm pode ser do hidrogênio em 6 ou em 8. Segundo Mabry, Markham e Thomas (1970) no espectro ¹H-RMN os sinais dos hidrogênios em 8 apresentam deslocamento químico em campo mais baixo do que os sinais dos hidrogênios em 6. Levando esse dado em consideração, juntamente com o deslocamento químico do sinal do hidrogênio em 8 (6,60 ppm) obtido para swertisina por Kumarasamy e colaboradores em 2004 foi possível sugerir que a aglicona de IFI apresenta um hidrogênio ligado ao carbono 8. O outro singlete em 6,61 ppm ocorre devido à presença do hidrogênio em 3 do núcleo flavona. Em 3,90 ppm há um singlete que é devido à metoxila ligada ao carbono 7. Em 4,82 ppm (encoberto pelo sinal do solvente) aparentemente ocorre um dubleto, que pode ser do hidrogênio do carbono anomérico de um açúcar. Esse sinal apresenta correlação pelo COSY com um dubleto em 4,46 ppm, sinal esse que não corresponde aos sinais para o hidrogênio ligado ao carbono 2 de açúcares na

literatura. Ainda em 2,02 ppm ocorre um singlete intenso que inicialmente foi atribuído à acetona, solvente utilizado para lavagem dos tubos em que são colocadas as amostras para realização dos espectros. Porém após busca na literatura, foi encontrado um trabalho (ZANG; XU, 2002) relatando o isolamento e a elucidação estrutural de dois flavonóides cujos açúcares apresentavam uma acetila. Os hidrogênios dessa acetila eram visualizados no espectro ^1H -RMN como um singlete em 1,96 ppm no caso da 3-O-acetil-glicopirranose (em DMSO) e 2,02 ppm no caso da 2-O-acetil-glicofuranose (em piridina), porém os outros valores para os hidrogênios do açúcar não eram compatíveis aos de IFI. Apesar da boa resolução do espectro, o mesmo apresenta sinais de impurezas na amostra que não foram visualizadas em cromatografia em camada delgada o que dificulta a conclusão da estrutura. Dessa forma, será realizada acetilação da substância para realização de novos espectros. IFI foi elucidada parcialmente como uma 4',5-diidroxí-7-metoxí-flavona.

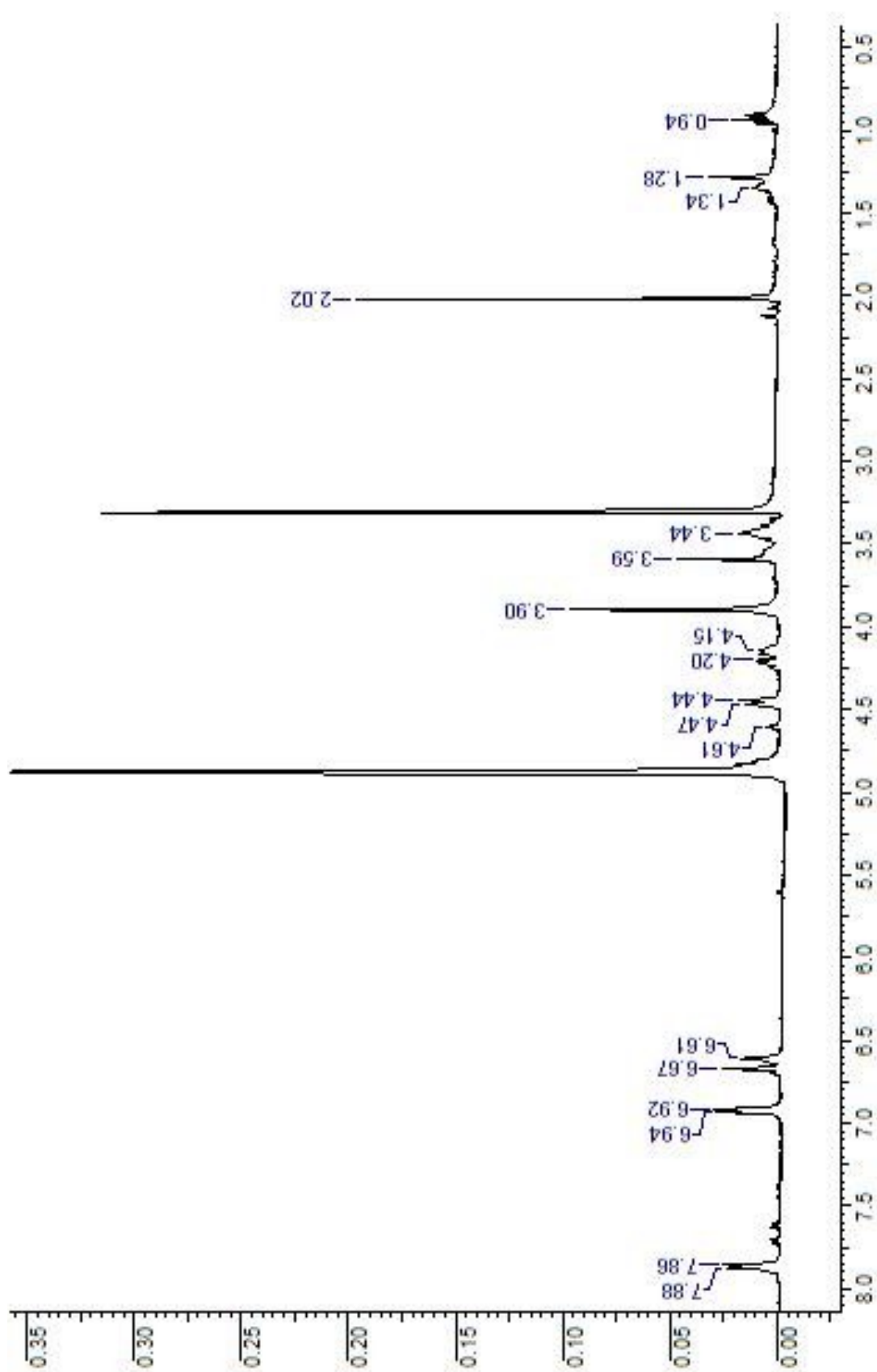


Figura 52: Espectro $^1\text{H-NMR}$ da substância IFI em CD_3OD

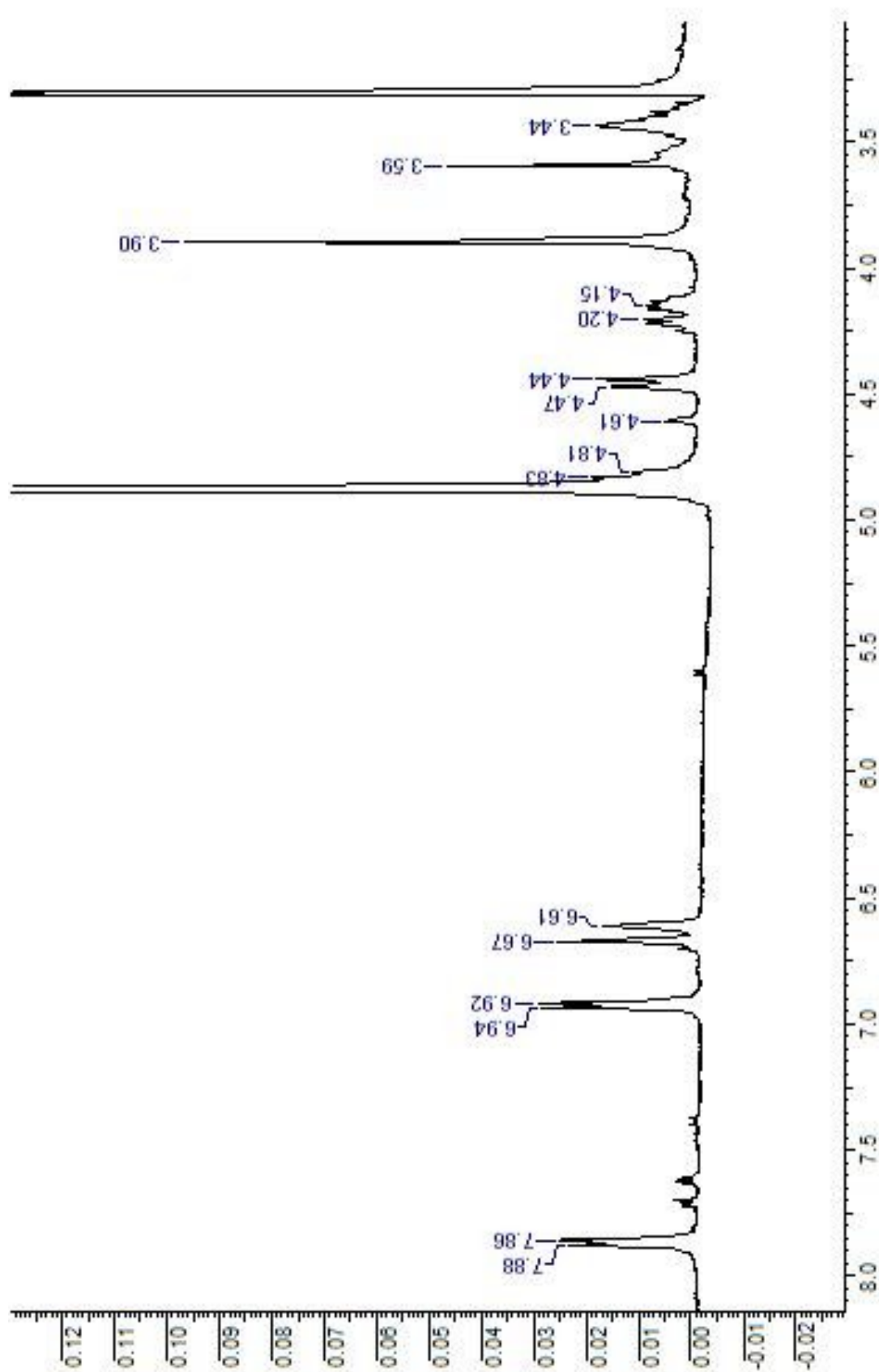


Figura 53: Espectro ^1H -RMN ampliado da substância IFI em CD_3OD

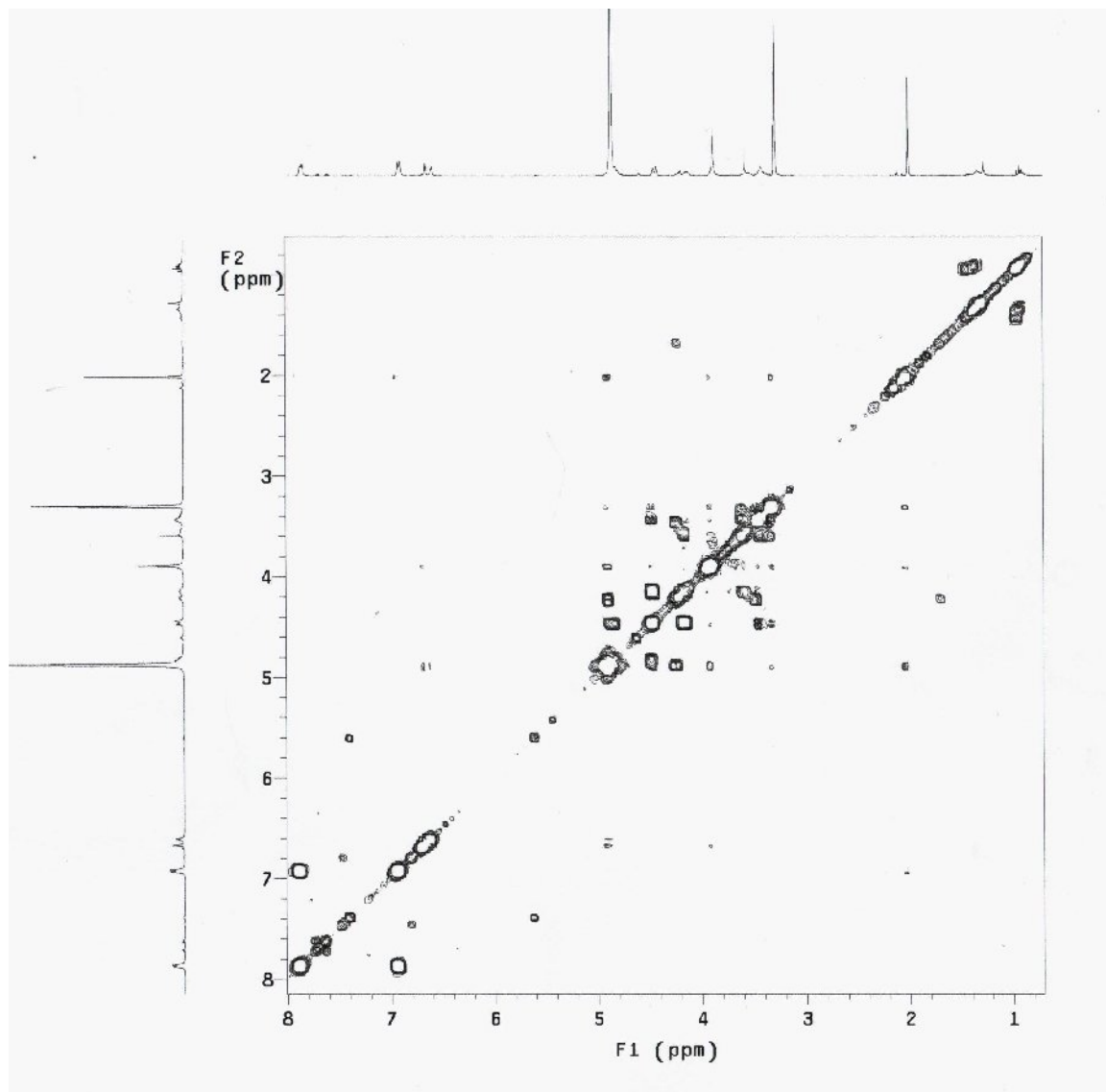


Figura 54: Espectro COSY da substância IFI em CD_3OD

5.3 Análise cromatográfica comparativa entre as frações butanólicas das raízes e das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

As análises por cromatografia em camada delgada (Fig. 55) e CLAE (Fig. 56) mostraram que as frações butanólicas das raízes e das folhas de *Wilbrandia ebracteata* apresentam seus perfis cromatográficos muito semelhantes, podendo-se verificar por exemplo a presença de spinosina, isovitexina, swertisina e da substância BRIV isolada neste trabalho. Além disso, a análise cromatográfica por CLAE também demonstrou que a área relativa ao pico da isovitexina é maior na fração butanólica proveniente das raízes do que na mesma fração provinda das folhas, o que indica que a concentração desse composto é mais elevada nas raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Outro dado obtido é a diferença quanto aos flavonóides C-glicosídeos do tipo luteolina que aparentemente são mais concentrados nas folhas do que nas raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Isso pode ser visualizado através da cromatografia em camada delgada pela presença de maior número de manchas com fluorescência alaranjada nas folhas, o que segundo Wagner e Bladt (1996) é característico de flavonóides com núcleo tipo luteolina, ou seja, 5,3',4'-triidroxi-flavona.

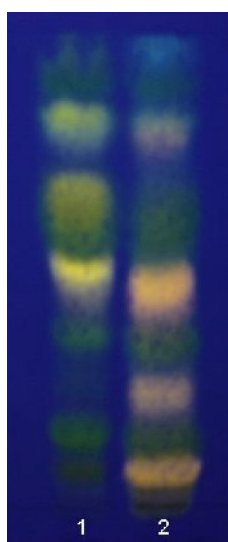


Figura 55: CCD comparativa entre as frações butanólicas das raízes e das folhas de *W. ebracteata*

Adsorvente: gel de sílica 60 F₂₅₄

Eluente: AcOEt:CH₃COOH:H₂O (8:1:1; v/v/v)

Deteção: NP/PEG e aquecimento/UV 366 nm

Amostras: 1- fração butanólica das raízes de *W. ebracteata*

2- fração butanólica das folhas de *W. ebracteata*

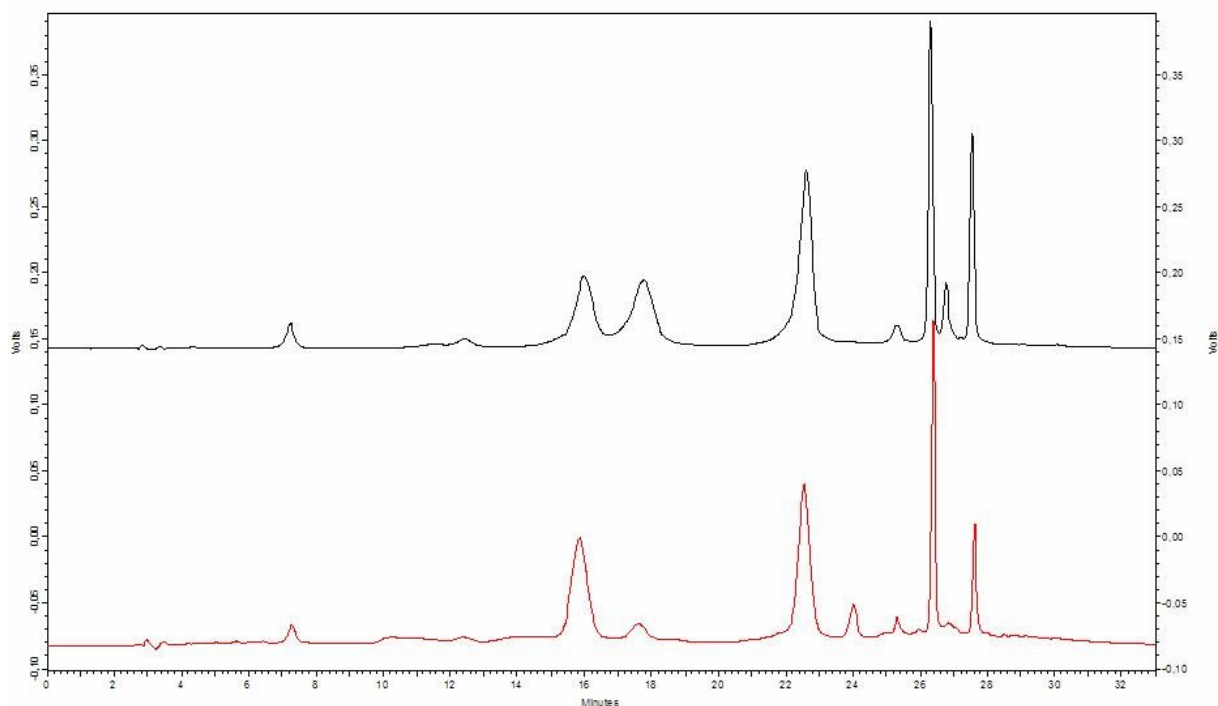


Figura 56: CLAE comparativo entre as frações butanólicas das raízes e das folhas de *W. ebracteata*

Adsorvente: Fenila

Eluente: CH₃CN:CH₃COOH 1% - gradiente

Deteção: 330 nm

Fluxo: 1 mL/min

Amostras: Preto- fração butanólica das raízes de *W. ebracteata*

Vermelho- fração butanólica das folhas de *W. ebracteata*

6 CONCLUSÕES

- Para as raízes de *Wilbrandia ebracteata*;
 - Da fração diclorometano das raízes de *Wilbrandia ebracteata* foram isolados os glicosídeos de cucurbitacinas:
 - $16\alpha,23\alpha$ -epoxi-2-O- β -glicopiranosil-3 β ,20 β -diidroxil-10 α ,23 β -cucurbit-5,24-dien-11-ona e $16\alpha,23\alpha$ -epoxi-2-O- β -glicopiranosil-3 β ,20 β -diidroxil-10 α ,23 α -cucurbit-5,24-dien-11-ona, em mistura, substâncias essas que ainda não foram descritas na literatura;
 - 2-O- β -glicopiranosídeo da diidrocucurbitacina B descrita previamente em mistura com outros glicosídeos de cucurbitacinas nas raízes de *Wilbrandia ebracteata*.
 - Da fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata* foram isolados os flavonóides C-glicosídeos: spinosina, isovitexina, swertisina e um di-glicosídeo da 4',5-diidroxil-7-metoxil-flavona denominado BRIV. Esse último não havia sido identificado até o momento em frações provenientes de *Wilbrandia ebracteata*.
 - Adicionalmente, através de análise por cromatografia em camada delgada e CLAE foi comprovada a presença de vitexina, orientina e isoorientina na fração butanólica das raízes de *Wilbrandia ebracteata*. Isovitexina, swertisina, spinosina e a referida substância BRIV são os compostos majoritários, enquanto vitexina-2-O-ramnosídeo e crisina-6,8-di-C-glicosídeo não estão presentes na fração.
- Para as folhas de *Wilbrandia ebracteata*:
 - Da fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata* foram isoladas as C-glicosilflavonas spinosina e a substância BRIV, isolada da raiz de *Wilbrandia ebracteata* neste trabalho. Esses resultados são inéditos, na medida em que o único trabalho com as folhas de *Wilbrandia ebracteata* não relatou o isolamento de flavonóides di-C-glicosídeos.
 - Adicionalmente, através de cromatografia em camada delgada e CLAE foi comprovada a presença de vitexina, isovitexina, swertisina, isoorientina e traços de orientina na fração butanólica das folhas de *Wilbrandia ebracteata*. Swertisina, spinosina e a substância BRIV são os compostos majoritários enquanto vitexina-2-O-ramnosídeo e crisina-6,8-di-C-glicosídeo não estão presentes na fração.

- As frações butanólicas das raízes e da folhas de *Wilbrandia ebracteata* apresentam similaridade de composição em vista da predominância de flavonóides C-glicosídeos. No entanto, nas folhas ocorre prevalência de flavonóides C-glicosídeos com o núcleo luteolina enquanto que nas raízes predominam os C-glicosídeos com o núcleo da apigenina. Além disso, na raiz, isovitexina é um dos compostos majoritários, o que não ocorre nas folhas.

7 REFERÊNCIAS

AFIFI, E.U.; KHALIL, E., ABDALLA, S. Effect of isoorientin isolated from *Arum palaestimum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacology**, 65, p.173-177, 1999.

AGRAWAL, P.K. (ed.) **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989.

AGRAWAL, P.K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides (Review Article Number 70). **Phytochemistry**, 31, p. 3307-3330, 1992.

ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. (ed.) **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 78, p.145-149, 2001.

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

BAUER, R. **Die HPLC-analyse von cucurbitacinhaltigen arzneidrogen und phorbolestern**. 1984. 206 p. Tese de Doutorado – Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, Munique, 1984.

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

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

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

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

CHENG, G.; BAI, Y.; ZHAO, Y.; TAO, J.; LIU, Y.; TU, G.; MA, L.; LIAO, N.; XU, X. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa*. **Tetrahedron**, 56, p. 8915-8920, 2000.

CHOPIN, J.; BOUILLANT, M.L. C-glycosylflavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. (ed.) **The flavonoids**. v.2. New York: Academic Press, 1975. Cap. 12, p.633-691.

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

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

D'ÁVILA, M.C. **Da flora medicinal do Rio Grande do Sul**. 1910. 155 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina e Farmácia de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1910.

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

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

EDERY, H.; SCHATZBER-PORATH, G.; GITTER, S. Pharmacodynamic activity of elatericin (cucurbitacin D). **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, 130, p.315-335, 1961.

ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, p. 235-239, 1991.

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

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

FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; VIANNA, R.M.J.; SANTOS, R.I. Identificação de amostras comerciais de raiz de taiuiá como *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1, p.200-202, 1986.

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

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

Farmacopéia Brasileira. São Paulo: Nacional, 1926.

GMELIN, R. **Arzneim.-Forsch.**, 14, p.1021-1025, 1964. apud FARIAS, M.R. **Cucurbitacine aus *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (*Cucurbitaceae*)**. 1991. 237p. Tese de Doutorado – Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms, Universität Bonn, Bonn, 1991.

GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; LOPES, J.L.C.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, 71, p. 3-6, 2005.

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

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, 58, p.438-441, 1995.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Quimiosistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. Cap.5, p.91-106.

GRAEL, C.F.F; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J.L.C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, 76, p.73-82, 2005.

GROTEWOLD, E. (ed.) **The science of flavonoids**. Nova York: Springer, 2006

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. Cap.1, p.13-28.

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

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The flavonoids**. New York: Academic Press, 1975.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55, p.481-504, 2000.

HIEN, T.V.; HUONG, N.B.; HUNG, P.M.; DUC, N.B. Radioprotective effects of vitexin for breast cancer patients undergoing radiotherapy with cobalt-60. **Integrative Cancer Therapies**, 1, p.38-43, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

HUGUET, A.I.; MÁÑEZ, S.; ALCARAZ, M.J. Superoxide scavenging properties of flavonoids in a non-enzymic system. **Z. Naturforsch.**, 45, p.19-24, 1990.

JAY, M.; VIRICEL, M.R.; GONNET, J.F. C-Glycosylflavonoids. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. (ed.) **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. Cap.14, p.857-916.

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

KREPSKI, P.B. **Contribuição para o desenvolvimento de método para a análise quantitativa de cucurbitacinas em *Wilbrandia ebracteata* Cogn. e *Luffa operculata* (L.) Cogn., empregando CLAE e espectroscopia no UV.** 2003. 92p. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

KUMARASAMY, Y.; BYRES, M.; COX, P.J.; DELAZAR, A.; JASPAR, M.; NAHAR, L.; SHOEB, M.; SARKER, S.D. Isolation, structure elucidation, and biological activity of flavone 6-C-glycosides from *Alliaria petiolata*. **Chemistry of Natural Compounds**, 40, p.122-128, 2004.

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

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

LEMIEUX, R.U.; KOTO, S. The conformational properties of glycosidic linkages. **Tetrahedron**, 30, p.1933-1944, 1974.

LI, Y.L.; MA, S.C.; YANG, Y.T.; YE, S.M., BUT, P.P.H. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **Journal of Ethnopharmacology**, 79, p.365-368, 2002.

LIMA, C. **Contribuição ao estudo das metaclamídeas medicinais de Ouro Preto.** Minas Gerais: Mineira, 1941.

LIN, C.M.; HUANG, S.T.; LIANG, Y.C.; LIN, M.S.; SHIN, C.M.; CHANG, Y.C.; CHEN, T.Y. Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. **Planta Medica**, 71, p.748-753, 2005.

MARTIUS, C.F.P. **Sistema de matéria médica vegetal brasileira.** Rio de Janeiro: Eduardo & Henrique Laemmert, 1854.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids.** Nova York: Springer-Verlag, 1970.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification.** Londres: Academic Press, 1982.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, 75, p.398-400, 2004.

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

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

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

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

NEWMANN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural products**, 66, p.1022-1037, 2003.

NEWMANN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, 70, p.461-477, 2007.

ORHAN, D.D.; ASLAN, M.; AKTAY, G.; ERGUN, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle. **Life Sciences**, 72, p.2273-2283, 2003.

ORTH, P.P.C. **A flora medicinal do herbário Anchieta na exposição farroupilha**. Porto Alegre: Globo, 1937.

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

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

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

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 2.ed. Orlando:Harcourt Brace College Publishers, 1996.

PECKOLT, T. Plantas medicinais e úteis do Brasil. **Revista da Flora Medicinal**, 3, p.479-482, 1937.

PEREIRA, A.M.C.B.; FARIAS, M.R.; VARGAS, V.M.F. Study of the mutagenic activity of extracts of the plant *Wilbrandia ebracteata*. **Phytotherapy research**, 10, p.512-516, 1996.

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

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

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

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

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

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

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

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

ROTHENBURGER, J.; HASLINGER, E. New cucurbitacine glycosides from *Gratiola officinalis* L. **Monatshefte für Chemie**, 126, p.1331-1339, 1995.

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

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

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

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

SATHIAMOORTHY, B.; GUPTA, P.; KUMAR, M.; CHATURVEDI, A.K.; SHUKLA, P.K.; MAURYA, R. New antifungal flavonoid glycoside from *Vitex negundo*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 17, p.239-242, 2007.

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

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. Cap.15, p.371-400.

SHOHAT, B.; BEEMER, A.M.; GITTER, S.; LAVIE, D. Antifertility activity of dihydroelatericin A in the female mouse. **Experientia**, 28, p.1203-1205, 1972.

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

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

SNATZKE, G.; ENSLIN, P.R.; HOLZAPFEL, C.W.; NORTON, K.B. Bitter principles of the Cucurbitaceae. Part XVI. Stereochemistry of cucurbitacin ring α -ketols and their acetates. **Journal of the Chemical Society C: organic**, p.792-796, 1967.

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

WAGNER H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2.ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

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

WITKOWSKI, A.; KONOPA, J. Binding of the cytotoxic and antitumor triterpenes, cucurbitacins, to glucocorticoid receptors of HeLa cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 654, p.246-255, 1981.

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

YAMADA, Y.; HAGIWARA, K.; IGUCHI, K. Structures of arveninI and II, bitter principles from *anagallis arvensis* L. (Primulaceae). New cucurbitacin glucosides. **Tetrahedron Letters**, 24, p.2099-2102, 1977.

ZANG, P.C.; XU, S.X. Two new C-glucoside flavonoids from leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. **Chinese Chemical Letters**, 13, p.337-340, 2002.

ZIELINSKI, J.; KONOPA, J. Thin-layer chromatography of cucurbitacins-a group of tetracyclic triterpenes. **Journal of Chromatography A**, 36, p.540-542, 1968.