



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

CLÉIA ROCHA DE SOUSA FEITOSA

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO
QUÍMICO-BIOLÓGICO DE PLANTAS DO
NORDESTE DO BRASIL:
Luffa operculata Cogn.**

FORTALEZA-CEARÁ

2011

CLÉIA ROCHA DE SOUSA FEITOSA

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO-
BIOLÓGICO DE PLANTAS DO NORDESTE DO
BRASIL: *Luffa operculata* Cogn.**

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientador: Dr. Francisco José Queiroz Monte

FORTALEZA-CEARÁ

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- F336c Feitosa, Cléia Rocha de Sousa.
 Contribuição ao conhecimento químico-biológico de plantas do Nordeste do Brasil: *Luffa operculata* Cogn. / Cléia Rocha de Sousa Feitosa – 2012.
 287 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2012.
 Área de Concentração: Química de Produtos Naturais.
 Orientação: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.
1. *Luffa operculata* 2. Curcubitacina 3. Atividades biológicas I. Título.

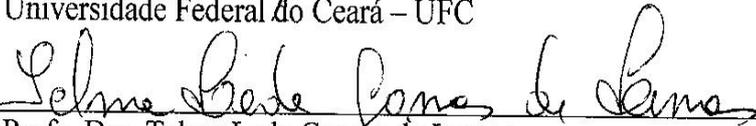
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários
obtenção do Grau de Doutor em Química, outorgado pela Universidade Federal do Ceará,
em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos
interessados.


Cléia Rocha de Sousa Feitosa

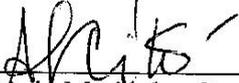
TESE APROVADA EM: 20/12/2011

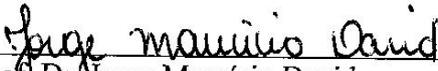
EXAMINADORES:


Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó
Universidade Federal do Piauí – UFPI


Prof. Dr. Jorge Mauricio David
Universidade Federal da Bahia – UFBA

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Pai, por sua presença e força que concedeu mais essa conquista me abençoando e me capacitando para realizar tudo aquilo que Ele me permite.

Aos meus Pais, Francisco Alcídio de Sousa e Raimunda Rocha Veloso de Sousa pelo apoio para realização desse sonho e conquista.

Aos meus irmãos, Clébia e Fabrício pela ajuda sempre que requisitada.

Ao Meu marido José Helder Feitosa, que chegou aos 45 minutos do segundo tempo para compartilhar mais essa etapa na minha vida estudantil.

A minha filha Maria Cléa que sempre me compreendeu e me ajudou a superar os momentos mais difíceis de nossas vidas, EU TE AMO!

À Universidade Federal do Ceará, pela possibilidade de concluir mais uma etapa de minha formação.

À Universidade Estadual do Ceará e a Faculdade de Educação de Crateús pela liberação do afastamento das minhas atividades para que eu pudesse concluir o doutorado.

Ao Professor Dr. Francisco José Queiroz Monte, pelo seu incentivo, paciência e orientação ao longo de todos estes anos e por sua contribuição valiosa e indispensável para a execução deste trabalho.

Ao Dr. Raimundo Braz Filho pela sua inestimável ajuda na interpretação dos espectros e identificação das substâncias.

Às professoras Ângela Marta Campos Arriaga, Telma Leda Gomes de Lemos e Maria Teresa Salles Trevisan pela contribuição na defesa do exame de qualificação.

Aos professores, Dr^a Antônia Maria das Graças Lopes Citó, Dr. Jorge Maurício David, Dr. Marcos Carlos de Mattos e Dr^a Telma Leda Gomes de Lemos pela contribuição na defesa da tese.

Aos professores Ângela Marta Campos Arriaga, Edilberto Rocha Silveira, Francisco Geraldo Barbosa, Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, Jair Mafezoli, Manoel Andrade Neto, Marcos Carlos de Matto, Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, Maria Goretti de Vasconcelos Silva, Maria Teresa Salles Trevisan, Mary Anne Sousa Lima, Nilce

Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil, Otília Deusdênia Loiola Pessoa e Telma Leda Gomes de Lemos, por sua atenção, apoio e estímulos recebidos.

Aos amigos, em especial a Andréia e Celma, pelas orações e apoio em todos os momentos que precisei, e não foram poucos, a Mundinha e Andreza, pela companhia de todos os dias, sobre quem descarreguei minhas emoções, nos momentos difíceis gerados pelo estresse da minha caminhada, as quais foram acolhidas com paciência e compreensão.

Aos amigos, Jane Eire, Zelina, Patrícias, Isabel, Ceíça, Gustavo, Bruno, Robério, Aurélio, Roberto, Ticiane, Max, Karine, Karísia, Daniele e Davina, pela grande atenção e disponibilidade para ajudar.

Ao José Gustavo Lima de Almeida pela obtenção de todos os espectros de ressonância magnética das substâncias isoladas.

Ao Raimundo Regivaldo Gomes do Nascimento pela realização do teste de atividade nematecida.

A Dr^a Jane Eire da Silva Alencar de Menezes pela realização do teste frente à enzima acetilcolinesterase.

Ao Leonardo Alcântara Alves e Márcia Cleane Soares de Almeida pela realização do teste de atividade antioxidante.

A Dr^a Cláudia do Ô Pessoa e Felipe Augusto Rocha Rodrigues pelo teste para avaliação do potencial citotóxico.

Ao Jayme Alencar de Oliveira Filho pela correção do abstract.

Aos funcionários Laurilane Maria Barbosa, Raimunda Cassiano de Moraes, Paulo Ribeiro, Célia Regina Xavier de Sena, José Orlando Soares de Oliveira e ao bolsista Robério Costa da Silva, pela amizade e diversos serviços prestados.

À todas as pessoas que de alguma forma tenham contribuído direta ou indiretamente no transcorrer desta tese.

A FUNCAP pelo suporte financeiro.

*“Minha carne e meu coração podem
desfalecer; mas Deus é a força do meu coração,
e minha porção para sempre”*

Sl 73: 26

RESUMO

Luffa operculata (Cucurbitaceae) é uma planta amplamente distribuída no Nordeste do Brasil onde é conhecida como "cabacinha". Uma solução aquosa a partir dos frutos é usada popularmente para o tratamento de sinusites e como remédio para problemas estomacais e purgante. O amplo espectro de efeitos farmacológicos descritos na literatura e a abundância desta planta na zona rural do Nordeste do Brasil justificaram o presente estudo. Assim, a planta foi submetida a estudo fitoquímico com o objetivo de isolamento e caracterização dos seus metabolitos secundários. A família Cucurbitaceae é caracteristicamente rica em cucurbitacinas, que são triterpenos oxidados com esqueleto carbônico modificado. Esses metabolitos, juntamente com seus derivados glicosilados são considerados os agentes responsáveis pela toxicidade potente observado nos extratos dos frutos de *Luffa operculata*. Os constituintes foram isolados e purificados usando repetidas colunas cromatográficas. O extrato etanólico dos frutos conduziu ao isolamento de seis triterpenóides do tipo cucurbitano (cucurbitacina D, isocucurbitacina D, 3-epi-isocucurbitacina D, cucurbitacina I, cucurbitacina B e arvenina I). O extrato etanólico dos talos deu origem a duas quinonas (emodina e crisofanol), bem como, uma mistura de ésteres alifáticos (acetato de hexadecanoíla e acetato de octadecanoíla) e um raro triterpeno do tipo friedolenano (ácido brionólico); do extrato etanólico das cascas dos frutos foram isolados uma mistura de esteróides [(22E,24S)-etil-5 α -colest-7,22-dien-3 β -ol e (22E,24R)-etil-5 α -colest-7,22,25-trien-3 β -ol] e uma mistura de ceramidas (1,3,4-tri-hidroxi-2-[2'-hidroxi-docosanoilamino]-19-tetracasadeceno e 1,3,4-tri-hidroxi-2-[2'-hidroxi-henicosanoilamino]-19-tetracasadeceno). Por outro lado, do extrato hexânico das folhas foi isolado uma mistura de esteróides [(22E,24S)-etil-5 α -colest-7,22-dien-3 β -ol e (22E, 24R)-etil-5 α -colest-7,22,25-trien-3 β -ol] enquanto, do extrato hexânico dos talos da planta foram isolados o esteróide (spinasterol) e uma mistura de ceramidas [(N-(2-isopropoxi-etil)eicosamida, N-(2-isopropoxi-etil)nonadecanamida, N-(2-isopropoxi-etil)octadecanamida, N-(2-isopropoxi-etil)heptadecanamida, N-(2-isopropoxi-etil)hexadecanamida]. No objetivo de comprovação estrutural dos constituintes, bem como, para efeito de treinamento junto aos processos e utilização de aparelhagem laboratorial, vários derivados reacionais foram obtidos através de reações químicas clássicas, tais como, oxidação, esterificação, hidrólise e metanólise. Além disso, os extratos brutos e alguns dos compostos naturais isolados foram avaliados com relação a atividades biológicas. Alguns dos compostos isolados foram descritos pela primeira vez a partir de *Luffa operculata*, enquanto, as ceramidas são novas para a literatura. Os espectros de RMN (^1H e ^{13}C), IV e EM, bem como, comparação com dados espectrométricos de compostos descritos na literatura, permitiram a elucidação estrutural completa de todos os compostos.

ABSTRACT

Luffa operculata (Cucurbitaceae) is a plant widely distributed in Northeastern Brazil, where is known as “cabacinha”. An aqueous solution from the fruit of “cabacinha” has been popularly used for the treatment of sinusitis as a bitter stomachic and purgative remedy. The broad spectrum of pharmacological effects reported in the literature and the abundance of this plant in rural Northeastern Brazil justified this study. The plant was subjected to phytochemical study with the objective of isolation and characterization of their secondary metabolites. The Cucurbitaceae are characteristically rich in cucurbitacins, which are oxidative modified triterpenes that together with their glycosides counterparts are considered the agents responsible for the potent toxicity observed in extracts of the fruit of *Luffa operculata*. Through various chromatographic steps the elements were purified and isolated. The ethanol extract of the fruit of *Luffa operculata* yielded the isolation of six triterpenoids (cucurbitacin D, isocucurbitacin D, 3-epi-isocucurbitacin D, cucurbitacin I, cucurbitacin B and arvenin I). The ethanol extract of the stems yielded two quinones (emodine and chrisophanol), as well as a mixture of aliphatic esters (hexadecanoic acid, ethyl ester and octadecanoic acid, ethyl ester) and one rare triterpene friedolenane type (bryonolic acid). Furthermore, a mixture of steroids [(22*E*, 24*S*)-ethyl-5 α -cholest-7,22-dien-3 β -ol and (22*E*,24*R*)-ethyl-5 α -cholest-7,22,25-trien-3 β -ol]; ceramides (1,3,4-trihydroxy-2-[2'-hydroxydocosanoylamino]-19-tetracasadecene and 1,3,4-trihydroxy-2-[2'-hydroxyhenicosanoylamino]-19-tetracasadecene) were isolated from the ethanol extract of the fruit bark. Meanwhile, a mixture of steroids was isolated from the hexane extract of the leaves [(22*E*, 24*S*)-ethyl-5 α -cholest-7,22-dien-3 β -ol and (22*E*,24*R*)-ethyl-5 α -cholest-7,22,25-trien-3 β -ol), while the hexane extract of the stems yielded one steroid (spinasterol) and a mixture of ceramides [(N-(2-isopropoxy-ethyl)eicosamide, N-(2-isopropoxy-ethyl)nonadecanamide, N-(2-isopropoxy-ethyl)octadecanamide, N-(2-isopropoxy-ethyl)heptadecanamide, N-(2-isopropoxy-ethyl)hexadecanamide]. In order to provide training activities in the laboratory and to collect structural proof of the extracts, several derivatives were prepared by classical reactions such as oxidation, esterification, hydrolysis and methanolysis. In addition, crude extracts and a few of the isolated natural products were assessed for biological activities. Some of the compounds found were described for the first time from *Luffa operculata*, while the ceramides isolated from the extract are new to the literature. The ^1H and ^{13}C NMR, IR and MS spectra and a comparison with previous spectral data allowed the research team to fully understand the chemical structure of all compounds.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Diferentes fontes de agentes terapêuticos	24
Figura 2	Fotos de <i>Luffa operculata</i> Cogn.	28
Figura 3	Aspectos dos cortes longitudinal e transversal; semente e a trama da parte do fruto de <i>Luffa operculata</i> Cogn.	28
Figura 4	Frutos secos de <i>Luffa operculata</i> Cogn.	29
Figura 5	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 1	83
Figura 6	Espectro de RMN ^{13}C de LOS 1 (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	84
Figura 7	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 1 (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	85
Figura 8	Espectro de RMN ^1H de LOS 1 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	86
Figura 9	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 7	90
Figura 10	Espectro de RMN ^{13}C de LOS 7 (125 MHz, CDCl_3)	91
Figura 11	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 7 (125 MHz, CDCl_3)	92
Figura 12	Espectro de massa de LOS 7	93
Figura 13	Espectro de RMN ^1H de LOS 7 (500 MHz, CDCl_3)	94
Figura 14	Espectro HMQC de LOS 7 (500 e 125 MHz, CDCl_3)	95
Figura 15	Espectro ^1H x ^1H -COSY de LOS 7 (125 MHz, CDCl_3)	96
Figura 16	Espectro HMBC de LOS 7 (500 e 125 MHz, CDCl_3)	97
Figura 17	Espectro de RMN ^{13}C de LOS 2 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	102
Figura 18	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 2 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	103
Figura 19	Espectro de RMN ^1H de LOS 2 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	104

Figura 20	Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 2 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	105
Figura 21	Espectro HMQC de LOS 2 (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	106
Figura 22	Espectro HMBC de LOS 2 (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	107
Figura 23	Espectro de massa de LOS 2	108
Figura 24	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 8	114
Figura 25	Espectro de RMN ^{13}C de LOS 8 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	115
Figura 26	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 8 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	116
Figura 27	Espectro de RMN ^1H de LOS 8 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	117
Figura 28	Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 8 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	118
Figura 29	Espectro HMQC de LOS 8 (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	119
Figura 30	Espectro HMBC de LOS 8 (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	120
Figura 31	Espectro de massa em alta resolução de LOS 8	121
Figura 32	Espectro de massa de LOS 8	122
Figura 33	Cromatograma CG-MS dos produtos da metanólise de LOS 8	123
Figura 34	Espectro de RMN ^{13}C de LOS 5 (125 MHz, Acetona- d_6 , DMSO- d_6)	127
Figura 35	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 5 (125 MHz, DMSO- d_6)	128
Figura 36	Espectro HMQC de LOS 5 (500 e 125 MHz, Acetona- d_6)	129
Figura 37	Espectro HMBC de LOS 5 (500 e 125 MHz, Acetona- d_6)	130
Figura 38	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 5	131
Figura 39	Espectro de RMN ^1H de LOS 5 (500 MHz, DMSO- d_6 , Acetona- d_6)	132
Figura 40	Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 5 (125 MHz, Acetona- d_6 , DMSO- d_6)	133

Figura 41	Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 5 (125 MHz, DMSO- d_6 , Acetona- d_6)	134
Figura 42	Espectro de RMN ^{13}C de LOS 3 (125 MHz, CDCl_3)	138
Figura 43	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 3 (125 MHz, CDCl_3)	139
Figura 44	Espectro HMQC de LOS 3 (500 e 125 MHz, CDCl_3)	140
Figura 45	Espectro HMBC de LOS 3 (500 e 125 MHz, CDCl_3)	141
Figura 46	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 3	142
Figura 47	Espectro de RMN ^1H de LOS 3 (500 MHz, CDCl_3)	143
Figura 48	Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 3 (125 MHz, CDCl_3)	144
Figura 49	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 4	147
Figura 50	Espectro de RMN ^{13}C de LOS 4 (125 MHz, CDCl_3)	148
Figura 51	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 4 (125 MHz, CDCl_3)	149
Figura 52	Espectro de RMN ^1H de LOS 4 (500 MHz, CDCl_3)	150
Figura 53	Cromatograma de LOS 4	151
Figura 54	Espectro de massa de LOS 4 (14)	152
Figura 55	Espectro de massa de LOS 4 (15)	152
Figura 56	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 6	158
Figura 57	Espectro de RMN ^1H de LOS 6 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	159
Figura 58	Espectro de RMN ^{13}C de LOS 6 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	160
Figura 59	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 6 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	161
Figura 60	Espectro HMBC de LOS 6 (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	162

Figura 61	Espectro HMQC de LOS 6 (500 e 125 MHz, C ₅ D ₅ N)	163
Figura 62	Espectro ¹ H x ¹ H-COSY de LOS 6 (125 MHz, C ₅ D ₅ N)	164
Figura 63	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 11	172
Figura 64	Espectro de RMN ¹³ C de LOS 11 (125 MHz, CD ₃ OD)	173
Figura 65	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de LOS 11 (125 MHz, CD ₃ OD)	174
Figura 66	Espectro de RMN ¹ H de LOS 11 (500 MHz, CD ₃ OD)	175
Figura 67	Espectro HMBC de LOS 11 (500 e 125 MHz, CD ₃ OD)	176
Figura 68	Espectro HMBC (expansão) de LOS 11 (500 e 125 MHz, CD ₃ OD)	177
Figura 69	Espectro ¹ H x ¹ H-COSY de LOS 11 (125 MHz, CD ₃ OD)	178
Figura 70	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 12	184
Figura 71	Espectro de RMN ¹³ C de LOS 12 (125 MHz, CD ₃ OD)	185
Figura 72	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de LOS 12 (125 MHz, CD ₃ OD)	186
Figura 73	Espectro de RMN ¹ H de LOS 12 (500 MHz, CD ₃ OD)	187
Figura 74	Espectro HMBC de LOS 12 (500 e 125 MHz, CD ₃ OD)	188
Figura 75	Espectro HMQC de LOS 12 (500 e 125 MHz, CD ₃ OD)	189
Figura 76	Espectro ¹ H x ¹ H-COSY de LOS 12 (125 MHz, CD ₃ OD)	190
Figura 77	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 14	196
Figura 78	Espectro de RMN ¹³ C de LOS 14 (125 MHz, CD ₃ OD)	197
Figura 79	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de LOS 14 (125 MHz, CD ₃ OD)	198
Figura 80	Espectro de RMN ¹ H de LOS 14 (500 MHz, CD ₃ OD)	199
Figura 81	Espectro HMQC de LOS 14 (500 e 125 MHz, CD ₃ OD)	200

Figura 82	Espectro HMBC de LOS 14 (500 e 125 MHz, CD ₃ OD)	201
Figura 83	Espectro ¹ H x ¹ H-COSY de LOS 14 (125 MHz, CD ₃ OD)	202
Figura 84	Espectro de RMN ¹³ C de LOS 1- Ac (125 MHz, CDCl ₃)	204
Figura 85	Espectro de RMN ¹ H de LOS 1- Ac (500 MHz, CDCl ₃)	205
Figura 86	Espectro de RMN ¹³ C de LOS 7- Ac (125 MHz, CDCl ₃)	207
Figura 87	Espectro de RMN ¹ H de LOS 7- Ac (500 MHz, CDCl ₃)	208
Figura 88	Espectro de massa LOS 9-JO [M+Na] ⁺	210
Figura 89	Espectro de massa LOS 9-JO [M+K] ⁺	210
Figura 90	Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 14- HIDRO	211
Figura 91	Espectro de massa LOS 14- HIDRO [M+Na] ⁺ e [M+K] ⁺	212
Figura 92	Espectro de massa LOS 14- HIDRO [M+Cl] ⁻	212
Figura 93	Espectro de massa LOS 9- RED [M+Na] ⁺	213
Figura 94	Espectro de massa LOS 9- RED [M-H] ⁻ e [M+Cl] ⁺	213
Figura 95	Cromatograma em fase líquida (CLAE) da fração 65-108	239
Figura 96	Cromatograma em fase líquida (CLAE) da fração 125-140	240
Figura 97	Procedimento para a realização do teste de Ellman	245

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (75 MHz) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ de LOS 1 e LOS 1-Ac (125 MHz) em CDCl_3 com dados descritos na literatura	82
Tabela 2	Análise comparativa dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) de LOS 7 e LOS 7-Ac com aqueles registrados na literatura	89
Tabela 3	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ de LOS 2. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.	101
Tabela 4	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^1H de LOS 2 com dados descritos na literatura	101
Tabela 5	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ de 8 e 9 . Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.	112
Tabela 6	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ de 8 e 9 com dados descritos na literatura	113
Tabela 7	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em Acetona- d_6 de LOS 5. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.	126
Tabela 8	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de LOS 5 com dados descritos na literatura	126
Tabela 9	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de LOS 3. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.	137
Tabela 10	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de LOS 3 com dados descritos na literatura	137
Tabela 11	Fragmentações de LOS 4 (14) no espectrômetro de massa	146
Tabela 12	Fragmentação de LOS 4 (15) no espectrômetro de massa	146
Tabela 13	Deslocamento químico de carbono-13 (δ) para LOS 6 obtidos dos deslocamentos de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	155
Tabela 14	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ de LOS 6. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz	156
Tabela 15	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de LOS 6 com dados descritos na literatura	157

Tabela 16	Deslocamentos químicos de carbono-13 (δ) para LOS 11 obtidos dos deslocamentos de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD)	166
Tabela 17	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em CD_3OD de LOS 11. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz	170
Tabela 18	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) em CD_3OD de LOS 11 com dados descritos na literatura	171
Tabela 19	Deslocamentos químicos de carbono-13 (δ) para LOS 12 obtidos dos deslocamentos de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD)	179
Tabela 20	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em CD_3OD de LOS 12. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz	182
Tabela 21	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) em CD_3OD de LOS 12 com dados descritos na literatura	183
Tabela 22	Deslocamentos químicos de carbono-13 (δ) para LOS 14 obtidos dos deslocamentos de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD)	192
Tabela 23	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em CD_3OD de LOS 14. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz	194
Tabela 24	Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) em CD_3OD de LOS 14 com dados descritos na literatura	195
Tabela 25	Frações obtidas a partir do extrato hexânico dos talos (LOEHT)	218
Tabela 26	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEHT-D	220
Tabela 27	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEHT-D	220
Tabela 28	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração H_6	221
Tabela 29	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração H_6	221
Tabela 30	Frações obtidas a partir do extrato etanólico dos talos (LOEET)	222
Tabela 31	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEET-C	223
Tabela 32	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEET-C	224
Tabela 33	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração E_2	224
Tabela 34	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração E_2	225
Tabela 35	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração $\text{E}_{2\text{C}}$ a $\text{E}_{2\text{F}}$	225

Tabela 36	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEET-AcOEt	226
Tabela 37	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEET-AcOEt	227
Tabela 38	Frações obtidas a partir do extrato hexânico das folhas (LOEHFO)	228
Tabela 39	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEHFO-D	230
Tabela 40	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEHFO-D	231
Tabela 41	Frações obtidas a partir do extrato etanólico das cascas do fruto (LOEECA)	232
Tabela 42	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEECA-D	234
Tabela 43	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEECA-D	234
Tabela 44	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEECA-Ac	235
Tabela 45	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEECA-Ac	235
Tabela 46	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração (LOEEF)	237
Tabela 47	Dados referentes à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das frações 65-108 e 125-140	238
Tabela 48	Frações obtidas através de CLAE a partir LOEEF	238
Tabela 49	Frações obtidas através de CLAE a partir LOEEF	239
Tabela 50	Resultados do teste de toxicidade sobre <i>Meloidogyne incognita</i>	243
Tabela 51	Resultado do teste de inibição de acetilcolinesterase	244
Tabela 52	Resultados do teste de atividade antioxidante	247
Tabela 53	Resultado do teste para avaliação do potencial citotóxico	249
Tabela 54	Percentual de inibição do crescimento celular (GI%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25µg/mL. Valores são média ± DPM	250

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	Obtenção dos extratos hexânico (LOEHT) e etanólico (LOEET) dos talos de <i>Luffa operculata</i>	218
Fluxograma 2	Obtenção das substâncias LOS 1 e LOS 2 a partir do extrato hexânico LOEHT	219
Fluxograma 3	Obtenção das substâncias LOS 3, LOS 4, LOS 5 e LOS 6 a partir do extrato etanólico LOEET	222
Fluxograma 4	Obtenção dos extratos hexânico (LOEHFO) e etanólico (LOEEFO) das folhas de <i>Luffa operculata</i>	229
Fluxograma 5	Obtenção da substância LOS 7 a partir do extrato hexânico LOEHFO	229
Fluxograma 6	Obtenção dos extratos hexânico (LOEHCA) e etanólico (LOEECA) das cascas de <i>Luffa operculata</i>	232
Fluxograma 7	Obtenção das substâncias LOS 7 e LOS 8 a partir do extrato etanólico LOEECA	233
Fluxograma 8	Obtenção dos extratos hexânico (LOEHF) e etanólico (LOEEF) das cascas do fruto de <i>Luffa operculata</i>	236
Fluxograma 9	Obtenção das substâncias LOS 9, LOS 10, LOS 11, LOS 12, LOS 13 e LOS 14 a partir do extrato etanólico LOEEF	240

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estruturas das cucurbitacinas mais conhecidas	34
Quadro 2	Cucurbitacinas com modificações estruturais	38
Quadro 3	Espécie, estrutura, atividade biológica e fonte bibliográfica de triterpenos do tipo curbitano	39
Quadro 4	Estruturas dos componentes da mistura e fragmentos de massas propostos para LOS 2 (3-7)	100
Quadro 5	Subestruturas para LOS 6, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro de HMBC.	155

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	24-
CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS E FARMACOGNÓSTICAS	27
1.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A FAMÍLIA CUCURBITACEAE	27
1.2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A ESPÉCIE <i>Luffa operculata</i> Cogn.	27
1.3 CONSIDERAÇÕES FARMACOGNÓSTICAS SOBRE <i>Luffa operculata</i> Cogn.	29
CAPÍTULO 2 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA (TRITERPENOS DO TIPO CUCURBITANO)	31
2.2 TRITERPENOS COM ESQUELETO DO TIPO CUCURBITANO: CUCURBITACINAS	31
2.3 CARACTERÍSTICAS DAS CUCURBITACINAS	32
2.4 O ESQUELETO CARBÔNICO	32
CAPÍTULO 3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>Luffa operculata</i> Cogn.	80
3.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 1	80
3.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 7	87
3.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 2	98
3.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 8	109
3.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 5	124
3.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 3	135
3.7 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 4	145
3.8 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 6	153
3.9 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 11	165
3.10 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 12	179

3.11 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE LOS 14	191
CAPÍTULO 4 OBTENÇÃO DE DERIVADOS	203
4.1 ACETILAÇÃO	203
4.1.1 LOS 1	203
4.1.2 LOS 7	206
4.2 METANÓLISE	209
4.2.1 LOS 8	209
4.3 OXIDAÇÃO	209
4.3.1 LOS 9	209
4.4 HIDRÓLISE	211
4.4.1 LOS 14	211
4.5 REDUÇÃO	212
4.5.1 LOS 9	212
CAPÍTULO 5 PARTE EXPERIMENTAL	214
5.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	214
5.1.1 CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO	214
5.1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	215
5.1.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	215
5.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	215
5.2.1 PONTO DE FUSÃO	215
5.2.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)	216
5.2.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	216
5.2.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO (IV)	217
5.3 MATERIAL BOTÂNICO	217
5.4 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS TALOS DE <i>Luffa operculata</i> Cogn.	217
5.4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICOS (LOEHT) E ETANÓLICO	217

(LOEET)	
5.4.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE LOEHT	218
5.4.3 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO (LOEHT-D)	219
5.4.4 ISOLAMENTO DE LOS 1 E LOS 2	219
5.4.5 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE LOEET	222
5.4.6 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (LOEET-C)	223
5.4.7 ISOLAMENTO DE LOS 3, LOS 4, LOS 5 E LOS 6	223
5.5 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FOLHAS DE <i>Luffa operculata</i> Cogn.	228
5.5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICOS (LOEHFO) E ETANÓLICO (LOEEFO)	228
5.5.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE LOEHFO	228
5.5.3 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO (LOEHFO-D)	230
5.5.4 ISOLAMENTO DE LOS 7 A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>Luffa operculata</i> Cogn.	230
5.6 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DA CASCA DO FRUTO DE <i>Luffa operculata</i> Cogn.	231
5.6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICOS (LOEHCA) E ETANÓLICO (LOEECA)	231
5.6.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE LOEECA	232
5.6.3 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO (LOEECA-D)	233
5.6.4 ISOLAMENTO DE LOS 7 A PARTIR DAS CASCAS DO FRUTO DE <i>Luffa operculata</i> Cogn.	233
5.6.5 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (LOEECA-AC)	234
5.6.6 ISOLAMENTO DE LOS 8	234
5.7 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DOS FRUTOS DE <i>Luffa operculata</i> Cogn.	236

5.7.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICOS (LOEHF) E ETANÓLICO (LOEEF)	236
5.7.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS (LOEEF)	237
5.7.3 ISOLAMENTO DE LOS 9, LOS 10, LOS 11, LOS 12 E LOS 13	238
5.7.4 ISOLAMENTO DE LOS 14	239
5.8 PREPARAÇÃO DE DERIVADOS	241
5.8.1 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DE LOS 1	241
5.8.2 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DE LOS 7	241
5.8.3 REAÇÃO DE METANÓLISE DE LOS 8	241
5.8.4 REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE JONES DE LOS 9	241
5.8.5 REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE LOS 14	242
5.8.6 REAÇÃO DE REDUÇÃO DE LOS 9	242
5.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS	242
5.9.1 TESTE DE ATIVIDADE NEMATECIDA	242
5.9.2 TESTE DE ATIVIDADE FRENTE À ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	243
5.9.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	245
5.9.4 TESTE PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO	248
CAPÍTULO 6 CONCLUSÃO	251
CAPÍTULO 7 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS	253
REFERÊNCIAS	264
APÊNDICES	275

INTRODUÇÃO

As plantas representaram, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. O uso das plantas como remédio é provavelmente tão antigo quanto a própria humanidade. Nas Ilhas Oceânicas, por exemplo, há séculos a planta kava kava (*Piper methysticum*) é usada como calmante. Durante muito tempo, foi utilizada em cerimônias religiosas, para um tipo de "efeito místico". Posteriormente foi comprovado que seu extrato tem efeito no combate à ansiedade (SILVA *et al.*, 2011). No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias como base para o desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados ainda são originários de plantas e 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizadas na terapia moderna (HOSTETTMANN *et al.*, 2003) (Figura 1, p. 24).

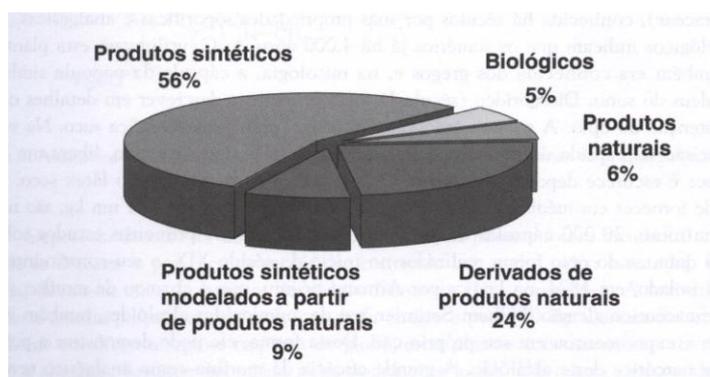


Figura 1- Diferentes fontes de agentes terapêuticos (Fonte: HOSTETTMANN *et al.*, 2003)

A fitoterapia tem se tornado cada vez mais popular entre os povos de todo o mundo. Inúmeros medicamentos no mercado utilizam em seus rótulos o termo "produto natural". Produtos à base de ginseng, carqueja, guaraná, confrei, ginko biloba, espinheira santa e sene são apenas alguns exemplos que em geral, prometem além de maior eficácia terapêutica, a ausência de efeitos colaterais. Grande parte utiliza plantas da flora estrangeira ou brasileira como matéria-prima. Os medicamentos à base de plantas são usados para os mais diferentes fins: acalmar, cicatrizar, expectorar, engordar, emagrecer e muitos outros (SILVA *et al.*, 2011).

O emprego correto de plantas medicinais para fins terapêuticos pelos serviços de saúde pública requer o uso de plantas selecionadas por sua eficácia e segurança terapêuticas, isto é,

plantas cientificamente validadas como medicinais, aliado a escolha das formas corretas de preparação e administração de seus produtos, sejam eles destinados para uso ambulatorial, hospitalar ou caseiro (MATOS, 2007).

Luffa operculata Cogn., é uma trepadeira anual da família Cucurbitaceae. Sua ocorrência se estende por toda América cisandina especialmente no Brasil, onde recebe os nomes vulgares de cabacinha e ou buchinha (BAHIA, 1979; MATOS, 1979). O fruto possui propriedades laxativas drásticas. O infuso diluído é usado no Ceará em lavagens nasais, por aspiração, no tratamento das sinusites. Extratos de várias espécies da família Cucurbitaceae inibem o crescimento de tumores (FARNSWORTH, 1966). Essas propriedades, segundo registros na literatura (MATOS; GOTTLIEB, 1967), devem-se à presença de cucurbitacinas para as quais, no entanto, cita-se elevada toxicidade. O crescente interesse pelas cucurbitacinas é o resultado da grande variedade de atividades que exercem em plantas, insetos e animais. Elas são conhecidas por seu extremo sabor amargo, tóxico, purgativo, emético, antifúngicos (BAR-NUN; MAYER, 1989; TALLAMY *et al.*, 1997) e citotóxico (LAVIE; GLOTTER, 1971; MIRO, 1995; AFIFI *et al.*, 1999). Vale destacar as propriedades das cucurbitacinas como inibidores do crescimento de tumores, como por exemplo, tumores no cérebro, melanoma (CARDELLINA *et al.*, 1990; FULLER *et al.* 1994), e ainda a inibição da adesão celular (MUSZA *et al.*, 1994). A espécie *L. operculata* age sobre as mucosas por efeito das cucurbitacinas e de seus glicosídeos. A saponina colabora com esta ação, emulsificando compostos lipossolúveis ativos, o que facilita o contato e absorção da isocucurbitacina pelas mucosas e resulta em ação cáustica sobre as mesmas (MATOS, 1979). A aspiração do infuso aquoso dos frutos há muito tempo tem sido utilizada empiricamente contra a sinusite. Porém, existem muitos relatos da ocorrência de hemorragias nasais após estas aspirações, resguardando seu uso (PLANTAS QUE CURAM, 2011).

Em geral, os extratos brutos consistem de mistura complexa de substâncias dos metabólitos primários e secundários e, estudos detalhados sobre a toxicidade de extratos obtidos a partir de muitos exemplares de plantas revelaram que a atividade biológica está diretamente relacionada com a qualidade e quantidade dos diferentes compostos por elas acumulados. Conseqüentemente, esses resultados encorajam investigações no sentido de identificar os constituintes químicos responsáveis por atividades biológicas específicas permitindo assim, maximizar os efeitos terapêuticos dessas plantas.

Estudos anteriores (KUSUMOTO *et al.*, 1989; OKABE *et al.*, 1989) a partir dos frutos de *L. Operculata* mostraram que, como esperado para uma planta da família

Cucurbitaceae, é rica em triterpenos do tipo cucurbitano. O presente trabalho teve como objetivos principais além, de re-estudar os frutos, investigar as outras partes da planta, tais como folhas, talos e cascas dos frutos. Em adição, realizar testes de atividade biológica com os extratos brutos e constituintes isolados, visto que, as cucurbitacinas e seus glicosídeos são considerados os agentes responsáveis por intoxicações observadas pelo uso de extrato dos frutos de *L. Operculata*.

CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS E FARMACOGNÓSTICAS

1.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A FAMÍLIA CUCURBITACEAE

A família Cucurbitaceae, compreende aproximadamente 126 gêneros e 1.280 espécies distribuídas em todo o mundo, preferencialmente nas regiões tropicais e semi desertas (HEYWOOD, 1978; BAHIA, 1979). No Brasil, estão representados por 30 gêneros, com um total aproximado de 200 espécies (BAHIA, 1979). Subdividi-se em duas subfamílias: **Cucurbitoideae** com oito tribos (Joliffieae, Benincaseae, Melothrieae, Schizopeponeae, Cyclanthereae, Sicyoeae, Trichosantheae e Cucurbiteae), e o **Zenonioideae** com uma única tribo (Zanonieae) (DUNILL; FOWDEN 1965; HEYWOOD, 1978).

As plantas da família Cucurbitaceae são ervas anuais ou perenes, ou subarbustos, escandentes ou com hastes rastejantes, com ou sem gavinha. Gavinha simples ou ramificada, originada da modificação de ramos, sendo esta uma das principais características da família juntamente com seu rápido crescimento vegetativo. Folhas alternadas simples, inteiras ou lobadas, estipuladas. Flores unissexuadas, monóicas ou dióicas, isoladas ou ordenadas em racemos, espigas, fascículos ou paniculas. Cálice rotáceo, campanulado ou tubuloso, com lacínios muito curtos ou longos. Corola campanulada, rotáceae ou tubulosa (BARROSO, 1986).

1.2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A ESPÉCIE *Luffa operculata* Cogn.

O espécimen *Luffa operculata* está inserida na subfamília Cucurbitoideae na tribo Benincaseae na sub-tribo Luffinae.

O gênero *Luffa* é constituído de 8 espécies, sendo 7 paleotrópicas (*L. aegyptica*, *L. acutangula*, *L. cylindrica*, *L. echinata*, *L. graveolens*, *L. umbellata* e *L. variegata*) e uma neotrópica (*L. operculata*) (LEITE, 1976). O gênero *Luffa* encontra-se, principalmente, nos países da América Central, no Equador, Colômbia e no Brasil, nos Estados do Amazonas, Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Ceará*, onde floresce nos meses de janeiro e fevereiro, apresentando flores masculinas e femininas isoladas também axilares (LEITE, 1976).

* Acréscimo feito após consulta no Herbário Prisco Bezerra – Departamento de Biologia a UFC.



Figura 2- Fotos de *Luffa operculata* Cogn. (Fonte: elaborada pela autora)

Segundo Braga *Luffa operculata* Cogn. (Figura 2, p. 28) é uma herbácea, trepadeira, caule pentágono ou não, com gavinhas simples ou bifidas, compridas, vilosas. Folhas pecioladas, codiforme-reniformes, angulosas ou lobadas, ásperas, verde-escuras na página superior. Flores axiliares, campanuladas, pequenas, amarelo-pálidas. Fruto ovóide (Figuras 3 e 4, p. 28 e 29), pequeno, mole, áspero, decacostado longitudinalmente, com acúleos nas costas, interiormente fibroso-reticulado, com sementes compridas, lisas, sem membrana marginal (BRAGA, 2001).

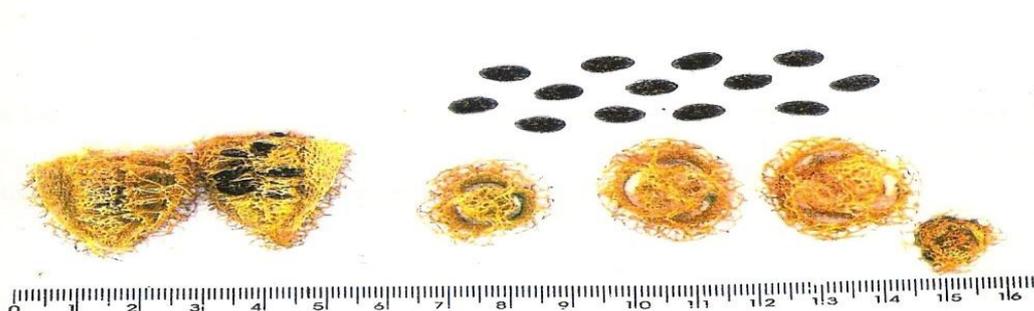


Figura 3- Aspectos dos cortes longitudinal e transversal; sementes e a trama da parte do fruto de *Luffa operculata* Cong. (Fonte: elaborada pela autora em 1999)

Os frutos maduros (Figura 4, p. 29) são dificilmente trituráveis por causa da trama fibrosa. Quando fortemente machucados soltam um pó muito fino esternulatório que faz sentir o seu sabor amargo por aspiração, mesmo a distância.



Figura 4- Frutos secos de *Luffa operculata* Cogn.

(Fonte: <http://www.plantasquecuram.com.br/ervas/buchinha-do-norte.html>, acessada em 25/08/2011)

1.3 CONSIDERAÇÕES FARMACOGNÓSTICAS SOBRE *Luffa operculata* Cogn.

O uso de plantas como remédio é provavelmente tão antigo quanto à própria humanidade. No entanto, é preciso ter cautela. A crença popular de que as plantas não fazem mal, estimulada ainda mais por fortes apelos de *marketing*, faz com que o quadro fique um tanto distorcido. “Havia um conceito pré-estabelecido, popular, de que o vem da natureza não faz mal. Isso não é correto”, lembra Elisaldo Carlini, pesquisador do Departamento de Psicofarmacologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

A utilização fitoterápica da *Luffa operculata* e de outras ervas medicinais está dentro de um contexto: cresce consideravelmente em todo o mundo nas últimas décadas a procura pelas diversas modalidades de medicina alternativa, cientificamente denominada "medicina complementar". A fitoterapia é a forma de medicina mais ancestral e disseminada. No Brasil, tradicionalmente usadas por populações rurais carentes, as plantas medicinais vêm sendo largamente utilizadas também nos centros urbanos, por pacientes de todo nível socioeconômico e cultural (MENON-MIYADE *et al.*, 2005). Seu uso é secular, as "Pílulas Purgativas de Resina de Batata e Momordica bucha do Cirurgião Mattos", ou "pílulas do mato" foram por muitos anos o fitoterápico de maior preferência no meio rural do Norte e Nordeste do Brasil. Um extrato aquoso de *Luffa operculata* em associação com outras ervas origina a "garrafada" mistura conhecida no interior e no Nordeste brasileiro como abortiva e purgativa, demonstrando a ação de poderoso irritante de mucosas. A aspiração do infuso

aquoso dos frutos há muito tempo tem sido utilizada empiricamente contra a sinusite. Porém, existem muitos relatos da ocorrência de hemorragias nasais após estas aspirações, resguardando seu uso (PLANTAS QUE CURAM, 2011).

O mecanismo de ação do vegetal não está esclarecido e ainda existem dúvidas sobre o princípio causador do quadro toxicológico. Das espécies *L. acutangula* Roxb., *L. cylindrica* (L.) Roem. e *L. aegyptiaca* Mill. foram isoladas glicoproteínas com ações inibidoras da síntese protéica, embriotóxicas e abortivas, propriedades estas demonstradas em animais de laboratório (SCHENKEL *et al.*, 2001). Da espécie *Luffa operculata* propriamente dita, não há experimentos específicos com o objetivo de elucidar a ação abortiva do fruto. O trabalho mais significativo foi realizado por Matos e Gottlieb em 1967. Neste, os autores isolaram do extrato aquoso do fruto um princípio amargo denominado isocucurbitacina B. As cucurbitacinas são esteróides resultantes da oxidação de triterpenos tetracíclicos e estão largamente distribuídas na família Cucurbitaceae (MONTE *et al.*, 2000). Para estas substâncias as atividades biológicas descritas na literatura (MATOS; GOTTLIEB, 1967; MIRO, 1995) são ações descongestionantes, laxativas, hemolíticas, embriotóxicas e abortivas. Recentemente trabalhos sobre o efeito necrótico destas substâncias em tumores estão sendo publicados (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Assim, em virtude da série de relatos confirmando a toxicidade das cucurbitacinas, admite-se que a isocucurbitacina B seja o princípio tóxico de *Luffa operculata* (MATOS; GOTTLIEB, 1967).

Hoje existe no mercado nacional um preparado para uso nasal à base de *Luffa operculata* 1%, soro fisiológico e conservantes (fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio monobásico (Na_2HPO_4), álcool feniletílico, metilparabeno, propilparabeno e água purificada q.s.p.), de venda livre nas farmácias autorizado pela ANVISA, conhecido com o nome fantasia de Sinustrat®, produzido pelo laboratório Zurita, Araras-SP. Em contrapartida, nos EUA e na Europa, principalmente na Alemanha, há vários medicamentos alopáticos e homeopáticos para rinosinusites à base de *Luffa operculata* disponíveis comercialmente (SALVIANO, 1992).

CAPÍTULO 2 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

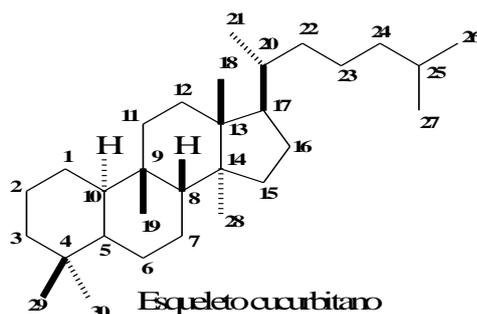
2.1 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA (TRITERPENOS DO TIPO CUCURBITANO)

Os triterpenos são metabolitos secundários de origem da flora e da fauna terrestre e marinha, que ocorrem na forma livre, bem como na forma de éster, éter e glicosídeos. Como próprio nome implica, são compostos com trinta átomos de carbono, originados através da via acetato-mevalonato a partir de uma unidade isopreno, que podem apresentar o esqueleto de carbono nas formas acíclica ou mono, di, tri, tetra ou pentacíclico. Os triterpenos pentacíclicos são os constituintes dominantes desta classe e, tem sido amplamente investigados. Embora o uso medicinal desta classe de compostos tenha sido limitado, nos últimos anos muitos trabalhos mostram seu considerável potencial (MAHATO; KUNDU, 1994).

Existem muitos exemplos de triterpenos contendo o esqueleto carbônico modificado e que dão origem a um tipo específico de triterpenos conhecidos como cucurbitacinas. No presente trabalho foi realizado uma pesquisa bibliográfica nos bancos de dados do Scielo, SciFinder, Science Direct, consultados por meio da palavra “cucurbitacins”, no período de 2006 a 2011, dando continuidade a uma pesquisa anteriormente realizada (CHAVES, 2006). Esta pesquisa mostrou varias publicações de cucurbitacinas isoladas anteriormente, assim como, publicações de cucurbitacinas inéditas de diferentes espécies botânica com suas atividades biológicas, um dos objetivos desse estudo (Quadro 3, p.39).

2.2. TRITERPENOS COM ESQUELETO DO TIPO CUCURBITANO: CUCURBITACINAS

As cucurbitacinas são constituídas de um sistema triterpênico tetracíclico altamente oxigenado tendo um esqueleto biogeneticamente modificado, caracterizado como 19(10→9β)abeo-10α-lanostano, que podem ser encontrado livres ou glicosilados (SOUSA, 1999; VALENTE, 2004).



2.3 CARACTERÍSTICAS DAS CUCURBITACINAS

As cucurbitacinas são metabólitos secundários presentes em plantas, principalmente da família Cucurbitaceae e pertencentes à classe dos terpenoides tetracíclicos oxigenados e que apresentam como característica organoléptica um forte sabor amargo (SHARMA; HALL, 1973). São reconhecidas principalmente como os princípios tóxicos das plantas da família Cucurbitaceae e, embora encontradas predominante nesta família, estão presentes também em outras famílias botânicas (VALENTE, 2004; CHEN *et al.*, 2005; CHAVES, 2006). Algumas espécies botânicas da família Cucurbitaceae são usadas na medicina popular brasileira como a “buchinha” (*Luffa operculata*) (MATOS, 1967; KAWAHARA *et al.*, 2001), “taiuiá” [*Wilbrandia ebracteata* (SCHENKEL *et al.*, 1992; FARIAS *et al.*, 1993) e/ou *Cayaponia tayuya* (BAUER *et al.*, 1985; HIMENO *et al.*, 1992)] e “nhandiroba” (*Fevillea trilobata*) (VALENTE *et al.*, 1993; VALENTE *et al.*, 1994).

O grande interesse que essas substâncias tem despertado está relacionado principalmente à sua toxicidade e ao seu amplo espectro de atividades biológicas, podendo ser destacadas as atividades citotóxica, antitumoral, antiinflamatória, antifertilizante, repelente, hepatoprotetora e curativa e antimicrobiana como as mais significativas (MIRO, 1995, VALENTE, 2004).

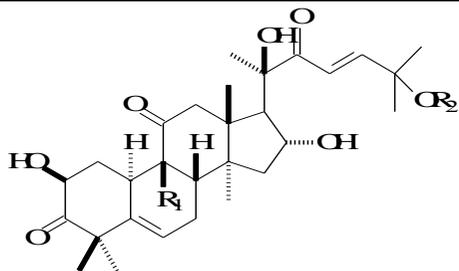
2.4 O ESQUELETO CARBÔNICO

Conforme as peculiaridades de suas estruturas, as cucurbitacinas são divididas em doze categorias sendo classificadas de acordo com as funcionalidades no anel A, modificações na cadeia lateral e aspectos estereoquímicos. Em geral são distinguidas pelo uso das letras A – T, obedecendo à ordem cronológica de isolamento ou identificação. O padrão de oxidação inclui uma diversidade de oxigenação em diferentes posições, com grupos

hidroxila e/ou carbonila nos carbonos C-2, C-3, C-7, C-11 e C-16 do sistema tetracíclico e nos carbonos C-20, C-22, C-23, C-24 e C-25 da cadeia lateral (ZANDER; WIGFIELD, 1970; VALENTE, 2004). A cadeia lateral apresenta-se em diversos tipos (cíclica ou acíclica) geralmente oxigenada (AKIHISA *et al.*, 1994; VALENTE, 2004). Apesar do grande número de variações estruturais, as cucurbitacinas ostentam características comuns (MULHOLLAND *et al.*, 1997; KAWAHARA *et al.*, 2001; VALENTE, 2004). Assim, todas apresentam uma ligação dupla entre os carbonos C-5 e C-6 e, a maioria, exibe grupos hidroxila nos carbonos C-16, C-20 e C-22.

(Quadro 1, p. 34).

Quadro 1- Estruturas das cucurbitacinas mais conhecidas

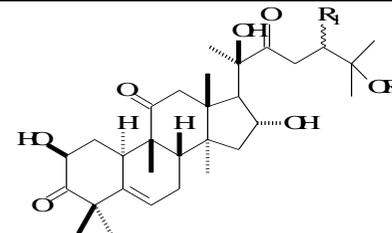


Cucurbitacina A - $R_1 = OH$; $R_2 = Ac$

Cucurbitacina B - $R_1 = H$; $R_2 = Ac$

Cucurbitacina D - $R_1 = R_2 = H$

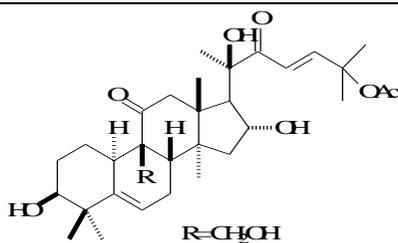
(VALENTE, 2004)



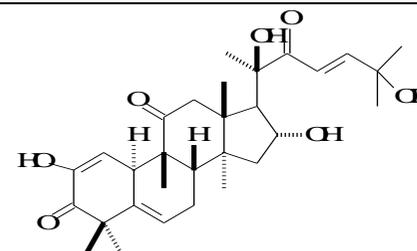
Cucurbitacina G e H - $R_1 = OH$; $R_2 = H$ (FARIAS *et al.*, 1993)

23,24-Dihidrocucurbitacina B - $R_1 = H$; $R_2 = Ac$ (VALENTE, 2004)

Cucurbitacina R - $R_1 = R_2 = H$ (FARIAS *et al.*, 1993)



Cucurbitacina C

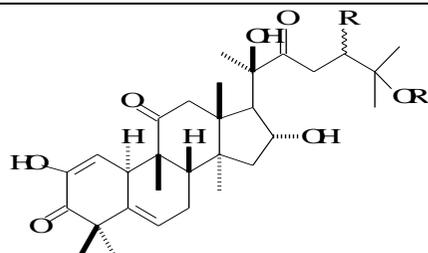


Cucurbitacina E - $R = Ac$

Cucurbitacina I - $R = H$

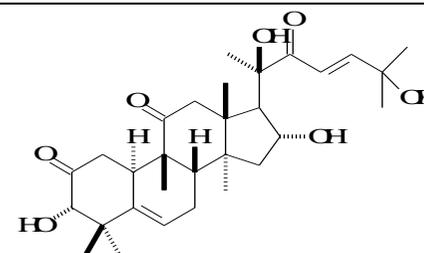
(VALENTE, 2004)

Quadro 1- Continuação



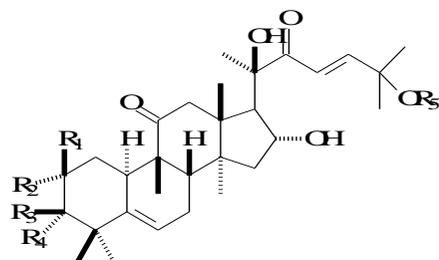
Cucurbitacina J e K – R= OH (KANCHANAPOOM *et al.*, 2002)

Cucurbitacina L – R= H (CHEN *et al.*, 1985)



Isocucurbitacina B – R= Ac

Isocucurbitacina D – R= H (MONTE *et al.*, 2003)



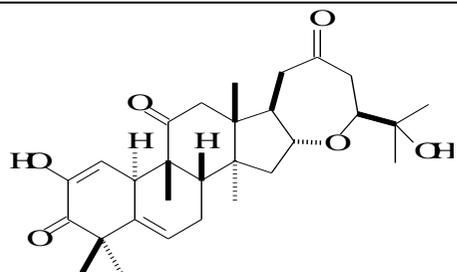
Cucurbitacina F – R₁= R₄= OH; R₂= R₃= R₅= H (CHEN *et al.*, 1985)

Cucurbitacina O – R₁= R₃= R₅= H; R₂= R₄= OH (KUPCHAN *et al.*, 1970)

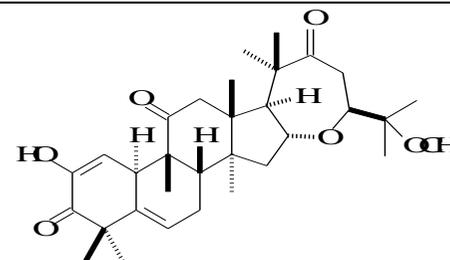
Cucurbitacina P – R₁= R₃= R₅=H; R₂=R₄=OH; (FARIAS *et al.*, 1993)

Cucurbitacina Q - R₁= R₃= H; R₂=R₄=OH; R₅= Ac (KUPCHAN *et al.*, 1970)

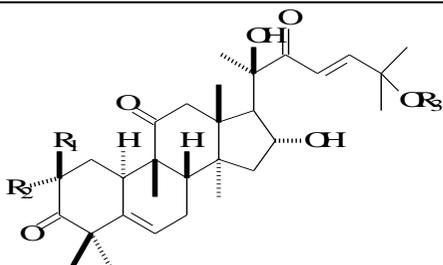
Quadro 1- Continuação



Cucurbitacina S (HYLANDS; MANSOUR, 1982)



Cucurbitacina T (GAMLATH *et al.*, 1988)

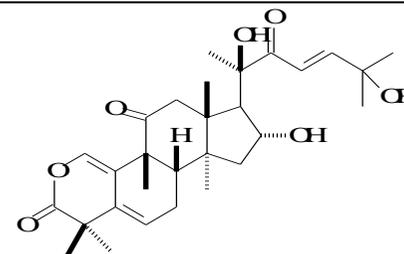


Operculina A – R₁= H; R₂= O-β-D-glicopirasonil; R₃= Ac

Arvenina I – R₁= O-β-D-glicopirasonil; R₂= H; R₃= Ac

Arvenina III - R₁= O-β-D-glicopirasonil; R₂= R₃= H

(KAWAHARA *et al.*, 2004)

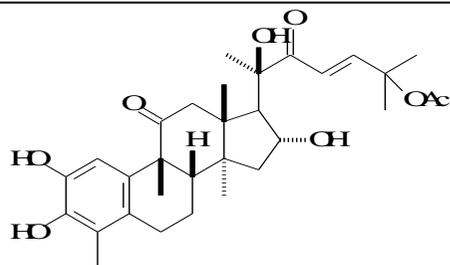


Neocucurbitacina A – R= Ac

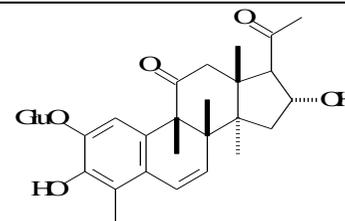
Neocucurbitacina B – R= H

(KAWAHARA *et al.*, 2001)

Quadro 1- Continuação

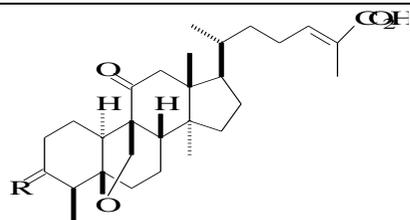


Fevivordina A



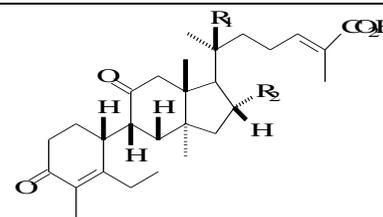
Andirobicina B

(CHEN *et al.*, 2005)



Ácido Siraitico A – R= β OH, H

Ácido Siraitico B – R=O



Ácido Siraitico C – R₁= R₂= H

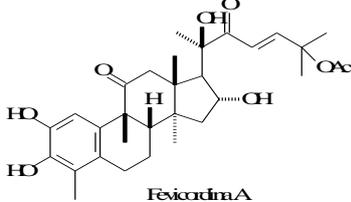
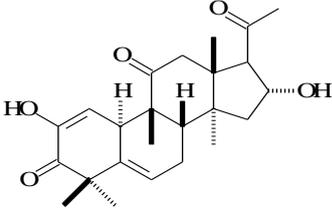
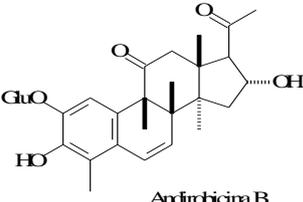
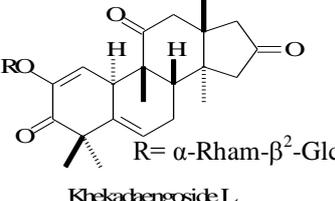
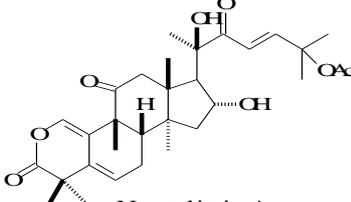
Ácido Siraitico D – R₁= OH; R₂= H

Ácido Siraitico E – R₁= H; R₂= OH

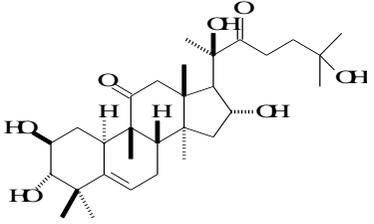
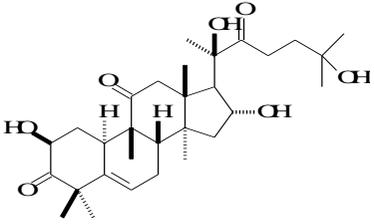
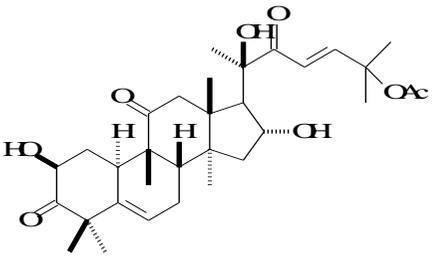
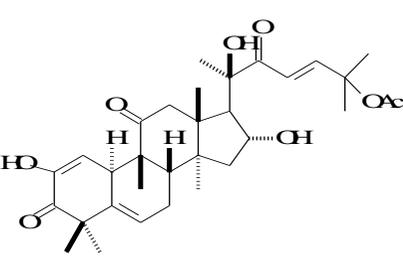
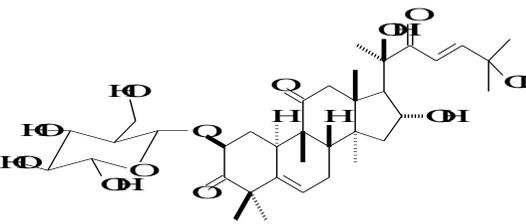
(CHEN *et al.*, 2005)

Algumas cucurbitacinas exibem modificações estruturais originando as nor, hexanor, heptanor, octanor e neocucurbitacinas (VALENTE, 2004) (Quadro 2, p. 38).

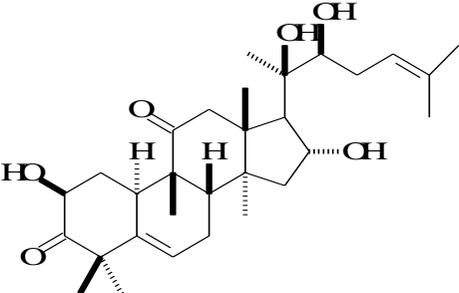
Quadro 2 – Cucurbitacinas com modificações estruturais

Classificação	Estrutura (exemplo)	Espécie/Família	Referência
Norcucurbitacina – são cucurbitacinas que possuem o anel A aromatizado, com a perda de um dos grupos metilas geminais ligados ao carbono C-4.	 <p style="text-align: center;">Fevicordina A</p>	<i>Fevillea cordifolia</i> – Cucurbitaceae	CHEN <i>et al.</i> , 2005
Hexanorcucurbitacina – são cucurbitacinas onde ocorre a perda parcial da cadeia lateral (manutenção dos carbonos C-20 e C-21).	 <p style="text-align: center;">Hexanorcucurbitacina I</p>	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> – Cucurbitaceae	KANCHANA POOM <i>et al.</i> , 2002
Heptanorcucurbitacina – são cucurbitacinas onde ocorre a perda parcial da cadeia lateral.	 <p style="text-align: center;">Androbicina B</p>	<i>Fevillea trilobata</i> – Cucurbitaceae	CHEN <i>et al.</i> , 2005
Octanorcucurbitacina – São cucurbitacinas onde ocorre à perda total da cadeia lateral.	 <p style="text-align: center;">R = α-Rham-β^2-Glc Khakachengoside L</p>	<i>Trichosanthes tricuspidata</i> – Cucurbitaceae	KANCHANA POOM <i>et al.</i> , 2002
Neocucurbitacina – São cucurbitacinas com o anel A rearranjado com perda de um átomo de carbono e formação de um anel δ -lactona C-1/C-3.	 <p style="text-align: center;">Neocucurbitacina A</p>	<i>Luffa operculata</i> – cucurbitaceae	KAWAHARA <i>et al.</i> , 2001

Quadro 3- Espécie, estrutura, atividade biológica e referências de triterpenos do tipo curbitano

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referências
<p style="text-align: center;"><i>Cucurbita pepo</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>1- 23,24-dihidrocurbitacina F (C₃₀H₄₈O₇)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>2- 23,24-dihidrocurbitacina D (C₃₀H₄₆O₇)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>3- Cucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₈)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>4- Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>5- Cucurbitacina D glicosilada (C₃₆H₅₄O₁₂)</p> </div> </div>	Antitumoral	XUESONG <i>et al.</i> , 2007; OH; LEE, 2007

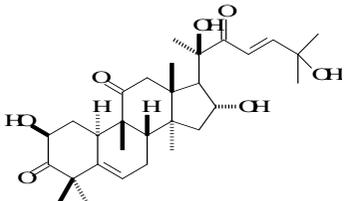
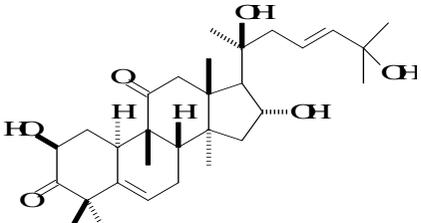
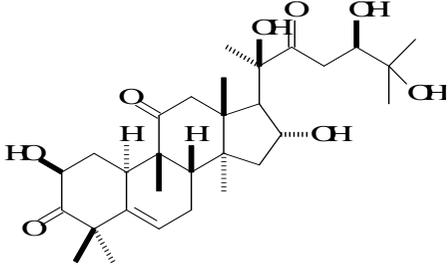
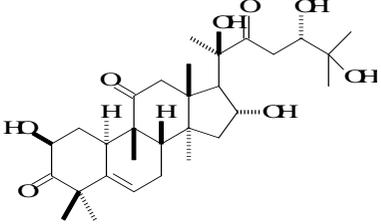
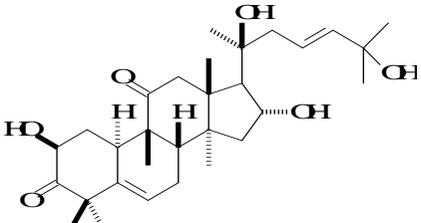
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referências
<p data-bbox="801 437 1048 469"><i>Picrorrhiza kurroa</i></p>  <p data-bbox="288 839 1559 871">6- 19-norlanosta-5,24-dien-3,11-diona-2,16,20,22-tetrahydroxi-9-metil-(2β,9β,10α,16α) (C₃₀H₄₆O₆)</p>	<p data-bbox="1659 421 1879 895">Anti-retroviral; Anti-Infecçiosa, Anti-hepatotoxicidade, hipoglicemiante, Anticâncer e antiinflamatória; Antipirético e Anti-icterícia</p>	<p data-bbox="1924 475 2074 839">SANGAR; BALLAL, 2006; AHMED <i>et al.</i>, 2007; SINDHU <i>et al.</i>, 2011</p>

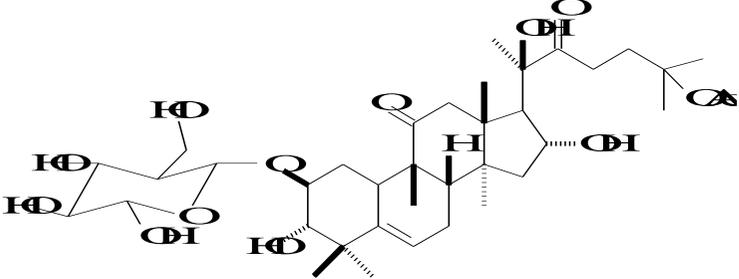
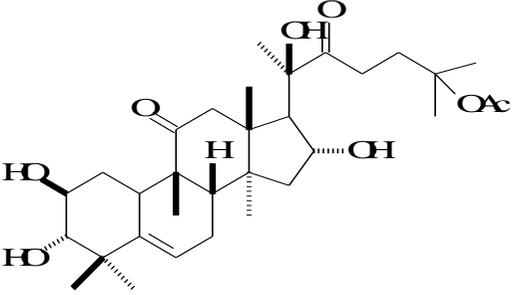
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referências
<p style="text-align: center;"><i>Cucumis melo</i></p> <p>Estruturas 3 e 4, p.39 Cucurbitacina B ($C_{32}H_{46}O_8$), Cucurbitacina E ($C_{30}H_{44}O_8$)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>7- Cucurbitacina Q ($C_{32}H_{48}O_8$)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>8- cucurbitacina I ($C_{32}H_{42}O_7$)</p> </div> </div>	<p>Anti-hepatite e Anti- hepatocarcinoma</p>	<p>DENG; ZHANG, 2007; KONG; WEI, 2007</p>

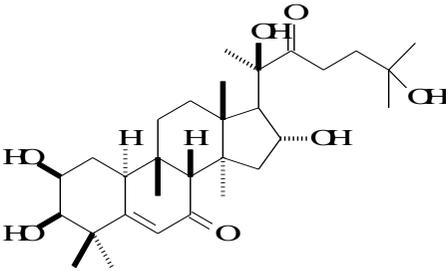
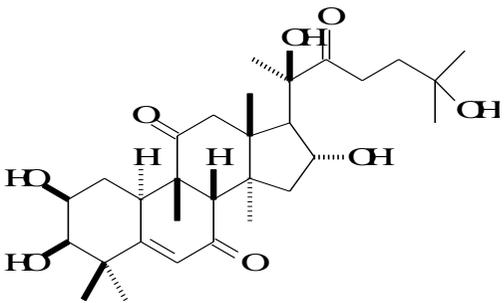
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referências
<p data-bbox="792 427 1055 459"><i>Lagenaria siceraria</i></p> <p data-bbox="221 501 461 533">Estruturas 3, p. 39</p> <p data-bbox="221 555 584 587">Cucurbitacina B ($C_{32}H_{46}O_8$)</p>  <p data-bbox="770 702 1167 734">9- Cucurbitacina D ($C_{30}H_{44}O_7$)</p>  <p data-bbox="264 954 674 986">10- Cucurbitacina G ($C_{30}H_{46}O_8$)</p>  <p data-bbox="674 1257 1084 1289">11- Cucurbitacina H ($C_{30}H_{46}O_8$)</p>  <p data-bbox="1111 1027 1599 1059">12- 22-deoxicucurbitacina ($C_{30}H_{46}O_6$)</p> 	<p data-bbox="1659 619 1883 1150">Analgésica, Anti-inflamatória, Anti-biótica, citotóxica, purgativa, diurética, Anti-insônias, cardioprotetora, Anti-hepatotóxica, Anti-úlceras.</p>	<p data-bbox="1921 539 2078 1230">GHULE <i>et al.</i>, 2006; UPAGANLAWAR; BALARAMAN, 2009; SHAH <i>et al.</i>, 2010; MILIND; SATBIR <i>et al.</i>, 2011; SHAH <i>et al.</i>, 2011</p>

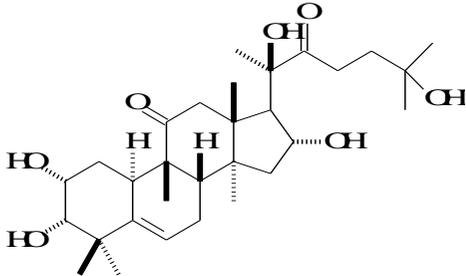
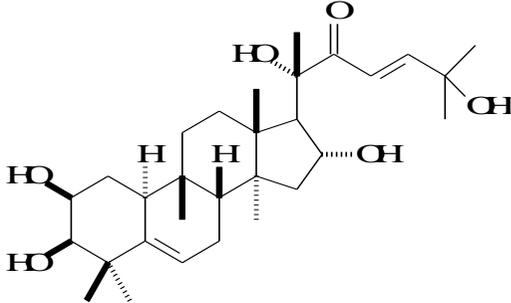
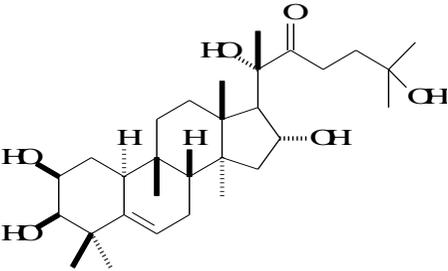
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="819 432 1066 459"><i>Coutarea hexandra</i></p> <p data-bbox="230 499 454 526">Estrutura 1, p. 39</p> <p data-bbox="224 555 748 582">23,24-dihidrocucurbitacina F (C₃₀H₄₈O₇)</p>  <p data-bbox="770 839 1659 866">14- 2-O-β-D-glicopirasonil-23,24-dihidrocucurbitacina F (C₃₆H₅₈O₁₂)</p>  <p data-bbox="262 1217 958 1244">13- 23,24-dihidro-25-acetilcucurbitacina F (C₃₂H₅₀O₈)</p>	Citotóxica	OLMEDO <i>et al.</i> , 2007

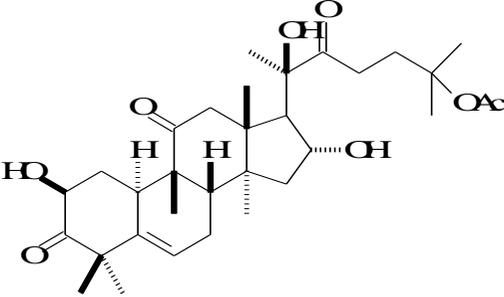
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="808 437 1077 469" style="text-align: center;"><i>Ecballium elaterium</i></p> <p data-bbox="230 504 752 536">Estruturas 3 e 4, p.39, 7, p. 41 e 9, p. 42</p> <p data-bbox="224 560 1659 647">Cucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₈), Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈), Cucurbitacina I (C₃₀H₄₂O₇) e Cucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇)</p>	<p data-bbox="1704 520 1877 552" style="text-align: center;">Anti-Icterícia</p>	<p data-bbox="1921 464 2078 608" style="text-align: center;">GREIGE-GERGES <i>et al.</i>, 2007</p>
<p data-bbox="826 762 1059 794" style="text-align: center;">Espécie/Estrutura</p>	<p data-bbox="1722 738 1861 826" style="text-align: center;">Atividade Biológica</p>	<p data-bbox="1921 762 2074 794" style="text-align: center;">Referências</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="286 858 831 1270" style="width: 45%;"> <p data-bbox="804 858 1081 890" style="text-align: center;"><i>Cayaponia racemosa</i></p>  <p data-bbox="286 1177 831 1270">15- 2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-7,22-diona (C₃₀H₄₈O₇)</p> </div> <div data-bbox="1095 858 1639 1286" style="width: 45%;">  <p data-bbox="1095 1193 1639 1286">16- 2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-7,11,22-triona (C₃₀H₄₆O₈)</p> </div> </div>	<p data-bbox="1704 1058 1872 1090" style="text-align: center;">Antitumoral</p>	<p data-bbox="1921 970 2078 1169" style="text-align: center;">CHAVES <i>et al.</i>, 2007; DANTAS <i>et al.</i>, 2006</p>

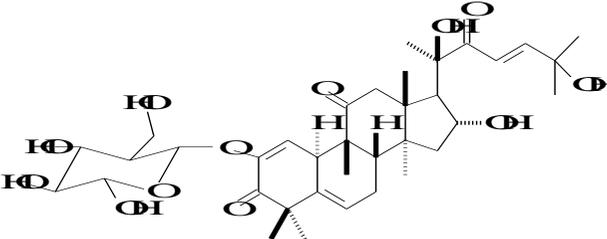
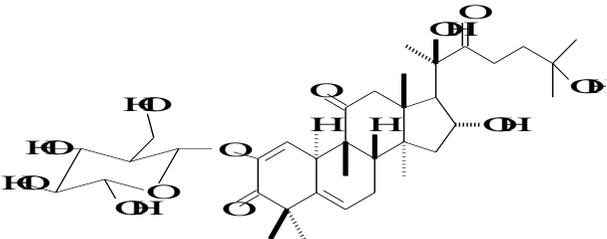
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referências
<p style="text-align: center;"><i>Cayaponia racemosa</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>17- Cucurbitacina P (C₃₀H₄₈O₇)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>19- 2,3,16,20(R),25-pentahidroxi- 22-oxocucurbita-5,23(E)-dieno (C₃₀H₄₈O₆)</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>18- 2,3,16,20(R),25-pentahidroxi-22-oxocucurita-5-eno (C₃₀H₅₀O₆)</p> </div>	Antitumoral	CHAVES <i>et al.</i> , 2007; DANTAS <i>et al.</i> , 2006

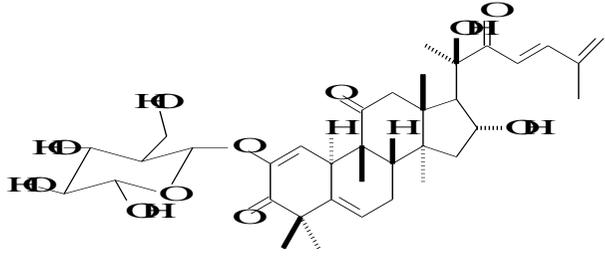
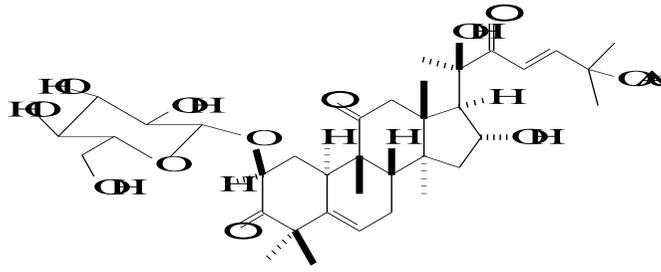
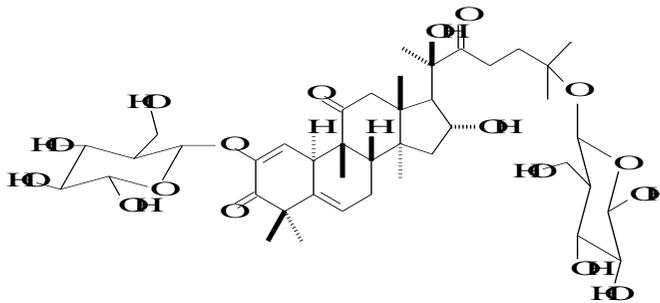
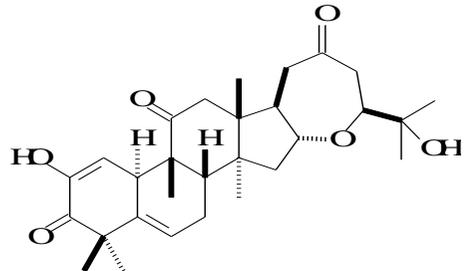
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referências
<p data-bbox="748 437 1122 469"><i>Wilbrandia ebracteata</i> Cogn.</p> <p data-bbox="226 504 450 536">Estrutura 3, p. 39</p> <p data-bbox="226 560 584 592">Cucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₈)</p> <div data-bbox="685 619 1189 916"></div> <p data-bbox="640 943 1227 975">20-23,24- Dihidrocucurbitacina B (C₃₂H₄₈O₈)</p>	Antiinflamatória e antitumoral	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2007; KREPSKY <i>et al.</i> , 2009; SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2009

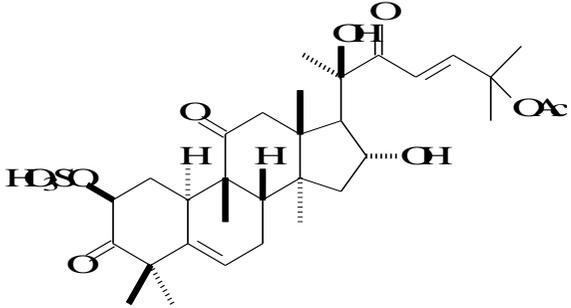
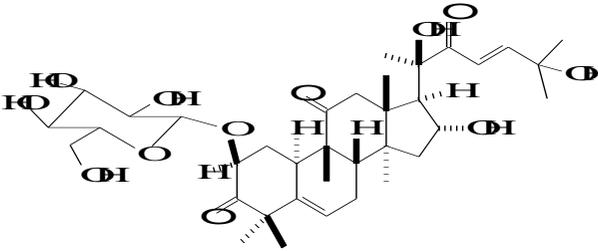
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referências
<p style="text-align: center;"><i>Citrullus colocynthis</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>21- 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina I (C₃₆H₅₂O₁₂)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>22- 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina L (C₃₆H₅₄O₁₂)</p> </div> </div>	<p>Abortiva, purgativa, Anti- edemas, Anti- bacteriana, Anti- câncer e hipoglicemiante</p>	<p>DELAZAR <i>et al.</i>, 2006; NAYAB <i>et al.</i>, 2006</p>

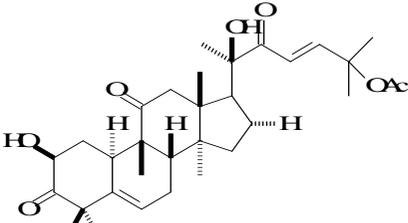
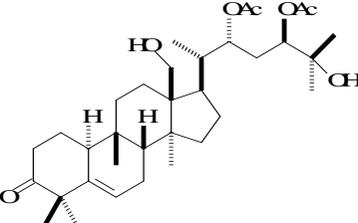
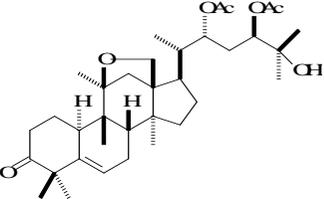
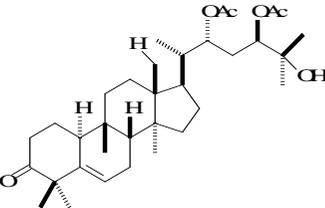
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referências
<p style="text-align: center;"><i>Citrullus colocynthis</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>23- 2-O-β-D-glicopirasonil-16α-20(R)-dihidroxicucurbita-1,5,23(E),25(26)-tetraen-3,11,22-triona (C₃₆H₅₀O₁₁)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>24- Arvenina I (C₃₈H₅₆O₁₃)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>25- 2,25-di-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina L (C₄₂H₆₈O₁₉)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>26- Cucurbitacina S (C₃₀H₄₂O₆)</p> </div> </div>	<p>Abortiva, purgativa, Anti- edemas, Anti- bacteriana, Anti- câncer e hipoglicemiante</p>	<p>DELAZAR <i>et al.</i>, 2006; NAYAB <i>et al.</i>, 2006</p>

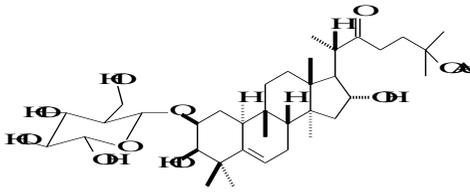
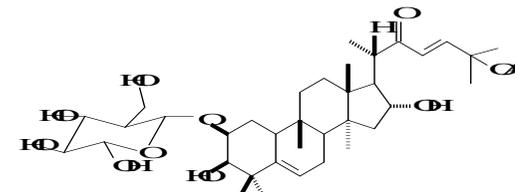
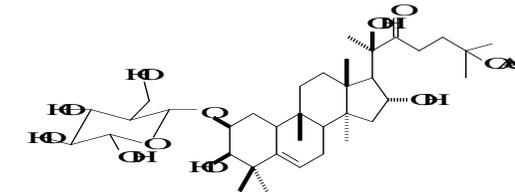
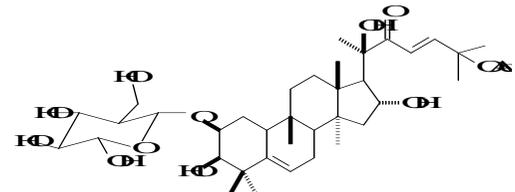
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="786 437 1081 472" style="text-align: center;"><i>Helicteres angustifolia</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"><div data-bbox="226 507 797 815"></div><div data-bbox="987 564 1585 815"></div></div> <p data-bbox="226 839 770 874">27- 2-sulfatocucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₁₁S)</p> <p data-bbox="1084 839 1451 874">28-Arvenina III (C₃₆H₅₄O₁₂)</p>	-	ZONG-TSI <i>et al.</i> , 2006

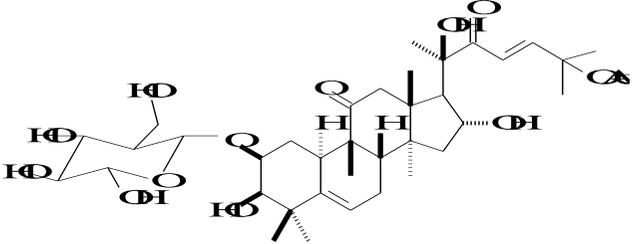
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Leucopaxillus gentianeus</i></p> <p>Estruturas 3, p. 39 e 9, p. 42 Cucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₈), Cucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>29- 16-deoxycucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₇)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>30- Leucopaxillona A (C₃₄H₅₄O₇)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>31- Leucopaxillona B (C₃₄H₅₂O₈)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>32- 18-deoxileucopaxillona A (C₃₄H₅₄O₆)</p> </div> </div>	Antiproliferativa	CLERICUZIO <i>et al</i> , 2006

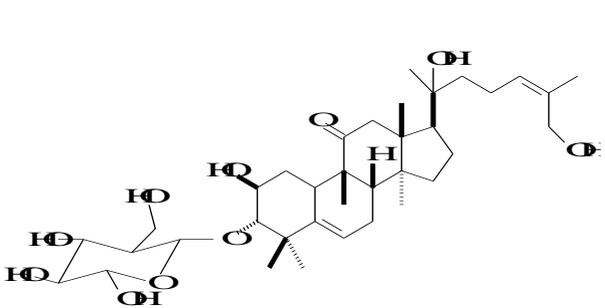
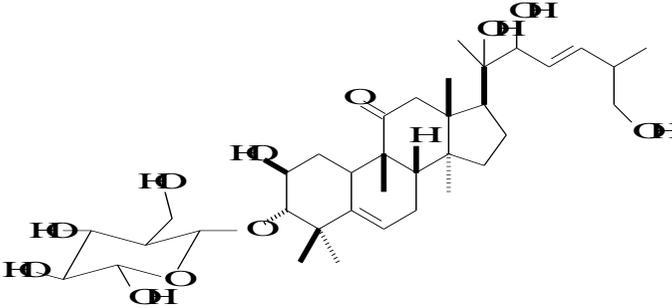
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Neopicrohiza scrophulariiflora</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>33- Scrophoside A (C₃₈H₆₂O₁₁)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>34- 19-norlanosta-5,23-dien-2-ona,25-(acetiloxi)-2-(β-D-glicopirasoniloxi)-3,16-dihidroxi-9-metil-(2β,3β,9β,10α,16α,23E) (C₃₈H₆₀O₁₁)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>35- 19-norlanosta-5-en-2-ona,25-(acetiloxi)-2-(β-D-glicopirasoniloxi)-3,16,20-trihidroxi-9-metil-(2β,3β,9β,10α,16α) (C₃₈H₆₂O₁₂)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>36- 19-norlanosta-5,23-dien-2-ona,25-(acetiloxi)-2-(β-D-glicopirasoniloxi)-3,16,20-trihidroxi-9-metil-(2β,3β,9β,10α,16α,23E) (C₃₈H₆₀O₁₂)</p> </div> </div>	-	KIM, <i>et al.</i> , 2006

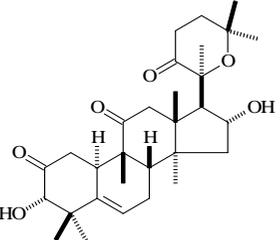
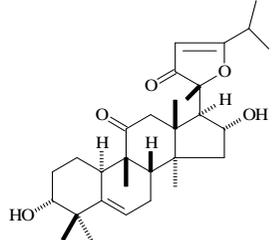
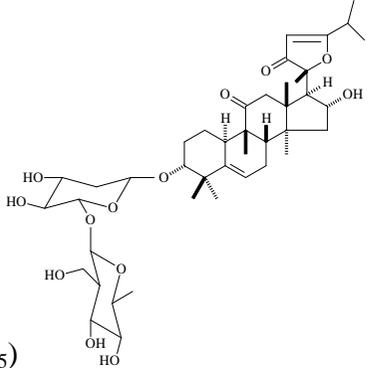
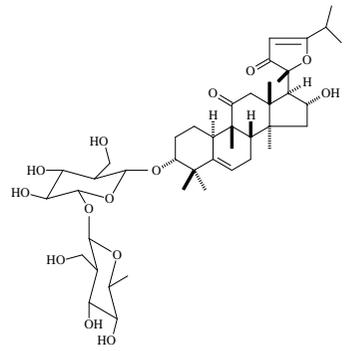
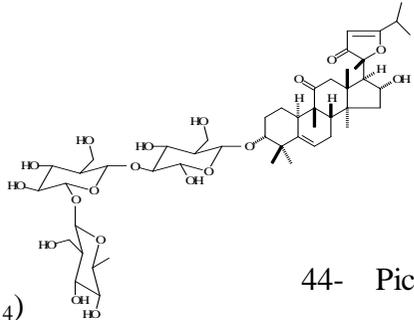
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="801 437 1066 469"><i>Cucurbita andreana</i></p> <p data-bbox="224 504 450 536">Estrutura 9, p. 42</p> <p data-bbox="224 560 584 592">Cucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇)</p>  <p data-bbox="577 887 1290 919">37- 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina E (C₃₈H₅₄O₁₃)</p>	hipoglicemiante	JAVED <i>et al.</i> , 2006

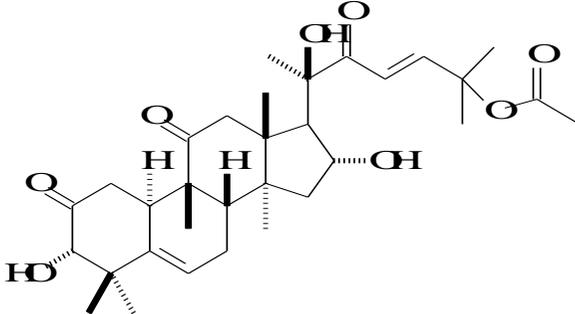
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="831 435 1037 469" style="text-align: center;"><i>Stemodia kingii</i></p> <div data-bbox="226 507 831 815"></div> <p data-bbox="226 842 645 876">38- Stemodiosida B₃ (C₃₆H₅₈O₁₀)</p> <div data-bbox="936 507 1608 815"></div> <p data-bbox="920 842 1339 876">39- Stemodiosida B₄ (C₃₆H₅₈O₁₁)</p>	-	ALLEN <i>et al.</i> , 2006

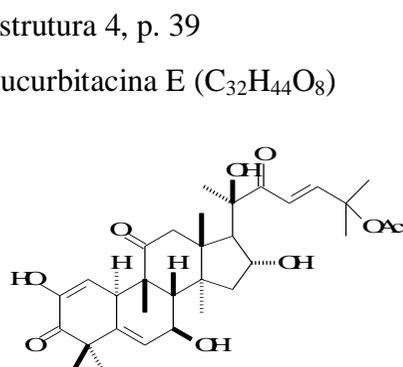
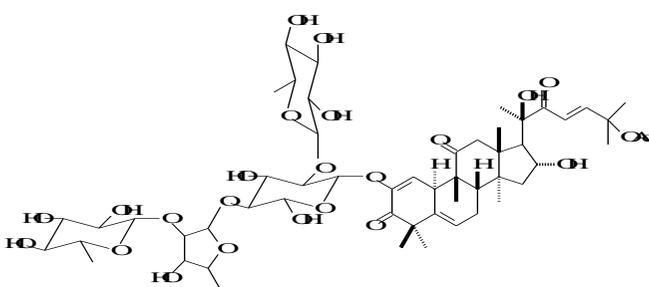
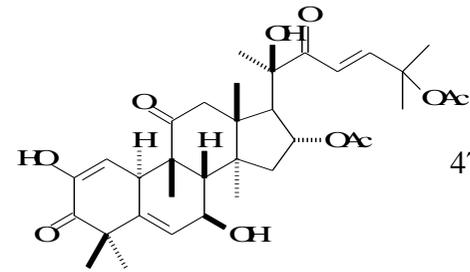
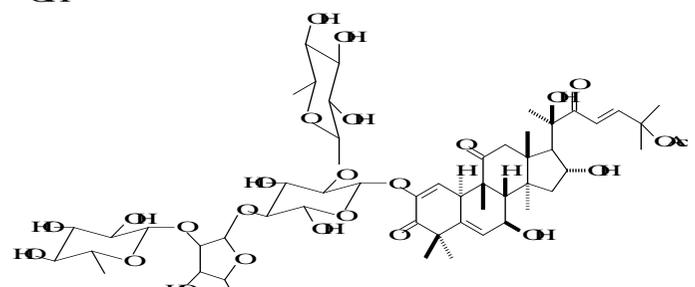
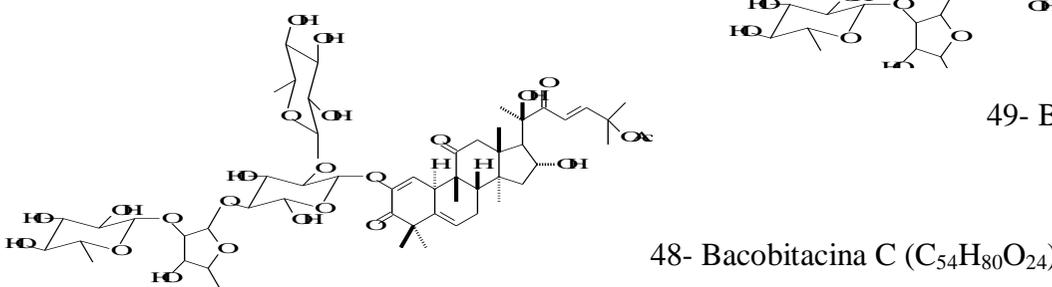
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Picria fel-terrae</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>40- Picfeltarraenona II (C₃₀H₄₄O₆)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>41- Picfeltarraegenina I (C₃₀H₄₄O₅)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>42- Picfeltarraenina IA (C₄₁H₆₂O₁₃)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>43- Picfeltarraenina IB (C₄₂H₆₄O₁₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>44- Picfeltarraenina IV (C₄₇H₁₂O₁₈)</p> </div> </div>	-	ZOU <i>et al.</i> , 2006

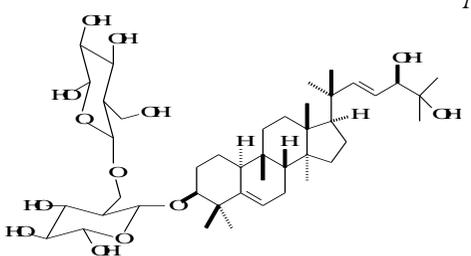
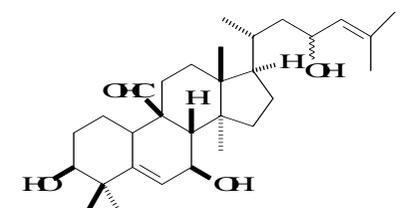
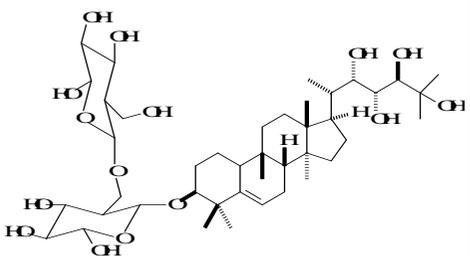
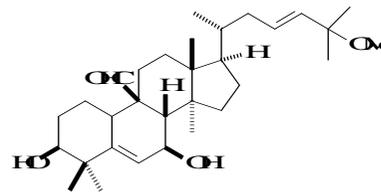
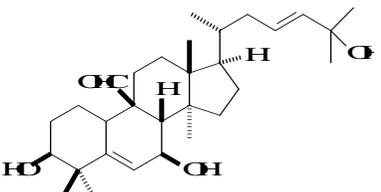
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="703 437 1167 469"><i>Bolbostemma paniculatum</i> Fraquent</p> <p data-bbox="224 504 600 536">Estruturas 4, p. 39 e 26, p. 48</p> <p data-bbox="224 560 965 592">Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈) e Cucurbitacina S (C₃₀H₄₂O₆)</p>  <p data-bbox="645 959 1220 991">45- 25-acetoxiisocucurbitacina D (C₃₂H₄₆O₈)</p>	-	ZHENG <i>et al.</i> , 2007

Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Bacopa monnieri</i></p> <p>Estrutura 4, p. 39 Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈)</p>  <p>46- Bacobitacina A (C₃₂H₄₄O₉)</p>   <p>47- Bacobitacina B (C₃₄H₄₆O₉)</p>  <p>49- Bacobitacina D (C₅₄H₈₀O₂₅)</p> <p>48- Bacobitacina C (C₅₄H₈₀O₂₄)</p> 	-	<p>BHANDARI <i>et al.</i>, 2007</p>

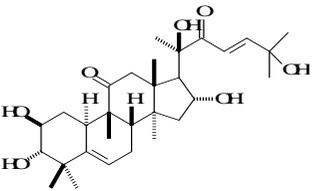
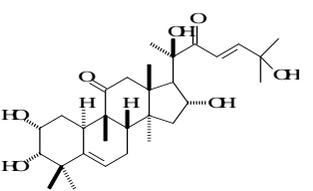
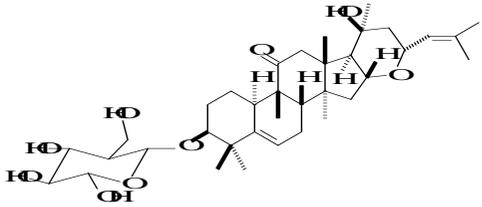
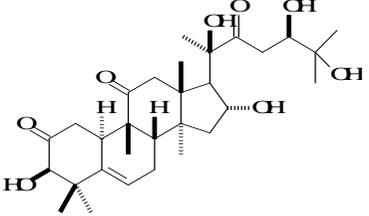
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Momordica cymbalaria</i> Hook f.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>50- 21,22- dihidroximomordicosidio A (C₄₂H₇₀O₁₃)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>51- Momordicina I (C₃₀H₄₈O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>52- Momordicosidio A (C₄₂H₇₂O₁₅)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>53- 3,7-dihidroxi-25-metoxicucurbita-5,23-dien-19-al (C₃₁H₅₀O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>54- 3,7,25-trihidroxicucurbita-5,23-dien-19-al (C₃₀H₄₈O₄)</p> </div> </div>	-	DHASAN <i>et al.</i> , 2008

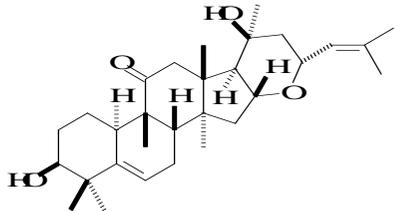
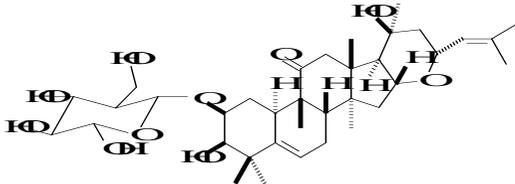
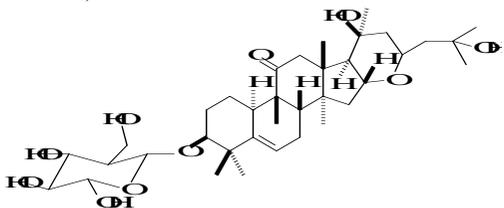
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="779 437 1088 469" style="text-align: center;"><i>Dendrosicyos socotrana</i></p> <p data-bbox="221 501 674 533">Estruturas 1 e 2, p. 39 e 9 e 10 p.42</p> <p data-bbox="221 555 1644 644">23,24-dihidrocucurbitacina F ($C_{30}H_{48}O_7$), 23,24-dihidrocucurbitacina D ($C_{30}H_{46}O_7$) e cucurbitacina G ($C_{30}H_{46}O_8$)</p>	Atividade citotóxica	ABDEL <i>et al.</i> , 2008

Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Elalocarpus hainanensis</i></p> <p>Estruturas 6, p. 40, 9 e 10, p.42 Cucurbitacina I (C₃₀H₄₂O₈), Cucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇) e Cucurbitacina G (C₃₀H₄₆O₈)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p>55- Cucurbitacina F (C₃₀H₄₆O₇)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>56- Cucurbitacina O (C₃₀H₄₆O₇)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>58- 19-norlanosta-5,24-dien-11-ona,16,23-epoxi-3-(β-D-glicopirasoniloxi)-20-hidroxi-9-metil, (3β,9β,10α,16α,23R) (C₃₆H₅₆O₉)</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>57- 19-norlanosta-5-em-2,11,22-triona, 3,16,20,24,25-pentahidroxi-9-metil, (3β,9β,10α,16α) (C₃₀H₄₆O₈)</p> </div>	Anticâncer	MENG <i>et al.</i> , 2008

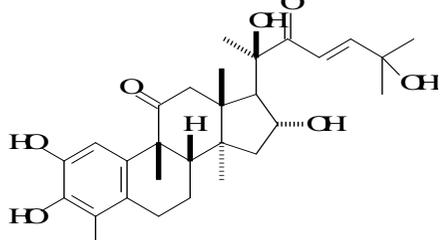
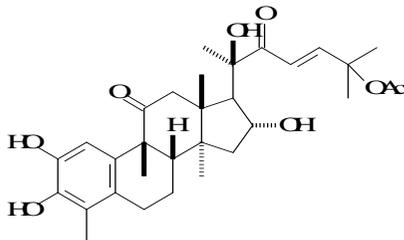
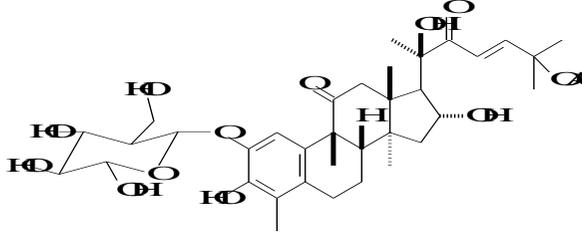
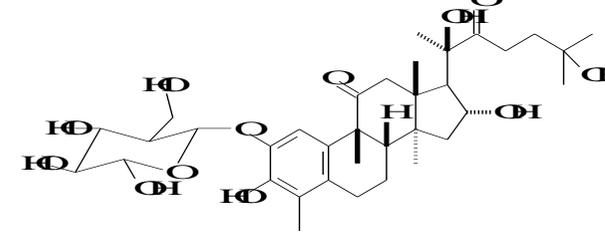
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Elalocarpus hainanensis</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>59- 19-norlanosta-5,24-dien-11-ona,16,23-epoxi-3,20-dihidroxi-9-metil, (3β,9β,10α,16α,23R) (C₃₀H₄₆O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>60- 19-norlanosta-5,24-dien-11-ona,16,23-epoxi-2-(β-D-glicopirasoniloxi)-3,20-dihidroxi-9-metil, (2β,3β,9β,10α,16α,23R) (C₃₆H₅₆O₁₀)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>61- 19-norlanosta-5-en-11-ona,16,23-epoxi-3-(β-D-glicopirasoniloxi)-20,25-dihidroxi-9-metil, (3β,9β,10α,16α,23S) (C₃₆H₅₈O₁₀)</p> </div> </div>	Anticâncer	MENG <i>et al.</i> , 2008

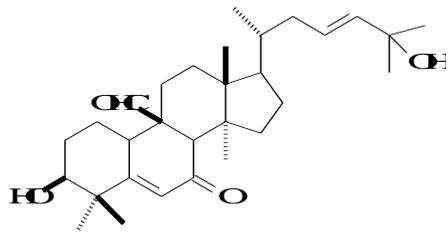
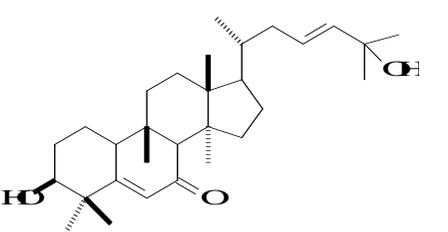
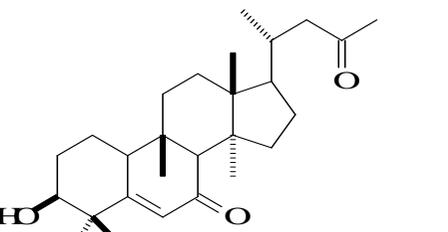
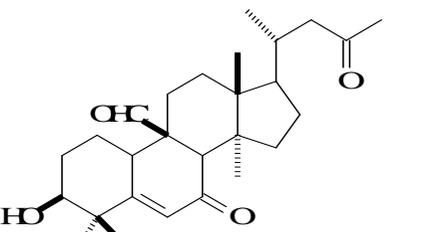
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Physocarpus capitus</i></p> <p>Estruturas 1, p. 39 e 55, p. 59 23,24-dihidrocucurbitacina F (C₃₀H₄₈O₇) e Cucurbitacina F (C₃₀H₄₆O₇)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>62- 19-Norlanosta-5,23-dien-11,22-diona,16-(acetiloxi)-2,3,15,20,25-pentahidroxi-9-metil (2β,3α,9β,10α,15α,16α,23E) (C₃₂H₄₈O₉)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>63- 19-Norlanosta-5,23-dien-11,22-diona,15-(acetiloxi)-2,3,16,20,25-pentahidroxi-9-metil (2β,3α,9β,10α,15α,16α,23E) (C₃₂H₄₈O₉)</p> </div> </div>	Antiproliferativa	MALONEY <i>et al.</i> , 2008

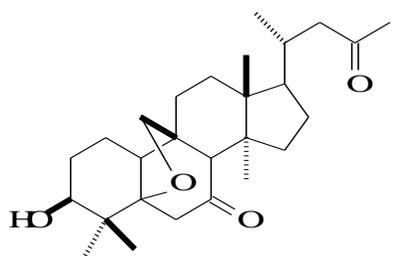
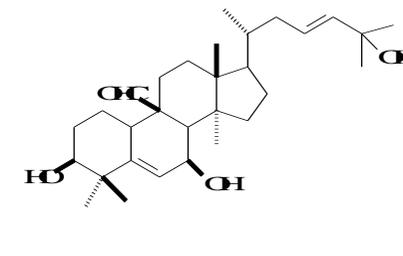
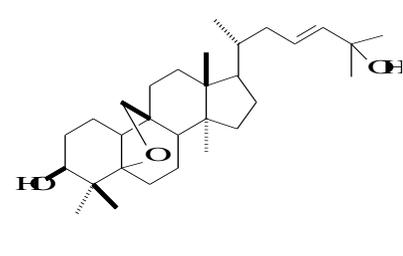
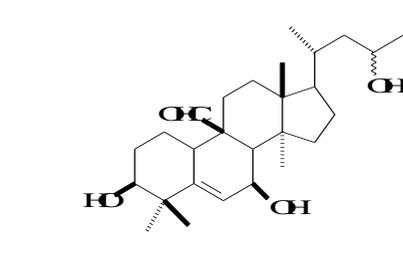
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff) Boerl</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>64- Desacetilfevicordina A (C₂₉H₄₀O₇)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>5- Fevicordina A (C₃₁H₄₂O₈)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>66- Fevicordina A glicosilada (C₃₇H₅₂O₁₃)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>67- Fevicordina D glicosilada (C₃₅H₅₂O₁₂)</p> </div> </div>	Citotóxica	KURNIA <i>et al.</i> , 2008)

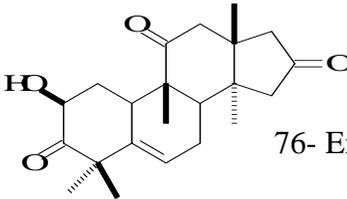
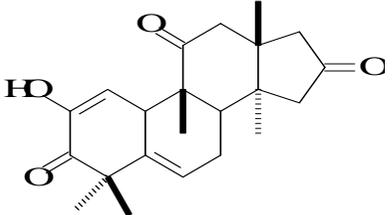
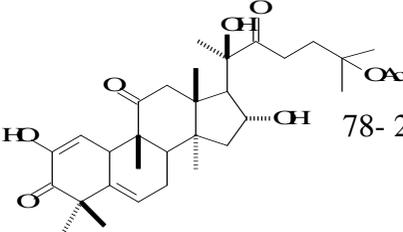
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Momordica charantia</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>68- Kuguacina A (C₃₀H₄₆O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>69- Kuguacina B (C₃₀H₄₈O₃)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>70- Kuguacina C (C₂₇H₄₂O₃)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>71- Kuguacina D (C₂₇H₄₀O₄)</p> </div> </div>	<p>Anti-HIV 1 e citotóxica</p>	<p>CHEN <i>et al.</i>, 2008</p>

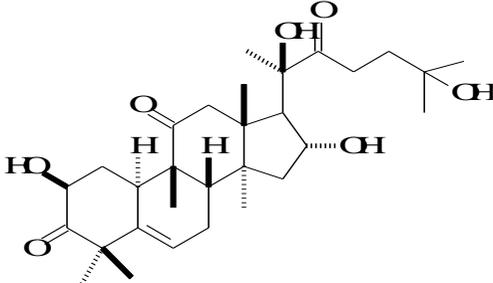
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Momordica charantia</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>72- Kuguacina E (C₂₇H₄₂O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>73- 3β,7β,25-trihydroxycucurbita-5,23(<i>E</i>)-dien-19-al (C₃₀H₄₈O₄)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>74- 3β,25-dihidroxi-5β,19-epoxicucurbita-6,23(<i>E</i>)-dieno (C₃₀H₄₈O₃)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>75- Momordicina I (C₃₀H₄₈O₄)</p> </div> </div>	<p>Anti-HIV 1 e citotóxica</p>	<p>CHEN <i>et al.</i>, 2008</p>

Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Hemsleya endecaphylla</i></p> <p>Estruturas 2 e 3, p. 39, 7, p. 41, 12, p. 42 e 20, p. 46</p> <p>23,24-dihidrocucurbitacina D (C₃₀H₄₆O₇), Cucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₈), Cucurbitacina I (C₃₂H₄₂O₇), 22-deoxicucurbitacina D (C₃₀H₄₆O₆) e 23,24-dihidrocucurbitacina B (C₃₂H₄₈O₈)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p>76- Endecafillacina A (C₂₂H₃₀O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>77- Endecafillacina B (C₂₂H₂₈O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>78- 23,24-dihidrocucurbitacina E (C₃₂H₄₆O₈)</p> </div> </div>	-	CHEN <i>et al.</i> , 2008

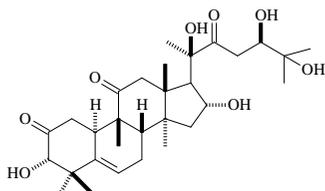
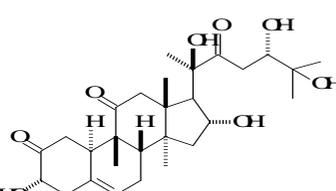
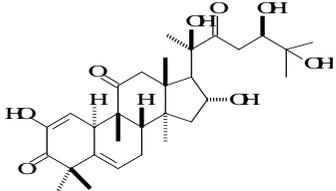
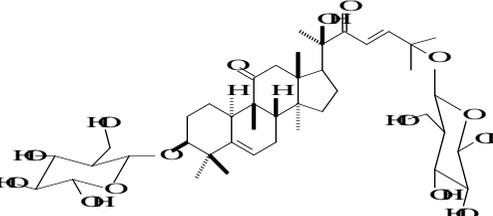
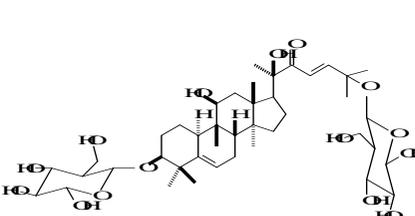
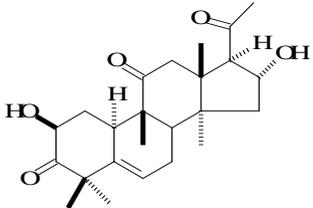
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="817 438 1052 470"><i>Cayaponia tayuya</i></p>  <p data-bbox="728 813 1142 845">79- Cucurbitacina R (C₃₀H₄₆O₇)</p>	Antiinflamatória e analgésica	SABA; ORIDUPA, 2010

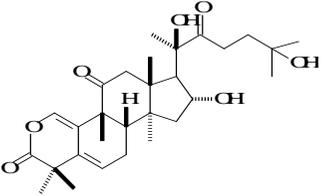
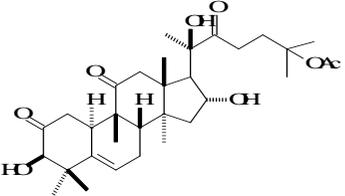
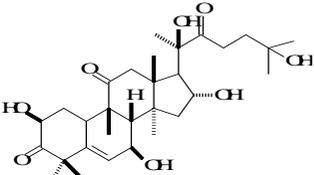
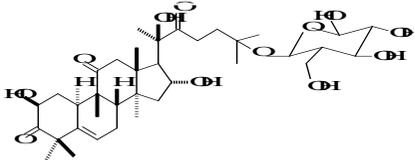
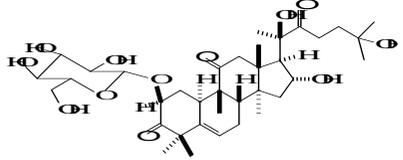
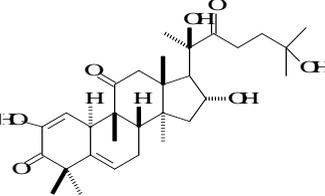
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<i>Trichosanthes cucumerina</i> L. Estrutura 3, p. 39 Cucurbitacina B (C ₃₂ H ₄₆ O ₈)	Anticancer	DUANGMANO <i>et al.</i> , 2010
Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<i>Pedicellus melo</i> Estruturas 3 e 4, p. 39 e 7, p. 41 Cucurbitacina B (C ₃₂ H ₄₆ O ₈), Cucurbitacina E (C ₃₂ H ₄₄ O ₈) e Cucurbitacina I (C ₃₂ H ₄₂ O ₇)	-	ZAI-SU <i>et al.</i> , 2011

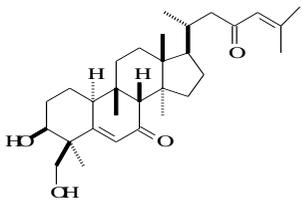
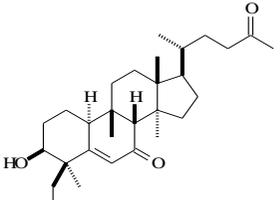
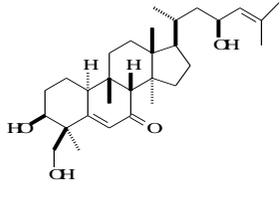
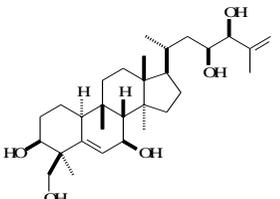
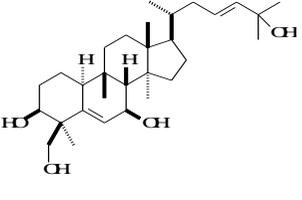
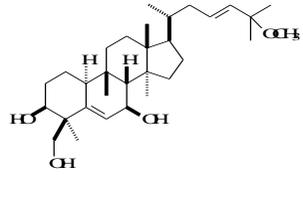
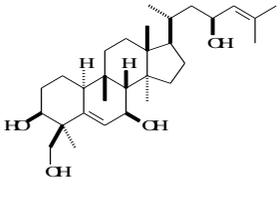
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referências
<p style="text-align: center;"><i>Bryonia cretica</i></p> <p>Estruturas 3 e 4, p. 39, 9,10 e 11, p. 42 e 20, p.46 Cucurbitaciana B (C₃₂H₄₆O₈), Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈), Cucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇) Cucurbitacina G (C₃₀H₄₆O₈), cucurbitacina H (C₃₀H₄₆O₈) e 23,24-dihidrocucurbitacina B (C₃₂H₄₈O₈)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>80- Isocucurbitacina G (C₃₀H₄₆O₈)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>81- isocucurbitacina H (C₃₀H₄₆O₈)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>82- Cucurbitacina J (C₃₀H₄₄O₈)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>83- Brioniosido A (C₄₂H₆₈O₁₃)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>84- Brioniosido B (C₄₂H₇₀O₁₃)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>85- Hexanorcucurbitacina D (C₂₄H₃₄O₅)</p> </div> </div>	Anticancer	SALLAM <i>et al.</i> ,2010; MATSUDA <i>et al.</i> , 2010

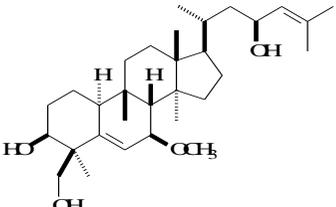
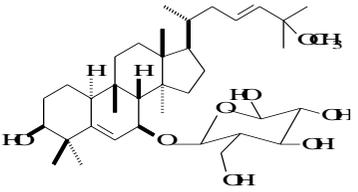
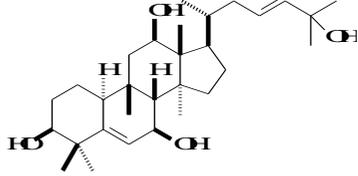
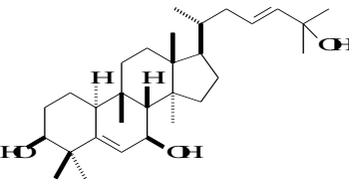
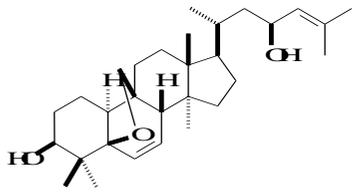
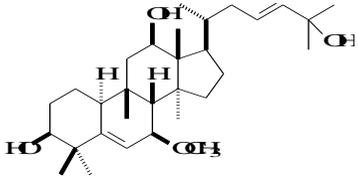
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Bryonia aspera</i></p> <p>Estruturas 2 e 4, p. 39 e 20, p. 46</p> <p>23,24-dihidrocucurbitacina D (C₃₀H₄₆O₇), Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈) e 23,24-dihidrocucurbitacina B (C₃₂H₄₈O₈)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>86- Neocucurbitacina C (C₂₉H₄₂O₇)</p>  </div> <div style="text-align: center;">  <p>87- 7β-hidroxi-23,24-dihidrocucurbitacina D (C₃₀H₄₆O₈)</p>  <p>89- 25-O-β-D-glicopirasoniloxi-23,24-dihidrocucurbitacina D (C₃₆H₅₆O₁₂)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>90- Arvenina IV (C₃₆H₅₆O₁₂)</p>  <p>91- Cucurbitacina L (C₃₀H₄₄O₇)</p> </div> </div> <p>88- 23,24-dihidro-3-epiisocucurbitacina B (C₃₂H₄₈O₈)</p>	<p>Anticancer</p>	<p>SAHRANAVARD <i>et al.</i>, 2010</p>

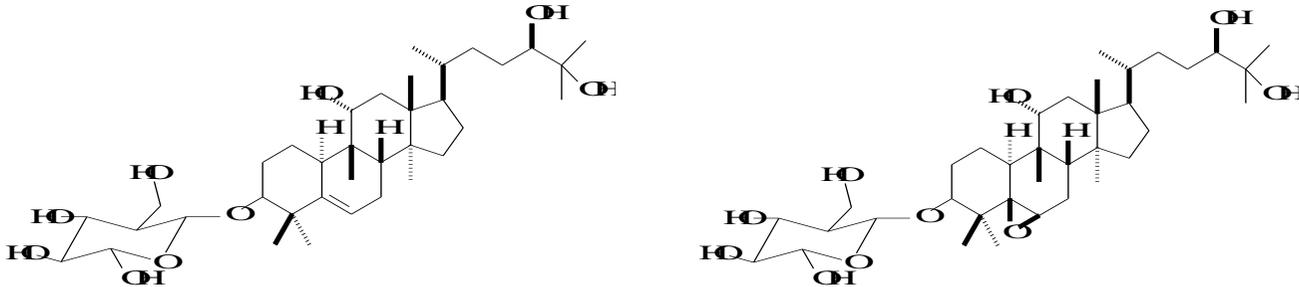
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Momordica balsamina</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p>92- Balsaminol C (C₃₀H₄₆O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>93- Balsaminol D (C₂₇H₄₂O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>94- Balsaminol E (C₃₀H₄₈O₃)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>97- Basaminapentanol (C₃₀H₅₀O₅)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>95- Balsaminagenina A (C₃₀H₅₀O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>96- Balsaminagenina B (C₃₁H₅₂O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>98- Balsaminol A (C₃₀H₅₀O₄)</p> </div> </div>	<p>Antimalárica e Citotóxica</p>	<p>RAMALHETE <i>et al.</i>, 2010</p>

Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Momordica balsamina</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>99- Balsaminol B (C₃₁H₅₂O₄)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>100- Balsaminosidio A (C₃₇H₆₂O₈)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>101- Cucurbalsaminol A (C₃₀H₅₀O₄)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>103- 19-norlanosta-5,23-dien-3,7,25-triol-9-metil (3β,7β,9β,10α,23E) (C₃₀H₅₀O₃)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>104- Karavilagenina E (C₃₀H₄₈O₃)</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>102- Cucurbalsaminol B (C₃₁H₅₂O₄)</p> </div>	<p>Antimalárica e citotóxica</p>	<p>RAMALHETE <i>et al.</i>, 2010</p>

Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="763 435 1102 470" style="text-align: center;"><i>Elalocarpus glabripetalus</i></p> <p data-bbox="221 502 448 537">Estrutura 9, p. 42</p> <p data-bbox="221 557 584 592">Cucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇)</p> <div data-bbox="286 614 1585 901" style="text-align: center;"><p>The image displays two chemical structures. On the left is Cucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇), a complex pentacyclic triterpene with multiple hydroxyl groups and a long side chain. On the right is 5R,6R-epoximogrosidio I E1 (C₃₆H₆₂O₁₀), which is a cucurbitacin glycoside consisting of the cucurbitacina D core linked to a glucose moiety at the C-3 position.</p></div> <p data-bbox="286 927 719 962">105- Mogrosidio I E1 (C₃₆H₆₂O₉)</p> <p data-bbox="922 927 1525 962">106- 5R,6R-epoximogrosidio I E1 (C₃₆H₆₂O₁₀)</p>	Anticancer	SHENG <i>et al.</i> , 2010

Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="792 437 1077 472" style="text-align: center;"><i>Gratiola officinalis</i> L.</p> <p data-bbox="226 504 846 539">Estruturas 4, p. 39, 7, p. 41, 21, p. 47 e 37, p. 52</p> <p data-bbox="226 560 1644 655">Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈), Cucurbitacina I (C₃₂H₄₂O₇), 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina I (C₃₆H₅₂O₁₂) e 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina E (C₃₈H₅₄O₁₃)</p>	Anticancer	KAYA; MELZIG, 2008
Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="848 841 1021 876" style="text-align: center;"><i>Iberis amara</i></p> <p data-bbox="226 908 584 943">Estruturas 4, p. 39 e 7, p. 41</p> <p data-bbox="226 963 958 999">Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈) e Cucurbitacina I (C₃₂H₄₂O₇)</p>	Inseticida	KAMELA; SOUAD, 2008

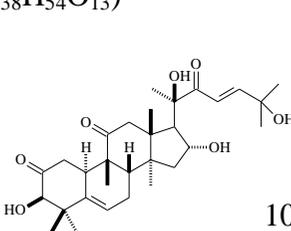
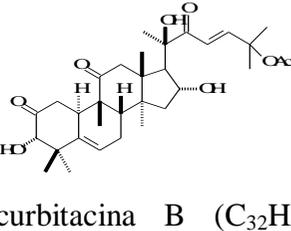
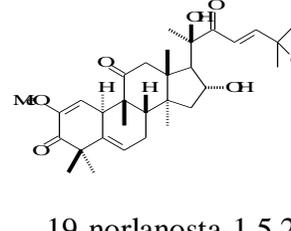
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="824 432 1048 464" style="text-align: center;"><i>Coccinia grandis</i></p> <p data-bbox="226 499 584 531">Estruturas 3, p. 39 e 9, p. 42</p> <p data-bbox="226 555 943 587">Cucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₈) e Cucurbitacina (C₃₀H₄₄O₇)</p>	Reguladora da glicemia	SUBBIAH, 2008
Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="824 807 1048 839" style="text-align: center;"><i>Citrullus lanatus</i></p> <p data-bbox="226 874 607 906">Estruturas 4, p. 39 e 22, p. 47</p> <p data-bbox="226 930 1267 962">Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈) e 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina L (C₃₆H₄₄O₁₂)</p>	Antigiardíase	HASSAN <i>et al.</i> , 2011

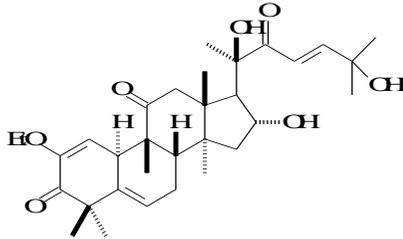
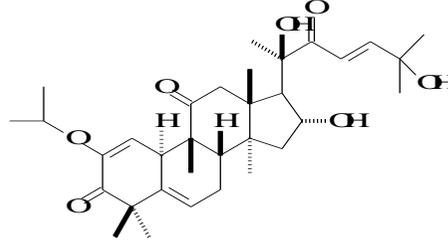
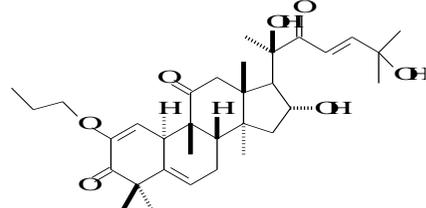
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="808 432 1059 464"><i>Lagenaria vulgaris</i></p> <p data-bbox="226 496 674 528">Estruturas 3, p. 39, 9, 10 e 11, p.42</p> <p data-bbox="226 552 1648 639">Cucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₈), Cucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇), cucurbitacina G (C₃₀H₄₆O₈) e Cucurbitacina H (C₃₀H₄₆O₈)</p>	Antioxidante	MEHTA <i>et al.</i> , 2011
Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p data-bbox="835 892 1032 924"><i>Aquilaria hulls</i></p> <p data-bbox="226 956 842 987">Estruturas 4, p. 39, 7, p. 41, 21, p. 47 e 37, p. 52</p> <p data-bbox="226 1011 1648 1107">Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈), Cucurbitacina I (C₃₂H₄₂O₇), 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina I (C₃₆H₅₂O₁₂) e 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina E (C₃₈H₅₄O₁₃)</p>	Anticancer	WANG <i>et al.</i> , 2011

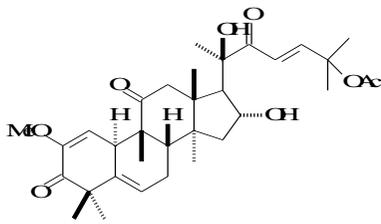
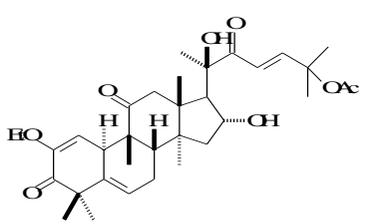
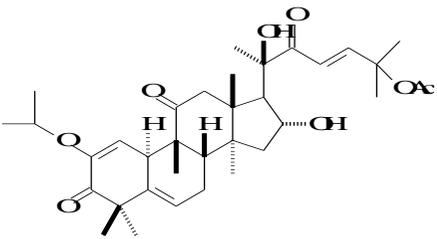
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Cucurbita texana</i></p> <p>Estruturas 3 e 4, p. 39, 7, p. 41, 9, p. 42, 21, p. 47 e 37, p. 52</p> <p>Cucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₈), Cucurbitacina E (C₃₂H₄₄O₈), Cucurbitacina I (C₃₂H₄₂O₇), Cucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇), 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina I (C₃₆H₅₂O₁₂) e 2-O-β-D-glicopirasonilcucurbitacina E (C₃₈H₅₄O₁₃)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p>108- Isocucurbitacina B (C₃₂H₄₆O₈)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>109- 19-norlanosta-1,5,23-trieno-3,11,22-triona-16,20,25-trihidroxi-2-metoxi-9-metil (9β,10α,16α,23E) (C₃₀H₄₄O₇)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>110- 19-norlanosta-1,5-dieno-3,11,22-triona-16,20,25-trihidroxi-2-metoxi-9-metil (9β,10α,16α) (C₃₁H₄₆O₇)</p> </div> </div> <p>107- Isocucurbitacina D (C₃₀H₄₄O₇)</p>	<p>Antiproliferativa e hepatoprotetora</p>	<p>HALAWEIS; BARTALIS, 2007</p>

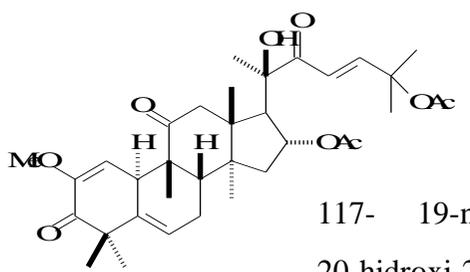
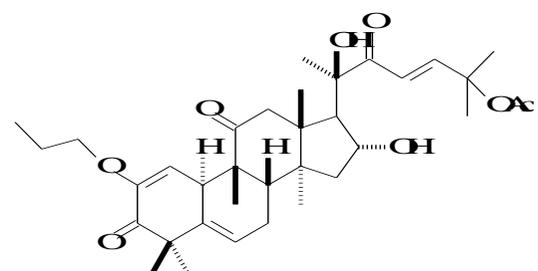
Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Cucurbita texana</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>111- 19-norlanosta-1,5,23-trieno-3,11,22-triona-2-etoxi-16,20,25-trihidroxi-9-metil (9β,10α,16α,23E) (C₃₂H₄₆O₇)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>112- 19-norlanosta-1,5,23-trieno-3,11,22-triona-16,20,25-trihidroxi-9-metil-2-(1-metilenoxi)- (9β,10α,16α,23E) (C₃₃H₄₈O₇)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>113- 19-norlanosta-1,5,23-trieno-3,11,22-triona-16,20,25-trihidroxi-9-metil-2-propoxi- (9β,10α,16α,23E) (C₃₃H₄₈O₇)</p> </div> </div>	<p>Antiproliferativa e hepatoprotetora</p>	<p>HALAWEIS; BARTALIS, 2007</p>

Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Cucurbita texana</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <p>114- 19-norlanosta-1,5,23-trieno-3,11,22-triona-25-(acetoxi)-16,20-dihidroxi-2-metoxi-9-metil-(9β,10α,16α,23E) (C₃₃H₄₆O₈)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> <p>116- 19-norlanosta-1,5,23-trieno-3,11,22-triona-25-(acetoxi)-16,20-dihidroxi-9-metil- 2-(1-metilenoxi) (9β,10α,16α,23E) (C₃₅H₅₀O₈)</p> </div> </div>	<p>Antiproliferativa e hepatoprotetora</p>	<p>HALAWEIS; BARTALIS, 2007</p>

Quadro 3- Continuação

Espécie/Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<p style="text-align: center;"><i>Cucurbita texana</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  <p>117- 19-norlanosta-1,5,23-trieno-3,11,22-triona-16,25-bis(acetoxi)-20-hidroxi-2-metoxi-9-metil- (9β,10α,16α,23E) (C₃₅H₄₈O₉)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>118- 19-norlanosta-1,5,23-trieno-3,11,22-triona-25-(acetoxi)-16,20-dihidroxi-9-metil-2-propoxi (9β,10α,16α,23E) (C₃₅H₅₀O₈)</p> </div> </div>	<p>Antiproliferativa e hepatoprotetora</p>	<p>HALAWEIS; BARTALIS, 2007</p>

CAPÍTULO 3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *Luffa operculata* Cogn.

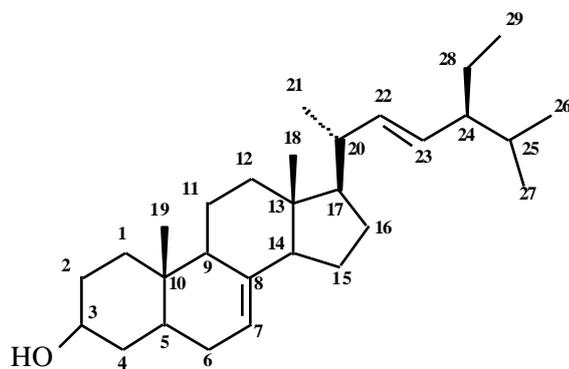
3.1 LOS 1 (1)

A fração hexânica resultante da coluna cromatográfica em gel de sílica do extrato hexânico dos talos de *Luffa operculata*, originou um sólido branco amorfo, solúvel em piridina com ponto de fusão 150,3 – 152,0 °C, denominado LOS 1.

O espectro de absorção na região do IV (Figura 5, p. 83) exibiu bandas de absorção de grupos hidroxila (ν_{OH} 3.420 cm^{-1}), grupos metila e metileno (ν_{CH} 2.932 cm^{-1} e 2.869 cm^{-1} ; $\delta_{\text{CH}_3/\text{CH}_2}$ 1.374 e 1.458 cm^{-1}), ligação olefínica ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$ 1.628 cm^{-1}) e banda representativa de deformação axial C – O de álcool ($\nu_{\text{C-O}}$ 1.100 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^{13}C CPD (Figura 6, p. 84) em combinação com o espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (Figura 7, p. 85) além de um grande número de sinais na região de carbono sp^3 , revelou dois pares de sinais na região de carbono sp^2 em δ_{C} 138,59 (CH)/129,63 (CH) e 139,56 (C)/117,97(CH) (Tabela 1, p. 82). Essas absorções, conforme comparação com dados da literatura (ALBUQUERQUE, 2000; CHAVES, 2002; KANG; XU, 2008), foram compatíveis com a estrutura de um esteróide do tipo estigmastano. Os sinais em δ_{C} 138,59 e 129,63 são valores característicos dos carbonos metínicos C – 22 e C – 23, respectivamente, da cadeia lateral desses esteróides (estigmasterol, por exemplo) (ALBUQUERQUE, 2000), enquanto, os sinais em δ_{C} 139,56 e 117,97 foram atribuídos aos carbonos C – 8 (não hidrogenado) e C – 7 (metínico), respectivamente (Espinasterol e 22-di-hidroespinasterol, por exemplos) (CHAVES, 2002). Vale ressaltar a absorção devida a carbono metínico oxigenado em δ_{C} 70,26, justificada pela presença de grupo hidroxila no carbono C -3, bastante comum em esteróides e, em acordo com a absorção centrada em δ_{H} 3,90 no espectro de RMN ^1H (Figura 8, p. 86) do hidrogênio H – 3 (m). A função álcool (C-3 OH) foi transformada na função éster através de reação de acetilação (Capítulo 4, p. 203). Os três hidrogênios olefínicos aparecem no espectro como multipletos em δ_{H} 5,37-5,24 (H-7 e H-22) e como duplete de duplete em δ_{H} 5,17-5,09 (H-23, $J = 15,0$ e 8,6 Hz).

Assim, a análise espectral e a comparação com os dados descritos na literatura (ALBUQUERQUE, 2000; CHAVES, 2002; KANG e XU, 2008) (Tabela 1, p. 82) permitiram identificar LOS 1 como sendo o (22E,24S)-etil-5 α -colest-7,22-dien-3 β -ol (espinasterol, **1**).



(1)

Tabela 1- Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (75 MHz) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ de LOS 1 e LOS 1-Ac (125 MHz) em CDCl_3 com dados descritos na literatura RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 (KANG; XU, 2008).

Carbonos	LOS 1 (δ_{C})	LOS 1 – Ac (δ_{C})	(KANG; XU, 2008) (δ_{C})
1	38,98	37,05	38,13
2	30,09	28,60	29,81
3	70,26	73,70	71,49
4	37,60	37,05	38,13
5	40,60	40,27	40,44
6	29,94	29,73	31,61
7	117,97	117,53	117,87
8	139,56	139,71	139,69
9	49,75	49,47	49,87
10	34,52	34,43	34,38
11	21,79	21,68	21,71
12	39,68	39,61	39,63
13	43,45	43,47	43,69
14	55,34	55,28	56,09
15	23,31	23,20	23,17
16	28,77	27,71	28,62
17	56,00	56,07	56,32
18	12,23	12,28	12,46
19	13,20	13,15	13,44
20	41,04	40,99	40,67
21	21,57	21,56	21,78
22	138,60	138,33	138,29
23	129,63	129,70	129,63
24	51,40	51,43	51,65
25	32,07	32,04	32,02
26	21,08	21,14	21,58
27	19,11	19,15	19,15
28	25,63	25,60	25,52
29	12,67	12,66	12,46
AcOCH ₃	-	21,68	-
AcO	-	170,92	-

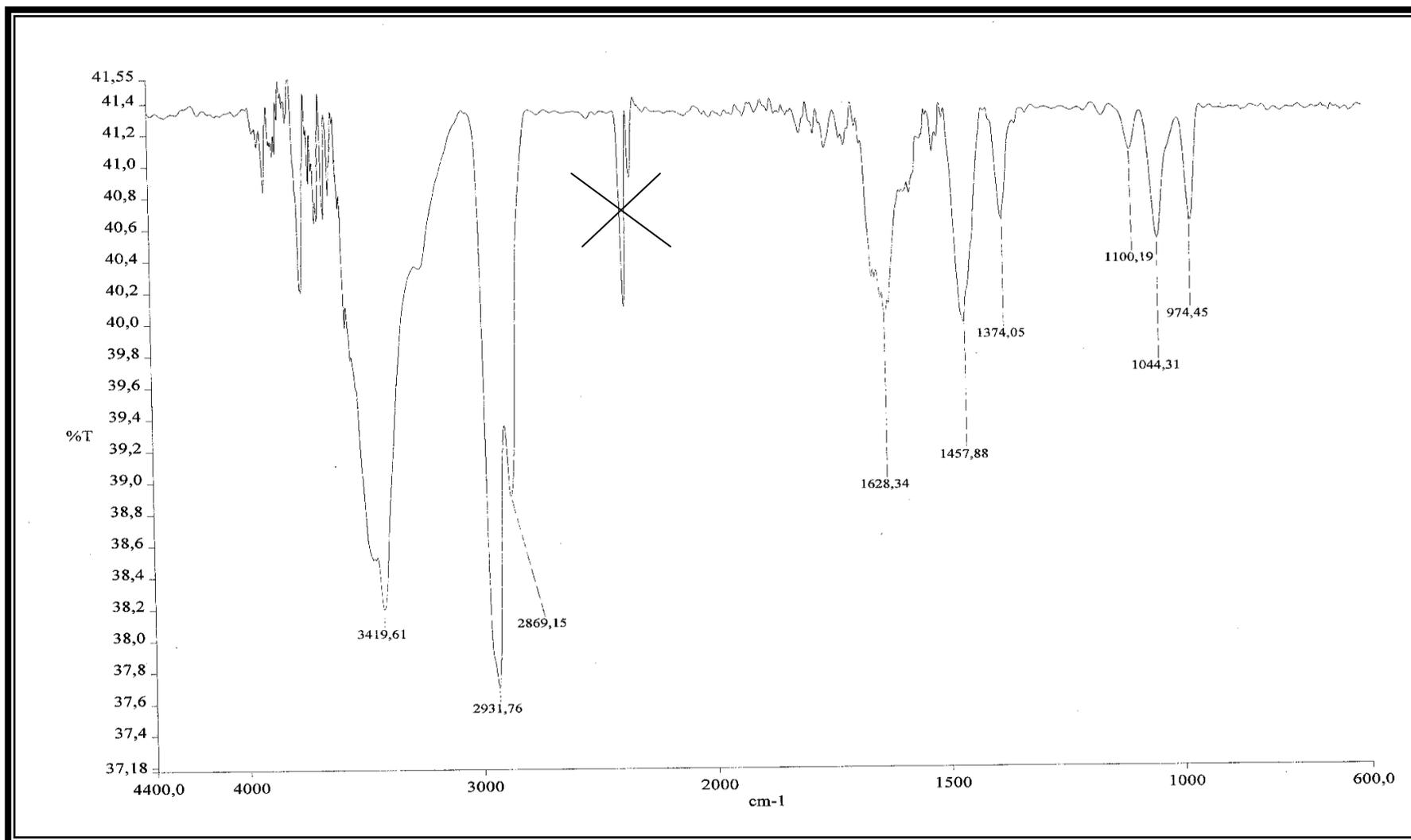


Figura 5- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 1

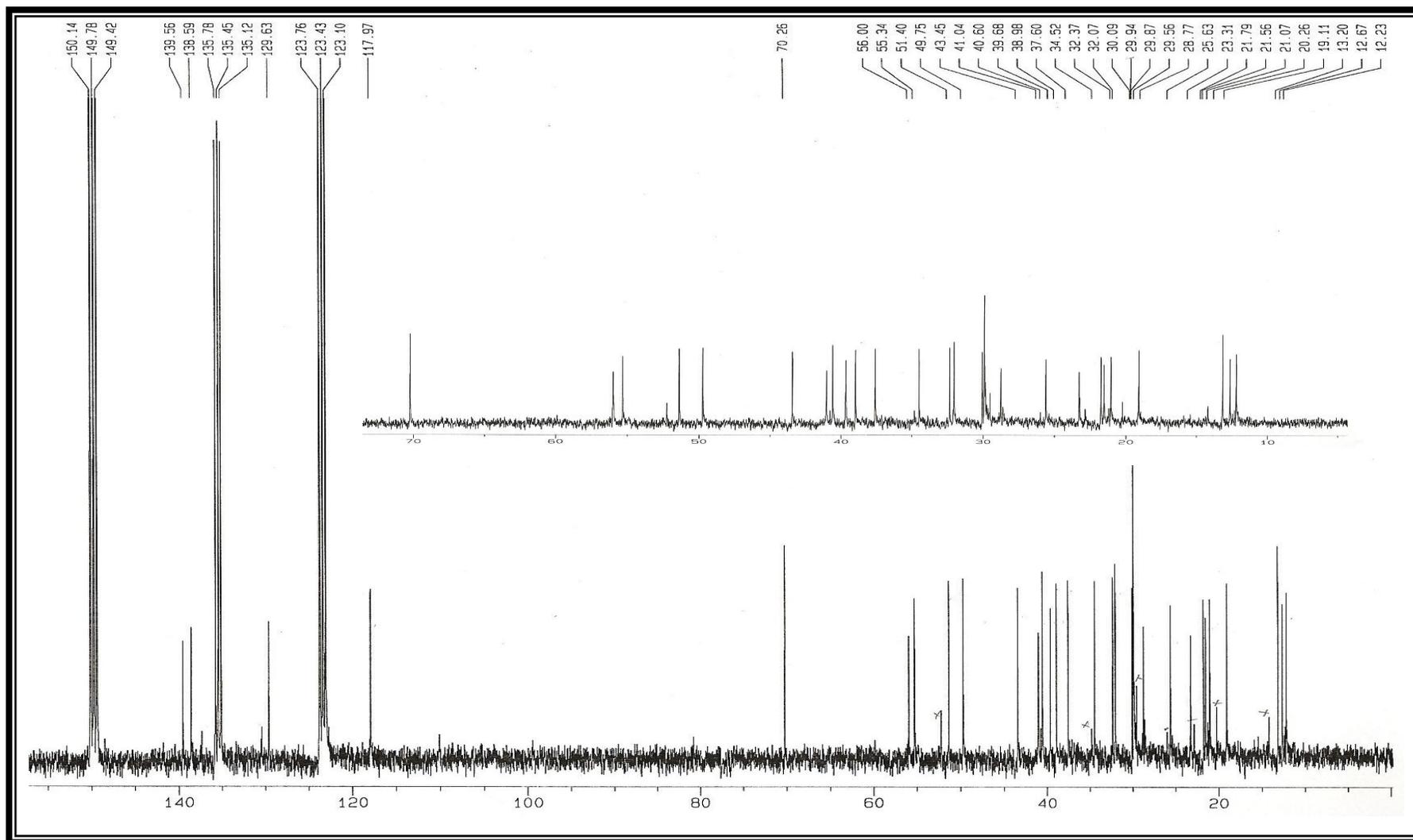


Figura 6- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 1 (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

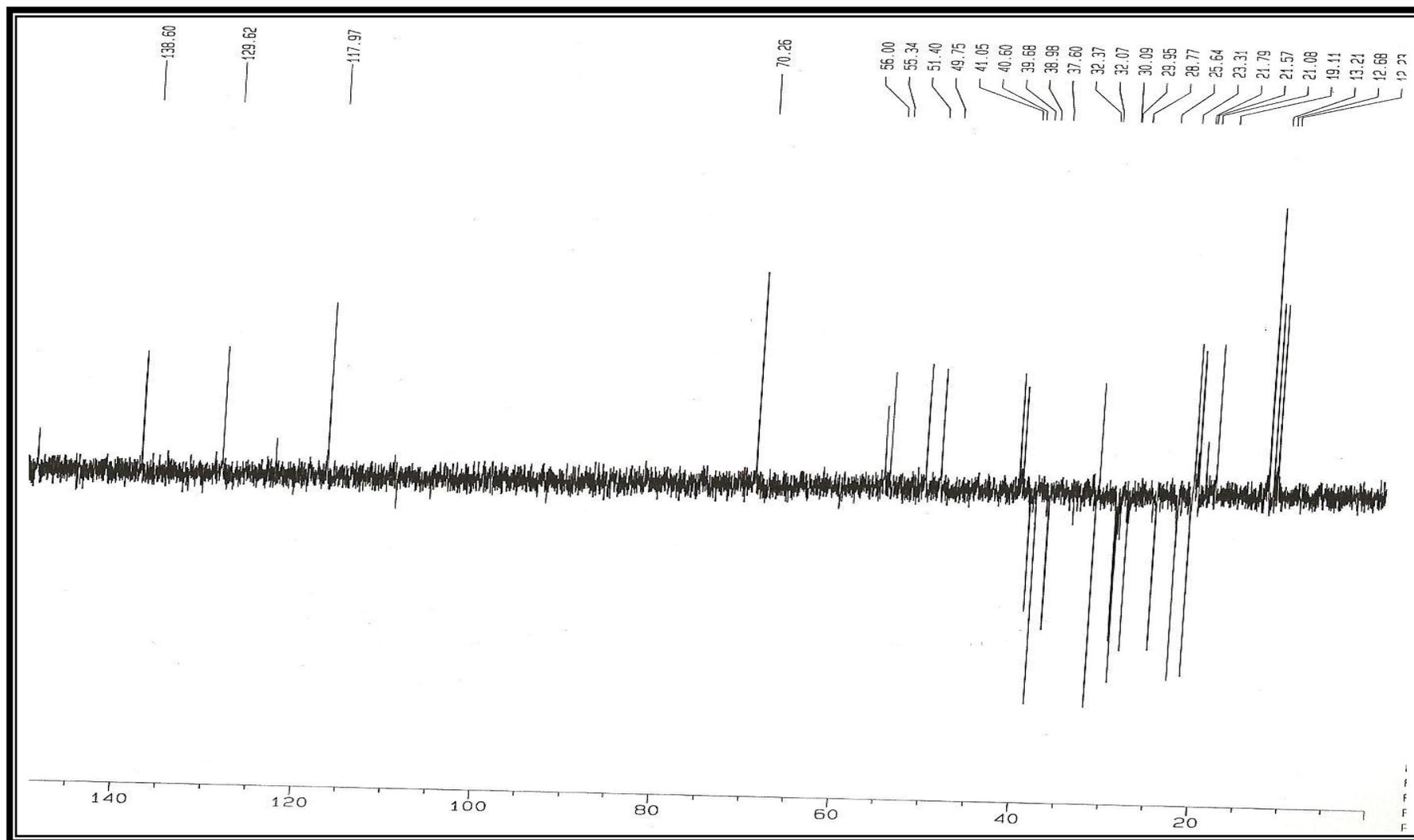


Figura 7- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 1 (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

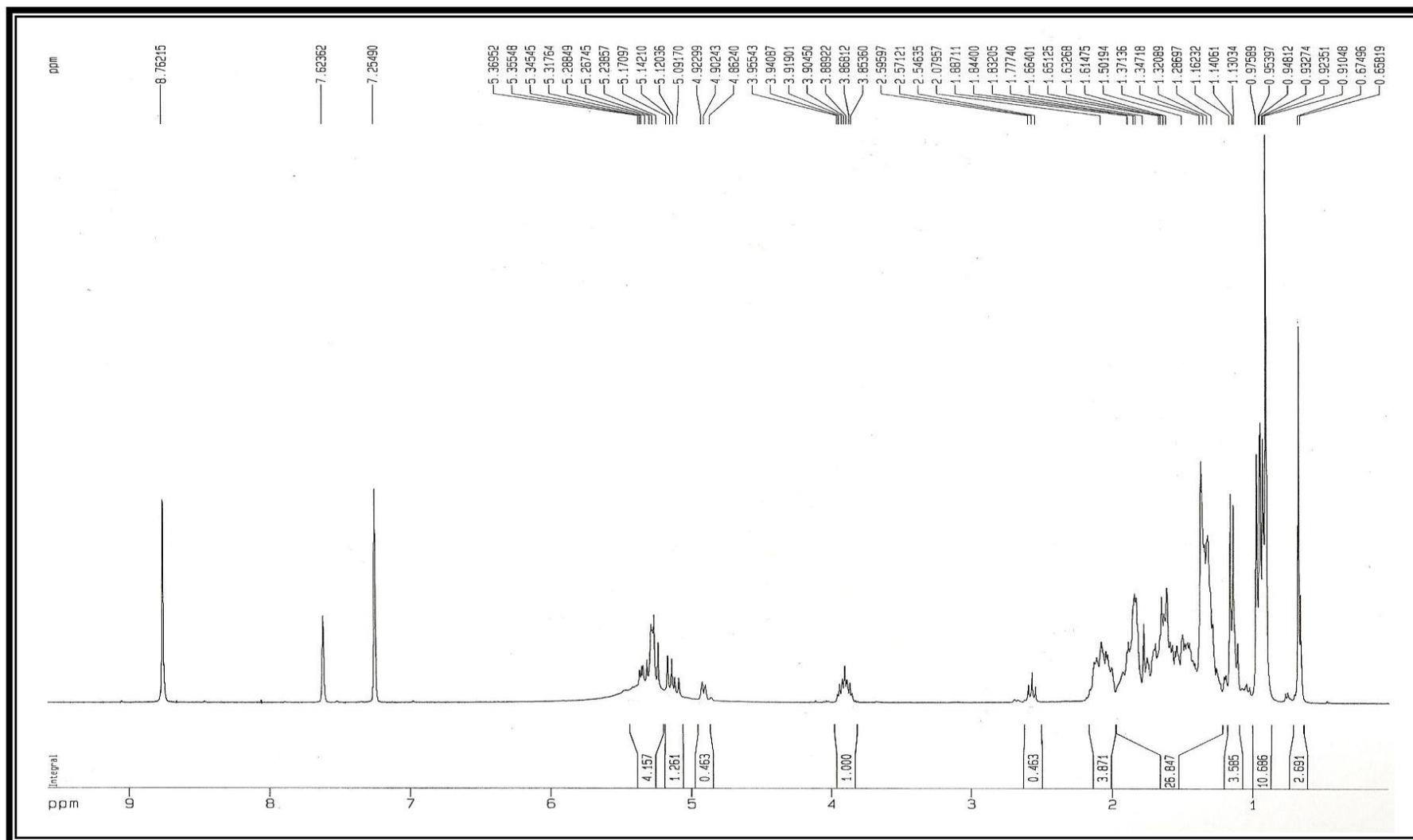


Figura 8- Espectro de RMN ¹H de LOS 1 (500 MHz, C₅D₅N)

3.2 LOS 7 (1 e 2)

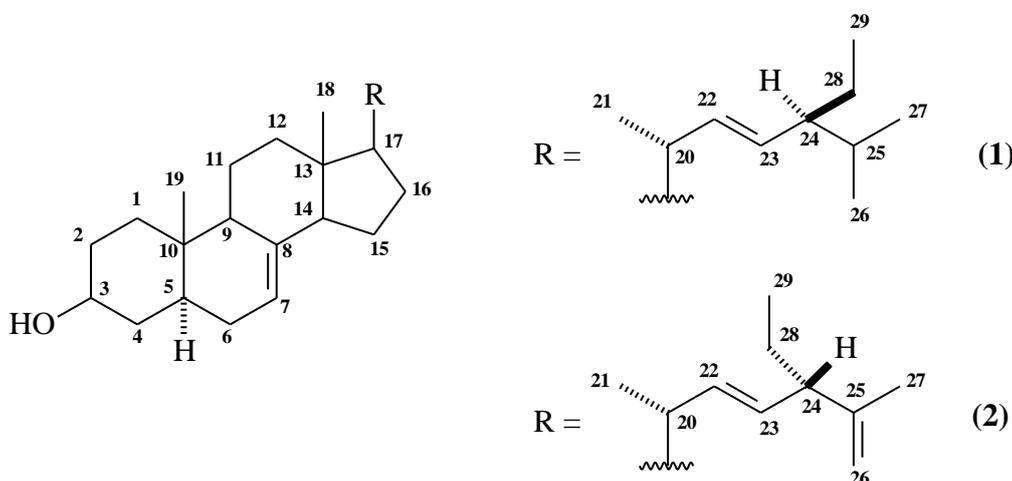
O extrato hexânico das folhas de *Luffa operculata*, após sucessivas colunas cromatográficas em gel de sílica, forneceu a fração diclorometano como um sólido branco amorfo com ponto de fusão 154,2 – 156,7 °C, solúvel em clorofórmio, denominado LOS 7.

O espectro na região do IV (Figura 9, p. 90) de LOS 7 exibiu bandas de absorção de grupos hidroxila (ν_{OH} 3.425 cm^{-1}), grupos metila e metileno (ν_{CH} 2.946 cm^{-1} e 2.868 cm^{-1} ; $\delta_{\text{CH}_3/\text{CH}_2}$ 1.457 cm^{-1} e 1.374 cm^{-1}), ligações olefínicas ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$ \approx 1.647 cm^{-1}) e banda representativa de deformação axial C – O de álcool ($\delta_{\text{C-O}}$ 1.100 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^{13}C CPD de LOS 7 (Figura 10, p. 91) em combinação com o espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (Figura 11, p. 92) mostrou um grande número de sinais na região de carbono sp^3 . Em adição, revelou cinco pares de sinais devidos a carbonos sp^2 : δ_{C} 138,32 (CH)/129,70 (CH), 139,70 (C)/117,71 (CH), 137,23 (CH)/130,40 (CH), 139,76 (C)/117,67 (CH) e 148,77 (C)/109,76 (CH_2) (Tabela 2, p. 89). Essas observações e a comparação com os dados espectrais [IV e RMN (^1H e ^{13}C)] de LOS 7, assim como, com os da literatura (ITOH *et al.*, 1981; CHAVES, 2002; KANG; XU, 2008), evidenciaram a existência de uma mistura de esteróides. Assim, os dois primeiros pares foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C – 22 (CH)/C – 23 (CH) e aos carbonos C – 8 (C)/C – 7 (CH) do espinasterol (**1**) como um dos componentes da mistura. Por conclusão, os sinais em δ_{C} 137,23/130,40 e 139,76/117,67 foram correlacionados aos carbonos C – 22 (CH)/C – 23 (CH) e C – 8 (C)/C – 7 (CH) de outro componente (**2**), o qual, contém adicionalmente, uma ligação olefínica terminal dissustituída, justificada pelos sinais em δ_{C} 148,77 (C) e 109,76 (CH_2) e devidos aos carbonos C – 25 e C- 26, respectivamente, da cadeia lateral. No espectro de massa (Figura 12, p. 93), o pico em m/z 412 (M^+) corresponde ao peso molecular de **1**, enquanto, o pico em m/z 410 (M^+) está em acordo com o esteróide (**2**) contendo uma ligação dupla carbono-carbono adicional, conforme salientado. Vale ressaltar no espectro de RMN ^{13}C a absorção intensa em δ_{C} 71,25 referentes aos carbonos metínicos oxigenados C – 3 (**1** e **2**). A função álcool (C-3 OH) de **1** e **2** foi transformada na função éster através de reação de acetilação (Capítulo 4, p. 206). No espectro de RMN ^1H (Figura 13, p. 94) os hidrogênios carbinólicos dos dois fitoesteróides absorvem em torno de δ_{H} 3,60 (m, 2H) e os olefínicos em δ_{H} 5,15 (m, 2H-7 de **1** e **2**), 5,15 (m, H-22 de **1**), 5,04 (dd, $J=15,3$ e 8,0 Hz, H-23 de **2**), 5,25 (dd, $J=15,3$ e 8,1 Hz, H-22 de **2**), 5,22 (dd, $J=15,3$ e 8,1 Hz, H-23 de **2**) e 4,71 (dois sl, 2H-26). Os deslocamentos químicos desses hidrogênios foram confirmados através das

correlações diretas com os respectivos carbonos no espectro HMQC (Figura 14, p. 95): δ_H 5,15 (2H-7; δ_C 117,71 e 117,67), 5,15 (H-22 de **1**; δ_C 138,31), 5,04 (H-23 de **1**; δ_C 129,70), 5,25 (H-22 de **2**; δ_C 137,23), 5,22 (H-23 de **2**; δ_C 130,40) e 4,71 (2H-26; δ_C 109,76).

Assim, a análise dos espectros de EM, RMN (1H e ^{13}C) e IV de LOS 7 e comparação os correspondentes dados descritos na literatura (ITOH *et al.*, 1981; CHAVES, 2002; KANG; XU, 2008) (Tabela 2, p. 89), permitiram caracterizar uma mistura dos esteróides (22*E*,24*S*)-etil-5 α -colest-7,22-dien-3 β -ol (**1**, 44,2 %, H-23) e (22*E*,24*R*)-etil-5 α -colest-7,22,25-trien-3 β -ol (**2**, 55,8 %, H-26) (porcentagens calculadas com base no espectro de RMN 1H).



O pico base no espectro de massa (Figura, 12, p. 93) em m/z 271 corresponde a uma quebra da ligação C-17 – C-20.

Outros espectros de RMN bi-dimensionais corroboraram as estruturas propostas. Por exemplos, para o composto **2**, no espectro $^1H \times ^1H$ COSY (Figura 15, p. 96) destacou-se o acoplamento alílico entre os hidrogênios H-26 (δ_H 4,70) e os hidrogênios metílicos 3H-27 (δ_H 1,65); no espectro HMBC ($^{2,3}J_{CH}$) (Figura 16, p. 97) foram observadas as correlações do hidrogênio H-24 (δ_H 2,43) com os carbonos C-22 (δ_C 137,23), C-23 (δ_C 130,40), C-25 (δ_C 148,77) e C-26 (δ_C 109,76), entre outras.

Tabela 2- Análise comparativa dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) de LOS 7 e LOS 7-Ac com aqueles registrados na literatura para o espinasterol (CHAVES, 2002; KANG; XU, 2008) e o (22*E*,24*R*)-etil-5 α -colest-7,22,25-trien-3 β -ol (ITOH *et al.*, 1981).

C	LOS 7 (1) (δ_{C})	LOS 7 (2) (δ_{C})	LOS 7-Ac (21) (δ_{C})	LOS 7-Ac (22) (δ_{C})	Espinasterol (KANG; XU, 2008) (δ_{C})	(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-etil- 5 α -colest-7,22,25- trien-3 β -ol (ITOH <i>et al.</i> , 1981) (δ_{C})
1	38,18		37,05		38,13	
2	29,85		29,75		29,81	
3	71,25		73,72		71,49	
4	38,18		37,05		38,13	
5	40,48		40,28		40,44	
6	31,67		29,92		31,61	
7	117,71	117,67	117,58	117,53	117,87	117,3
8	139,70	139,76	139,68	139,68	139,69	139,4
9	49,66		49,48		49,87	
10	32,03		34,03		34,38	
11	21,55		21,68		21,71	
12	39,68		39,63		39,63	
13	40,96		40,99		43,69	
14	55,33		55,29		56,09	
15	23,18		23,01		23,17	
16	28,60		28,30		28,62	
17	56,10		56,09		56,32	
18	12,26		12,28		12,46	
19	13,24		13,15		13,44	
20	40,70		40,54		40,67	
21	21,76		20,97		21,78	
22	138,32	137,23	138,33	137,27	138,29	137,0
23	129,70	130,40	129,71	130,45	129,63	130,2
24	51,43		51,44		51,65	
25	31,67	148,77	31,84	149,00	32,02	148,5
26	21,15	109,76	21,36	109,56	21,58	109,6
27	19,15		19,15		19,15	
28	25,59		25,41		25,52	
29	12,26		12,28		12,46	
AcOCH ₃	-	-	21,14	21,68	-	-
AcO	-	-	170,94	170,94	-	-

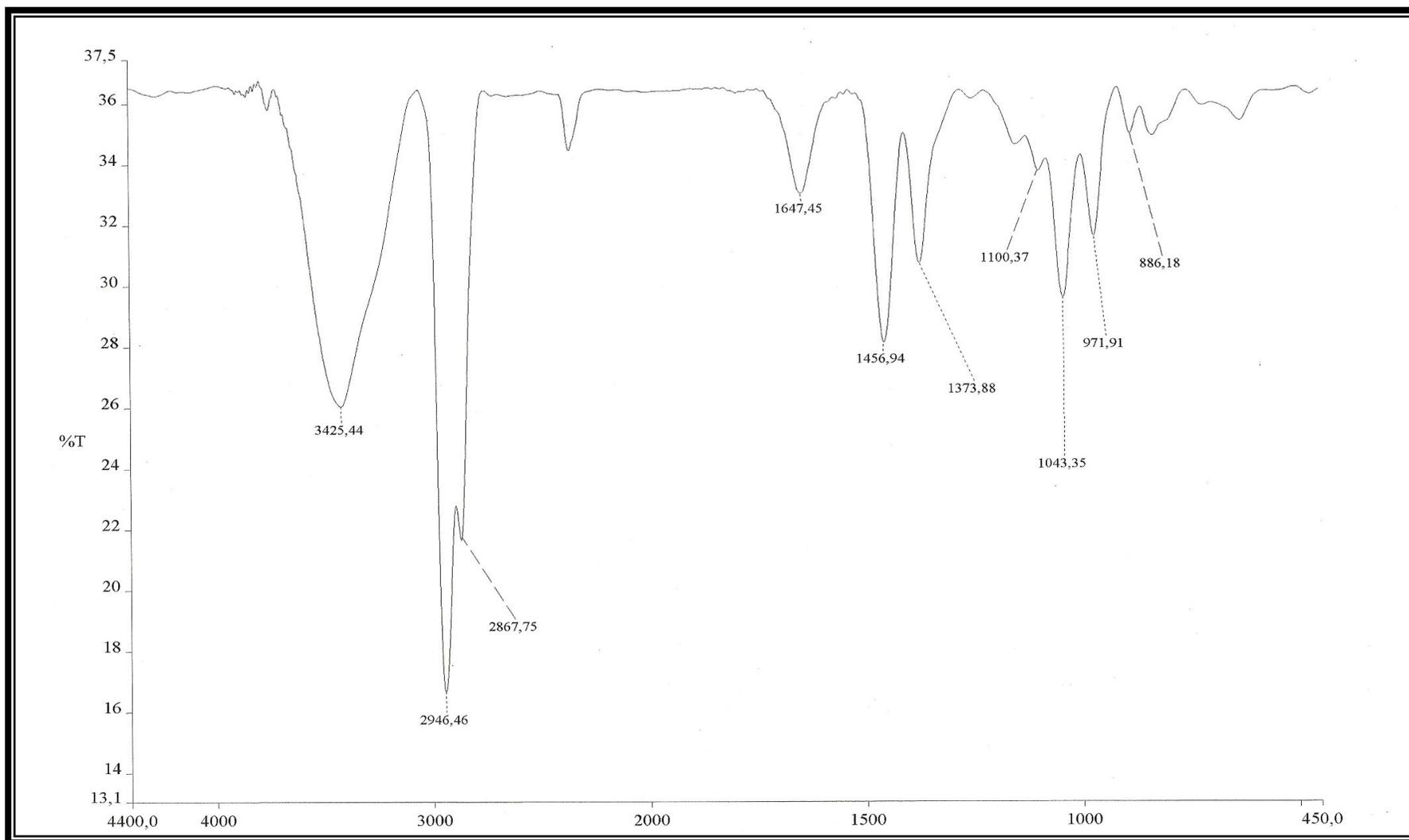


Figura 9- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 7

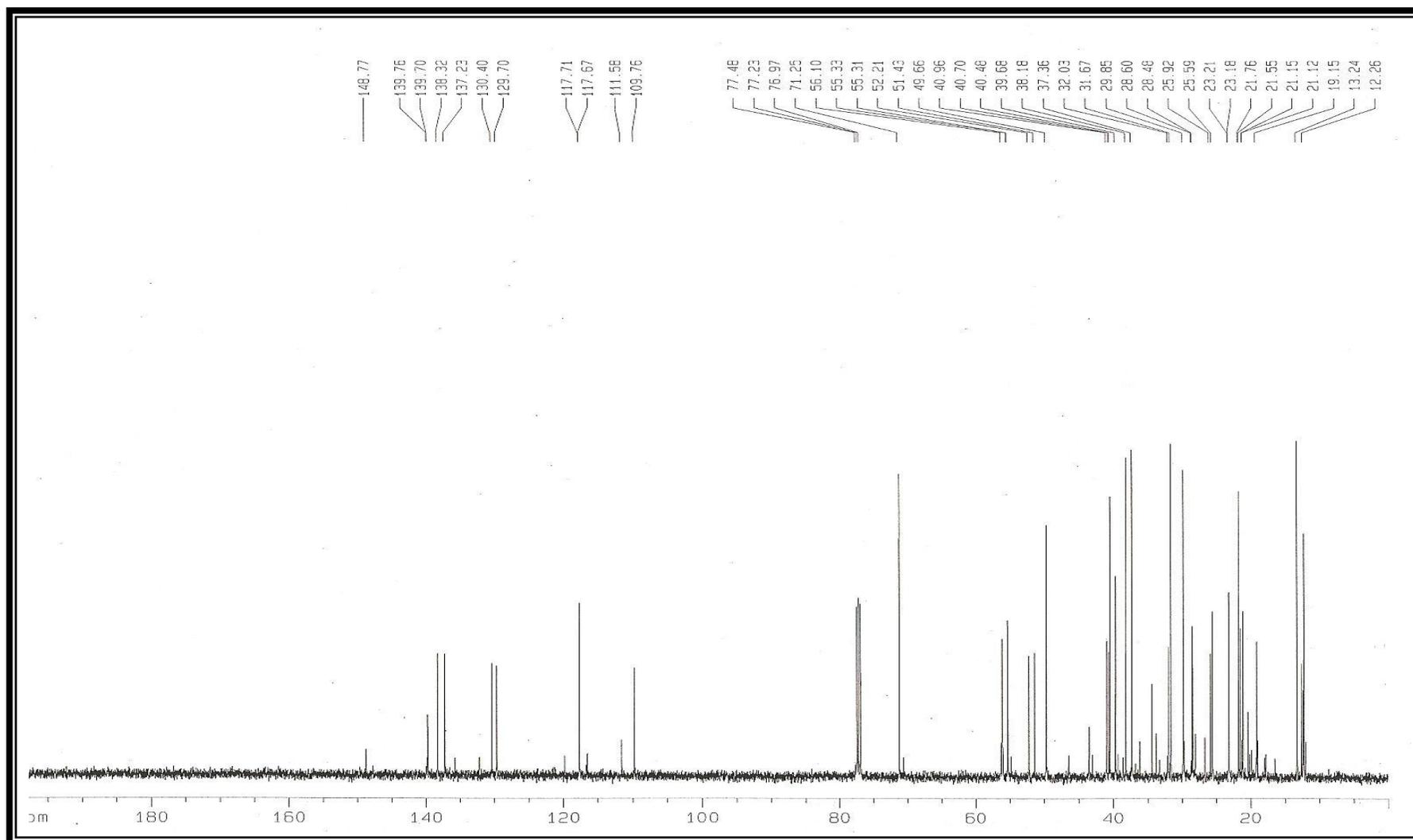


Figura 10- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 7 (125 MHz, CDCl_3)

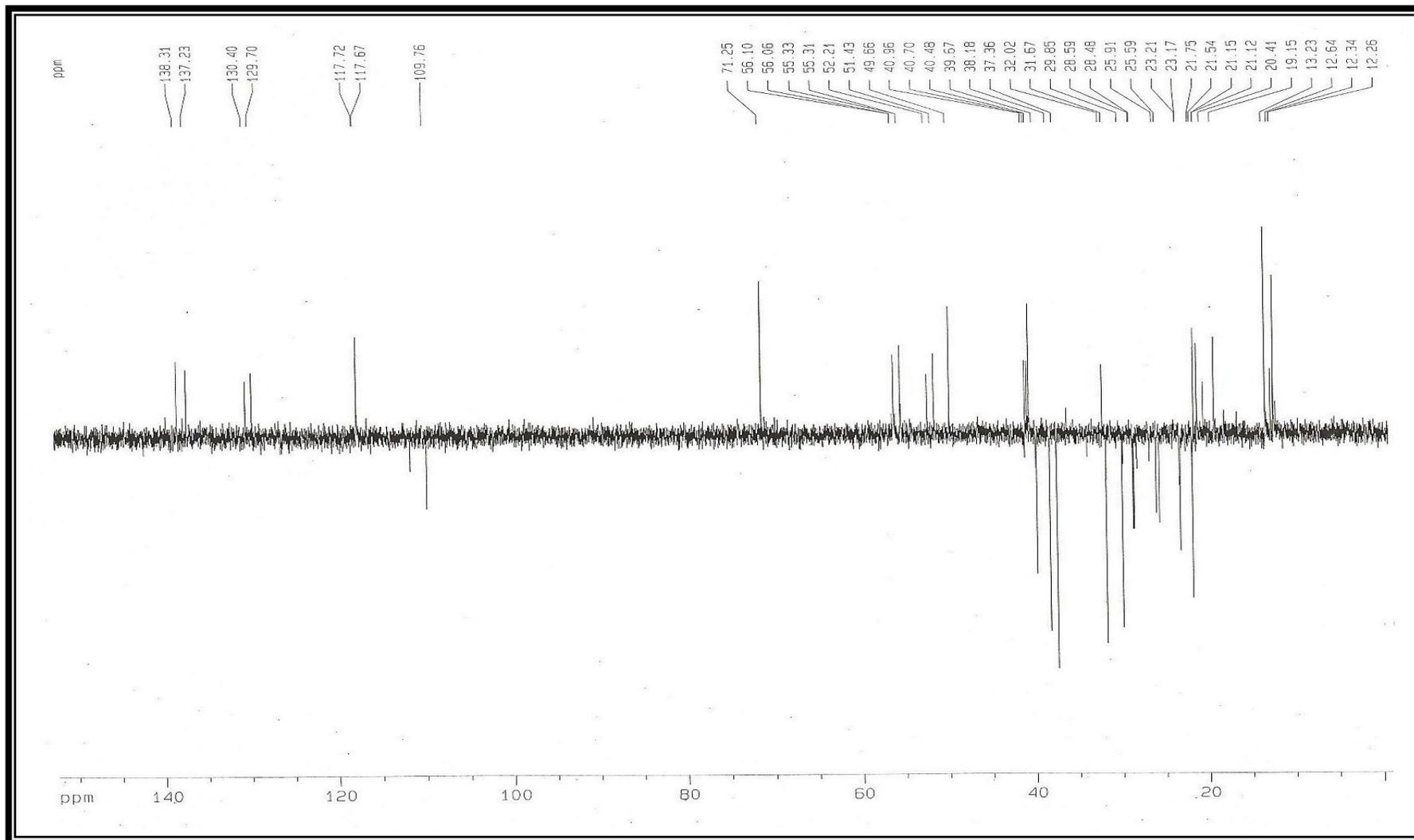


Figura 11- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 7 (125 MHz, CDCl_3)

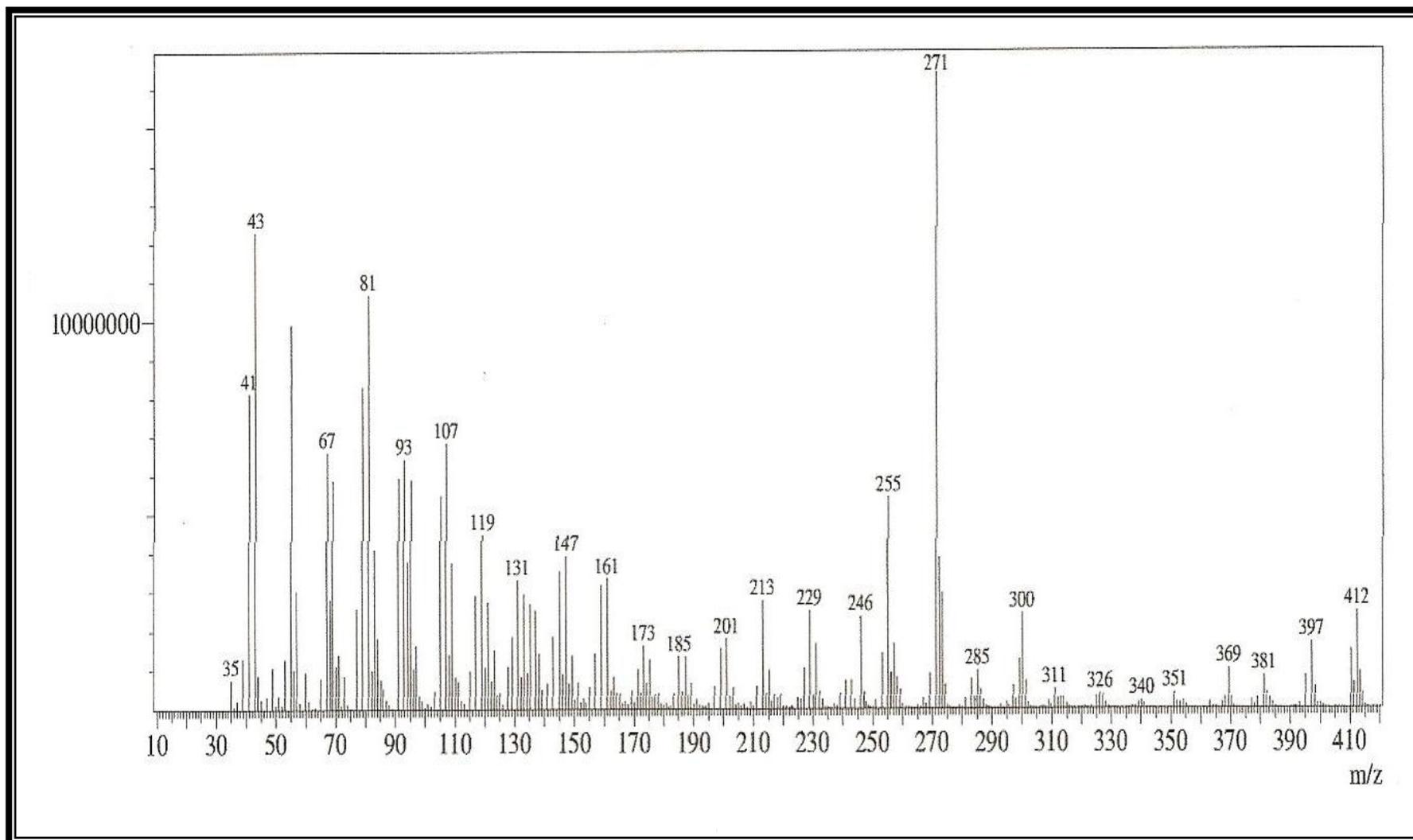


Figura 12- Espectro de massa de LOS 7

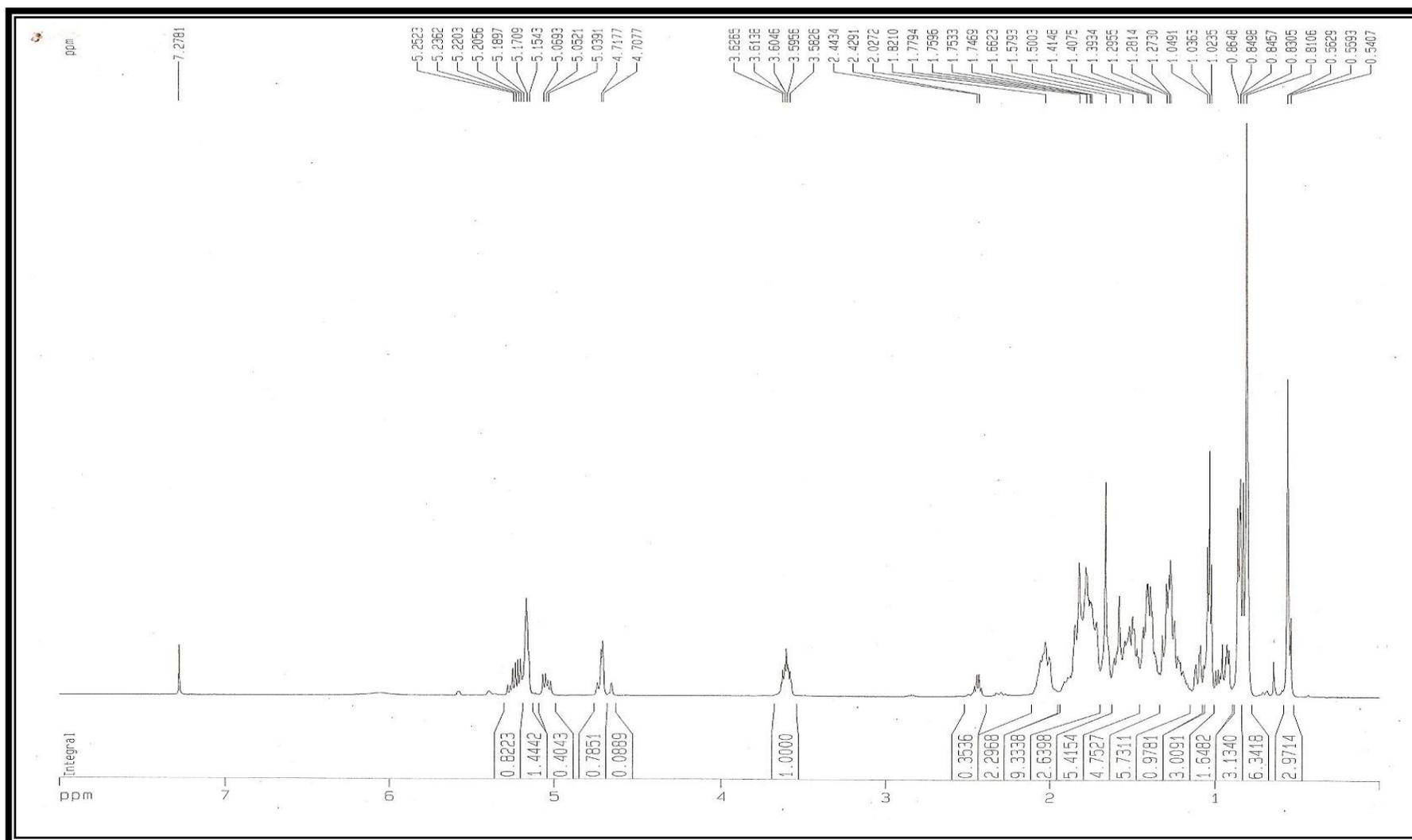


Figura 13- Espectro de RMN ¹H de LOS 7 (500 MHz, CDCl₃)

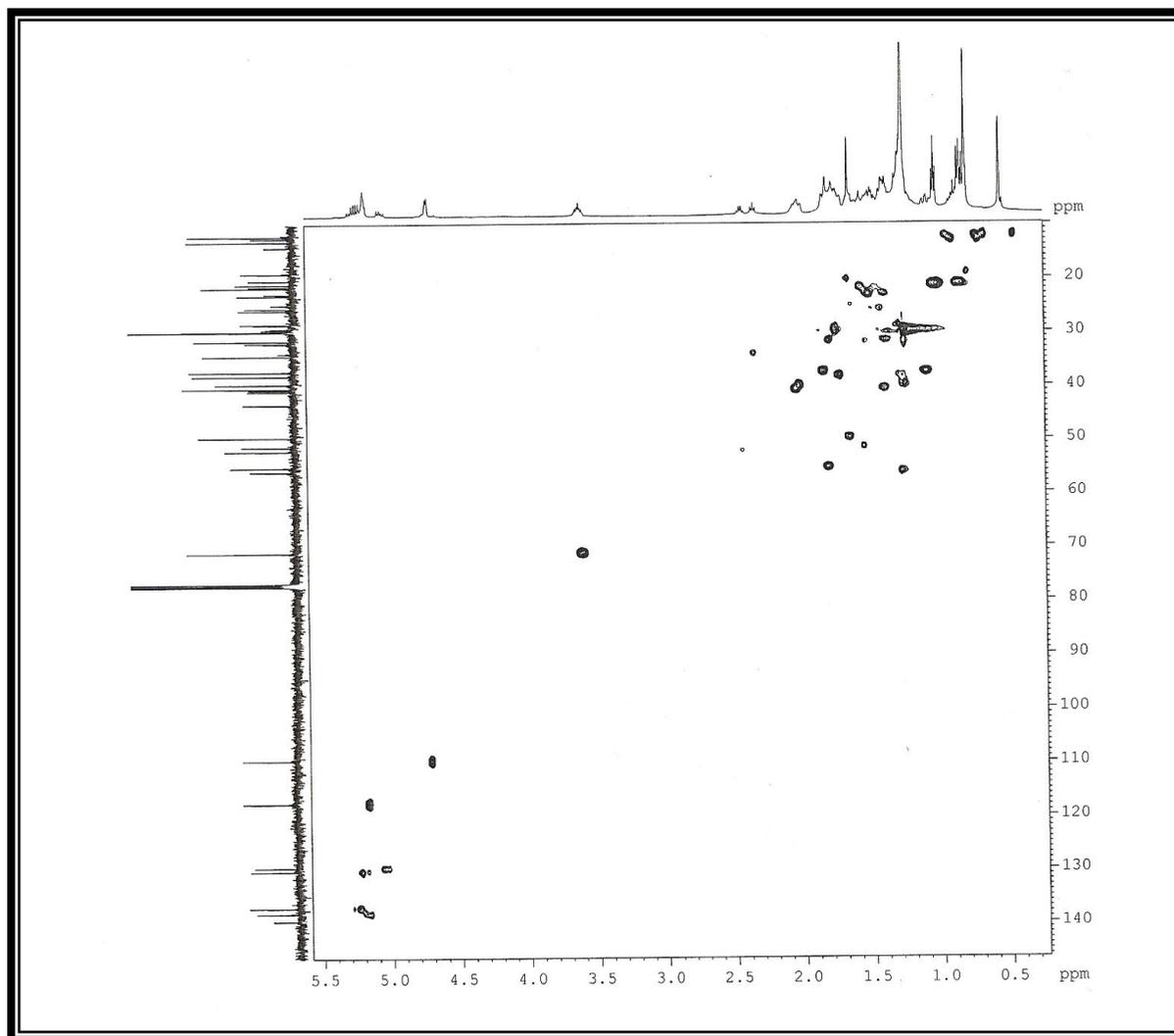


Figura 14- Espectro HMQC de LOS 7 (500 e 125 MHz, CDCl₃)

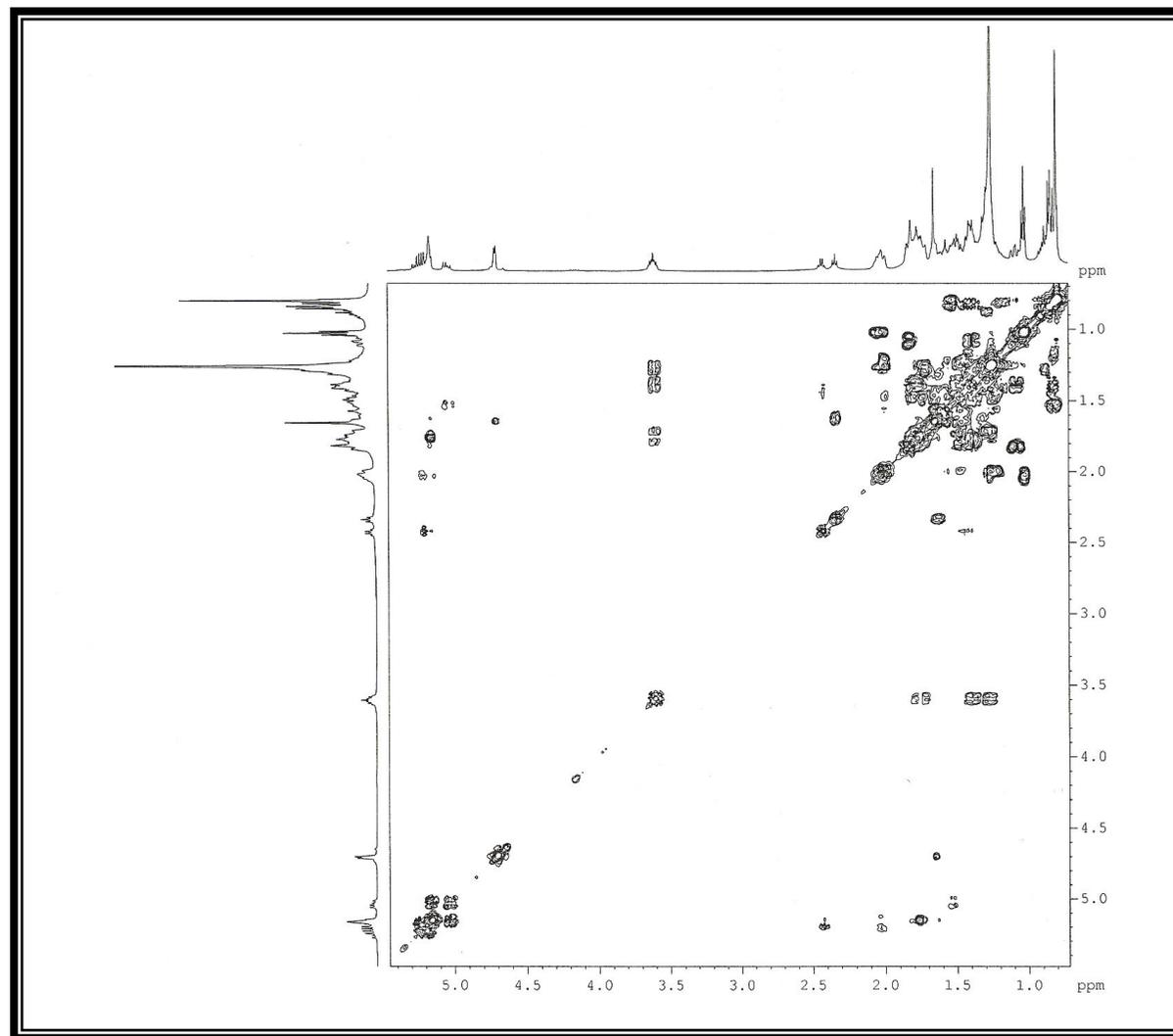


Figura 15- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 7 (125 MHz, CDCl_3)

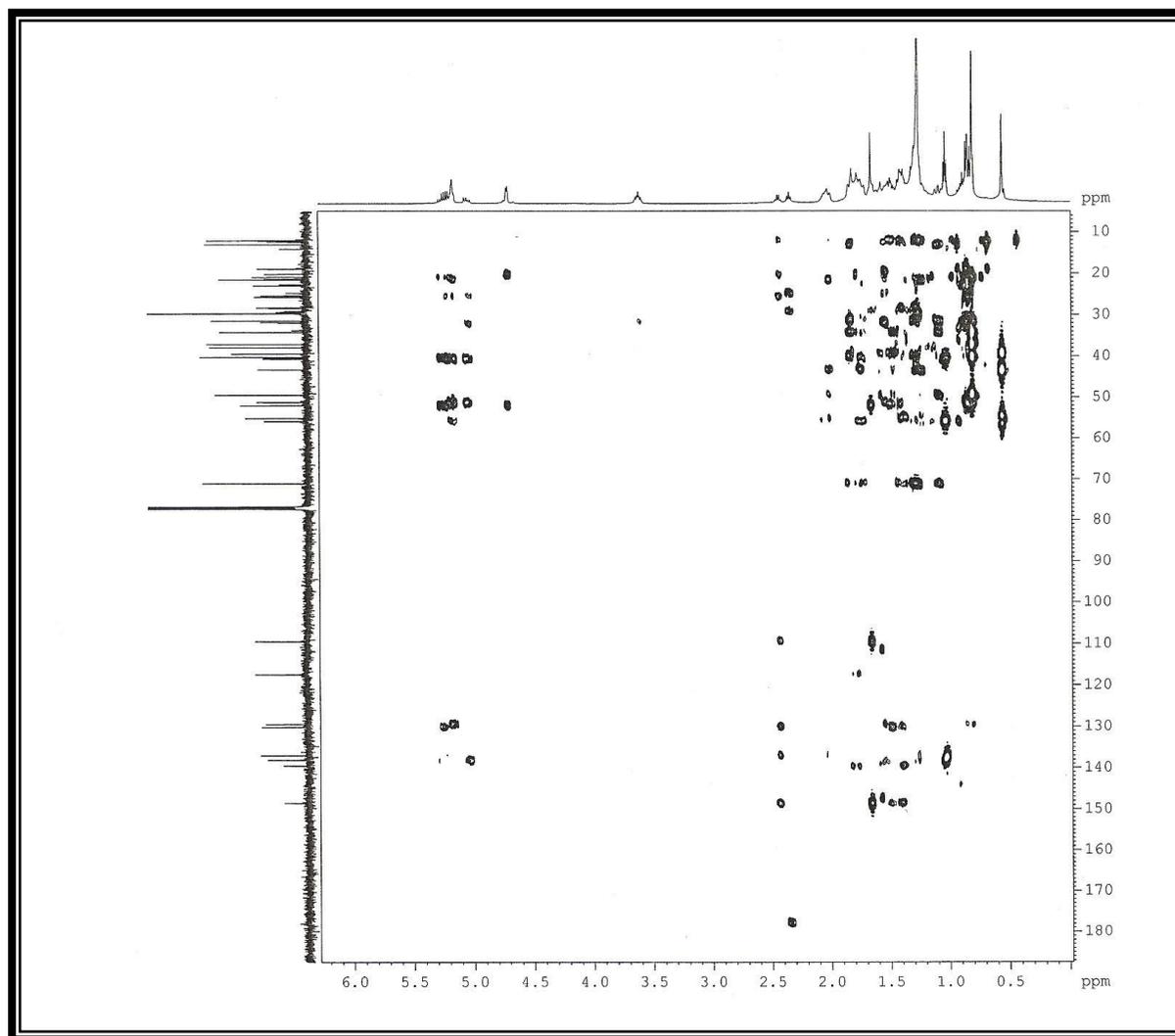


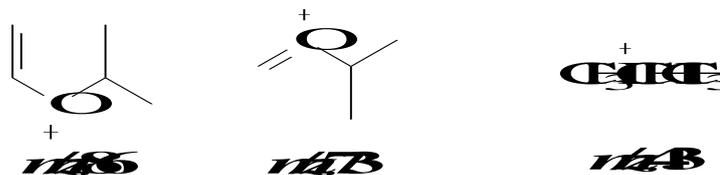
Figura 16- Espectro HMBC de LOS 7 (500 e 125 MHz, CDCl_3)

3.3 LOS 2 (3-7)

A fração clorofórmica do extrato hexânico dos talos de *Luffa operculata* (LOEHT-C) após cromatografia em coluna de gel de sílica, permitiu o isolamento de um óleo de coloração branca, denominada LOS 2.

O espectro de RMN ^{13}C CPD (Figura 17, p. 102) apresentou uma série de sinais compreendidos entre δ_{C} 14,80 e 34,89 referentes a átomos de carbono não funcionalizados, revelando o caráter alifático de LOS 2. No espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (Figura 18, p. 103), os sinais entre δ_{C} 23,46 e 34,89 devidos vários carbonos metilênicos, com destaque para a alta intensidade do sinal em δ_{C} 30,51, assim como, o sinal para carbono metílico em δ_{C} 14,80 (δ_{H} 0,88, t) indicou uma cadeia carbônica longa ligada a um grupo carbonila com δ_{C} 174,20. Essas observações permitiram deduzir a estrutura parcial $\text{CH}_3\text{-CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{-COR}$ (**I**) de LOS 2. Os espectros de RMN ^{13}C CPD e DEPT 135° revelaram, ainda, sinais para dois outros carbonos metilênicos (δ_{C} 64,67 e 66,76) e um carbono metínico (δ_{C} 72,40) ligados a átomos de oxigênio e/ou nitrogênio, além, de um sinal (δ_{C} 22,71) com intensidade dupla em relação ao sinal em δ_{C} 14,80 (CH_3) indicativo de dois carbonos metílicos equivalentes, possibilitando propor para R um dos dois segmentos: $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (**II**) e $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (**III**). No espectro de RMN ^1H (Figura 19, p. 104), foram observados sinais em δ_{H} 4,38 (t, $J=4,9$ Hz, 2H) e 3,66 (t, $J=5,2$ Hz, 2H) e em δ_{H} 3,57 (m, 1H) e 1,12 (d, $J=6,7$ Hz, 6H). No espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (Figura 20, p. 105) as correlações mútuas registradas entre os sinais em δ_{H} 4,38 e 3,66 e entre os sinais em δ_{H} 3,57 e 1,12, foram em acordo com ambos os segmentos estruturais propostos. O espectro HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) (Figura 21, p. 106) exibiu, claramente, todos os pares de correlações esperadas: δ_{C} 64,67/ δ_{H} 4,38, 66,76/3,66, 72,40/3,57 e 22,71/1,12. Por outro lado, o espectro HMBC (Figura 22, p. 107), registrou correlação que permitiu conectar a estrutura parcial **I** a um dos segmentos **II** ou **III**. Assim, o espectro mostrou conectividade ($^3J_{\text{CH}}$) dos hidrogênios do grupo CH_2 em δ_{H} 4,38 com o carbono carbonílico em δ_{C} 174,20. Em adição, as correlações ($^2J_{\text{CH}}$) dos hidrogênios do grupo dimetil geminado em δ_{H} 1,12 com o carbono metínico em δ_{C} 72,40 e entre os hidrogênios dos grupos metileno de **I** [*alfa* (δ_{H} 2,39) e *beta* (δ_{H} 1,67)] com o carbono carbonílico (δ_{C} 174,20). Finalmente, os fragmentos no espectro de massa (Figura 23, p. 108), devidos aos picos em m/z 311, 297, 283, 269 e 255 obtidos por rearranjos do tipo McLafferty a partir dos íons moleculares em m/z 397, 383, 369, 355 e 341 (observados em 395, 381, 367, 353 e 339, respectivamente), permitiu propor para LOS 2, uma mistura de amidas definidas

pelas estruturas do Quadro 4, p. 100. Outros picos importantes como m/z 86 (100%), 73 e 43 todos estão de acordo com as estruturas proposta.



Tendo em vista pesquisa na literatura especializada, as amidas em questão estão sendo relatadas pela primeira vez, portanto, inéditas.

Quadro 4- Estruturas dos componentes da mistura e fragmentos de massas propostos para LOS 2 (3-7)

	n	+ • M	m/z	Fragmentos do rearranjo	Nomenclatura
	3	14	397	311	
4	13	383	297		N-(2-isopropoxietil)nonadecanamida
5	12	369	283		N-(2-isopropoxietil)octadecanamida
6	11	355	269		N-(2-isopropoxietil)heptadecanamida
7	10	341	255		N-(2-isopropoxietil)hexadecanamida

Tabela 3- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ de LOS 2. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.

HMQC		HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{CH}}$
1'	174,20	-	H-1, H-2', H-3'
CH₂			
1	64,67	4,38 (t, 4,9)	H-2
2	66,76	3,66 (t, 5,2)	H-1
2'	34,89	2,39 (t, 7,4)	H-3'
3'	25,81	1,67 (m)	H-2'
4'	30,26	1,34-1,29 (m)	-
5'-n	30,51-29,85	1,34-1,29 (m)	-
n+1	32,64	1,34-1,29 (m)	3H-n+3
n+2	23,46	1,34-1,29 (m)	-
CH			
3	72,40	3,57 (m)	H-4, H-2
CH₃			
4	22,71	1,12 (d, 6,0)	
n+3	14,80	0,89 (t, 6,7)	H-2, H-4

Tabela 4- Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^1H de LOS 2 com dados descritos na literatura (MAIA *et al.*, 2010).

Carbonos	LOS 2	*Ceramida (MAIA, <i>et al.</i> , 2010)
1	64,67	-
2	66,76	-
3	72,40	-
4	22,71	-
1'	174,20	174,3
2'	34,89	38,0
3'	25,81	27,6
4'	30,26	-
5'-n	30,51-29,85	31,3-31,0
n+1	32,64	33,4
n+2	23,46	24,2
n+3	14,80	15,5

* Somente a cadeia alifática foi utilizada para comparação.

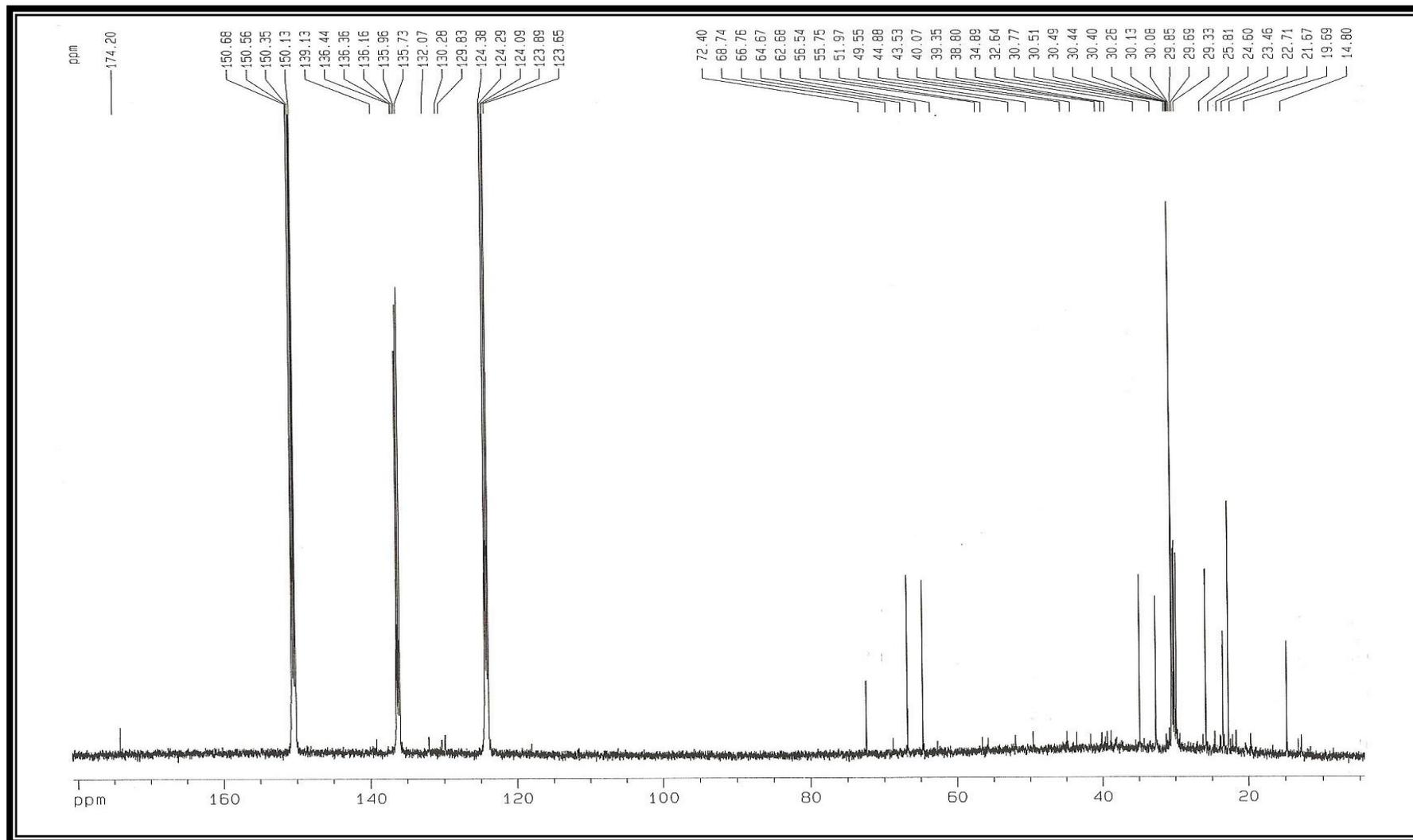


Figura 17- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 2 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

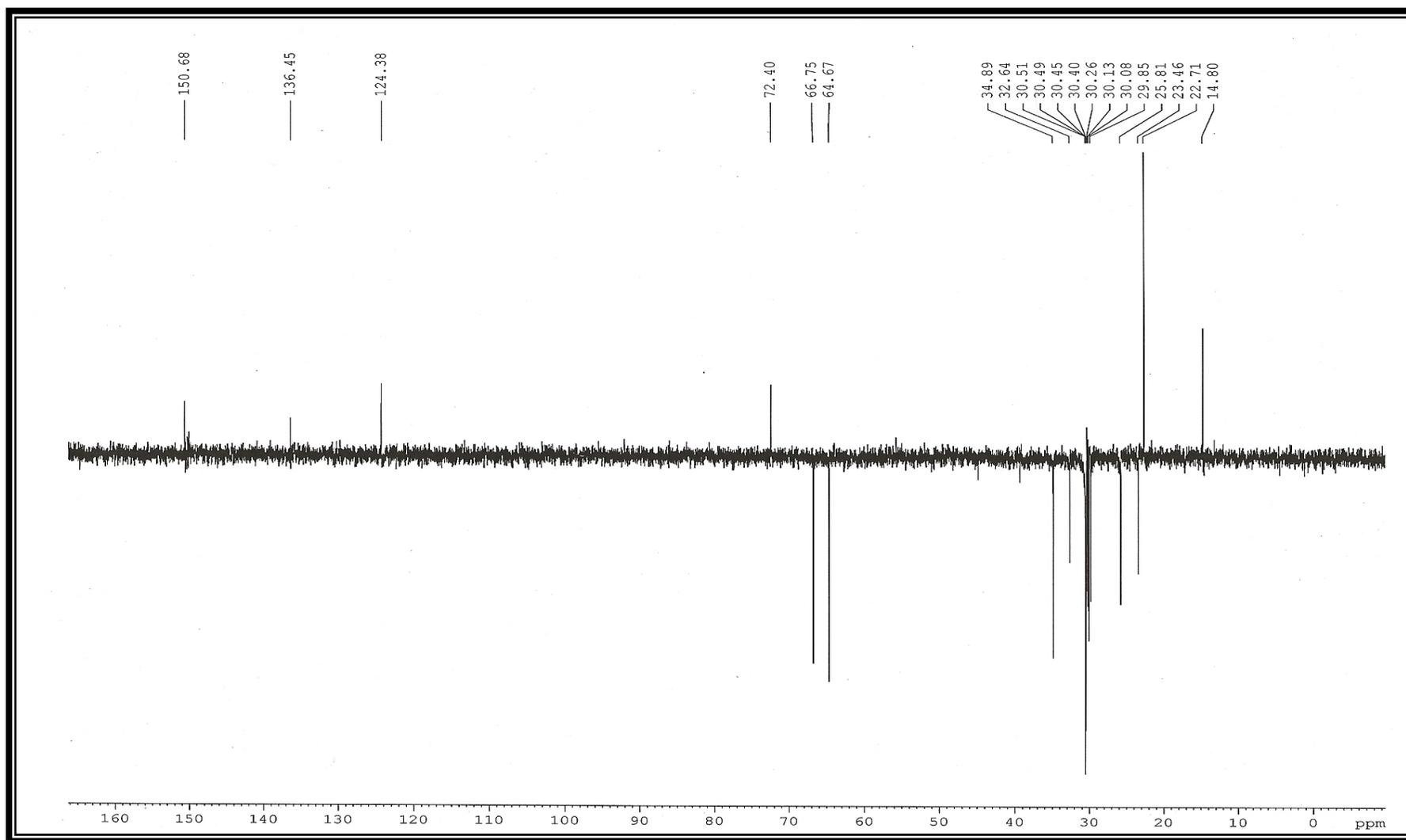


Figura 18- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 2 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

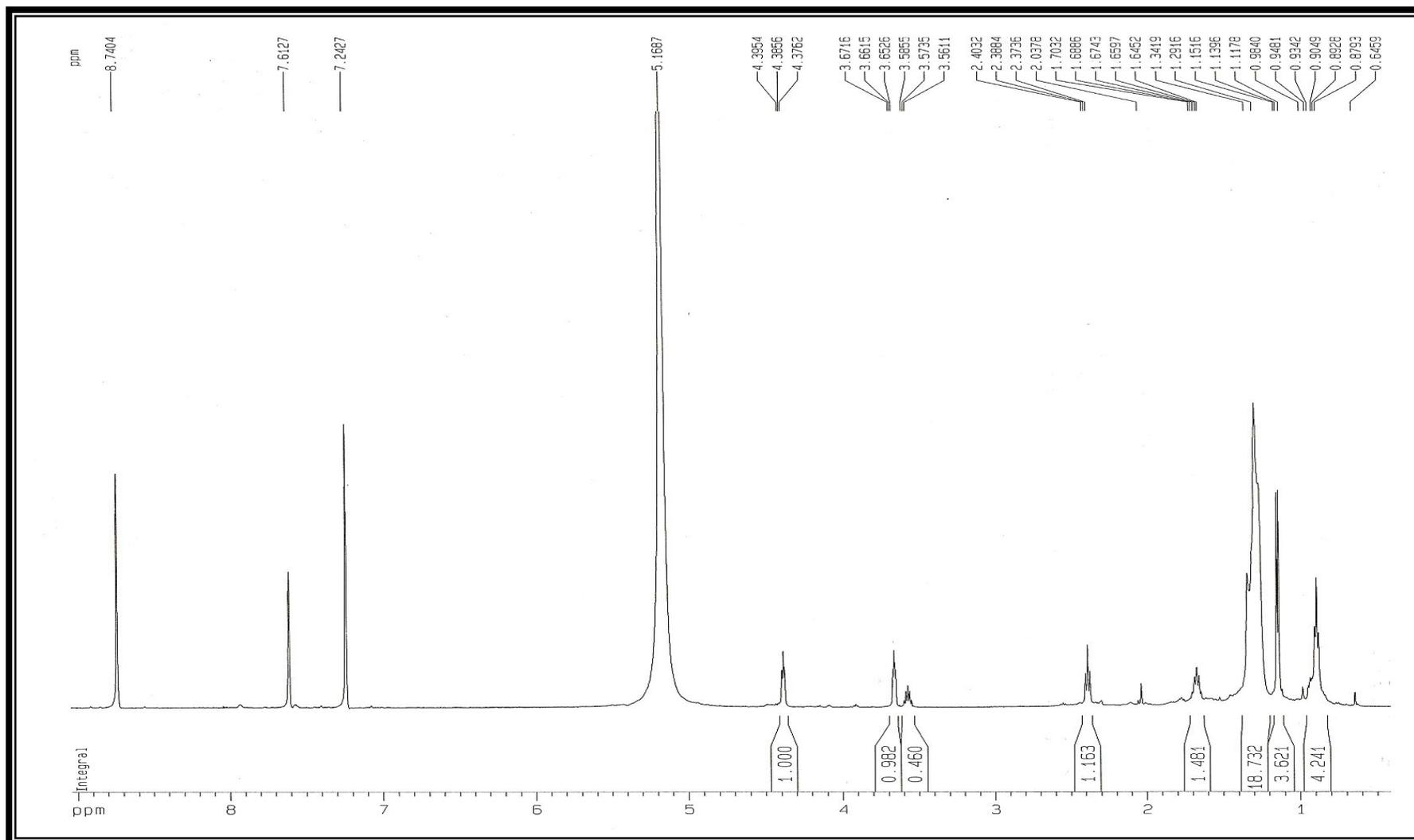


Figura 19- Espectro de RMN ¹H de LOS 2 (500 MHz, C₅D₅N)

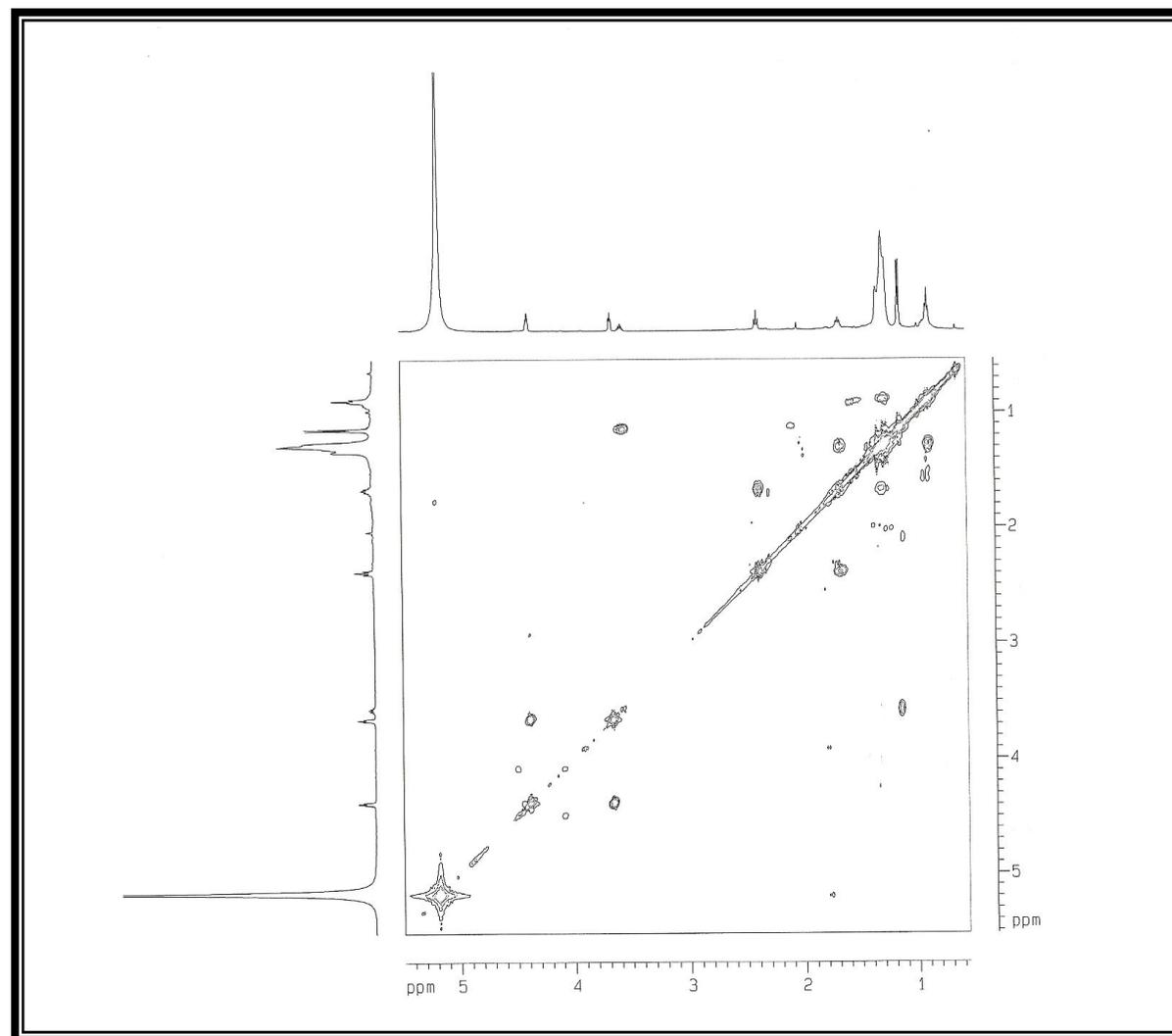


Figura 20- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 2 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

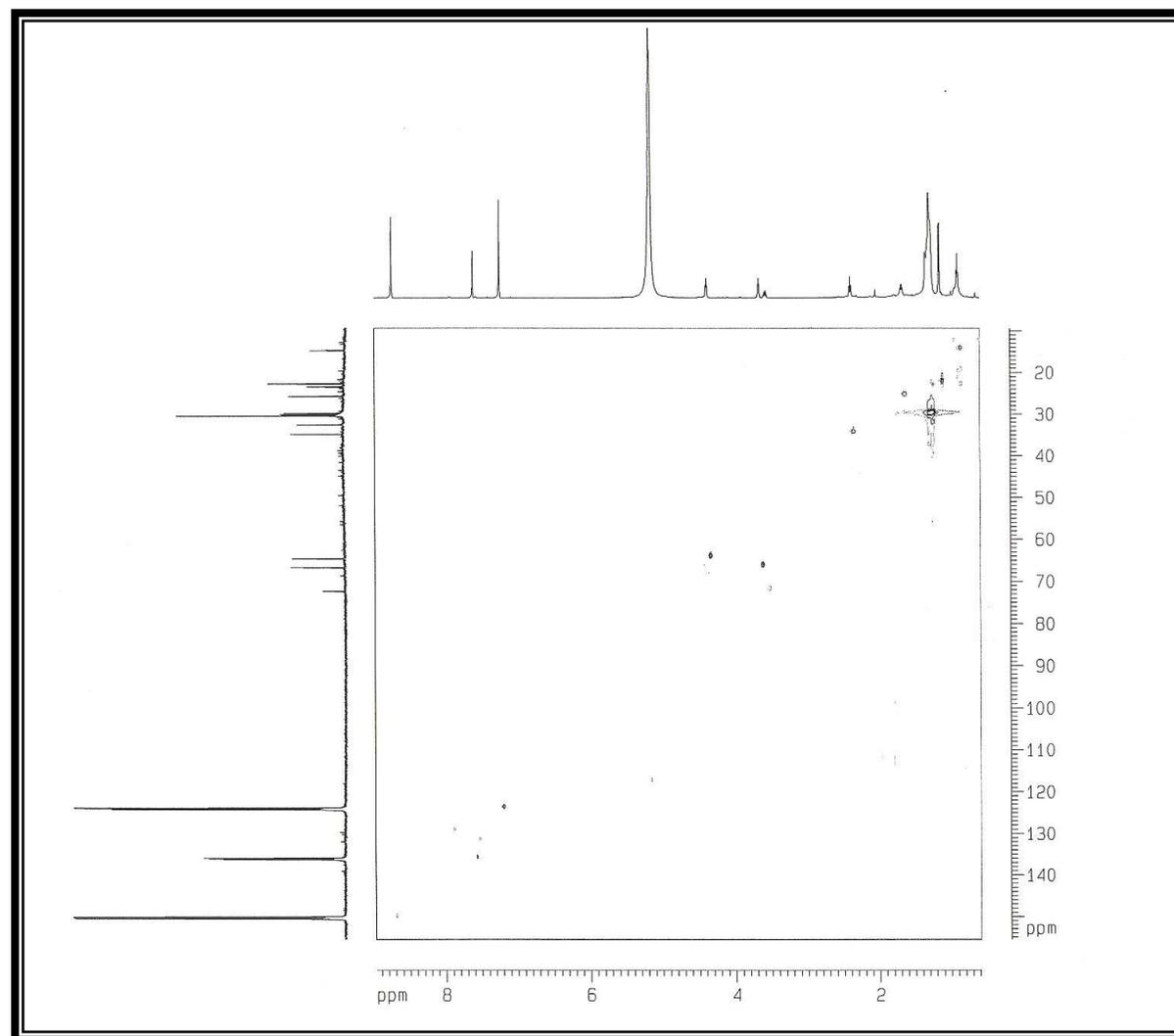


Figura 21- Espectro HMQC de LOS 2 (500 e 125 MHz, C₅D₅N)

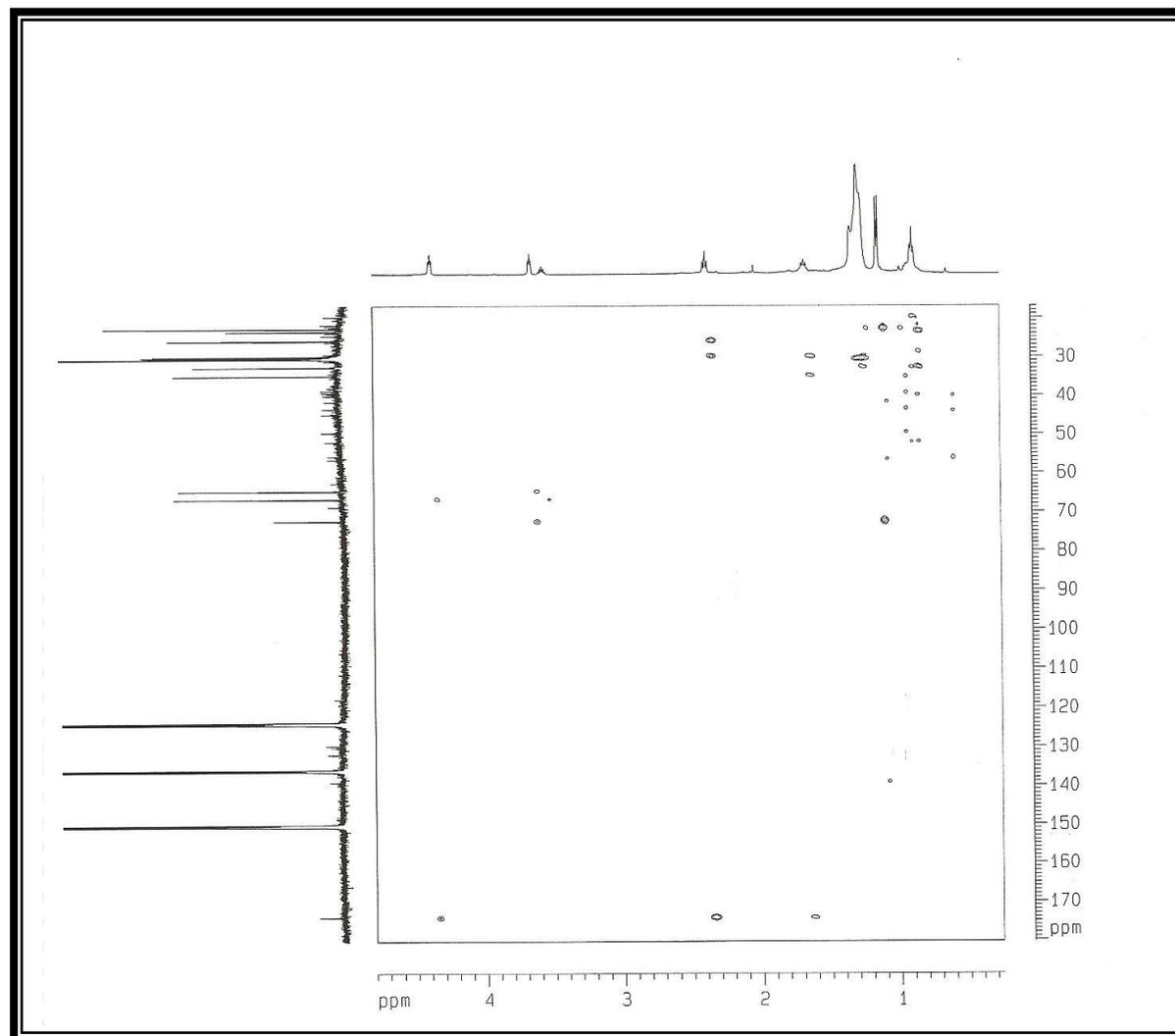


Figura 22- Espectro HMBC de LOS 2 (500 e 125 MHz, C₅D₅N)

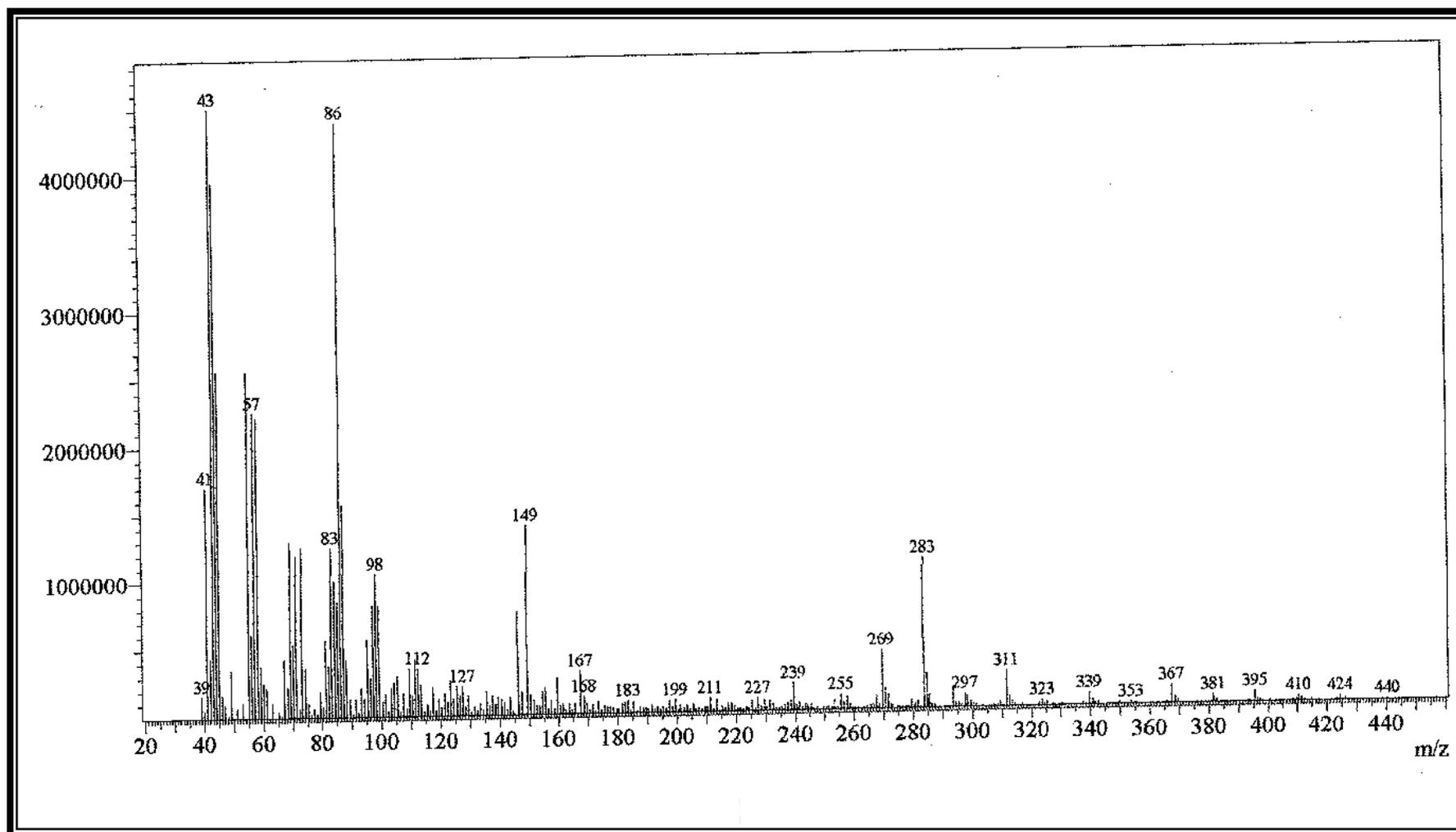


Figura 23- Espectro de massa de LOS 2

3.4 LOS 8 (8 e 9)

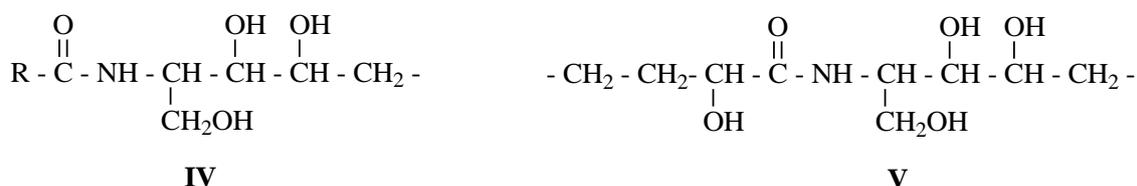
A fração acetato de etila do extrato etanólico das cascas do fruto de *Luffa operculata* (LOEECA-Ac) após cromatografia em coluna em gel de sílica, permitiu o isolamento de um sólido amorfo branco, solúvel em piridina e com ponto de fusão 136,8 – 137,3 °C, denominado LOS 8.

O espectro de absorção na região do IV (Figura 24, p. 114) de LOS 8, registrou bandas em 3.336 e 3.218 (médias), 2.918 e 2.849 (fortes), 1.621 (média) e 1.070/1.025 cm⁻¹ (fracas) relacionadas com deformação axial (ν_{\max}) de grupos OH/NH, CH/CH₂/CH₃, C = O e C – O/C – N, respectivamente, além, de bandas em 1.544, 1.466 e 750 cm⁻¹ correspondentes à deformação angular (δ_{\max}) de grupos NH, CH₂/CH₃ e CH₂, respectivamente.

O espectro de RMN ¹³C CPD (Figura 25, p. 115) apresentou uma série de sinais compreendidos entre δ_C 14,55 e 53,42 referentes a átomos de carbono não funcionalizados, revelando o caráter alifático de LOS 8. No espectro de RMN ¹³C DEPT 135° (Figura 26, p. 116), os sinais invertidos entre δ_C 23,33 e 36,29, com destaque para a alta intensidade do sinal em δ_C 29,95, indicou a presença de cadeia carbônica longa constituída de elevado número de grupos metilênicos. A comparação entre os espectros de RMN ¹³C CPD e DEPT, identificou, também, seis carbonos metínicos, sendo, um em δ_C 53,33, três carbinólicos (δ_C 72,75, 73,26 e 77,32) e dois olefínicos (δ_C 131,04 e 131,16). Foram identificados ainda os sinais em δ_C 14,55 e 62,38 devidos a carbonos metílico e metilênico oxigenado, respectivamente, além do sinal em δ_C 175,64, indicativo de carbono carbonílico de função éster ou amida.

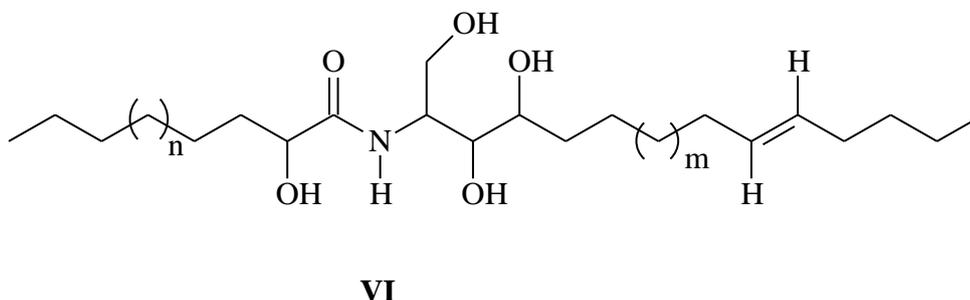
No espectro de RMN ¹H (Figura 27, p. 117) foi observado um sinal em δ_H 8,61 (d, 1H), deslocamento químico compatível com um hidrogênio de amida secundária ligada a um carbono metínico (RCONHR') e em acordo com os espectros IV ($\nu_{C=O}$ 1.621 cm⁻¹) e RMN ¹³C (δ_C 175,64). No espectro de RMN ¹H x ¹H COSY (Figura 28, p. 118), o hidrogênio com ressonância em δ_H 8,61 acoplou com o hidrogênio metínico em δ_H 5,13 (δ_C 53,33), que, por sua vez, acoplou com o hidrogênio metínico carbinólico em δ_H 4,38 (δ_C 77,32) e com os hidrogênios metilênicos em δ_H 4,45 e 4,53 (δ_C 62,38; CH₂ – O). O espectro HMQC (¹J_{CH}) (Figura 29, p. 119), além das correlações de hidrogênios e carbonos mencionadas, tornou possível também correlacionar os outros dois hidrogênios metínicos carbinólicos em δ_H 4,32 e 4,64 aos carbonos com deslocamentos químicos em δ_C 73,26 e 72,75, respectivamente. Em adição, no espectro HMBC (^{2,3}J_{CH}) (Figura 30, p. 120), o hidrogênio em δ_H 4,38 além de conectividade com os carbonos em δ_C 53,42 e 62,36, mostrou conectividade com o carbono carbinólico em δ_C 73,26, como também, com o carbono metilênico em δ_C 34,55. Em conjunto,

essas observações, tendo como base a função amida RCONHR', permitiram definir, em parte, o substituinte R' levando a uma estrutura parcial (IV)



Por outro lado, também no espectro HMBC (Figura 30, p. 120), o sinal do hidrogênio carbinólico em δ_{H} 4,64 (δ_{C} 72,75) exibiu correlação com o sinal do carbono carbonílico e com os sinais dos carbonos metilênicos em δ_{C} 36,17 e 26,19, situação condizente com a localização de um grupo hidroxila no carbono *alfa* à carbonila. Assim, os deslocamentos químicos δ_{C} 36,17 e 26,19 foram atribuídos aos carbonos *beta* e *gamma* e permitiram expandir (IV \rightarrow V) a estrutura parcial, definindo, em parte, o substituinte R.

Tendo em vista a análise acima, e a comparação com dados espectroscópicos [IV, RMN (^1H e ^{13}C) e EM] da literatura (SU *et al.*, 2002; OUESLATI *et al.*, 2005; VERAS, 2006, MAIA *et al.*, 2010) e os picos registrados no espectro de massa de alta resolução (Figura 31, p. 121) de LOS 8, foi proposta as estruturas de uma mistura de ceramidas com estrutura geral VI.

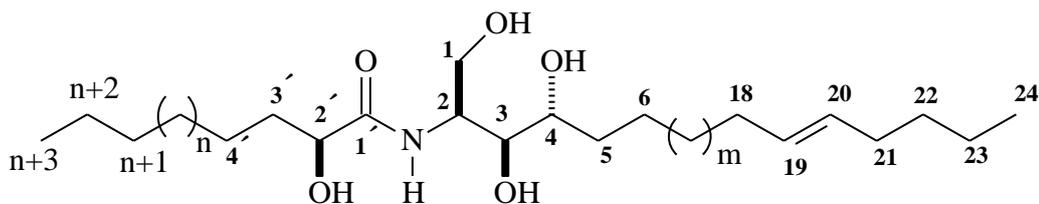


Outros picos no espectro de massa (Figura 32, p. 122) correspondentes aos fragmentos em m/z 97 ($^+\text{CH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 57 ($^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) e 43 ($^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) foram compatíveis com a localização da ligação dupla entre os átomos de carbono C-19 e C-20. A estereoquímica com configuração *E* foi estabelecida com base nos deslocamentos químicos dos carbonos metilênicos adjacentes aos carbonos olefínicos no espectro RMN ^{13}C , para os quais, são observados deslocamentos químicos em $\delta_{\text{C}} \approx 27,0$ nos isômeros *Z* e $\delta_{\text{C}} \approx 32,0$ nos isômeros *E* (ROSSI; VERACINI, 1982; CATENI *et al.*, 2003;

OUESLATI *et al.*, 2005). Em LOS 8, os citados carbonos mostraram ressonância em δ_C 33,31 e 34,23, ou seja, em concordância com estereoquímica *E*.

Após a comparação com compostos análogos (OUESLATI *et al.*, 2005; VERAS, 2006, RAMOS *et al.*, 2006; SANDJO *et al.*, 2008; CHEISTOPHE *et al.*, 2008; MAIA *et al.*, 2010) a estereoquímica relativa para os estereocentros 2, 3, 4 e 2' foi supostamente S*, S*, R* e R*, respectivamente. Com base dos dados acima mencionados, as estruturas de compostos **8** e **9** foram estabelecidos como rel-(2S, 3S, 4R, 19E) -2 - [(2'R) -2'-hidroxidocosanoilamino]-tetracosadec-19-eno-1,3,4-triol (**8**) e rel-(2S, 3S, 4R, 19E) -2 - [(2'R) -2'-hidroxihenicosanoilamino]-tetracosadec-19-eno-1,3,4-triol (**9**).

Esses dados corroboram as estruturas propostas para as ceramidas **8** e **9**:



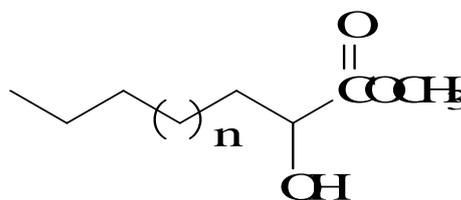
(**8**) [M-H]⁻ 736.5277 n = 15 m = 11

(**9**) [M-H]⁻ 722.3396 n = 14 m = 11

As estruturas das cadeias acila foram confirmadas pela análise da mistura de produtos (**10** e **11**), resultante da metanólise de **8** e **9**. O espectro de massa obtido através do sistema CG-MS (Figura 33, p. 123) de **10** e **11** foi de acordo com as estruturas de **8** e **9**, mostrando a presença de dois constituintes, os quais foram identificados como metil-2-hidroxidocosanoato (m/z 370 [M⁺]) metil-2-hidroxihenicosanoato e (m/z 356 [M⁺]).

(**10**) M⁺ 370 n = 16

(**11**) M⁺ 356 n = 15



Diversas outras correlações extraídas dos espectros bi-dimensionais relacionadas na Tabela 5, p. 112, corroboram as estruturas propostas para **8** e **9**.

Tabela 5- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ de **8** e **9**. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.

	HMQC		HMBC
1'	175,64	-	NH-1'
CH			
2	53,42	5,13 (m)	NH-1'; H-1; H-3
3	77,32	4,38 (m)	H-1; H-2; H-5
4	73,26	4,32 (m)	H-3; H-5
19	131,16	5,53 (m)	-
20	131,04	5,53 (m)	-
2'	72,75	4,64 (m)	-
CH₂			
1	62,36	4,45; 4,53 (m)	H-2; H-3
5	34,55	1,95; 2,30 (m)	H-3
6	27,00	1,71; 1,80 (m)	H-5
7-17	30,25-30,53	1,27-1,33 (m)	-
18	33,31	2,05	H-19; H-20
21	34,23	2,00; 2,30 (m)	-
22	32,43	1,27-1,33 (m)	-
23	23,28	1,27-1,33 (m)	H-24
3'	36,17	2,05; 2,25	H-2'
4'	26,19	1,71; 1,80	H-2'
5'-n	30,25-30,53	1,27-1,33 (m)	-
n+1	32,43	1,27-1,33 (m)	-
n+2	23,28	1,27-1,33 (m)	-
CH₃			
n+3	14,55	0,89 (t, 6,4)	-
24	14,55	0,89 (t, 6,4)	-
1'	17,64	-	NH-1'

Tabela 6- Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ de **8** e **9** com dados descritos na literatura em $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ (SU *et al.*, 2002; VERAS, 2006)

Carbonos	8 e 9 (δ_{C})	8 e 9 (δ_{H})	Ceramida (VERAS, 2006) (δ_{C})	Ceramida (VERAS, 2006) (δ_{H})
1	62,36	4,53 (m)/4,45 (m)	63,10	4,52(m)/4,45 (m)
2	53,42	5,13 (m)	54,04	5,13 (m)
3	77,32	4,38 (m)	77,92	4,37 (m)
4	73,26	4,32 (m)	74,08	4,29 (m)
5	34,55	2,30/1,95 (m)	34,89/35,21	2,27/1,95 (m)
6	27,00	1,80/1,71 (m)	26,87	1,80/1,73
7-17	30,25-30,53	1,32-1,27 (m)	31,40-30,57	1,36-1,26 (m)
18	33,31	2,10 (m)	34,03	2,17
19	131,16	5,53 (m)	131,87	5,53 (m)
20	131,04	5,53 (m)	131,75	5,53 (m)
21	34,23	2,30/2,00 (m)	34,34	2,01 (m)
22	32,43	1,32-1,27 (m)	33,18	1,36-1,26 (m)
23	23,28	1,32-1,27 (m)	23,98	1,36-1,26 (m)
24	14,55	0,89 (t, 6,4)	15,32	0,89 (t, 6,2)
1'	175,64	-	176,11	-
2'	72,75	4,64 (m)	73,54	4,63 (m)
3'	36,17	2,25/2,05	36,67	2,23/2,03
4'	26,19	1,71-1,80	27,70	1,80-1,73
5'-n	30,25-30,53	1,32-1,27 (m)	31,40-30-57	1,36-1,26 (m)
n+1	32,43	1,32-1,27 (m)	33,18	1,36-1,26 (m)
n+2	23,28	1,32-1,27 (m)	23,98	1,36-1,26 (m)
n+3	14,55	0,89 (t, 6,4)	15,32	0,89 (t, 6,2)
HN-1'	-	8,64 (d, 8,9)	-	8,58 (d, 8,9)
HO-1	-	-	-	6,72 (sl)
HO-3	-	-	-	6,72 (sl)
HO-4	-	-	-	6,26 (sl)
HO-2'	-	-	-	7,63 (sl)

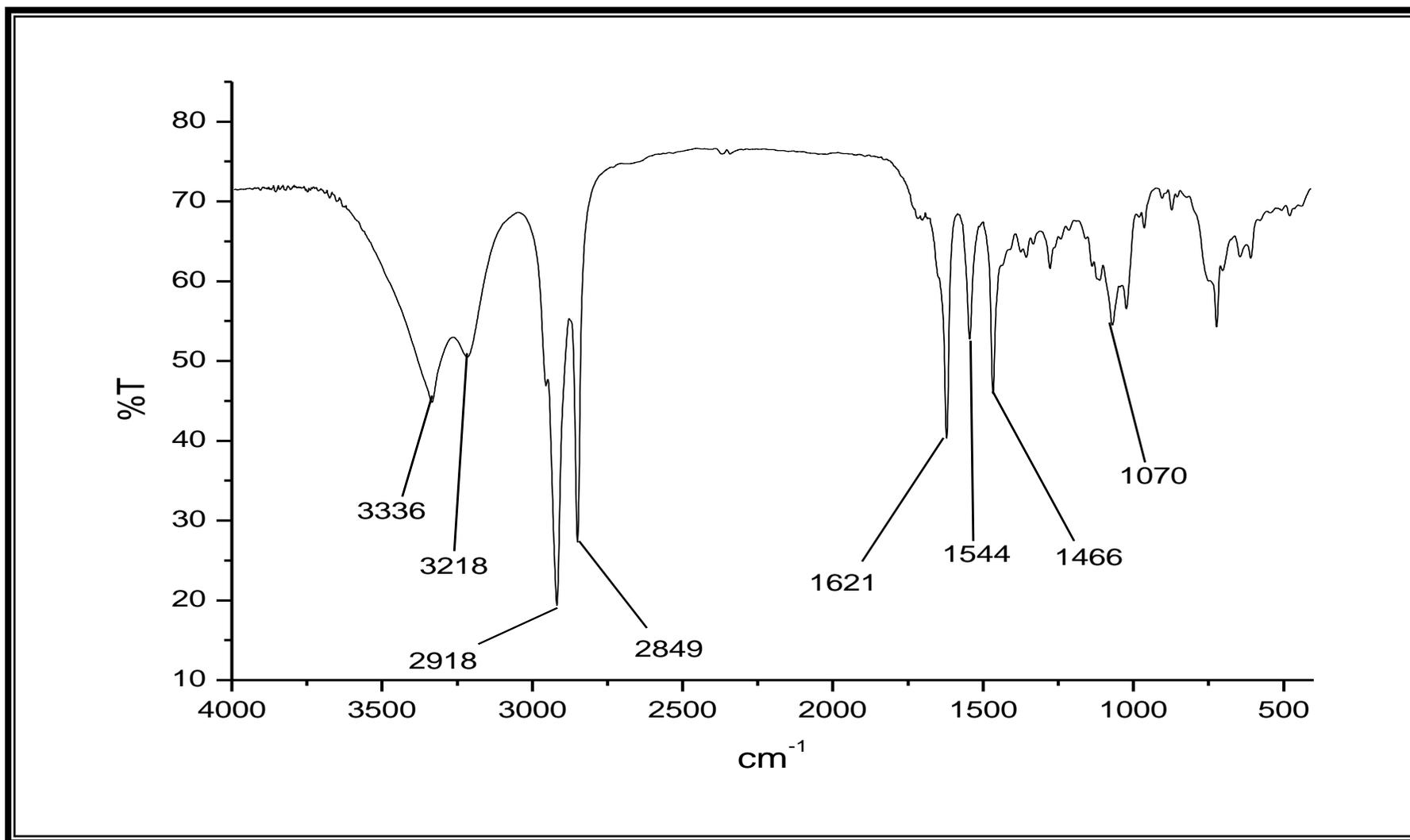


Figura 24- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 8

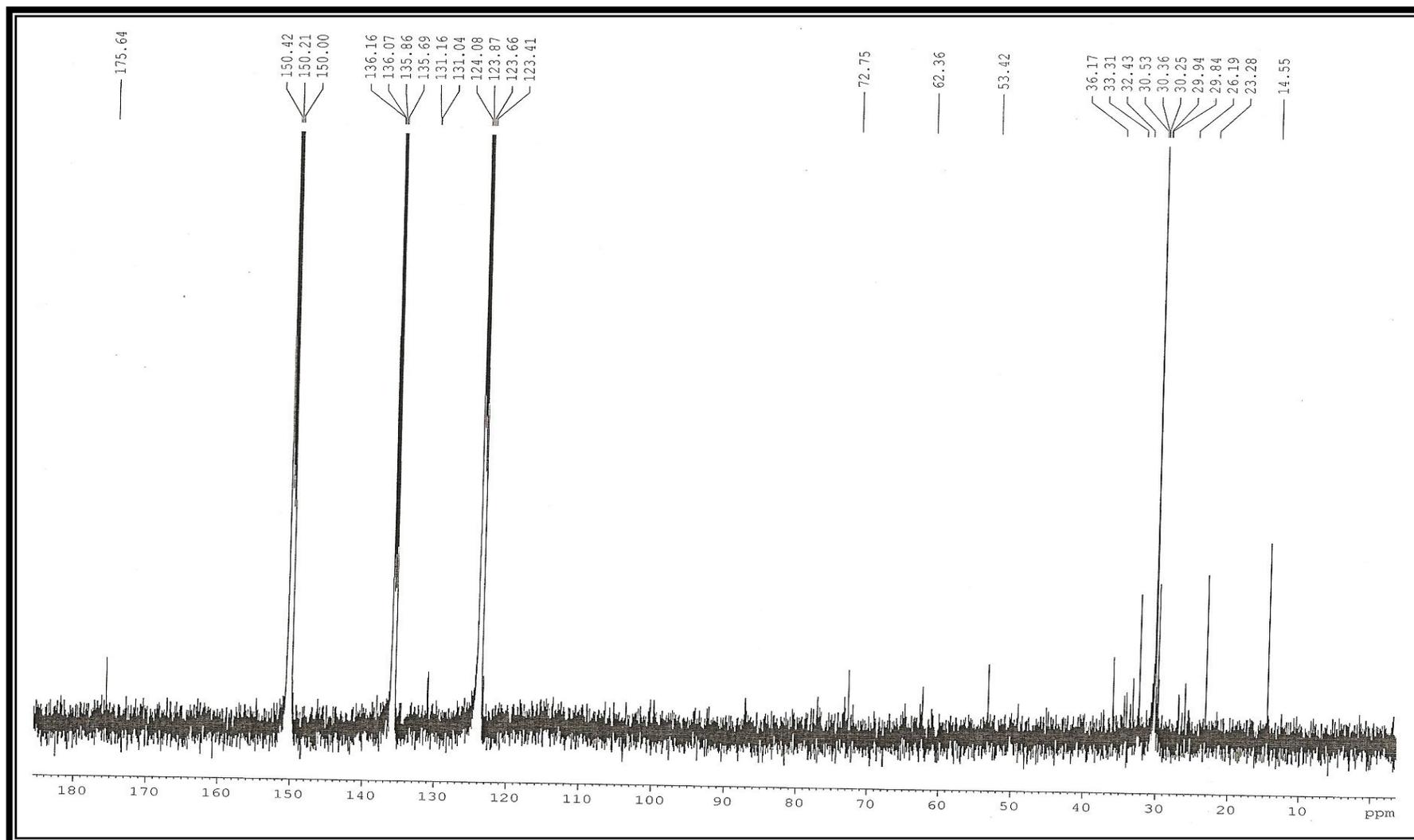


Figura 25- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 8 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

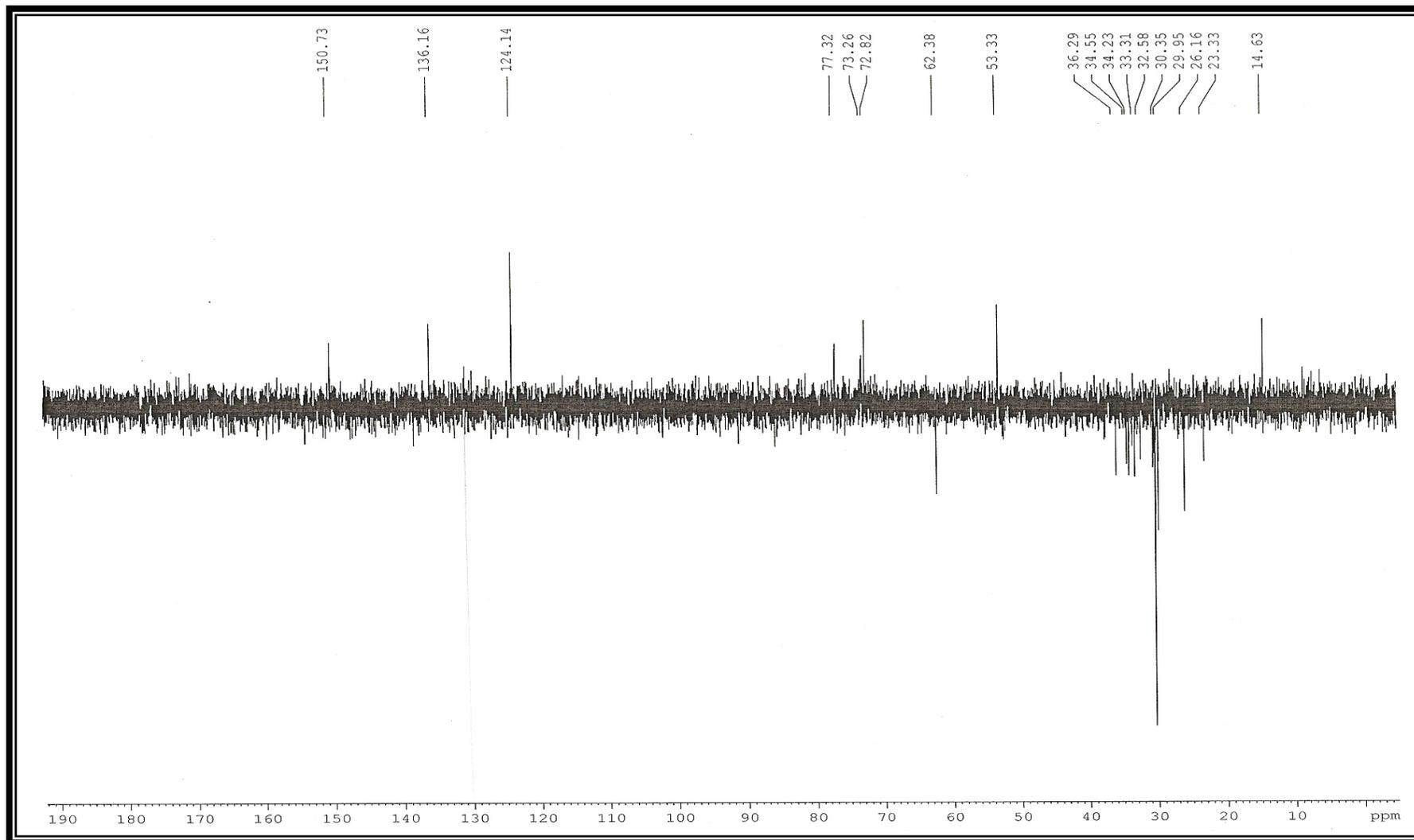


Figura 26- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 8 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

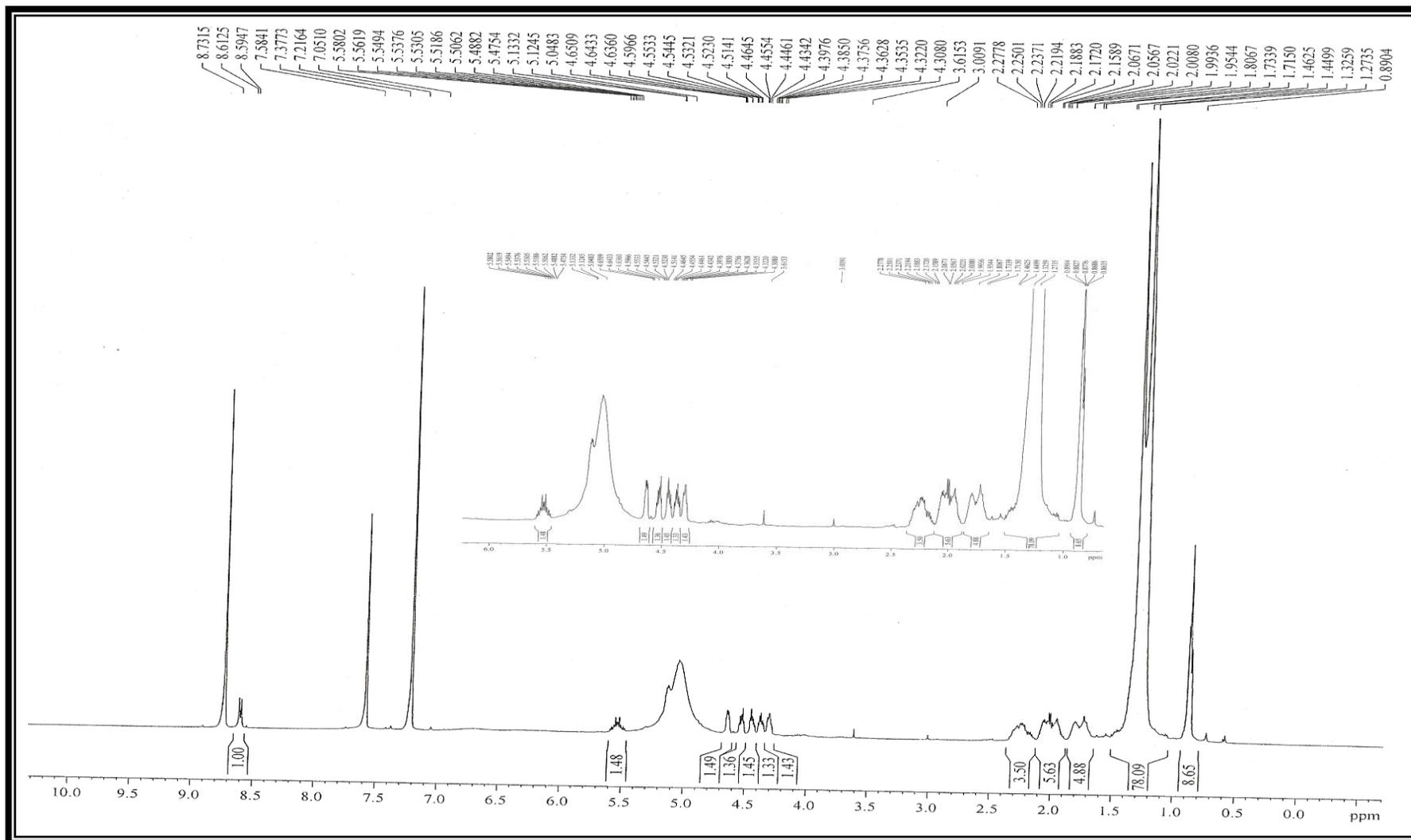


Figura 27- Espectro de RMN ¹H de LOS 8 (500 MHz, C₅D₅N)

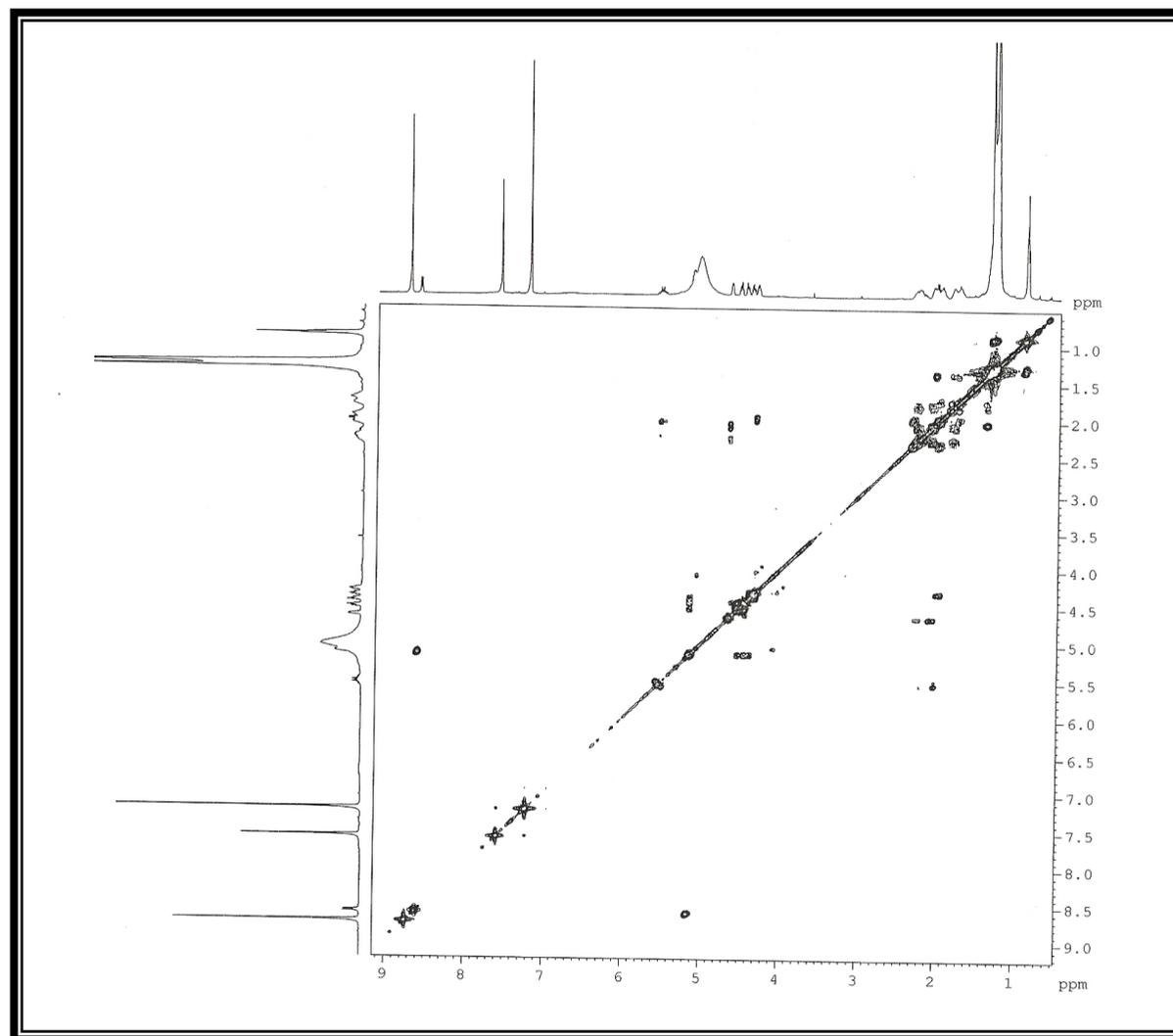


Figura 28- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 8 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

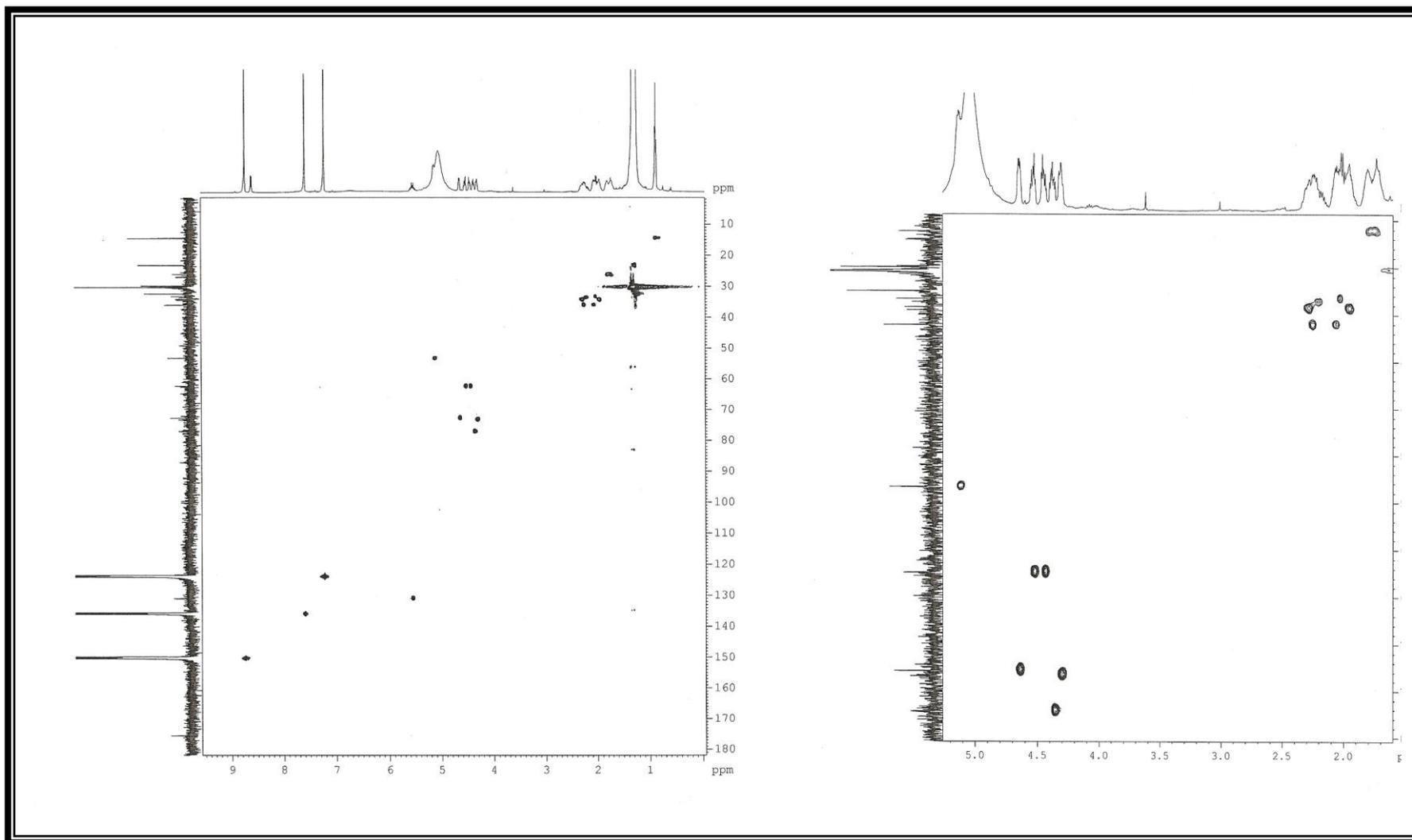


Figura 29- Espectro HMQC de LOS 8 (500 e 125 MHz, C₅D₅N)

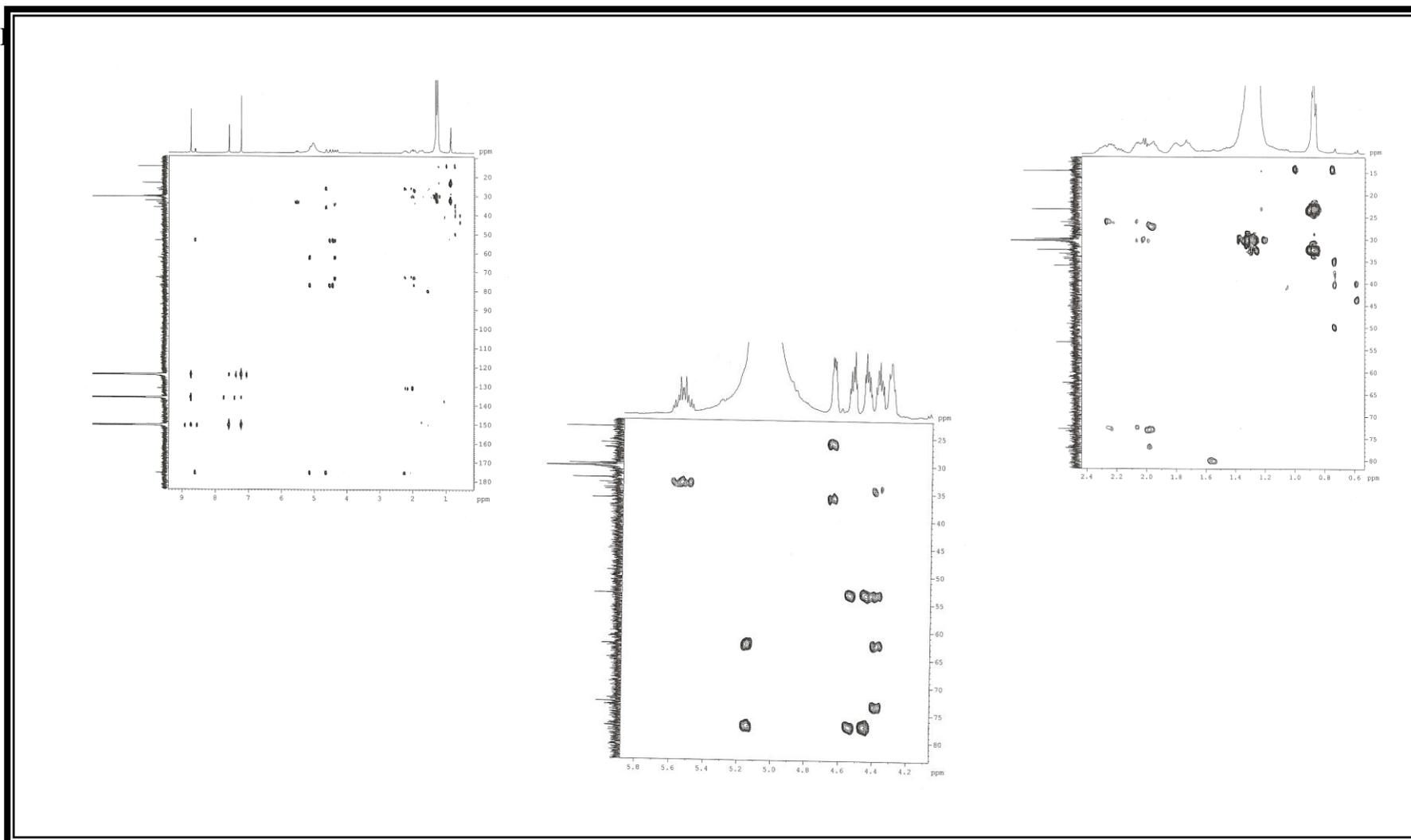


Figura 30- Espectro HMBC de LOS 8 (500 e 125 MHz, C₅D₅N)

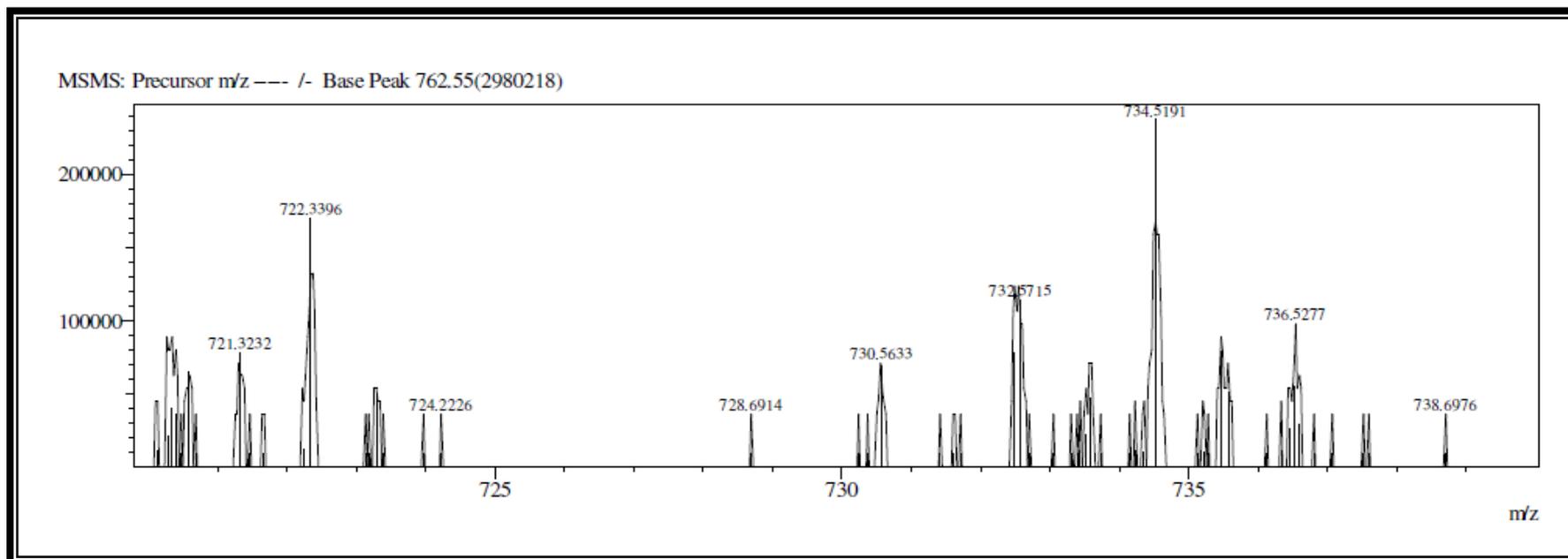


Figura 31- Espectro de massa em alta resolução de LOS 8

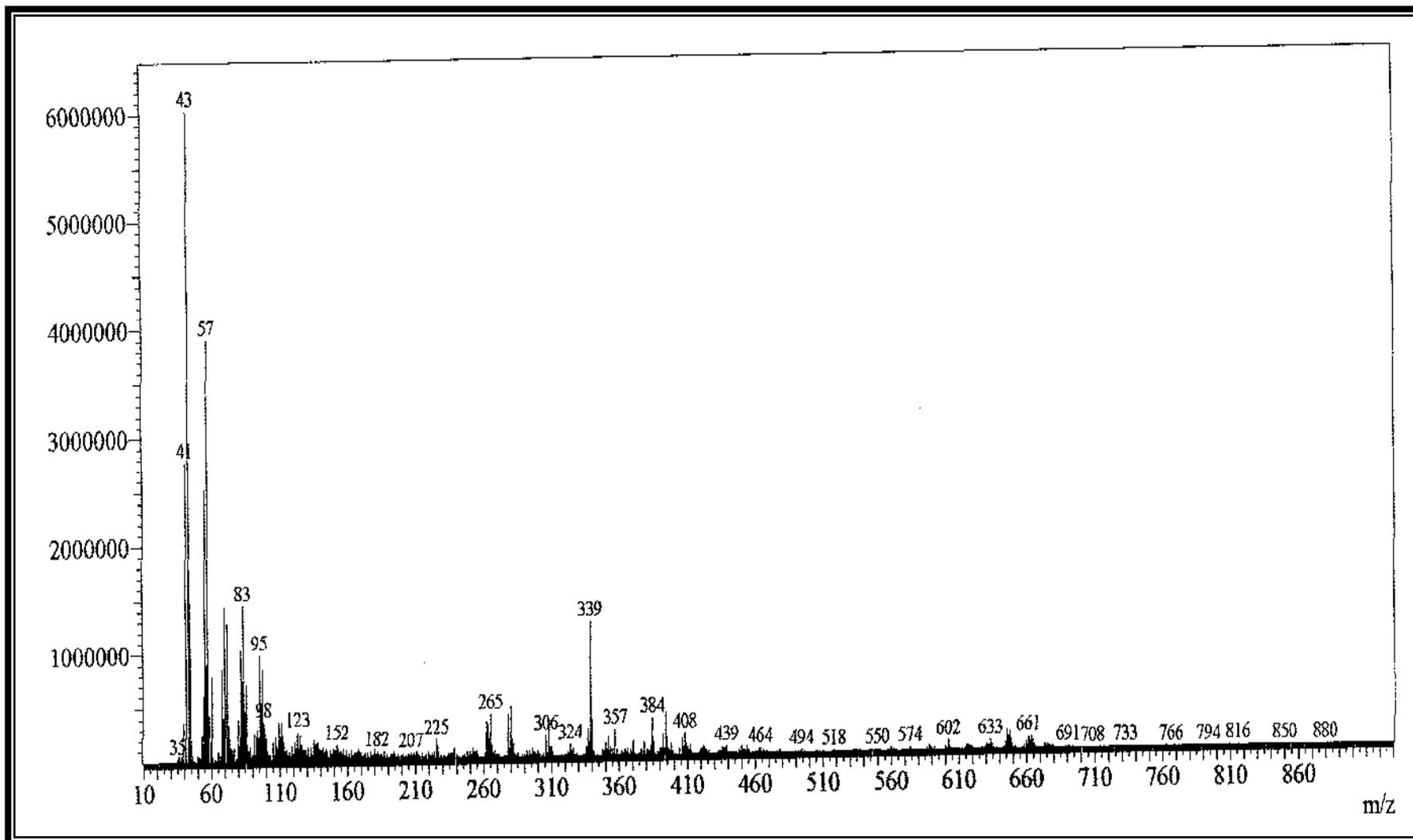


Figura 32- Espectro de massa de LOS 8

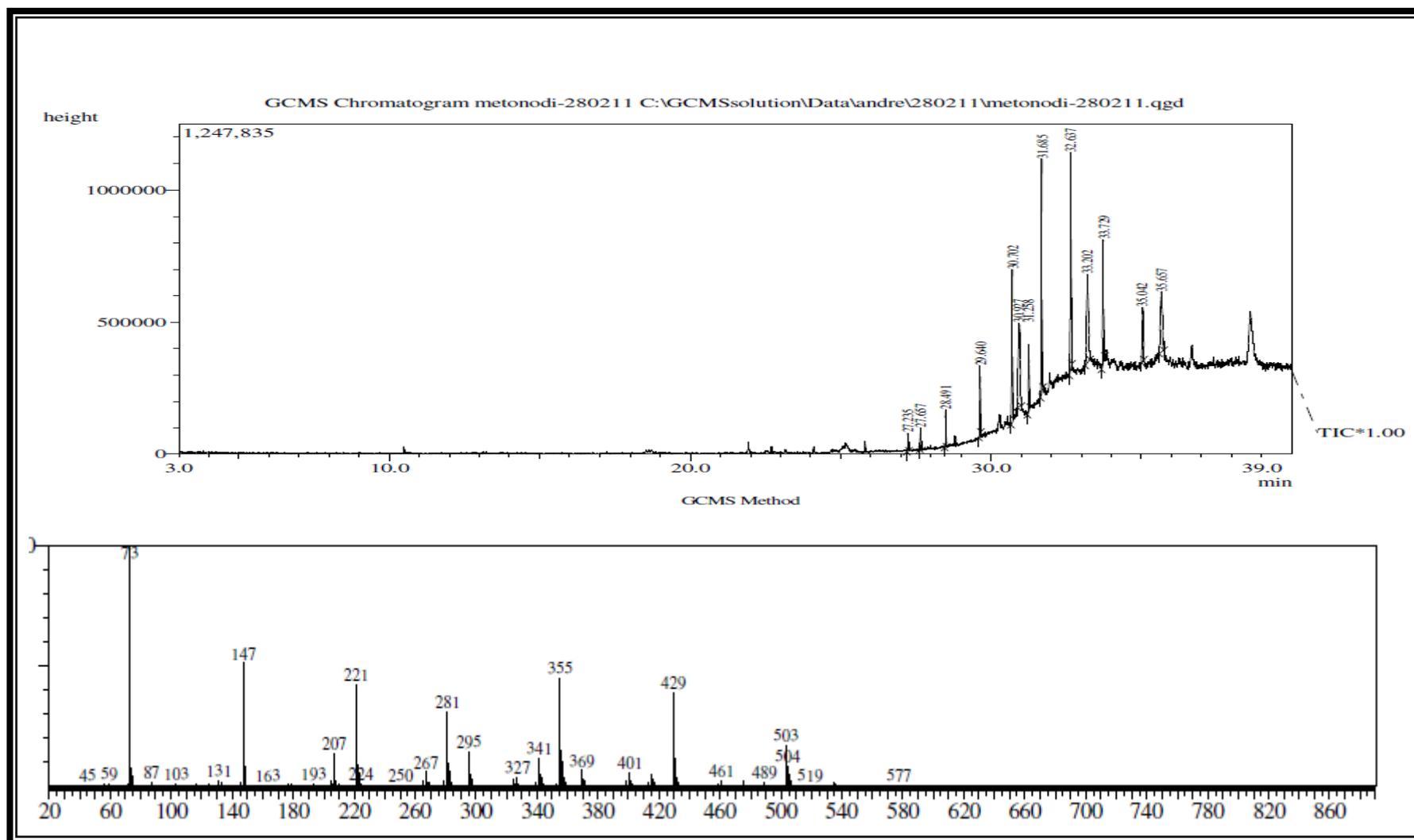
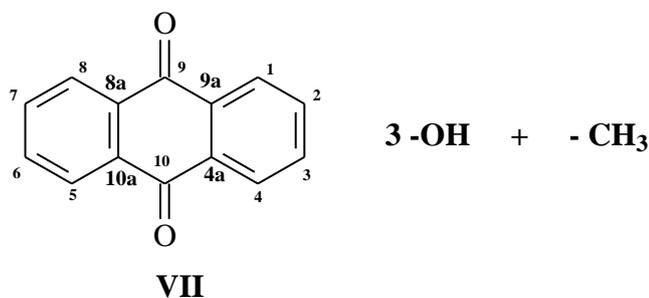


Figura 33- Cromatograma CG-MS dos produtos da metanólise de LOS 8

3.5 LOS 5 (12)

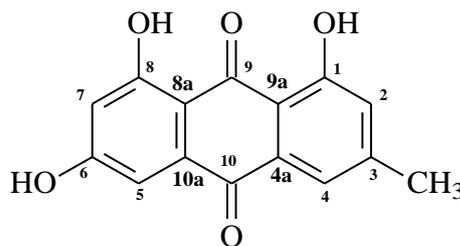
O extrato etanólico dos talos de *Luffa operculata* (LOEET-C) após sucessivas colunas cromatográficas em gel de sílica forneceu LOS 5 como sólido cristalino alaranjado, solúvel em acetona e com ponto de fusão 247,5 – 248,5 °C.

Os espectros de RMN ^{13}C [CPD (Figura 34, p. 127) e DEPT 135° (Figura 35, p. 128)] em combinação com os espectros de RMN obtidos de detecção inversa [HMQC (Figura 36, p.129) e HMBC (Figura 37, p. 130)] indicaram um total de 15 átomos de carbono e um total de 7 hidrogênio ligados a carbonos. Os tipos de carbono exibidos pelos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° foram: um carbono metílico (δ_{C} 22,13), quatro carbonos metínicos (δ_{C} 124,73, 121,05, 109,81 e 108,56) e dez não hidrogenados, sendo, dois carbonílicos (δ_{C} 190,01 e 182,13), três oxigenados (δ_{C} 166,84, 165,15 e 162,01), e cinco não oxigenados (δ_{C} 148,74, 135,70, 133,47, 114,04 e 109,27). Esses assinalamentos foram consistentes com a fórmula molecular empírica $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, que encerra a existência de três grupos hidroxila e índice 11 de deficiência de hidrogênio (IDH). A ocorrência de sinais para doze carbonos insaturados (três oxigenados), juntamente, com a presença de sinais para dois carbonos carbonílicos em δ_{C} 190,01 e 182,13 no espectro de RMN ^{13}C , surgiram para LOS 5 a estrutura de uma antraquinona (**VII**) sustentando três grupos hidroxila e um grupo metila.



No espectro de absorção na região do IV (Figura 38, p. 131) foram registradas uma forte banda em 3.417 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$) devido a grupos hidroxila e bandas em 1.692 e 1.625 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) de grupos carbonila, em acordo com o espectro de RMN ^{13}C (δ_{C} 190,01 e 182,13).

O espectro de RMN ^1H (Figura 39, p. 132) de LOS 5, mostrou sinais simples em δ_{H} 12,16 e 12,05 atribuídos a hidrogênios de hidroxilas fenólicas queladas, sinal de hidrogênios metílico em δ_{H} 2,41 (s, 3H), um par de dubletos referentes a hidrogênios *meta* acoplados em δ_{H} 7,48 (d, 1H, $J=2,3$ Hz) e 7,09 (d, 1H, $J=2,3$ Hz), além, de outro par de dubletos de hidrogênios *meta* acoplados em δ_{H} 6,56 (d, 1H, $J=0,5$ Hz) e 7,15 (d, 1H, $J=2,3$ Hz). Esses dados indicaram com alternativa para LOS 5 a estrutura abaixo:



(12)

Os acoplamentos citados acima, entre os sinais em δ_H 7,48 e 7,09, atribuídos respectivamente, aos hidrogênios H-4 e H-2, foram confirmados através do espectro bidimensional de correlação hidrogênio e hidrogênio ($^1H \times ^1H$ COSY, Figuras 40 e 41, p. 133 e 134) o qual, mostrou também fracas correlações dos sinais desses hidrogênios com o sinal dos hidrogênios metílico em δ_H 2,41 (CH₃-3). Em adição, no espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 através de duas e três ligações ($^{2,3}J_{CH}$ $^1H \times ^{13}C$ HMBC) (Figura 37, p. 130) os hidrogênios com maiores deslocamentos químicos [δ_H 7,48 (H-4) e 7,15 (H-5)] exibiram acoplamento ($^3J_{CH}$) com o carbono carbonílico em δ_C 182,13 (C-10) e acoplamento ($^4J_{CH}$) com o carbono carbonílico em δ_C 190,60 (C-9).

Assim, os dados extraídos dos espectros no IV, RMN 1H e RMN ^{13}C permitiram identificar LOS 5 como sendo a quinona 1,6,8-tri-hidroxi-3-metilantraquinona (12), conhecida comumente como Emodina, que apesar de já aparecer registrada na literatura (COHEN; TOWERS, 1995; BARBOSA, 1999) (Tabela 8, p. 126), seu isolamento a partir de *Luffa operculata* é descrito pela primeira vez, sendo portanto inédita para o gênero e a espécie. Em plantas superiores, encontram-se antraquinonas sobre tudo nas famílias Rubiaceae, Caesalpiniaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae, Liliaceae, Verbenaceae e Asphodelaceae. Nas Caesalpináceas as antraquinonas típicas são as do tipo emodina-crisofanol (SIMÕES *et al.*, 2004). Esse é um dos raros relatos de antraquinonas isoladas a partir de *Luffa*.

Vale ressaltar que alguns deslocamentos químicos de átomos de carbono relacionados para LOS 5 (C-2, C-4, C-4a e C-10a) (Tabela 8, p. 126) foram diferentes daqueles registrados na literatura. Porém, a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio de LOS 5, foram atribuídos com base nos espectros de RMN 2D.

Todas as atribuições de deslocamentos químicos, estabelecidas com base nos espectros de ressonância magnética nuclear bidimensional (RMN 2D) foram sumariados na Tabela 7, p. 126.

Tabela 7- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 de LOS 5. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.

HMQC		HMBC
C	δ_C	δ_H
1	165,15	-
3	148,74	-
4a	135,70	-
6	166,84	-
8	162,01	-
8a	109,27	-
9	190,01	-
9a	114,07	-
10	182,13	-
10a	133,47	-
CH		
2	121,05	7,09 (d, 2,3)
4	124,73	7,48 (d, 2,3)
5	109,81	7,15 (d, 2,3)
7	108,56	6,56 (d, 2,3)
CH₃		
3	22,13	2,41

Tabela 8- Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de LOS 5 com dados descritos na literatura em DMSO- d_6 (COHEN; TOWERS, 1995) e em CDCl_3 (BARBOSA, 1999).

Carbonos	LOS 5	Emodina (COHEN; TOWERS, 1995)	Emodina (BARBOSA, 1999)
1	165,15	161,3	
2	121,05	124,0	
3	148,74	148,1	
4	124,73	120,3	
4a	135,70	132,6	
5	109,81	108,7	
6	166,84	165,5	
7	108,56	107,8	
8	162,01	164,4	
8a	109,27	108,8	
9	190,01	189,5	190,8^a
9a	114,07	113,1	
10	182,13	181,1	182,0^a
10a	133,47	134,9	
CH ₃	22,13	21,5	

^a - Somente carbonilas foram utilizadas para comparação.

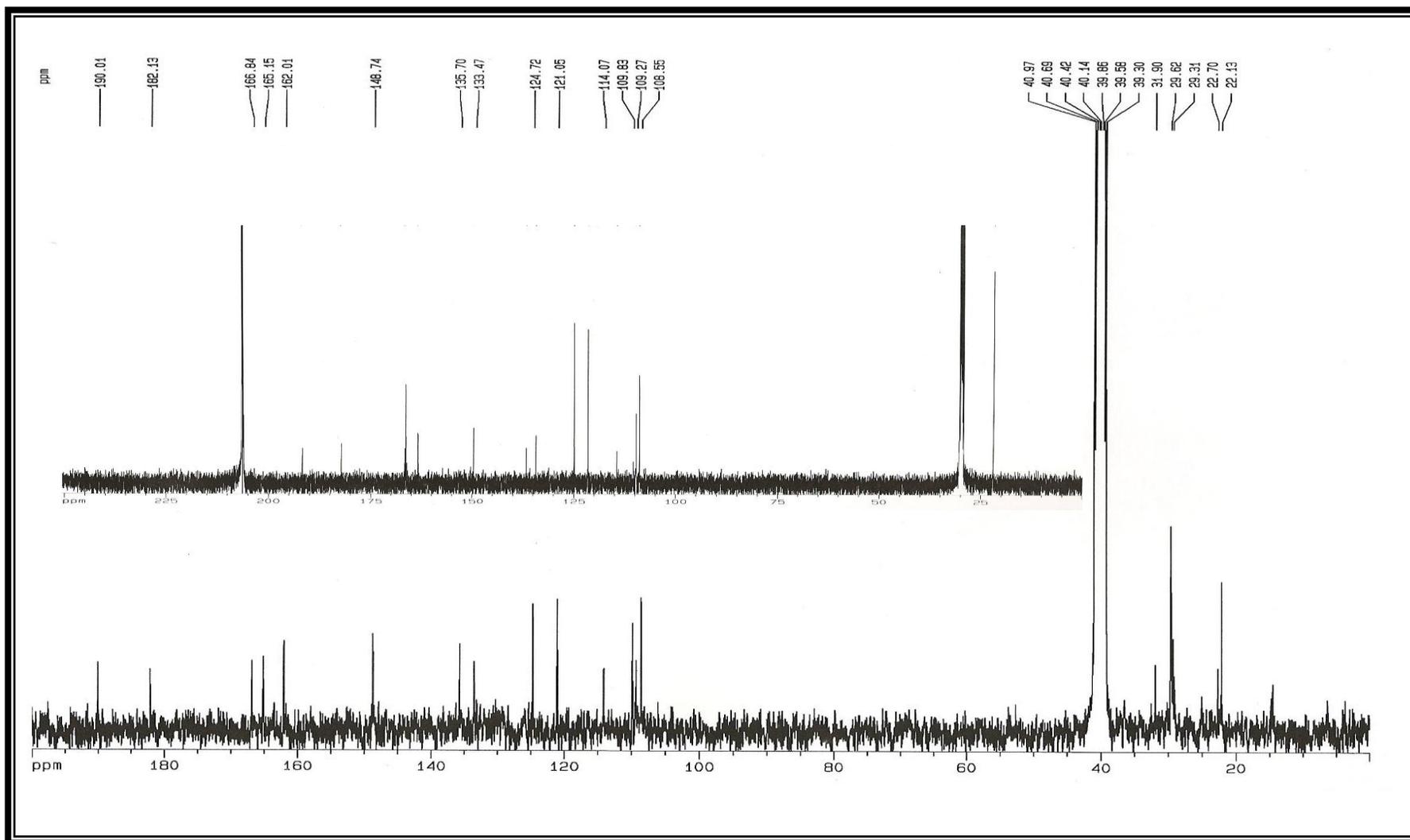


Figura 34- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 5 (125 MHz, Acetona- d_6 , DMSO- d_6)

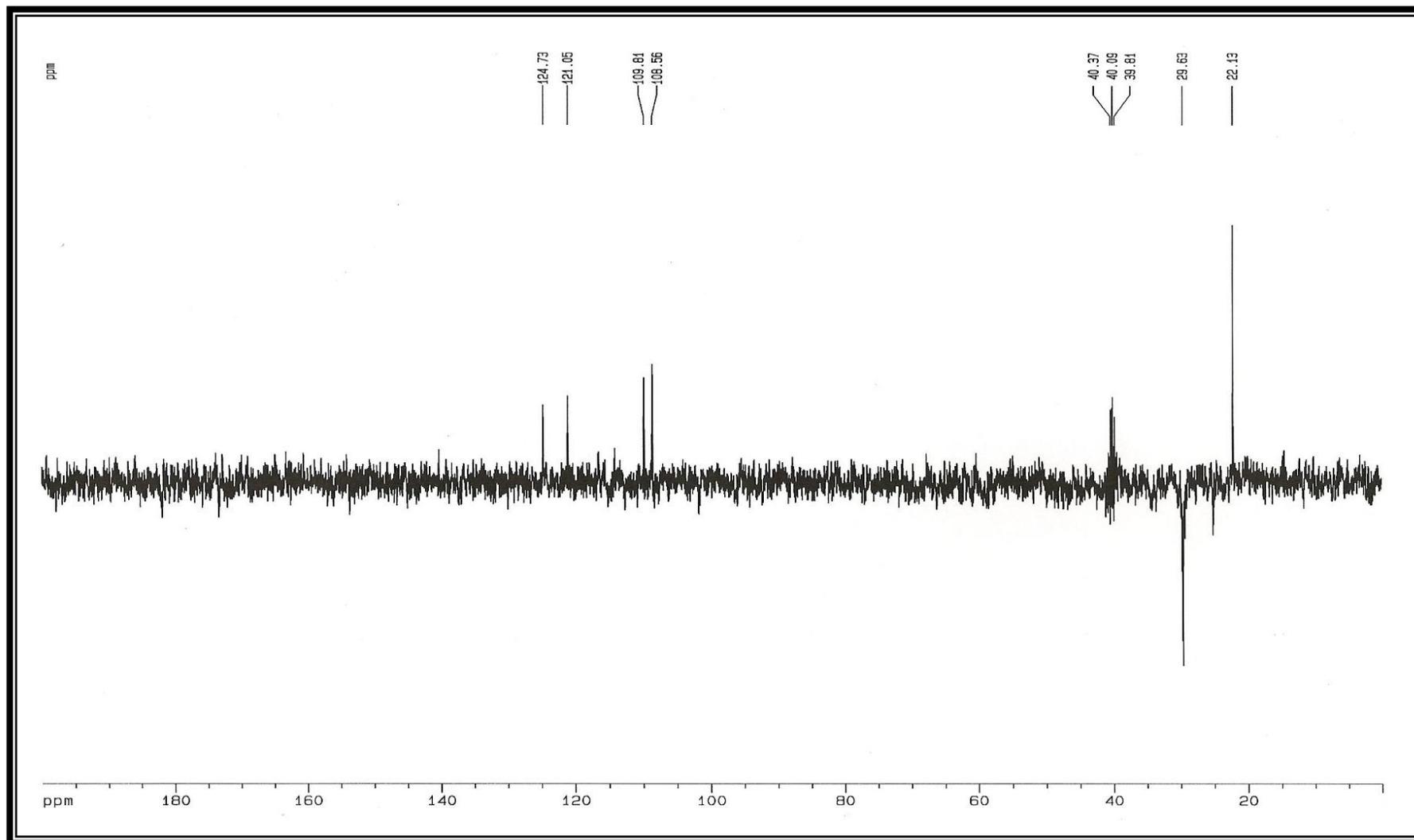


Figura 35- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 5 (125 MHz, DMSO -d₆)

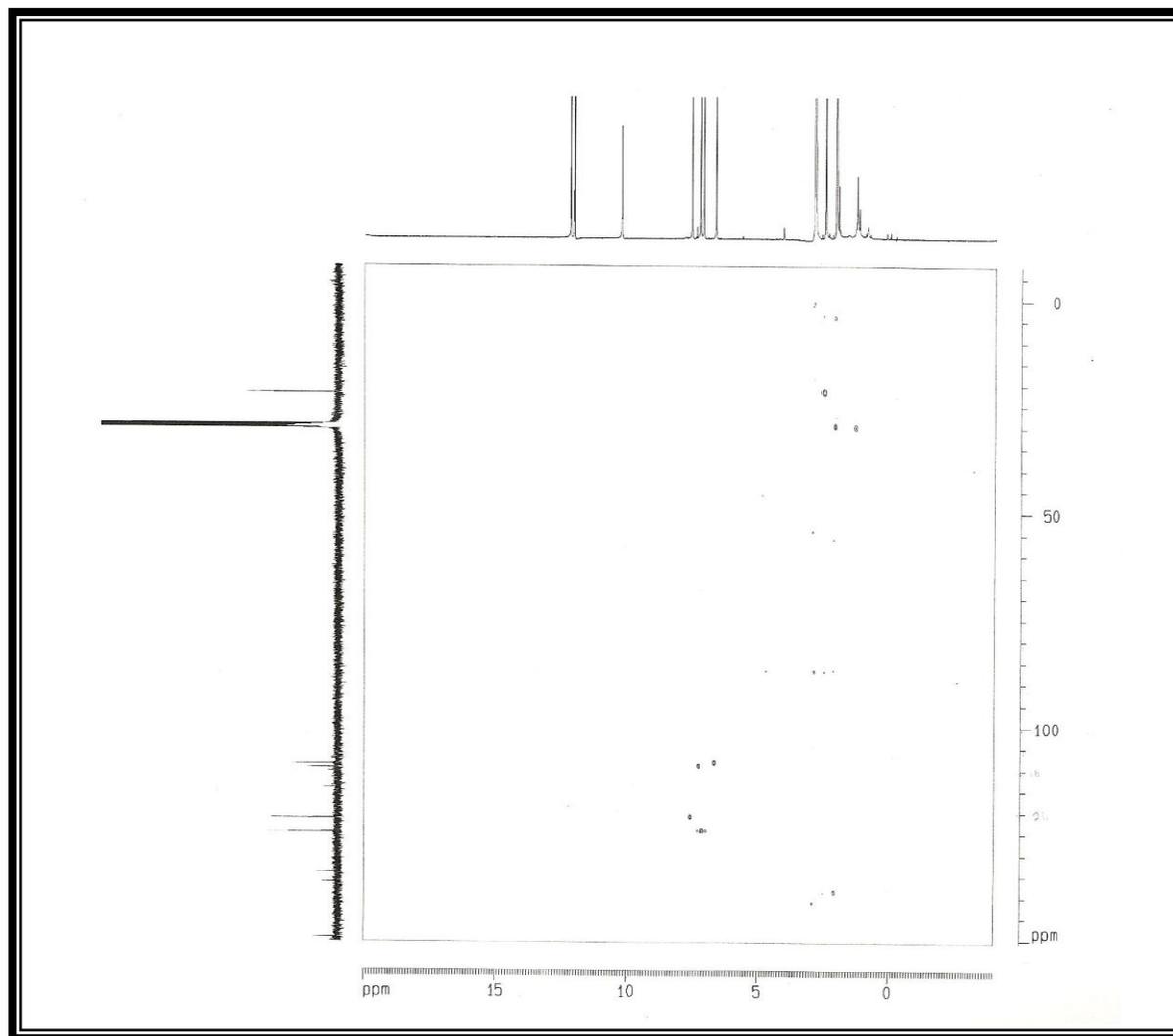


Figura 36- Espectro HMQC de LOS 5 (500 e 125 MHz, Acetona-d₆)

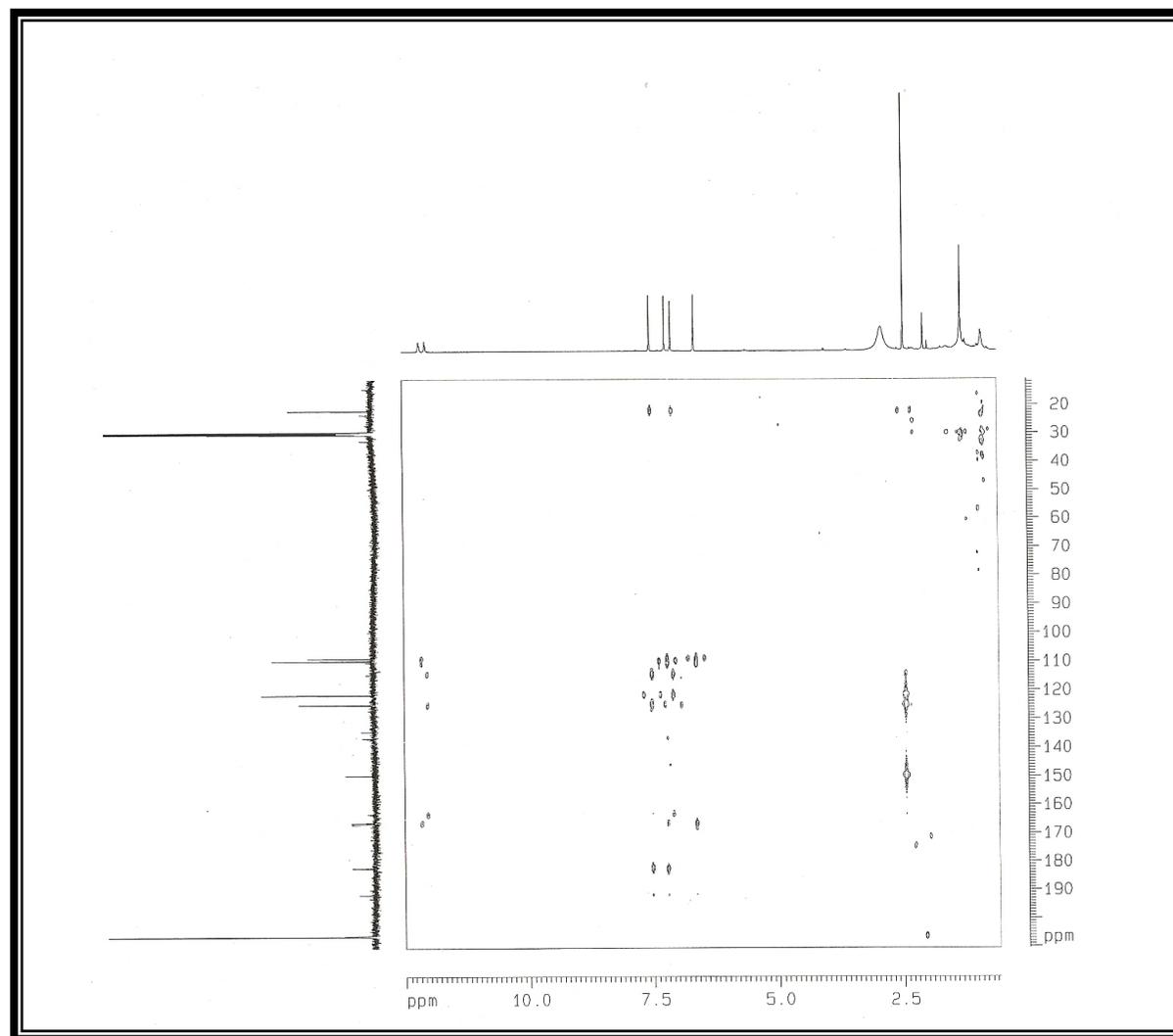


Figura 37- Espectro HMBC de LOS 5 (500 e 125 MHz, Acetona-d₆)

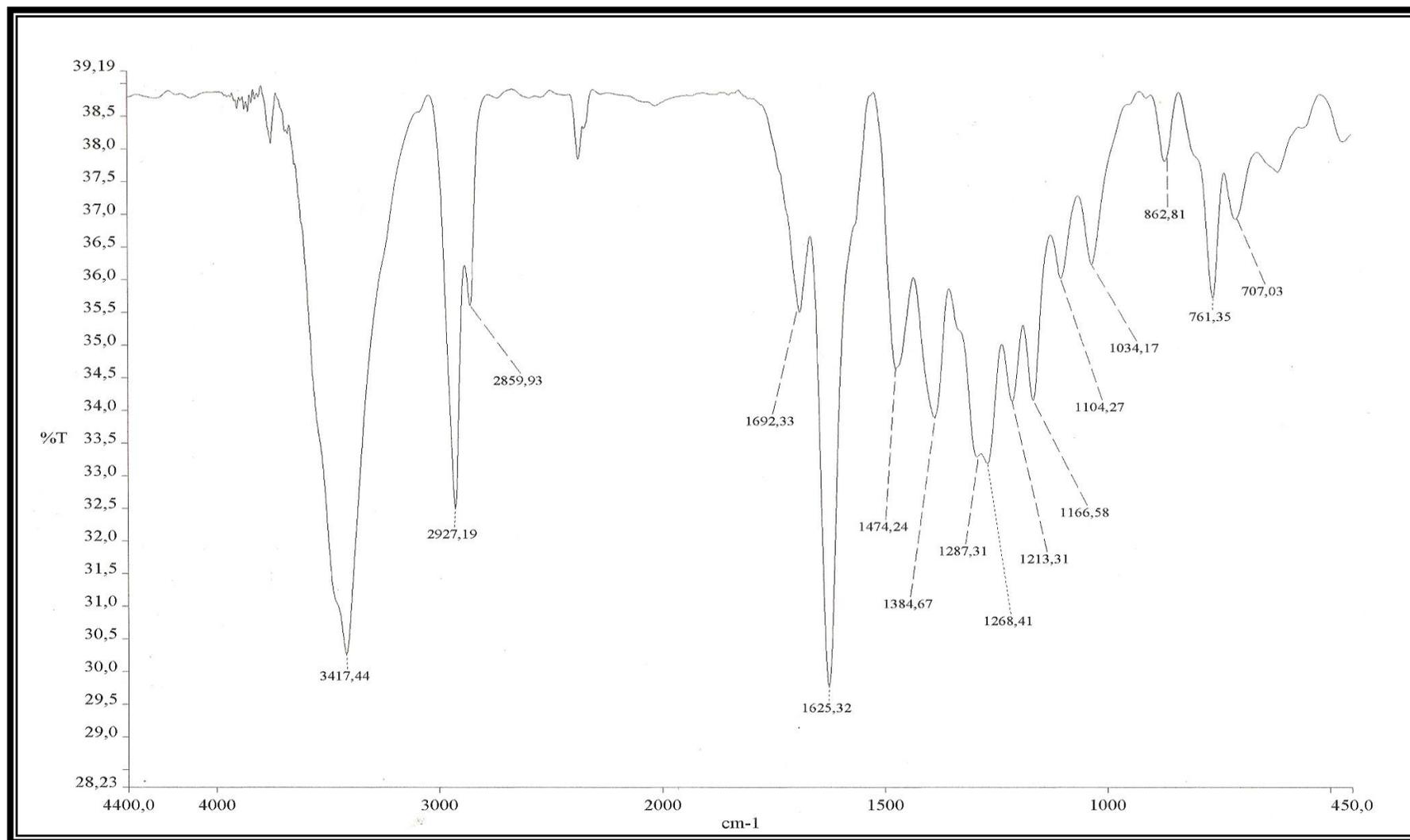


Figura 38- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 5

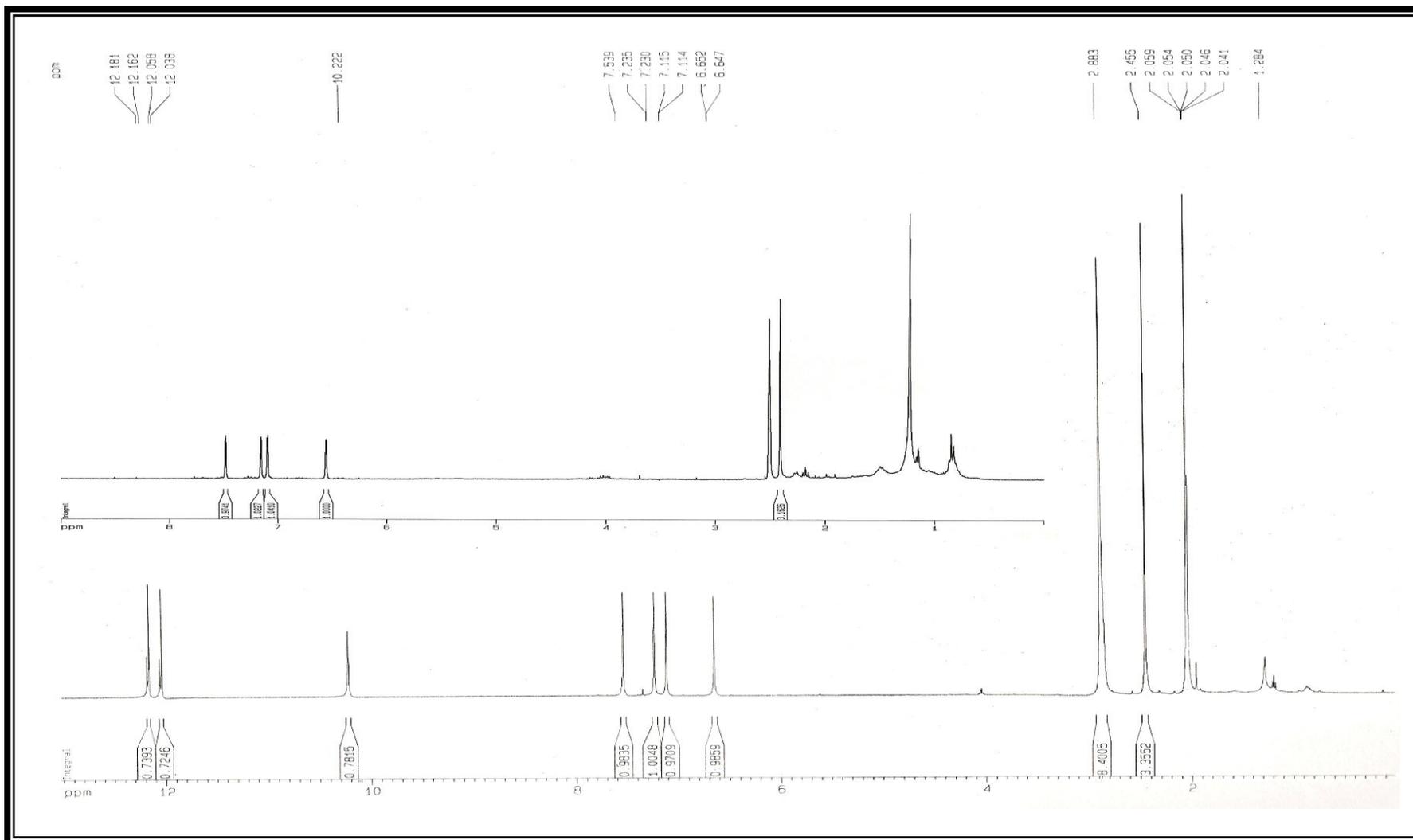


Figura 39- Espectro de RMN ^1H de LOS 5 (500 MHz, DMSO - d_6 , Acetona- d_6)

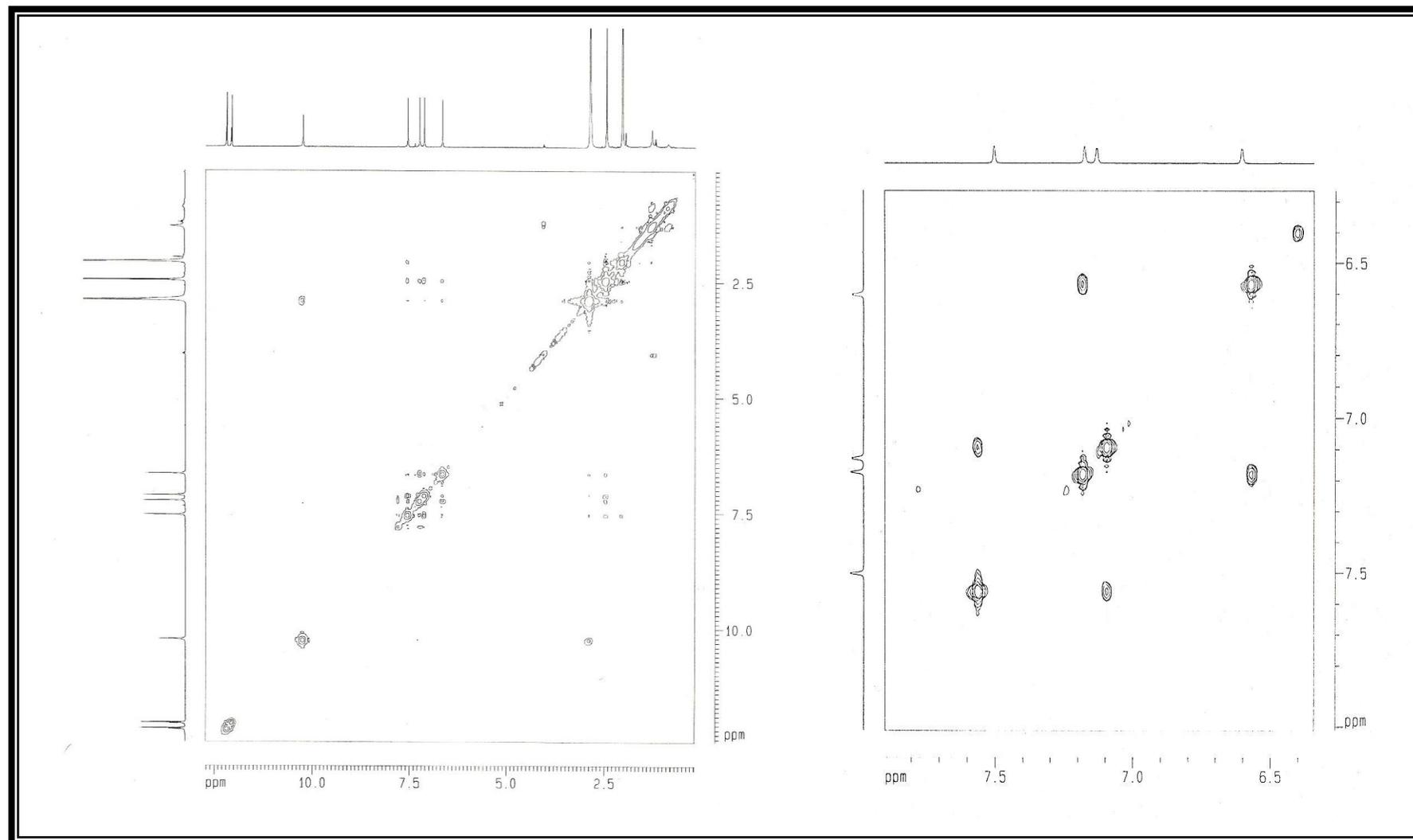


Figura 40- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 5 (125 MHz, Acetona- d_6 , DMSO - d_6)

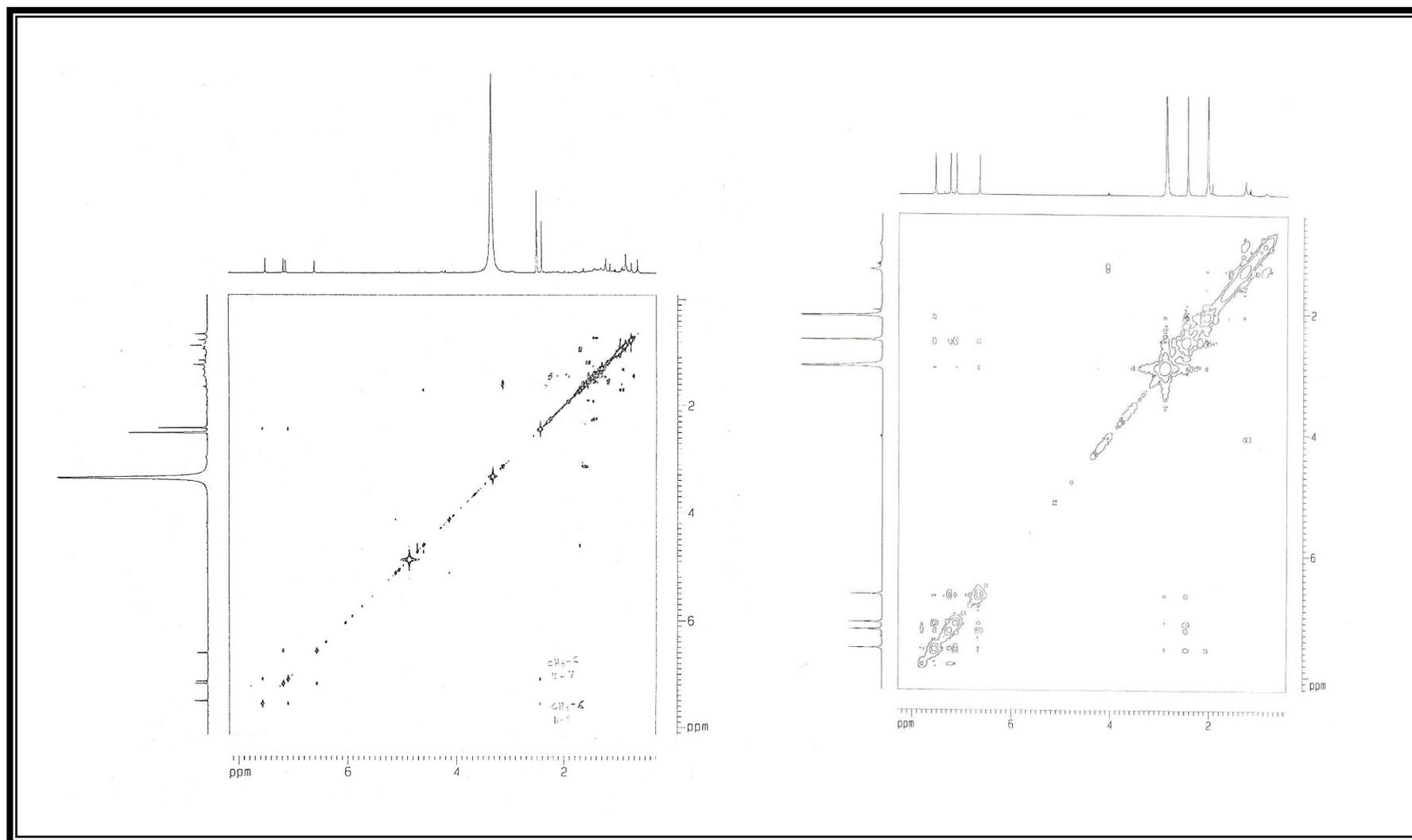
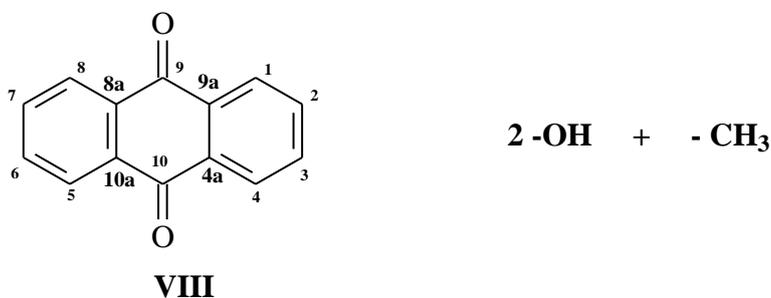


Figura 41- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 5 (125 MHz, DMSO - d_6 , Acetona- d_6)

3.6 LOS 3 (13)

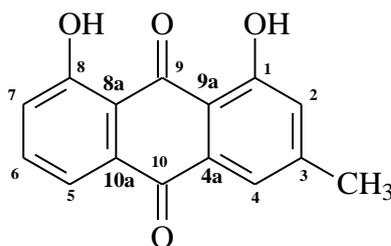
O extrato etanólico dos talos de *Luffa operculata* após sucessivas colunas cromatográficas em gel de sílica forneceu LOS 3 como sólido cristalino alaranjado, solúvel em clorofórmio e com ponto de fusão 234,9 – 235,7 °C.

O espectro de RMN ¹³C CPD (Figura 42, p. 138) de LOS 3 com ajuda dos experimentos de DEPT 135° (Figura 43, p. 139), HMQC (Figura 44, p. 140) e HMBC (Figura 45, p. 141), indicaram um total de 15 átomos de carbonos e um total de 8 átomos de hidrogênio ligados a carbonos. Os tipos de carbonos foram exibidos pelos espectros de RMN ¹³C CPD e DEPT 135° como um carbono metílico ligado (δ_C 22,49), cinco metínicos (δ_C 137,19, 124,79, 124,60, 121,60 e 120,17) e nove não hidrogenados, sendo, dois carbonílicos (δ_C 182,24 e 192,79) e cinco não oxigenados (δ_C 149,58, 133,89, 133,53, 117,00 e 113,00). Esses assinalamentos foram consistentes com a fórmula molecular empírica C₁₅H₁₀O₄, encerrando a existência de dois grupos hidroxila e índice 11 de deficiência de hidrogênio (IDH). A ocorrência de sinais para dois carbonos carbonílicos em δ_C 192,79 e 182,24 no espectro de RMN ¹³C, indicaram para LOS 3, como o caso de LOS 5, a estrutura de uma antraquinona (**VIII**) sustentando dois grupos hidroxila e um grupo metila.



No espectro de absorção na região do IV (Figura 46, p. 142), foram registradas uma forte banda em 3.417 cm⁻¹ (ν_{O-H}) de dois grupos hidroxila e bandas em 1.677 e 1.627 cm⁻¹ ($\nu_{C=O}$) de grupos carbonila, em acordo com o espectro de RMN ¹³C (δ_C 182,24 e 192,79).

O espectro de RMN ¹H de LOS 3 (Figura 47, p. 143), mostrou sinais simples em δ_H 12,13 e 12,02 devidos a hidrogênios de hidroxilas fenólicas queladas, sinal de hidrogênios metílico em δ_H 2,47 (s, 3H) e sinais para cinco hidrogênios aromáticos em δ_H 7,83 (dl, 1H, $J=8,0$ Hz), 7,69 (tl, 1H, $J=8,0$ Hz), 7,67 (sl, 1H), 7,30 (dl, 1H, $J=8,0$ Hz) e 7,11 (sl, 1H). Por comparação com LOS 5 e tendo em vista os dois grupos hidroxilas quelados com os grupos carbonilas, a alternativa resultante para LOS 3 foi a estrutura abaixo:



(13)

O espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (Figura 48, p. 144) mostrou, como em LOS 5, acoplamento do sinal do grupo metila [δ_{H} 2,47 (s)] com os sinais de dois hidrogênios ligados a carbono aromático, ou seja, H-2 (δ_{H} 7,11, sl) e H-4 (δ_{H} 7,67, sl). Este espectro também registrou correlações entre os sinais atribuídos aos hidrogênios H-5 (δ_{H} 7,83, dl), H-6 (δ_{H} 7,69, tl) e H-7 (δ_{H} 7,30, dl). Por outro lado, no espectro de HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) (Figura 45, p. 141), o hidrogênio H-5 mostrou correlações com os carbonos C-6 (δ_{C} 137,19), C-7 (δ_{C} 124,79), C-8a (δ_{C} 117,00) e C-10 (δ_{C} 182,24).

Assim, os dados extraídos dos espectros no IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C permitiram identificar LOS 3 como sendo a quinona 1,8-di-hidroxi-3-metilantquinona (13), conhecida comumente como Crisofanol, embora a antquinona, já se encontre registrada na literatura (DAGNE; STEGLICH, 1984; MACEDO, 2006) (Tabela 10, p. 137), é a primeira vez que seu isolamento a partir de *Luffa operculata* é relatado, sendo, portanto inédita para o gênero e a espécie.

Todas as atribuições de deslocamentos químicos, estabelecidas com base nos espectros de ressonância magnética nuclear bidimensional (RMN 2D) foram sumariados na Tabela 9, p. 137.

Tabela 9- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de LOS 3. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.

HMQC		HMBC
C	δ_{C}	δ_{H}
1	162,96	-
3	149,58	-
4a	133,53	-
8	162,66	-
8a	116,00	-
9	192,79	-
9a	114,00	-
10	182,24	-
10a	133,89	-
CH		
2	124,60	7,11 (sl)
4	121,59	7,67 (sl)
5	120,16	7,83 (dl, 8,0)
6	137,18	7,69 (tl, 8,0)
7	124,79	7,30 (dl, 8,0)
CH ₃		
3	22,49	2,47 (s)

Tabela 10- Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C em CDCl_3 de LOS 3 com dados descritos na literatura em Acetona- d_6 (DAGNE; STEGLICH, 1984) e em $\text{DMSO-}d_6$ (MACEDO, 2006).

Carbonos	LOS 3	Crisofanol (DAGNE; STEGLICH, 1984)	Crisofanol (MACEDO, 2006)
1	162,96	162,9	
2	124,60	124,5	
3	149,58	149,5	
4	121,59	121,5	
4 ^a	133,53	133,4	
5	120,16	120,1	
6	137,18	137,1	
7	124,79	124,7	
8	162,66	162,6	
8 ^a	116,00	116,0	
9	192,79	192,6	192,5^a
9 ^a	114,00	113,9	
10	182,24	182,0	181,9^a
10 ^a	133,89	133,8	
CH ₃	22,79	22,4	

^a – Somente carbonilas foram utilizadas para comparação.

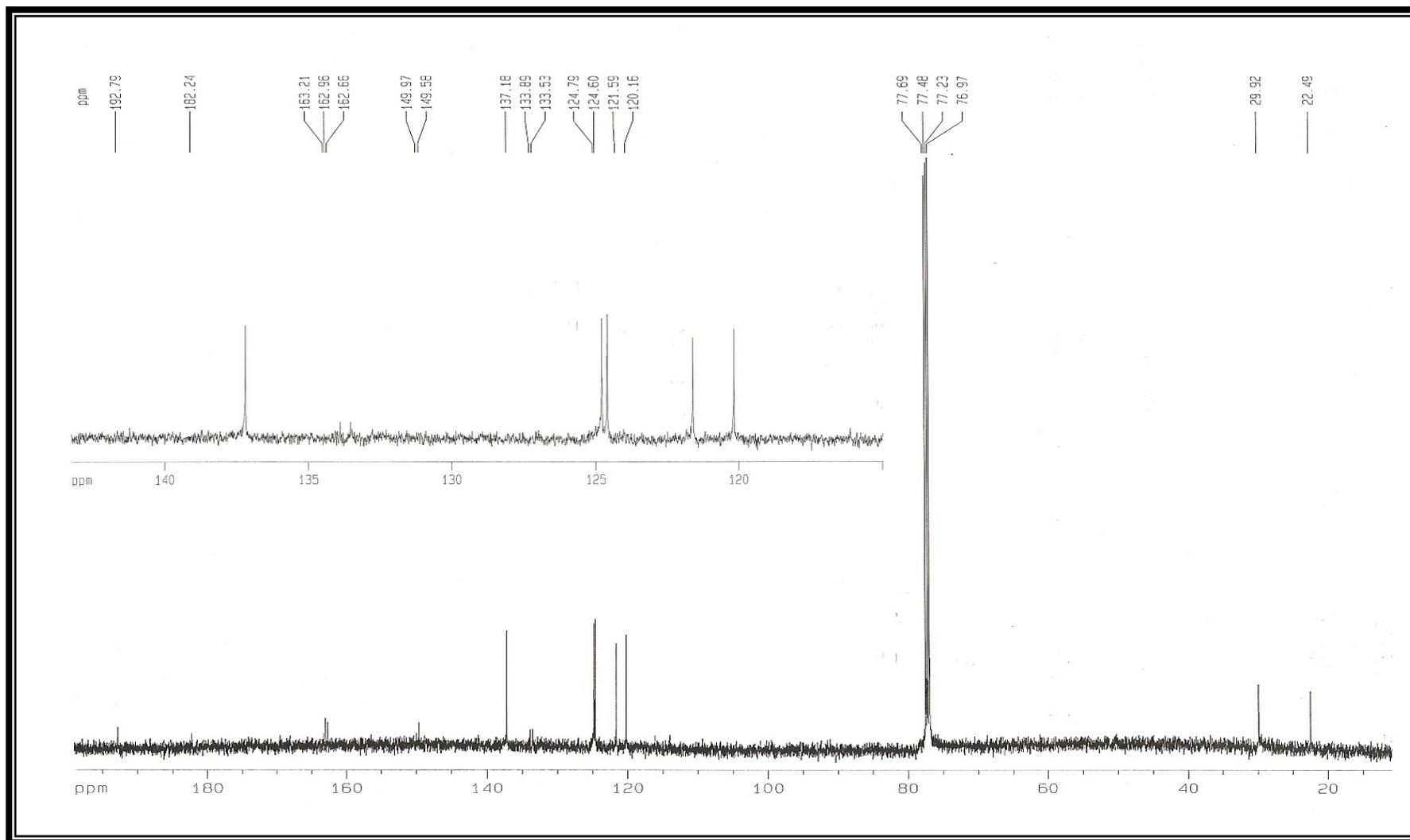


Figura 42- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 3 (125 MHz, CDCl_3)

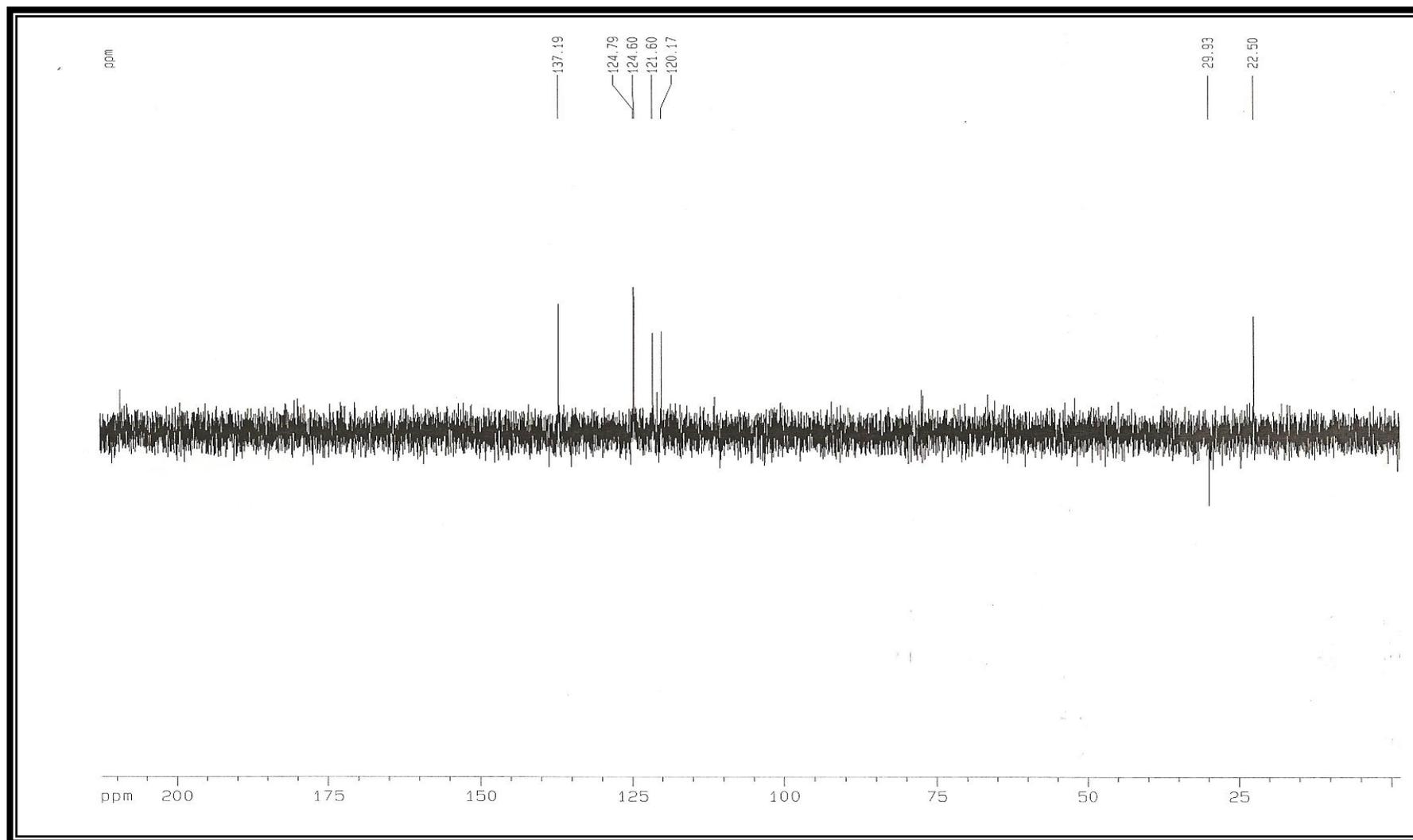


Figura 43- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 3 (125 MHz, CDCl_3)

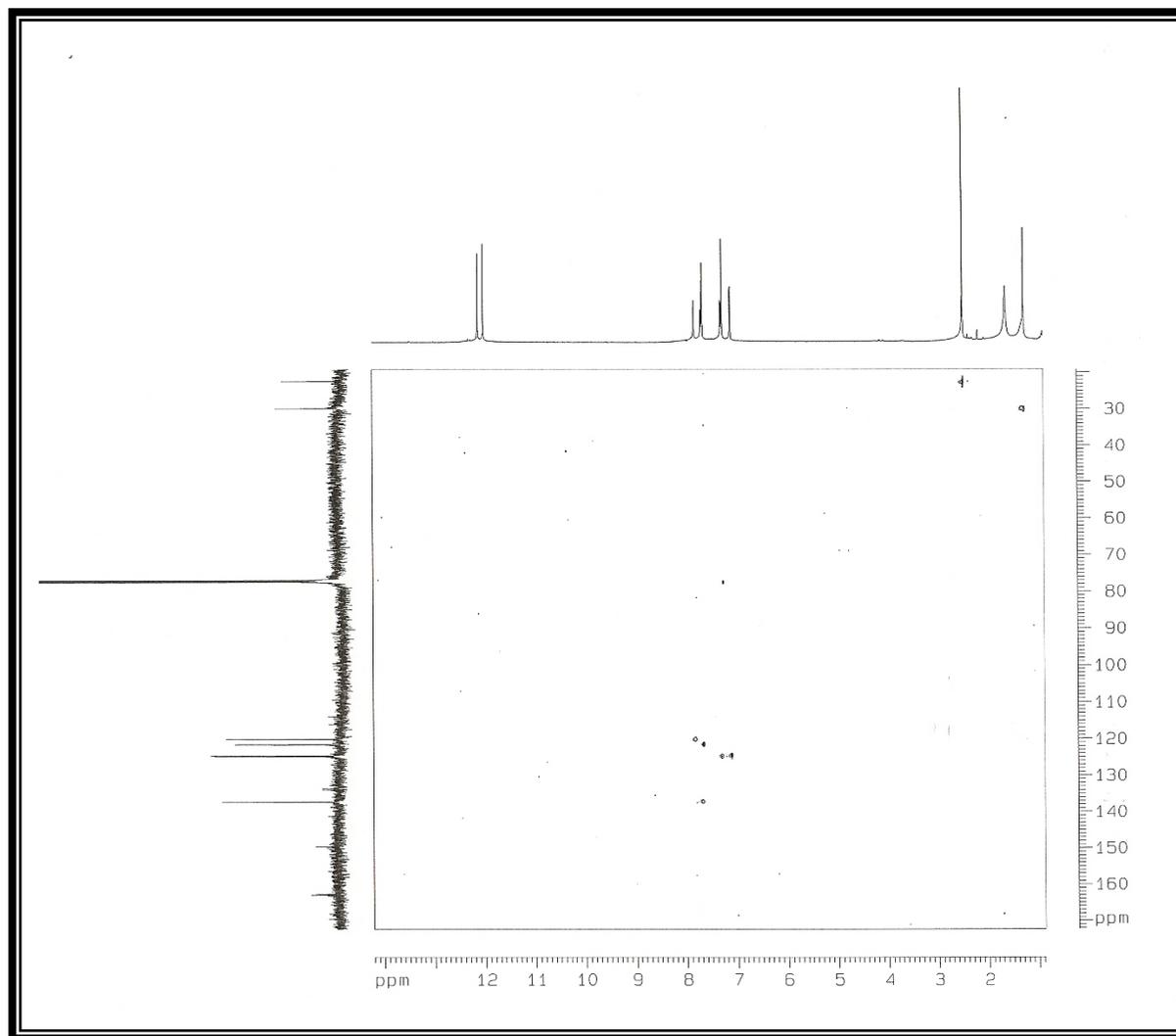


Figura 44- Espectro HMQC de LOS 3 (500 e 125 MHz, CDCl_3)

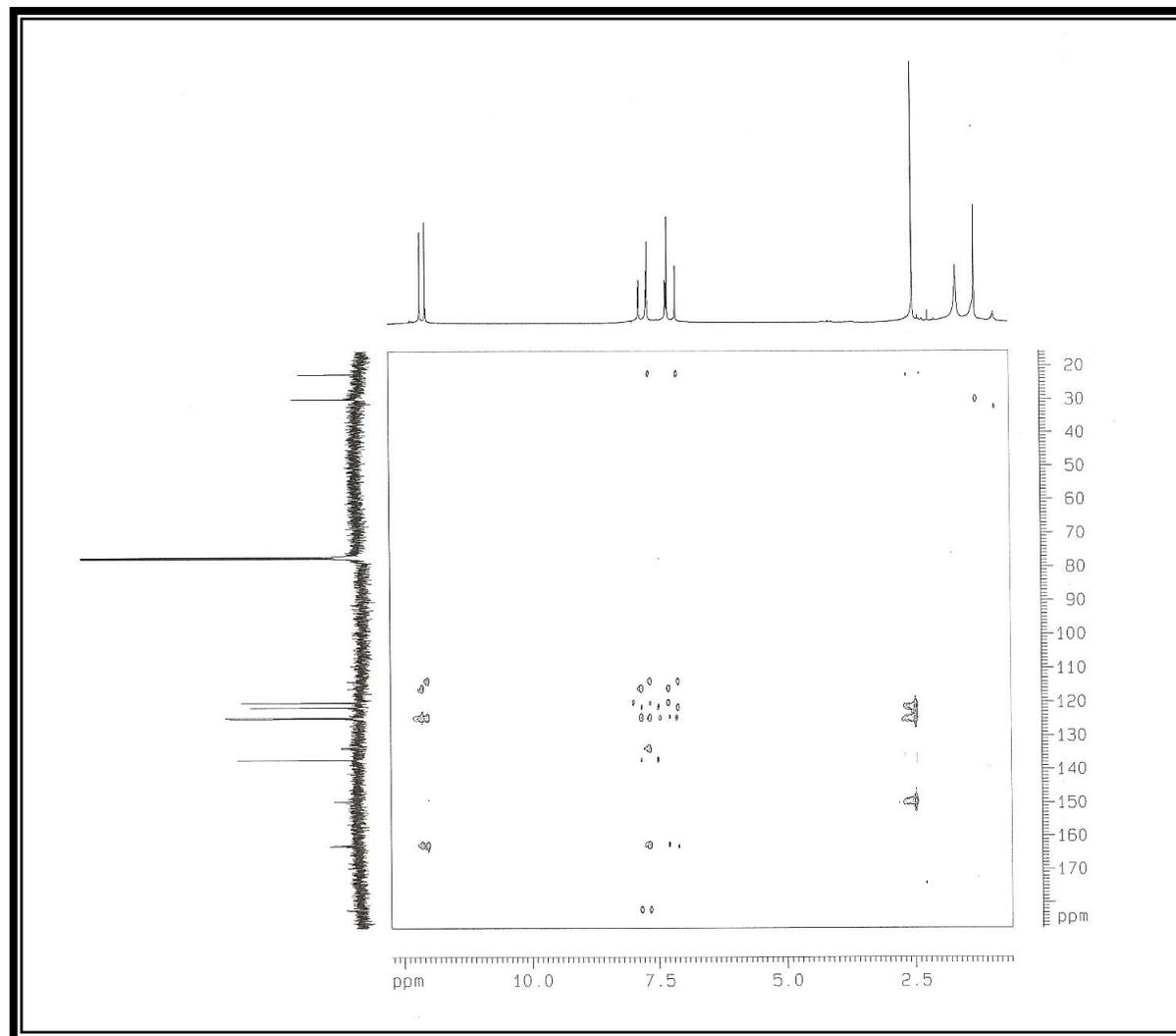


Figura 45- Espectro HMBC de LOS 3 (500 e 125 MHz, CDCl₃)

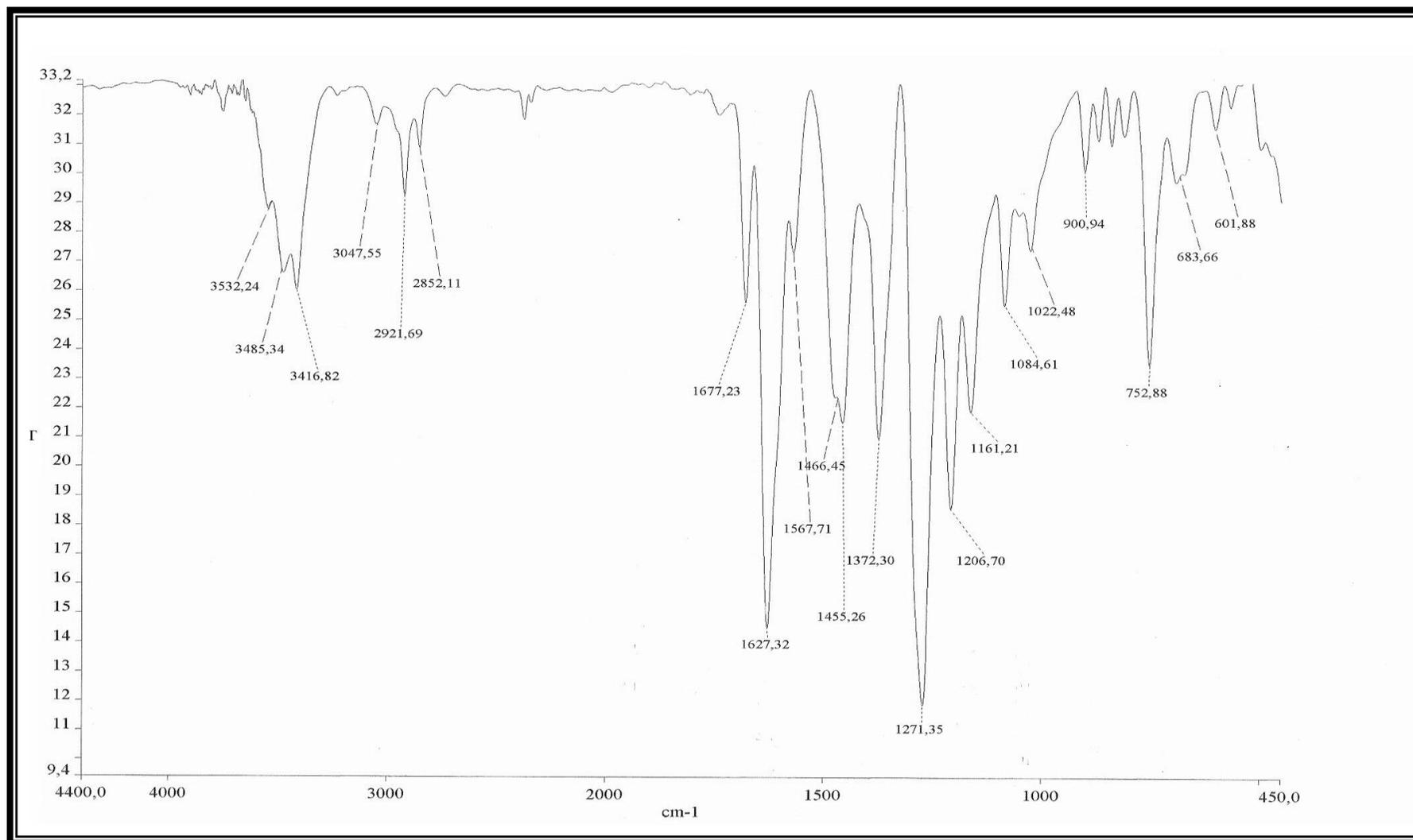


Figura 46- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 3



Figura 47- Espectro de RMN ^1H de LOS 3 (500 MHz, CDCl_3)

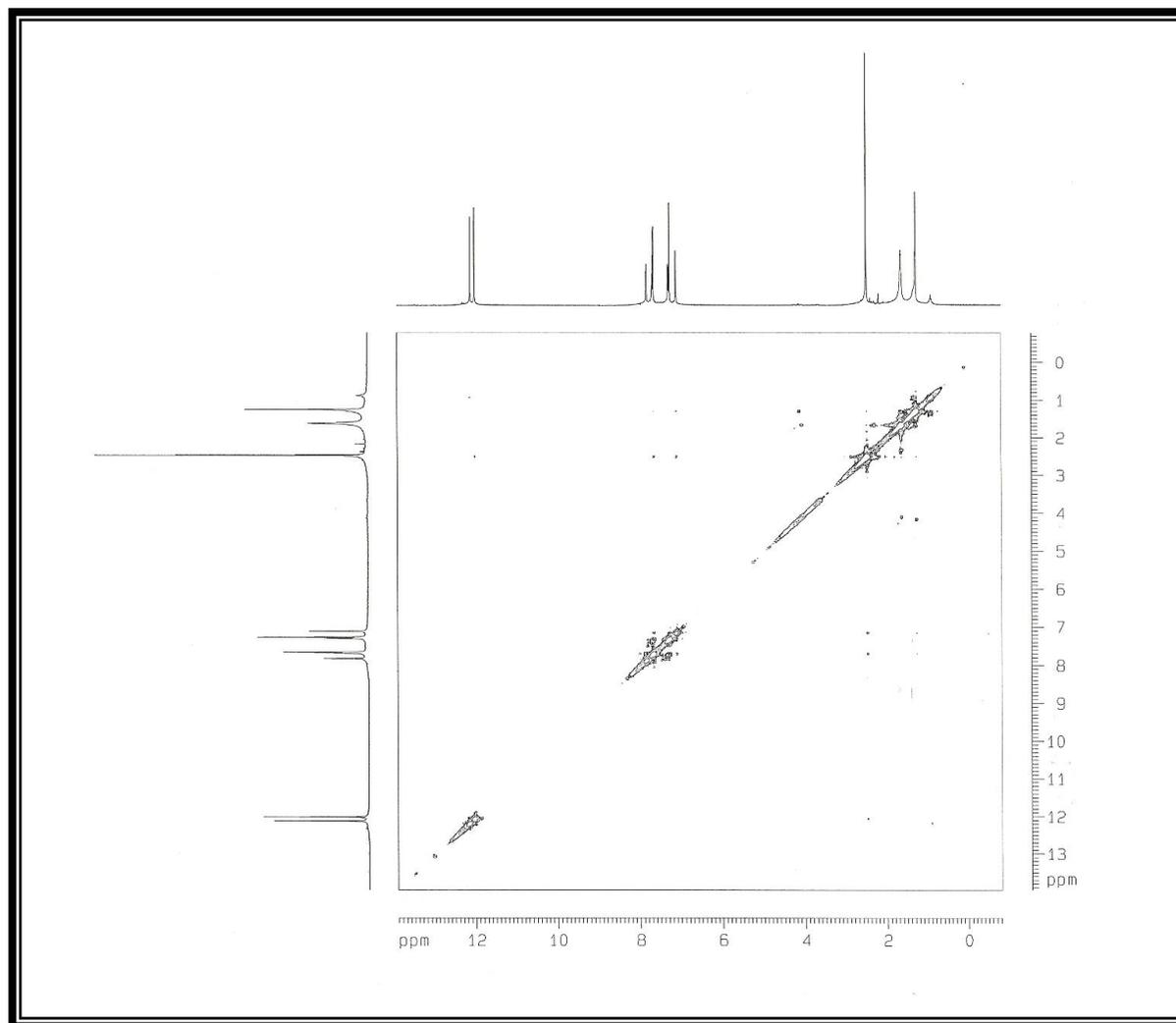


Figura 48- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 3 (125 MHz, CDCl_3)

3.7 LOS 4 (14 e 15)

O extrato etanólico dos talos de *Luffa operculata* (LOEET-C) após sucessivas colunas cromatográficas em gel de sílica e em gel de sílica “flash” forneceu um óleo amarelo, solúvel em clorofórmio.

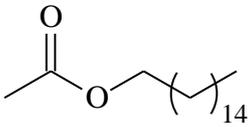
O espectro de absorção na região do IV (Figura 49, p. 147) apresentou bandas de absorção intensas devidas a deformação axial de ligação C-H de grupos CH₂ e CH₃ ($\nu_{\text{C-H}}$ 2.924 e 2.854 cm⁻¹), bandas características de deformação axial de grupo carbonila ($\nu_{\text{C=O}}$ 1.739 cm⁻¹) e de ligação C – O ($\nu_{\text{C-O}}$ 1.177 cm⁻¹) além, de bandas associadas à deformação angular dos grupos metil e metileno ($\delta_{\text{CH}_3/\text{CH}_2}$ 1.462 cm⁻¹).

A análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³C CPD (Figura 50, p. 148) e DEPT 135° (Figura 51, p. 149) permitiu verificar as multiplicidades dos átomos de carbono. Assim, o espectro de RMN ¹³C CPD exibiu vários sinais na região de carbonos sp³ compreendidos entre δ_{C} 22,89 e 34,59, todos os carbonos metilênicos, com destaque para o sinal de alta intensidade em δ_{C} 29,80, além de sinais devidos a dois carbonos metílicos em δ_{C} 14,29 e 14,44. Em adição, o espectro mostrou sinal para carbono metilênico oxigenado (δ_{C} 60,30) e sinal devido a carbono carbonílico de éster (δ_{C} 174,06).

O espectro de RMN ¹H (Figura 52, p. 150) apresentou sinais em δ_{H} 0,88 (t, $J=3,4$, 3H) e δ_{H} 4,12 (q, 2H), característicos de grupamento carboetoxila. Vale ressaltar os sinais em δ_{H} 2,27 (t, $J=7,5$, 2H) e δ_{H} 1,61 (m, 2H), atribuídos aos hidrogênios metilênicos *alfa* e *beta*, respectivamente, em relação à carbonila, como também, o sinal de alta intensidade em δ_{H} 1,28-1,23 devido a diversos hidrogênios metilênicos.

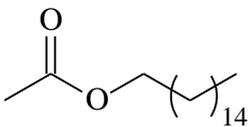
O espectro de massa do pico de maior intensidade no cromatograma (T_{R} 24.974) (Figuras 53 e 54, p. 151 e 152) revelou-se compatível com uma mistura de ésteres alifáticos, podendo-se observar picos de baixa intensidade compreendidos entre 430-270 Daltons, com destaque para o pico em m/z 284 (M^+) que permitiu propor um componente principal na mistura (**14**). O pico em m/z em 255 (M-29) foi compatível com um éster etílico alifático (Tabela 11, p. 146).

Tabela 11- Fragmentação de LOS 4 (14) no espectrômetro de massa

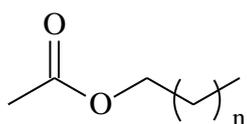
	M^+	m/z
 <p>LOS 4 (14) Acetato de Hexadecanoíla</p>	284	255

O espectro de massa do segundo pico de maior intensidade do cromatograma (T_R 27.157) (Figura 53 e 55, p. 151 e 152) exibiu um pico em m/z 312 (M^+) e permitiu identificar um componente (15) principal na mistura. O pico em m/z em 283 ($M-29$) foi compatível com a estrutura de um éster alifático etílico (Tabela 12, p. 146).

Tabela 12- Fragmentação de LOS 4 (15) no espectrômetro de massa

	M^+	m/z
 <p>LOS 4 (15) Acetato de Hexadecanoíla</p>	312	283

O pico em m/z 73 ($C_3H_5O_2$) observado nos espectros de massa reforçou as estruturas dos ésteres etílicos propostos.



LOS 4 (14) $n=14$

LOS 4 (15) $n=16$

$$\text{LOS 4 (14): } 29 + 44 + 14n + 15 = 284$$

$$n = 14$$

$$\text{LOS 4 (15): } 29 + 44 + 14n + 15 = 312$$

$$n = 16$$

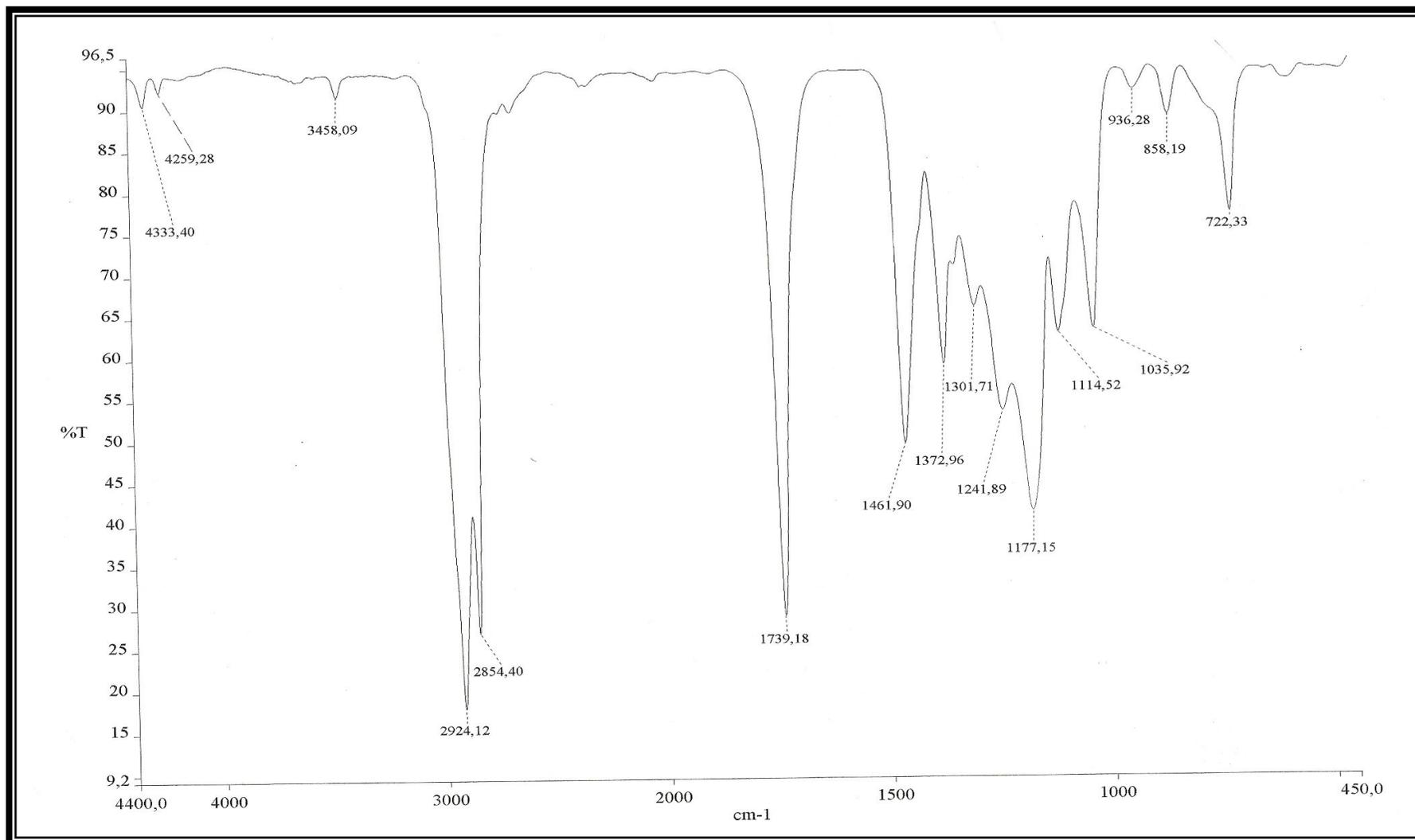


Figura 49- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 4

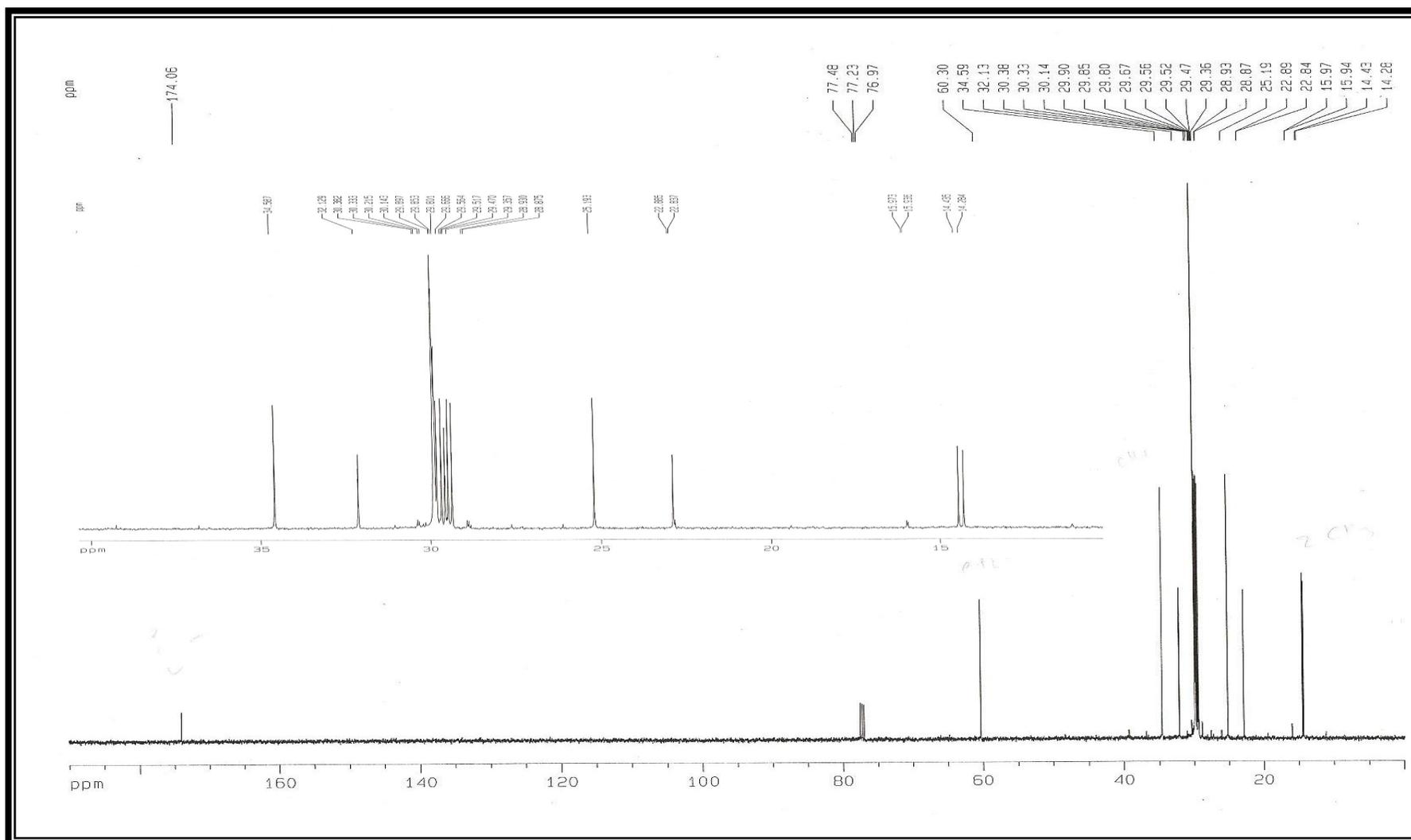


Figura 50- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 4 (125 MHz, CDCl_3)

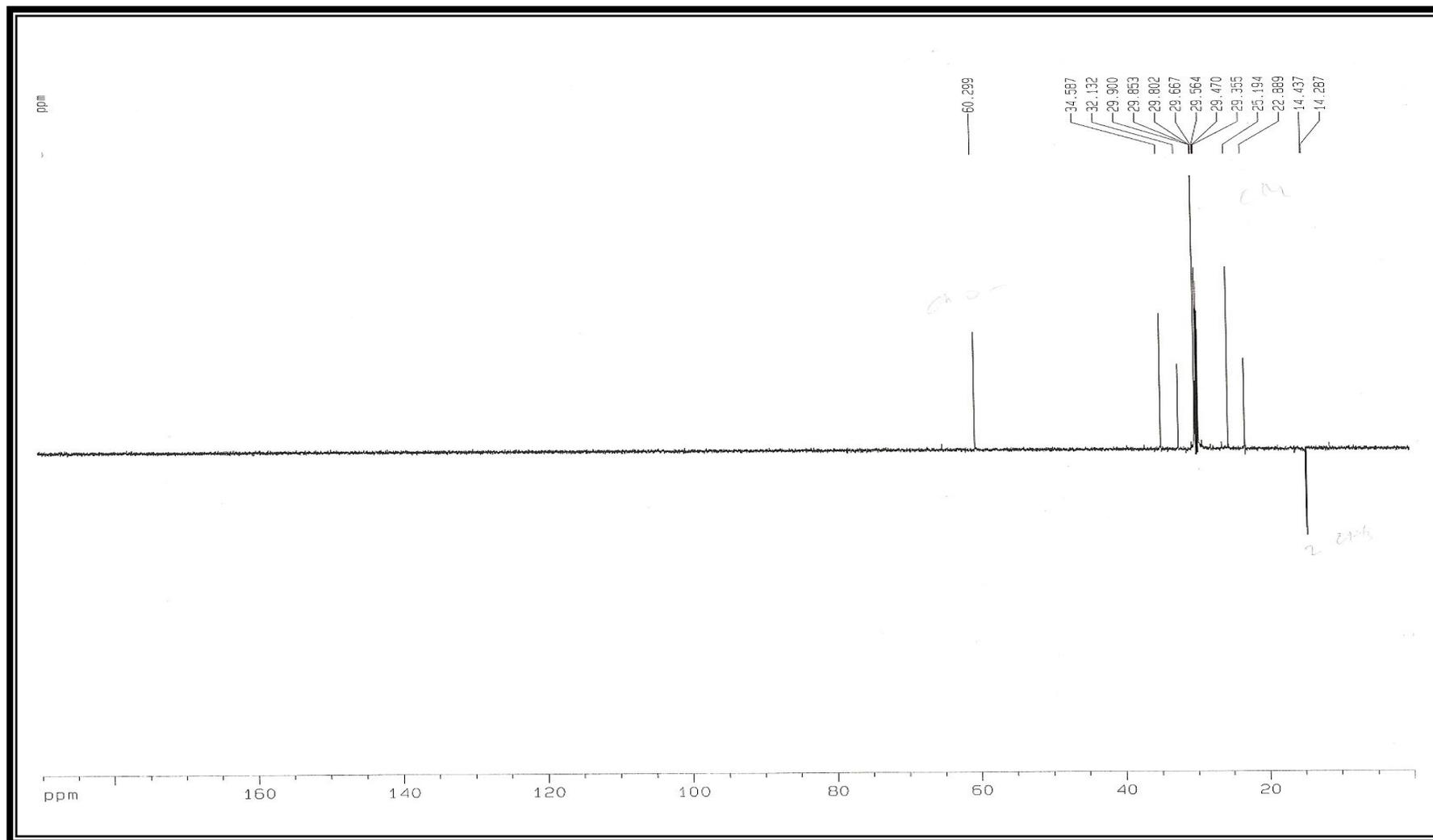


Figura 51- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 4 (125 MHz, CDCl_3)

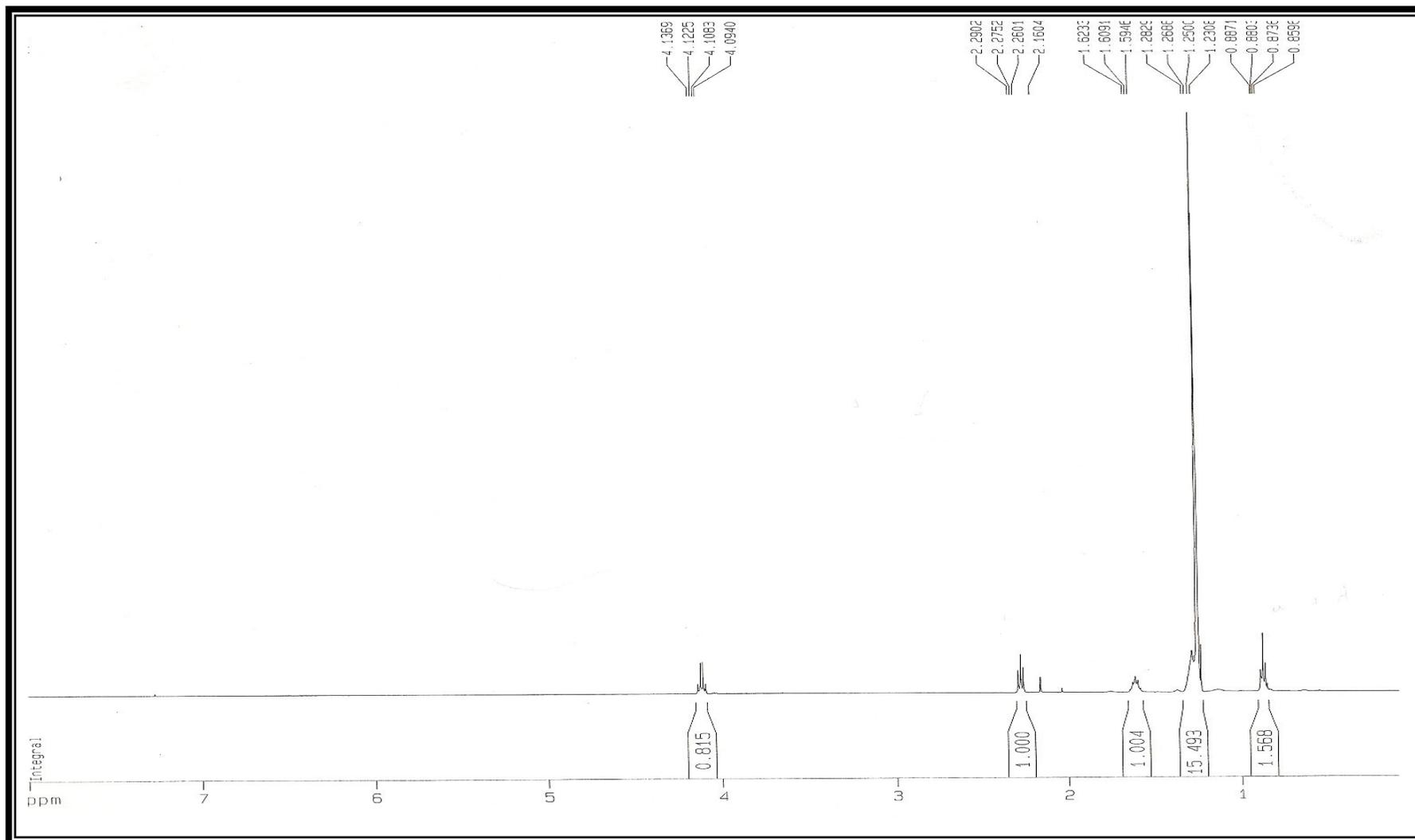


Figura 52- Espectro de RMN ¹H de LOS 4 (500 MHz, CDCl₃)

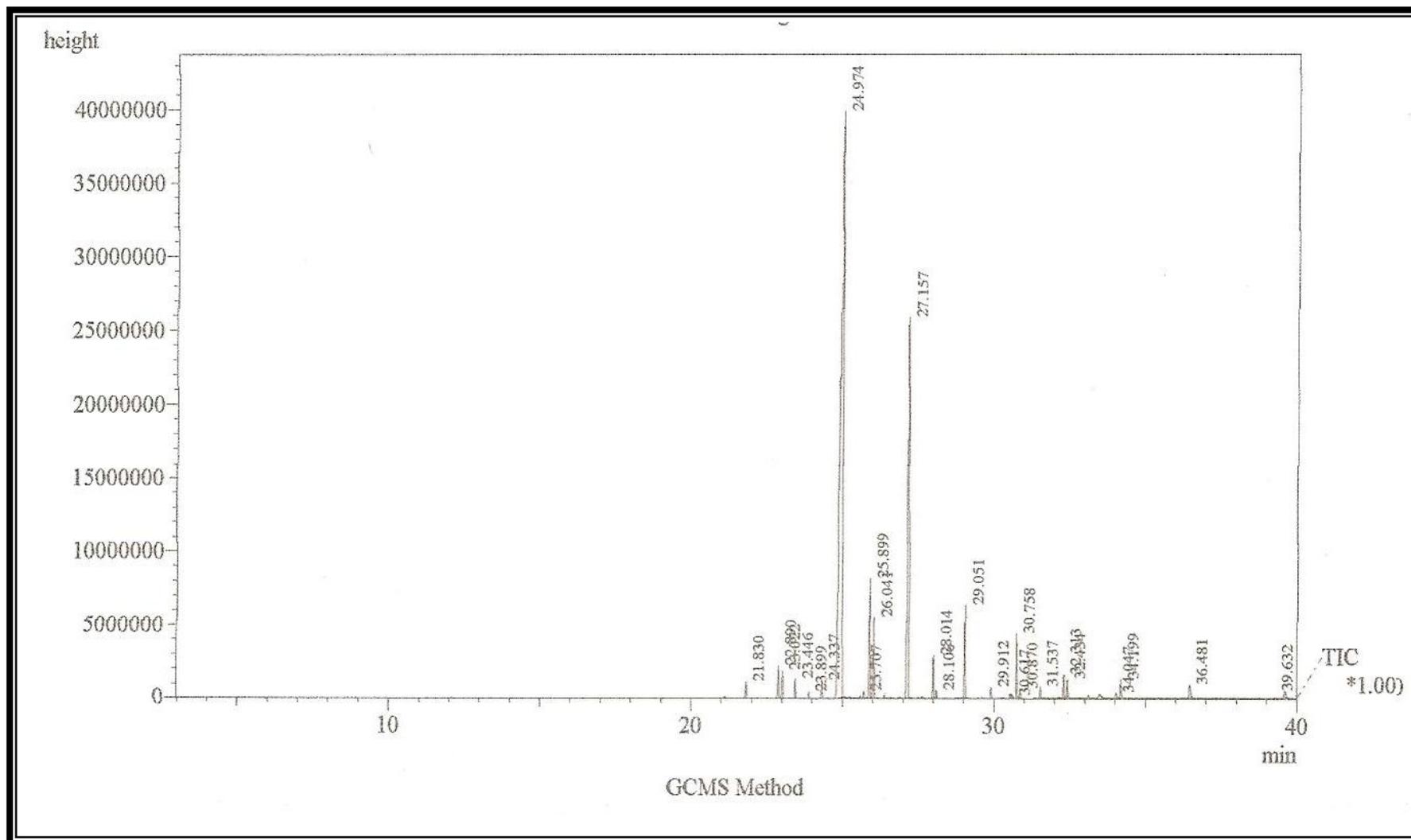


Figura 53- Cromatograma de LOS 4

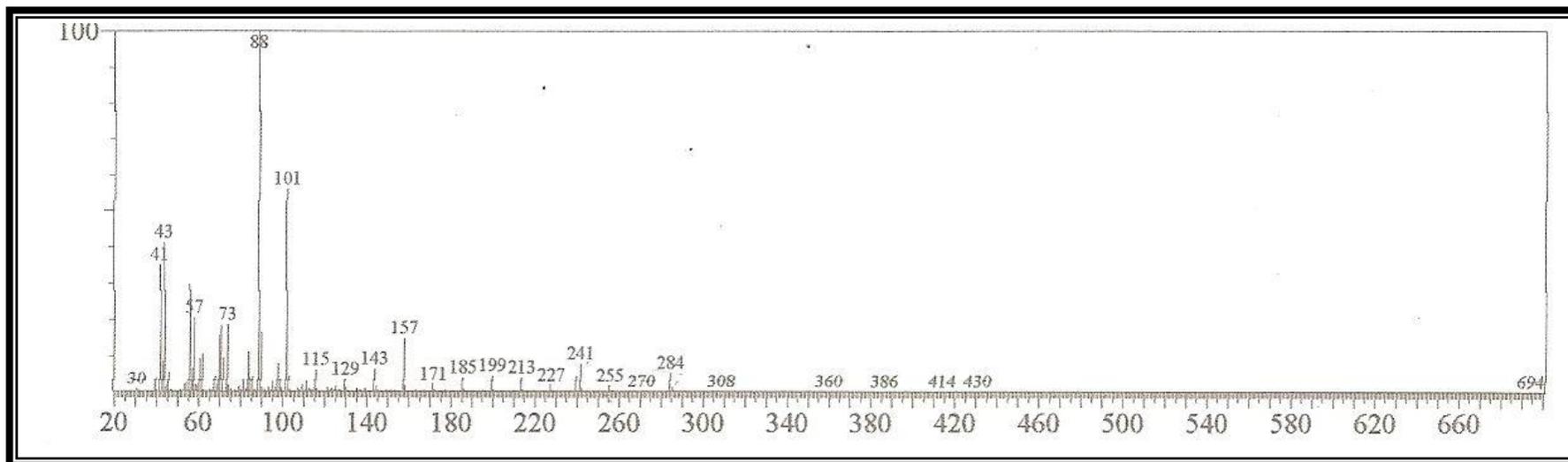


Figura 54- Espectro de massa de LOS 4 (14)

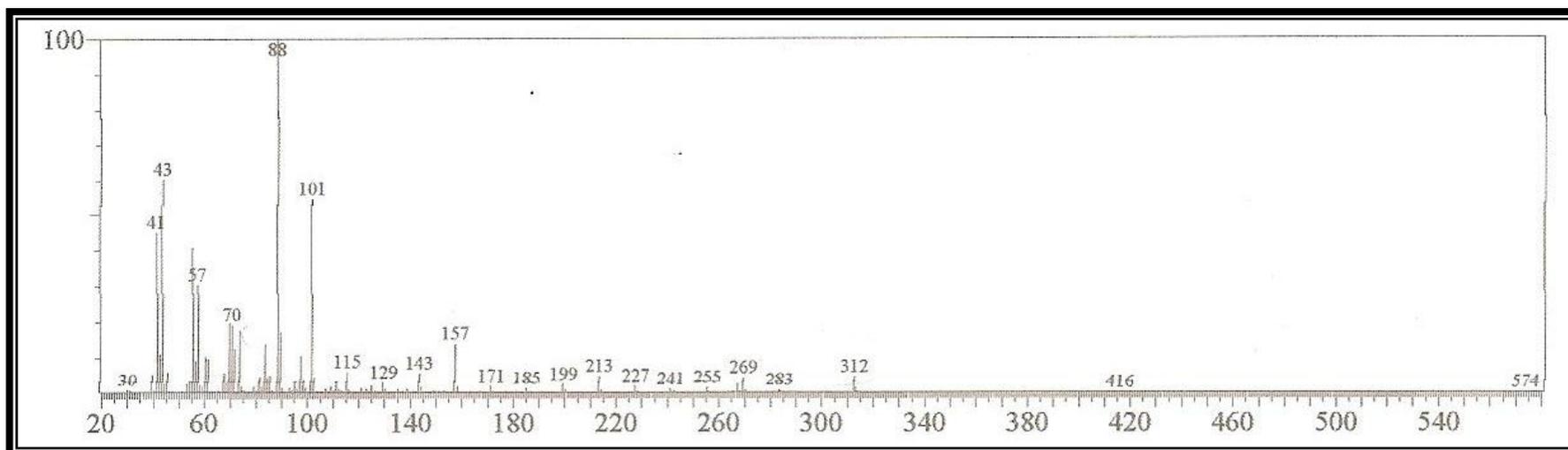


Figura 55- Espectro de massa de LOS 4 (15)

3.8 LOS 6 (16)

O extrato etanólico dos talos de *Luffa operculata*, após sucessivas colunas cromatográficas em gel de sílica, forneceu da fração acetato de etila como um sólido branco amorfo com ponto de fusão 262,4 – 262,8 °C, solúvel em piridina, denominado LOS 6.

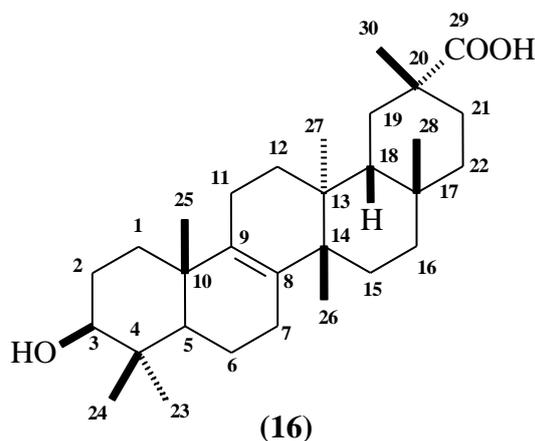
O espectro na região do IV (Figura 56, p. 158) exibiu bandas de absorção características de grupos hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$ 3.463 cm^{-1}), metila e metileno ($\nu_{\text{C-H}}$ 2.938 cm^{-1} ; $\delta_{\text{CH}_3/\text{CH}_2}$ 1.378 e 1.461 e cm^{-1}), carbonila ($\nu_{\text{C=O}}$ 1.685 cm^{-1}) e bandas relativas a deformação axial de ligação C – O ($\nu_{\text{C-O}}$ 1.200 e 1.010 cm^{-1}) atribuídas à função álcool.

O espectro de RMN ^1H (Figura 57, p. 159) mostrou como destaques, sinais característicos para sete grupos metila, todos terciários [δ_{H} 0,99 (s), 1,05 (s), 1,05 (s), 1,10 (s), 1,22 (s), 1,28 (s) e 1,42 (s)] e um sinal em δ_{H} 3,38 referente a hidrogênio carbinólico.

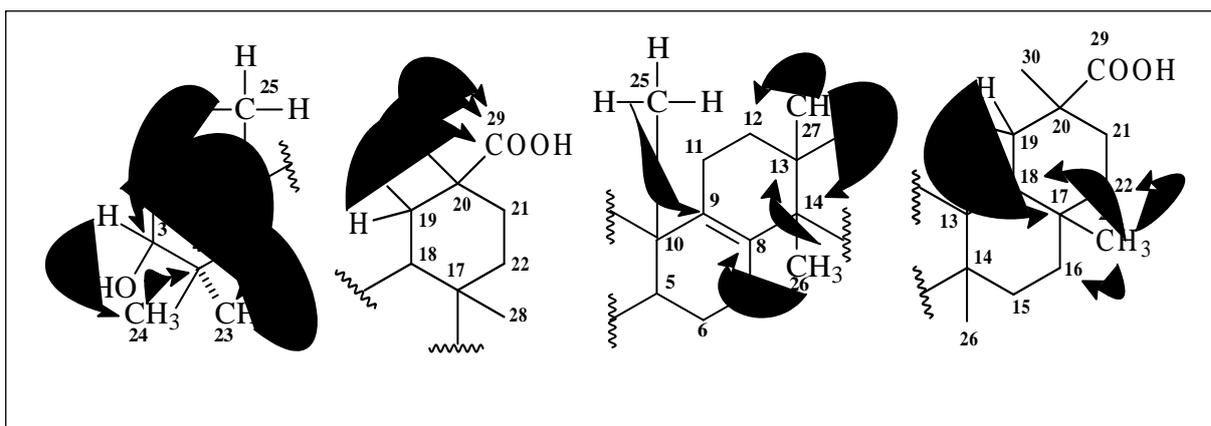
O espectro de RMN ^{13}C CPD (Figura 58, p. 160) exibiu sinais para 30 átomos de carbono, incluindo, a presença das funções ácido carboxílico (δ_{C} 181,68), olefina (δ_{C} 134,89 e 134,45) e álcool (δ_{C} 78,34). A comparação entre os espectros de RMN ^{13}C CPD e DEPT 135° (Figura 59, p. 161) possibilitou definir o padrão de hidrogenação de todos os átomos de carbono (Tabela 13, p. 155) e sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ para LOS 6. Os sinais em δ_{C} 134,89 (C) e 134,45 (C), no espectro de RMN ^{13}C , caracterizaram uma ligação dupla tetrassubstituída e o sinal em δ_{C} 78,34 (CH) um carbono metínico oxigenado. Dos 7 índices de deficiência de hidrogênio previstos, 2 consistiram de duas ligações duplas [sinais no espectro de RMN ^{13}C (Figura 58, p. 160) devido a uma ligação C = O (δ_{C} 181,68) e a uma ligação C = C (δ_{C} 134,89 e 134,45)]. Conseqüentemente, a estrutura de LOS 6 exigiu um esqueleto carbônico pentacíclico como nos triterpenóides das séries oleanano e ursano. Tendo em vista essa dedução, o grupo hidroxila foi localizado no carbono C – 3, posição comumente oxidada nesses tipos de compostos, condição confirmada no espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC ($^3J_{\text{CH}}$) (Figura 60, p. 162) através da correlação dos hidrogênios dos grupos metila 3H-23 (δ_{H} 1,22) e 3H-24 (δ_{H} 1,04) com o carbono C – 3 (δ_{C} 78,34). O espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) (Figura 61, p. 163) (Tabela 14, p. 156) estabeleceu a correlação direta entre os sinais em δ_{H} 3,38 (H – 3) e δ_{C} 78,34 (C – 3), ao passo que, a análise do espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (Figura 62, p. 164) mostrou conectividade entre os hidrogênios com ressonâncias em δ_{H} 3,38 (H – 3) e 1,84 (H – 2a). A multiplicidade do sinal em δ_{H} 3,38 do hidrogênio H – 3 permitiram calcular valores de acoplamento ($J = 10,0$ e $5,0$ Hz) compatíveis com interação *axial-axial* e *axial-equatorial*, indicando estereoquímica *beta* para o grupo hidroxila. Considerando as evidentes interações

dos sinais dos hidrogênios de dois grupos metila com os sinais dos carbonos olefínicos não hidrogenados no espectro HMBC (Figura 60, p. 162), a ligação dupla foi localizada entre os carbonos C – 8 e C – 9, ou seja, em acordo com as correlações observadas entre os grupos 3H-25 (δ_H 0,99) e 3H-26 (δ_H 1,05) com os carbonos C – 8 (δ_C 134,89) e C – 9 (134,45), respectivamente. Esta condição teve como base a possível modificação estrutural do esqueleto triterpênico ursano/oleanano em consequência de formação de ligação dupla entre os carbonos C – 8 e C - 9 com migração dos grupos metila 3H-26 e 3H-27 para os carbonos C – 14 e C – 13, respectivamente. Triterpenos com esta característica estrutural já foram observados em ocasiões anteriores (AKIYAMA; HAYASHI, 2002). Em adição, o experimento HMBC ($^2J_{CH}$) (Figura 60, p. 162) demonstrou que o sinal (δ_H 1,42) dos hidrogênios de um dos grupos metila interage com o sinal (δ_C 181,68) do carbono do grupo carboxila. Esta observação foi justificada admitindo que um dos grupos metila (3H-29) no triterpeno do tipo oleanano foi oxidado, modificação estrutural também já observada em outros exemplos (CHO *et al.*, 1992; TABATA *et al.*, 1993).

Assim, LOS 6 foi caracterizado como sendo o 3 β -hidroxi-D:C-friedo-olean-8-en-29-óico, conhecido como ácido brionólico, um triterpeno relativamente raro e para o qual, uma série de atividades farmacológicas (CHO *et al.*, 1992; CHIE *et al.*, 2002) já foram relatadas por alguns autores.



Diversas outras correlações de confirmação da estrutura foram observadas nos espectros bidimensionais [1H x 1H COSY (Figura 62, p. 164), 1H x ^{13}C HMQC ($^1J_{CH}$) (Figura 61, p. 163) e 1H x ^{13}C HMBC ($^{2,3}J_{CH}$) (Figura 60, p. 162)]. As correlações dos espectros HMQC e HMBC foram relacionadas na Tabela 14, p. 156. Algumas extraídas do experimento HMBC foram indicadas nas subestruturas abaixo.



Quadro 5- Subestruturas para LOS 6, mostrando as correlações a mais de uma ligação observadas no espectro de HMBC.

Conforme pesquisa bibliográfica, este é o primeiro relato de isolamento dessa substância a partir de *Luffa operculata*, embora comum em algumas espécies da família Cucurbitaceae (CHIE *et al.*, 2002).

Tabela 13- Deslocamento químico de carbono-13 (δ) para LOS 6 obtidos dos deslocamentos de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

C (δ)	CH (δ)	CH ₂ (δ)	CH ₃ (δ)	TOTAL
31,60	45,46	19,91	16,82	
37,99	51,25	21,37	18,28	
38,12	78,34**	25,77	20,43	
39,71		28,27	22,69	
40,91		28,97	28,93	
42,44		30,82	31,44	
134,89		30,98	33,64	
134,45		31,74		
181,68*		35,37		
		35,82		
		37,81		
C₉O₂	C₃H₃O	C₁₁H₂₂	C₇H₂₁	C₃₀H₄₈O₃

* Oxigênios devidos a um grupo CO₂

** Oxigênio devido a um grupo hidroxila OH

Tabela 14- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ de LOS 6 . Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.

C	HMQC		HMBC
	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{CH}}$
4	39,71	-	3H-23; 3H-24
8	134,89	-	3H-26
9	134,45	-	3H-25
10	38,12	-	3H-25
13	37,99	-	3H-27; 3H-26
14	42,44	-	3H-26; 3H-27
17	31,60	-	H-19a
20	40,91	-	H-19a; 3H-30
29	181,68	-	H-19a; H-19b; 3H-30
CH			
3	78,34	3,38 (dd, 10,0; 5,0)	3H-23; 3H-24; 3H-25
5	51,25	1,08	3H-23; 3H-24; 3H-25
18	45,46	1,57	3H-28
CH₂			3H-25
1	35,82	1,63; 1,84	-
2	28,27	1,84; 2,11	-
6	19,91	1,42; 1,72	-
7	28,97	1,86; 2,59	-
11	21,37	1,90; 1,94	-
12	30,82	1,49; 1,22	3H-27
15	25,77	1,37; 1,72	-
16	37,81	1,39; 2,75	3H-28
19	31,74	1,70; 2,73	-
21	30,98	1,46; 1,84	3H-30
22	35,37	1,03; 2,45	3H-28
CH₃			
23	28,93	1,22 (s)	H-3; 3H-23
24	16,82	1,04 (s)	-
25	20,43	0,99 (s)	-
26	22,69	1,05 (s)	-
27	18,28	1,28 (s)	-
28	31,44	1,08 (s)	-
30	33,64	1,42 (s)	-

Tabela 15- Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C em $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ de LOS 6 com dados descritos na literatura em DMSO- d_6 (KHALLOUKI *et al.*, 2009).

Carbonos	LOS 6	Ácido Brionólico (KHALLOUKI <i>et al.</i> , 2009)
1	35,82	34,62
2	28,27	27,57
3	78,34	76,71
4	39,71	38,35
5	51,25	50,13
6	19,91	18,77
7	28,97	27,02
8	134,89	133,22
9	134,45	133,72
10	38,12	37,03
11	21,37	20,07
12	30,82	29,70
13	37,99	36,63
14	42,44	41,27
15	25,77	24,55
16	37,81	36,66
17	31,60	30,47
18	45,46	44,18
19	31,74	29,98
20	40,91	39,36
21	30,98	29,42
22	35,37	33,96
23	28,93	28,02
24	16,82	15,89
25	20,43	19,59
26	22,69	21,71
27	18,28	17,13
28	31,44	30,94
29	181,68	179,54
30	33,64	32,53

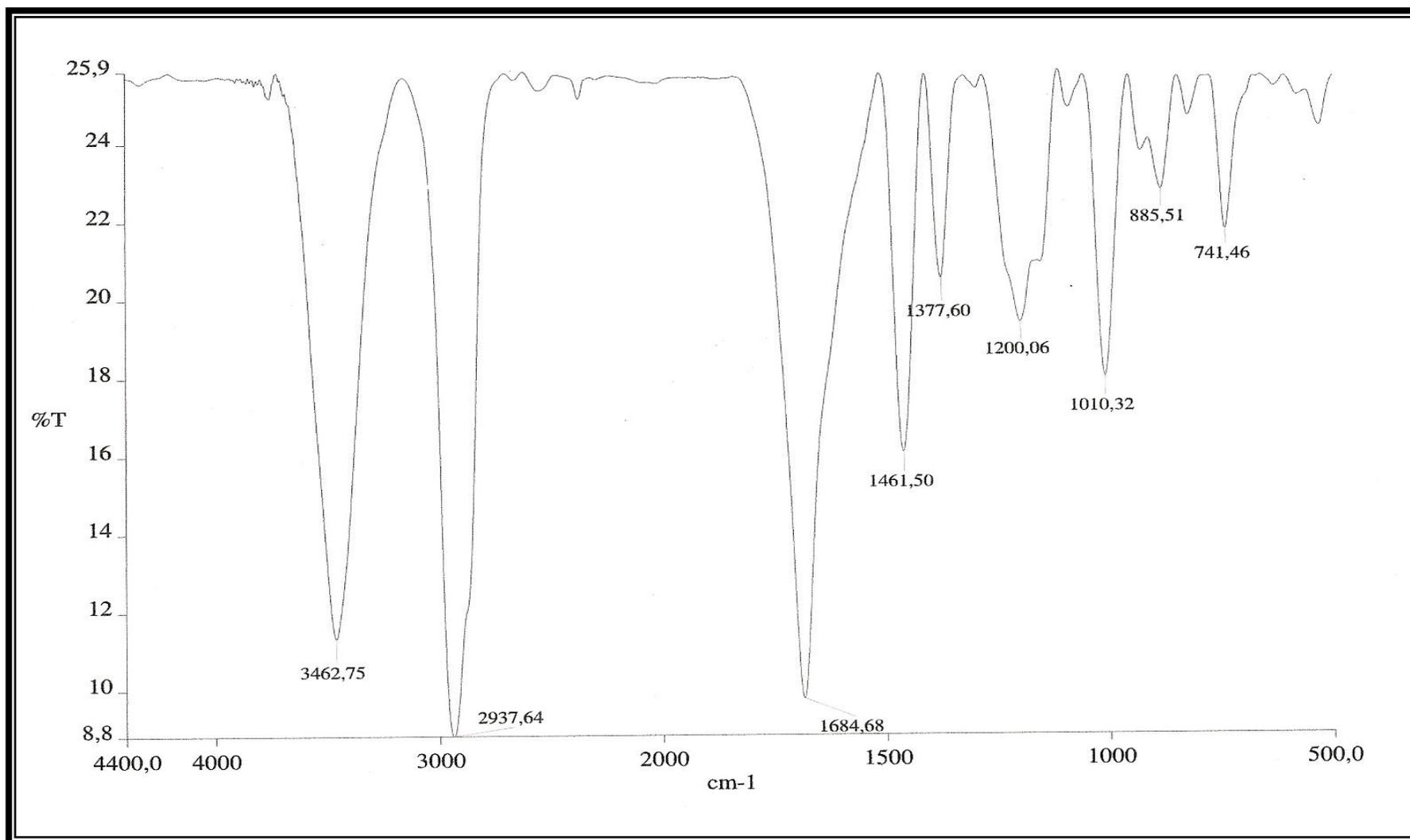


Figura 56- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 6

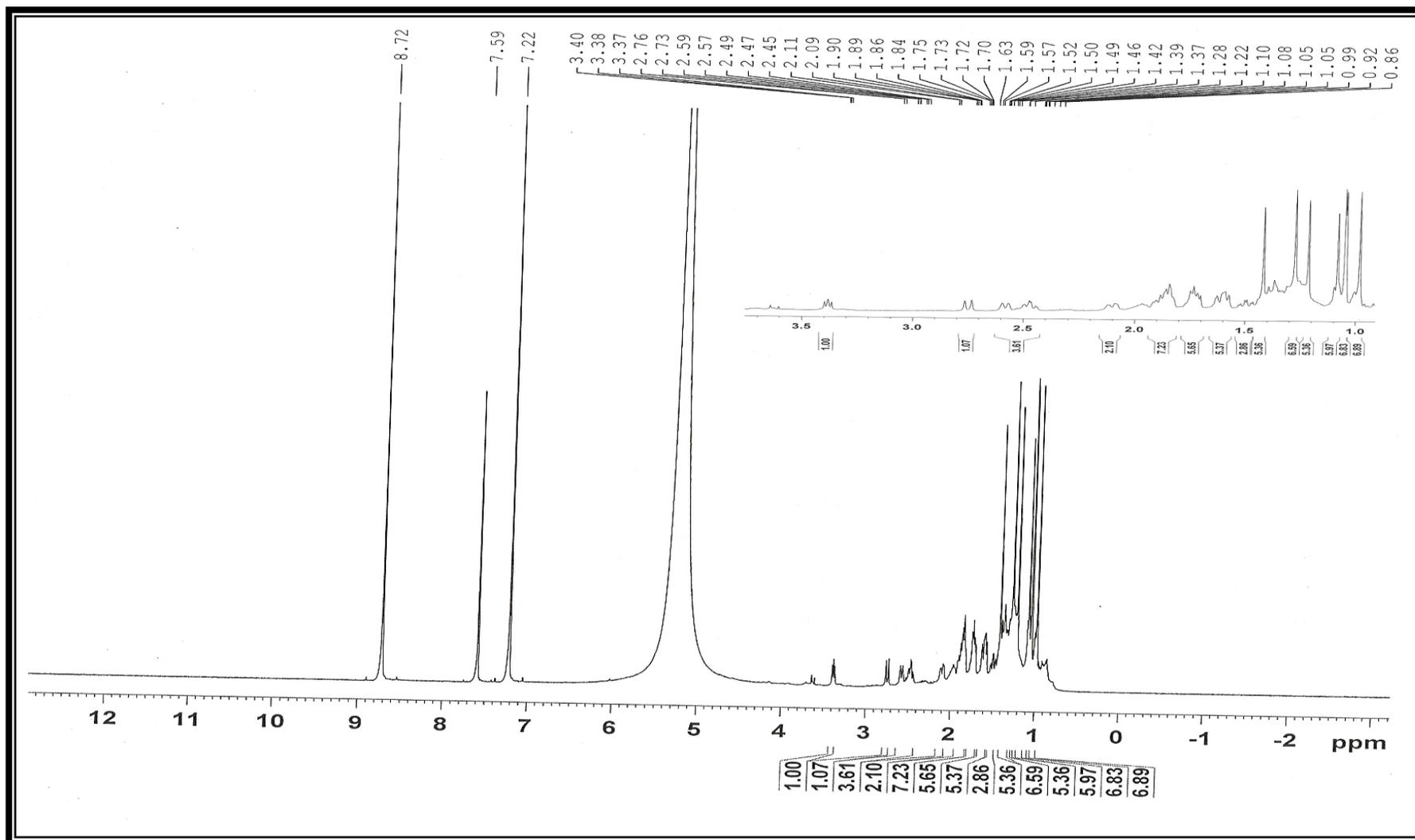


Figura 57- Espectro de RMN ¹H de LOS 6 (500 MHz, C₅D₅N)

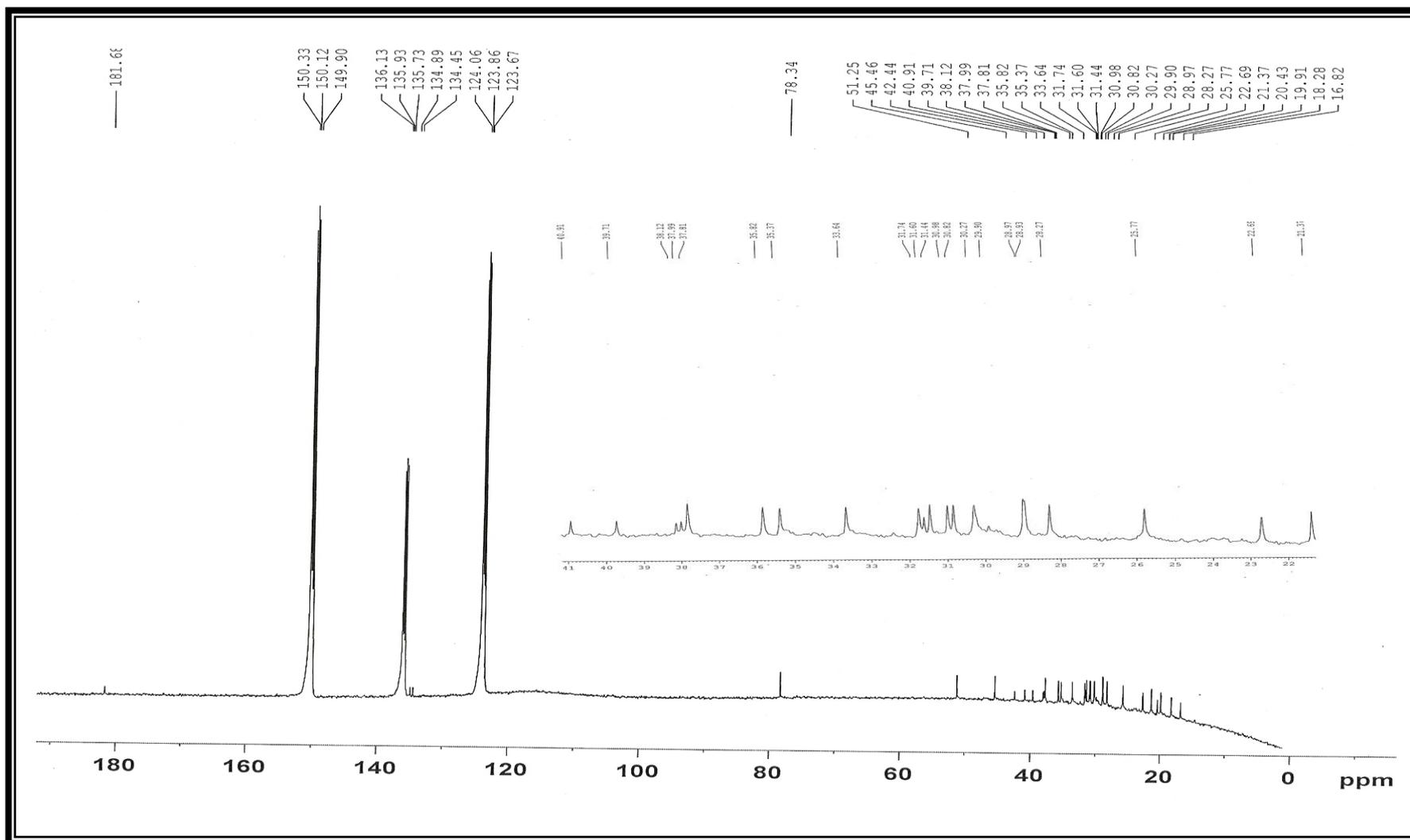


Figura 58- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 6 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

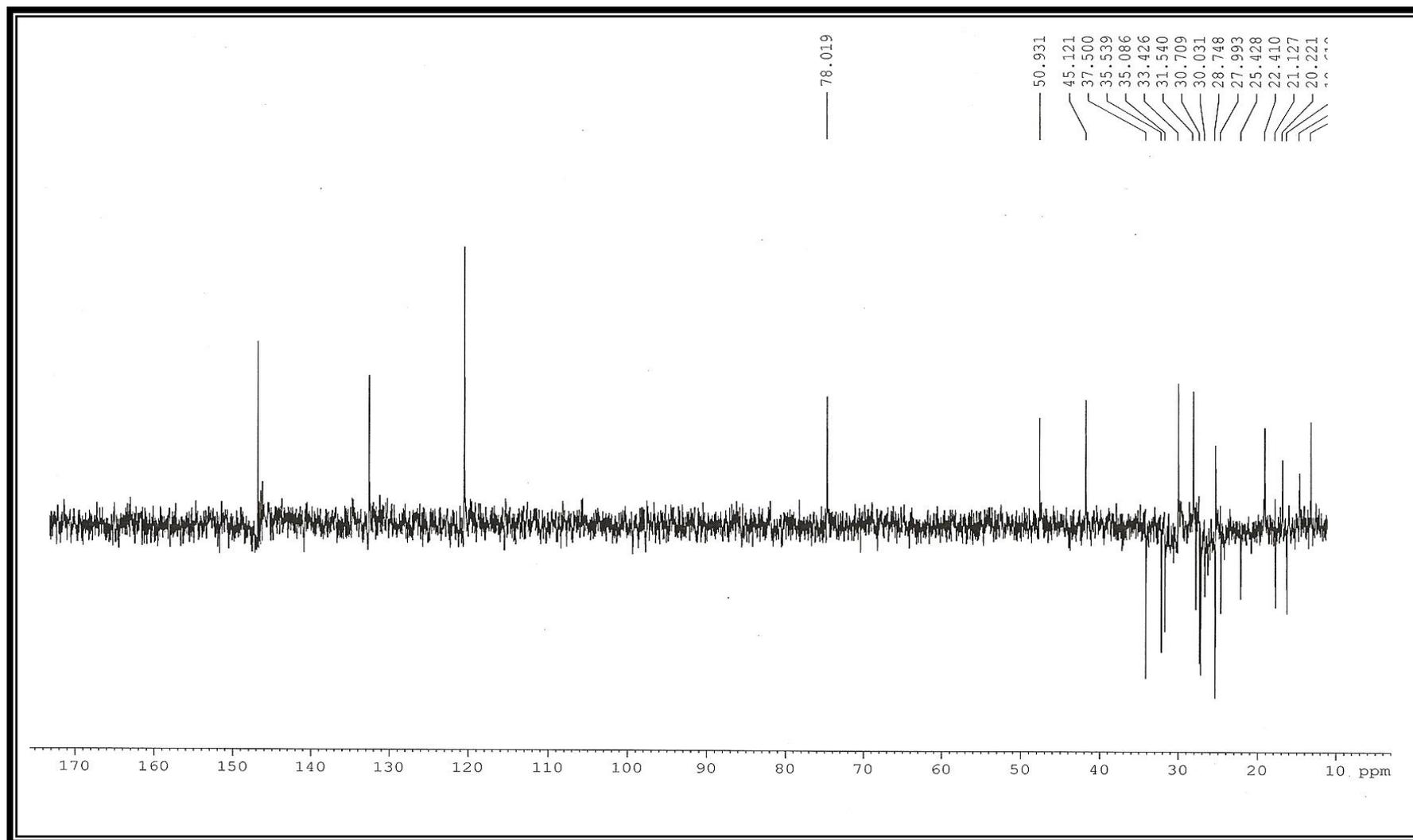


Figura 59- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 6 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

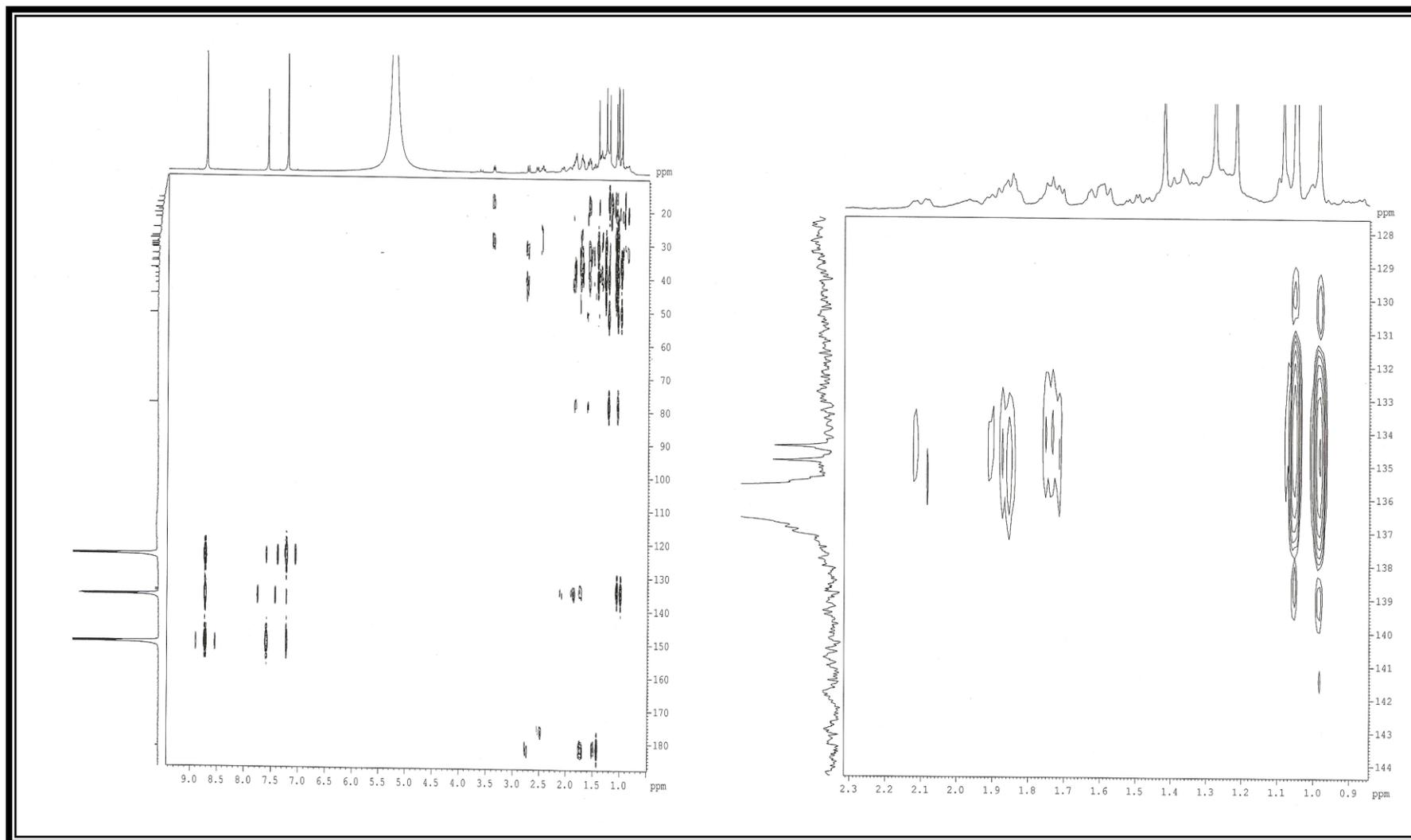


Figura 60- Espectro HMBC de LOS 6 (500 e 125 MHz, C₅D₅N)

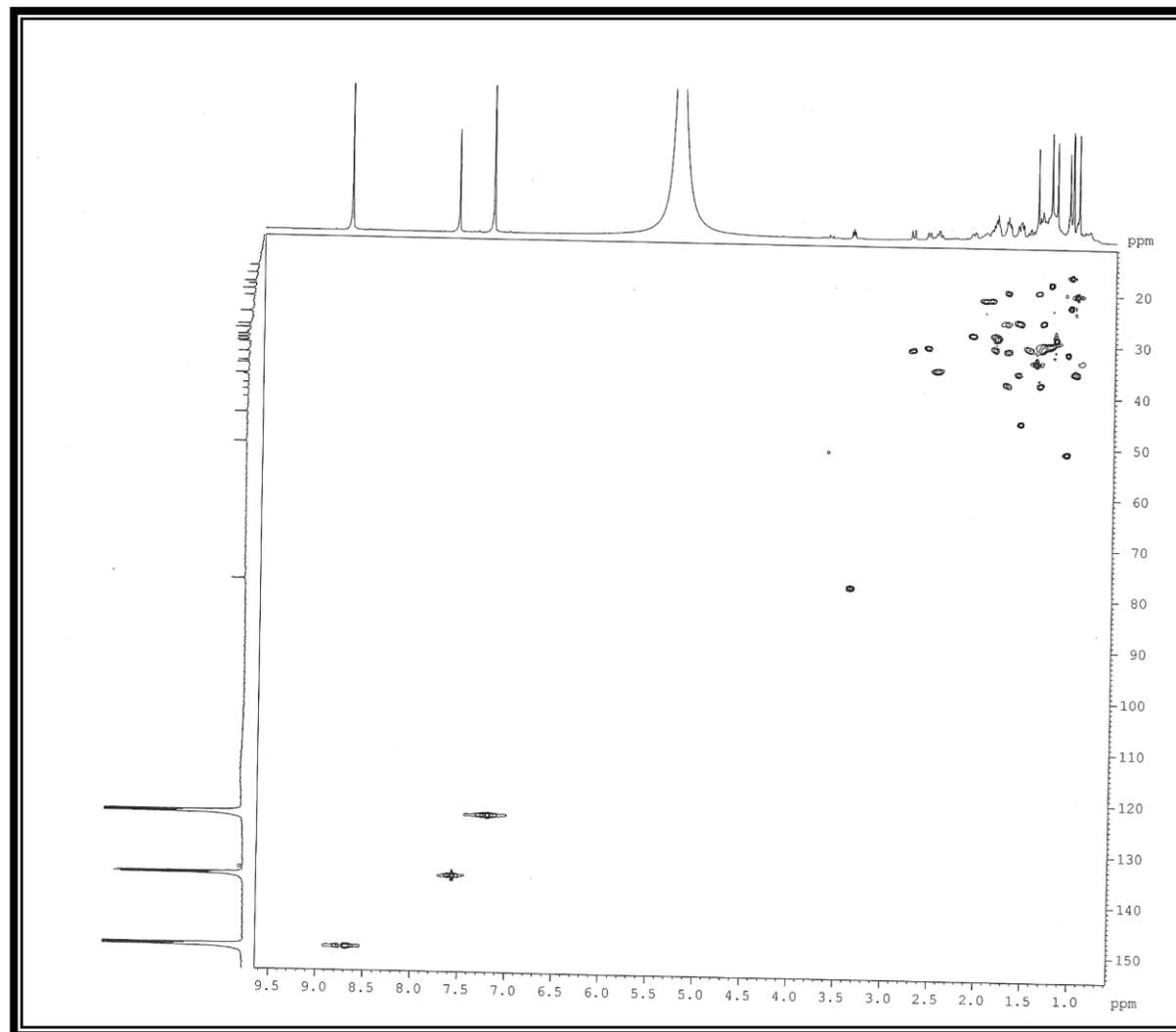


Figura 61- Espectro HMQC de LOS 6 (500 e 125 MHz, C_3D_5N)

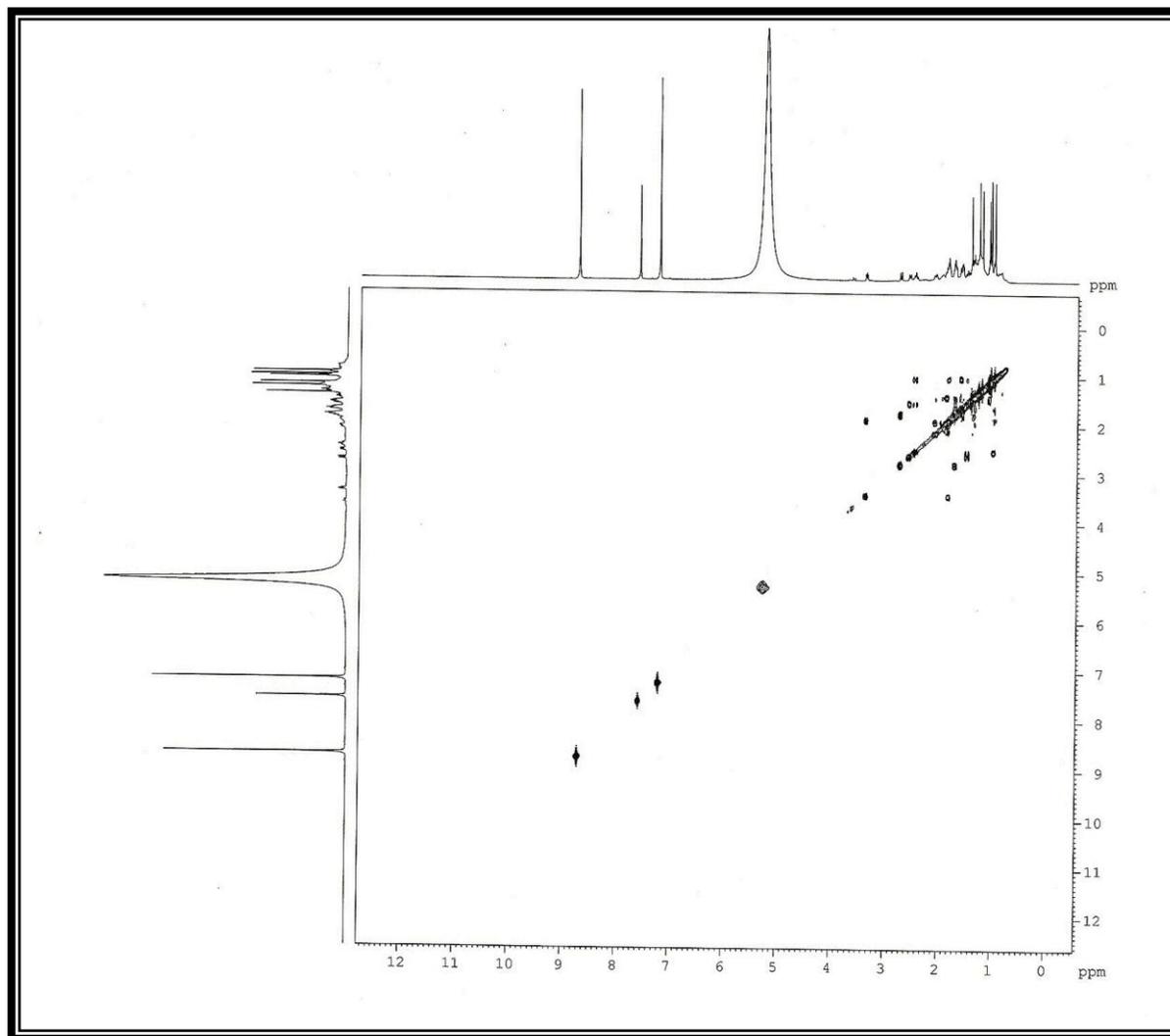


Figura 62- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 6 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

3.9 LOS 11 (17)

A fração acetato de etila do extrato etanólico dos frutos de *L. operculata* foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e permitiu o isolamento de um constituinte químico como um sólido amorfo levemente amarelado solúvel em metanol, com ponto de fusão 150,4 – 150,6 °C, denominado LOS 11.

O espectro de absorção na região do IV (Figura 63, p. 172) de LOS 11 mostrou, como destaques, bandas características de grupos hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$ 3.433 cm^{-1}), metila e metileno ($\nu_{\text{C-H}}$ 2.975 e 2.935 cm^{-1} ; $\delta_{\text{CH}_3/\text{CH}_2}$ 1.396 e 1.461 cm^{-1}), ligações olefinicas ($\nu_{\text{C=C}}$ \approx 1.631 cm^{-1}), carbonila ($\nu_{\text{C=O}}$ 1.688 cm^{-1}) e bandas relativas a deformação axial de ligação C – O ($\nu_{\text{C-O}}$ 1.206, 1.286 e 1.140 cm^{-1}) atribuídas à função álcool.

O espectro de RMN ^{13}C CPD (Figura 64, p. 173), exibiu trinta sinais indicando um metabólito de natureza triterpenoidal, sendo, vinte e três na região de carbonos saturados (δ_{C} 19,20 a 81,32) e sete na de carbonos insaturados (δ_{C} 121,44 a 215,91). A presença de grupos carbonílicos (δ_{C} 205,20, 213,20 e 215,91) e a multiplicidade individual dos sinais foram determinadas através de espectro de RMN ^{13}C em combinação com o espectro usando a sequência de pulsos DEPT 135° (Figura 65, p. 174). Assim, foi possível deduzir que dos carbonos saturados, seis [δ_{C} 42,61, 49,40, 49,50, 51,87 (carbonos quaternários) e 71,85 e 80,09 (carbonos não hidrogenados e oxigenados)], cinco [δ_{C} 34,23, 44,38, 59,68, 71,64 e 81,32 (os dois últimos oxigenados)] metínicos, quatro (δ_{C} 24,89, 38,15, 46,94 e 50,03) metilênicos e oito (δ_{C} 19,20, 19,56, 20,89, 24,94, 25,57, 27,76 e 2 x 29,38) metílicos e, dos carbonos insaturados três (δ_{C} 205,20, 213,20 e 215,91) eram devidos a carbonilas de função cetona, três (δ_{C} 121,44, 123,05, 155,50) metínicos e, um (δ_{C} 141,34) de carbono não hidrogenado (Tabela 16, p. 166).

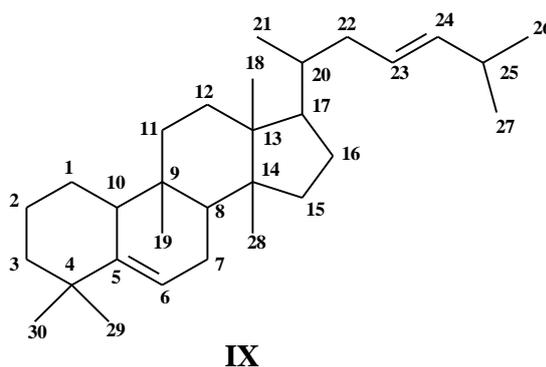
Tabela 16– Deslocamentos químicos de carbono-13 (δ) para LOS 11 obtidos dos deslocamentos de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD).

C (δ)	CH (δ)	CH ₂ (δ)	CH ₃ (δ)	TOTAL
42,61	34,23	24,89	19,20	
49,40	44,38	38,15	19,56	
49,50	59,68	46,94	20,89	
51,87	71,64 ^{**}	50,03	24,90	
80,09 [*]	81,32 ^{**}		25,57	
71,85 [*]	121,43		27,76	
141,34	123,05		29,38	
205,20 [*]	155,49		29,38	
213,20 [*]				
215,91 [*]				
C₁₀O₅[*]	C₈H₈O₂^{**}	C₄H₈	C₈H₂₄	C₃₀H₄₄O₇

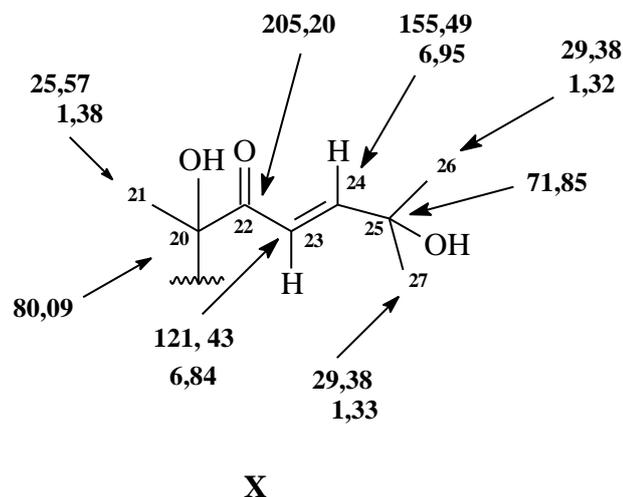
^{*} Oxigênios devidos a três grupos C=O e a dois grupos OH

^{**} Oxigênios devidos a dois grupos OH

Os dados da Tabela 16 permitiram propor a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7$ de LOS 11 e demonstraram um alto grau de oxidação (sete carbonos oxigenados), compatível com triterpeno do tipo cucurbitano, conhecidos como cucurbitacinas. Esses triterpenoides derivam do esqueleto lanostano-5,23-dieno (**IX**) e são bioprodutos característicos da família Cucurbitaceae. Em acordo com essas observações, os dados espectrais de RMN ^{13}C de LOS 11 revelaram, de modo geral, estreita similaridade com dados correspondentes registrados (SMITH *et al.*, 2000) para cucurbitacinas.



Em concordância com os dados (Tabela 16, p.166) do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD , Figura 64, p. 173), o espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) (Figura 66, p. 175) de LOS 11 revelou a presença de oito grupos metila terciário ligados a carbonos saturados (δ_{H} 0,90, 0,94, 1,04, 1,22, 1,32, 1,33, 1,38 e 1,39). Os sinais com deslocamentos químicos relativamente altos (δ_{H} 1,32, 1,33 e 1,38) foram justificados pela localização destes grupos metila em carbonos oxigenados. Estes dados estão em acordo com o padrão de oxigenação comumente observado na cadeia lateral das curcubitacinas (VELDE; LAVIE, 1983; HALAWEISH, 1993), exigindo a localização de grupos hidroxila nos carbonos C-20 e C-25. Os deslocamentos químicos em δ_{C} 80,09 (C-20) e 71,85 (C-25) dos carbonos não hidrogenados confirmaram esta condição. Em adição, um par de dupletos ($J = 15,5$ Hz) em δ_{H} 6,84 e 6,95 foram consistente com um típico sistema AB de hidrogênios olefínicos conjugados em uma ligação dupla com estereoquímica *trans*. Os sinais para esses hidrogênios com deslocamentos químicos, relativamente, altos, sugerem a conjugação da ligação $\text{C}=\text{C}$ com um grupo carbonila. Esta proposta é compatível com o sinal no espectro de RMN ^{13}C (Figura 64, p. 173) em δ_{C} 205,20 e com as absorções no infravermelho (Figura 63, p. 172) em 1.631 e 1.688 cm^{-1} , condição plenamente conciliável com uma carbonila cetônica α,β -insaturada. Assim, a partir dessas observações e deduções, foi possível projetar o segmento estrutural **X**.



Esse segmento foi facilmente identificado no espectro HMBC (Figuras 67 e 68, p. 176 e 177) através das correlações a longa distância dos hidrogênios olefínicos (δ_{H} 6,84; $^2J_{\text{CH}}$ e 6,95; $^3J_{\text{CH}}$) e dos hidrogênios metílicos 3H-21 (δ_{H} 1,39; $^3J_{\text{CH}}$) com o carbono carbonílico (δ_{C} 205,20), assim como, dos hidrogênios metílicos 3H-26 (δ_{H} 1,38, $^2J_{\text{CH}}$) e 3H-27 (δ_{H} 1,38, $^2J_{\text{CH}}$)

com o carbono oxigenado C-25 (δ_C 71,85). Os sinais de carbonos olefínicos mono-hidrogenados no espectro de RMN ^{13}C em δ_C 121,43 (CH-23) e 155,49 (CH-24), corroboram esta dedução. A estrutura parcial acima está em pleno acordo com o sinal do carbono metínico com deslocamento químico relativamente alto (δ_C 155,49), compatível com um carbono β em um sistema carbonílico α,β -insaturado e que exibe picos de correlação no espectro de HMBC (Figura 67, p. 176) com os sinais em δ_H 1,32 e 1,33 (2 x CH_3), conseqüentemente, atribuído aos hidrogênios metílicos 3H-26 e 3H-27. O carbono C-16 nesses triterpenóides, também é naturalmente oxigenado. Em vista disso, um terceiro grupo hidroxila foi localizado nessa posição, justificando o carbono metínico oxigenado (δ_C 71,64) previsto na Tabela 17, p. 170 e fundamentando o segundo hidrogênio oximetínico (H-16, δ_H 4,48, t, $J = 8,5$). Em acordo, este hidrogênio exibe através dos espectros $^1H \times ^1H - COSY$ (Figura 69, p. 178) e HMBC (Figura 68, p. 177), correlações com um dos hidrogênios H-15 (δ_H 1,85) e H-17 (δ_H 2,57) e, com os carbonos C-14 (δ_C 49,40) e C-20 (δ_C 80,09), respectivamente. Estas correlações em conjunto estabeleceram inequivocamente a posição dos grupos hidroxilas nos carbonos C-16 e C-20 (Tabela 17, p. 170). Por outro lado, considerando os átomos de carbono C-2 e C-3 oxigenados, uma situação usual para esse tipo de triterpenóides, o sistema 3-hidroxi-2-oxo permitiu justificar o simpleto em δ_H 4,08 no espectro de RMN 1H (Figura 66, p. 175) atribuído ao hidrogênio hidroximetino H-3, adjacente a um carbono carbonílico (C-2) e a um carbono não hidrogenado (C-4). A alternativa configuracional 3 α -hidroxi-2-oxo teve como base os deslocamentos químicos em δ_C 38,15 e 42,61 atribuídos aos carbonos C-1 (CH_2) e C-4, respectivamente, em concordância com substâncias semelhantes publicadas (MONTE *et al.*, 2003). Quando o grupo hidroxila ocupa posição axial esses carbonos têm deslocamentos químicos em torno de 36,00 e 40,00 ppm, respectivamente. Essas diferenças são consistentes com o efeito *gamma* no carbono C-1 atribuído ao grupo hidroxila *axial* no C-3, no caso 3 β -hidroxi-2-oxo há um maior efeito *beta* da função hidroxila na posição equatorial quando comparada com a influencia deste substituinte na orientação axial (MONTE *et al.*, 2003). No espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio e hidrogênio ($^1H \times ^1H - COSY$) (Figura 69, p. 178), o hidrogênio H-3 (δ_H 4,08) não exibiu correlação com os hidrogênios 2H-1 (δ_H 2,21 e 2,25), conforme previsto, contudo, os hidrogênios 2H-1 mostraram correlação com o hidrogênio H-10 (δ_H 3,09) vicinal. O terceiro grupo oxo foi posicionado no carbono C-11 (δ_C 215,91) devido aos evidentes acoplamentos no espectro HMBC (Figura 67, p. 176) deste carbono com os hidrogênios em δ_H 2,59 e 3,34 que absorvem como dois dupletos com constante de acoplamento ($J = 14,0$ Hz) geminal, típico de

hidrogênios de um sistema AB. Assim, essas ressonâncias foram atribuídas ao grupo metileno isolado no carbono C-12, *alfa* á carbonila. A função cetona na posição C-11 é comum em cucurbitacinas (SEGER *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2000). No espectro de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono a longa distância ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC – $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) a correlação ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio H-16 (δ_{H} 4,48) e o carbono C-20 (δ_{C} 80,09) comprova a ligação da cadeia lateral ao carbono C-17 (δ_{C} 59,68) do esqueleto tetracíclico.

As correlações para todos os átomos de hidrogênio e carbono (Tabela 17, p. 170) foram deduzidas com base na aplicação de parâmetros de deslocamentos químicos usuais, padrão de hidrogenação dos sinais de carbono (DEPT), análise dos espectros de experiências bidimensionais de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY) e hereronuclear [$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) e $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$)] e com dados descritos na literatura para substâncias semelhantes.

Assim, os dados extraídos dos espectros no IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C permitiram identificar LOS 11 como sendo a cucurbitacina 3 α -16 α -20 (R), 25-tetra-hidroxi-2,11,22-trioxo-5,23(*E*)dieno, conhecida comumente como 3-epi-isocucurbitacina D. Apesar de já registrada na literatura (SARKER *et al.*, 1999, Tabela 18, p. 171), seu isolamento a partir de *L. operculata* é descrito pela primeira vez, sendo portanto, inédita para a espécie.

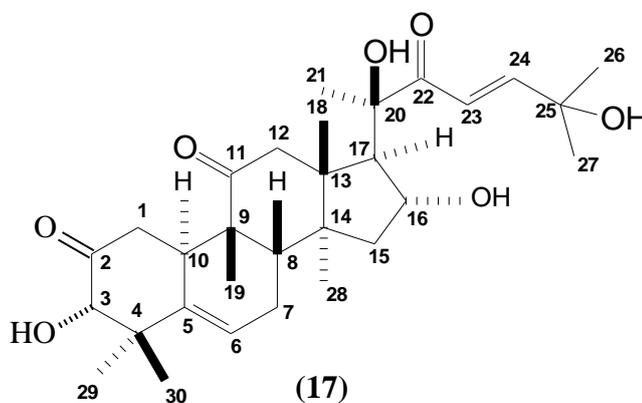


Tabela 17- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em CD_3OD de LOS 11. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.

C	HMQC		HMBC
	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{CH}}$
2	213,20	-	H-1a; H-3; 3H-30
4	42,61	-	H-3; 3H-29; 3H-30
5	141,34	-	3H-29; 3H-30
9	49,50	-	H-8; 2H-12; 3H-19
11	215,91	-	H-12a; 3H-19
13	51,87	-	H-12a; H-17; 3H-18; 3H-21; 3H-28
14	49,40	-	H-16; 3H-18; 3H-28
20	80,09	-	H-16; H-17; 3H-21
22	205,20	-	H-17; 3H-21; H-23; H-24
25	71,85	-	H-23; H-24
CH		-	
3	81,32	4,08 (s)	3H-29; 3H-30
6	123,05	5,90 (d, 5,1)	-
8	44,38	2,01	3H-19; 3H-28
10	34,23	3,09	3H-19
16	71,64	4,48 (t, 8,5)	H-15b; H-17
17	59,68	2,57 (d, 6,6)	3H-18; 3H-21
23	121,43	6,84 (d, 15,5)	H-24; 3H-26; 3H-27
24	155,49	6,95 (d, 15,5)	H-23; 3H-26; 3H-27
CH₂			
1	38,15	2,21/2,25	-
7	24,89	1,99/2,05	H-8
12	50,03	2,59/3,34 (d, 14,0)	3H-18
15	46,94	1,56/1,85 (dd, 13,3 e 9,5)	3H-28
CH₃			
18	20,89	0,90 (s)	2H-12a; H-17
19	19,56	1,04 (s)	-
21	25,57	1,38 (s)	-
26	29,38	1,32 (s)	H-24; 3H-26; 3H-27
27	29,38	1,33 (s)	3H-26
28	19,20	1,39 (s)	H-15a
29	24,90	0,94 (s)	3H-30
30	27,76	1,22 (s)	3H-29

Tabela 18- Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) em CD_3OD de LOS 11 com dados descritos na literatura em CDCl_3 (SARKER *et al.*, 1999).

Carbonos	LOS 11	3-epi-isocucurbitacina D (SARKER <i>et al.</i> , 1999)
1	38,15	36,4
2	213,20	210,9
3	81,32	79,5
4	42,61	40,9
5	141,34	140,1
6	123,05	-
7	24,89	23,7
8	44,38	42,4
9	49,50	47,9
10	34,23	32,4
11	215,91	212,4
12	50,03	48,7
13	51,87	48,4
14	49,40	50,7
15	46,94	45,6
16	71,64	71,3
17	59,68	57,6
18	20,89	19,9
19	19,56	19,1
20	80,09	78,1
21	25,57	23,9
22	205,20	203,0
23	121,43	119,1
24	155,49	155,5
25	71,85	71,2
26	29,38	29,5
27	29,38	29,3
28	19,20	18,5
29	24,90	24,4
30	27,76	27,7

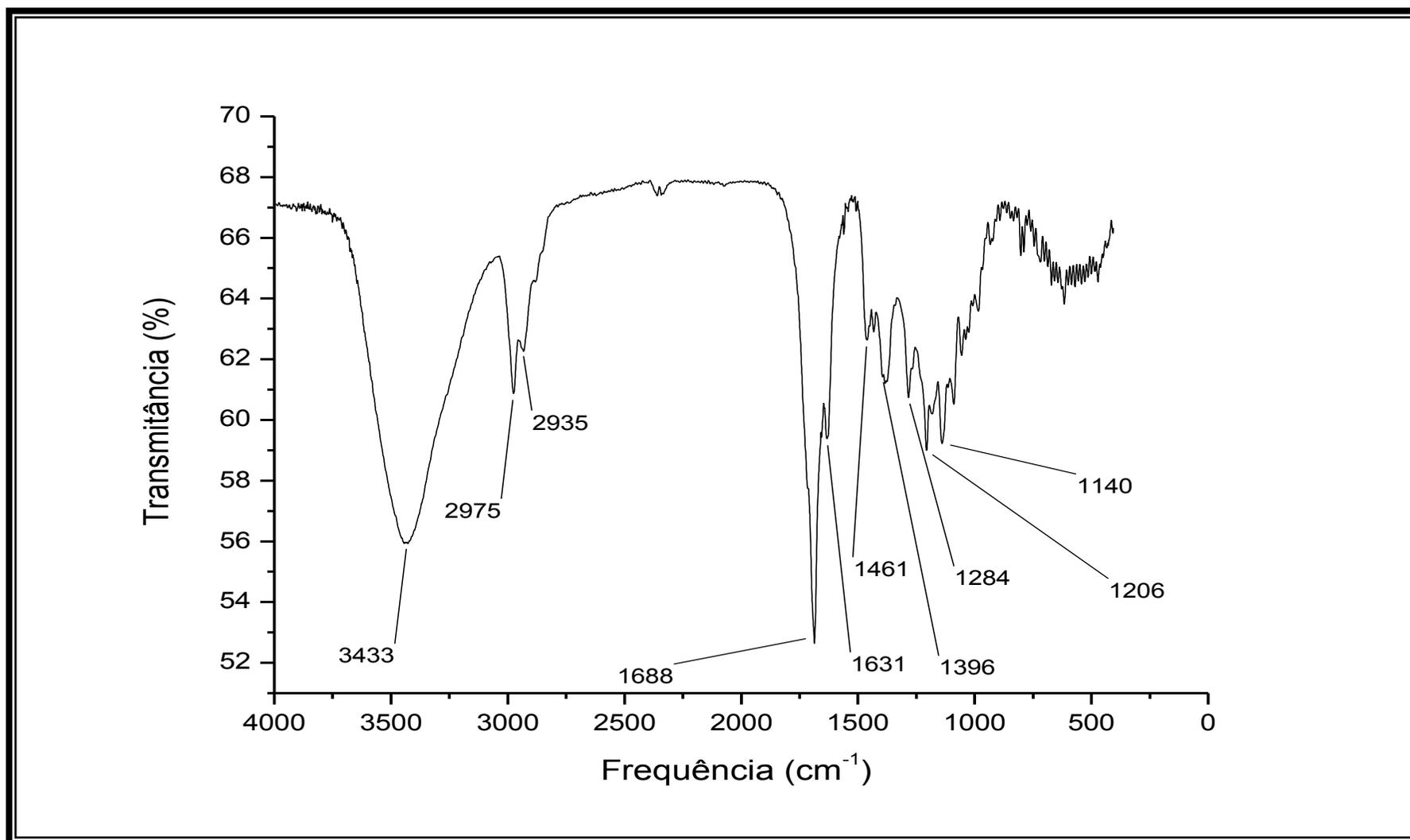


Figura 63- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 11

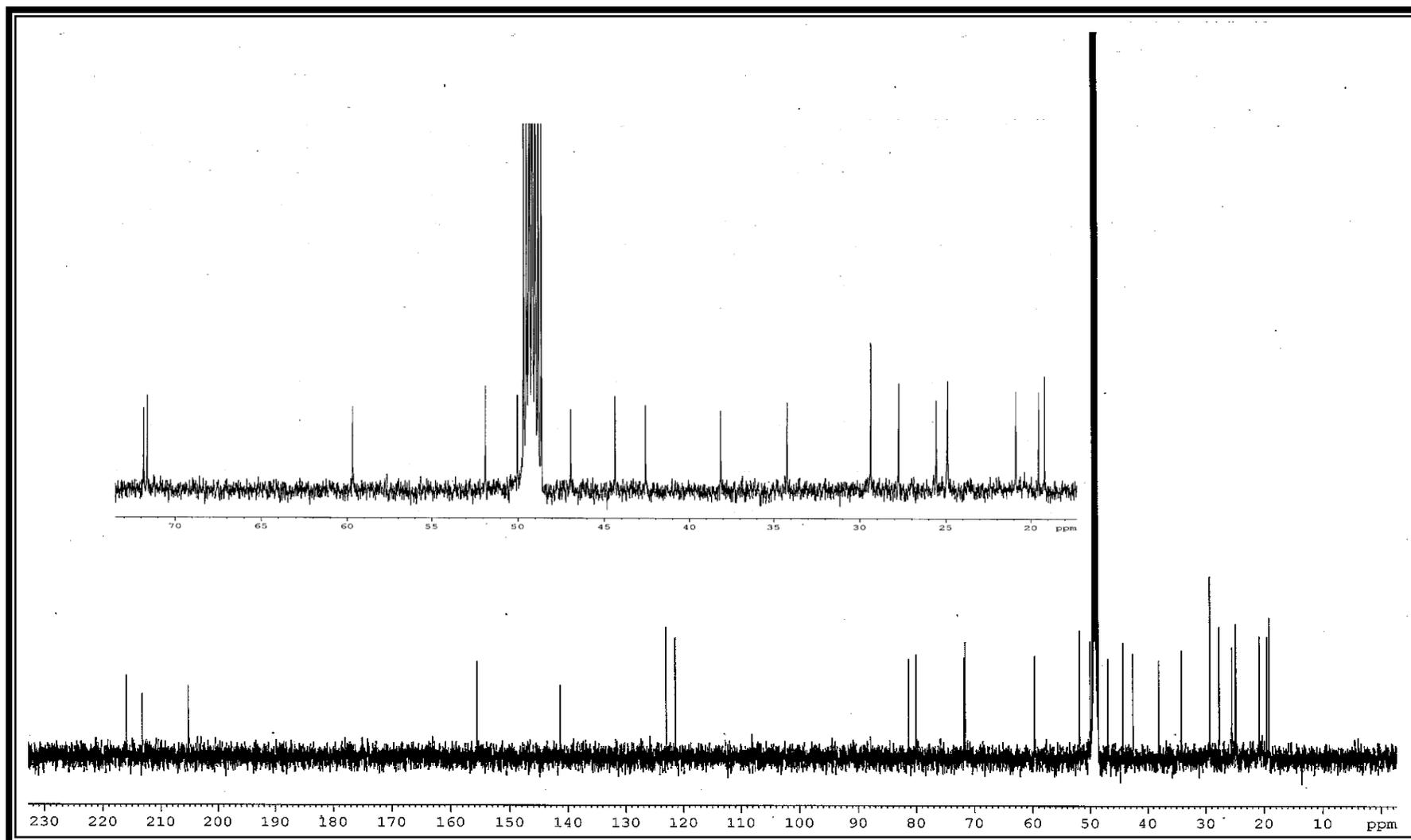


Figura 64- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 11 (125 MHz, CD_3OD)

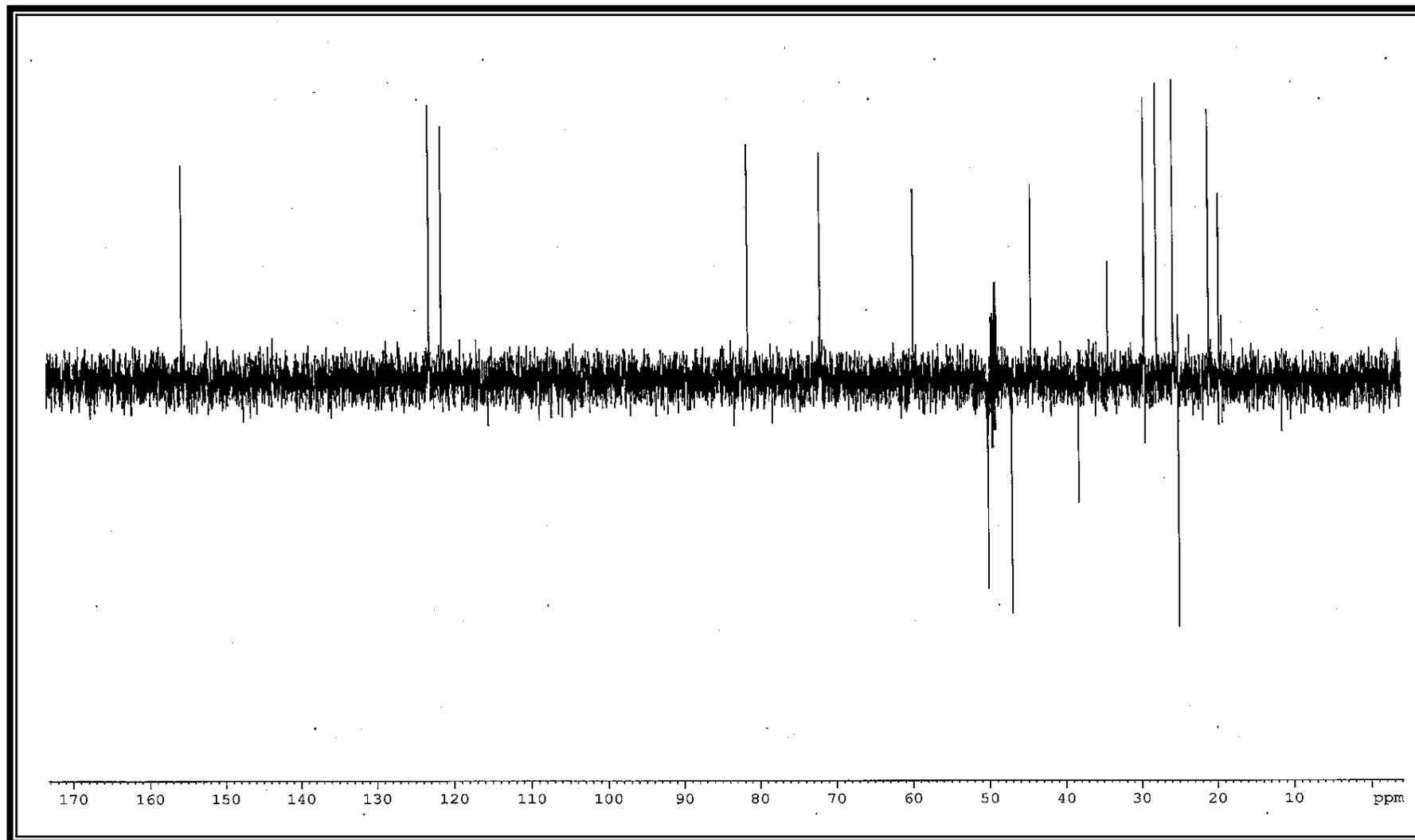


Figura 65- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 11 (125 MHz, CD_3OD)

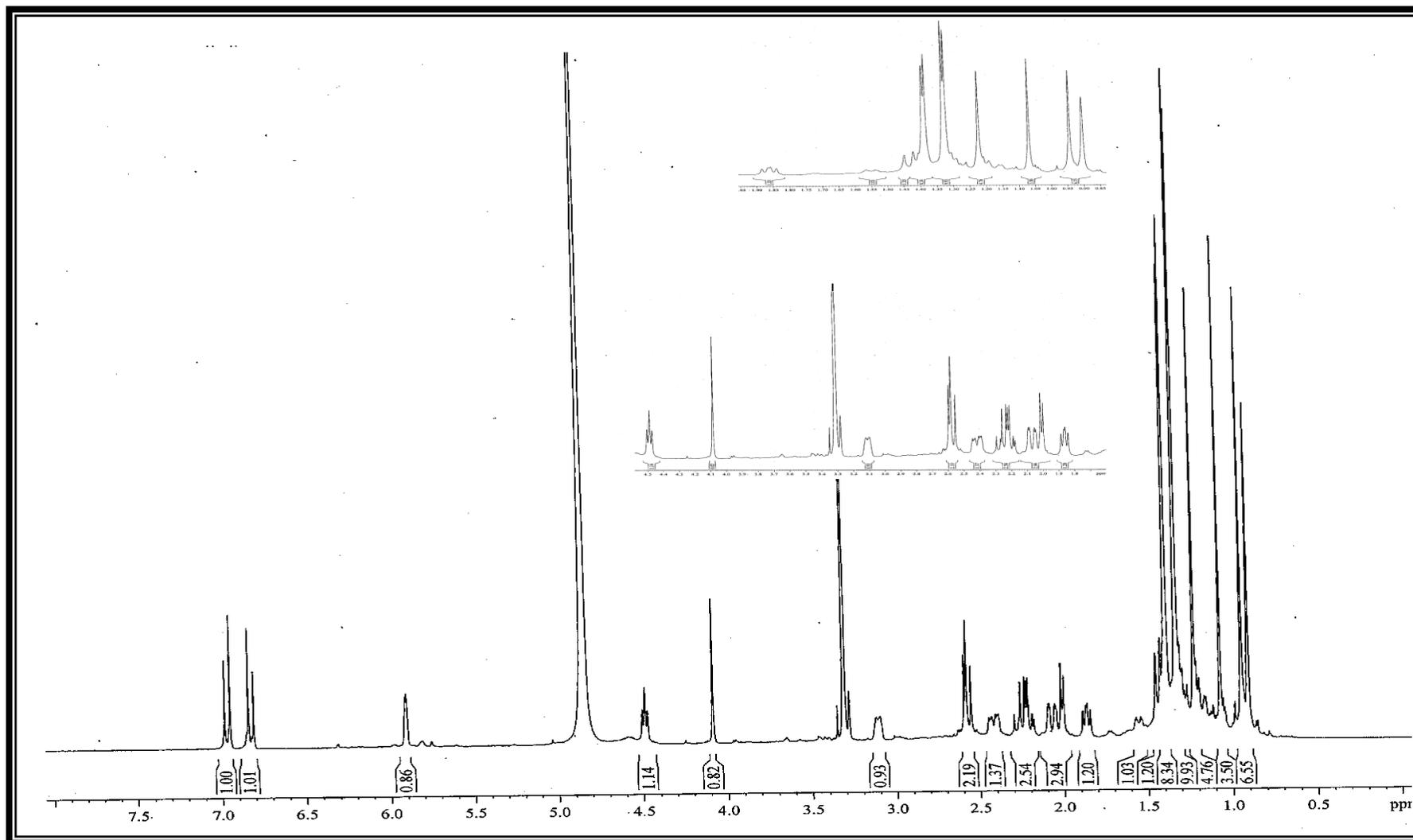


Figura 66- Espectro de RMN ¹H de LOS 11 (500 MHz, CD₃OD)

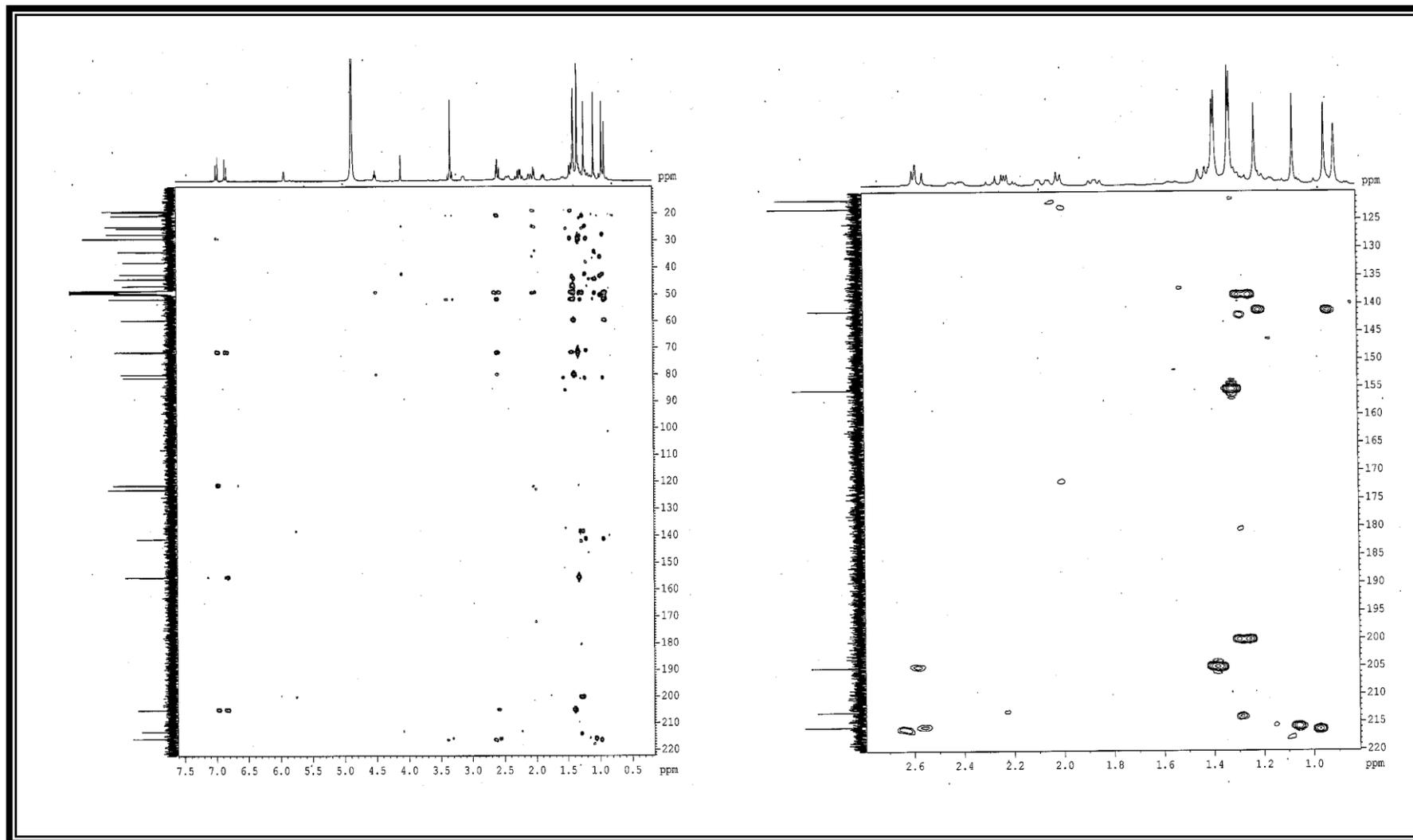


Figura 67- Espectro HMBC de LOS 11 (500 e 125 MHz, CD_3OD)

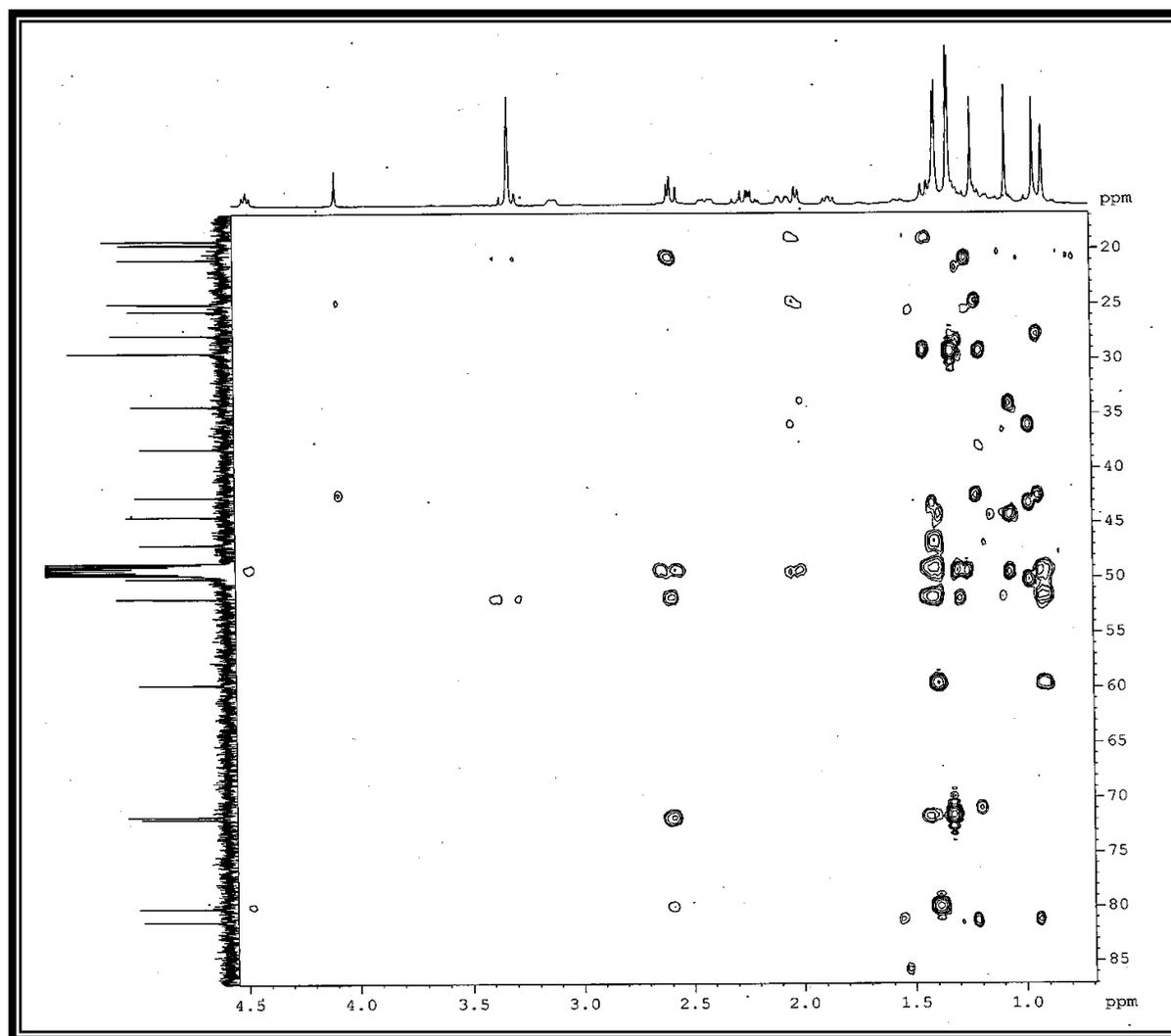


Figura 68- Espectro HMBC (expansão) de LOS 11 (500 e 125 MHz, CD₃OD)

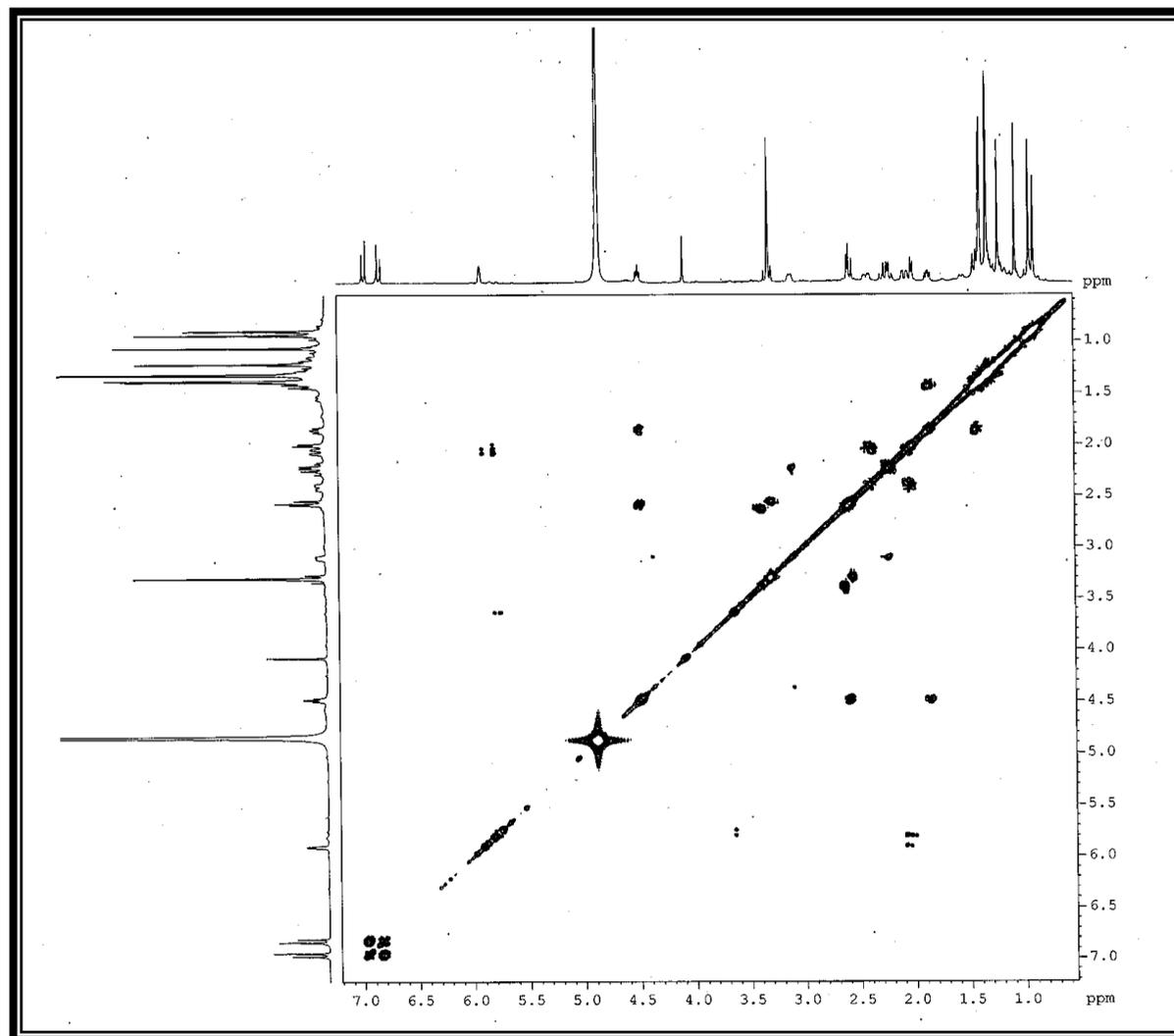


Figura 69- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 11 (125 MHz, CD_3OD)

3.10 LOS 12 (18)

A fração acetato de etila do extrato etanólico dos frutos de *L. operculata*, foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e permitiu o isolamento de um constituinte químico como um sólido amorfo levemente amarelado com ponto de fusão 182,8 – 183,8 °C, denominado LOS 12.

O espectro na região do IV (Figura 70, p. 184) de LOS 12 mostrou, como destaques, bandas características de grupos hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$ 3.434 cm^{-1}), metila e metileno ($\nu_{\text{C-H}}$ 2.974 e 2.930 cm^{-1} ; $\delta_{\text{CH}_3/\text{CH}_2}$ 1.398 e 1.381 cm^{-1}), ligações olefínicas ($\nu_{\text{C=C}}$ \approx 1.627 cm^{-1}), carbonila ($\nu_{\text{C=O}}$ 1.687 cm^{-1}) e bandas relativas a deformação axial de ligação C – O ($\nu_{\text{C-O}}$ 1.205 e 1.137 cm^{-1}) atribuídas à função álcool.

Um total de trinta sinais foi observado no espectro de RMN ^{13}C CPD (Figura 71, p. 185) indicando também, a presença de um triterpeno. A comparação com o espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (Figura 72, p. 186), permitiu reconhecer o padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono e, indicou oito átomos de carbono metílicos, três metilênicos, oito metínicos, e por exclusão, onze átomos de carbono não hidrogenados. Dos oito carbonos metínicos, quatro são olefínicos (δ_{C} 116,85, 121,41, 121,82 e 155,44), um é sp^3 oxigenado (δ_{C} 71,81) e, dos onze não hidrogenados, três são carbonílicos (δ_{C} 200,18, 205,25 e 216,30), dois olefínicos (δ_{C} 138,60 e 146,95) e dois sp^3 oxigenados (δ_{C} 71,61 e 80,13) (Tabela 19, p. 179).

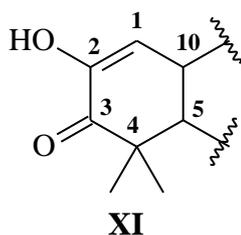
Tabela 19– Deslocamentos químicos de carbono-13 (δ) para LOS 12 obtidos dos deslocamentos de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD).

C (δ)	CH (δ)	CH ₂ (δ)	CH ₃ (δ)	TOTAL
48,61	36,19	24,76	19,06	
48,81	43,47	46,90	20,45	
48,81	59,65	49,68	20,78	
50,16	71,81**		20,93	
80,13*	116,85		25,58	
71,61*	121,41		28,48	
138,60	121,82		29,38	
146,95*	155,44		29,38	
200,18*				
205,25*				
216,30*				
C₁₁O₆*	C₈H₈O**	C₃H₆	C₈H₂₄	C₃₀H₄₂O₇

* Oxigênios devidos a três grupos C=O e três grupos OH

** Oxigênio devido a um grupo hidroxila OH

Assim, os espectros de RMN ^{13}C (Figura 71, p.185) e de RMN ^1H de LOS 12 (Figura 73, p.187), revelaram grande identidade com os de LOS 11, consistentes com a presença do mesmo sistema lanostano-5,23-dieno. A semelhança com LOS 11 foi caracterizada, sobretudo, através dos sinais dos carbonos sp^3 oxigenados em δ_{C} 71,81 (CH-16), δ_{C} 80,13 (CH-20) e δ_{C} 71,61 (CH-25) e, dos sinais de carbono carbonílicos em δ_{C} 205,25 (C-22) e δ_{C} 216,30 (C-11) como em LOS 11. Por outro lado a diferença ficou por conta de sinais adicionais em δ_{C} 116,85 e δ_{C} 146,95 de carbonos olefínicos metínico e não hidrogenado, respectivamente, além de um sinal para um terceiro carbono carbonílico de função cetona registrado em δ_{C} 200,18, deslocamento químico relativamente baixo (LOS 11 em δ_{C} 213,20 e LOS 12 δ_{C} 200,18). Este deslocamento relativamente baixo foi justificado admitindo a localização desta carbonila na posição C-3 conjugada com a ligação olefínica entre os carbonos C-1 e C-2, conforme comparação com substâncias descritas na literatura (SEGER *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2000).



Desta forma, o deslocamento químico em δ_{C} 146,95 foi atribuído ao carbono olefínico ligado a um grupo hidroxila permitindo estabelecer o segmento estrutural (XI), justificado com base no espectro de HMBC (Figura 74, p. 188). Assim, por exemplo, foram observados acoplamentos à longa distância do sinal em δ_{H} 5,76 (H-1, d, $J = 2,73$ Hz) com os sinais dos carbonos em δ_{C} 146,95 (C-2) e em δ_{C} 200,18 (C-3) através de duas ($^2J_{\text{CH}}$) e três ($^3J_{\text{CH}}$) ligações, respectivamente (Tabela 20, p 159, Figura 74, p. 182). Conseqüentemente, o sinal em δ_{C} 116,85 foi correlacionado ao carbono C-1 pela utilização do espectro HMQC (Figura 75, p. 189), confirmado da correlação do sinal em δ_{H} 5,76 (H-1) com o sinal em δ_{C} 116,85 (C-1). Vale ressaltar a correlação homonuclear observada entre os hidrogênios H-1 (δ_{H} 5,76) e H-10 (δ_{H} 3,64) no espectro COSY (Figura 76, p. 190).

As correlações para todos os átomos de hidrogênio e carbono (Tabela 20, p. 182) foram deduzidas com base na aplicação de parâmetros de deslocamentos químicos usuais, padrão de hidrogenação dos sinais de carbono (DEPT), análise dos espectros de experiências bidimensionais de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY) e heteronuclear [$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC

($^1J_{CH}$) e $^1H \times ^{13}C$ HMBC ($^{2,3}J_{CH}$)] e com dados descritos na literatura para substâncias semelhantes.

Assim, os dados extraídos dos espectros no IV, RMN 1H e RMN ^{13}C permitiram identificar LOS 12 como sendo a cucurbitacina 2,16 α ,20(R),25-tetra-hidroxi-3,11,22-trioxo-5,23(E)dieno, conhecida comumente como Cucurbitacina I. Apesar de já registrada na literatura (SEGER *et al*, 2005, Tabela 21, p. 183), seu isolamento a partir de *L. operculata* é descrito pela primeira vez, sendo portanto, inédita para a espécie.

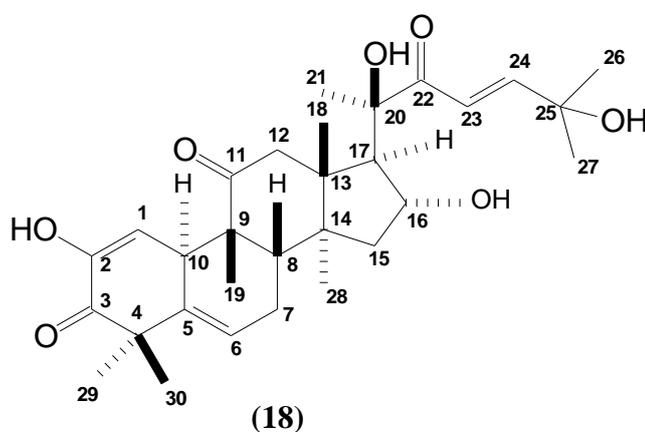


Tabela 20 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em CD_3OD de LOS 12. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.

C	δ_{C}	HMQC		HMBC
		δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{CH}}$	
2	146,95	-	-	H-1
3	200,18	-	-	H-1; 3H-29; 3H-30
4	48,61	-	-	-
5	138,60	-	-	H-1; H-6; H-7a; 3H-29; 3H-30
9	48,81	-	-	3H-19
11	216,30	-	-	2H-12; 3H-18
13	50,16	-	-	H-8; H-17; 3H-18; 3H-28
14	48,81	-	-	H-17; 3H-19; 3H-28
20	80,13	-	-	H-17; 3H-21
22	205,25	-	-	H-17; 3H-21; H-23; H-24;
25	71,61	-	-	H-23; H-24; 3H-26; 3H-27
CH				
1	116,85	5,76 (d, 2,73)	-	-
6	121,82	5,80	-	H-8
8	43,47	2,05	-	3H-18; 3H-19
10	36,19	3,64	-	H-8
16	71,81	4,52 (tl, 7,5)	-	H-15a; H-17
17	59,65	2,60	-	3H-18; 3H-21; 3H-28
23	121,41	6,85 (d, 15,5)	-	H-24
24	155,44	6,99 (d, 15,5)	-	3H-26; 3H-27
CH₂				
7	24,76	2,08/2,37	-	H-8
12	49,68	2,65/3,40 (dl, 14,5)	-	H-12b; H-17; 3H-18; 3H-19; 3H-28
15	46,90	1,45/1,87 (tl, 12,3)	-	-
CH₃				
18	20,45	0,98 (s)	-	-
19	20,78	0,93 (s)	-	H-8; H-15a
21	25,58	1,40 (s)	-	-
26	29,38	1,32 (s)	-	3H-27
27	29,38	1,32 (s)	-	3H-26
28	19,06	1,45 (s)	-	H-17
29	20,93	1,30 (s)	-	-
30	28,48	1,26 (s)	-	-

Tabela 21 - Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) em CD_3OD de LOS 12 com dados descritos na literatura em CDCl_3 (SEGER *et al.*, 2005).

Carbonos	LOS 12	cucurbitacina I (SEGER <i>et al.</i> , 2005)
1	116,85	114,9
2	146,95	144,5
3	200,18	198,7
4	48,61	47,5
5	138,60	136,9
6	121,82	120,6
7	24,76	23,6
8	43,47	41,6
9	48,81	48,8
10	36,19	34,7
11	216,30	212,8
12	49,68	48,8
13	50,16	50,8
14	48,81	48,3
15	46,90	45,6
16	71,81	71,5
17	59,65	57,4
18	20,45	20,0
19	20,78	20,1
20	80,13	78,1
21	25,58	23,9
22	205,25	202,7
23	121,41	119,0
24	155,44	155,8
25	71,61	71,3
26	29,38	29,5
27	29,38	29,1
28	19,06	18,5
29	20,93	20,2
30	28,48	27,9

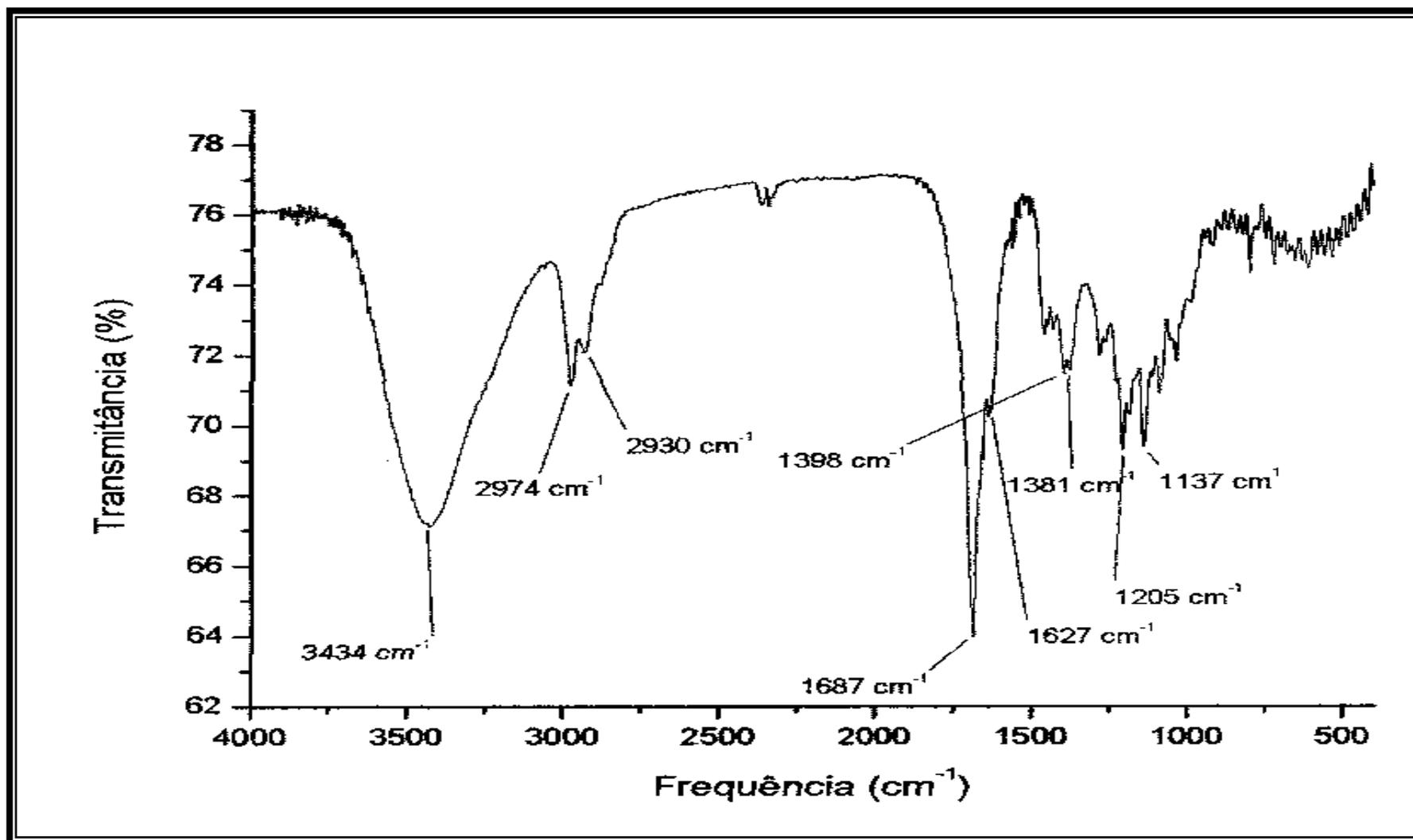


Figura 70- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 12

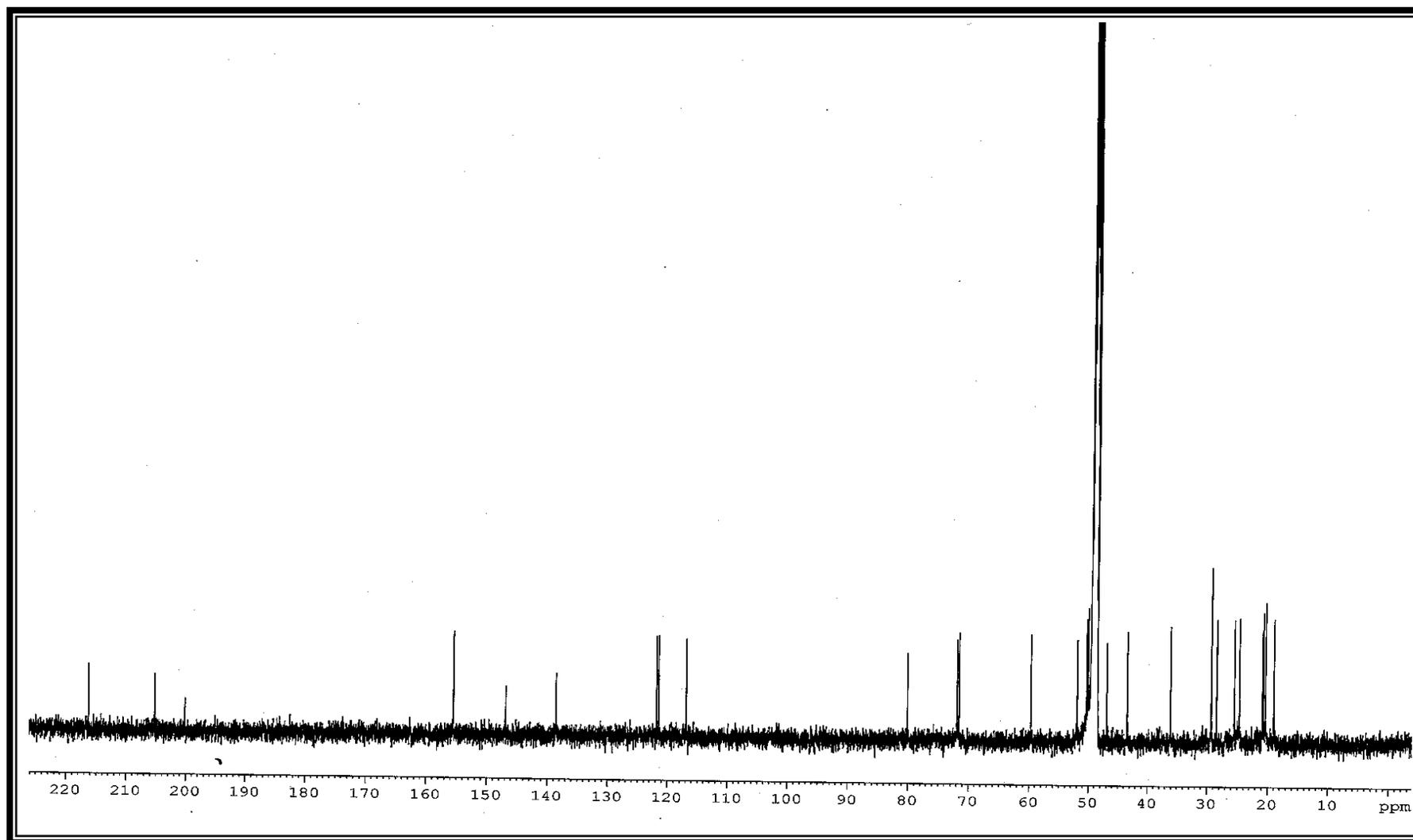


Figura 71- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 12 (125 MHz, CD_3OD)

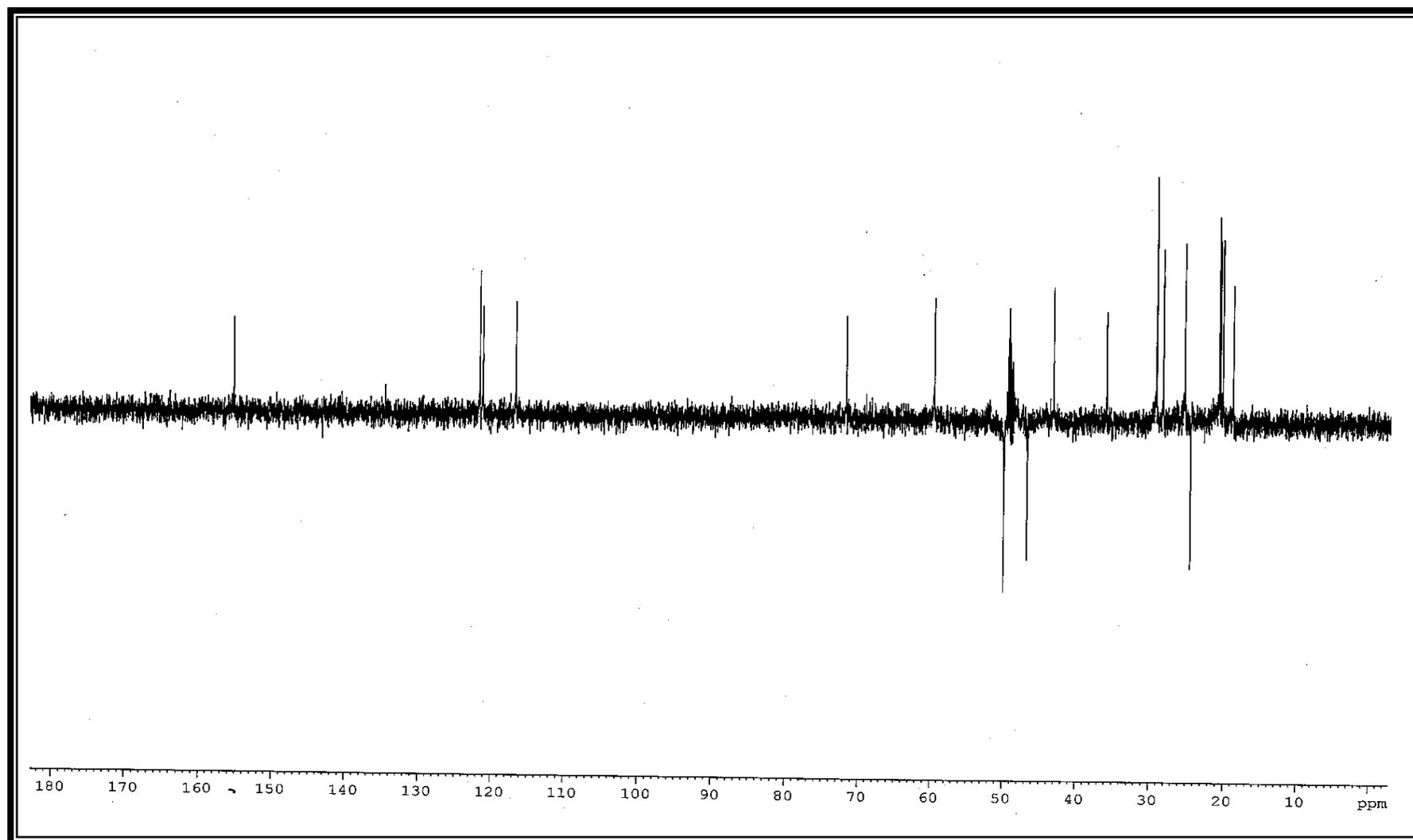


Figura 72- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 12 (125 MHz, CD_3OD)

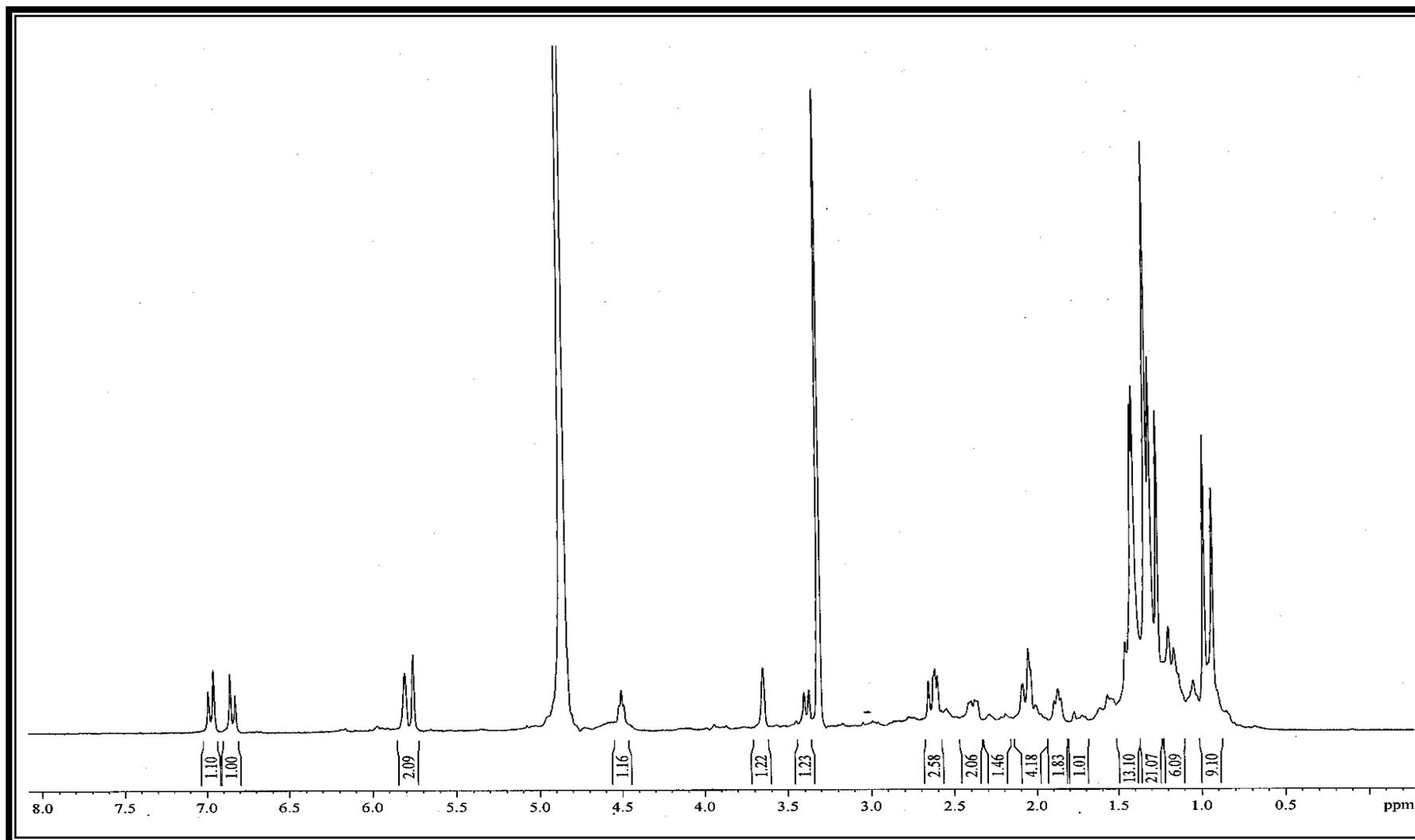


Figura 73- Espectro de RMN ¹H de LOS 12 (500 MHz, CD₃OD)

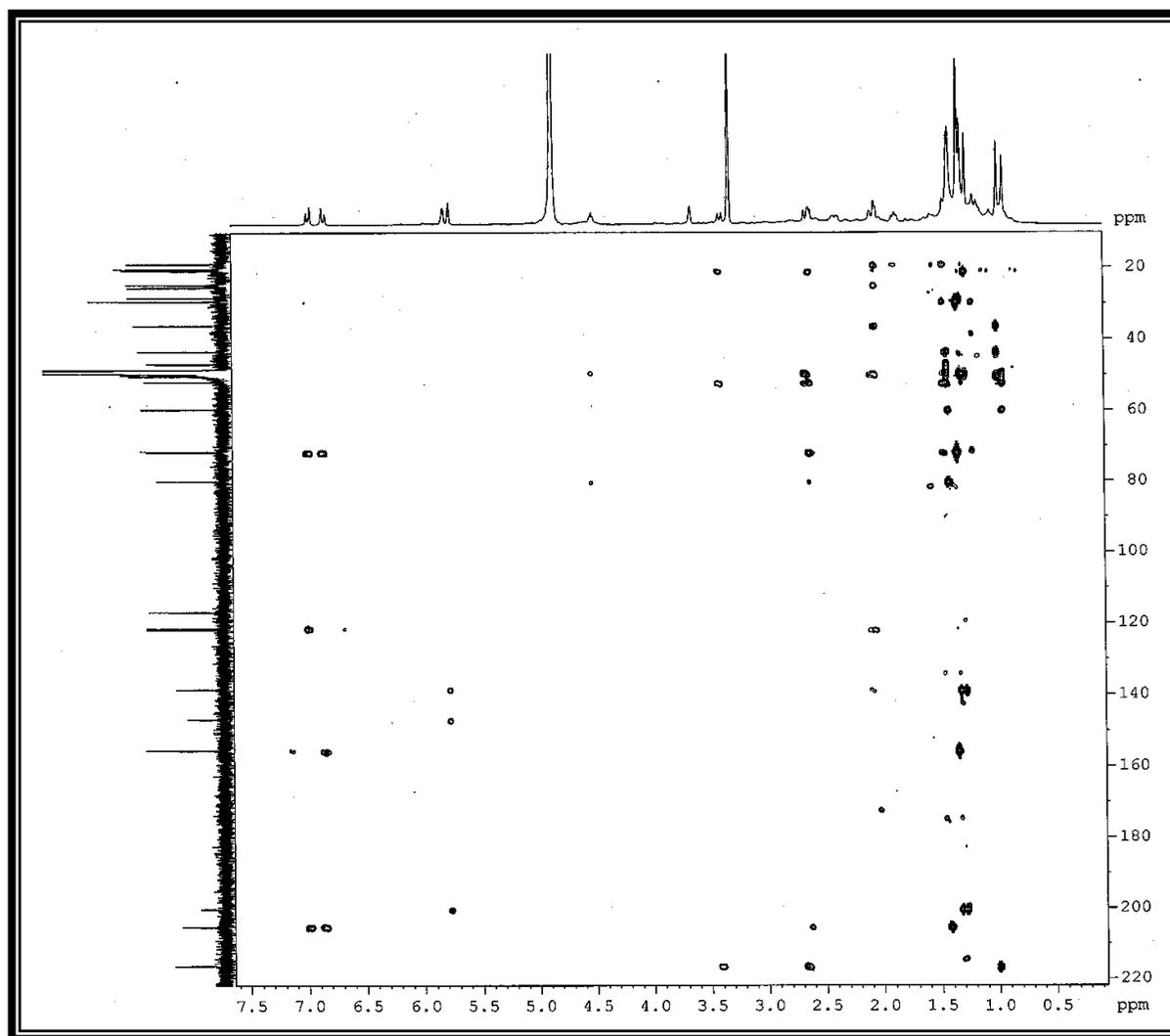


Figura 74- Espectro HMBC de LOS 12 (500 e 125 MHz, CD₃OD)

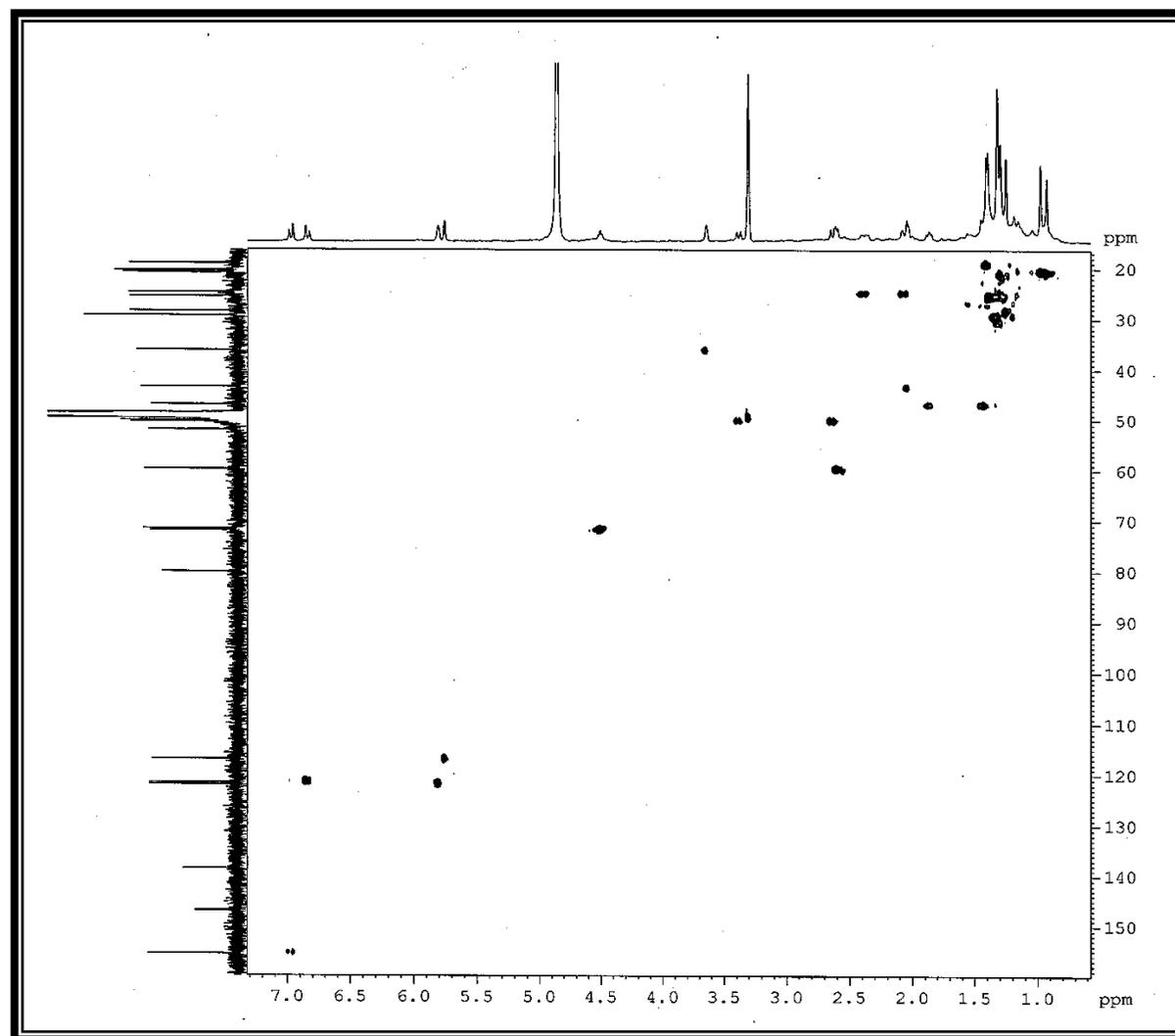


Figura 75- Espectro HMQC de LOS 12 (500 e 125 MHz, CD₃OD)

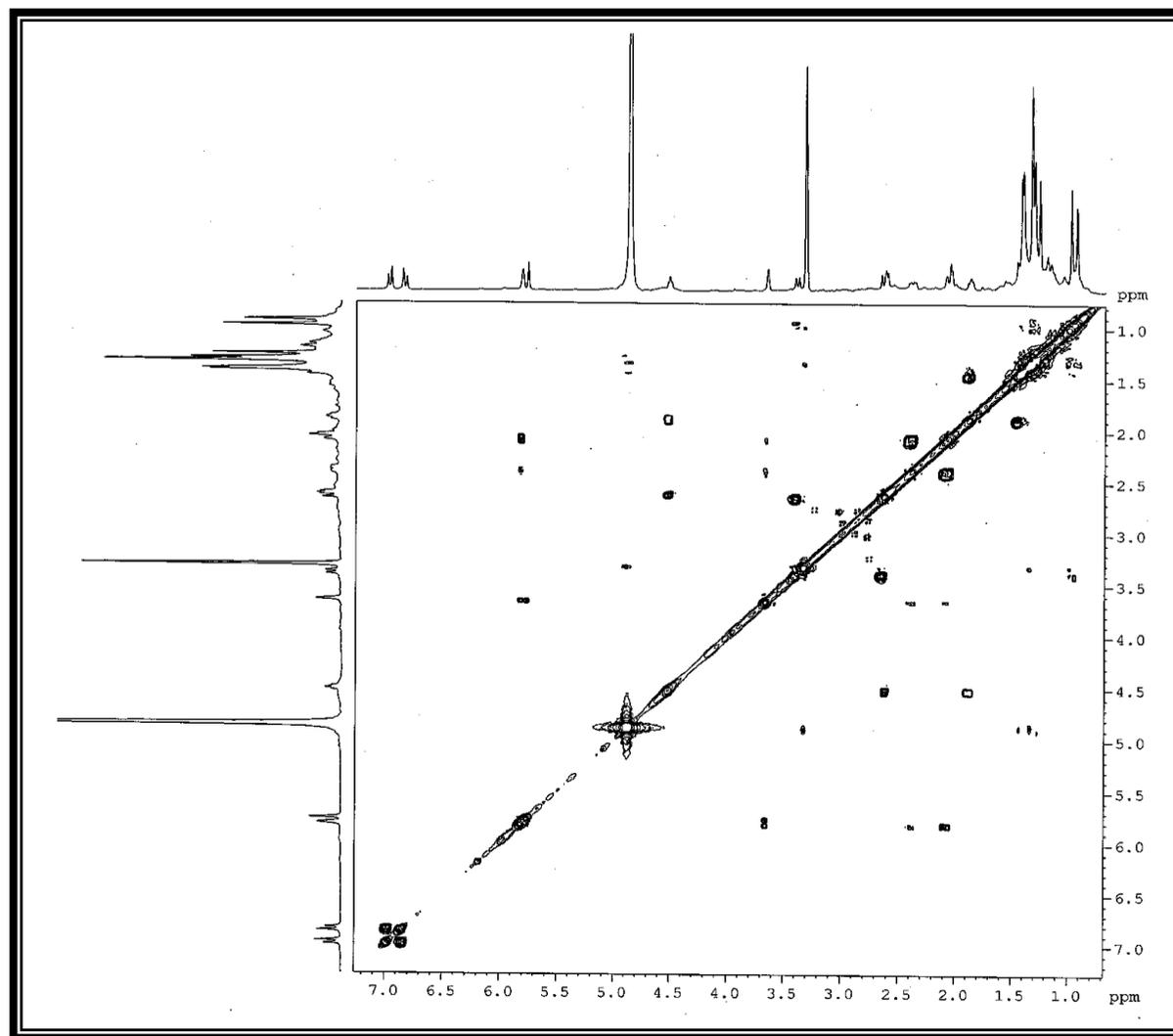


Figura 76- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 12 (125 MHz, CD_3OD)

3.11 LOS 14 (19)

A fração acetato de etila do extrato etanólico dos frutos de *L. operculata*, foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e permitiu o isolamento de um constituinte químico como um sólido amorfo levemente amarelado com ponto de fusão 160,8 – 162,7 °C, denominado LOS 14.

O espectro na região do IV (Figura 77, p. 196) de LOS 14 mostrou, como destaques, bandas características de grupos hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$ 3.427 cm^{-1}), metila e metileno ($\nu_{\text{C-H}}$ 2.981 e 2.928 cm^{-1} ; $\delta_{\text{CH}_3/\text{CH}_2}$ 1.373 cm^{-1}), ligações olefinicas ($\nu_{\text{C=C}}$ \approx 1.627 cm^{-1}), carbonilas ($\nu_{\text{C=O}}$ 1.721 e 1.689 cm^{-1}) e bandas relativas a deformação axial de ligação C – O ($\nu_{\text{C-O}}$ 1.260 e 1.081 cm^{-1}) atribuídas à função álcool.

Um total de trinta e oito sinais foi observado no espectro de RMN ^{13}C CPD (Figura 78, p. 197). A comparação com o espectro de RMN ^{13}C DEPT 135⁰ (Figura 79, p.198), permitiu reconhecer o padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono e, indicou nove átomos de carbono metílicos, cinco metilênicos, treze metínicos, e por exclusão, onze átomos de carbono não hidrogenados (Tabela 22, p. 192). Foram registrados sinais para 10 carbonos sp^3 oxigenados, dos quais, 4 (2C: δ_{C} 80,42 e 81,21 e 2CH: δ_{C} 79,78 e 71,95) foram inseridos na aglicona (unidade triterpênica) e 6 (5CH: δ_{C} 104,44; 75,56; 78,05; 71,62 e 78,34 e 1CH₂: δ_{C} 63,04) correlacionados a uma unidade de monossacarídeo. Entre os carbonos sp^2 , 3 (δ_{C} 121,54; 122,80 e 151,61) são metínicos e 1 (δ_{C} 141,79) não hidrogenado como em LOS 11 e LOS 12. Em geral, com exceção dos sinais devidos aos carbonos do açúcar, os espectros de RMN ^1H (Figura 80, p. 199) e RMN ^{13}C (Figura 78, p. 197) de LOS 14 mostraram grande semelhança com LOS 11 e LOS 12, conseqüentemente, indicando a existência de triterpenóide do tipo cucurbitano. Por outro lado, o deslocamento químico do carbono anomérico em δ_{C} 104,44 também foi compatível com a ligação osídica no carbono C-2 da aglicona. Os seis sinais adicionais foram atribuídos à hexose glicose, caracterizada através dos sinais correspondentes ao carbono anomérico (δ_{C} 104,44), ao carbono hidroximetilênico (δ_{C} 63,04) e aos quatro carbonos metínicos oxigenados (δ_{C} 71,62, 75,05, 78,05 e 78,34), confirmados por comparação com dados de δ_{C} de compostos semelhantes descritos na literatura (KAWAHARA *et al.*, 2004) (Tabela 24, p. 195).

Tabela 22 – Deslocamentos químicos de carbono-13 (δ) para LOS 14 obtidos dos deslocamentos de RMN ^{13}C – CPD e DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD).

C (δ)	CH (δ)	CH ₂ (δ)	CH ₃ (δ)	TOTAL
49,65	35,15	25,00	19,58	
50,03	44,27	36,06	20,27	
51,89	60,38	46,67	20,89	
52,57	71,62 ^{**}	49,86	21,96	
80,42 [*]	71,95 ^{**}	63,04 ^{***}	22,05	
81,21 [*]	75,56 ^{**}		25,70	
141,79	78,05 ^{**}		26,63	
172,06 [*]	78,34 ^{**}		26,95	
205,52 [*]	79,78 ^{**}		29,52	
213,44 [*]	104,44 ^{**}			
215,93 [*]	121,54			
	122,80			
	151,61			
C₁₁O₆[*]	C₁₃H₁₃O₆^{**}	C₅H₁₀O^{***}	C₉H₂₇	C₃₈H₅₀O₁₃

* Oxigênios devidos a três grupos C=O e três grupos OH

** Oxigênios devidos a seis grupos hidroxila OH

*** Oxigênio devido a um grupo hidroxila OH

Baseado nos dados acima foi deduzida a fórmula molecular $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_{13}$ de LOS 14 que apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a onze. Como LOS 14 apresenta seis ligações duplas (2 x C = C e 4 x C = O), as cinco insuficiências restantes estão em acordo com uma estrutura triterpênic tetracíclica glicosilada (Tabela 22, p. 192).

Os espectros de RMN ^1H (Figura 80, p.199), conforme deduções acima apresentaram as absorções esperadas: δ_{H} 5,82 (1H, H-6), 6,82 (1H, H-23) e 6,99 (1H, H-24); δ_{H} 4,90 (dd, $J=12,0, 5,2$, H-2); δ_{H} 0,88; 1,04; 1,28; 1,32; 1,38; 1,41; 1,55; 1,57; 2,01 simpletos referentes aos hidrogênios dos nove grupos metílicos e, δ_{H} 3,24 – 4,33 correspondentes aos hidrogênios da unidade de açúcar.

A atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos de todos os átomos de hidrogênio e carbono foi efetuada através dos espectros bidimensionais (HMQC, Figura 81, p. 200), HMBC (Figura 82, p. 201) e COSY (Figura 83, p. 202) (Tabela 23, p. 194).

A unidade de açúcar foi localizada no carbono C-2 em função da conectividade observada entre o carbono anomérico C-1' (δ_{C} 104,44) e o hidrogênio H-2 (δ_{H} 4,90) no espectro de HMBC (Figura 82, p. 201).

Assim, os dados extraídos dos espectros no IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C permitiram identificar LOS 14 como sendo a cucurbitacina glicosilada 2-O- β -D-glicopirasonil-16 α ,20(R)di-hidroxi-25-acetoxi-3,11,22-trioxi-5,23(E)dieno, conhecida comumente como

Arvenina I, já isolada a partir de *L. operculata* e registrada na literatura (KAWAHARA *et al.*, 2004, Tabela 24, p. 195).

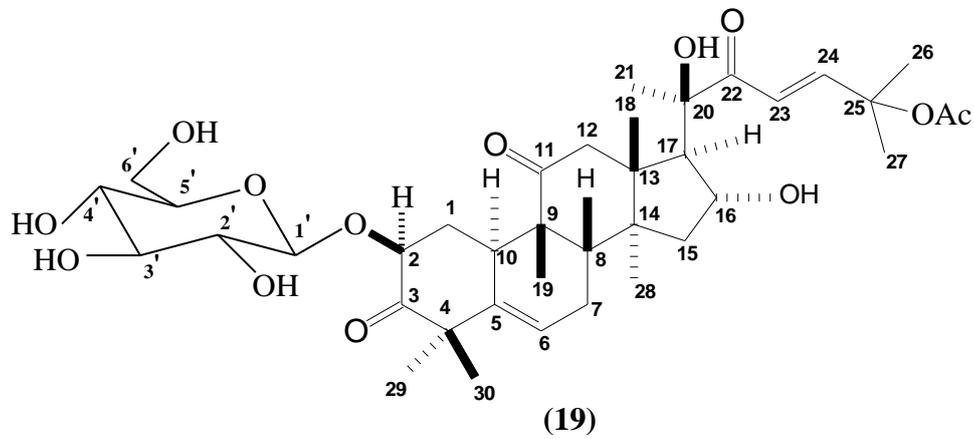


Tabela 23 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em CD_3OD de LOS 14. Deslocamentos químicos (δ) em PPM e constante de acoplamento (J) em Hz.

		HMQC	HMBC
C	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{CH}}$
3	213,44	-	3H-29; 3H-30
4	52,57	-	H-6; 3H-29; 3H-30
5	141,79	-	3H-29; 3H-30
9	50,03	-	2H-12
11	215,93	-	3H-12; 2H-19
13	51,89	-	2H-12; 3H-18; 3H-21
14	49,65	-	H-16; H-17
20	80,42	-	2H-12; H-16
22	205,52	-	H-17; 3H-21
25	81,21	-	H-23; H-24
AcO	172,06	-	3H-Ac
CH			
2	79,78	4,90 (dd, 12,0, 5,2)	H-1'
6	121,54	5,82	3H-30
8	44,27	1,98	H-5; H-6; 3H-19
10	35,15	3,04 (dl, 12,5)	H-1; H-6; H-8; 3H-19; 3H-29
16	71,95	4,55 (t, 7,5)	2H-12; 3H-21; 3H-28
17	60,38	2,60	3H-18; 2H-21
23	122,80	6,82	3H-26; 3H-27
24	151,61	6,99	3H-26; 3H-27
1'	104,44	4,33	H-2
2'	75,56	3,24	H-1'
3'	78,05	3,37	H-5'; 2H-6'
4'	71,62	3,25	-
6'	78,34	3,26	-
CH₂			
1	36,06	1,35; 2,28	H-2; H-6
7	25,00	2,05; 2,40	H-6
12	49,86	2,60; 3,40	H-17; 3H-18
15	46,67	1,48; 1,88	-
6'	63,04	3,66; 3,89	-
CH₃			
18	20,89	0,88	2H-12; H-17; 3H-18; 3H-21
19	20,27	1,04	-
21	25,70	1,41	-
26	26,63	1,57	H-23; H-24; 3H-27
27	26,95	1,55	H-23; 3H-26
28	19,58	1,38	-
29	29,52	1,32	3H-30
30	22,05	1,28	3H-29
AcO	21,96	2,01	-

Tabela 24 - Comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) em CD_3OD de LOS 14 com dados descritos na literatura em CD_3OD (KAWAHARA *et al.*, 2004).

Carbonos	LOS 14	Arvenina I (KAWAHARA <i>et al.</i> , 2004)
1	36,06	35,9
2	79,78	79,6
3	213,44	213,3
4	52,57	52,4
5	141,79	141,7
6	121,54	121,4
7	25,00	24,9
8	44,27	44,1
9	50,03	49,9
10	35,15	35,0
11	215,90	215,7
12	49,86	49,7
13	51,89	51,7
14	49,65	49,1
15	46,67	46,5
16	71,94	71,8
17	60,38	60,2
18	20,89	20,8
19	20,27	20,1
20	80,42	80,2
21	25,70	25,6
22	205,52	205,4
23	122,80	122,6
24	151,61	151,5
25	81,21	81,1
26	26,63	26,5
27	26,95	26,8
28	19,57	18,9
29	29,52	29,4
30	22,05	21,8
1'	104,44	104,3
2'	75,56	75,4
3'	78,05	77,9
4'	71,61	71,5
5'	78,34	78,2
6'	63,04	62,9
Ac	21,96	21,9
AcO	172,06	171,9

As cucurbitacinas B (LOS 13), D (LOS 9) e isocucurbitacina D (LOS 10) já haviam sido isoladas também em trabalhos anteriores (SOUSA, 1999; PAPA, 1999) e foram consideradas no presente trabalho apenas para efeito de determinação de atividade biológica e para obtenção de derivados reacionais, no caso da cucurbitacina D (LOS 9).

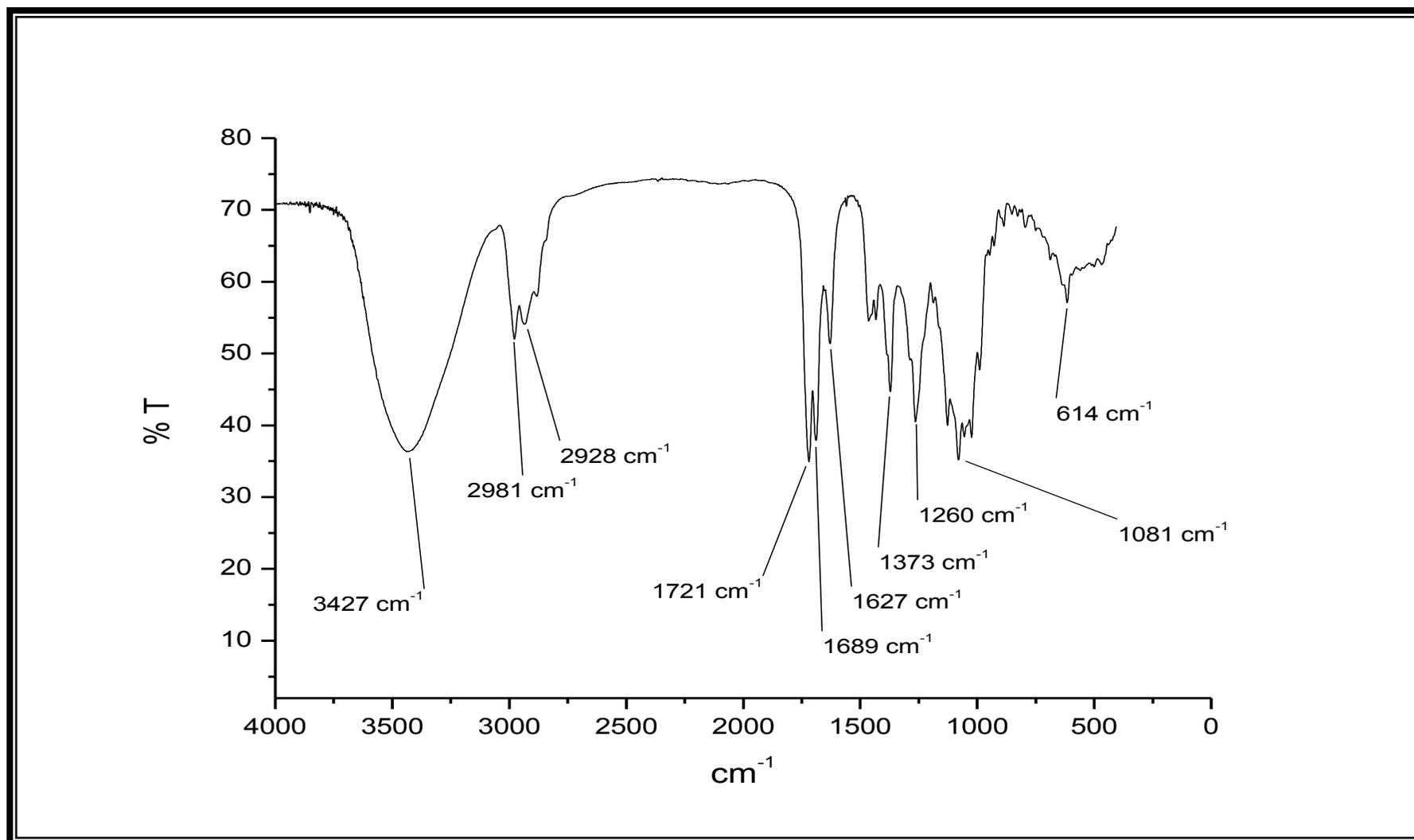


Figura 77- Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) de LOS 14

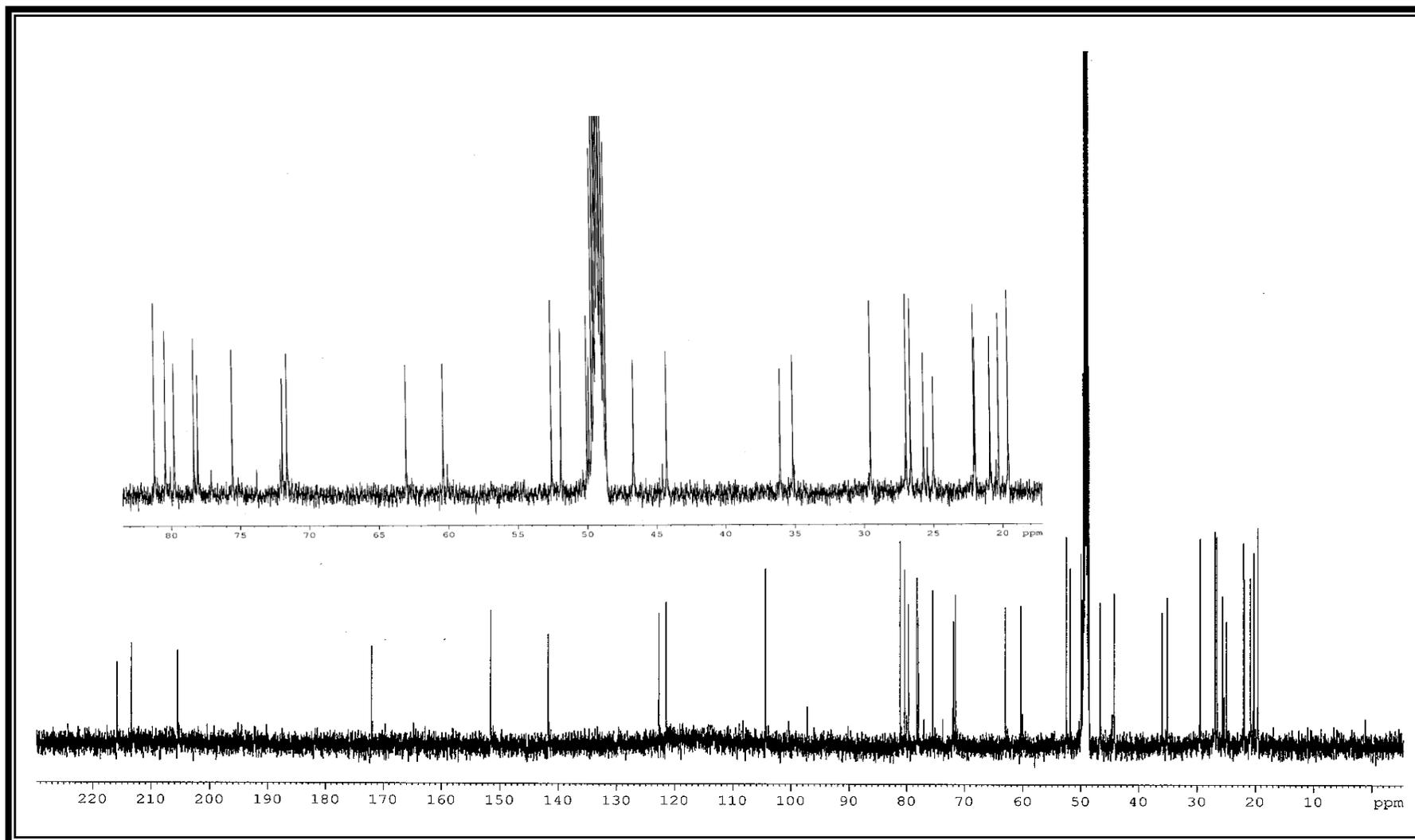


Figura 78- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 14 (125 MHz, CD_3OD)

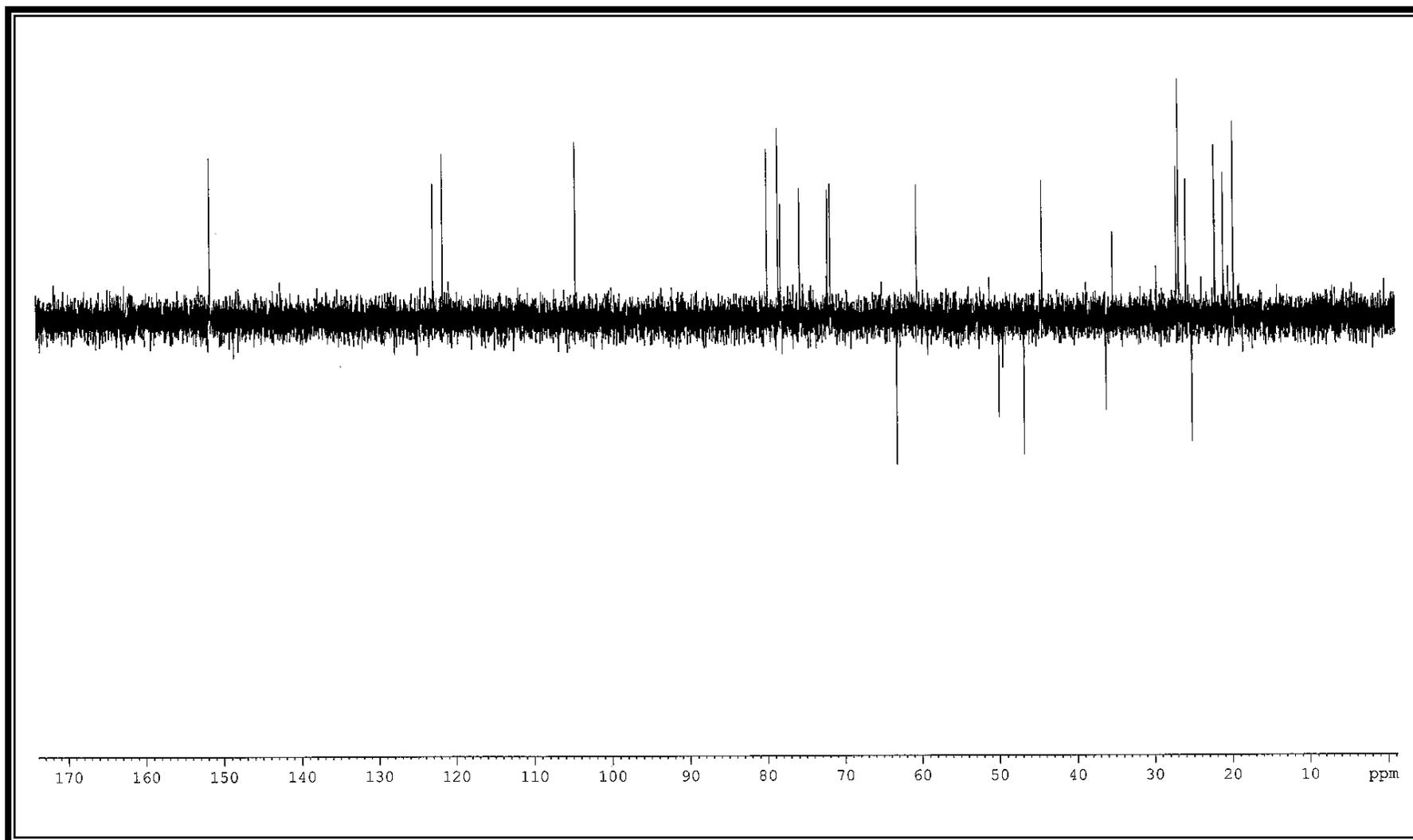


Figura 79- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de LOS 14 (125 MHz, CD_3OD)

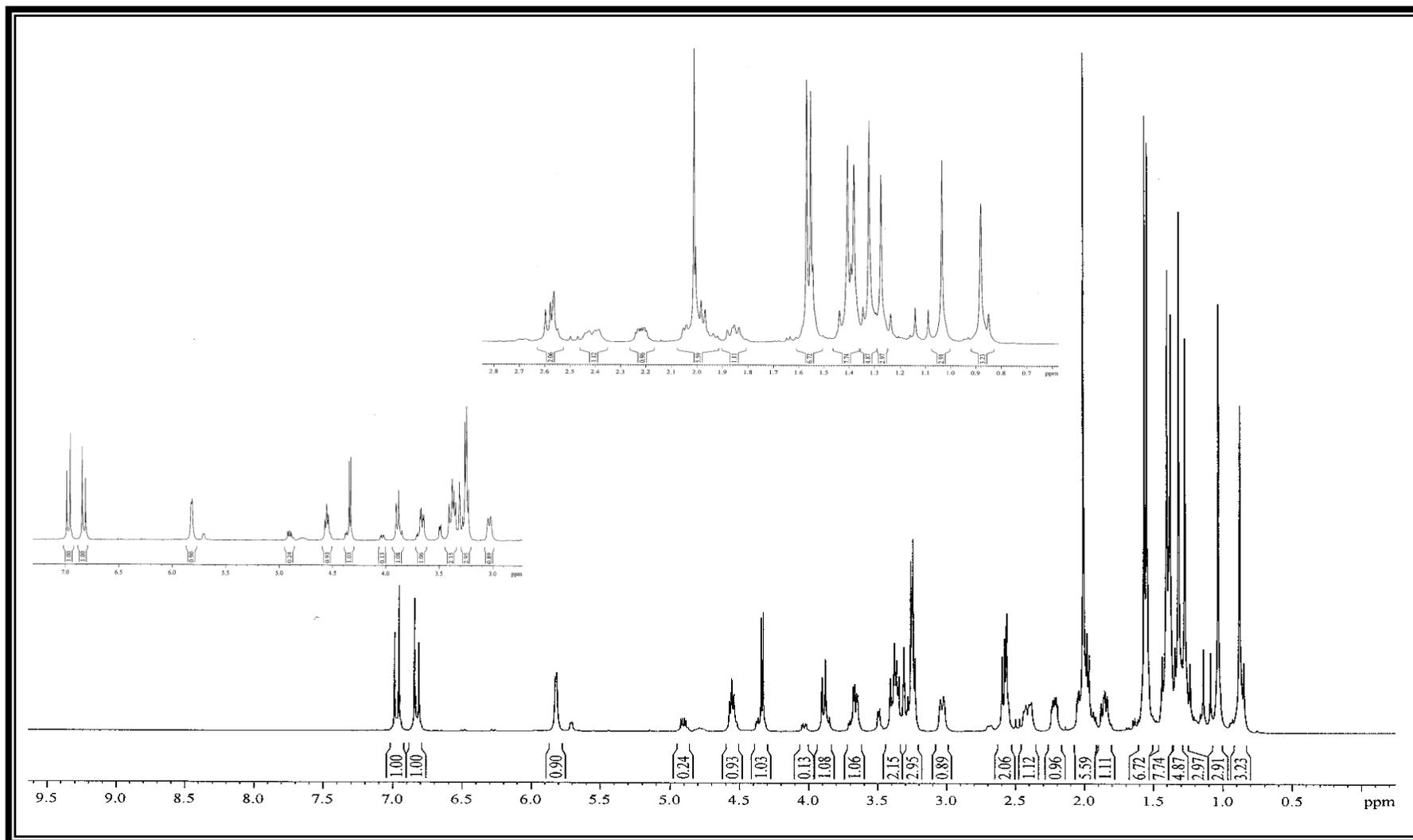


Figura 80- Espectro de RMN ^1H de LOS 14 (500 MHz, CD_3OD)

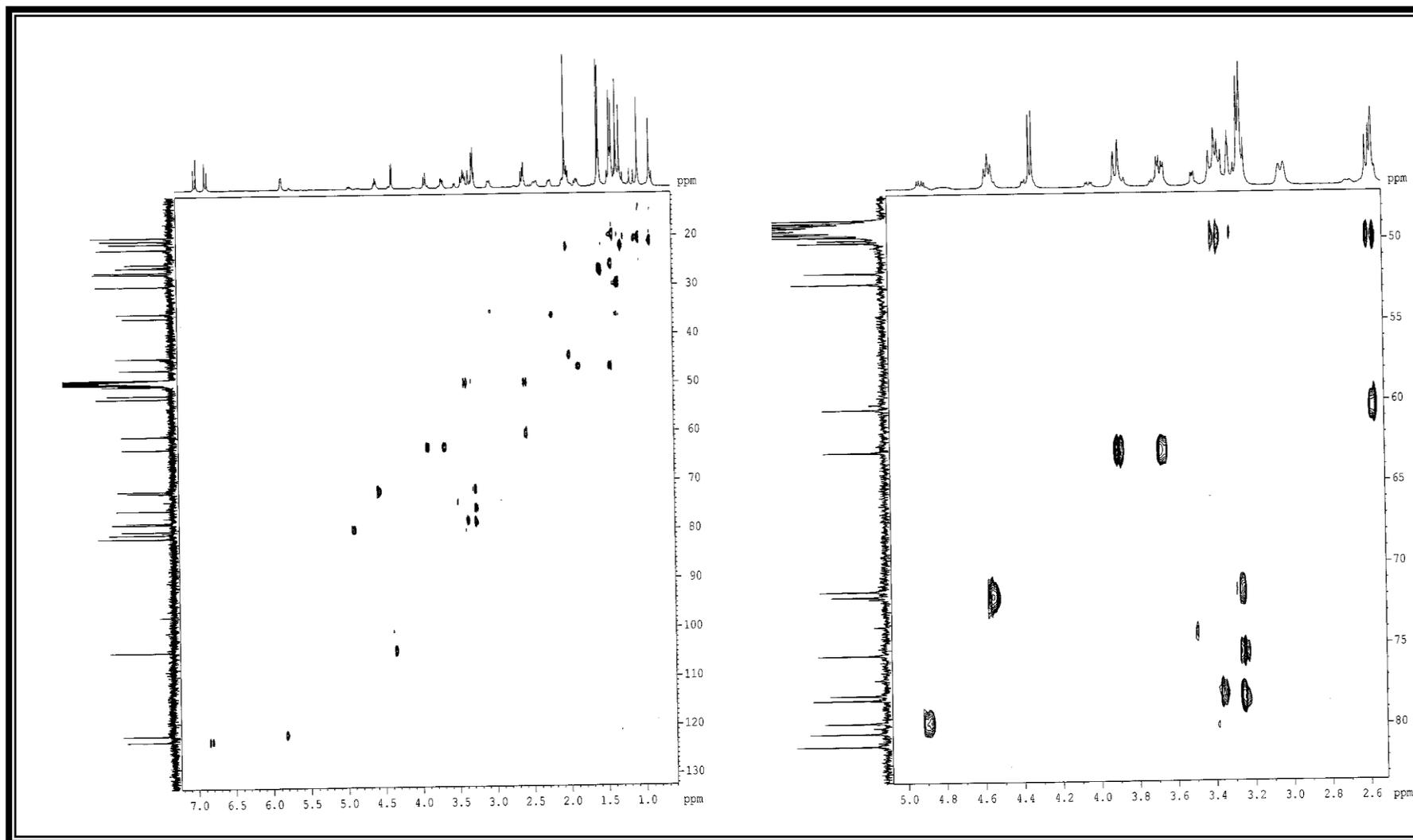


Figura 81- Espectro HMQC de LOS 14 (500 e 125 MHz, CD_3OD)

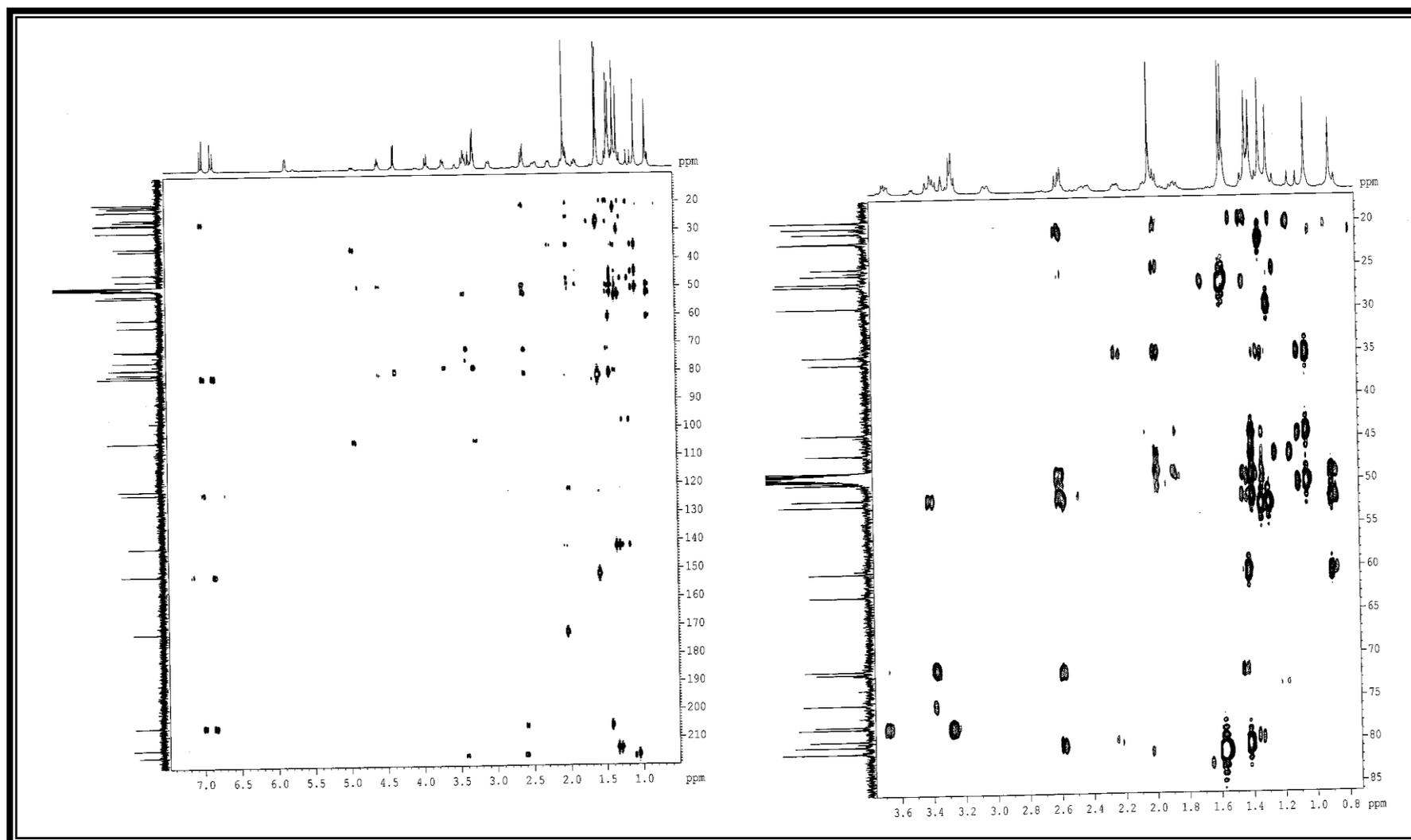


Figura 82- Espectro HMBC de LOS 14 (500 e 125 MHz, CD₃OD)

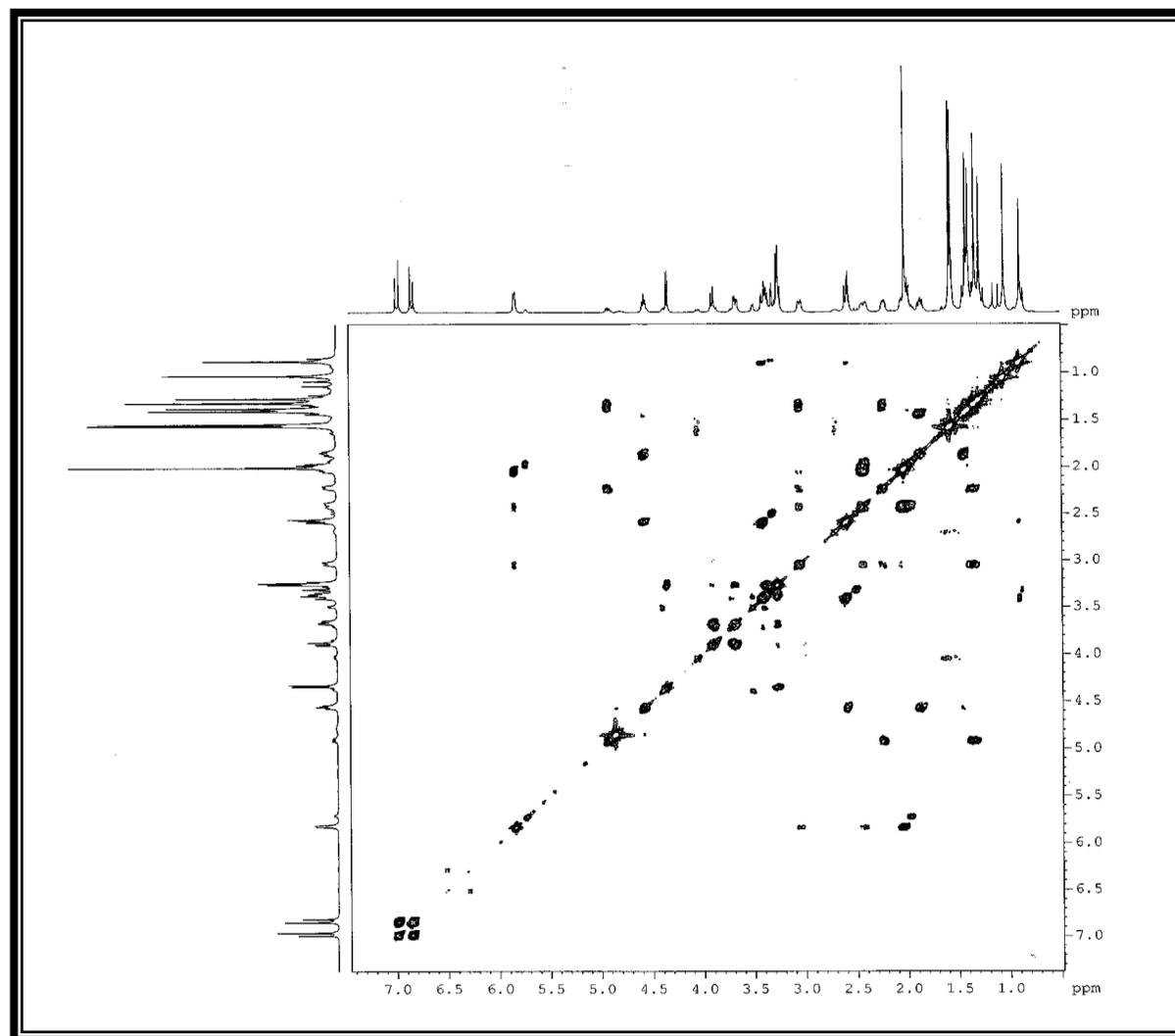


Figura 83- Espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de LOS 14 (125 MHz, CD_3OD)

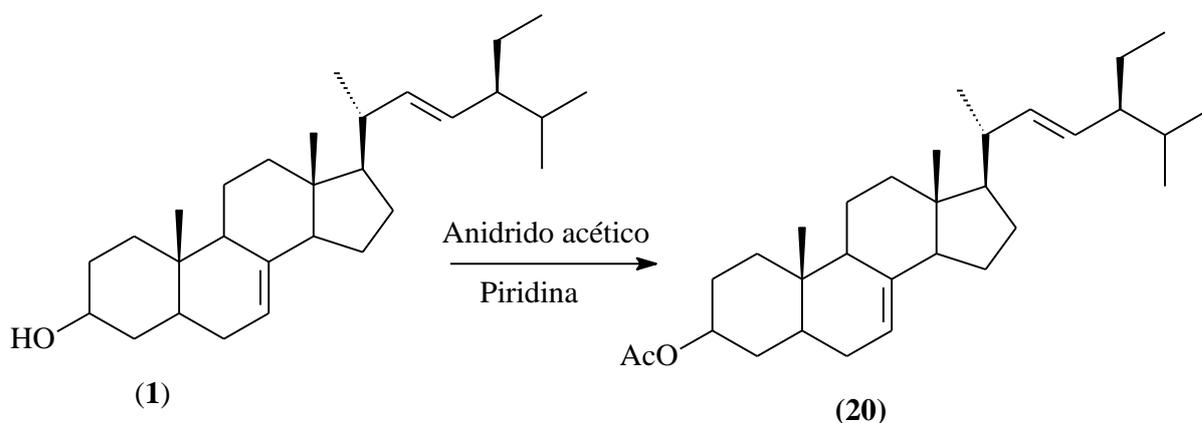
CAPÍTULO 4 OBTENÇÃO DE DERIVADOS

4.1 ACETILAÇÃO

4.1.1 LOS 1 – Ac (20)

A substância **1** (**LOS 1**) foi acetilada com anidrido acético e piridina obtendo-se um produto sólido (**LOS 1 – Ac**), solúvel em clorofórmio e com ponto de fusão 180,8 – 182 °C (ITOH *et al.*, 1981). O espectro de RMN ^{13}C CPD (Figura 84, p. 204) conforme esperado, exibiu sinais em δ_{C} 170,92 e δ_{C} 21,14 característicos dos carbonos carbonílico e metílico do grupo acetoxila. O espectro de RMN ^1H (Figura 85, p. 205) corroborou esta observação, através do sinal em δ_{H} 2,03 (s) devido aos hidrogênios metílicos do grupo acetoxila, assim como, o sinal do hidrogênio carbinólico H-3 em δ_{H} 4,70 (m), com maior deslocamento químico em relação ao respectivo hidrogênio na substância original, como previsto.

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono de **LOS 1- Ac** foram descritos na (Tabela 1, p. 82).



(22*E*,24*S*)-etil-5 α -colest-7,22-dien-3 β -acetoxila (espinasterol acetilado, **20**)

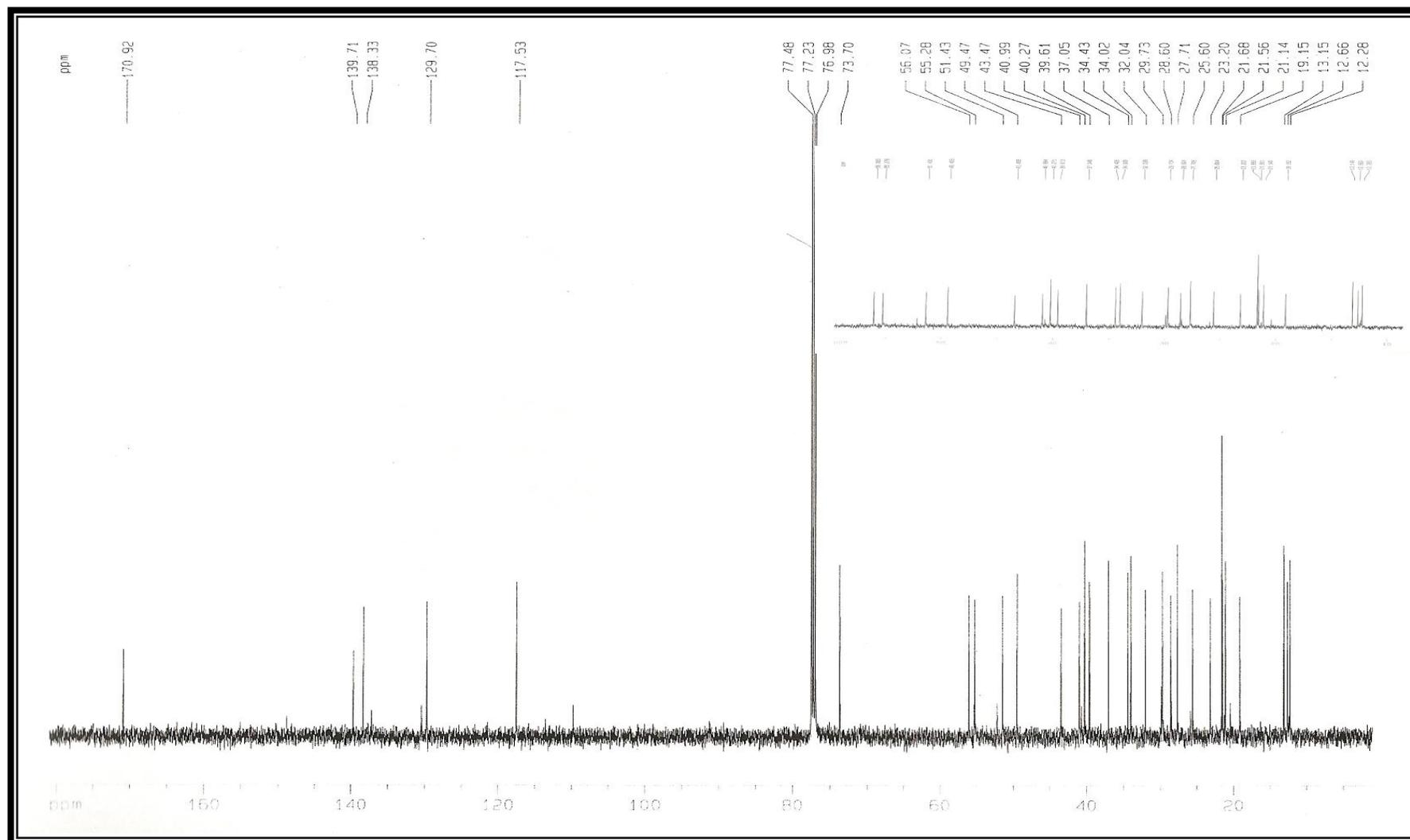


Figura 84- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 1 - Ac (125 MHz, CDCl₃)

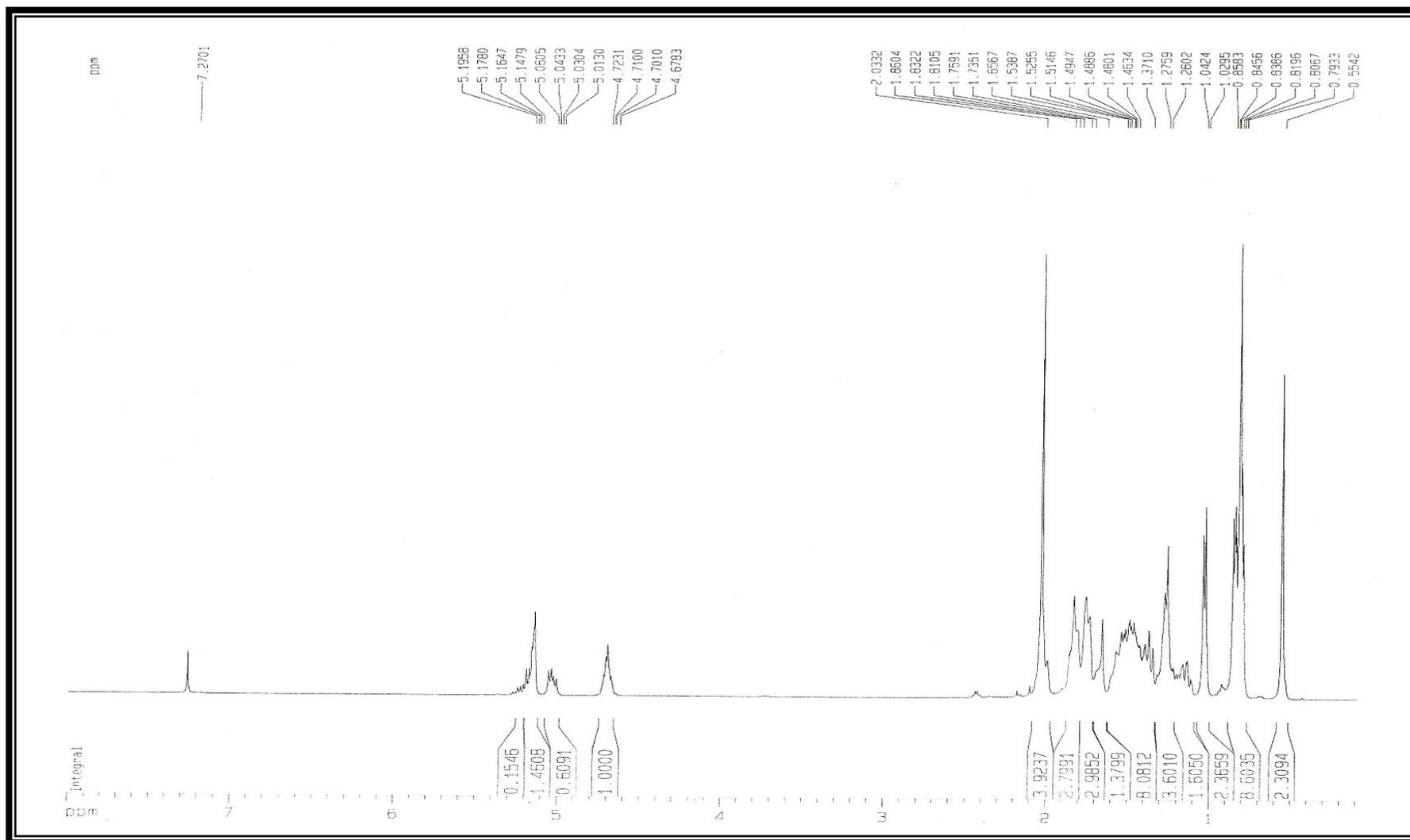


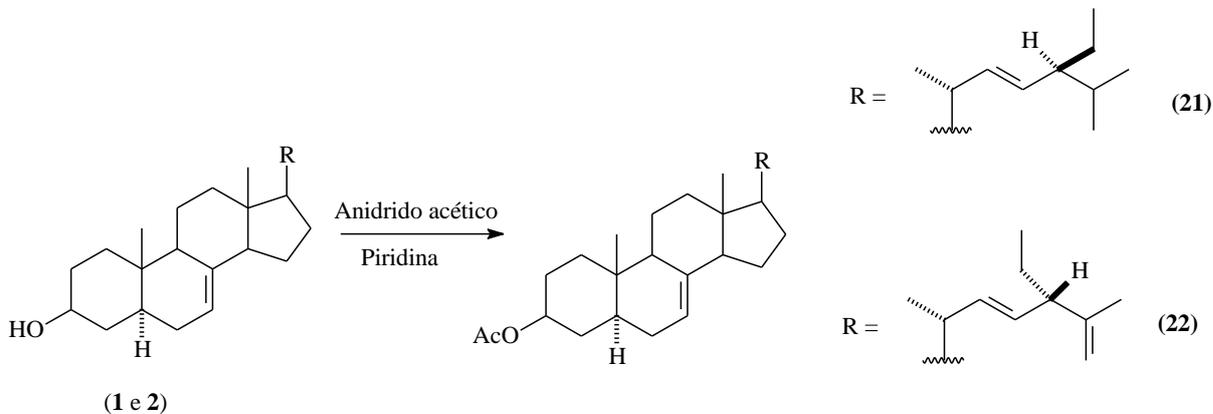
Figura 85- Espectro de RMN ^1H de LOS 1 - Ac (500 MHz, CDCl_3)

4.1.2 LOS 7 – Ac (21/22)

A mistura de **1** e **2** (**LOS 7**) foi acetilada com anidrido acético e piridina obtendo-se um produto sólido (**LOS 7-Ac, 21/22**), solúvel em clorofórmio e com ponto de fusão 148,0 – 149,9 °C. O espectro de RMN ^{13}C CPD (Figura 86, p. 207) do produto de acetilação exibiu sinais em δ_{C} 170,94, δ_{C} 21,68 e δ_{C} 21,14, interpretados como uma só absorção para os carbonos carbonílicos do di-acetato, porém os dois grupos metila com diferentes deslocamentos químicos.

O espectro de RMN ^1H (Figura 87, p. 208) corroborou esta observação exibindo os sinais em δ_{H} 1,99 e δ_{H} 2,32 (s) devidos aos hidrogênios metílicos dos grupos acetoxila, assim como, o sinal em δ_{H} 4,65 (m) dos dois hidrogênios carbinólicos H-3, com maior deslocamento químico em relação aos respectivos hidrogênios nas substâncias originais, como previsto.

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram descritos na (Tabela 2, p. 89).



(22*E*,24*S*)-etil-5 α -colest-7,22-dien-3 β -acetoxila (**21**) e (22*E*,24*R*)-etil-5 α -colest-7,22,25-trien-3 β - acetoxila (**22**)

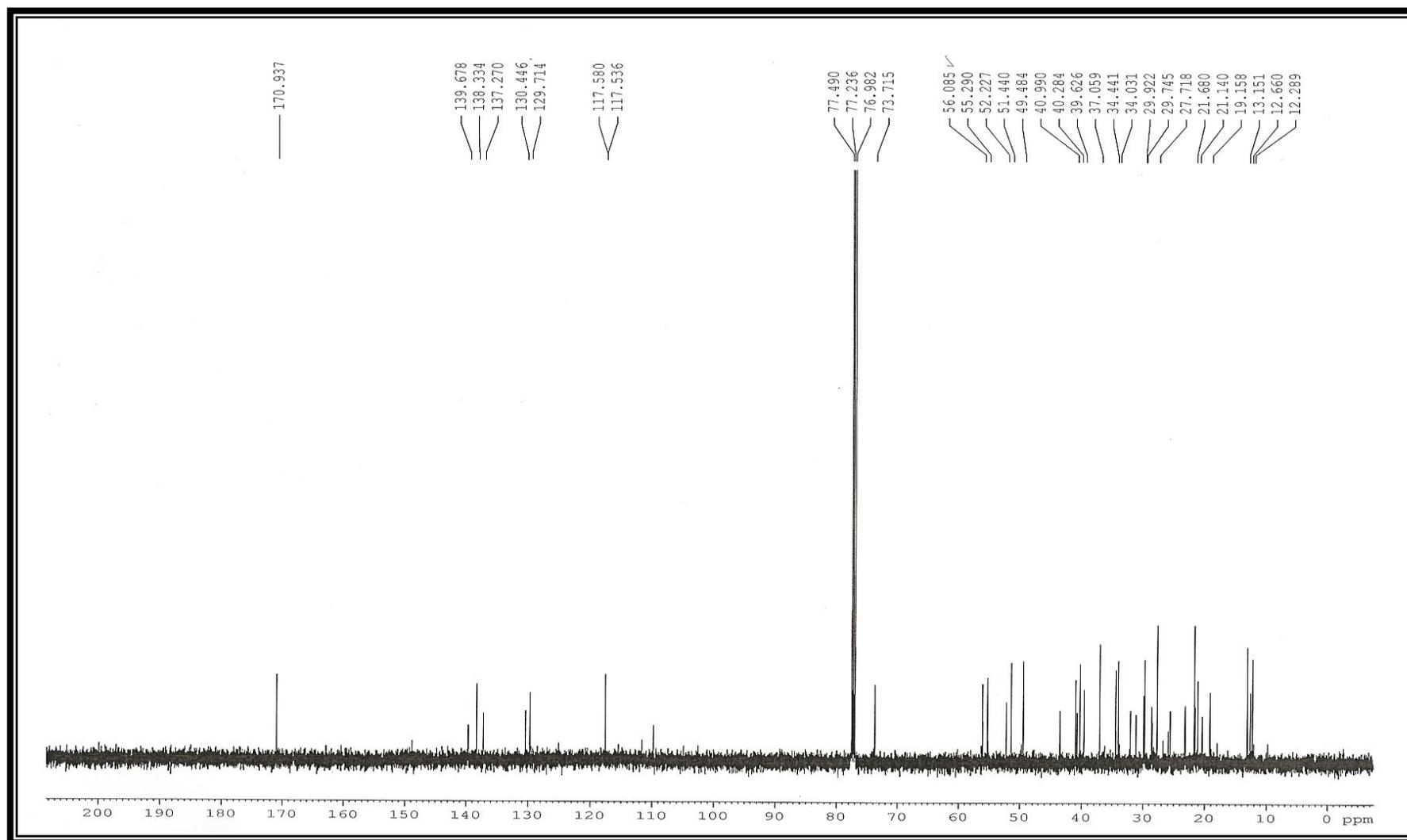


Figura 86- Espectro de RMN ^{13}C de LOS 7 -Ac (125 MHz, CDCl_3)

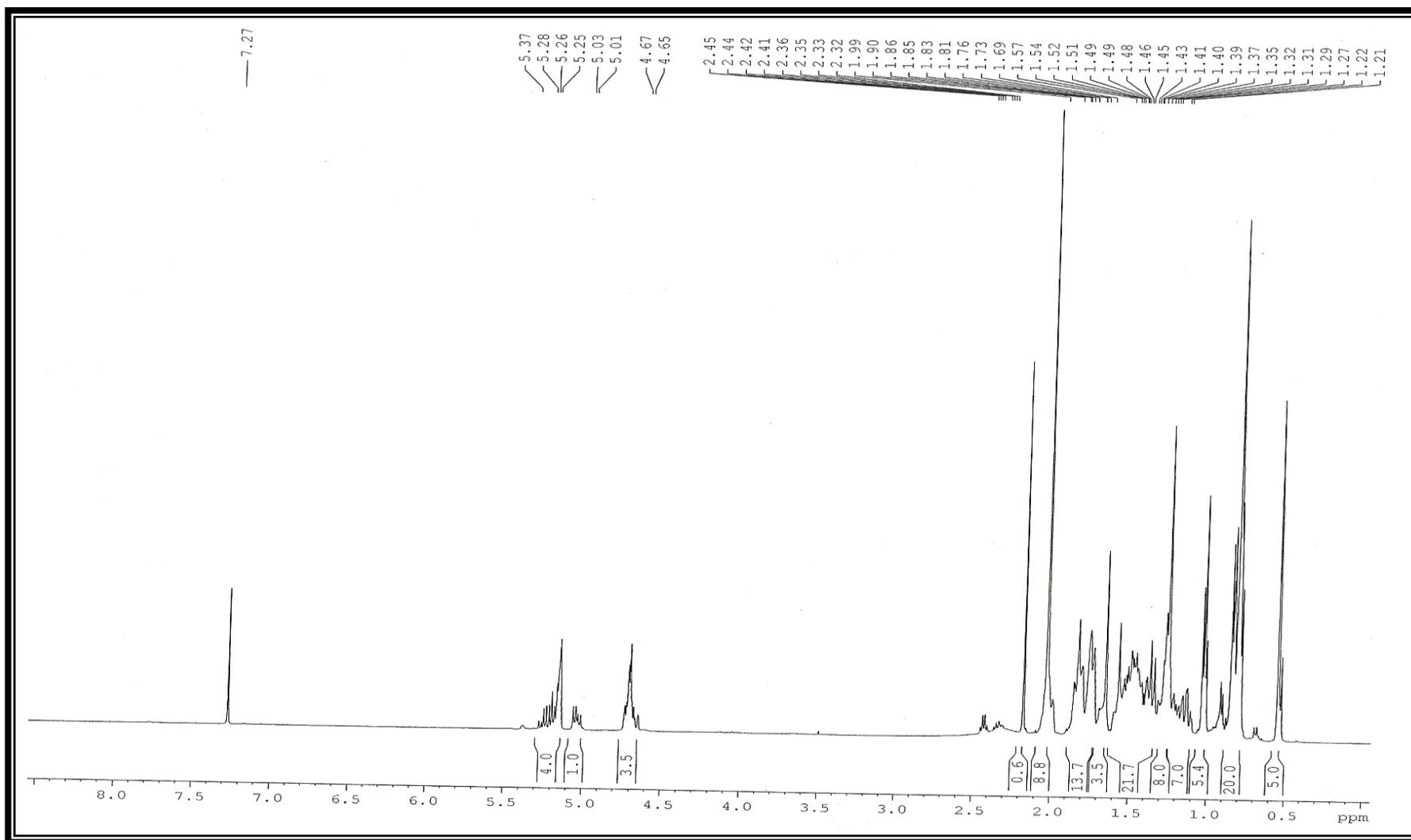
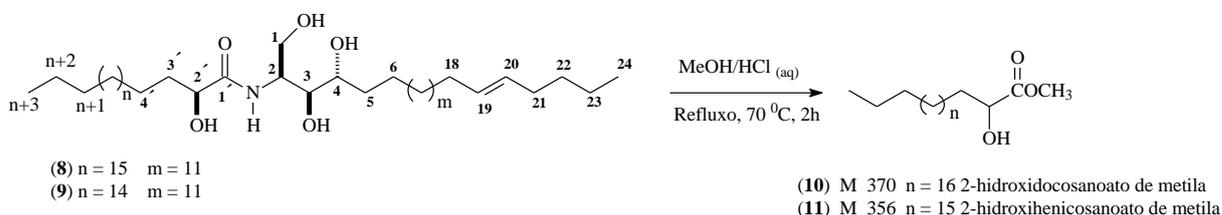


Figura 87- Espectro de RMN ^1H de LOS 7 - Ac (500 MHz, CDCl_3)

4.2 METANÓLISE

4.2.1 LOS 8 (8 e 9)

A reação de metanólise de **8** e **9** (LOS 8) confirmou as cadeias acila nas estruturas de **8** e **9**, contendo 22 (**10**) e 21 (**11**) carbonos respectivamente, de acordo com os picos em m/z 370 [M^+] e 356 [M^+], respectivamente, vistos no espectro de massa do produto resultante da metanólise, obtido através do sistema CG-MS (Figura 33, p. 123).



4.3 OXIDAÇÃO

4.3.1 LOS 9 (23)

A substância **23** (LOS 9) foi oxidada utilizando o reagente de Jones e, conforme análise do espectro de massa de alta resolução (IES-EM, Figuras 88 e 89, p. 210) do derivado obtido foi possível observar a ocorrência de oxidação de apenas uma das funções hidroxilas secundárias (C-2 OH ou C-16 OH) através dos íons correspondentes ao aduto de sódio [$M+Na$]⁺ com m/z 537,4829 e ao aduto de potássio [$M+K$]⁺ com m/z 553,4511, os quais indicaram a fórmula molecular $C_{30}H_{42}O_7$. Em adição, ocorreu a oxidação dessas duas hidroxilas (C-2 OH e C-16 OH) através dos íons correspondentes ao aduto de sódio [$M+Na$]⁺ com m/z 535,4819 e ao aduto de potássio [$M+K$]⁺ com m/z 551,4994, compatíveis com a fórmula molecular $C_{30}H_{40}O_7$.

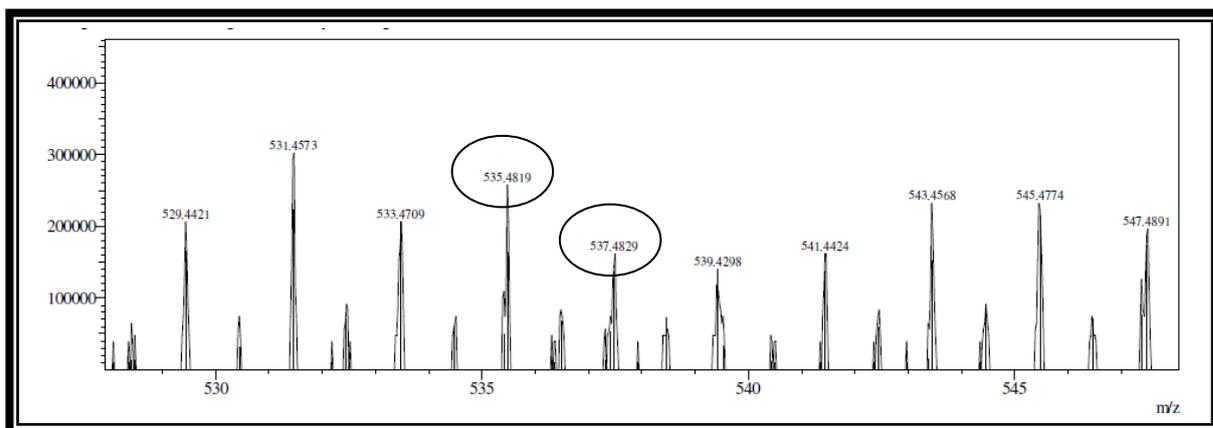
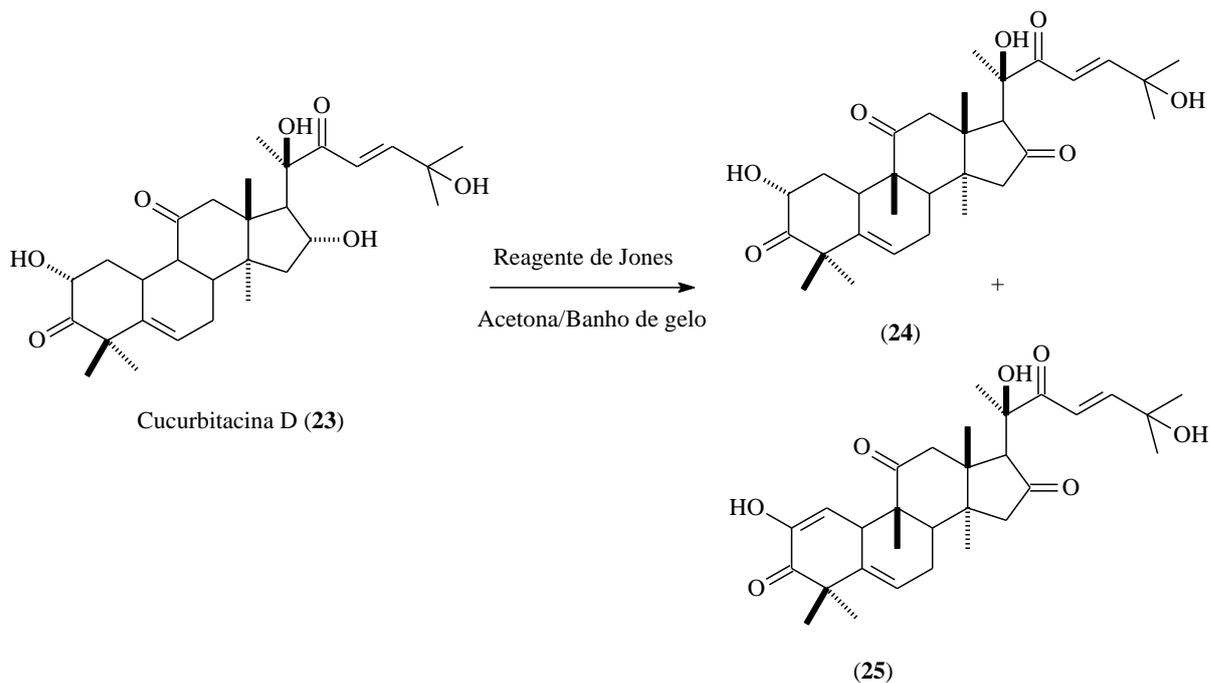


Figura 88- Espectro de massa LOS 9-JO $[M+Na]^+$

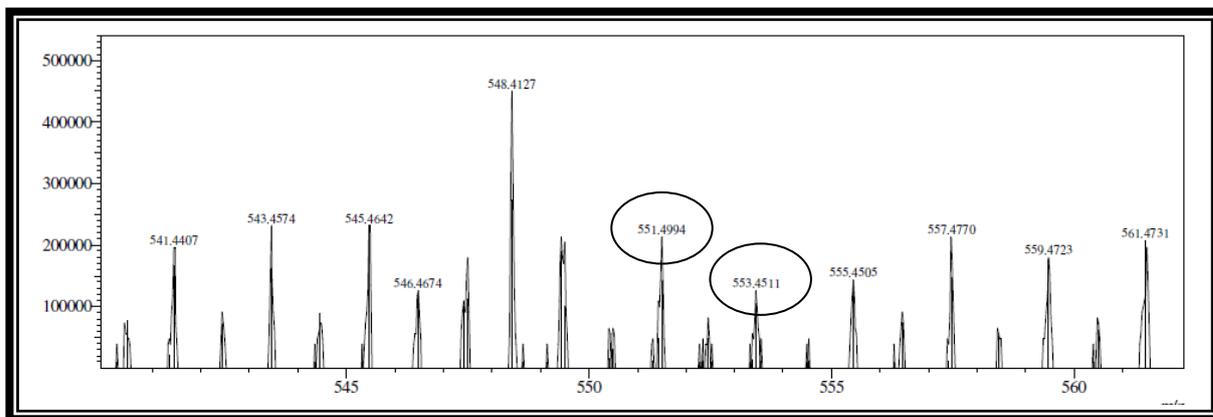


Figura 89- Espectro de massa LOS 9-JO $[M+K]^+$

4.4 HIDRÓLISE

4.4.1 LOS 14 (19)

O produto da hidrólise da substância **19** (LOS 14) foi identificado pelos dados dos espectros na região do infravermelho (Figura 90, p. 211) e de massa obtido pela técnica “*electrospray*” (Figuras 91 e 92, p. 212). Assim, foi observada no espectro de absorção na região do IV a relativa diminuição da intensidade da banda referente a estiramento das ligações de grupos hidroxilas. O espectro de massa de alta resolução (IES-EM, Figura 91, p. 212) exibiu os íons correspondentes ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ com m/z 581,3359 e ao aduto de potássio $[M+K]^+$ com m/z 597,3406 e ainda íons referente ao aduto de cloro $[M+Cl]^-$ com m/z 593,2808 e m/z 595,2666 (IES-EM, Figura 92, p. 212) correspondentes à fórmula molecular $C_{32}H_{46}O_8$, compatíveis com a estrutura do produto de hidrólise.

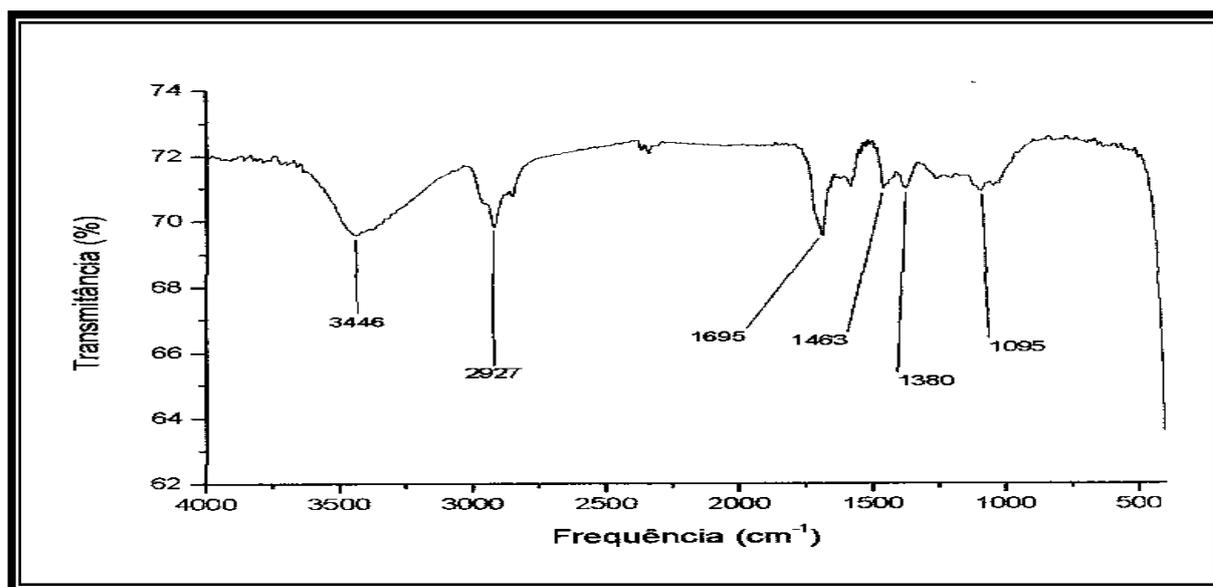
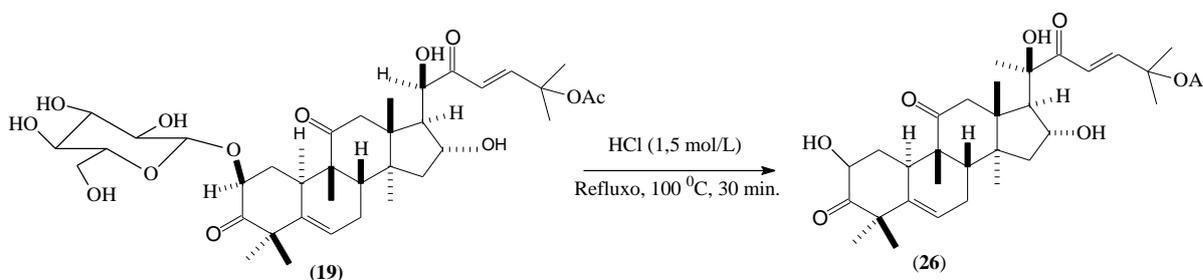


Figura 90- Espectro de absorção na região de infravermelho de LOS 14- HIDRO

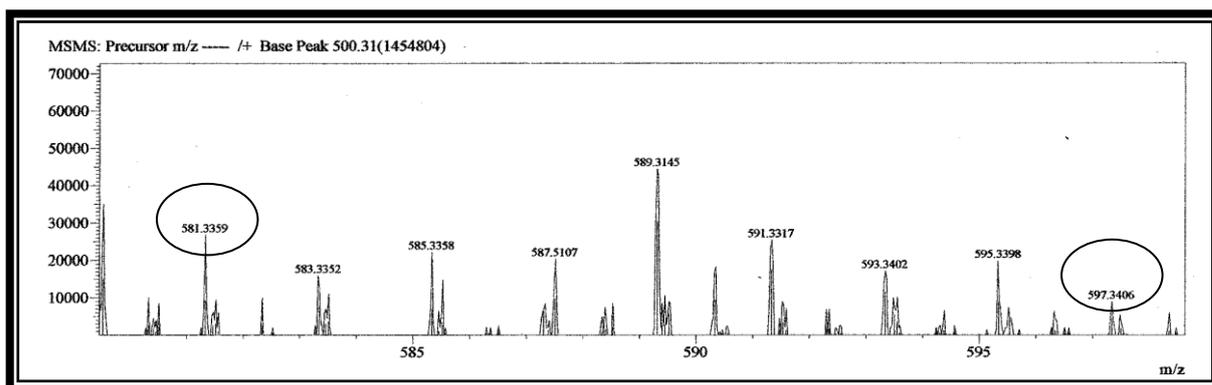


Figura 91- Espectro de massa LOS 14- HIDRO $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$

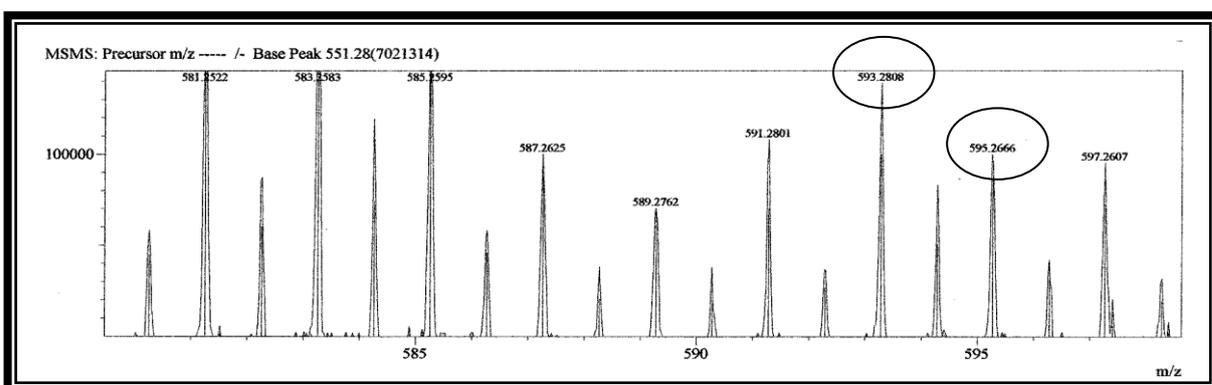


Figura 92- Espectro de massa LOS 14- HIDRO $[M+Cl]^-$

4.5 REDUÇÃO

4.5.1 LOS 9 (23)

A substância **23** (LOS 9) foi submetida a reação de redução com boridreto de sódio, tendo os espectros de massa em alta resolução (IES-EM, Figuras 93 e 94, p. 213) evidenciado a redução de dois dos três grupos carbonila. Assim, o espectro de massa em alta resolução exibiu o íon correspondente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ com m/z 543,3339 (IES-EM, Figura 93, p. 213), além de picos referentes à molécula desprotonada $[M-H]^-$ com m/z 519,3321 e ao aduto de cloro $[M+Cl]^-$ com m/z 555,3088 (IES-EM, Figura 94, p. 213), os quais indicaram a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_7$ que foram em acordo com a estrutura do produto (**27**) de redução nas carbonilas C-3 e C-11. Assim, como esperado não houve redução da carbonila conjugada (C-22).

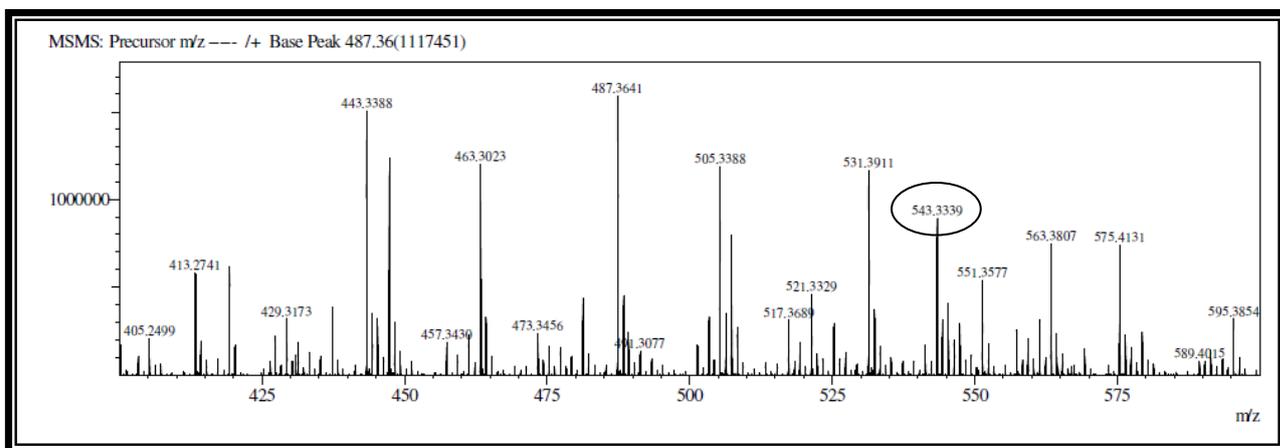
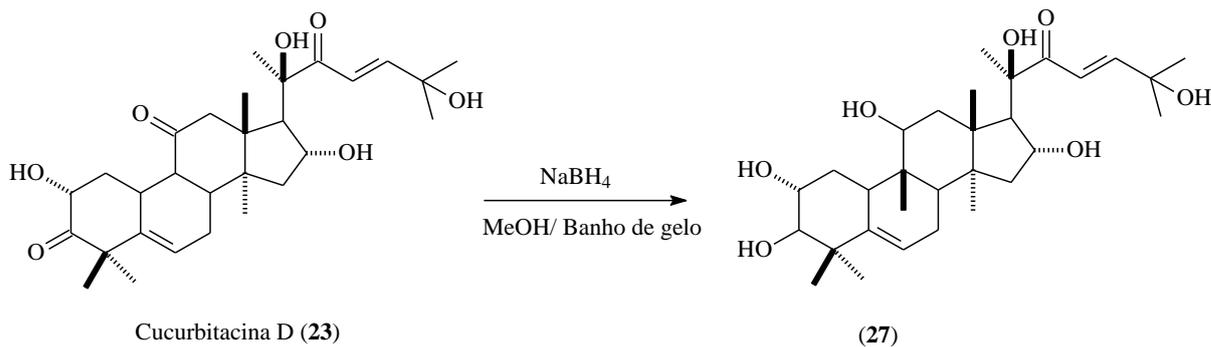


Figura 93- Espectro de massa LOS 9- RED $[M+Na]^+$

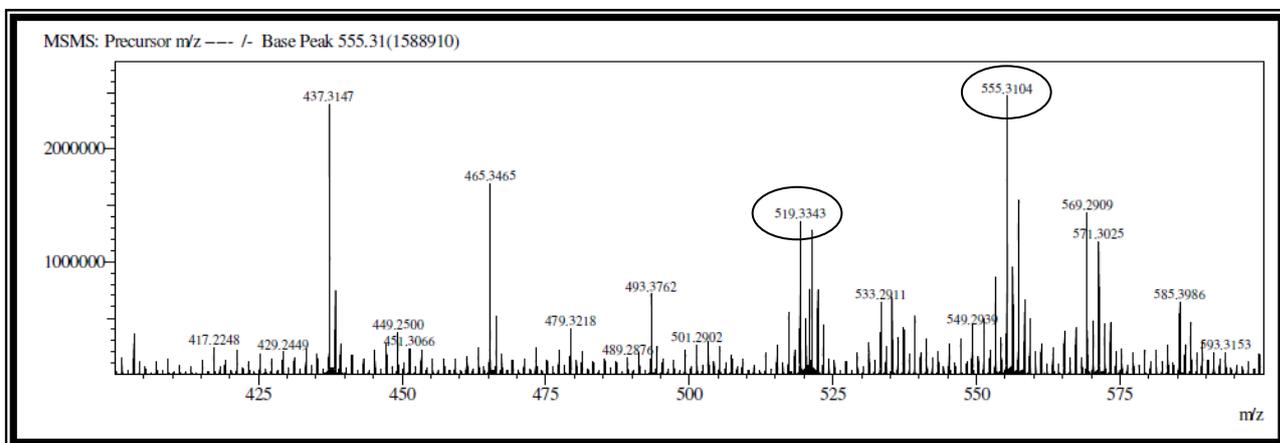


Figura 94- Espectro de massa LOS 9- RED $[M-H]^-$ e $[M+Cl]^-$

CAPÍTULO 5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

5.1.1 CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO

As colunas cromatográficas por adsorção foram realizadas utilizando-se gel de sílica 60 (ϕ 63-200 μm) e (ϕ 40-63 μm) MERCK como fase estacionária para cromatografia do tipo “*flash*”. O diâmetro e o comprimento das colunas variaram de acordo com a alíquota das amostras a serem cromatografadas. As colunas utilizadas na cromatografia de adsorção sob média pressão (cromatografia “*flash*”) foram de vidro resistente a pressão e apresentavam um bulbo na parte superior, para o armazenamento do solvente. Foi empregada nessa técnica uma bomba de ar comprimido modelo INALAR COMPACT 4724059.

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasacas de gel de sílica 60 F₂₅₄ da MERCK (ϕ 2-25 μm) sobre alumínio, com indicador de fluorescência com absorção em 254 nm ou placas de vidro cobertas com gel de sílica 60 da MERCK (ϕ 30-70 μm) preparadas no Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC).

A revelação das substâncias nas placas analíticas de sílica foi realizada por exposição à irradiação na faixa do ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), emitidos por lâmpadas modelo UVSL-25 da mineral *Light* e/ou por aspensão com solução de cloreto férrico a 1% em etanol (C₂H₅OH) e em solução de vanila (C₈H₈O₃) em ácido perclórico (HClO₄) e etanol, seguida de aquecimento em chapa elétrica a 120 °C por aproximadamente 3 minutos.

Os solventes empregados como eluentes foram: hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol, puros ou em misturas binárias, de forma a obter um gradiente crescente de polaridade. Os solventes utilizados foram previamente destilados ou de qualidade P.A. da marca *Synth*. Para os procedimentos de cromatografia sob média pressão os eluentes foram escolhidos após análise por CCD, sendo considerado bom, o eluente que proporcionava um R_f próximo de 0,3 para a mancha de interesse. Os eluentes escolhidos foram utilizados no acondicionamento da sílica na coluna e como eluente de partida no procedimento cromatográfico.

5.1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol puro como fase móvel. A quantidade da amostra a ser submetida a cromatografia foi determinante para a definição do comprimento e diâmetro da coluna bem como a quantidade de fase estacionária.

5.1.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em aparelho da marca SHIMADZU, no Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM/DQOI/UFC), constituído de três bombas de alta pressão, modelo LC-20AT, detector com arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, desgaseificador acoplado, modelo DGU-20AS, um forno termostático para acomodação da coluna, modelo CTO-20A e programa SHIMADZU LC solution (2003-2008, Japão). A análise foi feita em uma coluna semi-preparativa C-18 de fase reversa (Gemini[®], Phenomenex) 250 x 10 mm (5 µm) e como fase móvel os solventes acetonitrila e água com grau CLAE, que foram filtrados à vácuo em membranas de nylon com poros de PTFE de 0,45 µm. As amostras foram dissolvidas com solventes utilizados na fase móvel e filtradas num sistema manual de membranas de teflon 0,45 µm da Whatman. A vazão utilizada foi de 4,72 mL/min e volume de injeção de 200 µL.

5.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Todos os espectros (IV, RMN de ¹H e ¹³C) das substâncias isoladas neste trabalho foram obtidos em equipamentos da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará.

5.2.1 PONTO DE FUSÃO

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram obtidos em equipamento de Microdeterminação Digital da Mettler Toledo com placa aquecedora FP82HT e central de

processamento FP90, localizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min e não foram corrigidas.

5.2.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

Os espectros de massa dos constituintes não voláteis foram obtidos em espectrômetro Shimadzu, modelo QP 5050, acoplado ao Cromatógrafo Gás-Líquido modelo HP – 5890 A série II (CGL/EM) por impacto eletrônico (70 eV) da Universidade Federal do Ceará.

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos por inserção direta em espectrômetro de massa Shimadzu, modelo LCMS-IT-TOF (225-07100-34), com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), do Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR) da Universidade Federal do Ceará.

5.2.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), uni- e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo DPX-500, operando na frequência de 300 e 500 MHz para hidrogênio e 75 e 125 MHz para carbono-13. Para a dissolução das amostras foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl_3), acetona (Acetona- d_6), metanol deuterado (CD_3OD) e piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

As multiplicidades dos sinais nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete).

Através da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de 135° (CH e CH_3 com amplitude em oposição aos CH_2), foi determinado o padrão de hidrogenação dos carbonos. Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro de RMN ^{13}C -CPD (coupling proton decoupling) e DEPT 135°, segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico).

5.2.4 ESPECTROMETRIA NA REGIÃO DE ABSORÇÃO DO INFRAVERMELHO (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no Laboratório de Bioinorgânica (DQOI/UFC) em espectrômetro da marca ABB-BOMEM, modelo FTLA 2000-102 na região de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr para a realização das amostras.

5.3 MATERIAL BOTÂNICO

Luffa operculata Cogn. foi coletada no município de Acarape-Ce. A identificação foi realizada pelo botânico Pro^o Edson de Paula Nunes e uma exsicata da planta encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob o número de registro 43.056, coletada por Francisco José Queiroz Monte em março de 2008.

As partes da planta (talos, folhas, cascas do fruto e fruto) foram separadas, secas, trituradas e submetidas à extração com hexano e, em seguida com etanol à frio.

5.4 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS TALOS DE *Luffa operculata* Cogn.

5.4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICO (LOEHT) E ETANÓLICO (LOEET) (Fluxograma 1, p. 218)

Os talos secos e moídos (935 g) foram extraídos exaustivamente com hexano à temperatura ambiente. A destilação do solvente sob pressão reduzida forneceu 4,1 g de material resinoso amarelo claro, denominado LOEHT.

A torta resultante da extração com hexano foi submetida à extração com etanol à temperatura ambiente. Após destilação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se 22,5 g de material pastoso amarelo esverdeado, denominado LOEET.

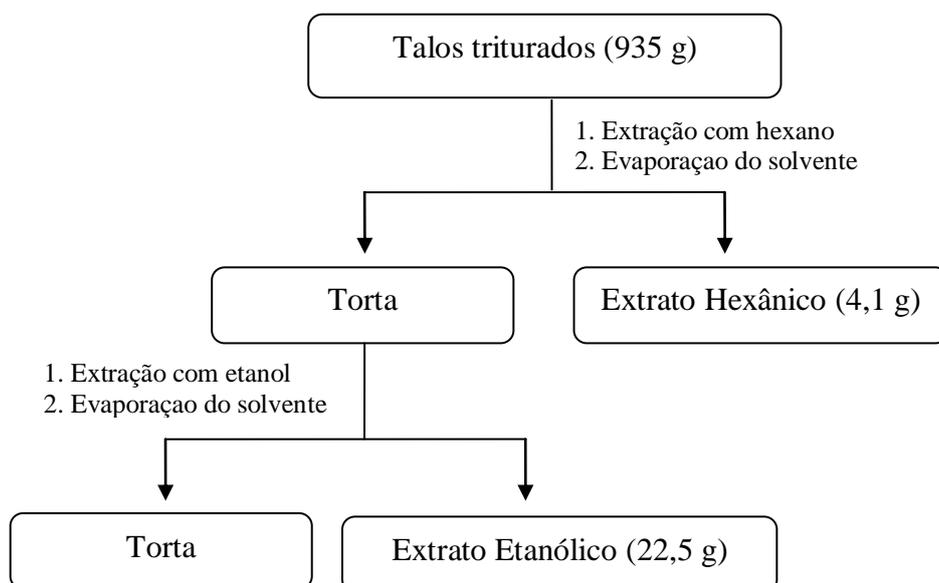
5.4.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO HEXÂNICO DOS TALOS (LOEHT) (Fluxograma 2, p. 219)

O extrato hexânico (4,1 g) foi submetido ao fracionamento em coluna de gel em sílica (coluna filtrante), usando os seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, seguindo uma ordem de polaridade crescente. As soluções foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se as frações conforme mostradas na tabela 25, p. 218.

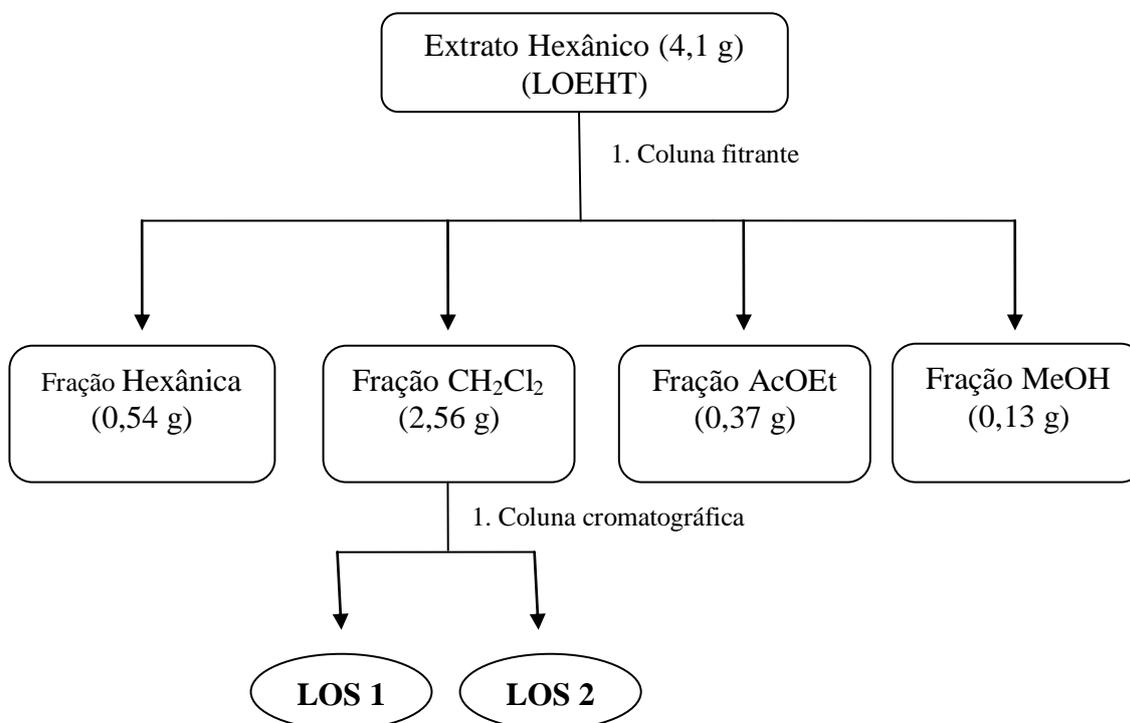
Tabela 25- Frações obtidas a partir do extrato hexânico dos talos (LOEHT)

Eluente	Fração	Peso (g)	Rendimento (%)
Hexano	LOEHT-H	0,54	13,2
Diclorometano	LOEHT-D	2,56	62,4
Acetato de etila	LOEHT-Ac	0,37	9,0
Metanol	LOEHT-M	0,13	3,2
Total	-	3,6	87,8

Fluxograma 1- Obtenção dos extratos hexânico (LOEHT) e etanólico (LOEET) dos talos de *Luffa operculata*



Fluxograma 2- Obtenção das substâncias LOS 1 e LOS 2 a partir do extrato hexânico LOEHT



5.4.3 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO (LOEHT-D)

5.4.4 ISOLAMENTO DE LOS 1 E LOS 2

- ISOLAMENTO DE LOS 1

A fração eluída com diclorometano (LOEHT-D, 2,56 g) foi adsorvida em aproximadamente 6,0 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 28,0 g de gel em sílica em coluna de 250 mL ($\phi = 8,0$ cm) empacotada com hexano. A eluição foi realizada com hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade. Foram coletadas 96 frações (25 mL cada) (Tabela 26, p. 220).

Tabela 26- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEHT-D

Eluente	Identificação	Frações
Hexano	H _H	01-15
Hexano/DCM 10%	H _{H/D}	16-25
Hexano/DCM 20%	H _{H/D}	26-35
Hexano/DCM 30%	H _{H/D}	36-40
Hexano/DCM 40%	H _{H/D}	41-51
Hexano/DCM 50%	H _{H/D}	52-55
Hexano/DCM 70%	H _{H/D}	56-62
Hexano/DCM 90%	H _{H/D}	63-69
DCM	H _D	70-72
DCM/AcOEt 10%	H _{D/Ac}	73-80
DCM/ AcOEt 50%	H _{D/Ac}	81-88
AcOEt	H _{Ac}	89-92
MeOH	H _M	93-96

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças conforme mostra a Tabela 27, abaixo.

Tabela 27- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEHT-D

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-14	H ₁	13,0
15-22	H ₂	135,7
23-29	H ₃	53,1
30-35	H ₄	43,6
36-40	H ₅	65,5
41-48	H ₆	137,0
49-66	H ₇	309,8
67-77	H ₈	263,3
78-83	H ₉	188,5
84-91	H ₁₀	278,3
92-96	H ₁₁	493,0

A fração H₇ (49-66) apresentou-se como um material sólido e exibiu em CCD uma mancha em maior concentração roxa intensa. Após sucessivas lavagens da fração H₇ (309,8 mg) com diclorometano e remoção do solvente (solução amarelada) foi obtido um material branco que, por CCD indicou tratar-se de uma substância pura (**LOS 1**, 102,2 mg), solúvel em piridina e ponto de fusão 150,3-152,2 °C.

- ISOLAMENTO DE LOS 2

A fração H₆ (137,0 mg, Tabela 27, p. 220) foi adsorvida a 0,5 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada em coluna pequena ($\phi = 1,0$ cm), sobre 4,3 g de gel em sílica empacotada com hexano. A eluição foi realizada com hexano, diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt) puros ou em misturas binárias e em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 114 frações (10 mL cada) (Tabela 28, p. 221).

Tabela 28- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração H₆

Eluente	Identificação	Frações
Hexano	H _H	1-13
Hexano/DCM 10%	H _{H/DCM}	14-25
Hexano/DCM 20%	H _{H/DCM}	26-37
Hexano/DCM 30%	H _{H/DCM}	38-49
Hexano/DCM 40%	H _{H/DCM}	50-71
Hexano/DCM 50%	H _{H/DCM}	72-82
Hexano/DCM 70%	H _{H/DCM}	83-93
DCM	H _{DCM}	94-109
AcOEt	H _{Ac}	110-114

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças conforme mostra a Tabela 29, abaixo.

Tabela 29- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração H₆

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-15	H ₁	1,9
16-19	H ₂	17,3
20-26	H ₃	27,8
27	H ₄	6,7
28-40	H ₅	28,2
41-51	H ₆	4,9
52-57	H ₇	1,5
58-109	H ₈	5,4
110	H ₉	4,5
111-114	H ₁₀	2,5

Após remoção completa do solvente foi obtido um material resinoso branco que, por CCD indicou que as frações de 16 a 19 tratavam-se de apenas uma substância (**LOS 2**, 17,3 mg) solúvel em piridina.

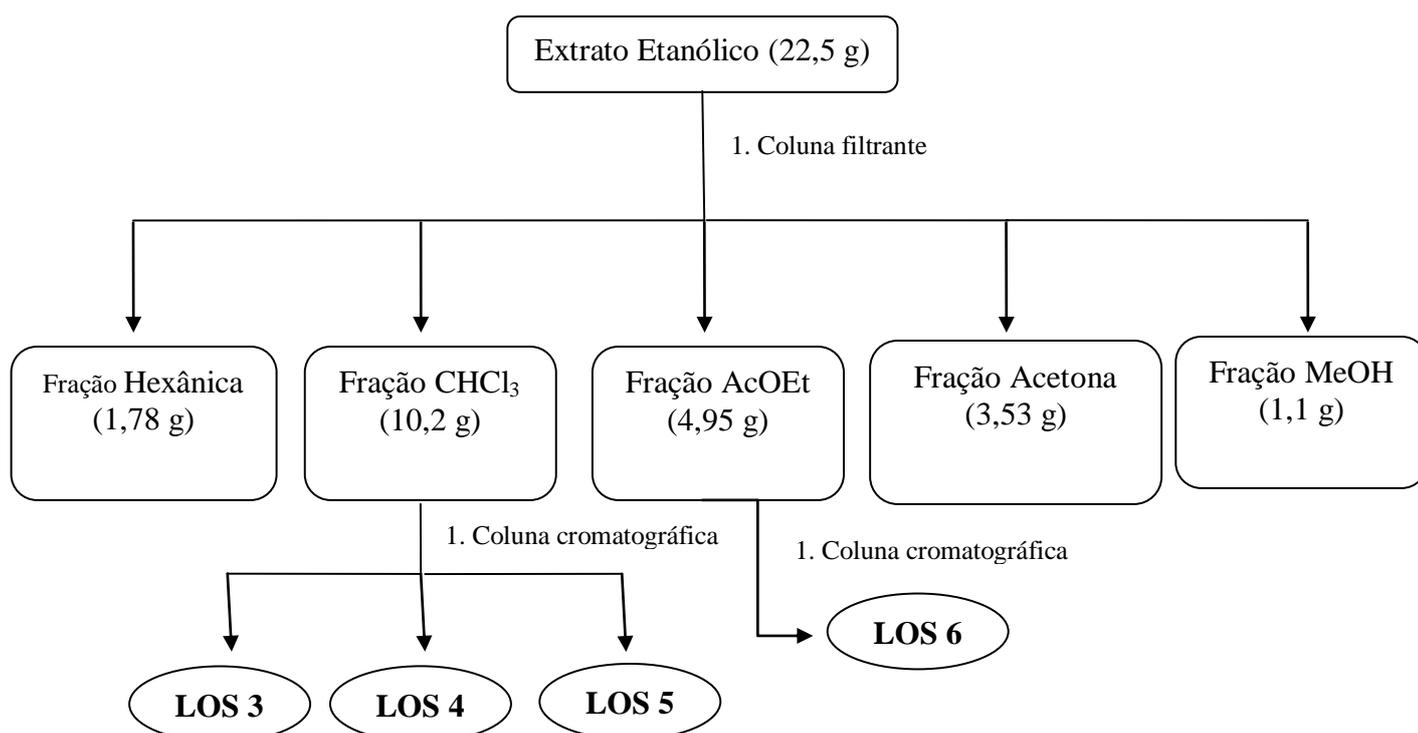
5.4.5. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS TALOS (LOEET) (Fluxograma 3, p. 222)

O extrato etanólico (22,5 g) foi submetido ao fracionamento em coluna de gel em sílica (coluna filtrante), usando os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol, seguindo uma ordem de polaridade crescente. As soluções foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se as frações conforme mostradas na Tabela 30, p. 222.

Tabela 30- Frações obtidas a partir do extrato etanólico dos talos (LOEET)

Eluente	Fração	Peso (g)	Rendimento (%)
Hexano	LOEET-H	1,78	7,9
Clorofórmio	LOEET-C	10,2	45,3
Acetato de etila	LOEET-AcOEt	4,95	22,0
Acetona	LOEET-Ac	3,53	15,7
Metanol	LOEET-M	1,1	4,9
Total	-	21,56	95,8

Fluxograma 3- Obtenção das substâncias **LOS 3, LOS 4, LOS 5 e LOS 6** a partir do extrato etanólico LOEET



5.4.6 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (LOEET-C)

5.4.7 ISOLAMENTO DE LOS 3, LOS 4, LOS 5 E LOS 6

- ISOLAMENTO DE LOS 3

A fração CHCl_3 (10,2 g) foi adsorvida em aproximadamente 49,0 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 114,0 g de gel em sílica em coluna de 1000 mL ($\phi = 7,0$ cm) empacotada com hexano. Na eluição foram utilizados hexano, acetato de etila (AcOEt), acetona, metanol (MeOH) e etanol (EtOH) puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade. Foram coletadas 157 frações (50 mL cada) (Tabela 31, p. 223).

Tabela 31- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEET-C

Eluente	Identificação	Frações
Hexano	E_H	01-11
Hexano/AcOEt 5%	$E_{H/Ac}$	12-30
Hexano/AcOEt 10%	$E_{H/Ac}$	31-40
Hexano/AcOEt 20%	$E_{H/Ac}$	41-50
Hexano/AcOEt 30%	$E_{H/Ac}$	51-60
Hexano/AcOEt 40%	$E_{H/Ac}$	61-71
Hexano/AcOEt 50%	$E_{H/Ac}$	72-79
Hexano/AcOEt 80%	$E_{H/Ac}$	80-91
AcOEt	E_{Ac}	92-101
AcOEt/Acetona 30%	$E_{Ac/Acetona}$	102-111
AcOEt/Acetona 50%	$E_{Ac/Acetona}$	112-122
Acetona	$E_{Acetona}$	123-132
Acetona/MeOH 30%	$E_{Acetona/M}$	133-142
Acetona/MeOH 50%	$E_{Acetona/M}$	143-152
MeOH	E_M	153-155
EtOH	E_E	156-157

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças conforme mostra a Tabela 32, p. 224.

Tabela 32- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEET-C

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-17	E ₁	320,0
18-25	E ₂	733,4
26-34	E ₃	1.090
35-39	E ₄	447,0
40-45	E ₅	400,0
46-49	E ₆	302,3
50-54	E ₇	148,4
55-70	E ₈	920,7
71-78	E ₉	374,3
79-84	E ₁₀	546,8
85-90	E ₁₁	470,4
91-100	E ₁₂	371,9
101-110	E ₁₃	356,9
111-120	E ₁₄	145,9
121-130	E ₁₅	879,5
131-157	E ₁₆	581,3

De um modo geral, as frações compreendidas entre E₁ e E₁₂ foram analisadas, porém, apenas a fração E₂ permitiu uma análise cromatográfica que resultou na obtenção de subfrações com massas consideráveis para continuidade de fracionamento. As frações E₁₃ a E₁₆ mostraram-se bastante polares.

A fração E₂ foi adsorvida a 2,0 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada em coluna 125 mL ($\phi = 3,5$ cm), sobre 27,6 g de gel em sílica e empacotada com hexano. A eluição foi realizada com hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) puros ou em misturas binárias e em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 65 frações (25 mL cada) (Tabela 33, p. 224).

Tabela 33- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração E₂

Eluente	Identificação	Frações
Hexano	E _{2H}	01-03
Hexano/AcOEt 1%	E _{2H/Ac}	04-23
Hexano/AcOEt 2%	E _{2H/Ac}	24-29
Hexano/AcOEt 3%	E _{2H/Ac}	30-35
Hexano/AcOEt 4%	E _{2H/Ac}	36-38
Hexano/AcOEt 5%	E _{2H/Ac}	39-45
Hexano/AcOEt 10%	E _{2H/Ac}	46-51
Hexano/AcOEt 50%	E _{2H/Ac}	52-57
AcOEt	E _{2Ac}	58-60
AcOEt/MeOH 10%	E _{2Ac/M}	61-65

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças conforme mostra a Tabela 34, abaixo.

Tabela 34- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração E₂

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-10	E _{2A}	10,5
11	E _{2B}	1,6
12-14	E _{2C}	213,3
15-30	E _{2D}	67,4
31-50	E _{2E}	136,7
51-52	E _{2F}	15,1
53-60	E _{2G}	190,2
61-63	E _{2H}	6,2
64-65	E _{2I}	15,5

A fração E_{2D} (67,4 mg), um material sólido alaranjado, foi lavado com hexano. Após remoção do solvente (solução alaranjada) foi obtido um material alaranjado que, por CCD indicou que as frações 15 a 19 tratavam-se de apenas uma substância (**LOS 3**, 6,1 mg) solúvel em clorofórmio e ponto de fusão 234,9-235,7 °C.

- ISOLAMENTO DE LOS 4

As frações E_{2C} a E_{2E} (417,4 mg), foram adsorvidas em 100 mg de gel em sílica “flash”, pulverizado em gral de porcelana e acondicionados em coluna de 125 mL ($\phi = 1,5$ cm), sobre 11,7 g de gel em sílica “flash”. A eluição procedeu-se inicialmente de forma isocrática com hexano/Acetato de etila (AcOEt) (97:3). Após obtenção das frações 14-25 a coluna foi eluída com acetato de etila. Foram coletadas 30 frações de 10 mL cada, conforme mostra-se descrito na Tabela 35, p. 225.

Tabela 35- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração E_{2C} a E_{2E}

Eluente	Frações	Identificação	Massa (mg)
Hexano/ AcOEt 97:3	1-2	E _{2CA}	7,4
	3	E _{2CB}	77,9
	4	E _{2CC}	63,3
	5-13	E _{2CD}	38,3
	14-25	E _{2CE}	18,6
AcOEt	26-30	E _{2CF}	96,7

A fração 4 (E_{2CC} , 63,3 mg) apresentou-se como um óleo amarelo e exibiu em CCD apenas uma mancha. Entretanto, a análise espectroscópica mostrou-se tratar de uma mistura de ésteres: **LOS 4 (14 e 15)**. Os dados físicos e espectrométricos se encontram descritos nas págs. 147 a 152.

- ISOLAMENTO DE LOS 5

Durante a eluição das frações 50-54 (E_7 : fração obtida com hexano/Acetato de etila (AcOEt) (70:30) de LOEET-C, Tabela 32, p. 224), houve a formação de um precipitado de coloração alaranjada que foi lavado com hexano. Após remoção do solvente foi obtido um material sólido alaranjado que, por CCD indicou tratava-se de apenas uma substância (**LOS 5**, 10 mg) solúvel em acetona e ponto de fusão 258,1-261,1 °C.

- ISOLAMENTO DE LOS 6

A fração Acetato de etila (4,95 g) de LOEET (fluxograma 3, p. 222) foi adsorvida em aproximadamente 4,40 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 42,50 g de gel em sílica em coluna de 250 mL ($\phi = 4,5$ cm) e empacotada com hexano. Na eluição foram utilizados hexano, acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade. Foram coletadas 161 frações (25 mL cada) (Tabela 36, p. 226).

Tabela 36- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEET-AcOEt

Eluente	Identificação	Frações
Hexano	E_H	01-05
Hexano/AcOEt 5%	$E_{H/Ac}$	06-19
Hexano/AcOEt 10%	$E_{H/Ac}$	20-27
Hexano/AcOEt 20%	$E_{H/Ac}$	28-64
Hexano/AcOEt 30%	$E_{H/Ac}$	65-81
Hexano/AcOEt 40%	$E_{H/Ac}$	82-99
Hexano/AcOEt 50%	$E_{H/Ac}$	100-117
Hexano/AcOEt 80%	$E_{H/Ac}$	118-128
AcOEt	E_{Ac}	129-139
AcOEt/Acetona 50%	$E_{Ac/Acetona}$	140-147
Acetona	$E_{Acetona}$	148-152
Acetona/MeOH 50%	$E_{Acetona/M}$	153-156
MeOH	E_M	157-161

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças conforme mostra a Tabela 37, abaixo.

Tabela 37- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEET-AcOEt

Frações	Identificação	Massa (mg)
1-10	Ac	1,5
11-14	Ac ₂	2,4
15-20	Ac ₃	3,6
21-24	Ac ₄	4,7
25-29	Ac ₅	1,2
30-31	Ac ₆	9,3
32-34	Ac ₇	18,7
35-40	Ac ₈	38,2
41-46	Ac ₉	39,3
47-60	Ac ₁₀	116,9
61-100	Ac ₁₁	1.072,2
101-121	Ac ₁₂	643,0
122-127	Ac ₁₃	243,0
128-139	Ac ₁₄	341,0
140-149	Ac ₁₅	172,7
150-159	Ac ₁₆	206,5
160-161	Ac ₁₇	54,2

A fração Ac₁₀ (116,9 mg), um material sólido branco, foi lavado com Acetato de etila (AcOEt). Após remoção do solvente foi obtido um material branco que, por CCD indicou que as frações 47 a 60 tratavam-se de apenas uma substância (**LOS 6**, 7,1 mg) solúvel em piridina e ponto de fusão 262,4-262,8 °C.

De um modo geral, as frações compreendidas entre Ac₁₁ e Ac₁₇ foram analisadas, porém, apenas a fração Ac₁₀ permitiu uma análise cromatográfica que resultou na obtenção de subfrações com massas consideráveis para continuidade de fracionamento. Além dessas, algumas frações mostraram-se bastante polares.

5.5 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FOLHAS DE *Luffa operculata* Cogn.

5.5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICO (LOEHFO) E ETANÓLICO (LOEEFO) (Fluxograma 4, p. 229)

As folhas secas e moídas (730 g) foram extraídas exaustivamente com hexano à temperatura ambiente. A destilação do solvente sob pressão reduzida forneceu 5,7 g de material resinoso amarelo claro, denominado LOEHFO.

A torta resultante da extração com hexano foi submetida à extração com etanol à temperatura ambiente. Após destilação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se 29,9 g de material pastoso amarelo esverdeado, denominado LOEEFO.

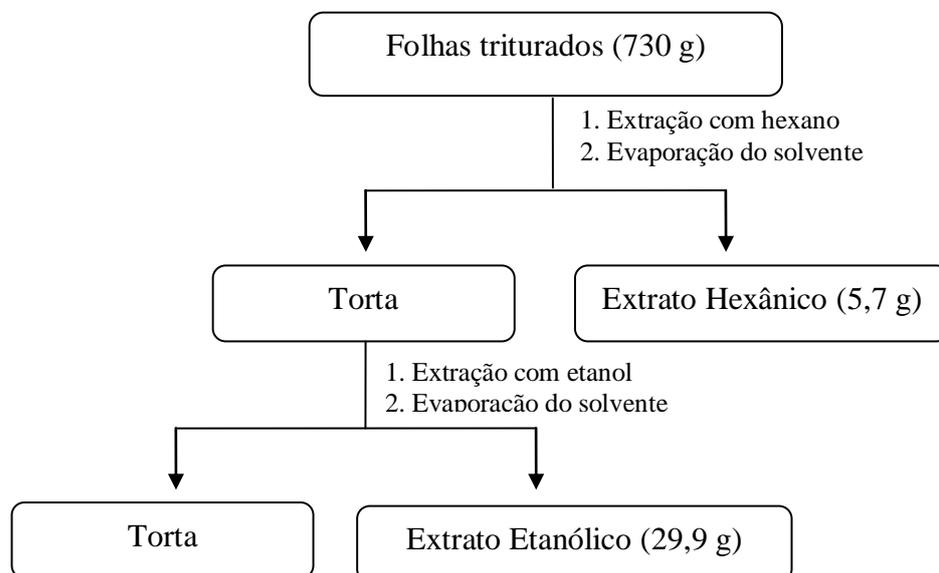
5.5.2. Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas (LOEHFO) (Fluxograma 5, p. 229)

O extrato hexânico (5,7 g) foi submetido ao fracionamento em coluna em gel em sílica (coluna filtrante), usando os seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, seguindo uma ordem de polaridade crescente. As soluções foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se as frações conforme mostradas na Tabela 38, p. 228.

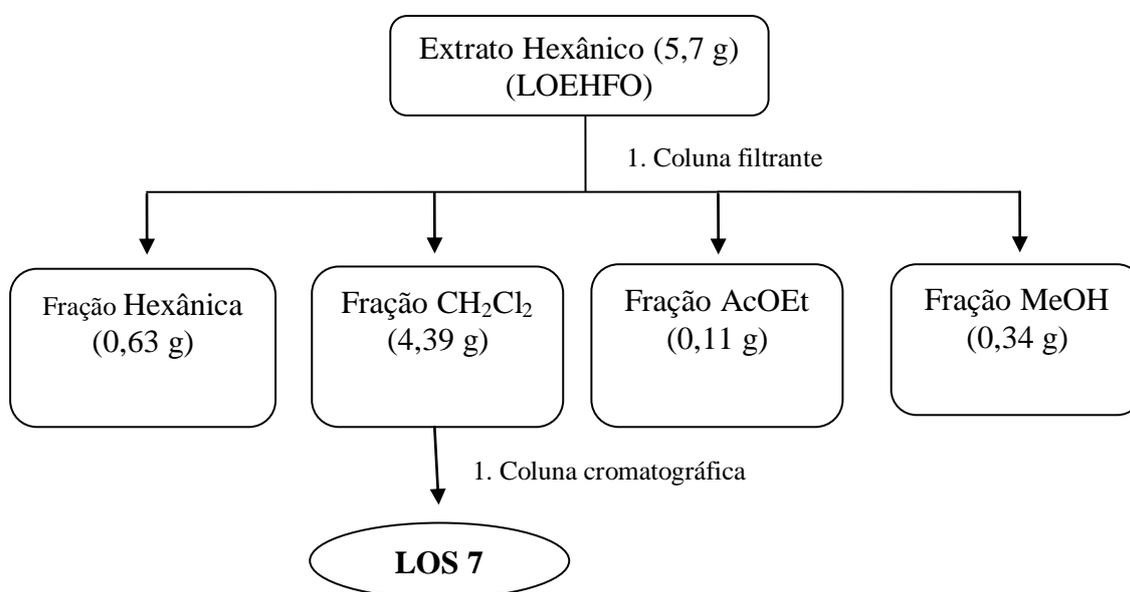
Tabela 38- Frações obtidas a partir do extrato hexânico das folhas (LOEHFO)

Eluente	Fração	Peso (g)	Rendimento (%)
Hexano	LOEHFO-H	0,63	11,1
Diclorometano	LOEHFO-D	4,39	77,0
Acetato de etila	LOEHFO-Ac	0,11	1,9
Metanol	LOEHFO-M	0,34	6,0
Total	-	5,47	96,0

Fluxograma 4- Obtenção dos extratos hexânico (LOEHFO) e etanólico (LOEEFO) das folhas de *Luffa operculata*



Fluxograma 5- Obtenção da substância **LOS 7** a partir do extrato hexânico LOEHFO



5.5.3 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO (LOEHFO-D)

5.5.4 ISOLAMENTO DE LOS 7

A fração eluída com diclorometano (LOEHFO-D, 4,39 g) foi adsorvida em aproximadamente 13,9 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 39,7 g de gel em sílica em coluna de 500 mL ($\phi = 6$ cm) empacotada com hexano. A eluição foi realizada com hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade. Foram coletadas 99 frações (25 mL cada) (Tabela 39, p. 230).

Tabela 39- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEHFO-D

Eluente	Identificação	Frações
Hexano	H _H	01-05
Hexano/DCM 10%	H _{H/D}	06-12
Hexano/DCM 20%	H _{H/D}	13-20
Hexano/DCM 30%	H _{H/D}	21-27
Hexano/DCM 40%	H _{H/D}	28-38
Hexano/DCM 50%	H _{H/D}	39-45
Hexano/DCM 60%	H _{H/D}	46-51
Hexano/DCM 70%	H _{H/D}	52-58
Hexano/DCM 80%	H _{H/D}	59-65
DCM	H _D	66-75
DCM/ AcOEt 50%	H _{D/Ac}	76-82
AcOEt	H _{Ac}	83-95
MeOH	H _M	96-99

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças conforme mostra a Tabela 40, p. 231.

Tabela 40- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEHFO-D

Frações	Identificação	Massa (mg)
01-03	H ₁	10,7
04-09	H ₂	2,7
10-16	H ₃	217,8
17-29	H ₄	711,9
30-34	H ₅	197,6
35-51	H ₆	589,2
52-77	H ₇	743,7
78-79	H ₈	1.0439
80-82	H ₉	226,4
83-87	H ₁₀	158,1
88-99	H ₁₁	272,4

De um modo geral, as frações compreendidas entre H₁ e H₇ foram analisadas, porém, apenas a fração H₇ permitiu uma análise cromatográfica que resultou na obtenção subfrações com massas consideráveis para continuidade de fracionamento. As frações E₈ a E₁₁ mostraram-se polares.

Após sucessivas lavagens da fração H₇ (743,7 mg) com hexano e remoção do solvente (solução amarelada) foi obtido um material branco que, por CCD exibiu apenas uma mancha. Entretanto, a análise espectroscópica mostrou-se tratar de uma mistura de esteróides: **LOS 7 (1 e 2, 75,8 mg)**, solúvel em clorofórmio e ponto de fusão 154,2-156,7 °C. Os dados físicos e espectrométricos se encontram descritos nas págs. 90 a 97.

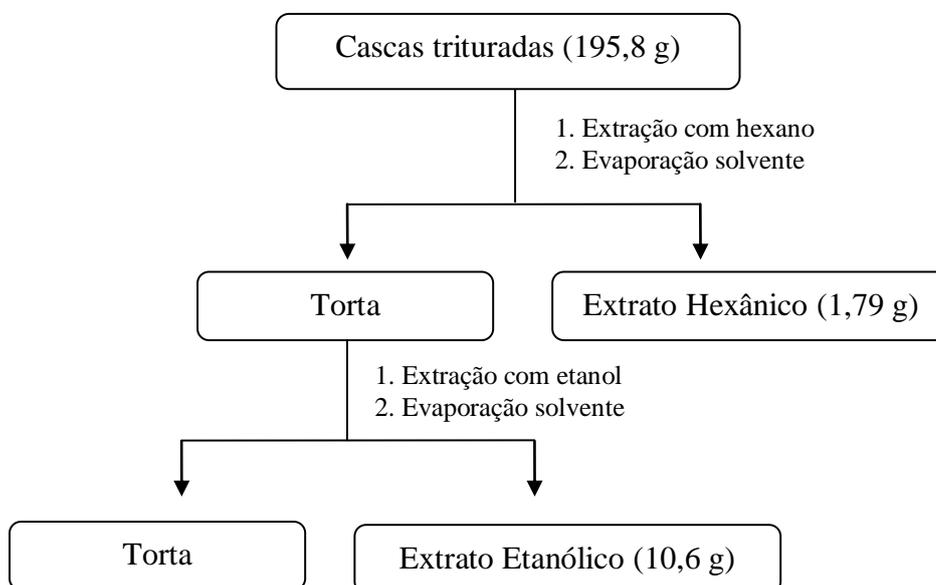
5.6 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DA CASCA DO FRUTO DE *Luffa operculata* Cogn.

5.6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICOS (LOEHCA) E ETANÓLICO (LOEECA) (Fluxograma 6, p. 232)

As cascas do fruto secas e moídas (195,8 g) foram extraídas exaustivamente com hexano à temperatura ambiente. A destilação do solvente sob pressão reduzida forneceu 1,79 g de material resinoso amarelo claro, denominado LOEHCA.

A torta resultante da extração com hexano foi submetida à extração com etanol à temperatura ambiente. Após destilação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se 10,6 g de material pastoso amarelo, denominado LOEECA.

Fluxograma 6- Obtenção dos extratos hexânico (LOEHCA) e etanólico (LOEECA) das cascas de *Luffa operculata*



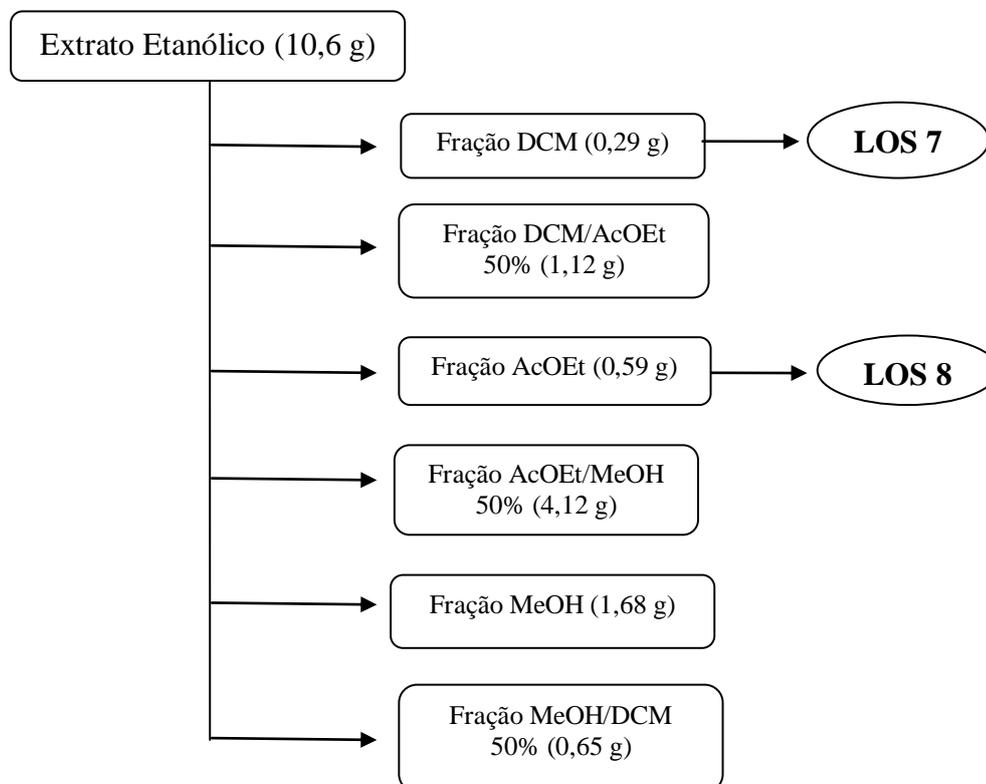
5.6.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DO FRUTO (LOEECA) (Fluxograma 7, p. 233)

O extrato etanólico (10,6 g) foi submetido ao fracionamento em coluna em gel em sílica (coluna filtrante), usando os seguintes solventes: hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), seguindo uma ordem de polaridade crescente. As soluções foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se as frações conforme mostradas na Tabela 41, abaixo.

Tabela 41- Frações obtidas a partir do extrato etanólico das cascas do fruto (LOEECA)

Eluente	Fração	Peso (g)
Hexano	LOEECA-H	-
DCM	LOEECA-D	0,29
DCM / AcOEt 50%	LOEECA-Ac	1,12
AcOEt	LOEECA-Ac	0,59
AcOEt / MeOH 50%	LOEECA-Ac	4,12
MeOH	LOEECA-M	1,68
MeOH/DCM 50%	LOEECA-M/D	0,65
Total	-	8,45

Fluxograma 7- Obtenção das substâncias LOS 7 e LOS 8 a partir do extrato etanólico LOEECA



5.6.3 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO (LOEECA-D)

5.6.4 ISOLAMENTO DE LOS 7

A fração eluída com diclorometano (0,29 g) foi adsorvida em aproximadamente 1,5 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 7,5 g de gel em sílica em coluna de 125 mL (diâmetro $\phi = 3,5$ cm) empacotada com hexano. A eluição foi realizada com hexano, diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade. Foram coletadas 5 frações (200 mL cada) (Tabela 42, p. 234).

Tabela 42- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEECA-D

Eluente	Identificação	Frações
Hexano/DCM 50%	E _{H/D}	01
Hexano/DCM 70%	E _{H/D}	02
Hexano/DCM 90%	E _{H/D}	03-04
MeOH	E _M	05

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças conforme mostra a Tabela 43, abaixo.

Tabela 43- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEECA-D

Frações	Identificação	Massa (mg)
01	E ₁	74,5
02	E ₂	45,8
03-04	E ₃	40,3
05	E ₄	77,3

Após sucessivas lavagens da fração E₂ (45,8 mg) com hexano e remoção do solvente (solução amarelada) foi obtido um material branco que, por CCD indicou tratar-se de uma mistura de esteróides: **LOS 7** (21,0 mg).

A fração eluída com diclorometano/Acetato de etila (DCM/AcOEt 50%, Fluxograma 7, p. 233) após ser analisada por CCD mostrou uma mancha roxa intensa com R_f igual ao mostrado para a fração E₂, como substância majoritária, o que nos levou a crer tratar-se da mistura de esteróides [**LOS 7 (1 e 2)**], que após cromatografada confirmou nossas suspeitas nos restando apenas algumas subfrações polares.

As demais frações (AcOEt/MeOH 50%, MeOH e MeOH/DCM, Fluxograma 7, p. 233) também foram analisadas contudo mostraram-se muito polares, desmotivando a continuação do fracionamento.

5.6.5 TRATAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (LOEECA-AC)

5.6.6 ISOLAMENTO DE LOS 8

A fração eluída com acetato de etila (0,589 g) foi adsorvida em aproximadamente 3,3 g de gel em sílica desativada com etanol/H₂O 5%, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 15,7 g de gel em sílica em coluna de 100 mL ($\phi = 3,5$ cm) empacotada

com diclorometano. A eluição foi realizada com diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade. Foram coletadas 7 frações (200 mL cada) (Tabela 44, p. 235).

Tabela 44- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEECA-Ac

Eluente	Identificação	Frações
DCM	E _D	01
DCM/AcOEt 10%	E _{D/Ac}	02
DCM/AcOEt 30%	E _{D/Ac}	03
DCM/AcOEt 50%	E _{D/Ac}	04
DCM/AcOEt 70%	E _{D/Ac}	05
AcOEt	E _{Ac}	06
AcOEt/MeOH 50%	E _{Ac/M}	07

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças conforme mostra a Tabela 45, abaixo.

Tabela 45- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração LOEECA-Ac

Frações	Identificação	Massa (mg)
01	E ₁	16,3
02	E ₂	14,4
03	E ₃	68,6
04	E ₄	100,4
05	E ₅	131,4
06	E ₆	222,8

Após sucessivas lavagens da fração E₅ (131,4 mg) com acetato de etila e remoção do solvente (solução amarelada) foi obtido um material branco que, por CCD indicou tratar-se de uma substância pura (**LOS 8**, 24,3 mg), solúvel em piridina e ponto de fusão 136,8-137,3 °C.

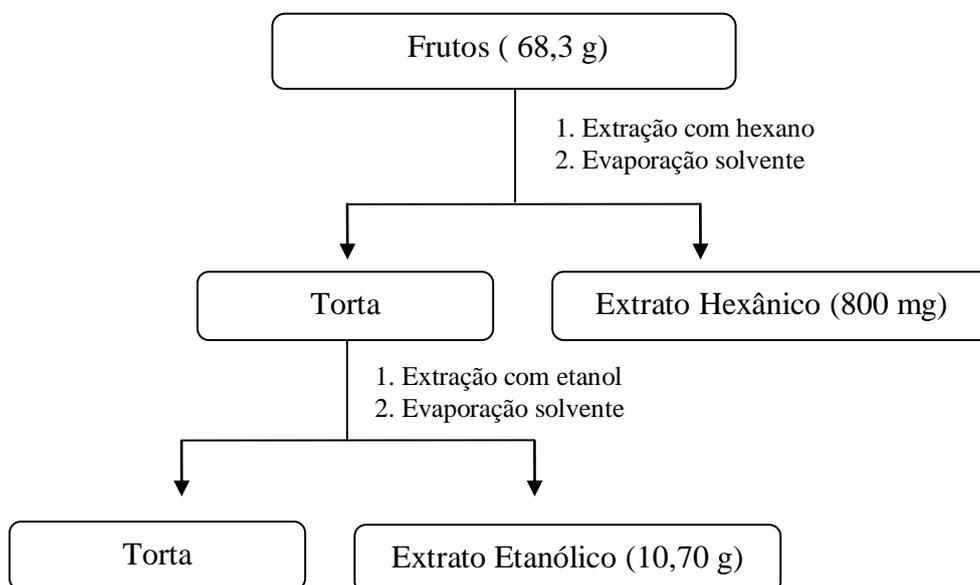
5.7 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DOS FRUTOS DE *Luffa operculata* Cogn.

5.7.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HEXÂNICOS (LOEHF) E ETANÓLICO (LOEEF) (Fluxograma 8, p. 236)

Os frutos secos e moídos (68,3g) foram extraídos exaustivamente com hexano à temperatura ambiente. A destilação do solvente sob pressão reduzida forneceu 800 mg de material resinoso amarelo claro, denominado LOEHF.

A torta resultante da extração com hexano foi submetida à extração com etanol à temperatura ambiente. Após destilação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se 10,70 g de material pastoso amarelo esverdeado, denominado LOEEF.

Fluxograma 8- Obtenção dos extratos hexânico (LOEHF) e etanólico (LOEEF) dos frutos de *Luffa operculata*



5.7.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS FRUTOS (LOEEF) (Fluxograma 9, p. 240)

O extrato etanólico (7,60 g) foi submetido ao fracionamento em coluna em gel em sílica, adsorvido em aproximadamente 4,50 g de gel em sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 21,90 g de gel em sílica em coluna de 250 mL ($\phi = 8,0$ cm) empacotada com hexano. A eluição foi realizada com hexano, clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e etanol (EtOH), puros ou em misturas binárias e em escala crescente de polaridade. As soluções foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se 142 frações (25 mL cada) conforme mostradas na Tabela 46 abaixo.

Tabela 46- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração (LOEEF)

Eluente	Identificação	Frações
Hexano	-	-
Hexano/clorofórmio (10%)	-	-
Hexano/clorofórmio (20%)	-	-
Clorofórmio	LOEEF-C	01-34
Clorofórmio/AcOEt (10%)	LOEEF-Ac	35-58
Clorofórmio/AcOEt (30%)	LOEEF-Ac	59-83
Clorofórmio/AcOEt (50%)	LOEEF-Ac	84-109
Clorofórmio/AcOEt (80%)	LOEEF-Ac	110-127
AcOEt	LOEEF-Ac	128-140
MeOH	LOEEF-M	141
EtOH	LOEEF-E	142

As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças fornecendo sob a forma de sólidos amorfos amarelados as seguintes frações: 45-64 (621,10 mg), 65-108 (1.149,10 mg), 109-116 (111,50 mg), 117-124 (66,0 mg) e 125-140 (278,90 mg). Todas as frações acima citadas foram solúveis em metanol e revelaram-se como misturas (R_f s praticamente iguais). Tentativas de purificação por CCDP, CLC e recristalização com solventes variados não deram bons resultados. A análise qualitativa de uma pequena das amostras das frações 65-108 e 125-140 por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Fase móvel: acetonitrila:água (45:55); fluxo: 1 mL/min) revelou a presença de cinco substâncias principais para a fração 65-108 e uma substância para a fração 125-140 (Figuras 95 e 96, p. 239 e 240), com tempos de retenção (t_R) próximos, descritos na Tabela 47, p.238.

Tabela 47- Dados referentes à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das frações 65-108 e 125-140

Fração	Substância	t _R
65-108	LOS 9	6,3
	LOS 10	6,8
	LOS 11	7,3
	LOS 12	8,2
	LOS 13	11,4
125-140	LOS 14	4,9

5.7.3 ISOLAMENTO DE LOS 9, LOS 10, LOS 11, LOS 12 E LOS 13

O isolamento e purificação dos constituintes foi possível por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tendo como base o cromatograma visto na Figura 95, p. 239. A partir da fração 65-108 (212 mg) foram coletadas as frações LOS 9 (38,2 mg), LOS 10 (14,5 mg), LOS 11 (12,8 mg), LOS 12 (8,3 mg) e LOS 13 (9,8 mg). O isolamento destas foi realizado utilizando coluna phenomenex – 250 x 4,6 mm C-18 e como fase móvel a mistura de solvente acetonitrila (45%) e água (55%), fluxo de 1 mL/min e detector de ultravioleta (UV) cm comprimento de onda 215-400 nm. As amostras foram dissolvidas na mesma mistura binária [ACN:H₂O (45:55)].

A coleta das substâncias relativa aos picos principais do cromatograma permitiu separar cinco frações. Os picos 1 a 5 do cromatograma (Figura 95, p. 239), com tempo de retenção (t_R) descrito na Tabela 48, p. 238. Essas substâncias apresentaram-se como cristais amorfos amarelados, solúveis em metanol e com ponto de fusão de 150,4-151,9 °C (LOS 9), 140,0-150,0 °C (LOS 10), 150,4-150,6 (LOS 11), 182,8-183,8 °C (LOS 12) e 147,7-148,1 °C (LOS 13).

Tabela 48- Frações obtidas através de CLAE a partir LOEEF

Fração	Peso (mg)	Rendimento (%)	Tempo de retenção
LOS 9	38,2	18,02	6,3
LOS 10	14,5	6,84	6,8
LOS 11	12,8	6,04	7,3
LOS 12	8,3	3,91	8,2
LOS 13	9,8	4,62	11,4

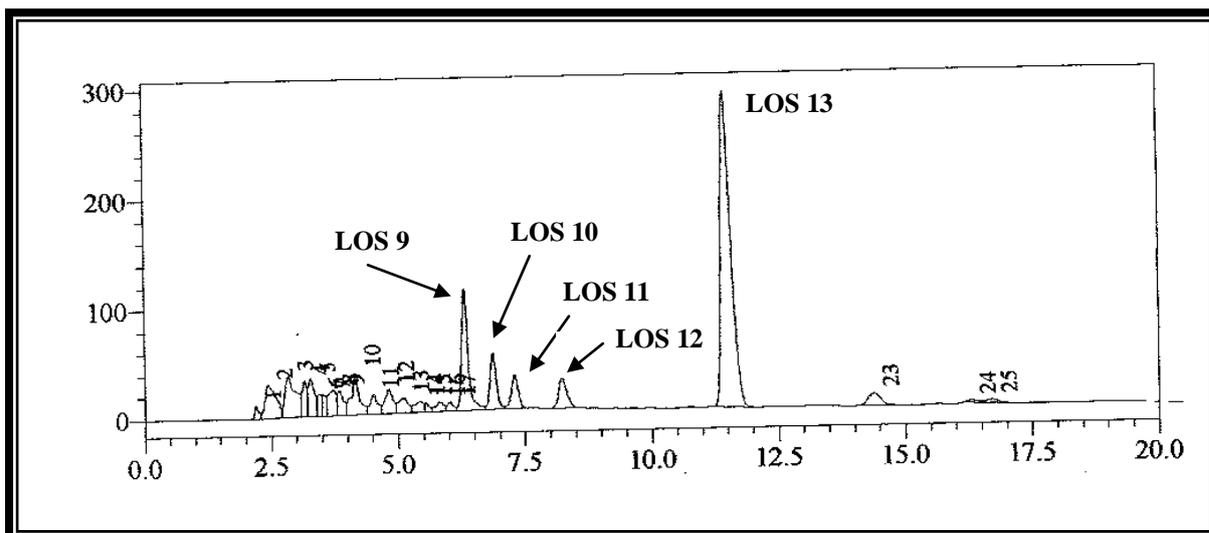


Figura 95- Cromatograma em fase líquida (CLAE) da fração 65-108

5.7.4 ISOLAMENTO DE LOS 14

O isolamento e purificação do constituinte foi possível por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tendo como base o cromatograma visto na Figura 96, p. 240. A partir da fração 125-140 (269 mg) foi coletada a fração LOS 14 (58,0 mg). O isolamento foi realizado utilizando coluna phenomenex – 250 x 4,6 mm C-18 e como fase móvel a mistura de solvente acetonitrila (45%) e água (55%), fluxo de 1 mL/min e detector de ultravioleta (UV) cm comprimento de onda 215-400 nm. A amostra foi dissolvida na mesma mistura binária [ACN:H₂O (45:55)].

A coleta da substância relativa ao pico principal do cromatograma permitiu separar a fração. O pico 1 do cromatograma (Figura 96, p. 240), com tempo de retenção (t_R) descrito na Tabela 49, p. 239. Essa substância apresentou-se como cristais amorfos amarelados, solúveis em metanol e com ponto de fusão de 160,8-162,7 °C.

Tabela 49- Frações obtidas através de CLAE a partir LOEEF

Fração	Peso (mg)	Rendimento (%)	Tempo de retenção
LOS 14	58	21,56	4,9

Fluxograma 9- Obtenção das substâncias **LOS 9, LOS 10, LOS 11, LOS 12, LOS 13 e LOS 14** a partir do extrato etanólico LOEEF

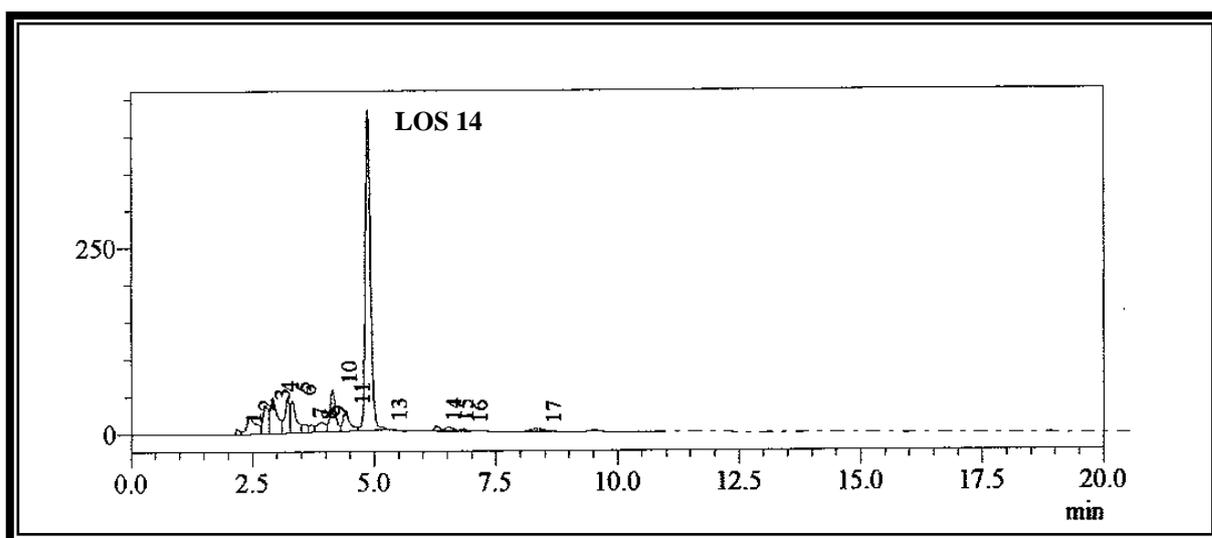
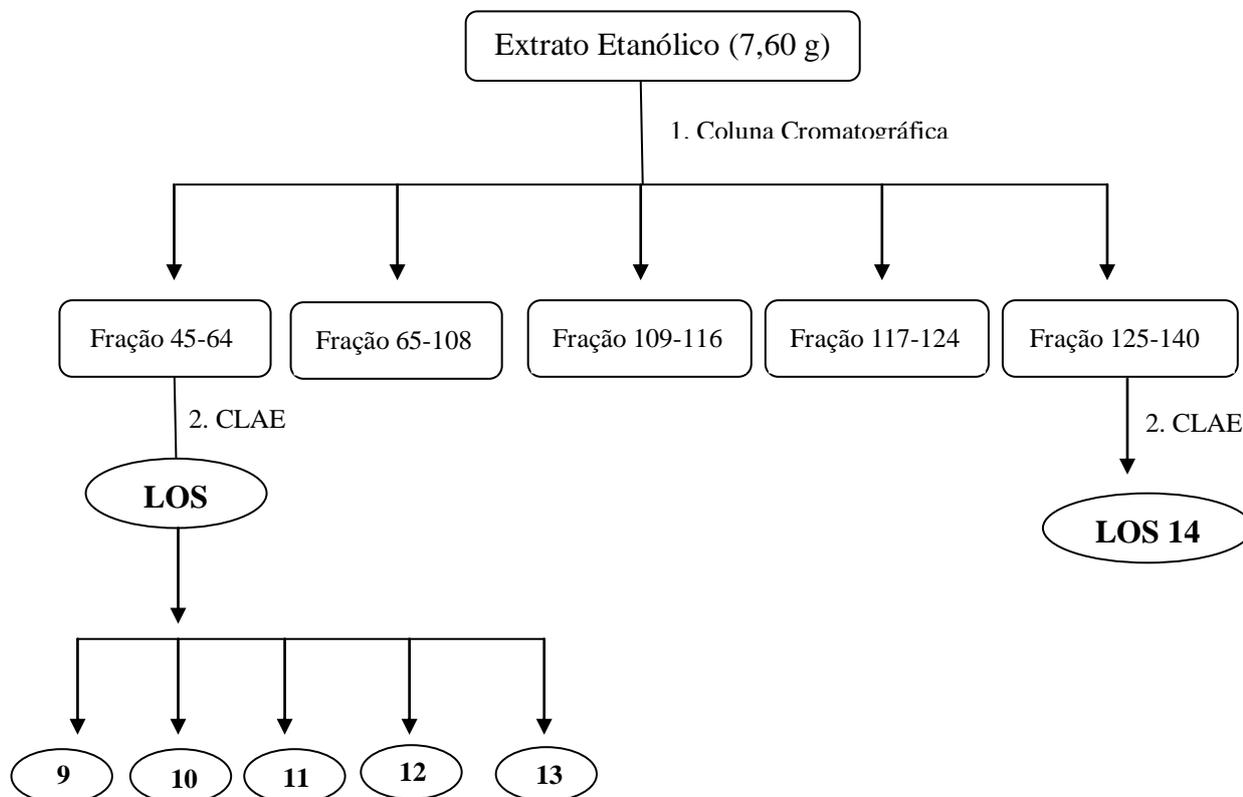


Figura 96- Cromatograma em fase líquida (CLAE) da fração 125-140

5.8 PREPARAÇÃO DE DERIVADOS

5.8.1 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DE LOS 1 (1).

A substância 1 (LOS 1, 24,0 mg) foi dissolvida em anidrido acético (2,0 mL) e piridina (1,0 mL) e a mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas. Decorrido esse tempo, a mistura ligeiramente acidificada com ácido clorídrico 10% foi submetida a extração com clorofórmio (3 x 10,0 mL). A fase clorofórmica foi tratada com sulfato de sódio e, em seguida, evaporada sob pressão reduzida, resultando em 38,0 mg de material acetilado denominado **LOS 1 – Ac (20)**.

5.8.2 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DE LOS 7 (1 E 2) .

A mistura de 1 e 2 (LOS 7, 10,0 mg) foi dissolvida em anidrido acético (2,0 mL) e piridina (1,0 mL) e a mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas. Decorrido esse tempo, a mistura ligeiramente acidificada com ácido clorídrico 10% foi submetida a extração com clorofórmio (3 x 10,0 mL). A fase clorofórmica foi tratada com sulfato de sódio e, em seguida, evaporada sob pressão reduzida, resultando em 17,7 mg de material acetilado denominado **LOS 7– Ac (21 e 22)**.

5.8.3 REAÇÃO DE METANÓLISE DE LOS 8.

A mistura de 8 e 9 (LOS 8, 4,7 mg) foi dissolvida em MeOH/HCl_{aq} 5% (4,5 mL) e mantida sob refluxo por 2 horas. A mistura reacional foi extraída com hexano (3 x 3,0 mL) e após evaporação do solvente sob pressão reduzida, resultando em 2,4 mg de material esterificado denominado **LOS 8 – Met (10 e 11)**.

5.8.4 REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE JONES DE LOS 9.

Preparação do reagente de Jones – 2,75 g de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) foram dissolvidos em 5,0 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 2,3 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) e o volume da solução foi completado para 10,0 mL com água destilada.

A substância 23 (LOS 9, 5,0 mg) foi dissolvida em 2,5 mL de acetona sob aquecimento brando. A solução foi resfriada em banho de gelo e o reagente de Jones (2,0 mL) foi adicionado gota a gota por 5 minutos sob atmosfera de nitrogênio (N₂). Em seguida foram adicionados 3,0 mL de água destilada, e a solução submetida a extração (3 x 10,0 mL) com clorofórmio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e o solvente

evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se 2,0 mg do produto, denominado **LOS 9 – JO (24 e 25)**.

5.8.5 REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE LOS 14.

A substância **19 (LOS 14, 10,0 mg)** foi dissolvida em 5,0 mL de HCl (1,5 mol/L) e a solução refluxada por 30 minutos. Após o resfriamento foram adicionados 5,0 mL de água destilada e a mistura reacional foi submetida à extração com diclorometano (3 x 20,0 mL) e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se 3,0 mg do produto, denominado **LOS 14 – HIDRO (26)**.

5.8.6 REAÇÃO DE REDUÇÃO DE LOS 9.

A substância **23 (LOS 9, 10,0 mg)** foi adicionada a uma solução de boridreto de sódio (NaBH_4 , 16,0 mg) em MeOH (2,5 mL) em banho de gelo. A mistura foi submetida à agitação mecânica por 24 horas. Após o resfriamento foi adicionado água destilada (30,0 mL) e submetida à extração com diclorometano (3 x 30,0 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e evaporada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel em sílica utilizando diclorometano/acetato de etila (50/50) como eluente, obtendo-se 3,0 mg do produto, denominado **LOS 9 – RED (27)**.

5.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.9.1 TESTE DE ATIVIDADE NEMATECIDA

Os testes de atividade nematecida foram feitos no Laboratório de Fitoquímica Aplicada do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação do Prof^o. Dr. Francisco Geraldo Barbosa.

Ootecas de *Meloidogyne incognita* extraídas de raízes de quiabeiro com auxílio de um estereoscópio, foram colocadas em placa de Petri com água destilada para a eclosão dos juvenis durante 24 horas. Após a eclosão, porções contendo 50 mL de água e aproximadamente 100 destes juvenis foram colocados em vidros nematológicos nos quais foram posteriormente acrescentados as soluções dos extratos a serem testados até completar o volume de 1,0 mL.

Os extratos testados foram diluídos em soluções aquosas de DMSO 2% a uma concentração de 1,0 mg/mL e como testemunha usou-se água destilada (testemunha absoluta)

e a solução diluente (testemunha normal). Os vidros nematológicos foram mantidos a temperatura média de 28 °C. Para cada amostra testada, foram efetuadas três repetições por concentração e as contagens dos nematóides juvenis foram realizadas após 24 horas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Os extratos hexânicos e etanólicos de *Luffa operculata* não apresentaram atividade nematecida, fato que pode ser justificado pela baixa solubilidade das amostras no solvente utilizado no ensaio (DMSO 2%). A Tabela 50, p. 243 apresenta o resultado dos extratos testados no ensaio.

Tabela 50- Resultados do teste de toxicidade sobre *Meloidogyne incognita*

Material testado	% de mortalidade				OBSERVAÇÃO
	R1	R2	R3	% Média	
EHLO Frutos	0	0	0	0,00	Não houve solubilidade
EHLO Cascas do Fruto	0	1	0	0,33	Não houve solubilidade
EELO Frutos	2	1	1	1,33	Baixa solubilidade (ppt)
EELO Talos	2	1	2	1,66	Baixa solubilidade (ppt)
EELO Folhas	1	3	2	2,00	Baixa solubilidade (ppt)
DMSO 2%	0	0	0	0,00	

5.9.2 TESTE DE ATIVIDADE FRENTE À ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Os testes de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foram feitos no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Estadual do Ceará, sob a orientação da Prof^a Selene Maia de Moraes.

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE), foi realizada através do método de Ellman (1961), modificado por Rhee e colaboradores (2001). O objetivo desse bioensaio é encontrar substâncias que apresentam a propriedade de inibir a enzima acetilcolinesterase, inibição essa que esta diretamente ligada ao tratamento da doença de Alzheimer (RHEE *et al.*, 2001). Este bioensaio consiste na aplicação das amostras em CCD, seguida da pulverização da placa com uma solução contendo o reagente de Ellman (DTNB - ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]) e uma solução de ATCI (iodeto de acetiltiocolina) em tampão apropriado. É considerado um método colorimétrico e que pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa (no caso desse trabalho, foi utilizado apenas o modo qualitativo). É um método rápido e sensível para a pré-seleção de amostras com ação anticolinesterásica. O método de Ellman é um procedimento fidedigno para atividade da acetilcolinesterase e pode ser rotineiramente empregado para avaliar a atividade inibitória de constituintes químicos.

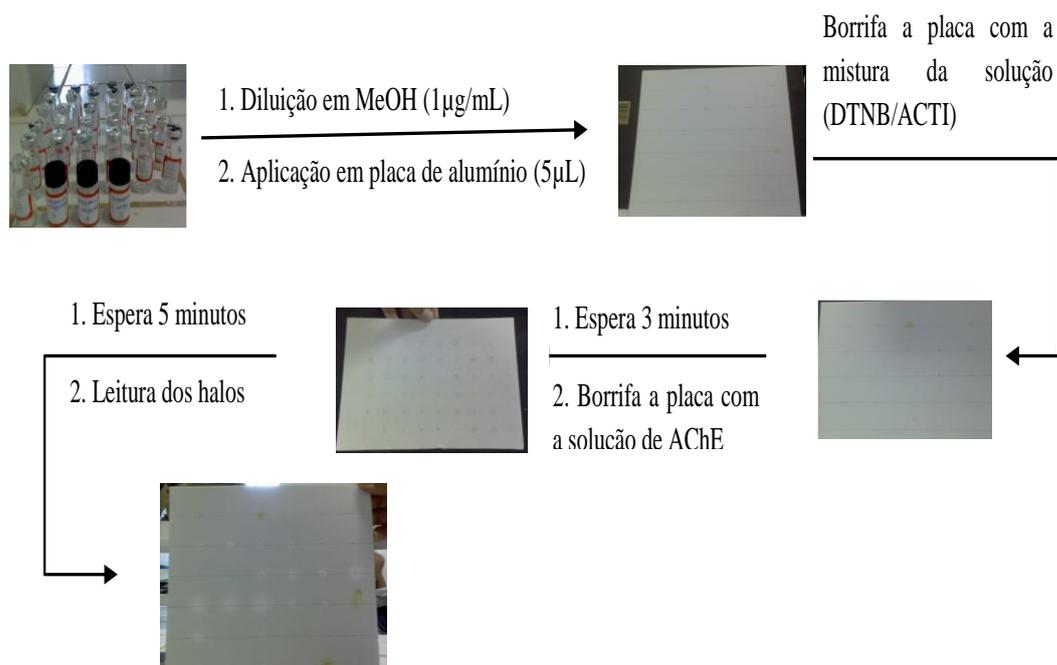
Para o referido teste, utilizou-se uma alíquota de 5,0 μL das amostras a serem testadas na concentração de 2,0 mg/mL dissolvidas em metanol e aplicadas em uma cromatoplaça. Após a evaporação dos solventes, pulverizou-se uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1,0 mmol.L⁻¹ com o reagente de Ellman (ácido 5,5' – Ditiobis-[2-nitrobenzólico], DTNB, 1,0 mmol.L⁻¹), deixando em repouso por 3 minutos para a secagem da placa. Após completa secagem das soluções, pulverizou-se a placa com a enzima acetilcolinesterase 3,0 U/mL. Após um período de 5 minutos, observou-se o surgimento de uma coloração amarela na placa e o aparecimento de halos brancos em torno das amostras que apresentaram atividade, em contraste com a coloração amarela da placa, cujos diâmetros foram imediatamente medidos. Neste experimento, a fisostigmina dissolvida em clorofórmio (2,0 mg/mL) foi utilizada como controle positivo. Na Figura 97, p. 245 estão apresentados as etapas desse método. O resultado deste bioensaio encontra-se descrito na Tabela 51, p. 244.

Tabela 51- Resultado do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase

Amostra	Halos de inibição (mm)
EELO Talos	Negativo
EELO Folhas	Negativo
LOS 1	Negativo
LOS 5	Negativo
LOS 7	8,0
LOS 7 – Ac	8,0
LOS 8	12,0
LOS 9	10,0
LOS 10	7,0
LOS 11	7,0
LOS 12	7,0
LOS 14	Negativo
Padrão- fisostigmina	9,0

* Concentração da amostra e padrão = 2,0 mg/mL

Os dados obtidos (Tabela 51, p. 244) ressaltam o potencial anticolinesterásico da espécie de *Luffa operculata* como forte candidata a elaboração de drogas naturais que possam vir a auxiliar no tratamento do mal de Alzheimer.



DTNB: Reagente de Ellman (ác. 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]; ACTI: iodeto de acetilcolina

Figura 97- Procedimento para a realização do teste de Ellman

5.9.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os testes de atividade antioxidantes foram feitos no Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação da Prof^ª Telma Leda Gomes de Lemos.

A avaliação da atividade antioxidante das amostras foi realizada pelo método do seqüestro de radicais livres, segundo Hegazi e Hady (2002), na qual o radical utilizado foi o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) na concentração de 60,0 µmol/L. As amostras foram testadas de 0,001 a 1,0 mg/L, todas em triplicata. Para Cada 1,0 mL de solução da amostra foram adicionados 1,0 mL da solução de DPPH, comparando a um controle negativo (metanol). As leituras foram realizadas 30 minutos após a mistura. O comprimento de onda utilizado para detecção foi de 520 nm, em espectrofotômetro UV/VIS. A percentagem de inibição foi obtida por comparação da absorção contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra. Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e Vitamina C foram utilizados como padrões positivos. Os valores de IC₅₀

calculados através da relação: concentração da amostra versus percentual de DPPH remanescente.

Os resultados conforme Tabela 52, p. 247, exibiram uma atividade insignificante ou negativa quando comparado com os padrões Trolox e Vitamina C.

Tabela 52- Resultados do teste de atividade antioxidante

Nº	Identificação	0,001mg/mL	0,005mg/mL	0,01mg/mL	0,05mg/mL	0,1mg/mL	1,0mg/mL	IC ₅₀ (mg/mL)
1	EHFO	0,45 %	1,2 %	2,2 %	5,2 %	10,1 %	28,3 %	-
2	EEFO	2,8 %	3,5 %	3,9 %	4,2 %	5,5 %	8,4 %	-
3	EHT	12,05 %	16,9 %	17,5 %	18,6 %	19,7 %	28,8 %	-
4	EET	5,7 %	7,6 %	8,5 %	8,7 %	9,1 %	19,2 %	-
5	LOS 10	1,3 %	1,4%	2,3 %	6,3 %	11,5 %	84,4 %	0,47±1,9.10⁻³
6	LOS 11	0,51 %	0,58 %	0,79 %	5,0 %	9,3 %	43,8 %	-
7	LOS 13	-	0,72 %	0,76 %	0,94 %	2,0 %	17,6 %	-
8	LOS 14	0,87 %	2,10 %	2,13 %	3,2 %	5,3 %	47,2 %	-
9	EELO fruto	NÃO APRESENTOU ATIVIDADE						
10	LOS 1	NÃO APRESENTOU ATIVIDADE						
11	LOS 7	NÃO APRESENTOU ATIVIDADE						
12	LOS 7 – Ac	NÃO APRESENTOU ATIVIDADE						
13	LOS 8	NÃO APRESENTOU ATIVIDADE						
14	LOS 9	NÃO APRESENTOU ATIVIDADE						
Padrão	TROLOX	24,5 %	41,8 %	51,8 %	86,5 %	99,8 %	99,9 %	2,6.10⁻³ ±2,3.10⁻⁴
Padrão	VITAM. C	3,25 %	17,8 %	19,0 %	19,3 %	92,8 %	99,8 %	4,3.10⁻² ±1,9.10⁻²

5.9.4 TESTE PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO

Os testes de avaliação do potencial citotóxico foram feitos no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação da Prof^a Cláudia do Ó Pessoa.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mossman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cels/mL para a linhagem SF-295 (sistema nervoso - humano) e $0,3 \times 10^6$ para as linhagens HCT-8 (cólon - humano) e HL-60 (leucemia - humana). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150,0 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150,0 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

O percentual de crescimento celular (%G) foi calculado comparando a absorbância do teste com o controle (100%), tempo-zero (0%) e padrões, doxorubicina, (100% de inibição). As frações foram classificadas em sem atividade (SA), com pouca atividade (aquelas que provocaram inibição de até 50% do crescimento, PA), com moderada atividade (aquelas que provocaram inibição entre 50% e 90% do crescimento-MO), e com muita atividade (aquelas que provocaram inibição maior que 90% do crescimento, MA) para cada linhagem testada. As amostras foram testadas em três linhagens tumorais em dose única na concentração de 25µg/mL (frações) e 50µg/mL (extratos), Tabela 53, p. 249.

Tabela 53- Resultado do teste para avaliação do potencial citotóxico

Nº	Amostra	HL-60	SF 295	HCT 8
	Identificação	Média	média	média
1	E.E. L.O Talos (Extrato)	AS	PA (34,96)	PA (39,73)
2	E.E.L.O fruto c/ casca (Extrato)	MO (53,85)	MO (75,58)	MO (87,34)
3	LOS 1	AS	PA (36,63)	MO (50,09)
4	LOS 3	AS	MO (57,29)	MO (56,25)
5	LOS 5	AS	PA (37,83)	PA (40,08)

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cels/mL para a linhagem SF-295 (Sistema Nervoso - Humano) e MDAMB-435 (Melanoma - Humano) e $0,3 \times 10^6$ para as linhagem HCT-8 (Cólon - Humano). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150,0 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150,0 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

A atividade citotóxica de todas as amostras está apresentada na Tabela 54, p. 250, com seus respectivos percentuais de inibição. As substâncias destacadas foram escolhidas para avaliações subseqüentes por apresentarem valores de inibição ≥ 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais testadas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 54- Percentual de inibição do crescimento celular (GI%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25µg/mL. Valores são média ± DPM

Amostra		SF-295	SD	HCT-8	SD	MDAMB-435	SD
Nº	Identificação	GI%(média)		GI%(média)		GI%(média)	
1	LOS 2	11,01%	6,69%	22,11%	3,42%	21,43%	3,55%
2	LOS 6	16,00%	4,02%	0,00%	0,00%	4,49%	2,94%
3	LOS 7	25,08%	4,19%	0,00%	0,00%	8,29%	0,29%
4	LOS 8	38,24%	4,66%	3,93%	1,24%	17,20%	0,19%
5	LOS 9	89,24%	0,08%	91,39%	1,92%	74,78%	0,48%
6	LOS 10	79,45%	0,39%	92,80%	0,94%	92,84%	0,87%
7	LOS 11	77,87%	0,73%	87,74%	1,14%	87,72%	1,01%
8	LOS 12	78,93%	0,33%	90,48%	1,41%	90,42%	1,48%
9	LOS 14	20,35%	0,42%	0,00%	0,00%	11,90%	2,50%

As quatro cucurbitacinas (LOS 9, LOS 10, LOS 11 e LOS 12) foram ativas nas concentrações testadas, sendo a substância LOS 9 a mais ativa, e a substância LOS 11, a menos ativa. A cucurbitacina glicosilada mostrou baixa atividade citotóxica. Os dados obtidos (Tabela 54, p. 250) mostraram que as cucurbitacinas isoladas se revelaram como fontes promissoras de produtos naturais com atividade antitumoral.

6 CONCLUSÃO

A espécie botânica *Luffa operculata* Cogn. (cucurbitaceae), conhecida popularmente como “cabacinha”, foi submetida ao estudo fitoquímico tendo como objetivos principais, a) o isolamento de metabólitos secundários, mais especificamente, os triterpenos cucurbitanos (cucurbitacinas) que são os constituintes característicos dessa família e responsáveis por sua toxicidade; b) realizar testes de atividade biológica com os constituintes isolados. As cucurbitacinas e seus glicosídeos são considerados os agentes responsáveis por intoxicações observadas pelo uso de extratos dos frutos de *L. operculata*. O amplo espectro de efeitos farmacológicos registrado na literatura exercido pelas cucurbitacinas e a abundância na zona rural justificaram o re-estudo dessa planta.

Uma visão na literatura científica dirigida para a relação estrutura-atividade mostra que apesar de extensa investigação de plantas da família Cucurbitaceae e a caracterização dos diversos triterpenos cucurbitano delas isolados, ainda não há uma exata definição dos metabólitos responsáveis por determinados efeitos biológicos. Entre estes, pode-se citar, a ação medicamentosa observada no tratamento de sinusites.

Na presente pesquisa, outros tipos de substâncias, além de cucurbitacinas, foram isoladas e que ainda não haviam sido relatadas na literatura: diferentes tipos de ceramidas, quinonas, esteróides e um raro triterpeno do tipo friedolenano.

As cucurbitacinas isoladas e caracterizadas no presente trabalho, com exceção da arvenina I, estão sendo descritas pela primeira vez a partir de *L. operculata*.

As ceramidas [N-(2-isopropoxietil)eicosamida (3), N-(2-isopropoxietil)nonadecanamida (4), N-(2-isopropoxietil)octadecanamida (5), N-(2-isopropoxietil)heptadecanamida (6), N-(2-isopropoxietil)hexadecanamida, (7)] são inéditas na literatura.

Foram obtidos também alguns derivados reacionais utilizando reações clássicas tais como acetilação, oxidação, hidrólise e metanólise.

Os extratos brutos, assim como, algumas das substâncias isoladas a partir de *L. operculata* também foram investigados quanto ao seu potencial biológico, sendo realizados testes de atividade nematecida, acetilcolinesterase, antioxidante e citotoxicidade.

A mistura de esteróides [(22E,24S)-etil-5 α -colest-7,22-dien-3 β -ol (1) e (22E,24R)-etil-5 α -colest-7,22,25-trien-3 β -ol (2)], a mistura de ceramidas [(1,3,4-tri-hidroxi-2-[2'-hidroxidocosanoilamino]-19-tetracasadeceno (8) e 1,3,4-tri-hidroxi-2-[2'-hidroxihenicosanoilamino]-19-tetracasadeceno (9)] e a mistura de acetatos dos esteróides

[(22*E*,24*S*)-etil-5 α -colest-7,22-dien-3 β -ol e (22*E*,24*R*)-etil-5 α -colest-7,22,25-trien-3 β -ol] apresentaram atividade positiva para o teste da inibição da enzima acetilcolinesterase quando comparados com o padrão fisostignina, sendo que a mistura de ceramidas (**8** e **9**) revelou-se mais ativa que o padrão.

Na avaliação de ação antiproliferativa, utilizando diferentes linhagens de células [(SF-295 (Sistema Nervoso – Humano), MDAMB-435 (Melanoma - Humano) e HCT-8 (Cólon – Humano) as cucurbitacinas apresentaram atividades nas concentrações testadas, sendo que a cucurbitacina D (**LOS 9**) revelou-se mais ativa que as demais cucurbitacinas isoladas.

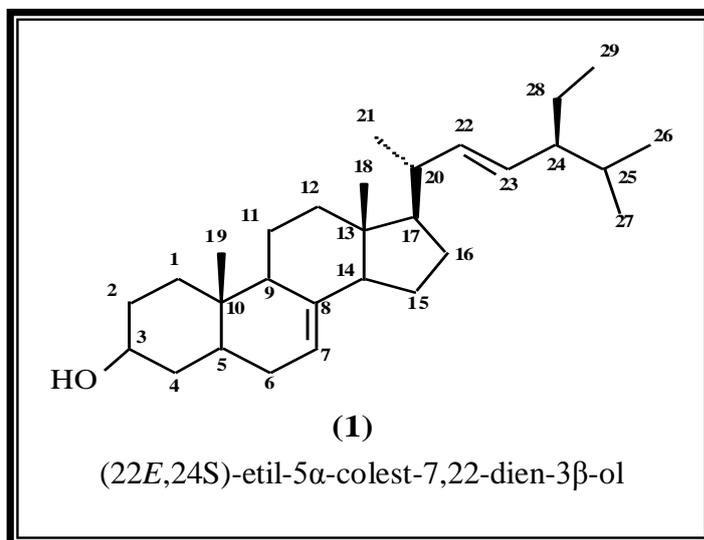
O estudo da atividade antioxidante dos extratos e substâncias isoladas a partir de *L. operculata*, pelo método do radical livre DPPH, apontou uma atividade insignificante ou negativa quando comparado com os padrões Trolox e Vitamina C. Os extratos hexânicos e etanólicos de *L. operculata* também apresentaram atividade negativa para o nematoide *Meloidogyne incognita*.

Os resultados dos testes de atividade biológica (Tabela 54, p. 250) obtidos com a cucurbitacina D (**LOS 9**) permitem esperar que resultados promissores possam ser também obtidos com seus derivados reacionais.

Várias investigações científicas já foram realizadas com a espécie em estudo. Como relatado na presente tese, diversos triterpenos cucurbitano, esteróides, quinonas, triterpeno de outra natureza e ceramidas, foram isolados e caracterizados. Entretanto, a análise dos espectros de massa das ceramidas, assim como, de éster alifático, embora, tenha permitido a caracterização das estruturas apresentadas, permite, contudo, observar que outros componentes não caracterizados estão presentes nas respectivas misturas.

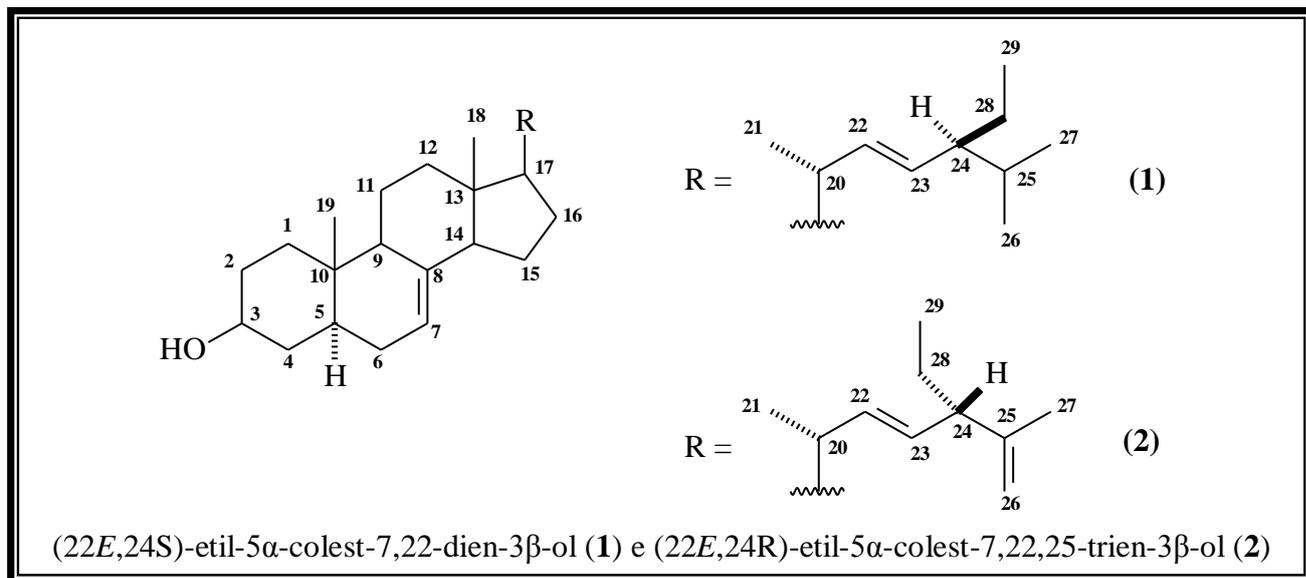
CAPÍTULO 7 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS

7.1 LOS 1



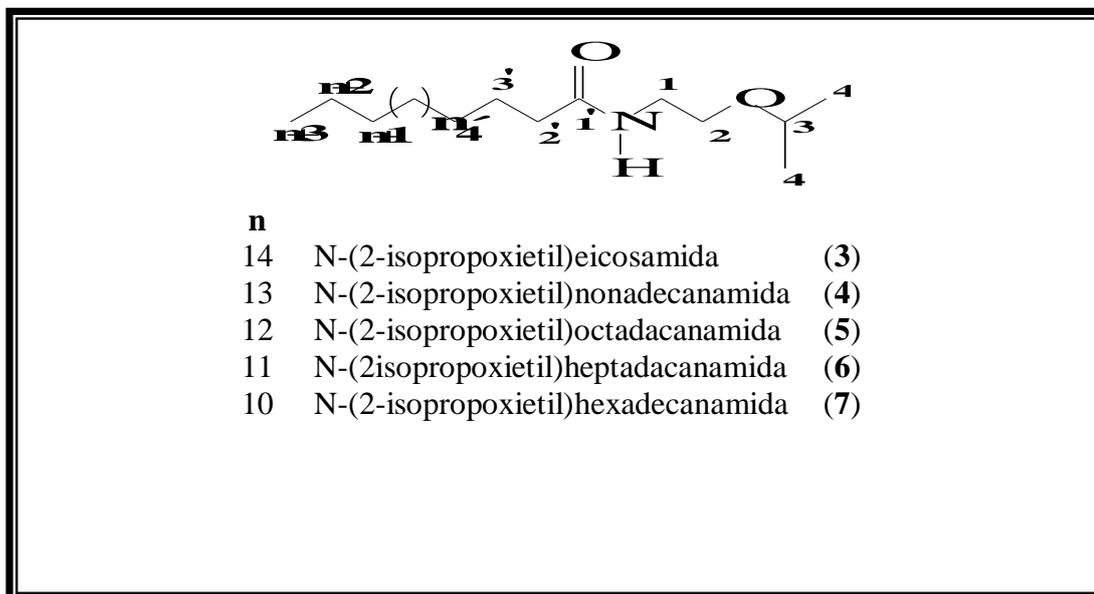
- Características: sólido branco amorfo, solúvel em piridina, fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$, massa molar 412 u.m.a, ponto de fusão 150,3-152,0 °C.
- Dados de RMN 1H (300 MHz, C_5D_5N): ver Figura 8, p. 86.
- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 1, p. 82.

7.2 LOS 7



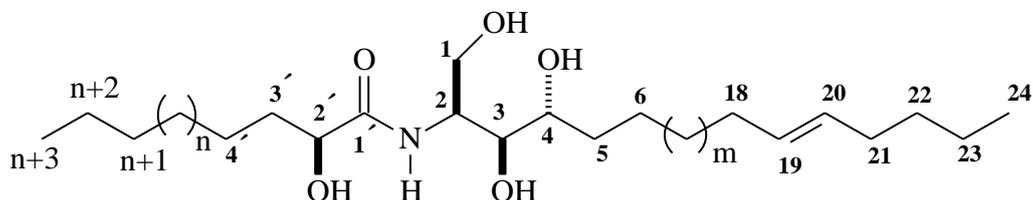
- Características: sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio, fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$ (1) e $C_{29}H_{46}O$ (2), massa molar 412 e 410 u.m.a, ponto de fusão 154,2-156,7 °C.
- Dados de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N): ver Figura 13, p. 94.
- Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 2, p. 89.

7.3 LOS 2



- Características: graxa de coloração branca, solúvel em piridina, fórmula molecular $C_{25}H_{51}NO_2$ (3), $C_{24}H_{49}NO_2$ (4), $C_{23}H_{47}NO_2$ (5), $C_{22}H_{45}NO_2$ (6), $C_{21}H_{43}NO_2$ (7), massa molar 397 (3), 383 (4), 369 (5), 355 (6) e 341 (7) u.m.a.
- Dados de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 3, p. 101.
- Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 3, p. 101.

7.4 LOS 8



(8) $n = 15$ $m = 11$

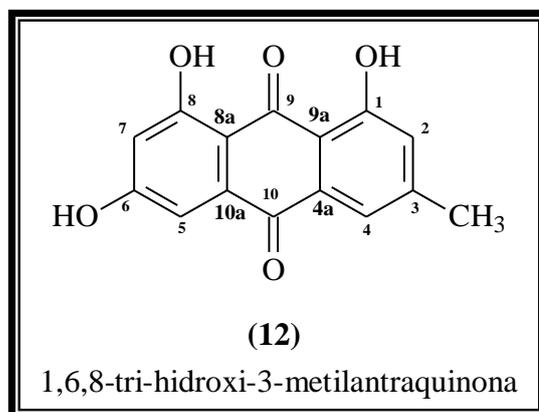
(9) $n = 14$ $m = 11$

rel-(2S, 3S, 4R, 19E) -2 - [(2'R) -2'-hidroxi-docosanoilamino]-tetracosadec-19- eno-1,3,4-triol (8)

rel-(2S, 3S, 4R, 19E) -2 - [(2'R) -2'-hidroxi-henicosanoilamino]-tetracosadec-19-eno-1,3,4-triol (9)

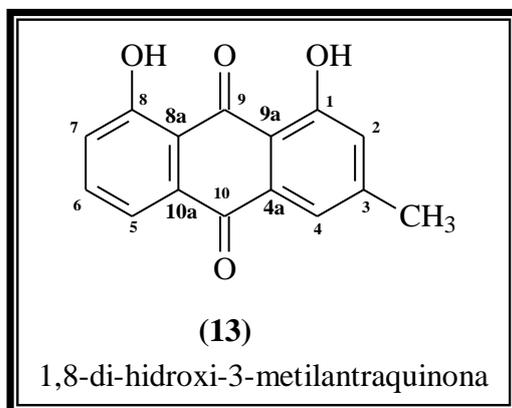
- Características: sólido amorfo branco, solúvel em piridina, fórmula molecular, $C_{46}H_{91}NO_5$ (8) e $C_{45}H_{89}NO_5$ (9) massa molar 737 (8) e 723 (9) u.m.a. e ponto de fusão 136,8-137,3 °C.
- Dados de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 5, p. 112.
- Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 5, p. 112.

7.5 LOS 5



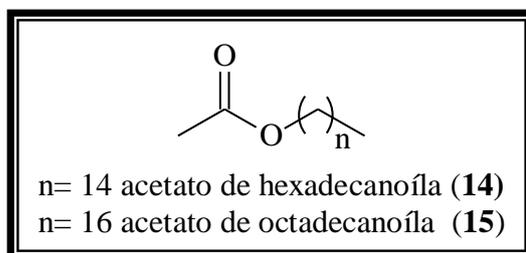
- Características: sólido cristalino alaranjado, solúvel em acetona, fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_5$ massa molar 270 u.m.a. e ponto de fusão 247,5-248,5 °C.
- Dados de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 7, p. 126.
- Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 7, p. 126.

7.6 LOS 3



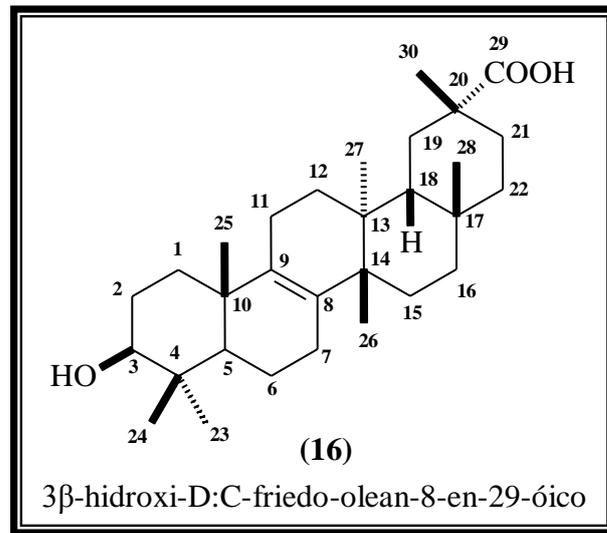
- Características: sólido cristalino alaranjado, solúvel em clorofórmio, fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_4$ massa molar 254 u.m.a. e ponto de fusão 234,9-235,7 °C.
- Dados de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 9, p. 137.
- Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 9, p. 137.

7.7 LOS 4



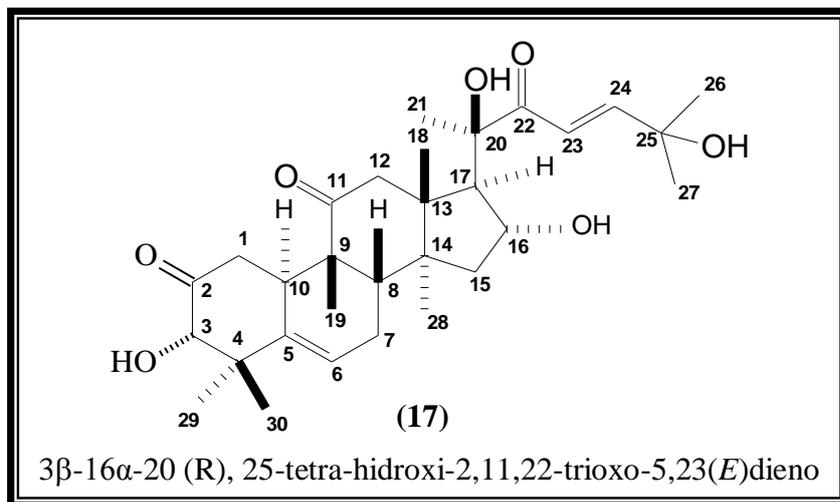
- Características: óleo amarelo, solúvel em clorofórmio, fórmula molecular C₁₈H₃₆O₂ (**14**) e C₂₀H₄₀O₂ (**15**) massa molar 284 (**14**) e 312 (**15**) u.m.a.
- Dados de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N): ver Figura 52, p. 150.
- Dados de RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N): ver Figura 50, p. 148.

7.8 LOS 6



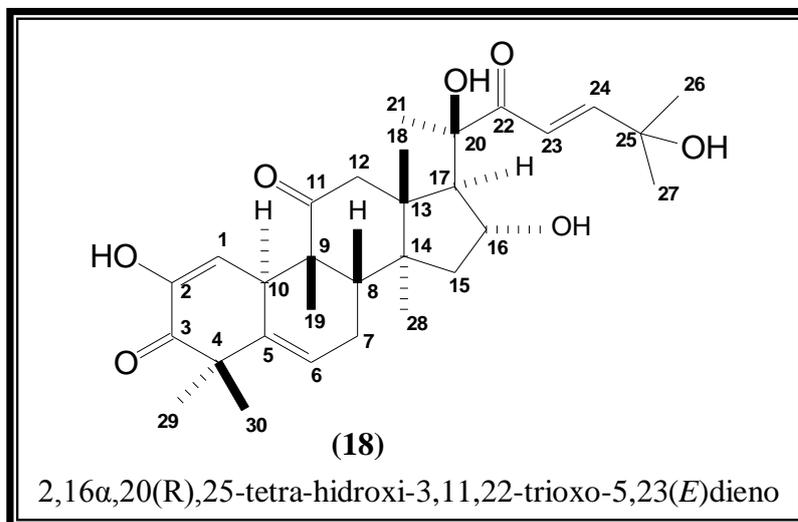
- Características: sólido branco amorfo, solúvel em piridina, fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ massa molar 456 u.m.a. e ponto de fusão 262,4-262,8 °C.
- Dados de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 14, p. 156.
- Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 14, p. 156.

7.9 LOS 11



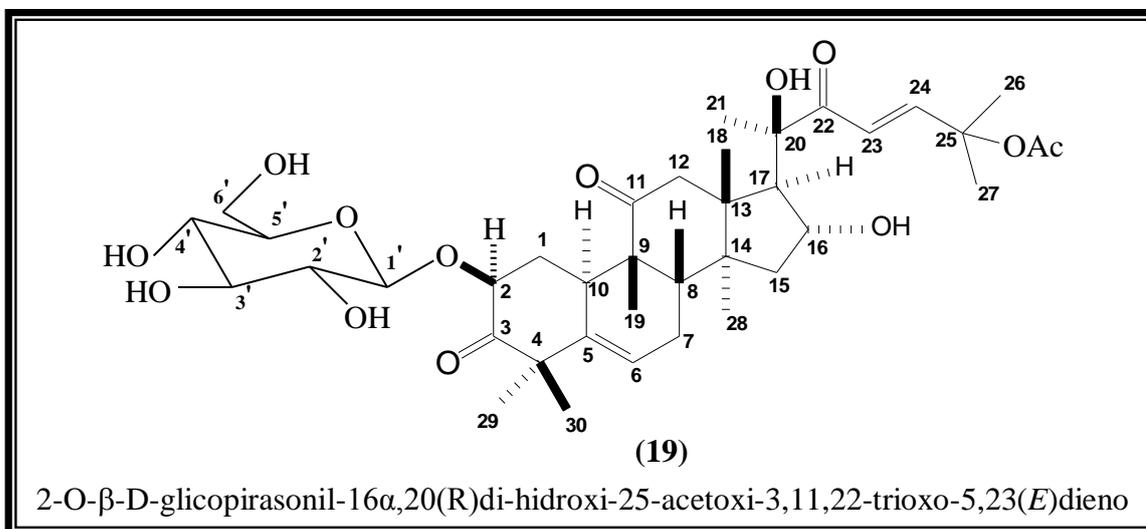
- Características: sólido amorfo levemente amarelado, solúvel em metanol, fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_7$ massa molar 520 u.m.a. e ponto de fusão 150,4-150,6 °C.
- Dados de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 17, p. 170.
- Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 17, p. 170.

7.10 LOS 12



- Características: sólido amorfo levemente amarelado, solúvel em metanol, fórmula molecular $C_{30}H_{42}O_7$ massa molar 514 u.m.a. e ponto de fusão 182,8-183,8 °C.
- Dados de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 20, p. 182.
- Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 20, p. 182.

7.13 LOS 14



- Características: sólido amorfo levemente amarelado, solúvel em metanol, fórmula molecular $C_{38}H_{56}O_{13}$ massa molar 720 u.m.a. e ponto de fusão 160,8-162,7 °C.
- Dados de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 23, p. 194.
- Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N): ver Tabela 23, p. 194.

REFERÊNCIAS

- ABDEL, H. *et al.* Socotroside, a new pentacyclic cucurbitane glycoside from *Dendrosicyos socotrana*. **Zeitschrift fur Naturforschung B: Journal of Chemical Sciences**, v. 63, n. 12, p. 1415-1420, 2008.
- AFIFI, M. S. *et al.* Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum* and *Cucumis prophetarum*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 4, p. 847-859, 1999.
- AHMED, B.; MASODI, M. H.; KHAN, S. Pharmacological and phytochemical review on *Picrorrhiza kurroa*. **Indian Journal of Natural Products**, v. 23, n. 2, p. 3-13, 2007.
- AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. *Arbuscular mycorrhizal* fungus-promoted accumulation of two new triterpenoids in Cucumber roots. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 762-769, 2002.
- AKIHISA, T. *et al.* 7-oxo-10 α -cucurbitadienol from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* and its anti-inflammatory. **Phytochemistry**, v. 36, n. 1, p. 153-157, 1994.
- ALBUQUERQUE, M. R. J. R. *et al.* Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis opodocephala* Baker. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 2, p. 209-213, 2007.
- ALBUQUERQUE, R. L. **Contribuição ao Estudo Químico de Plantas Mediciniais do Brasil: *Plectranthus barbatus* Andr. e *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng.** 2000. 165 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
- ALLEN, J. G. *et al.* The bioactivity-guided isolation and structural identification of toxic cucurbitacin steroidal glucosides from *Stemodia kingie*. **Phytochemical Analysis**, v. 17, n. 4, p. 226-235, 2006.
- BAHIA. Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia, Subsecretária de Ciência e Tecnologia. **Inventário de Plantas Mediciniais do Estado da Bahia**. Salvador, 1979.
- BARBOSA, F. G. **Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: *Senna rugosa*, *Eugenia citrifolia* e *Solanum asperum*.** 1999. 199 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.
- BAR-NUN, N.; MAYER, A. M. Cucurbitacins-repressors of induction of laccase formation. **Phytochemistry**, v. 28, n. 5, p. 1369-1371, 1989.

- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1986.
- BAUER, R. *et al.* Cucurbitacins and flavones C-glycosides from *Cayaponia tayuya*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1587-1591, 1985.
- BERRIDGE, M. V. *et al.* The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BHANDARI, P. *et al.* Cucurbitacins from *Bacopa monnieri*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1248-1254, 2007.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste: Especialmente do Ceará**, 4. ed. Fortaleza: Universitária UFRN, 2001.
- CARDELLINA, J. H. I. I. *et al.* National cancer institute intramural research on human immunodeficiency virus inhibitory and antitumor plant natural products. *In*: KINGHORN, A. D.; BALANDRIN, M. F. (Eds). **Human medicinal agents from plants**. Washington: American Chemical Society, 1990, p. 218-227.
- CATENI, F. *et al.* New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L.: antimicrobial activity evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 24, p. 4345-4350, 2003.
- CHAVES, D. C. **Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste do Brasil: *Cayaponia racemosa* Cogn.** 2002. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- _____. **Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste do Brasil: *Cayaponia racemosa* Cogn.** 2006. 293 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- CHAVES, D. C. *et al.* Cucurbitacins from *Cayaponia racemosa*: isolation and assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 389-392, 2007.
- CHEISTOPHE, C. F. S. *et al.* Benjaminamide: A new ceramide and other compounds from the twigs of *Ficus benjamina* (Moraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 3, p. 238-243, 2008.
- CHEN, C. T. *et al.* High-field ^1H -NMR spectral analysis of some cucurbitacins. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 3, p. 429-434, 1985.
- CHEN, J. C. *et al.* Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 386-399, 2005.

- CHEN, J. *et al.* Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 1043-1048, 2008.
- CHEN, J. C. *et al.* Octanorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the tubers of *Hemsleya endecaphylla* with HIV-1 inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 1, p. 153-155, 2008.
- CHIE, H. *et al.* Relative population of S-form and F-form conformers of bryonolic acid and its derivatives in equilibrium in CDCl₃ solution. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin.**, v. 50, n. 4, p. 467-474, 2002.
- CHO, H. J. *et al.* Formation of bryonolic acid in cucurbitaceous plants and their cell cultures. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3893-3896, 1992.
- CLERICUZIO, M. *et al.* Cucurbitane triterpenes from the fruiting bodies and cultivated mycelia of *Leucopaxillus gentianeus*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 12, p. 1796-1799, 2006.
- COHEN, P. A.; TOWERS, G. H. N. Anthraquinones and phenanthroperylenequinones from *Nephroma laevigatum*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 4, p. 520-526, 1995.
- DAGNE, E.; STEGLICH, W. Knipholone: a unique anthraquinone derivative from *Kniphofia foliosa*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1729-1731, 1984.
- DANTAS, I. N. F. *et al.* Studies on the cytotoxicity of cucurbitacins isolated from *Cayaponia racemosa* (Cucurbitaceae). **Journal of Biosciences**, v. 61, n. 9/10, p. 643-646, 2006.
- DELAZAR, A. *et al.* Flavone C-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. **Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 109-114, 2006.
- DENG, Y.; ZHANG, M. **Applications of cucurbitacins for treatment of laryngocarcinoma and leucopenia**. CN n. 101062041, 31 may. 2007, 31 set. 2007.
- DHASAN, P. B.; JEGADEESAN, M.; KAVIMANI, S. Cucurbitacins isolated from the fruits of *Momordica cymbalaria* Hook f. **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, n. 14, p. 96-101, 2008.
- DUANGMANO, S. *et al.* Antiproliferative effects of cucurbitacin B in breast cancer cells: Down-regulation of the C-Myc/h-TERT/Telomerase pathway and obstruction of the cell cycle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 12, p. 5323-5338, 2010.

DUNILL, P. M.; FOWDEN, L. The amino acids of seeds of the cucurbitaceae. **Phytochemistry**, v. 4, n. 6, p. 933-944, 1965.

ELLMAN, G. L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-90, 1961.

FARIAS, M. R. *et al.* Cucurbitacins as constituents of *wilbrandia ebracteata*. **Planta Médica**, v. 59, n. 3, p. 272-275, 1993.

FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, n. 3, p. 225-276, 1966.

FULLER, R. W. *et al.* Cucurbitacins: differential cytotoxicity, dereplication and first isolation from *Gonystylus keithii*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 10, p. 1442-1445, 1994.

GAMLATH, C. B. *et al.* Studies on medicinal and related plants of Sri Lanka. Part 17. Cucurbitacins of *Colocynthis vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3225-3229, 1988.

GHULE, B.V. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of *Lagenaria siceraria* Stand. Fruit juice extract in rats and mice. **Pharmacognosy Magazine**, v. 2, n. 8, p. 232-238, 2006.

GREIGE-GERGES, H. *et al.* Cucurbitacins from *Ecballium elaterium* juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. **Chemico-Biological Interactions**, v. 169, n. 1, p. 53-62, 2007.

HALLAWEISH, F. T. Cucurbitacins from *Cucurbita texana*: Evidence for the role of isocucurbitacins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 1, p. 29-37, 1993.

HALAWEISH, F. T.; BARTALIS, J. **Cucurbitacin compounds**. US n. 20070099852, 31 aug. 2006, 03 may. 2007.

HASSAN, L. E. A. *et al.* In vitro anti-giardial activity of *Citrullus lanatus* Var. *citroides* extracts and cucurbitacins isolated compounds. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 15, p. 3338-3346, 2011.

- HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from Reclaimed lands. *Z. Naturforsch*, v. 57c, p. 395-402, 2002.
- HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants of the World**. Oxford: Oxford Universit press., 1978.
- HIMENO, E. *et al.* Structures of Cayaponosides A, B, C and D, glucosides of new nor-cucurbitacins in the roots of *Cayaponia tayuya*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 40, n. 10, p. 2885-2887, 1992.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de Plantas Superiores**. São Carlos-SP: UFSCar, 2003.
- HYLANDS, ; MANSOUR, E. S. S. A revision of the structure of cucurbitacin S from *Bryonia dioica*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 11, p. 2703-2707, 1982.
- ITOH, T. *et al.* Co-occurrence of chondrillasterol and spinaterol in two cucurbitaceae seeds as shown by ¹³C NMR. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 761-764, 1981.
- JAVED, J.; HALAWEISH, F. T.; CERVANTES-LAUREAN, D. Cucurbitacins role as potent advanced glycation and product inhibitors. **American Chemical Society**, p. 25-27, 2006.
- KAMELA, A. M.; SOUAD, E. E. G. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 36, p. 80, 2008.
- KANCHANAPOOM, T.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Cucurbitane, hexanorcucurbitane and octanorcucurbitan glycosides from fruits of *Tricosanthes tricuspida*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 2, p. 215-228, 2002.
- KANG, W. Y.; XU, X. J. Struture of a new xanthone from *Securidaca inappendiculata*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 4, p. 432-434, 2008.
- KHALLOUKI, F.; HULL, W. E.; OWEN, R. W. Characterization of a rare triterpenoid and minor phenolic compounds in the root bark of *Anisophyllea dichostyla* R. Br. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2007-2018, 2009.
- KAWAHARA, N. *et al.* Two novel cucurbitacins, neocucurbitacins A and B, from the Brazilian folk medicine “Buchinha” (*Luffa operculata*) and their effecton PEBP₂ α A and OCIF gene expression in a human osteoblast-like saos-2 cell line. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 10, p. 1377-1379, 2001.
- KAWAHARA, N. *et al.* Two new cucurbitacins glucosides, operculins A and B, from the Brazilian folk medicine “Buchinha” (*Luffa operculata*). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 8, p. 1018-1020, 2004.

- KAYA, G. I.; MELZIG, M. F. Quantitative determination of cucurbitacin E and cucurbitacin I in homeopathic mother tincture of *Gratiola officinalis* L. by HPLC. **Pharmazie**, v. 63, n. 12, p. 851-853, 2008.
- KIM, I. H. *et al.* Iridoid glycosides and cucurbitacin glycoside from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 24, p. 2691-2696, 2006.
- KONG, L.; WEI, J. **Method for manufacturing traditional Chinese medicinal dispersible tablet for treating acute and chronic hepatitis, chronic persistent hepatitis and hepatocarcinoma**. CN n. 1969931, 23 nov. 2005, 30 may. 2007.
- KREPSKY, P. B. *et al.* High performance liquid chromatography determination of cucurbitacin in the roots of *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 715-719, 2009.
- KUPCHAN, S. M. *et al.* Tumor inhibitors, LVI. Cucurbitacins O, P and Q, the cytotoxic principles of *Brandegea bigelovii*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 35, n. 9, p. 2891-2894, 1970.
- KURNIA, D.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. Norcucurbitacin derivatives isolated from the Indonesian medicinal plant, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 618-620, 2008.
- KUSUMOTO, K. *et al.* Studies on the constituents of *Luffa operculata* Cogn. I. Isolation and structures of luperosides A-H, dammarane-type triterpene glycosides in the herb. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 18-22, 1989.
- LAVIE, D.; GLOTTER, E. The cucurbitacins, a group of tetracyclic triterpenes. **Chemie organischer Naturstoffe**, v. 29, p. 308-362, 1971.
- LEITE, M. V. C., Contribuição para o estudo botânico de *Luffa operculat* (L.) Cogniaux. **Revista de Farmacia e Odontologia**, v. 10, n. 2, p. 353-369, 1976.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.
- MACEDO, E. M. S. **Estudo Químico de Plantas do Nordeste e sua Atividade antioxidante: *Senna martiana* (Benth) I. e B.** 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- MAIA, A. I. V. *et al.* New ceramides from *Acnistus arborescens*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 867-871, 2010.
- MALONEY, K. N. *et al.* Actin-aggregating cucurbitacins from *Physocarpus capitatus*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 11, p. 1927-1929, 2008.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais: Guia de Seleção e emprego de Plantas Usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3. ed. Fortaleza: UFC, 2007.

_____. Farmacognosia de *Luffa operculata* Cogn. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 60, n. 7/9, p. 69-76, 1979.

MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R. Isocucurbitacina B, constituinte citotóxico da *Luffa operculata*. **Anais Academia Brasileira Ciências**, v. 39, n. 2, p. 245-247, 1967.

MATSUDA, H. *et al.* Cucurbitane-type triterpenes with anti-proliferative effects on U937 cells from on Egyptian natural medicine, *Bryonia cretica*: structures of new triterpene glycosides, bryoniaosides A and B. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 747-751, 2010.

MEHTA, V. B.; SHARMA, V. J.; SHAIKH, M. Evaluation of antioxidant and immunomodulatory activity of *Lagenaria vulgaris*. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 393-398, 2011.

MENG, D. *et al.* Cytotoxic cucurbitane-type triterpenoids from *Elaeocarpus hainanensis*. **Planta Medica**, v. 74, n. 14, p. 1741-1744, 2008.

MENON-MIYADE, M. A. *et al.* Efeitos da *Luffa operculata* sobre o epitélio do palato de rã: aspectos histológicos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 2, p. 132-138, 2005.

MILIND, P.; SATBIR, K. Is bottle gourd a natural guard?? **Internacional Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 6, p. 13-17, 2011.

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

MONTE, F. J. Q. *et al.* Total assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of two isomeric cucurbitane triterpenoids. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 38, p. 809-812, 2000.

MONTE, F. J. Q. *et al.* Cucurbitacins of *Luffa operculata*: isolation and complete ^1H and ^{13}C chemical shifts assignment. **Latinoamericana de Química**, v. 31, n. 3, p.89-99, 2003.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MULHOLLAND, D. A. *et al.* Cucurbitane triterpenoids from the leaves of *Momordica foetida*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 391-395, 1997.

MUSZA, L. L. *et al.* Cucurbitacins cell adhesion inhibitors from *Canoebe scoparioides*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 11, p. 1498-1502, 1994.

NAYAB, D. *et al.* Cucurbitacin glucosides from *Citrullus colocynthis*. **Natural Product Research**, v. 20, n. 5, p. 409-413, 2006.

OH, M. J.; LEE, B. J. **Method for preparing anti-tumor agent not causing any side effect from germinated pumpkin seed**. KR n. 2007039407, 12 apr. 2005, 12 apr. 2007.

OKABE, H. *et al.* Studies on the constituents of *Luffa operculata* Cogn. II. Isolation and structure elucidation of saponins in the herb. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin.**, v. 37, n. 4, p. 895-900, 1989.

OLMEDO, D. *et al.* A new coumarin from He fruits of *Coutarea hexandra*. **Natural Product Research**, v. 21, n. 7, p. 625-631, 2007.

OUESLATI, M. H. *et al.* New ceramides from *Rantherium suaveolens*. **Lipids**, v. 40, n. 10, p. 1075-1079, 2005.

PAPA, S. M. A. **Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste do Brasil: *Luffa operculata* Cogn. (Cucurbitaceae)**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

PLANTAS QUE CURAM. **Buchinha do norte** [S.l.], [200-]. Disponível em: <www.plantasquecuam.com.br/ervas/buchinha-do-norte.html>. Acesso em: 25 agost. 2011.

RAMALHETE, C. *et al.* New antimalarials with a triterpenic scaffold from *Momordica balsamina*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 5254-5260, 2010.

RAMOS, F. *et al.* Immunosuppressive diacetylenes, ceramides and cerebrosides from *Hydrocotyle leucocephala*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 11, p. 1143-1150, 2006.

RHEE, I. K. *et al.* Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal Chromatography A.**, v. 915, p. 217-223, 2001.

RODRIGUEZ, N. *et al.* Cytotoxic cucurbitacin constituents from *Sloanea zuliaensis*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1515-1516, 2003.

ROSSI, R.; VERACINI, C. A. Insect pheromone components: use of ^{13}C NMR spectroscopy for assigning the configuration of C=C Double bonds of monoenic a dienic pheromone components and for quantitative determination of *Z/E* mixtures. **Tetrahedron**, v. 38, n. 5, p. 639-644, 1982.

- SABA, B. A.; ORIDUPA, A. O. Search for a novel antioxidant, anti-inflammatory/analgesic or anti-proliferative drug: cucurbitacins hold the ace. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 25, p. 2821-2826, 2010.
- SAHRANAVARD, S. *et al.* New cucurbitane-type triterpenoids from *Bryonia aspera*. **Planta Medica**, v. 76, n. 10, p. 1014-1017, 2010.
- SALLAM, A. A. *et al.* Cucurbitacins from *Bryonia cretica*. **Phytochemistry letters**, v. 3, n. 3, p. 117-121, 2010.
- SALVIANO, P. A. Tratamento da sinusite com preparação contendo *Luffa operculata* e solução fisiológica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 49, n. 9, p. 681-682, 1992.
- SANDJO, L. P. *et al.* Triumphettamide and Triumphettoside Ic, Two Ceramides and Other Secondary Metabolites from the Stems of Wild *Triumfetta cordifolia* A. RICH. (Tiliaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, n. 7, p. 1326-1335, 2008.
- SANGAR, D. H.; BALLAL, R. B. **Invention of herbal antiretroviral agent againsts HIV infection / aids**. IN n. 2005MU0113, 07 dez. 2005, 13 jun. 2006.
- SARKES, S. D.; WHITING, P.; SIK, V.; DINAN, L. Ecdysteroid antagonists (cucurbitacins) from *Physocarpus opulifolius* (rosaceae). **Phytochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1123-1128, 1999.
- SCHENKEL, E. P. *et al.* (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Rio Grande do Sul: Universidade/UFRGS, 2001.
- SCHENKEL, E. P. *et al.* Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1329-1333, 1992.
- SEGER, C. *et al.* Spectral assignments and reference data. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 489-491, 2005.
- SHAH, B. N.; SETH, A. K.; DESAI, R. V. Phytopharmacological profile of *Lagenaria siceraria*: a review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 3, p. 152-157, 2010.
- SHAH, B. N.; SETH, A. K.; DESAI, R. V. Phytopharmacological profile of *Lagenaria siceraria*: a review. **Plant Digest**, v. 2, n. 1, p. 16-21, 2011.

SHARMA, G.C.; HALL, C.V. Identifying cucurbitacin in cotyledons of *cucurbita pepo* L. cv. **HortScience**, v. 8, n. 3, p. 136-137, 1973.

SHENG, Z. *et al.* Chemical constituents from the stems and leaves of *Elaeocarpus glabripetalus*. **Zhongguo Tianran Yaowu**, v. 8, n. 1, p. 21-24, 2010.

SILVA, C. L. *et al.* **Fitoterapia: entre o conhecimento popular e o científico**. Disponível em: <[HTTP://www.comciencia.br/reortagens/fito/fito1.html](http://www.comciencia.br/reortagens/fito/fito1.html)>. Acesso em: 17 out. 2011.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFRGS, 2004.

SINDHU, N.; PRATIMA, T.; ASHWINI, W. Isolation of a cucurbitacin from *Picrorhiza kurroa* by column chromatography and its characterization. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 149-156, 2011.

SIQUEIRA, J. M. *et al.* Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Life Sciences**, v. 80, n. 15, p. 1382-1387, 2007.

SIQUEIRA, J. M. *et al.* Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both in vitro and in vivo models. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 529-538, 2009.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity Assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**. v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SMIT, H. F. *et al.* Inhibition of T-Lymphocyte proliferation by cucurbitacins from *Picrorhiza scrophulariaeflora*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.9, p. 1300-1302, 2000.

SOUSA, C. R. **Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste do Brasil: *Luffa operculata* Cogn.** 1999. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

SU, B. N. *et al.* Isolation and characterization of bioactive principles the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. **Tetrahedron**, v. 58, n. 17, p. 3453-3466, 2002.

SUBBIAH, V. **Method and composition using Adipo Cleave for management of weight and blood sugar, and screening method.** US n. 20080026084, 24 set. 2007, 31 jan. 2008.

TABATA, M. *et al.* Production of an anti-allergic triterpene, bryonolic acid, by plant cell cultures. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 2, p. 165-174, 1993.

TALLAMY, D. T. *et al.* The effect of sequestered cucurbitacins on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Moniliales: Monicoleoptera: Chrysomelidae). In **Environmental Entomology**. In press., 1997.

UPAGANLAWAR, A.; BALARAMAN, R. Bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) “a vegetable food for human health” – a comprehensive review. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 209-226, 2009.

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

VALENTE, L. M. M. *et al.* New norcucurbitacin and heptanorcucurbitacin glucosides from *Fevillea trilobata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1772-1778, 1993.

VALENTE, L. M. M. *et al.* Norcucurbitacin Gentiobiosides from *Fevillea trilobata*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 14, p. 1560-1563, 1994.

VELDE, V. V.; LAVIE, D. ^{13}C NMR spectroscopy of cucurbitacins. **Tetrahedron**, v. 39, n. 2, p. 317- 321, 1983.

VERAS, M. L. **Estudo Químico e Farmacológico de *Acnistus arborescens* L. Schlecht e *Physalis angulata* L.** 2006. 286 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

XUESONG, F. *et al.* Determination of cucurbitacins from Cucurbitapepo cv. Dayangua by HPLC. **Zhongyocai**, v. 30, n. 4, p. 418-420, 2007.

ZAI-SU, J. *et al.* Preparative isolation and purification of cucurbitacin from *Pedicellus melo* by high-speed counter-current chromatography. **Fenxi Huaxue**, v. 39, n. 6, p. 867-871, 2011.

ZANDER, J. M.; WIGFIELD, D. C. The biosynthesis of cucurbitacin B. **Chemical Communications**, p. 1599-1600, 1970.

ZHENG, C. H.; FU, H. W.; PEI, Y. H. A neu cucurbitacin from *Bolbostemma paniculatum* Franguent. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 9, n. 2, p. 187-190, 2007.

ZONG-TSI, C.; SHWU-WOAN, L.; CHIU-MING, C. Cucurbitacin B 2-sulfate and cucurbitacin glucosides from root bark of *Helicteres angustifolia*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 11, p. 1605-1607, 2006.

ZOU, J. M. *et al.* A new cucurbitacin from *Picria fel-terrae*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 8, n. 4, p. 367-371, 2006.

WANG, C.C. *et al.* **Extracts of *Aquilaria hulls* and use there of in the treatment of cancer**. US n. 20110160152, 29 dec. 2009, 30 jun. 2011.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TWO QUINONES FROM STEMS OF *Luffa operculata* COGN. (CUCURBITACEAE)

CLÉIA R. DE SOUSA^a AND FRANCISCO J.Q. MONTE^a

(Received May 2009; Accepted October 2009)

ABSTRACT

Phytochemistry investigation of the stems of *Luffa operculata* Cogn. has led to the isolation and characterization of two aliphatic esters (hexadecanoic acid, ethyl ester and octadecanoic acid, ethyl ester), two steroids (stigmasterol and spinasterol) and two quinones (emodine and chrisophanol). The structures of the compounds were identified by spectroscopic methods, including 2D RMN (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HMQC, ¹H-¹³C HMBC) experiments and comparison with published data. To the best of our knowledge, prior to our work, no previous publications on quinones have been reported from *Luffa* genus.

Keywords: Cucurbitaceae; *Luffa operculata*; Stems; Quinones

RESUMEN

En la investigación fitoquímica de los tallos de *Luffa operculata* Cogn fueron aislados e identificados dos ésteres alifáticos (palmitato de etilo y estearato de etilo), dos esteróides (estigmasterol y espinasterol) y dos quinonas (emodina y chrisophanol). Las estructuras de los compuestos fueron identificadas basados en los métodos espectrales, incluyendo experimentos 2D NMR (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HMQC, ¹H-¹³C HMBC) y la comparación con datos espectrales publicados. Este es el primer reporte de la presencia de quinonas en el género *Luffa*.

Palabras clave: Cucurbitaceae; *Luffa operculata*; Quinonas

INTRODUCTION

The Cucurbitaceae comprise 121 genera, arranged into 8 tribes and 2 sub-families. The genus *Luffa* includes five species in two phyletic lines, one comprised of *L. aegyptica* and *L. acutangula* and the other of *L. echinata*, *L. graveolensa* and *L. oper-*

culata (Heiser *et al.*, 1988). *L. operculata* is widely distributed in Northeastern Brazil where is popularly known as “cabacinha” or “bucha de caçador” (Braga, 1976). A solution prepared from its fruits has been used in popular medicine for the treatment of sinusitis, as a bitter stomach and purgative remedy (Corrêa, 1984). The plants of

^aPrograma de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará – UFC. Centro de Ciências, Campus do Pici, caixa postal 12.200 CEP 697643 Fortaleza, Ceará Brasil; Fone/fax: (85) 3366.9782; E-mail: fmonte@dqoi.ufc.br

Cucurbitaceae are characteristically rich in cucurbitacins, which are oxidatively modified triterpenes. These plants have been used as laxative, purgative, abortive and in treatment of sinusitis (Matos, 1979). In addition, the cucurbitacins have received a great deal of attention because of their cytotoxic and anticancer activities (Chen *et al.*, 2005; Atta-ur-Rhman, 2005). In previous contributions (Papa, 1999; Sousa, 1999), we reported the isolation and characterization of triterpenes (Cucurbitacins) from the fruits of *Luffa operculata*. In continuation of this work, we report the isolation and characterization of steroids (**1** and **2**), of aliphatic esters (**3** and **4**) and, of quinones (**5** and **6**) from stem of this specie. All the compounds were characterized by spectroscopic analysis. To the best of our knowledge, this is the first report of quinones being isolated from *Luffa* genus.

MATERIAL AND METHODS

General

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 500 and 125 MHz, respectively, on a Bruker DRX 500 spectrometer and are reported in ppm relative to TMS as an internal standard. The usual pulse sequence of Bruker were used in ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC and ^1H - ^1H HMBC experiments. Infrared spectra were recorded on a Perkin-Elmer 720 FT spectrophotometer and refer to KBr pellets.

Plant material

L. operculata was collected in the Aca-rape, Ceará State, Brazil, in March 2008. A voucher specimen (No. 43.056) is deposited at the Herbarium Prisco Bezerra of the University Federal of Ceará, Brazil.

Extraction and isolation

Stems (935.0 g) of *L. operculata* were pulverized and percolated successively at room temperature with n-hexane and EtOH.

Evaporation of the solvents at reduced pressure afforded a resinous yellow solid (4.1 g) and a yellow dark pasty (22.5 g), respectively. The hexane extract (4.1 g) was subjected to solvent partitioning between hexane, CH_2Cl_2 and EtOAc by chromatography on silica gel column to afford, after evaporation, the respective extracts. The CH_2Cl_2 extract (758.0 mg) was further chromatographed on silica gel, eluting successively with hexane and then with increasing amounts of EtOAc in hexane. Elution with hexane-EtOAc 4:6 yielded a mixture (55.5 mg) of steroids **1** and **2**. The EtOH extract (22.5 g) was fractionated on silica gel (86.0 g) column by elution with hexane, CHCl_3 , EtOAc and MeOH. The CHCl_3 fraction (10.0 g) was rechromatographed on silica gel column with gradient of hexane-EtOAc to give 157 fractions that were combined according to TLC analysis. The main fractions 12, 18 and 52 eluted with hexane-EtOAc 9.9:0.1, 9.5:0.5 and 7:3, respectively, were selected for analysis. Fraction 12 was further subjected to chromatography on flash column eluted successively with hexane-EtOAc 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 and 4:6. From the fraction eluted with hexane-EtOAc 6:4 esters **3** and **4** (63.0 mg) was obtained as a yellow oil. Fraction 18 was rechromatographed on silica gel column with gradient of hexane-EtOAc and the fractions were combined according to TLC analysis. The fraction eluted with hexane-EtOAc 9:1 gave quinone **6** (6.5 mg) as orange solid. The fraction 52 was rechromatographed on silica gel using hexane-EtOAc as binary mixture with increasing polarity. The fraction eluted with hexane-EtOAc 7:3 afforded 10.0 mg of quinone **5** as orange solid.

1,6,8-Trihydroxy-3-methylantraquinone (5). Orange powder, m.p. 247.5-248.5 °C; IR cm^{-1} : 3417 (OH), 1692 (C=O), 1625 (C=O), 1569 (aromatic benzene ring).

1,8-Dihydroxy-3-methylantraquinone (6). Orange powder, m.p. 235-236 °C; IR cm^{-1} : 3485 (OH), 3417 (OH), 1677 (C=O), 1627 (C=O), 1567 and 1466 (aromatic benzene ring).

RESULTS AND DISCUSSION

The stems of *L. operculata* were pulverized and successively extracted with n-hexane and EtOH. After repeated chromatography on silica gel, two steroids (**1** and **2**), two fatty acid esters (**3** and **4**) and two quinones (**5** and **6**), were obtained. The steroids stigmasterol (**1**) and spinasterol (**2**) and, the long-chain fatty acid esters hexadecanoic acid, ethyl ester (**3**) and octadecanoic acid, ethyl ester (**4**) (Figure 1) were identified by their spectral data (RMN, IV and MS) and by comparison with literature values (Chaves *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2001). Compound **5**, C₁₅H₁₀O₅, was isolated as an orange solid, mp 247.5–248.5 °C. The ¹³C NMR spectrum of **5** with the aid of the DEPT, HMQC and HMBC experiments indicated a carbon count of 15 carbons and a hydrogen count of 7 carbon-bond hydrogens. The presence of twelve unsaturated carbons signals coupled with the presence of two carbonyl functionalities at δ_C 190.60 and 182.00, indicated **5** to be an anthraquinone. The ¹H NMR spectrum of **5** showed chelated phenolic hydroxyl signals at δ_H 12.16 and 12.05, a methyl signal at δ_H 2.41 (s), a pair of meta-coupled 1H doublets at δ_H 7.09 (*J* = 2.3 Hz, H - 2) and 7.48 (*J* = 2.3 Hz, H - 4), and a pair of meta-coupled 1H broad doublets at δ_H 7.15 (*J* = 2.3 Hz, H - 5) and 6.56 (*J* = 2.3 Hz, H - 7). These couplings were confirmed by ¹H-¹H COSY spectrum. In addition, in the HMBC spectrum, the downfield hydrogens at δ_H 7.48 (H-4) and 7.15 (H - 5) displayed strong coupling (³J_{CH}) to carbonyl carbon at δ_C 182.00 (C-10). Thus the above ¹H and ¹³C spectra and comparison with the literature (Barbosa, 1999; Dutra *et al.*, 1992; Kazmi *et al.*, 1994) values supported the characterization of **5** as 1,6,8-Trihydroxy-3-methylanthraquinone (Figure 1). Compound **6**, C₁₅H₁₀O₄, was isolated as an orange solid, mp 235–236 °C. The ¹³C NMR spectrum of **6** with the aid of the DEPT, HMQC, and HMBC experiments indicated a carbon count of 15 carbons and a hydro-

gen count of 8 carbon-bond hydrogens. The presence of twelve unsaturated coupled with the presence of two carbonyl functionalities at δ_C 192.79 and 182.24 indicated **6** to be an anthraquinone. The ¹H NMR spectrum of **6** showed chelated phenolic hydroxyl signals at δ_H 12.13 and 12.02, a methyl signal at δ_H 2.47 (s), signals for five aromatic hydrogens at δ_H 7.83 (1H, br d, *J* = 8.0 Hz), 7.69 (1H, br t, *J* = 8.0 Hz), 7.67 (1H, br s), 7.30 (br d, *J* = 8.0 Hz) and 7.11 (1H, br s). The COSY spectrum displayed the correlations peaks between the hydrogens signals at δ_H 7.83 (H-5), 7.69 (H-6) and 7.30 (H-7). On the other hand, in the HMBC spectrum, the hydrogen H - 5 (δ_H 7.83) showed correlations with C - 6 (δ_C 137.19), C - 7 (δ_C 124.79), C - 8a (δ_C 117.00) and C - 10 (δ_C 182.24). Thus, the above ¹H and ¹³C spectra and comparison with the literature (Barbosa, 1999; Dutra *et al.*, 1992; Kazmi *et al.*, 1994) values supported the characterization of **6** as 1,8-Dihydroxy-3-methylanthraquinone (Figure 1).

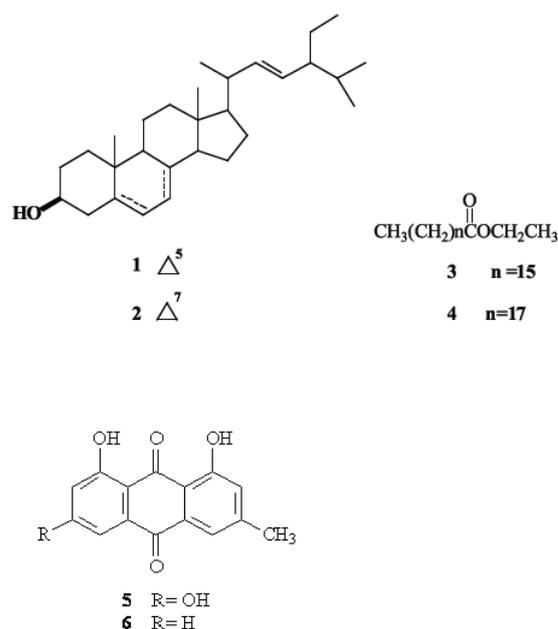


Fig. 1

CONCLUSIONS

The present paper reports isolation and characterization of two aliphatic esters (hexadecanoic acid, ethyl ester and octadecanoic acid, ethyl ester), two steroids (stigmasterol and spinasterol) and two quinones (emodine and chrisophanol). The chemistry of a number large of species of the Cucurbitaceae has been studied by many authors (Chaves, 2006; Fatope *et al.*, 1990; Halaweish, 1993; Jacobs *et al.*, 1990; Kupchan *et al.*, 1978; Monte *et al.*, 2003; Valente *et al.*, 1993). These papers reported only the isolation and characterization of several steroids and especially highly oxygenated triterpenes (cucurbita-

cins), which are widespread in this family. Hier, we reported the continued study of *Luffa operculata*, from which two known compounds, quinone-type named 1,6,8-Trihydroxy-3-methylantraquinone (**5**) and 1,8-Dihydroxy-3-methylantraquinone (**6**), have been isolated. To the best of our knowledge, no previous publication on this compound type have been reported in *Luffa* genus and very few in the family Cucurbitaceae.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to CAPES/FUNCAP for the fellowships and financial support.

REFERENCES

- Atta-ur-Rhaman (2005) Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products. Elsevier, Karachi, Pakistan v. 32 (Part L).
- Braga, R., (1976) Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. 3ª Ed. Imprensa Universitária, Fortaleza, pp 94-95.
- Barbosa, F. G., (1999) "Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: *Senna rugosa*, *Eugenia citrifolia* e *Solanum asperum*" MSc. Thesis, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.
- Chaves, D.C. (2006) "Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: *Cayaponia racemosa*" (Cucurbitaceae) Dr. Thesis, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.
- Chaves, D.C.; Assunção, J.C.C.; Braz-Filho, R.; Lemos, T.L.G.; Monte, F.J.Q. (2007) Cucurbitacins from *Cayaponia racemosa*: isolation and total assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* **45**: 389-392.
- Chen, J.C.; Chiu, M.C.; Nie, R.L.; Cordell, G.A.; Qiu, S.X. (2005) Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* **22**:386-399.
- Corrêa, M.P. (1984) Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Imprensa Nacional, Ministerio da Agricultura, Brasília, Brasil, v. I, p 335.
- Dutra, N. N.; Alves, H. M.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.. (1992) Constituintes Químicos de *Simaba obovata* Spruce. *Química Nova* **15**: 1014.
- Fatope, M.O.; Takeda, Y.; Yamashita, H.; Okabe, H.; Yamauchi, T. (1990) New Cucurbitane triterpenoids from *Monmordica charantia*. *J. Nat. Prod.* **53**: 1491-1497.
- Halaweish, F.T. (1993) Cucurbitacins from *Cucurbita texana*: Evidence for the role of isocucurbitacins. *J. Chem. Ecol.* **19**: 29-37.
- Heiser, C.B.; Schilling, E.E. (1988) Phylogeny and Distributins of *Luffa* Cucurbitaceae. *Biotropica* **20**: 185-191.
- Jacobs, H.; Singh, T.; Reynolds, W.F.; McLean, S. (1990) Isolation and carbon-13 NMR assignments of cucurbitacins from *Cayaponia angustiloba*, *Cayaponia racemosa* and *Gurania subumbellata*. *J. Nat. Prod.* **53**: 1600-1605.

- Kazmi, M.H.; Malik, A.; Hameed, S. (1994) An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry* **36**: 761-763.
- Kupchan, S.M.; Meshulam, H.; Sneiden, A.T. (1978) Tumor inhibitors. Part 128. New cucurbitacins from *Phormium tenax* and *Marah oreganus*. *Phytochemistry* **17**: 767-769.
- Matos, F.J.A. (1979) Farmacognosia de *Luffa operculata* Cogn. *Rev. Bras. Farm.* **60**: 69-79
- Monte, F.J.Q.; Soraia, M.A.P.; Sousa, C.R.; Braz-Fiho, R. (2003) Cucurbitacins of *Luffa operculata*: isolation and complete ¹H and ¹³C chemical shifts assignment. *Rev. Latinoamer. Quím.* **31** (3): 89-99.
- Papa, S.M.A. (1999) "Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: *Luffa operculata*" MSc. Thesis, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.
- Sousa, C.R. (1999) "Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: *Luffa operculata*" MSc. Thesis, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.
- Souza, A. D. L.; Rocha, A. F. I.; Pinheiro, M. L. B.; Andrade, C. H. S.; Gallota, A. L. A. Q.; Santos, M. P. G. S. (2001) Constituintes químicos de *Gustavia augusta* (Lecythidaceae). *Quim. Nova* **24** (4): 439-442.
- Valente, L.M.M.; Gunatilaka, A.A.L.; Glass, T.E.; Kingston, D.G.I.; Pinto, A.C. (1993.) New nor- and hepta nor-cucurbitacins glucosides from *Frevillea trilobata*. *J. Nat. Prod.* **56** (10): 1772-1778.

Characterization of Chemical Constituents of *Luffa operculata* (Cucurbitaceae)

Cléia Rocha de Sousa Feitosa^{1,3}, Robério Costa da Silva¹, Raimundo Braz-Filho²,
Jane Eire Silva Alencar de Menezes⁴, Sônia Maria Costa Siqueira⁵, Francisco José Queiroz Monte¹

¹Programa de Pós-Graduação em Química-DQOI-CC, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

²Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil

³Universidade Estadual do Ceará, Faculdades de Educação de Crateús, Fortaleza, Brazil

⁴Universidade Estadual do Ceará, Itapipoca Fortaleza, Brazil

⁵Universidade Estadual do Ceará, e campos do Itaperi, Fortaleza, Brazil

E-mail: fmonte@dqoi.ufc.br

Received August 4, 2011; revised September 15, 2011; accepted September 28, 2011

Abstract

A mixture of new ceramides (**1**, **2**, **3**, **4** and **5**) together with a binary mixture of ceramides with long chain alkyl (**6** and **7**), triterpenoid (**10**) and steroids (**11** and **12**) have been isolated from bark of the fruits and of the stems of *Luffa operculata* (Cucurbitaceae). The structures were elucidated by comprehensive spectroscopic analysis including ¹H and ¹³C NMR, DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer), COSY (correlated spectroscopy), HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence), HMBC (heteronuclear multiple bond connectivity), IR (infrared), HR-ESI-MS (electrospray ionization-high resolution mass spectra) and LR-MS (low resolution electron ionization mass spectra) experiments. All the ceramides are reported for the first time in Cucurbitaceae and this is the first report of the rare triterpene **10** isolated from *Luffa operculata*. The ceramides **6** and **7** showed a high acetylcholine esterase inhibitory effect.

Keywords: Cucurbitaceae, Ceramides, Triterpenes, Spectroscopic Data

1. Introduction

As a part of our continuing chemical studies on plants of Cucurbitaceae family, we have investigated the bark of the fruits and the stems of *Luffa operculata* specie. *L. operculata* Cogn. (Cucurbitaceae), locally known as “cabacinha”, a perennial shrub widely distributed in Northeastern Brazil where an aqueous solution from its fruits has been used in popular medicine for the treatment of sinusitis [1]. In the previous paper [2], we reported the isolation and structure elucidation of triperpenes cucurbitane type from these fruits. In this paper, we report the isolation and structure elucidation of ceramides (**1-5**, **6** and **7**), triterpene oleanane type (**10**) and steroids (**11** and **12**) from the bark of the fruits and stems of this plant. In plants, recent studies indicate that ceramides may be involved in signal transduction, membrane stability, host-pathogen interactions, and stress responses [3]. The compound **6** and **7**, as well as the steroids mixture (**12**), showed an acetylcholine esterase inhibitory effect. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) is used

as a strategy for the treatment of Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative malady characterized by cognitive impairment and personality changes. One of the most promising approaches for treating this disease is to enhance the acetylcholine level in brain using acetylcholine esterase (AChE) plant-derived inhibitors [4]. In this work we report an evaluation of the cholinesterase inhibition effect of the ceramides **6** and **7** following the methodology of Elmann, adapted by Rhee [5] for the layer chromatography (TLC).

2. Materials and Method

2.1. General Procedures

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker DPX 300 and DRX 500 spectrometers in CDCl₃, with TMS as an internal standard. DEPT and all 2D experiments (COSY, HMQC and HMBC) with standard Bruker pulse sequence; IR spectra were carried out on Perkin-Elmer 2000 series FT-IR; electrospray ionization mass spectra

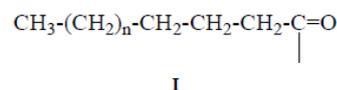
(HR-ESI-MS) obtained in mass spectrometer model LCMS-IT-TOF (225-07100-34, Shimadzu) and on a QP5050 (Shimadzu) instrument at 70 eV for low resolution; melting point were measured on Mettler Toledo FP90 apparatus, uncorrected; the spots were visualized by spraying with a mixture of vanillin-perchloric acid ethanol.

2.2. Extraction and Isolation of Constituents

Luffa operculata stems were collected in Acarape County, Brazil and identified in the Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (UFC). A voucher specimen (N° 43.056) was deposited at Departamento de Biologia (UFC) Prisco Bezerra Herbarium. The air-dried stems (935 g) were powdered and extracted at room temperature with hexane and EtOH. The hexane extract (4.1 g) was subjected to column chromatography (CC) on silica gel (Si gel) 60 (230 - 400 mesh) using hexane, CH₂Cl₂, EtOAc and MeOH as solvents. The CH₂Cl₂ fraction (2.56 g) was further subjected to CC on Si gel 60 (230 - 400 mesh) to yield a material (17.5 mg) white greasy (**1** - **5**) and **11** (102 mg). The AcOEt fraction (4.95 g) of EtOH extract (22.5 g) was successively chromatographed on Si gel column to afford **10** (7.5 mg) as white powder. The air-dried bark of fruits (195.8 g) were powdered and extracted at room temperature with hexane and EtOH. The EtOH extract (10.5 g) was subjected to CC on silica gel 60 (230 - 400 mesh) using CH₂Cl₂, EtOAc and EtOH as solvents. The CH₂Cl₂ fraction (0.29 g) was successively chromatographed on Si gel column to afford **12** (21 mg) as a white powder, while the AcOEt fraction (0.59 g) after successively chromatographed on Si gel column afforded **6** and **7** (24.5 mg) a white solid.

3. Results and Discussion

The CH₂Cl₂ fraction of the hexane extract of the stems of *L. operculata* was chromatographed on silica gel column to yield a white greasy material. Its IR spectrum disclosed bands due to methylene and methyl (ν_{\max} 2923/2853 cm⁻¹ and δ_{\max} 1462/1380 cm⁻¹), carbonyl (ν_{\max} 1737 cm⁻¹) groups, as well as bands of C - O/C - N (ν_{\max} 1172 cm⁻¹) bounds. The LR-MS displayed a cluster of four 14-amu-apart ion peaks at m/z 311, 297, 283, 269 and 255 indicative of a mixture of homologous compounds (**Scheme 1**). In agreement, the NMR data (**Table 1**) revealed signals due to methylene groups [intense and broad signal at δ_{H} 1.29 - 1.34; several peaks at δ_{C} 23.46 - 34.89 (very high peak at δ_{C} 29.85)], as well as signals to one primary methyl group (δ_{H} 0.89, t, 6.7 Hz; δ_{C} 14.80) all characteristic of a long alkyl chain. The methylene hydrogens at δ_{H} 2.39 [t, 7.3 Hz; δ_{C} 34.89 (methylene carbon *alpha* to carbonyl)] showed ²J and ³J HMBC correlations with the carbons at δ_{C} 174.20 (C = O), 32.64 (methylene carbon *beta* to carbonyl) and 30.26 (methylene carbon *gamma* to carbonyl) and allowed to establish the partial structure **I**.



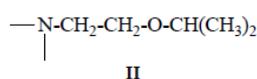
In addition, the ¹H and ¹³C spectra exhibited signals due to two other methylene groups (δ_{H} 4.38, t, 4.9 Hz, 2H; δ_{C} 64.67 and δ_{H} 3.66, t, 5.2 Hz, 2H; δ_{C} 66.76) and to a secondary *gem*-dimethyl group (δ_{H} 1.12, d, 6.0 Hz, 6H; δ_{C} 22.71 and δ_{H} 3.57, m, 1H; δ_{C} 72.40) and allowed to suggest the partial structure **II**.

	n	+•M	m/z	Fragmentos	m
	14	397	311		18
	13	383	297		17
	12	369	283		16
	11	355	269		15
	10	341	255		14
			m/z 86		
			m/z 73		
				CH ₃ ⁺ CHCH ₃	m/z 43

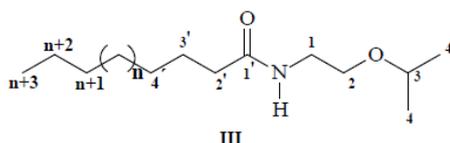
Scheme 1. Structures for the amides 1-5.

Table 1. ^{13}C (125 MHz) and ^1H (500 MHz) data of compounds **1 - 5** in pyridine-*d*₅, δ in ppm, *J* in Hz and multiplicities, in parenthesis.

No.	1 - 5		
C	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{CH}}$
1'	174.20	-	H-1; H-2'; H-3'
CH			
3	72.40	3.57 (m)	H-4; H-2
CH₂			
1	64.67	4.38 (t, 4.9)	H-2
2	66.76	3.66 (t, 5.2)	H-1
2'	34.89	2.39 (t, 7.3)	H-3'
3'	25.81	1.67 (m)	H-2'
4'	30.26	1.29 - 1.34 (m)	
5'-n	29.85 - 30.51	1.29 - 1.34 (m)	-
n + 1	32.64	1.29 - 1.34 (m)	3H-n + 3
n + 2	23.46	1.29 - 1.34 (m)	-
CH₃			
4	22.71	1.12 (d, 6.0)	-
n + 3	14.80	0.89 (t, 6.7)	H-2; H-4



In the $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY spectrum, the mutual correlations between the signals at δ_{H} 4.38 and 3.66, as well as between the signals at δ_{H} 1.12 and 3.57, supported the fragment **II**. The linkage of these partial structures (**I** and **II**) to each other was based on additional long-range connectivities observed between the hydrogens at δ_{H} 4.38 (-NCH₂-) and the carbon atom in δ_{C} 174.20 (C = O) in the ^1H - ^{13}C HMBC spectrum and resulted in the general structure **III**, corresponding to amides mixture. Others correlations in the HMBC spectrum were assigned in the **Table 1**.



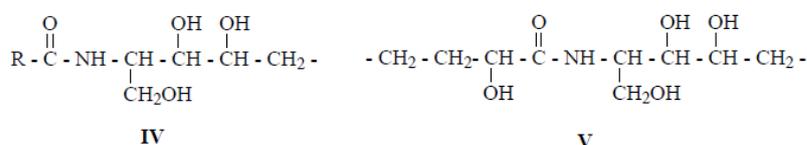
Finally, the fragments in the mass spectrum due to the peaks at m/z 311, 297, 283, 269 and 255 obtained by McLafferty rearrangement from molecular ion peaks at m/z 397, 383, 369, 355 and 341 (observed at 395, 381,

367, 353 and 339, respectively), respectively, allowed the possible structures for the amides **1 - 5** (**Scheme 1**), unknown ceramides up to date. Others important peaks as m/z 86 (100%), 73 and 43 all are in agreement with the proposed structures (**Scheme 1**).

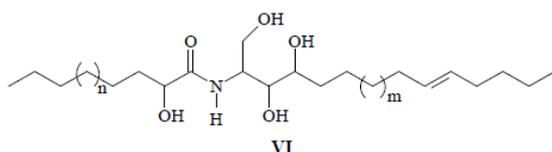
1	n = 14	M^+ 397	N-(2-isopropoxy-ethyl)eicosamide
2	n = 13	M^+ 383	N-(2-isopropoxy-ethyl)nonadecanamide
3	n = 12	M^+ 369	N-(2-isopropoxy-ethyl)octadecanamide
4	n = 11	M^+ 355	N-(2-isopropoxy-ethyl)heptadecanamide
5	n = 10	M^+ 341	N-(2-isopropoxy-ethyl)hexadecanamide

The AcOEt fraction of the EtOH extract from bark fruit of *L. operculata* was chromatographed on silica gel column to afford a white solid whose high-resolution high-resolution ESI mass spectrometry in the negative mode displayed two 14-amu-apart quasimolecular ion peaks $[\text{M-H}]^-$ at m/z 736.5277 and 722.3396, indicative of a binary mixture of homologous compounds. The IR spectrum of this solid disclosed bands at 3336/3218, 2918/2849 and 1621 cm^{-1} suggestive of OH and/or NH, CH₃/CH₂ and C = O groups, respectively, as well as bands at 1070/1025 cm^{-1} of C-O/C-N bound; further

bands at 1544, 1466 and 750 cm^{-1} were attributed to NH, CH_3/CH_2 and CH_2 groups, respectively. The ^{13}C and DEPT NMR spectra (Table 2) showed several aliphatic methylenes (δ_{C} 23.28 - 36.17) and methyl terminal signal (δ_{C} 14.55) which constructed a long alkane chain. These spectra also revealed the presence of six methine [δ_{C} 53.42; three oxygenated (δ_{C} 72.75, 73.26 and 77.32) and two olefinic (δ_{C} 131.16 and 131.04)] carbons. In addition, signals at δ_{C} 62.36 and 175.64 indicated an oxymethylene carbon and an ester or amide carbonyl, respectively. The ^1H NMR spectrum also revealed characteristic signals for long alkyl chains (δ_{H} 1.27 - 1.33) as well as a signal at δ_{H} 8.61 compatible with hydrogen of secondary amide (RCONHR') which, was further substantiated by



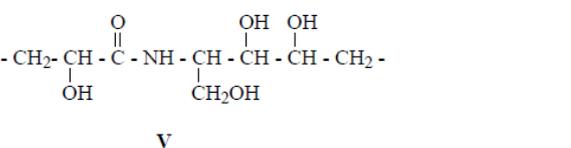
The third oxygenate methine carbon at δ_{C} 72.75 was associated to hydrogen in δ_{H} 4.64 by HMQC experiment. In addition, the HMBC spectrum showed that this hydrogen was correlated with carbonyl carbon and with the methylene carbons at δ_{C} 36.17 and 26.19, *beta* and *gamma* carbons, respectively, to carbonyl function. Thus, a partial structure IV was expanded to V. Based on the above spectral analysis and by comparison with spectral data [IR, NMR (^1H and ^{13}C) and MS] of the literature [3,6-8] the sample was identified as a ceramides mixture with general structure VI.



The position of the double bond at C-19 was indicated by strong peaks corresponding to m/z 97 ($^+\text{CH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 57 ($^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) and 43 ($^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). The *E* stereochemistry of double bond was determined on the basis of ^{13}C NMR chemical shift of the methylene carbons adjacent to the olefinic carbons, which is observed at $\delta_{\text{C}} \approx 27.00$ in *Z* isomers and at $\delta_{\text{C}} \approx 32.00$ in *E* isomers [3,6].

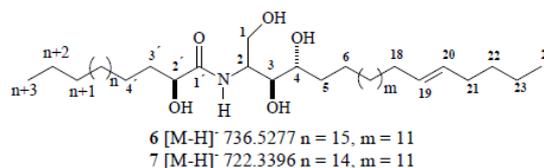
After comparison with analogous compounds [3,7-11] the relative stereochemistry inferred for the stereocenters 2, 3, 4 and 2' was presumed to be S^* , S^* , R^* and R^* , respectively. On the basis of the above mentioned data, the structures of compounds 6 and 7 were established as *rel*-(2*S*,3*S*,4*R*,19*E*)-2-[(2'*R*)-2'-hydroxydocosanoylamin]o-

its ^{13}C NMR (δ_{C} 175.64) and IR (1621 and 1544 cm^{-1}) spectra. In the ^1H - ^1H COSY spectrum, the amide hydrogen with resonance at δ_{H} 8.61 coupled to a methine hydrogen at δ_{H} 5.13 (δ_{C} 53.42) which in turn revealed coupling to a methyne carbinolic hydrogen at δ_{H} 4.38 (δ_{C} 77.32) and to a diastereotopic methylene group observed at δ_{H} 4.45 and 4.53 (δ_{C} 62.36). On the other hand, in the HMBC spectrum, the hydrogen resonance at δ_{H} 4.38 showed correlation to the δ_{C} 53.42 (CH), 62.38 (CH_2), 73.26 (CH) and 34.55 (CH_2). The HMQC spectrum established the association of the methyne carbon at δ_{C} 73.26 with the carbinolic hydrogen at δ_{H} 4.32. This analysis, based on amide function (RCONHR'), allowed to establish the partial structure IV.

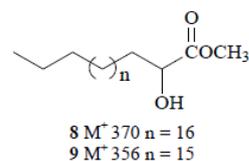


o]-tetracosadec-19-ene-1,3,4-triol (6) and *rel*-(2*S*,3*S*,4*R*,19*E*)-2-[(2'*R*)-2'-hydroxyhenicosanoylamino]-tetracosadec-19-ene-1,3,4-triol (7).

These data support the structures 6 and 7 proposed for ceramides:



The structures of acyl chains were confirmed by analysis of the mixture of products (8 and 9) resulting from methanolysis of 6 and 7. The CG-MS of 8 and 9 was in agreement with structures of 6 and 7, showing the presence of two constituents, which were identified as methyl-2-hydroxydocosanoato (m/z 370 [M^+]) and methyl-2-hydroxyhenicosanoato (m/z 356 [M^+]).



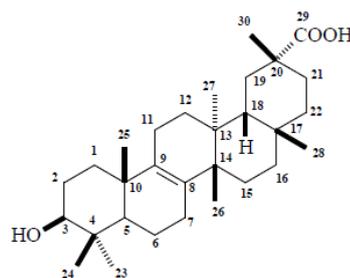
The AcOEt fraction of the EtOH extract of the stems of *L. operculata* was successively chromatographed on silica gel column to afford 10 as white powder, mp 262°C - 263°C. The ^{13}C NMR spectrum of 10 exhibited thirty signals divided by DEPT spectra in nine quaternary carbons, three CH, eleven CH_2 and seven CH_3

Table 2. ^{13}C (125 MHz) and ^1H (500 MHz) data of compounds **6** and **7** in pyridin- d_5 , δ in ppm, J in Hz and multiplicities, in parenthesis.

No.	6 and 7		
C	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{CH}}$
1'	175.64	-	NH-1'
CH			
2	53.42	5.13 (m)	NH-1'; H-1; H-3
3	77.32	4.38 (m)	H-1; H-2; H-5
4	73.26	4.32 (m)	H-3; H-5
19	131.16	5.53 (m)	-
20	131.04	5.53 (m)	-
2'	72.75	4.64 (m)	-
CH₂			
1	62.36	4.45; 4.53 (m)	H-2; H-3
5	34.55	1.95; 2.30 (m)	H-3
6	27.00	1.71; 1.80 (m)	H-5
7 - 17	30.25 - 30.53	1.27 - 1.33 (m)	-
18	33.31	2.05	H-19; H-20
21	34.23	2.00; 2.30 (m)	-
22	32.43	1.27 - 1.33 (m)	-
23	23.28	1.27 - 1.33 (m)	H-24
3'	36.17	2.05; 2.25	H-2'
4'	26.19	1.71; 1.80	H-2'
5'-n	30.25 - 30.53	1.27 - 1.33 (m)	-
n + 1	32.43	1.27 - 1.33 (m)	-
n + 2	23.28	1.27 - 1.33 (m)	-
CH₃			
n + 3	14.55	0.89 (t, 6.4)	-
24	14.55	0.89 (t, 6.4)	-

groups. In the ^1H and ^{13}C NMR spectra of **10** characteris-

tic feature can be identified: methyl groups (δ_{H} 0.99, 1.04, 1.05, 1.08, 1.22, 1.28 and 1.42; δ_{C} 20.43, 16.82, 22.69, 31.44, 28.93, 18.28 and 33.64) all bonded to the quaternary carbons; one carbinolic methyne carbon (δ_{H} 3.38, dd, $J = 10.0$ and 5.0 ; δ_{C} 78.34); one tetrasubstituted double bond (δ_{C} 134.89 and 134.45) and one carboxylic carbon (δ_{C} 181.68). Together, these data were consistent with a molecular formula of $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$, including one -OH and one $-\text{CO}_2\text{H}$ groups. Based on this NMR data (Table 3), the seven degrees of unsaturation could be attributed to one carbon-carbon double bond, one carbonyl group, and five ring systems. Compound **10** was distinct from oleanolic acid by two remarks: the double bond was located at Δ^8 based on the long range connectivities between two methyl signals at δ_{H} 0.99 (3H-25) and 1.05 (3H-26) and the olefinic carbon signals at δ_{C} 134.89 (C-8) and 134.45 (C-9), respectively; the long range coupling between the methyl signal at δ_{H} 1.42 (3H-30) and carbon carboxylic signal at δ_{C} 181.68 (C-29). Thus, based on the above spectral analysis and by comparison with spectral data [IR, NMR (^1H and ^{13}C) of literature [12,13] the structure was confirmed as 3β -hydroxy-D:C-friedoolean-8-en-29-oic acid, known as bryonolic acid, a triterpenoid rare in nature.



The steroids were identified as 24α -etil- 5α -colest- $7,trans$ - 22 -dien- 3β -ol [**11** (spinasterol)] and a mixture of 24α -ethyl- 5α -colest- $7,trans$ - 22 -dien- 3β -ol (**11**) and 24β -ethyl- 5α -colest- $7,trans$ - $22,25$ -trien- 3β -ol (**12**) from their spectral analysis and by comparison of their physical and spectral data with literature [14,15] values.

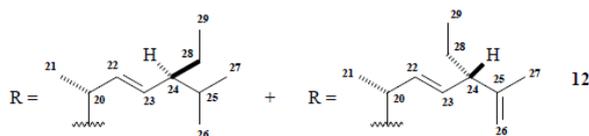
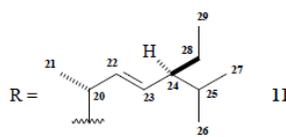
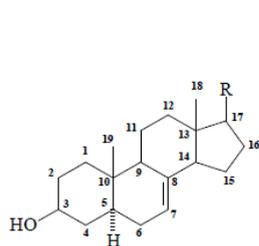


Table 3. ^{13}C (125 MHz) and ^1H (500 MHz) data of compound 10 in pyridin-*d*₅, δ in ppm, *J* in Hz and multiplicities, in parenthesis.

No.	C	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{CH}}$
4		39.71	-	3H-23; 3H-24
8		134.89	-	3H-26
9		134.45	-	3H-25
10		38.12	-	3H-25
13		37.99	-	3H-27; 3H-26
14		42.44	-	3H-26; 3H-27
17		31.60	-	H-19a
20		40.91	-	H-19a; 3H-30
29		181.68	-	H-19a; H-19b; 3H-30
CH				
3		78.34	3.38 (dd, 10.0; 5.0)	3H-23; 3H-24; 3H-25
5		51.25	1.08	3H-23; 3H-24; 3H-25
18		45.46	1.57	3H-28
CH₂				
1		35.82	1.63; 1.84	-
2		28.27	1.84; 2.11	-
6		19.91	1.42; 1.72	-
7		28.97	1.86; 2.59	-
11		21.37	1.90; 1.94	-
12		30.82	1.22; 1.49	3H-27
15		25.77	1.37; 1.72	-
16		37.81	1.39; 2.75	3H-28
19		31.74	1.70; 2.73	-
21		30.98	1.46; 1.84	3H-30
22		35.37	1.03; 2.45	3H-28
CH₃				
23		28.93	1.22 (s)	H-3; 3H-23
24		16.82	1.04 (s)	-
25		20.43	0.99 (s)	-
26		22.69	1.05 (s)	-
27		18.28	1.28 (s)	-
28		31.44	1.08 (s)	-
30		33.64	1.42 (s)	-

Table 4. Cholinesterase inhibition of constituents from *L. operculata*.

Substance ^a	Zone of inhibition (mm)
6 and 7	12
11	N ^b
12	8
Physostigmine ^{a,c}	9

^aConcentration = 2mg/mL; ^bN = No effect; ^cPositive control.

In the anticholine esterase activity test, fisostgmine was used as positive control (with an inhibition zone of 9 mm) since it is a drug that binds and activates the acetylcholine receptor. Acetylcholine esterase (AChE) hydrolyzes the neurotransmitter acetylcholine at one of the highest known enzymatic rates. Therefore the anticholine esterase activity of the ceramides (6 and 7) (with aninhibition zone of 12 mm) is relevant as the results below (Table 4).

4. Conclusions

Many previous studies showed that *Luffa operculata* is rich in triterpenes cucurbitano type, as expected for a Cucurbitaceae. Although almost all of these metabolites were found only in their fruits, this study showed that the stems and bark of the fruits of this plant are bioproductors of ceramides as well as steroids and triterpenes of another type (oleanane). According to the analysis of spectral data, the mixture of long chain ceramides seems to involve more than two components, requiring a further thorough study about the subject.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP) for grants and to Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) for a research fellowship and grants.

6. References

- [1] R. Braga, "Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará," 5th Edition, Fundação Guimarães Duque, Mossoró-RN, 2001.
- [2] F. J. Q. Monte, S. M. A. Papa, C. R. Sousa and R. Braz-Filho, "Cucurbitacins of *Luffa operculata*: Isolation and Complete ^1H and ^{13}C Chemical Shifts Assignment," *Revista Latinoamericana de Química*, Vol. 31, No. 3, 2003, pp. 89-99.
- [3] M. H. Oueslati, Z. Mighri, H. B. Jannet and P. M. Abreu, "New Ceramides from *Rantherium suaveolens*," *Lipids*,

- Vol. 40, No. 10, 2005, pp. 1075-1079.
[doi:10.1007/s11745-005-1472-3](https://doi.org/10.1007/s11745-005-1472-3)
- [4] Viegas Junior, V. S. Bolzani and M. Furian, "Produtos Naturais Como Candidatos a Fármacos Úteis no Tratamento do Mal de Alzheimer," *Química Nova*, Vol. 27, No. 4, 2004, pp. 655-660.
[doi:10.1590/S0100-40422004000400021](https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400021)
- [5] I. K. Rhee, M. V. Meent, K. Ingkaninan and R. Verpoorte, "Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors from Amaryllidaceae Using Silica Gel Thin-Layer Chromatography in Combination with Bioactivity Staining," *Journal of Chromatography*, Vol. 915, No. 1, 2001, pp. 217-223. [doi:10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)
- [6] F. Cateni, J. Zilic, G. Falsone, G. Scialino and E. Banfi, "New Cerebrosides from *Euphorbia peplis*, L.: Antimicrobial Activity Evaluation," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 13, No. 24, 2003, pp. 4345-4350. [doi:10.1016/j.bmcl.2003.09.044](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.09.044)
- [7] M. L. Veras, "Estudo Químico e Farmacológico de *Acnistus arborescens* L. Schlecht e *Physalis angulata* L.," Thesis, Programa de Química, DQOI, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- [8] A. I. V. Maia, M. L. Veras, R. Braz-Filho, N. P. Lopes, E. R. Silveira and O. D. L. Pessoa, "New Ceramides from *Acnistus arborescens*," *Journal of Brazilian Chemical Society*, Vol. 21, No. 5, 2010, pp. 867-871. [doi:10.1590/S0103-50532010000500014](https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000500014)
- [9] F. Ramos, Y. Takaishi, K. Kawazoe, C. Osorio, C. Duque, R. Acuña, Y. Fujimoto, M. Sato, M. Okamoto, T. Oshikawa and S. U. Ahmed, "Immunosuppressive Diacytylenes, Ceramides and Cerebrosides from *Hydrocotyle leucocephala*," *Phytochemistry*, Vol. 67, No. 11, 2006, pp. 1143-1150. [doi:10.1016/j.phytochem.2006.03.004](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.004)
- [10] L. P. Sandjo, P. Hannewald, M. Yemloul, G. Kirsch and B. T. Ngadjui, "Triumfettamide and Triumfettoside Ic, Two Ceramides and Other Secondary Metabolites from the Stems of Wild *Triumfetta cordifolia* A. Rich. (Tiliaceae)," *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 91, No. 7, 2008, pp. 1326-1335. [doi:10.1002/hlca.200890144](https://doi.org/10.1002/hlca.200890144)
- [11] C. F. S. Christophe, F. S. Kouam, S. F. Kouam, M. P. P. Herve, I. K. Simo, B. T. Ngadjui, I. R. Green and K. Krohn, "Benjaminamide: A New Ceramide and Other Compounds from the Twigs of *Ficus benamina* (Moraceae)," *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 36, No. 3, 2008, pp. 238-243. [doi:10.1016/j.bse.2007.08.014](https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.08.014)
- [12] F. Khallouki, W. E. Hull and R. W. Owen, "Characterization of a Rare Triterpenoid and Minor Phenolic Compounds in the Root Bark of *Anisophyllea dichostyla* R. Br.," *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 47, No. 8, 2009, pp. 2007-2012. [doi:10.1016/j.fct.2009.05.018](https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.018)
- [13] C. Honda, K. Suwa, S. Takeyama and W. Kamisako, "Relative Population of S-Form and F-Form Conformers of Bryonolic Acid and Its Derivates in Equilibrium in CDCl₃ Solutions," *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 50, No. 4, 2002, pp. 467-474. [doi:10.1248/cpb.50.467](https://doi.org/10.1248/cpb.50.467)
- [14] N. Jahan, W. Ahmed and A. Malik, "New Steroidal Glycosides from *Mimusops elengi*," *Journal of Natural Products*, Vol. 58, No. 8, 1995, pp. 1244-1247. [doi:10.1021/np50122a014](https://doi.org/10.1021/np50122a014)
- [15] W. Y. Kang and X. J. Xu, "Structure of a New Xanthone from *Securidaca inappendicuata*," *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 44, No. 4, 2008, pp. 432-434. [doi:10.1007/s10600-008-9089-9](https://doi.org/10.1007/s10600-008-9089-9)

