

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Compostos com Atividade Antitumoral da Planta Africana

Momordica balsamina L.

Moduladores da Glicoproteína-P

Cristina Isabel Duarte Silva

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria José Umbelino Ferreira e
coorientada pela Professora Doutora Ana Margarida Madureira

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2017

O trabalho desenvolvido nesta dissertação foi realizado no grupo de Química de Produtos Naturais do *Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences* (iMed.Ulisboa), da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O projeto foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (Projeto: PTDC/QEQ-MED/0905/2012, UID/DTP/04138/2013).

RESUMO

A multirresistência farmacológica (MDR) tem sido apontada como um dos principais motivos para a ineficácia da quimioterapia no tratamento do cancro. Um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de MDR é a sobre-expressão da glicoproteína-P (P-gp) nas células tumorais, levando ao aumento do efluxo do fármaco do interior para o exterior da célula.

Em estudos anteriores, os triterpenos do tipo cucurbitano demonstraram uma forte atividade como moduladores da P-gp em células tumorais multirresistentes. Neste sentido, este trabalho teve como principal objetivo a obtenção de uma pequena biblioteca de compostos ativos, resultantes do estudo fitoquímico do extrato metanólico das partes aéreas da planta Africana *Momordica balsamina* L. (Cucurbitaceae).

Do fracionamento do extrato metanólico, por processos cromatográficos, resultaram cinco compostos novos, com o esqueleto do cucurbitano, denominados balsacurbitriol (**2.1**), balsacurbepoxitol (**2.2**), ácido balsacurbitóico (**2.3**), balsacurbitol (**2.4**) e balsacurbinol (**2.5**), e cinco compostos já descritos anteriormente com o mesmo esqueleto: karavilagenina C (**1.92**), karavilagenina A (**2.6**), karavilagenina B (**2.7**), kuguacina B (**2.8**) e kuguacina C (**2.9**) e o esteroide, 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol (**2.10**). A oxidação da karavilagenina C (**1.92**) e do esteroide (**2.10**) originou os compostos **2.11** e **2.12**, respetivamente. A atribuição das estruturas químicas dos compostos foi realizada através da análise dos seus dados físicos e espectroscópicos, que incluíram: infravermelho, espectrometria de massa e estudos de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C , DEPT) e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY).

Os compostos (**1.92** e **2.1-2.12**) foram avaliados quanto ao seu efeito citotóxico e como moduladores da P-gp em células T L5178Y de linfoma de rato, transfetadas com o gene humano *ABCB1*, e em células do adenocarcinoma do colón humano multirresistentes, através do ensaio de acumulação da rodamina 123. A maioria dos compostos mostrou uma forte atividade moduladora da P-gp (FAR > 10) e uma interação sinérgica com o fármaco antitumoral doxorubicina, o que corroborou o seu potencial como reversores de MDR.

Palavras-chave: *Momordica balsamina*, triterpenos, cucurbitano, multirresistência farmacológica, Glicoproteína-P.

ABSTRACT

Multidrug resistance (MDR) is considered one of the main reasons of cancer chemotherapy failure. One of the most significant mechanisms of MDR is due to the overexpression of P-glycoprotein (P-gp) that acts as an extrusion pump for chemotherapeutic agents, thus decreasing their intracellular concentration.

In previous studies, cucurbitane-type triterpenes were found to be strong P-gp modulators in multidrug resistant tumour cells. In this way, this dissertation aimed at generating a small library of compounds through the phytochemical study of the African medicinal plant *Momordica balsamina* L. (Cucurbitaceae). Fractionation of the methanol extract of *Momordica balsamina* aerial parts, by chromatographic techniques, such as extensive column chromatography, preparative thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC), afforded five new compounds with the cucurbitane skeleton, named balsacurbitriol (**2.1**), balsacurbepoxitol (**2.2**), balsacurbitoic acid (**2.3**), balsacurbital (**2.4**) and balsacurbinol (**2.5**), along with five known compounds with the same skeleton: karavilagenin C (**1.92**), karavilagenin A (**2.6**), karavilagenin B (**2.7**), kuaguacin B (**2.8**) and kuguacin C (**2.9**), and a steroid, 24-ethyl-5 α -cholesta-7,22,25-trien-3 β -ol (**2.10**). Oxidation of karavilagenin C (**1.92**) and the steroid (**2.10**) yielded the derivatives **2.11** and **2.12**, respectively. The chemical structures of the compounds were deduced from their physical and spectroscopic data, which included infrared spectroscopy, mass spectrometry and extensive one-dimensional (^1H , ^{13}C , DEPT) and two-dimensional (HMQC, HMBC, COSY e NOESY) NMR experiments.

Compounds **1.92** and **2.1-2.12** were assessed for their cytotoxic activities and as P-gp modulators in human *ABCB1*-gene transfected L5178Y mouse lymphoma cells and resistant human colon adenocarcinoma cells by the rhodamine-123 accumulation assay. Most of the compounds showed strong P-gp modulating activity (FAR > 10) and a synergistic interaction with the antitumor drug doxorubicin, confirming their potential as MDR reversers.

Keywords: *Momordica balsamina*, cucurbitane-type triterpenes, multidrug resistance, P-glycoprotein

AGRADECIMENTOS

A realização deste Mestrado não teria sido possível sem a orientação, o apoio e incentivo de diversas pessoas que de diferentes modos possibilitaram a concretização deste sonho, a quem quero deixar expresso o meu sincero agradecimento.

Quero agradecer à Professora Doutora Maria José Umbelino, minha orientadora, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste trabalho e pela sua ajuda, acompanhamento e constante incentivo durante este longo processo para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Margarida Madureira, minha co-orientadora, agradeço a dedicação na revisão deste trabalho e a disponibilidade prestada.

Os meus profundos agradecimentos vão, também, para a Professora Doutora Cátia Ramalhete pela sua preciosa ajuda, pelos seus conhecimentos, disponibilidade e acompanhamento incansáveis.

Os meus agradecimentos ao Doutor Silva Mulhovo do Centro de Estudos de Moçambique e de Etnociências (CEMEC), na Universidade Pedagógica de Maputo, pela recolha e envio da planta, essencial para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Professor Doutor Joseph Molnár e à Dr. Prof Gabriella Spengler da Universidade de Szeged, na Hungria, pela colaboração nos ensaios biológicos de multirresistência farmacológica presentes neste trabalho.

Endereço também os meus agradecimentos ao Prof. Carlos Cordeiro pelo seu contributo na realização dos espectros de FTICR-MS na Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa e ao Dr. João Ferreira e Dr. Lina Santos pelos espectros de ESI-MS na Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.

O meu agradecimento à Dr. Rita Ventura, do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, por proporcionar o acesso ao polarímetro para medição do poder rotatório.

Os meus agradecimentos a Professora Doutora Ana Paula Francisco, Professora Doutora Emília Valente e Professora Doutora Noélia Duarte pelos ensinamentos e motivação que transmitiram ao longo de todo o processo e pela preciosa ajuda na manutenção do equipamento de HPLC.

À Ângela pela sua disponibilidade e apoio prestado no trabalho desenvolvido no laboratório, assim como ao Ricardo Ferreira pelo seu apoio e disponibilidade tanto dentro como fora do laboratório, vendo com felicidade a obtenção dos seus graus de Doutor.

Aos meus colegas de laboratório e aos colegas de outros laboratórios, o meu muito obrigado por todo o apoio, amizade e boa disposição que se fez sentir ao longo do trabalho. Aos meus colegas de curso, principalmente ao Luís Sobral, Pedro Gonçalves e Cláudia Braga pela amizade e apoio prestados tanto dentro como fora do laboratório. Não esquecendo, o meu colega e amigo João, pelo companheirismo, espírito de interajuda, pelas discussões que fazem parte, pelas horas sem fim passadas no laboratório nos momentos mais angustiantes, em que os resultados teimavam em não surgir e nos bons momentos, pela partilha de aprendizagens e de gargalhadas pelas escolhas musicais.

Aos meus amigos pela compreensão e apoio mostrado aquando da minha indisponibilidade constante pela dedicação a este sonho.

Não poderia excluir dos meus agradecimentos os meus pais, Isabel e Manuel, pelos sacrifícios de uma vida inteira, apoio e paciência incondicionais que demonstraram para comigo e por me proporcionarem a educação que tenho. À minha querida Avó, ao meu irmão Nuno, à Joana e à minha futura sobrinha, que tanto me incentivaram nesta caminhada. Ao meu namorado, Luís, pela pessoa que é, pelo carinho e amizade demonstrados ao longo desta caminhada e principalmente pela sua incalculável ajuda e paciência.

O meu obrigado a todas as outras pessoas, do meu local de trabalho, amigos e família, que aqui não mencionei, mas não esquecidas, que direta ou indiretamente participaram nesta fase da minha vida.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
Abreviaturas e Símbolos.....	xi
Capítulo 1	i
Introdução.....	i
1. Introdução	3
1.1. A família Cucurbitaceae	3
1.2. O género <i>Momordica</i>	4
1.2.1.A espécie <i>Momordica balsamina</i>	6
1.3. Terpenos - considerações gerais.....	7
1.3.1.Triterpenos do tipo cucurbitano.....	10
1.3.2.Biossíntese de triterpenos do tipo cucurbitano.....	11
1.3.3.Revisão bibliográfica.....	13
1.4. O cancro e a multirresistência farmacológica	26
1.4.1.Mecanismo de MDR mediado pela P-gp.....	26
1.4.2.Estratégias para reversão da MDR	29
1.4.3.O papel dos produtos naturais: cucurbitacinas como moduladoras da P-gp	32
Capítulo 2	35
Apresentação e Discussão dos Resultado.....	35
2. Estudo fitoquímico de <i>Momordica balsamina</i>	37
2.1. Balsacurbitriol [7β -metoxicucurbita-5,25-dieno- $3\beta,23(R),24(R)$ -trio].....	38
2.2. Balsacurbepoxitol [$24S,25$ -Epoxi- 7β -metoxicucurbit-5-en- $3\beta,23(R)$ -diol]	41
2.3. Ácido balsacurbitóico [ácido $24,25,26,27$ - <i>tetranor</i> - 7β -metoxicucurbit-5-en- 3β -ol-23-oico].....	45
2.4. Balsacurbital [$24,25,26,27$ - <i>tetranor</i> - 7β -metoxicucurbit-5-en- 3β -ol-23-al].....	49
2.5. Balsacurbinol [25 -metoxicucurbita-5,23(<i>E</i>)-dien-7-on- 3β -ol]	52
2.6. Karavilagenina C [7β -metoxicucurbita-5,24-dieno- $3\beta,23(R)$ -diol].....	56
2.6.1.Oxidação da karavilagenina C: dicetona em C-3 e C-23.....	57
2.7. Karavilagenina A [$7\beta,25$ -dimetoxicucurbita-5,23(<i>E</i>)-dien- 3β -ol]	60

2.8. Karavilagenina B [7 β -metoxicucurbita-5,23(<i>E</i>)-dieno-3 β ,25-diol]	62
2.9. Kuguacina B [cucurbita-5,23(<i>E</i>)-dien-7-ona-3 β ,25-diol]	64
2.10. Kuguacina C [25,26,27- <i>trinor</i> -cucurbit-5-eno-7,23-dion-3 β -ol]	66
2.11. 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol	68
2.11.1. Oxidação do 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol: cetona em C-3	70
2.12. Reversão da multirresistência mediada pela glicoproteína-P	72
2.12.1. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	72
2.12.2. Modulação da multirresistência farmacológica em células de linfoma de rato e do adenocarcinoma do cólon humano.....	73
2.12.3. Relação estrutura-atividade.....	76
2.12.4. Combinação dos compostos com um fármaco antitumoral.....	82
Capítulo 3	85
Parte Experimental	85
3. Procedimento Experimental	87
3.1. Equipamentos e técnicas gerais.....	87
3.2. Estudo fitoquímico	88
3.2.1. Processo extrativo e Isolamento.....	88
3.2.2. Estudo da fração C.....	89
3.2.3. Estudo da fração E.....	94
3.3. Ensaio biológicos.....	113
3.3.1. Caracterização das linhas celulares e do meio de cultura.....	113
3.3.2. Ensaio de citotoxicidade.....	113
3.3.3. Teste de acumulação da Rodamina 123 (R123).....	114
3.3.4. Ensaio de combinação dos compostos com a doxorrubicina.	115
Capítulo 4	117
Conclusões.....	117
4. Conclusões	119
<i>Referências bibliográficas</i>	123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Novos triterpenos do tipo cucurbitano isolados a partir do género <i>Momordica</i>	13
Tabela 1.2 Outros compostos isolados a partir do género <i>Momordica</i>	24
Tabela 2.1 Compostos isolados a partir da <i>Momordica balsamina</i> e derivados.	37
Tabela 2.2 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.1	40
Tabela 2.3 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.2	44
Tabela 2.4 Estudo comparativo de alguns valores observados no espectro de ^{13}C -RMN, entre o composto 2.2 e um composto análogo (alisol B), descrito na literatura.	45
Tabela 2.5 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [C_6D_6 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.3	48
Tabela 2.6 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.4	51
Tabela 2.7 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.5	55
Tabela 2.8 Espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e DEPT [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 1.92	57
Tabela 2.9 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.11	59
Tabela 2.10 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.6	61
Tabela 2.11 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [MeOD_4 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.7	63

Tabela 2.12 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.8	65
Tabela 2.13 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.9	67
Tabela 2.14 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.10	69
Tabela 2.15 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.12	71
Tabela 2.16 Atividade citotóxica dos compostos (1.92 e 2.1 - 2.12) nas células de linfoma de rato L5178Y (células PAR), nas células T de linfoma de rato transfetadas com o gene humano ABCB1 (células MDR) e nas células do adenocarcinoma do colón humano quimiossensíveis (Colo 205) e multirresistentes (Colo 320).	73
Tabela 2.17 Efeito dos compostos 1.92 e 2.1 - 2.12 na reversão da MDR em células T de linfoma de rato transfetadas com o gene humano ABCB1 (L5178Y) e do adenocarcinoma do colón humano multirresistentes (Colo 320).	75
Tabela 2.18 Propriedades físico-químicas dos compostos 1.92 e 2.1 - 2.12 (PM - peso molecular; VM - volume molecular; log P - coeficiente de partilha octanol/água; TPSA - área da superfície polar topológica; n ^o de aceitadores e dadores de ligações de hidrogénio.....	82
Tabela 2.19 Efeito de alguns dos compostos estudados em combinação com a doxorrubicina nas células L5178Y.	83
Tabela 3.1 Cromatografia em coluna do extrato de AcOET.....	88
Tabela 3.2 Cromatografia em coluna da fração C.....	90
Tabela 3.3 Cromatografia em coluna da fração E.....	94
Tabela 3.4 Cromatografia em coluna da fração E7B4.....	99
Tabela 3.5 Cromatografia em coluna da fração E9.....	108

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.1 Classificação taxonómica da planta <i>M. balsamina</i> (Thakur et al., 2009). Legenda: A e B - Flores e frutos não maduros; C - frutos amadurecidos; D - flor feminina; E - flor masculina; F - sementes vermelhas.....	6
Esquema 1.2 Biossíntese de terpenos: formação das unidades IPP e DMAPP pela via do ácido mevalónico e pela via da deoxi-xilulose (Ajikumar et al, 2008)	9
Esquema 1.3 Biossíntese das principais classes de terpenos (Roberts, 2007).	10
Esquema 1.4 Biossíntese de cucurbitacinas (adaptado de Kushiro e Ebizuka, 2010; Shibuya et al, 2004)	12
Esquema 2.1 Reação de oxidação do composto 1.92	58
Esquema 2.2 Reação de oxidação do composto 2.10	70
Esquema 3.1 Resumo do processo de extração e fracionamento (frações iniciais) da <i>Momordica balsamina</i>	89
Esquema 3.2 Representação esquemática do estudo da Fração C.	91
Esquema 3.3 Representação esquemática do estudo da fração E7.	95
Esquema 3.4 Representação esquemática do estudo da fração E9.	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Exemplos de frutos de algumas espécies do género <i>Momordica</i> (Nagarani et al, 2014).....	5
Figura 1.2 Estrutura básica das cucurbitacinas.....	11
Figura 1.3 (A) Representação tridimensional da P-gp. Possíveis locais de ligação do inibidor da P-gp. (B) Estrutura da P-gp. Constituída por dois domínios transmembranares hidrofóbicos (TMD), cada um constituído por seis hélices transmembranares (TMH) e por uma região de ligação a nucleótidos (NBD). (Adaptado de Palmeira et al; 2012 e Silva et al, 2015).....	27
Figura 1.4 Mecanismo de ação da P-gp: a) modelo do "poro membranar"; b) modelo do "aspirador hidrofóbico"; c) modelo da "flipase". (adaptado de Casco e Soto-Vega, 2016).	28
Figura 1.5 Exemplos de modeladores da P-gp de primeira, segunda e terceira geração.....	31
Figura 2.1 Fragmentos estruturais (A , B e C) estabelecidos através dos espectros de ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC para o composto 2.1	39
Figura 2.2 Fragmento estrutural estabelecido através dos espectros de ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC para o composto 2.2	42
Figura 2.3 Principais correlações observadas nos espectros de COSY e de NOESY.	43
Figura 2.4 Fragmento estrutural estabelecido através dos espectros de ^1H - ^1H COSY e HMBC para o composto 2.3	47
Figura 2.5 Principais correlações observadas nos espectros de COSY e de NOESY.	47
Figura 2.6 Fragmento estrutural estabelecido através dos espectros de ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC para o composto 2.4	50
Figura 2.7 Principais correlações observadas nos espectros de COSY e de NOESY.	50
Figura 2.8 Fragmentos estruturais estabelecidos através dos espectros de ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC para o composto 2.5	53
Figura 2.9 Principais correlações observadas nos espectros de COSY e de NOESY.	54
Figura 2.10 Relação estrutura-atividade e respectivos valores de FAR para os compostos 1.92 , 2.1 - 2.9 e 2.11 , para as células L5178Y a 20 μM	76
Figura 2.11 Relação estrutura-atividade e respectivos valores de FAR para os compostos 1.92 , 2.1 - 2.9 e 2.11 , para as células L5178Y a 2 μM	77
Figura 2.12 Relação estrutura-atividade e respectivos valores de FAR para os compostos 1.92 , 2.1 - 2.9 e 2.11 , para as células Colo 320 a 20 μM	79
Figura 2.13 Relação estrutura-atividade e respectivos valores de FAR para os compostos 1.92 , 2.1 - 2.9 e 2.11 , para as células Colo 320 a 2 μM	80

Abreviaturas e Símbolos

$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica determinada a 20°C
[M] ⁺	Íon Molecular
² J _{C-H}	Acoplamento C-H a duas ligações
³ J _{C-H}	Acoplamento C-H a três ligações
¹³ C-NMR	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
¹ H-NMR	Ressonância magnética nuclear de próton
AcOEt	Acetato de etilo
Acetyl-CoA	Acetil-coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina-trifosfato
ABC	<u>A</u> TP <u>B</u> inding <u>C</u> assette
CC	Cromatografia em coluna
C ₆ D ₆	Benzeno deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
Cl	Índice combinatório
cf.	Confronte
IC ₅₀	Concentração de composto necessária para inibir em 50% a resposta máxima (<u>H</u> alf <u>M</u> aximal <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration)
IDH	Índice de deficiência de hidrogénios
COSY	Correlação próton-próton (<u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscopy)
<i>d</i>	Dupleto
dd	Duplo duplete
ddd	Duplo duplete de dupletos
DEPT	Espectro de ¹³ C com seleção de carbonos (<u>D</u> istortionless <u>E</u> nhancement by <u>P</u> olarization <u>T</u> ransfer)
DMAPP	Difosfato dimetilalilo
ESIMS	Espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> (<u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry - <u>E</u> lectro <u>S</u> pray <u>I</u> onization)
<i>et al.</i>	E outros autores
FAR	Razão de atividade de fluorescência
FPP	Farnesilpirofosfato
FTICR-MS	Espectrometria de massa de alta resolução (<u>F</u> ourier <u>T</u> ransform <u>I</u> on <u>C</u> yclotron <u>R</u> esonance <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry)
GPP	Geranilpirofosfato
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato

HMBC	Hetero-correlação ^1H - ^{13}C a duas e três ligações (<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation)
HMQC	Hetero-correlação com detecção de próton (<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>Q</u> uantum <u>C</u> orrelation)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
HR-ESITOFMS	Espectrometria de massa de alta resolução (<u>H</u> igh <u>R</u> esolution <u>E</u> lectrospray <u>I</u> onization <u>T</u> ime- <u>O</u> f- <u>F</u> light <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry)
IBX	ácido 2-iodoxibenzóico
IPP	Difosfato de isopentilo
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
log <i>P</i>	Coeficiente de partilha octanol/água
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa / carga
MDR	Multirresistência farmacológica (<u>M</u> ulti <u>D</u> rug <u>R</u> esistance)
Me	Metilo
MeOD ₄	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MTT	Sal de tetrazólio
MVA	Via do ácido mevalônico
NBD	região de ligação a nucleótidos (<u>N</u> ucleotide <u>B</u> inding <u>D</u> omain)
NOE	Efeito nuclear de <i>Overhauser</i>
NOESY	espectroscopia de efeito nuclear de <i>overhauser</i> (<u>N</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>E</u> ffect <u>S</u> pectroscopy)
P.f.	Ponto de fusão
P-gp	Glicoproteína-P
PM	Peso molecular
ppm	Partes por milhão
<i>R_t</i>	Tempo de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	Singuleto
SD	Desvio Padrão (<u>S</u> tandard <u>D</u> eviation)
<i>t</i>	Triplete
TLC	Cromatografia em camada fina (<u>T</u> hin <u>L</u> ayer <u>C</u> hromatography)
TMH	Hélices transmembranares

TMD	Domínio transmembranar hidrofóbico
TPSA	Área da superfície polar topológica
UV	Ultravioleta
VM	Volume molecular
WHO	Organização mundial de saúde (<i>World Health Organization</i>)
δ_C	Deslocamento químico no espectro de ^{13}C -RMN
δ_H	Deslocamento químico no espectro de ^1H -RMN

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

Os produtos naturais apresentam uma grande importância no desenvolvimento de novos fármacos, principalmente devido à sua diversidade estrutural. Os compostos obtidos através de produtos naturais diferem dos sintéticos na sua multifuncionalidade, possuindo uma ampla diversidade de propriedades estruturais e físico-químicas (Chen *et al*, 2015a).

O contributo dos produtos naturais na descoberta de fármacos antitumorais não é recente, dado que alguns dos fármacos utilizados na quimioterapia (como exemplo, paclitaxel e vincristina) tiveram a sua origem a partir de metabolitos secundários de plantas. Um elemento demonstrativo desta afirmação reside no facto de entre o período de 1981 a 2014, dos cerca de 136 fármacos que foram aprovados como agentes antitumorais, 113 (83%) eram produtos naturais, seus derivados ou obtidos com base em estruturas de produtos naturais conhecidas (Newman e Cragg, 2016). Apesar destes avanços, o sucesso da quimioterapia pode ficar comprometido devido à multirresistência farmacológica, pelo que se impõe a pesquisa de novas estratégias terapêuticas (Cragg e Newman, 2013; Yuan *et al*, 2017).

No presente capítulo pretende-se abordar algumas considerações gerais sobre a família Cucurbitaceae com enfoque no género *Momordica* e na espécie *balsamina* sobre a qual recai o estudo fitoquímico desenvolvido neste trabalho, fazendo uma revisão bibliográfica sobre os triterpenos do tipo cucurbitano isolados a partir desta planta nos últimos sete anos. Seguidamente, apresenta-se a atual necessidade de encontrar uma resposta para o desenvolvimento de novos compostos e estratégias para reversão da multirresistência a fármacos (em inglês MDR - *MultiDrug Resistance*) mediada pela glicoproteína-P (P-gp).

1.1. A família Cucurbitaceae

A família Cucurbitaceae, constituída por cerca de 130 géneros e 800 espécies, apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo principalmente nos trópicos e subtropicais. As plantas da família Cucurbitaceae são rastejantes, constituídas por um extenso sistema radicular que se ramifica pela superfície do solo, ou trepadeiras; anuais ou perenes; monóicas ou dióicas. Os géneros mais importantes pertencentes a esta família incluem: *Benincasa*, *Bryonopsis*, *Cucumis*, *Citrullus*, *Cucurbita*, *Corallocarpus*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Momordica* e *Trichosanthes*, (Ajuru e Nmom, 2017; Dhiman *et al*, 2012; Shah *et al*, 2014).

As plantas da família Cucurbitaceae são cultivadas em todo o mundo, em termos de produção mundial, a mais popular é a melancia - *Citrullus lanatus* (Wehner e Maynard, 2001). O interesse económico de algumas destas plantas deve-se em grande parte ao consumo humano, essencialmente pelos seus frutos e sementes comestíveis com valor nutricional (exemplo: abóbora, melão, melancia e pepino). Contudo, podem ter outros fins, tome-se por exemplo, a *Lagenaria vulgaris* conhecida vulgarmente por cabaça; os seus frutos são utilizados para fazer cabaças, utensílios e na construção de instrumentos musicais. Para além disso, são lhe reconhecidas certas propriedades medicinais, nomeadamente, purgativas, anti-helmínticas e eméticas resultantes do teor em cucurbitacinas, os principais metabolitos secundários presentes nestas plantas (Ajuru e Nmom, 2017; Dhiman *et al*, 2012).

1.2. O género *Momordica*

O género *Momordica* pertence à família Cucurbitaceae e compreende um total de 45 espécies (Figura 1.1), localizadas preferencialmente no continente asiático, na Austrália e com três espécies presentes no Paquistão. As plantas pertencentes a este género são conhecidas pelo seu sabor amargo (associado à presença de cucurbitacinas) e podem apresentar as seguintes características morfológicas: trepadeiras anuais ou perenes; monóicas (*M. charantia*, *M. balsamina*) ou dióicas (exemplo, *M. dioica*); as folhas lobadas, palmadas ou denticuladas; a cor predominante das flores é o amarelo e raramente o branco; flores femininas e masculinas unissexuadas e solitárias; frutos cilíndricos, bagas, indeiscentes ou deiscentes; sementes túrgidas ou achatadas, lisas ou esculpidas (Dandawate *et al*, 2016; Franchi e Pacini, 2017; Nagarani *et al*, 2014; Shah *et al*, 2014).

Estas plantas são utilizadas como alimentos, mas o seu interesse vai para além disso, nomeadamente, pelas suas propriedades terapêuticas, sendo utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças. O conhecimento indígena oriundo das práticas tribais, aumentou o interesse no estudo fitoquímico destas plantas. Com o conhecimento dos principais compostos bioativos presentes nestas plantas (ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, fitosteróis e os triterpenos do tipo cucurbitano) e reconhecidos os seus potenciais efeitos na promoção da saúde, estes podem ser utilizados como suplementos nutricionais (Nagarani *et al.*, 2014).

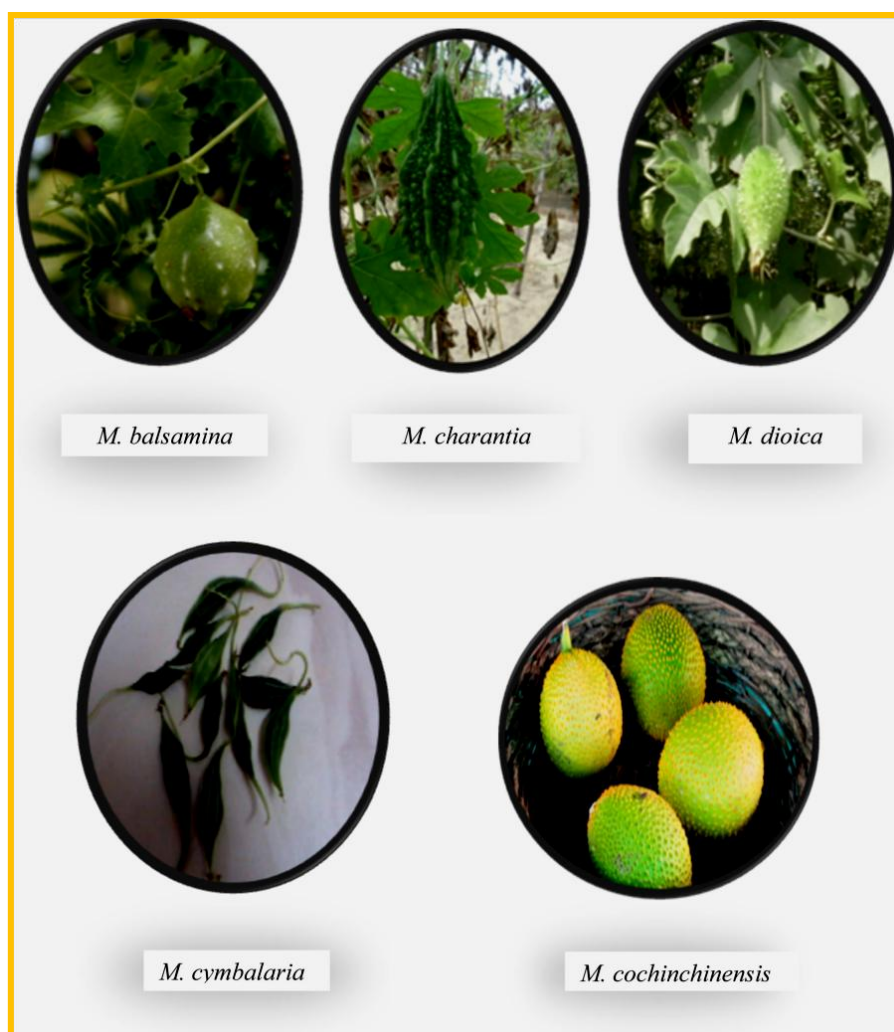
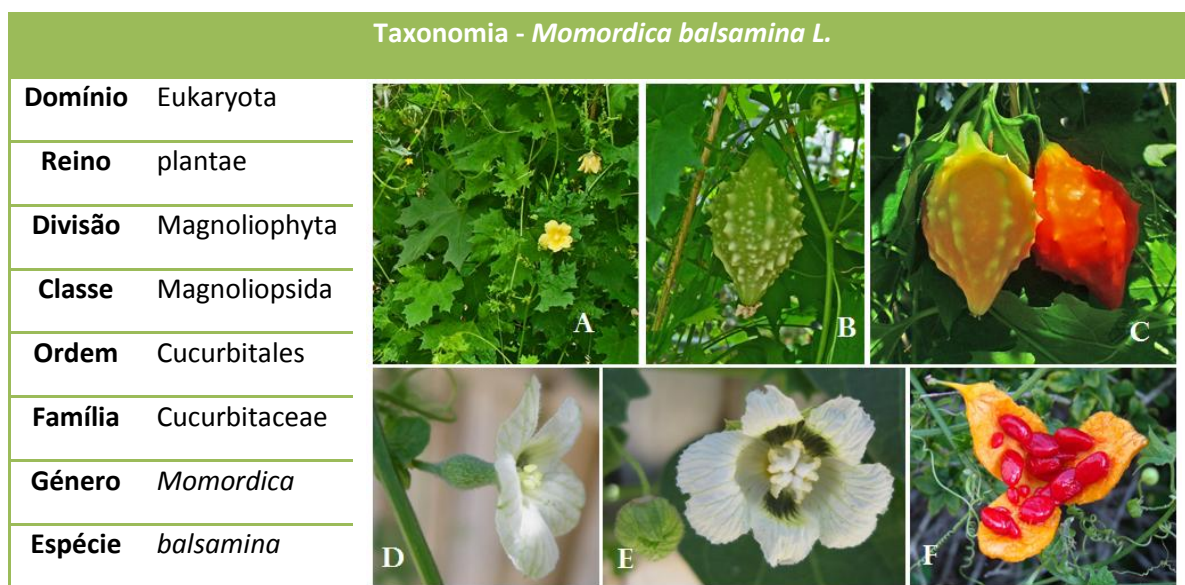


Figura 1.1 Exemplos de frutos de algumas espécies do género *Momordica* (Nagarani *et al*, 2014).

Algumas das espécies mais estudadas são a *Momordica charantia* e a *Momordica balsamina*. Relativamente aos seus usos tradicionais a *M. charantia* é utilizada no tratamento da malária nas regiões a sudoeste da Nigéria. Por sua vez, na medicina tradicional turca, os frutos verdes são utilizados no tratamento da diabetes e os frutos maduros destinam-se ao tratamento de úlceras pépticas e na rápida cicatrização de feridas (Ajuru e Nmom, 2017). Com base na aplicabilidade deste vegetal na medicina tradicional, têm sido desenvolvidos estudos com o objetivo de conhecer as propriedades medicinais dos seus constituintes ativos, *in vitro* e *in vivo*, tendo sido observadas as seguintes atividades: antidiabética, anticancerígena, hipotensora, anti-obesidade, antimicrobiana, antidislipidémica, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, neuroprotetora, anti-helmíntica e hepatoprotetora (Dandawate *et al*, 2016; Wang *et al*, 2017).

1.2.1. A espécie *Momordica balsamina*

A espécie *Momordica balsamina* (Esquema 1.1), também designada por abóbora Africana e maçã balsâmica é originária da África tropical e comum na Ásia (Índia), Arábia e Austrália. Na Europa, foi introduzida em 1800 (Shah *et al*, 2014; Thakur *et al*, 2009). Morfologicamente, apresenta-se como uma planta trepadeira monóica anual, de flores brancas e frutos de coloração laranja-avermelhado. As flores e os frutos ocorrem principalmente entre os meses de Outubro a Maio (Shah *et al*, 2014; Thakur *et al*, 2009). As folhas e os frutos são usados como alimentos nas tribos da África do Sul e na Ásia (Flyman e Afolayan, 2007).



Esquema 1.1 Classificação taxonômica da planta *M. balsamina* (Thakur *et al.*, 2009). Legenda: A e B - Flores e frutos não maduros; C - frutos amadurecidos; D - flor feminina; E - flor masculina; F - sementes vermelhas¹.

Na medicina tradicional, os extratos das várias partes da planta têm várias aplicações terapêuticas, nomeadamente contra a febre, anti-emético, como agente purgativo, analgésico, vermífico, tratamento de feridas e antisséptico, em doenças de pele como a sarna, relaxante em doenças mentais, alívio de dores menstruais, inseticida, aplicação em úlceras malignas, queimaduras e hemorroidas e infeções urinárias. Na medicina tradicional africana os extratos das folhas e frutos são utilizados no tratamento da malária, devido à sua atividade antiplasmódica (Thakur *et al*, 2009).

¹ Adaptado do site (5-10-2017):<http://tropical.theferns.info/image.php?id=Momordica+balsamina>

As principais propriedades medicinais descritas na literatura para os extratos e compostos isolados a partir de *Momordica balsamina*, incidem no seu potencial antidiabético, anti-HIV, anti-inflamatório, antioxidante, antidiarreico, citotóxico, hepatoprotetor, antiparasitário e, ainda, nos efeitos a nível cardiovascular. (Bot *et al*, 2007; Shah *et al*, 2014; Thakur *et al*, 2009; Thakur *et al*, 2011).

Esta planta tem sido alvo de estudo nos últimos anos por este grupo de investigação, que demonstrou atividade dos triterpenos isolados como agentes antimaláricos, como moduladores da P-gp e inibidores dos sistemas de efluxo no *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, (Ramalheite *et al*, 2010; Ramalheite *et al*, 2009b; Ramalheite *et al*, 2016; Ramalheite *et al*, 2011b; Rocha *et al*, 2015).

Relativamente ao seu valor nutricional, a *M. balsamina* tem sido analisada quanto à sua composição e comparada com outros vegetais, mostrando ser uma importante aposta nos países subdesenvolvidos por se traduzir numa fonte economicamente atrativa e enriquecida em micronutrientes essenciais, contendo na sua composição 17 aminoácidos. Neste sentido, o estudo das suas folhas demonstrou a presença de uma maior quantidade de proteína e gordura quando comparado com outros vegetais como o repolho, alface e espinafre. Aliado a estes dados, o seu alto teor em potássio pode ter interesse no controlo da hipertensão e outros problemas cardiovasculares, bem como, as suas elevadas concentrações de zinco, ferro e manganês podem ter interesse no reajuste das deficiências nestes micronutrientes (Flyman e Afolayan, 2007; Thakur *et al*, 2009; Thakur *et al*, 2011).

1.3. Terpenos - considerações gerais

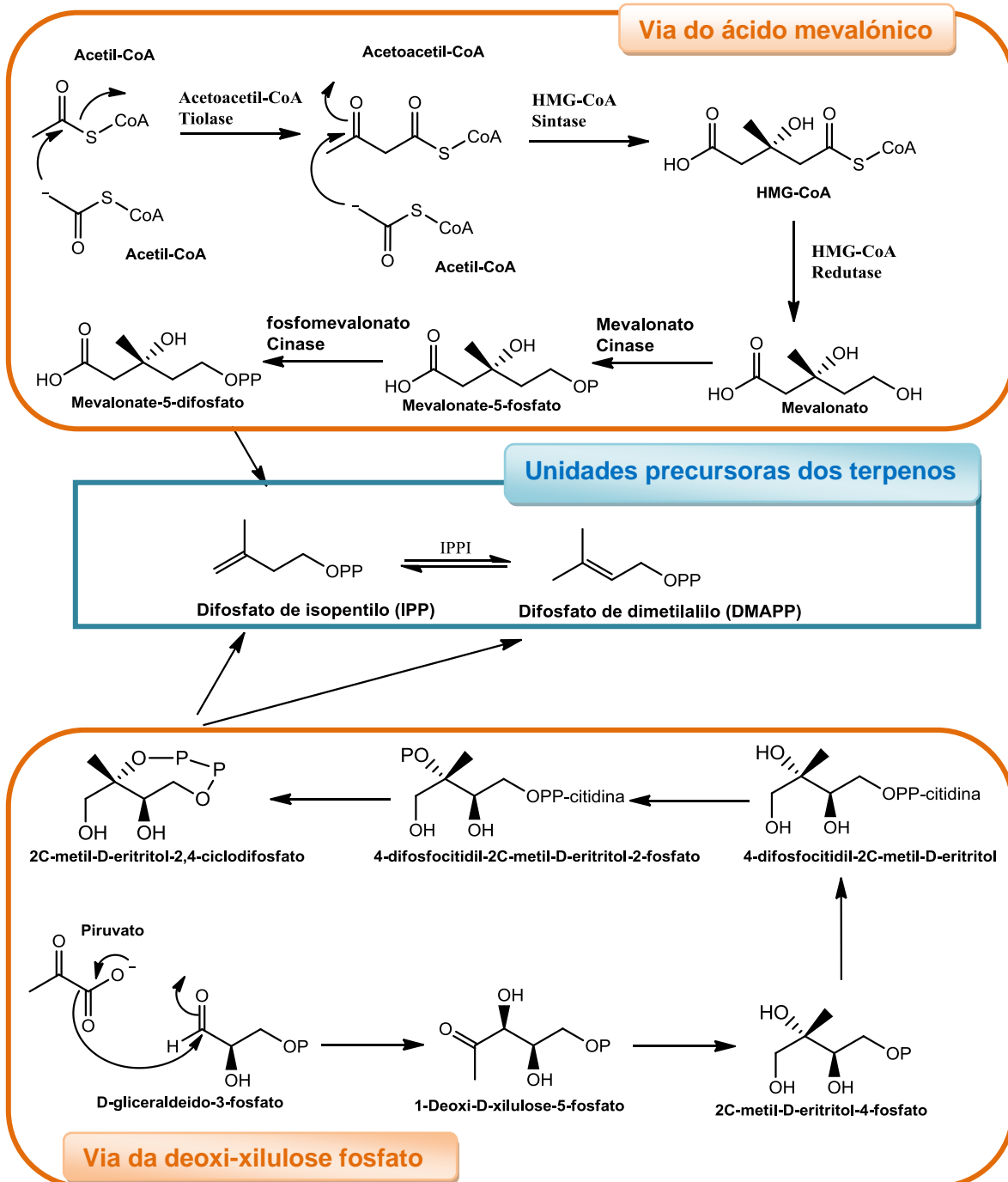
As plantas produzem metabolitos primários e secundários, não estando estes últimos, ao contrário dos primeiros, envolvidos diretamente em funções de crescimento e desenvolvimento, mas sim atuando como mecanismo de defesa contra fatores externos ou na atração de polinizadores. Os terpenos são um grupo de metabolitos secundários com interesse em áreas como a indústria dos aromas, fragrâncias, produtos farmacêuticos, compostos industriais e inseticidas. Uma das principais características dos produtos naturais consiste na sua variedade estrutural. A classe dos terpenos ou terpenoides conta com cerca de 40 mil compostos (Roberts, 2007; Singh e Sharma, 2015; Tholl, 2015).

De acordo com as unidades isoprénicas presentes, os terpenos podem ser classificados como hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅),

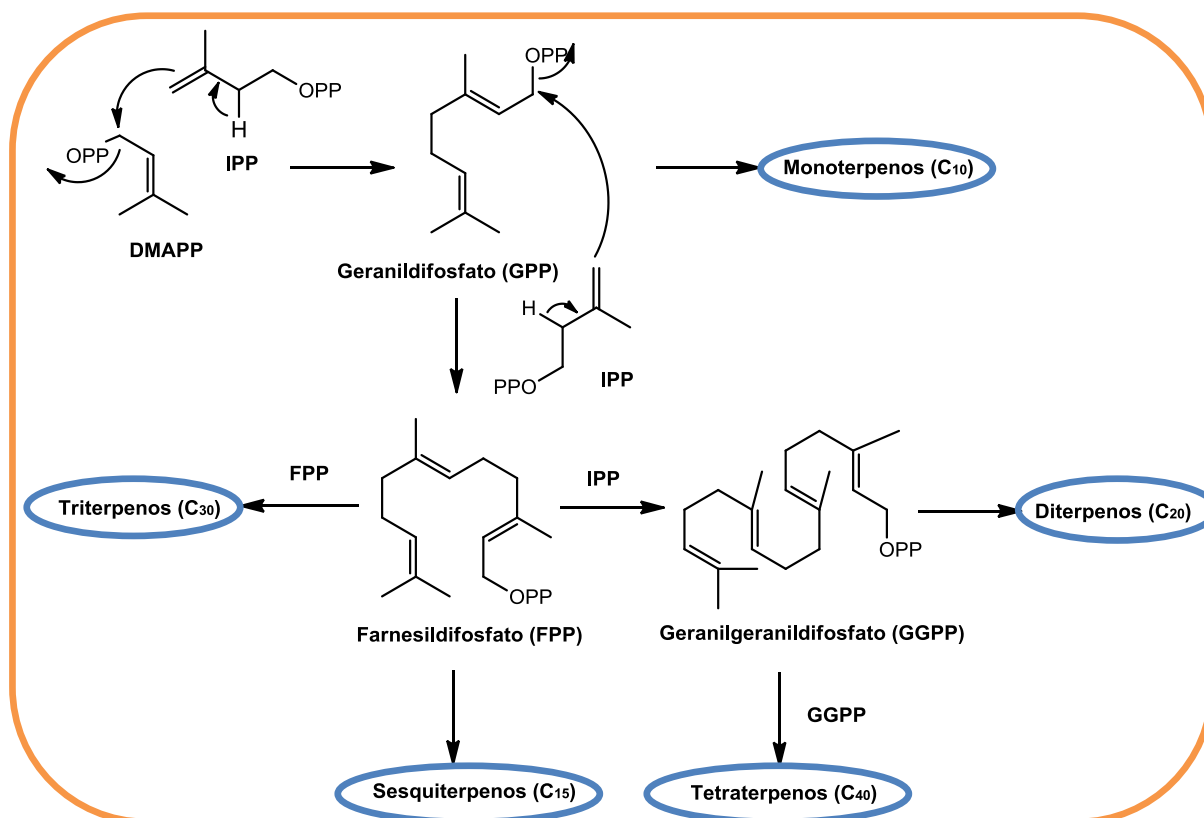
diterpenos (C_{20}), sesteterpenos (C_{25}) e triterpenos (C_{30}) (Roberts, 2007; Singh e Sharma, 2015; Tholl, 2015).

Os terpenos têm como precursores duas unidades constituídas por cinco carbonos, o difosfato de isopentilo (IPP) e o seu isómero alílico, o difosfato de dimetilalilo (DMAPP) provenientes de duas vias biossintéticas independentes nas plantas, a via do ácido mevalónico (MVA) e a via da deoxi-xilulose fosfato (Esquema 1.2). Por sua vez, a condensação destas duas unidades leva à formação de precursores intermediários para a síntese de uma grande variedade de terpenos. A via do ácido mevalónico ocorre preferencialmente na biossíntese de sesquiterpenos, esteroides e triterpenos, enquanto que, a via da deoxi-xilulose fosfato intervém predominantemente na biossíntese de hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos e carotenos (Bohlmann *et al*, 1998; Tholl, 2015; Wang *et al*, 2005).

Seguidamente ocorre a principal etapa da biossíntese de terpenos, com a fusão das unidades IPP e DMAPP segundo reações típicas de "cabeça-cauda" catalisadas pelas preniltransferases através de mecanismos de condensação e eliminação para formar o C_{10} -geranilpirofosfato (GPP) precursor dos monoterpenos, o C_{15} -farnesilpirofosfato (FPP) precursor dos sesquiterpenos e o C_{20} -geranilgeranilpirofosfato (GGPP) precursor dos diterpenos (Esquema 1.3). Os triterpenos são obtidos a partir da formação do esqualeno, que por sua vez, resulta da condensação "cauda-cauda" de duas unidades FPP (Bohlmann *et al*, 1998; Tholl, 2015; G. Wang *et al*, 2005).



Esquema 1.2 Biossíntese de terpenos: formação das unidades IPP e DMAPP pela via do ácido mevalônico e pela via da deoxi-xilulose (Ajikumar *et al*, 2008)



Esquema 1.3 Biossíntese das principais classes de terpenos (Roberts, 2007).

1.3.1. Triterpenos do tipo cucurbitano

Os triterpenos do tipo cucurbitano ou cucurbitacinas estão presentes em plantas da família Cucurbitaceae, mas também nas famílias Scrophulariaceae, Cruciferae, Datisceae, Primulaceae, Rubiaceae, entre outras. A concentração em cucurbitacinas varia consoante as diferentes partes da planta, sendo que a maior concentração se verifica nos frutos quando amadurecidos, sendo conhecidos pelo seu sabor amargo (Kaushik *et al*, 2015; Kushiro e Ebizuka, 2010).

As cucurbitacinas apresentam um esqueleto tetracíclico comum, 19-(10→9β)-abeo-10α-lanost-5-eno, também designado por 9β-metil-19-*nor*-lanost-5-eno (Figura 1.2). Na sua grande maioria encontram-se sob a forma cristalina, sendo geralmente solúveis em clorofórmio, benzeno, acetato de etilo e metanol. A estrutura destes compostos apresenta as seguintes características: variedade de grupos oxigenados (por exemplo, grupos cetona, aldeído, hidroxilo) e insaturações em diferentes posições; grupo dimetil em C-4, presença da ligação dupla em C-5 e localização do grupo metilo em C-9 em vez de C-10, algumas das características que os distinguem dos esteroides e, podem ainda, apresentar-se na forma livre ou na forma glicosilada. A variedade estrutural destes compostos, sobretudo ao nível dos grupos funcionais

presentes na cadeia lateral, contribui para as diferentes atividades biológicas observadas (Kaushik *et al*, 2015; Kushiro e Ebizuka, 2010). As cucurbitacinas têm sido associadas a várias propriedades biológicas, entre as quais se incluem, as atividades anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, anti-aterosclerótica, antidiabética, antipirética, hepatoprotetora, cardiovascular e antiparasitária. A toxicidade destes compostos é um dos problemas que pode inviabilizar a sua utilização dada a relativa proximidade entre a dose eficaz e a dose tóxica. Contudo, esta não deve servir de impedimento para o desenvolvimento de potenciais agentes terapêuticos, mas pelo contrário, servir de ponto de partida para o estabelecimento de relações estrutura-atividade de modo a diminuir a atividade tóxica, mantendo a eficácia (Chen *et al*, 2005; X. Chen *et al*, 2012; Haque *et al*, 2011; Kaushik *et al*, 2015).

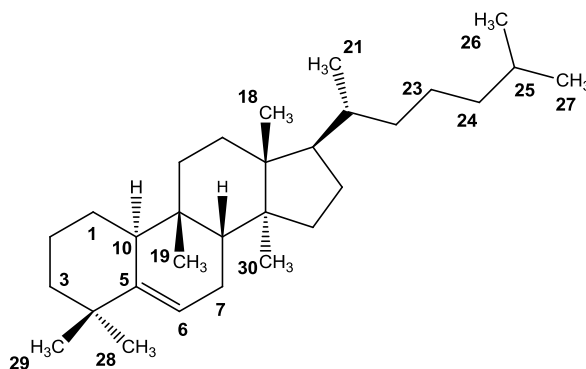
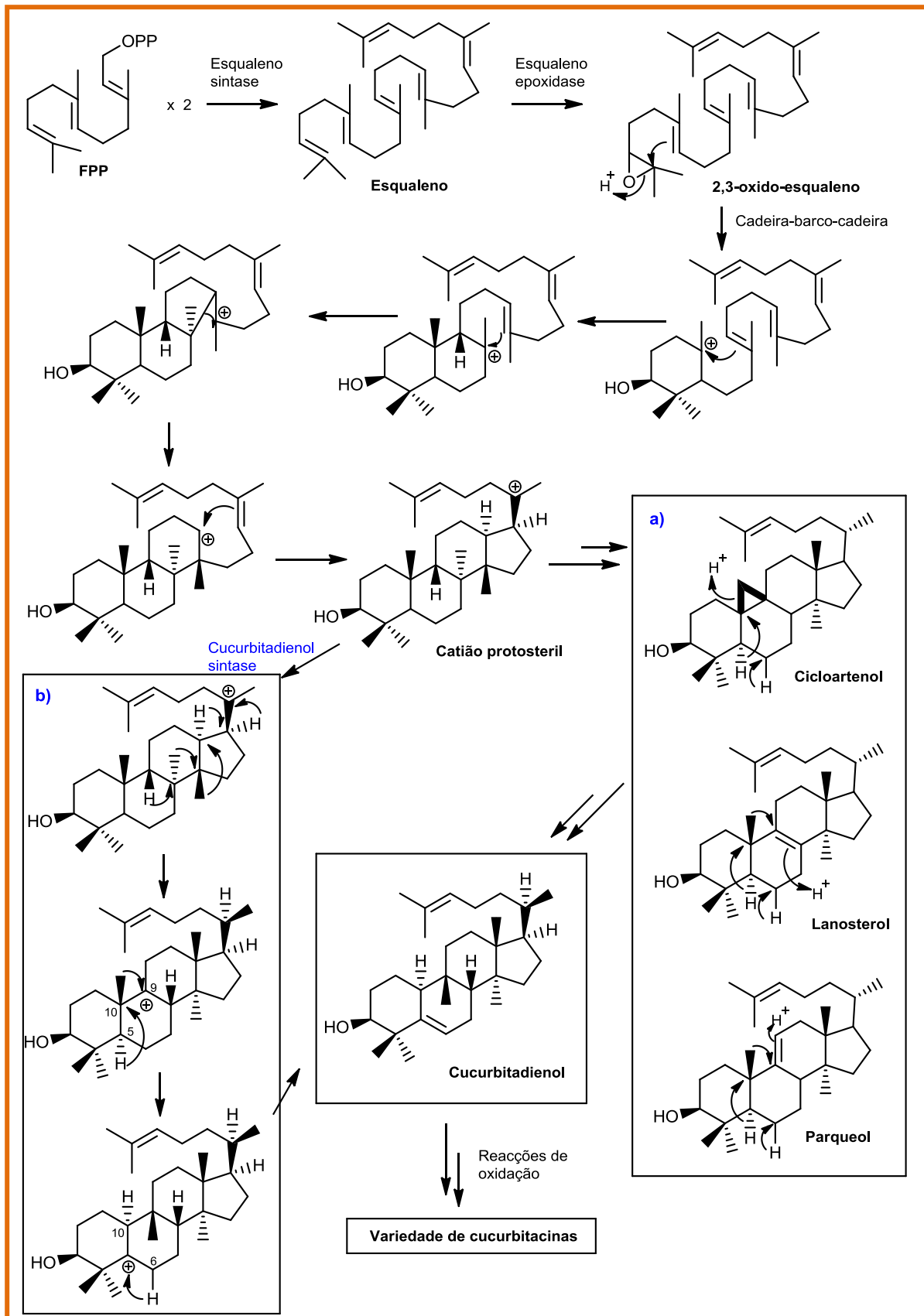


Figura 1.2 Estrutura básica das cucurbitacinas

1.3.2. Biossíntese de triterpenos do tipo cucurbitano

A biossíntese de cucurbitacinas (Esquema 1.4) ocorre nas células das plantas, ao nível do citosol e do retículo endoplasmático, através da via do mevalonato. Após a produção da unidade FPP, ocorre a condensação de duas moléculas, unidas segundo um mecanismo cauda-cauda, resultando na formação do esqualeno através da redução NADPH dependente (Kushiro e Ebizuka, 2010).

A maioria dos triterpenos presentes na natureza são triterpenos cíclicos com 1 a 5 anéis, constituídos por seis unidades de isopreno. A ciclização do esqualeno em triterpenos pentacíclicos pode ocorrer diretamente nas bactérias, no entanto, nos animais, plantas e fungos o processo ciclização do esqualeno engloba mais etapas. Inicialmente, o esqualeno é convertido em oxido-esqualeno, no qual ocorre uma epoxidação estereoespecífica (na posição 2), com formação do (3S)-2,3-oxido-esqualeno, a partir do qual todos os triterpenos cíclicos resultantes possuem um oxigénio na posição C-3 (Kushiro e Ebizuka, 2010).



Esquema 1.4 Biossíntese de cucurbitacinas (adaptado de Kushiro e Ebizuka, 2010; Shibuya *et al*, 2004)

O processo de ciclização é catalisado por enzimas designadas por ciclases oxido-esqualeno e envolve vários passos, entre eles, a protonação do 2,3-oxido-esqualeno, mudanças de hidretos e de grupos metilo e desprotonação (Zheng *et al*, 2015). A conformação inicial do 2,3-oxido-esqualeno determina a via de ciclização seguida. Deste modo, a conformação cadeira-barco-cadeira dá origem ao catião protosterilo que leva à formação do precursor cucurbitadienol. Por sua vez, a conformação cadeira-cadeira-cadeira origina o catião damarenilo (Ghosh, 2016).

Relativamente à formação do cucurbitadienol, foram propostas duas vias distintas: a) via do cicloartenol, lanosterol e parqueol; b) via cucurbitadienol sintase. A primeira deve-se à semelhança observada entre o esqueleto tetracíclico cucurbitano e os esteroides. A segunda resulta da evidência em diversos estudos, da presença de uma enzima designada por cucurbitadienol sintase cujo mecanismo de ciclização é semelhante ao observado para a cicloartenol sintase (ambas levam à formação do carbocátion em C-9) (Kushiro e Ebizuka, 2010; Shibuya *et al*, 2004).

1.3.3. Revisão bibliográfica

O género *Momordica* tem vindo a ser alvo de estudo por diversos grupos de investigação, pelo interesse nas suas propriedades acima referidas. Neste sentido, com o presente trabalho, pretendeu-se fazer uma revisão da literatura dos novos triterpenos do tipo cucurbitano, isolados a partir do género *Momordica*, e respetivas atividades biológicas, no período compreendido entre 2011 a 2017 (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Novos triterpenos do tipo cucurbitano isolados a partir do género *Momordica*.

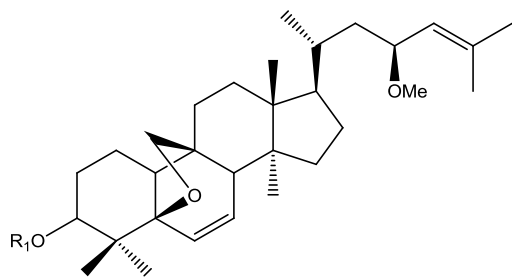
Espécie	Parte analisada	Composto (nº)	Atividade	Referência
<i>M. charantia</i>	Frutos imaturos secos	1.1 - 1.2	Atividade inibitória da α -glucosidase	(Yue <i>et al</i> , 2017)
<i>M. charantia</i>	Frutos	1.3 - 1.8	Inibição da proliferação de células do músculo liso vascular	(Tuan <i>et al.</i> , 2017)
<i>M. charantia</i>	Frutos	1.9 - 1.10	Atividade anticancerígena contra a linha celular do adenocarcinoma da mama humano MCF-7 (1.9)	(Cao <i>et al</i> , 2011)
<i>M. charantia</i>	Frutos frescos	1.11 - 1.14		(Chen <i>et al</i> , 2014)

Tabela 1.1 (Continuação).

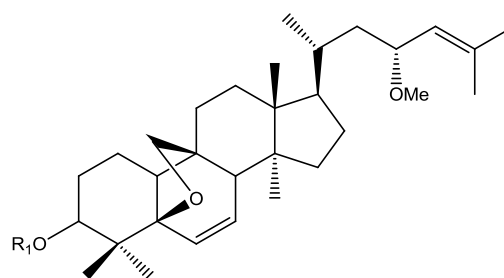
Espécie	Parte analisada	Composto (nº)	Atividade	Referência
<i>M. charantia</i>	Frutos	1.15 - 1.19	Propriedades antidiabéticas (1.15)	(Chen <i>et al</i> , 2015b)
<i>M. charantia</i>	Videiras e folhas	1.20 - 1.25		(Cheng <i>et al</i> , 2013)
<i>M. charantia</i>	Frutos	1.26 - 1.29	Atividade antiproliferativa (1.26)	(Hsiao <i>et al</i> , 2013)
<i>M. charantia</i>	Frutos liofilizados	1.30 - 1.34	Atividade agonista/antagonista parcial para os recetores de estrogénio	(Hsu <i>et al</i> , 2011)
<i>M. charantia</i>	Partes aéreas	1.35 - 1.40		(Jiang <i>et al</i> , 2016)
<i>M. charantia</i>	Caules	1.41		(Li <i>et al</i> , 2016)
<i>M. charantia</i>	Frutos verdes	1.42 - 1.43		(Li <i>et al</i> , 2015)
<i>M. charantia</i>	Polpa da fruta	1.44 - 1.46	Atividade citotóxica contra as células do hepatocarcinoma humano SK-Hep-1 (1.44)	(Liao <i>et al</i> , 2012)
<i>M. charantia</i>	Polpa da fruta	1.47 - 1.48	Ligeira atividade citotóxica contra SK-Hep-1	(Liao <i>et al</i> , 2013a)
<i>M. charantia</i>	Frutos frescos	1.49 - 1.53	Atividade anti-inflamatória (1.52 e 1.53)	(Liaw <i>et al</i> , 2015)
<i>M. charantia</i>	Caules e Frutos	1.54 - 1.55	Atividade anti-oxidante	(Lin <i>et al</i> , 2011)
<i>M. charantia</i>	Sementes	1.56 - 1.57		(Ma <i>et al</i> , 2014)
<i>M. charantia</i>	Frutos	1.58 - 1.59	Atividade citotóxica	(Wang <i>et al</i> , 2012)
<i>M. charantia</i>	Folhas	1.60 - 1.65	Atividade citotóxica e inibição do desenvolvimento de cancro	(Zhang <i>et al</i> , 2012)
<i>M. charantia</i>	Folhas	1.66 - 1.67		(Zhang <i>et al</i> , 2014b)
<i>M. charantia</i>	Frutos	1.68 - 1.75	Efeito anti-hiperglicémico e atividade citotóxica	(Zhang <i>et al</i> , 2014a)
<i>M. charantia</i>	Caules e folhas	1.76 - 1.81		(Zhao <i>et al</i> , 2014)
<i>M. charantia</i>	Frutos	1.82 - 1.83		(Liao <i>et al</i> , 2013b)
<i>M. charantia</i>	Polpa da fruta	1.84 - 1.85		(Chen <i>et al</i> , 2017a)
<i>M. Charantia</i>	Frutos	1.86 - 1.87		(Chen <i>et al</i> , 2017b)

Tabela 1.1 (Continuação).

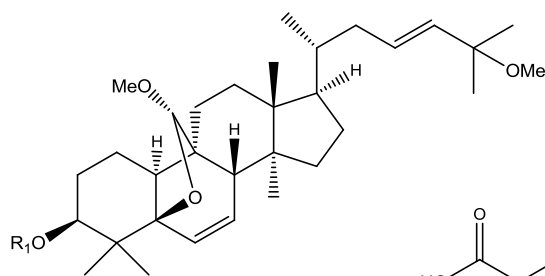
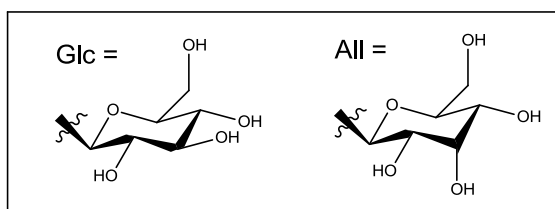
Espécie	Parte analisada	Composto (nº)	Atividade	Referência
<i>M. balsamina</i>	Partes aéreas	1.88	Ativo contra a P-gp	(Ramalhete <i>et al</i> , 2011a; Ramalhete <i>et al</i> , 2016)



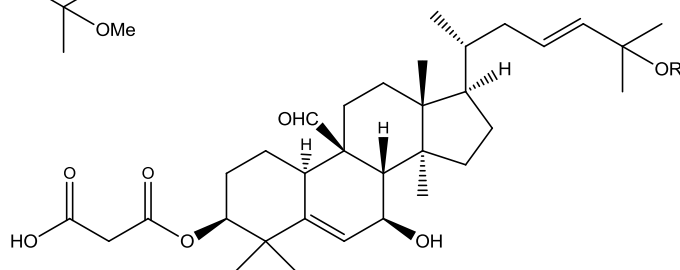
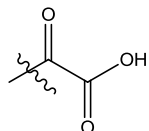
1.1 R₁ = Glc



1.2 R₁ = All

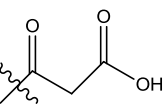


1.3 R₁ =

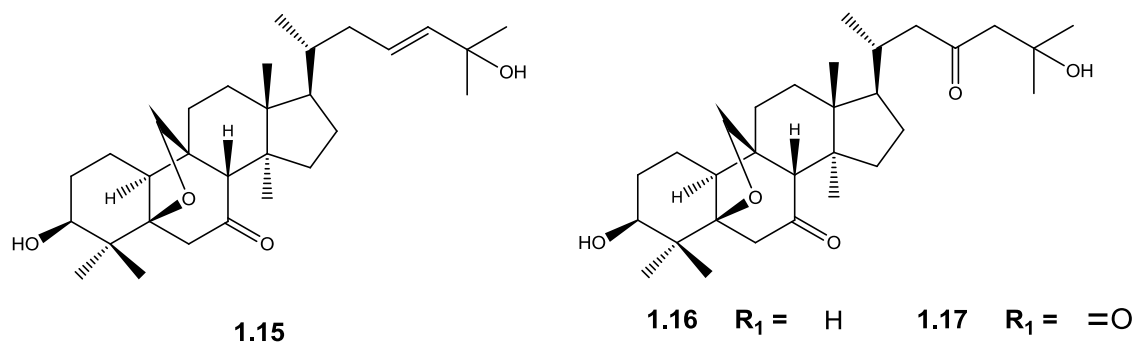
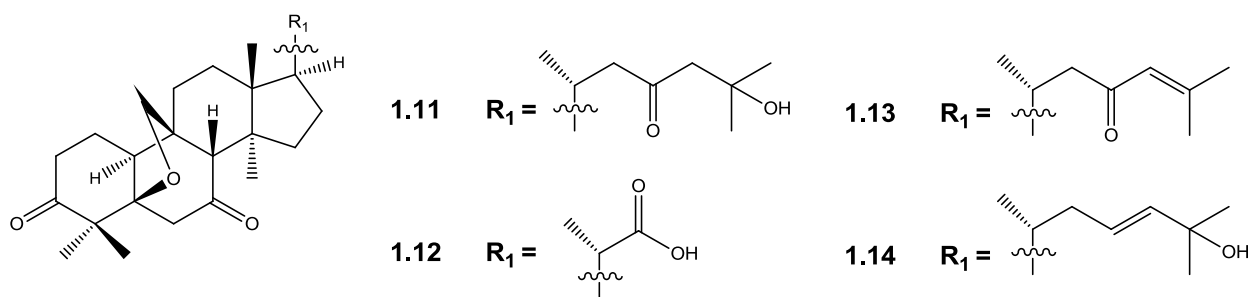
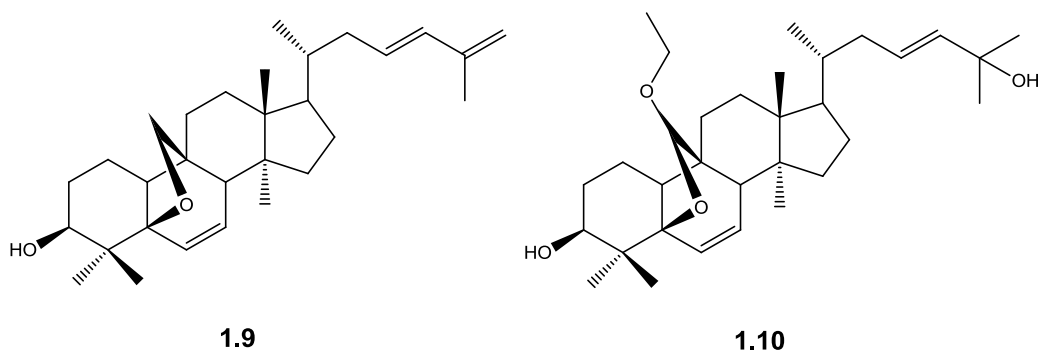
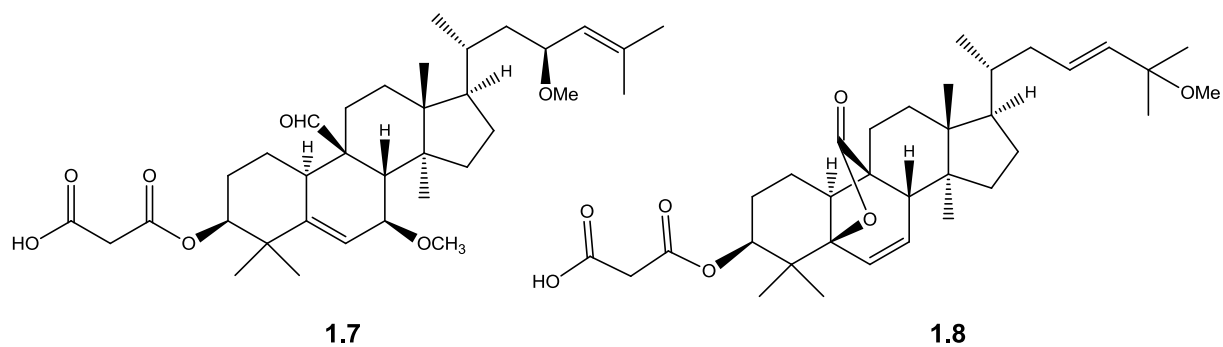


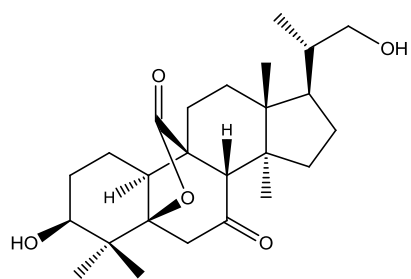
1.5 R₁ = OH

1.4 R₁ =

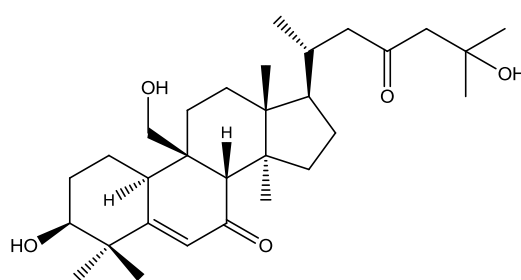


1.6 R₁ = OCH₃

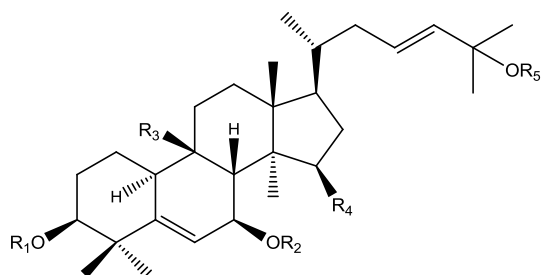




1.18

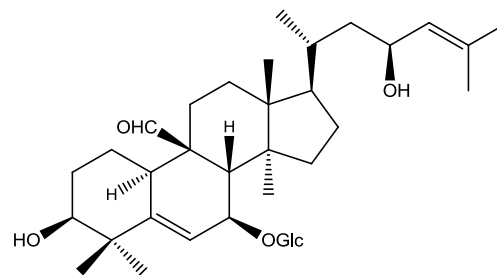


1.19

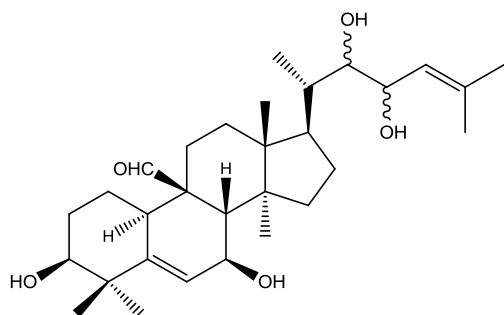


R₁ **R₂** **R₃** **R₄** **R₅**

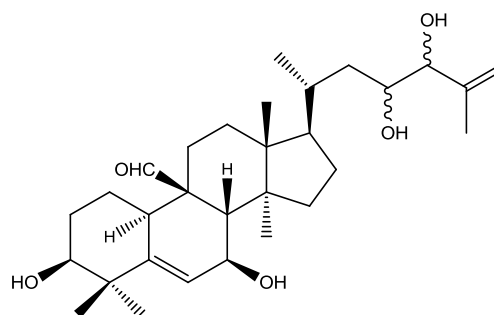
1.20	H	H	CHO	OH	H
1.21	H	Glc	CH ₂ OH	H	H
1.22	All	H	CHO	H	Me



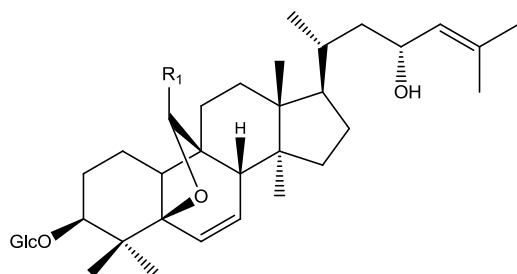
1.23



1.24

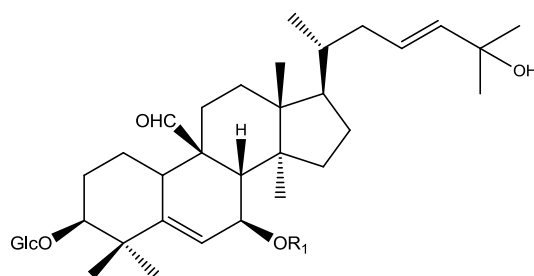


1.25



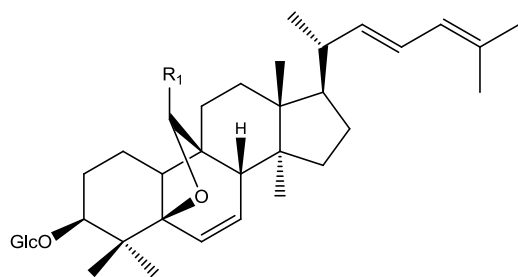
1.26 R₁ = H

1.27 R₁ = OCH₃



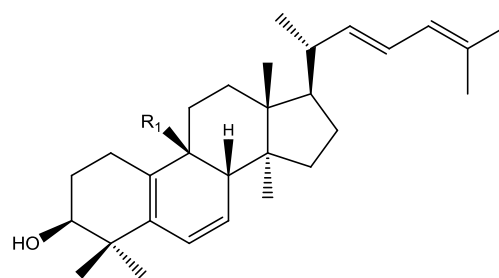
1.28 R₁ = H

1.29 R₁ = Me



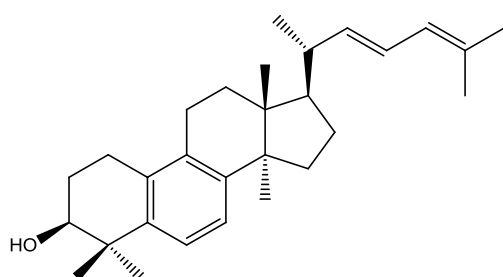
1.30 $R_1 = =O$

1.31 $R_1 = OH$

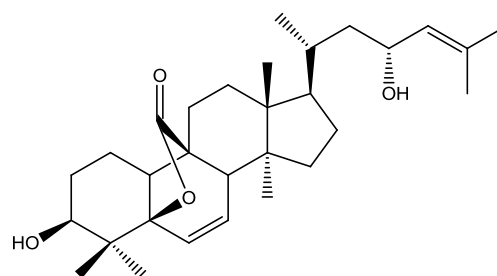


1.32 $R_1 = CHO$

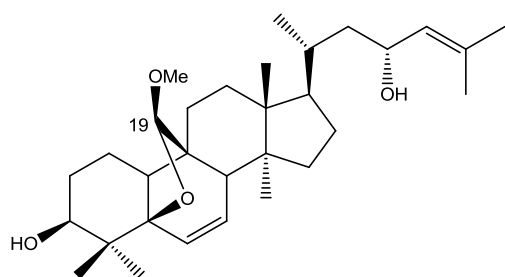
1.33 $R_1 = C(OCH_3)_2$



1.34

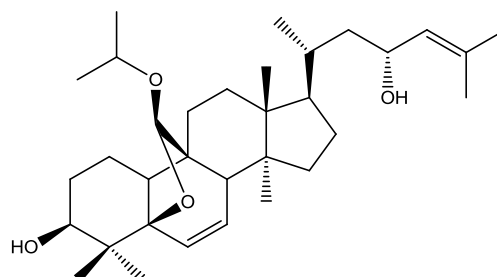


1.35

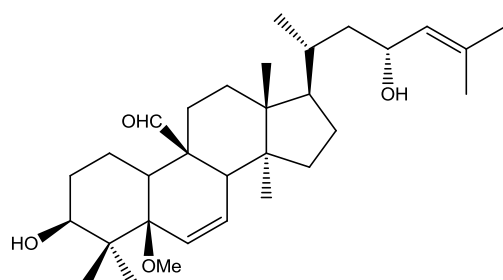


1.36 19 *R*

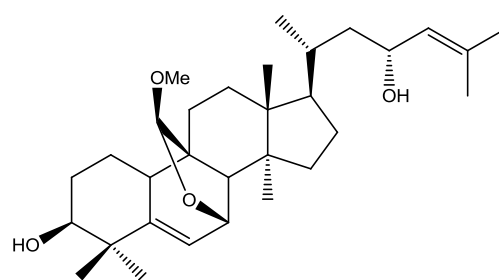
1.37 19 *S*



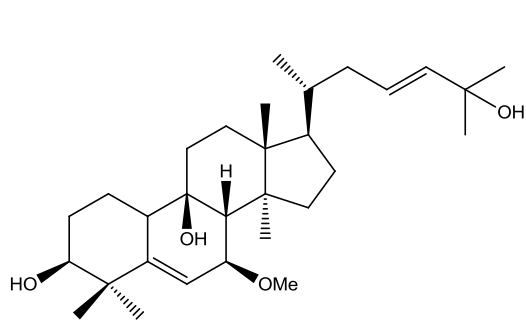
1.38



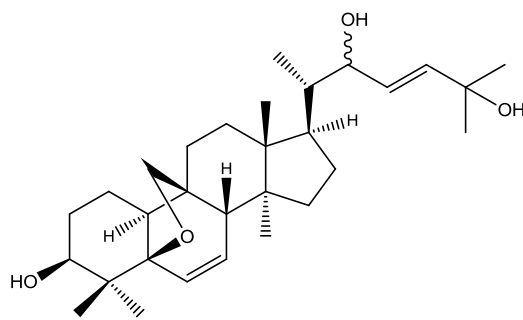
1.39



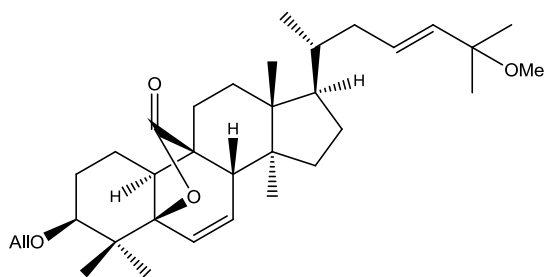
1.40



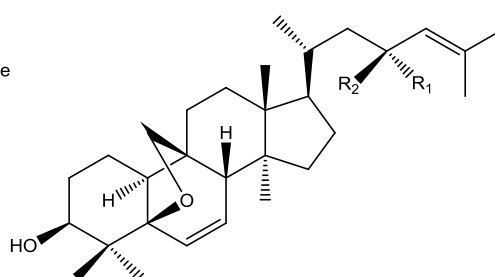
1.41



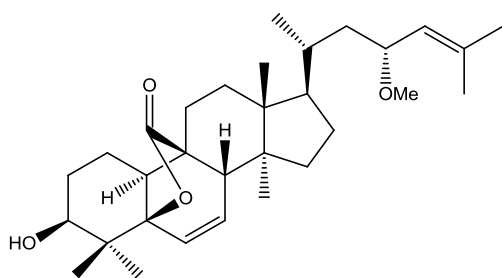
1.42



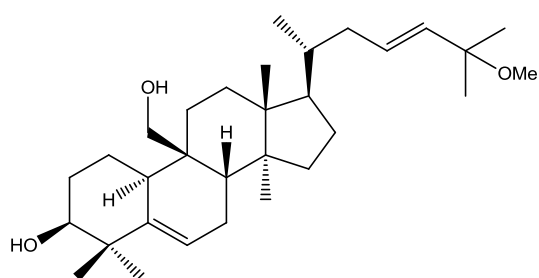
1.43



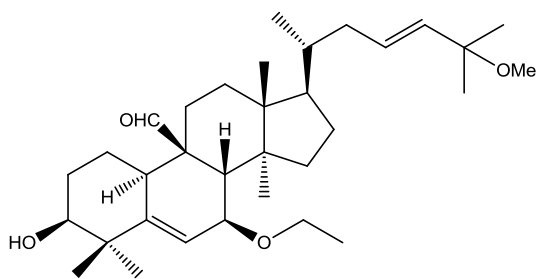
	R₁	R₂
1.44	OMe	H
1.45	H	OMe



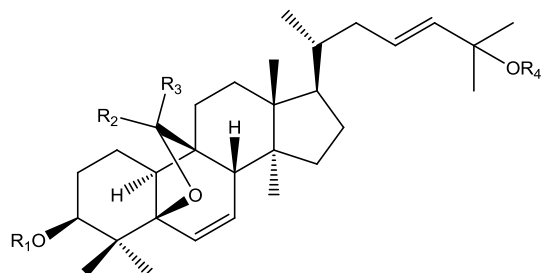
1.46



1.47

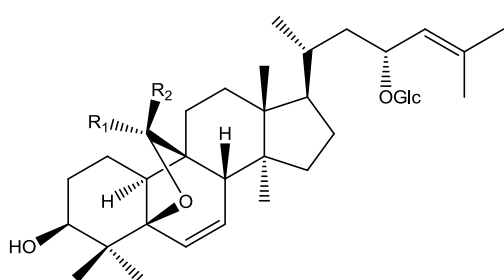


1.48



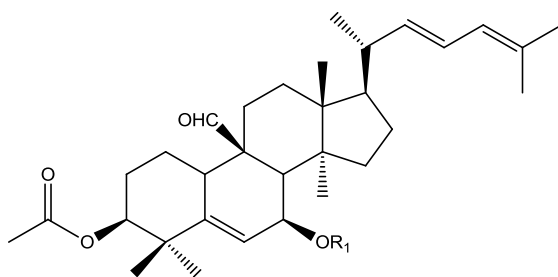
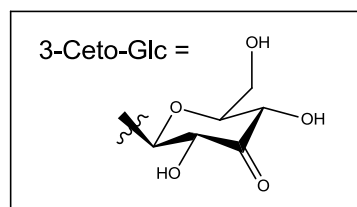
R_1 R_2 R_3 R_4

1.49	3-Ceto-Glc	OMe	H	H
1.50	All	H	OCH ₂ CH ₃	H
1.51	H	OH	H	Me

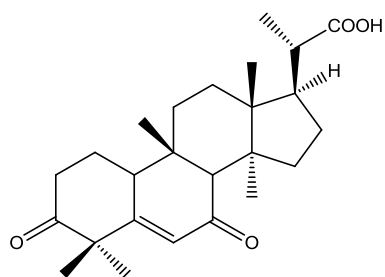


R_1 R_2

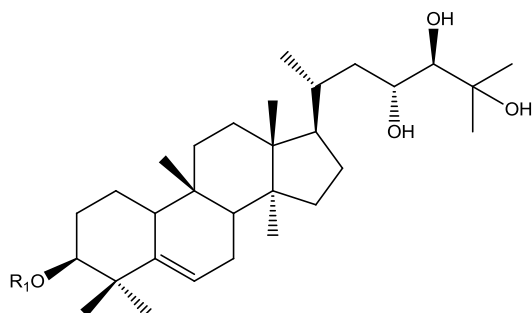
1.52	OMe	H
1.53	H	OMe



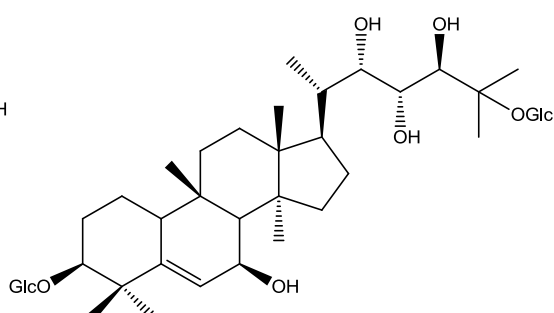
1.54 $R_1 = \text{Glc}(6 \rightarrow 1)\text{Glc}$



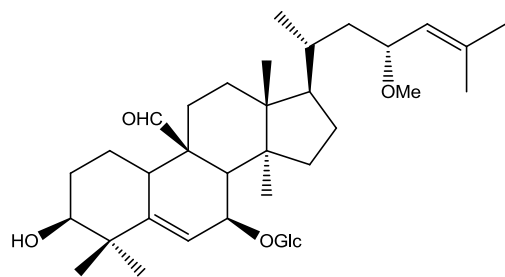
1.55



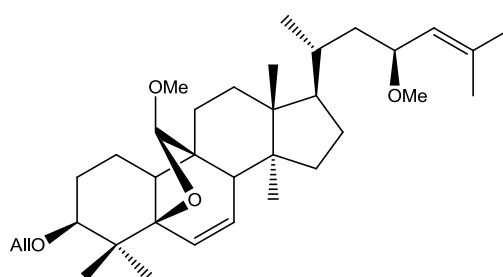
1.56 $R_1 = \text{Glc}(1 \rightarrow 6)\text{Glc}$



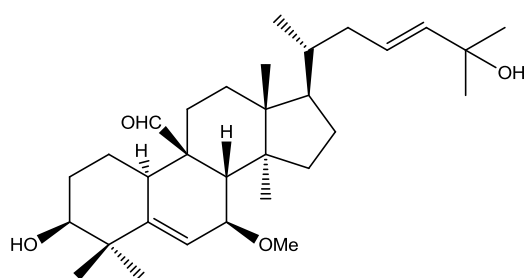
1.57



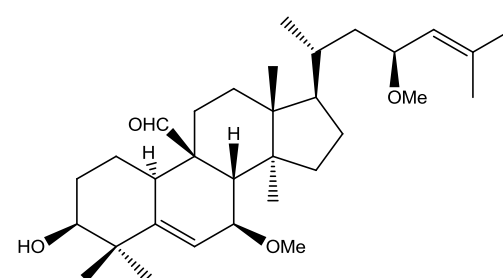
1.58



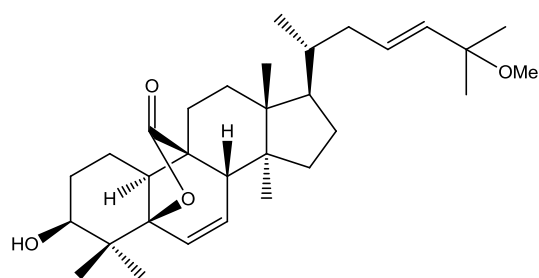
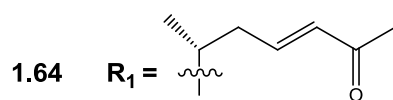
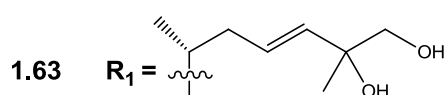
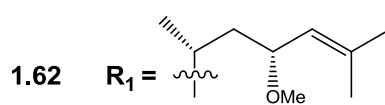
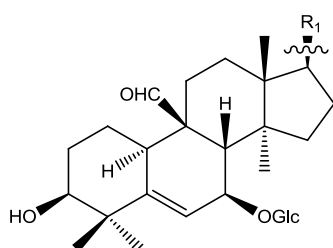
1.59



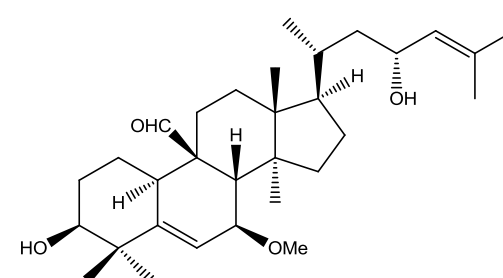
1.60



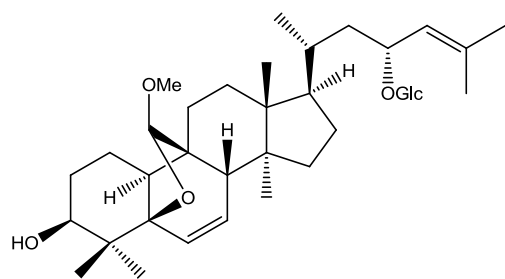
1.61



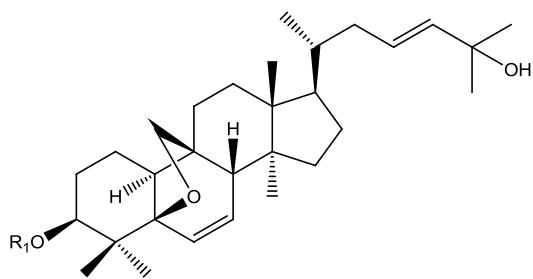
1.65



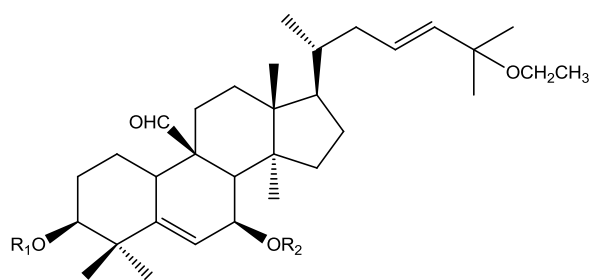
1.66



1.67

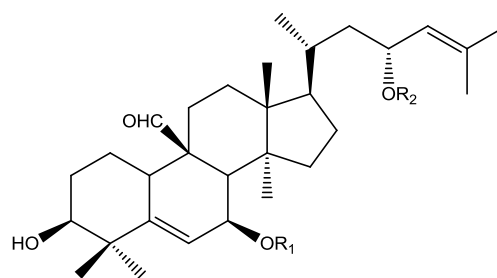


1.68 $R_1 = 3\text{-Ceto-Glc}$



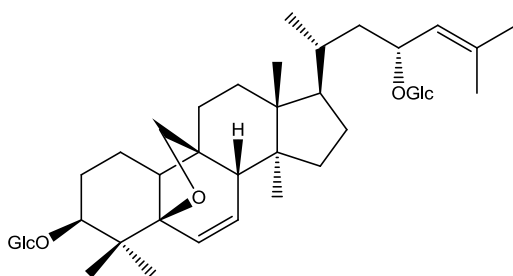
R_1 R_2

1.69	H	Glc
1.70	Glc	H
1.71	All	H

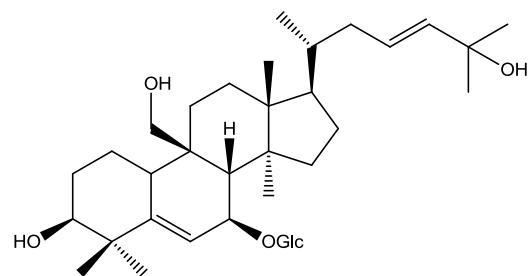


R_1 R_2

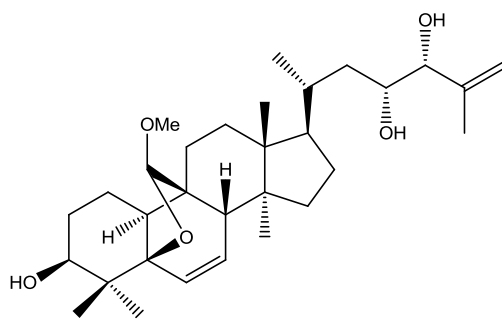
1.72	Glc	CH_2CH_3
1.73	Glc	3-Ceto-Glc



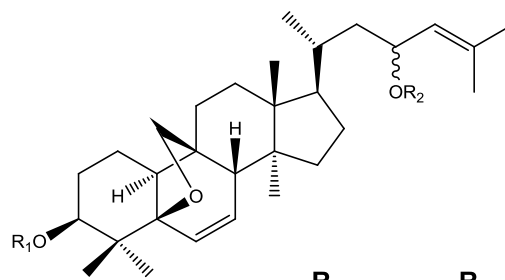
1.74



1.75

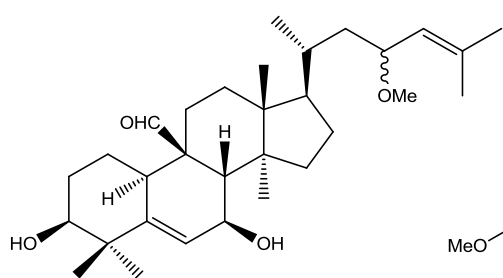


1.76

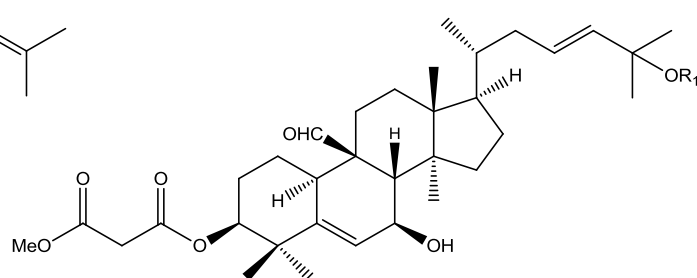


R_1 R_2

1.77	COCH_3	Glc
1.78	H	All

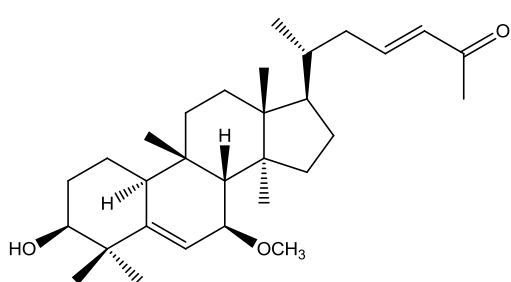


1.79

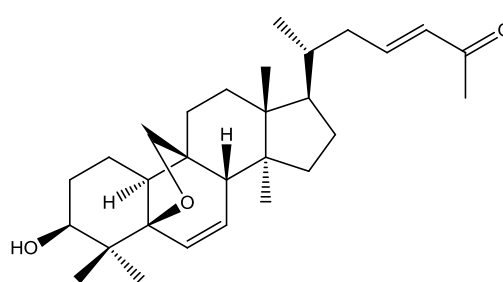


1.80 $R_1 = H$

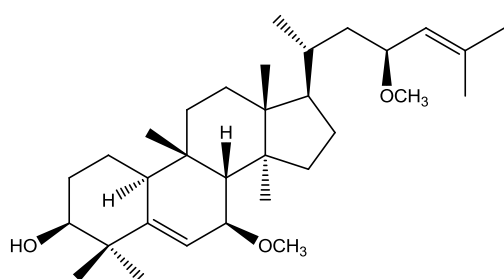
1.81 $R_1 = Me$



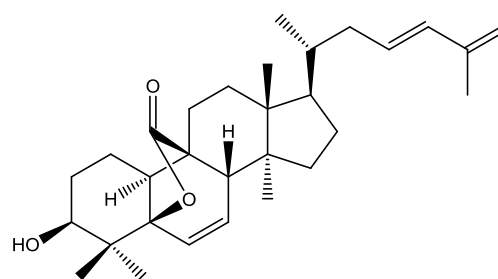
1.82



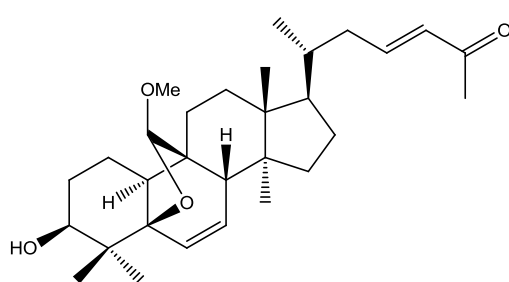
1.83



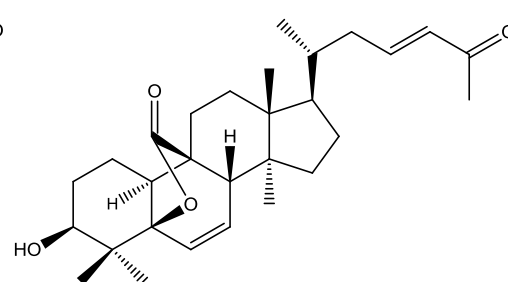
1.84



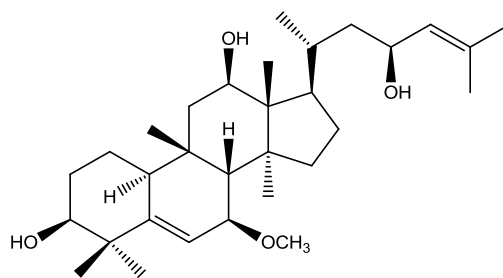
1.85



1.86



1.87

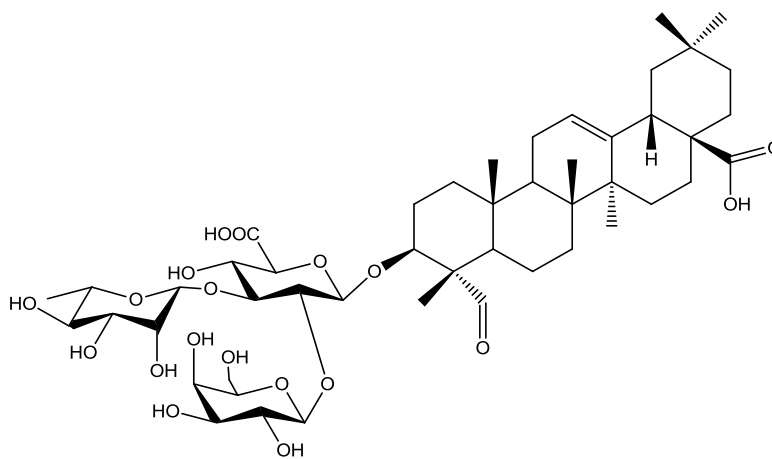


1.88

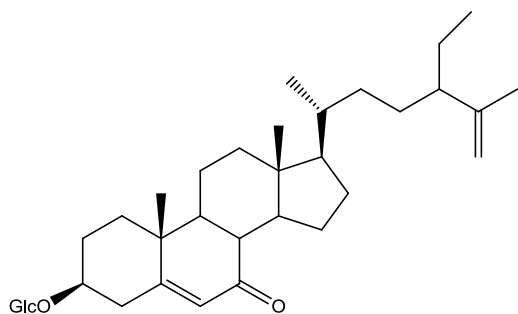
Para além dos triterpenos do tipo cucurbitano outras classes de compostos foram também isolados a partir do género *Momordica* no período compreendido entre 2011 a 2017 (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 Outros compostos isolados a partir do género *Momordica*.

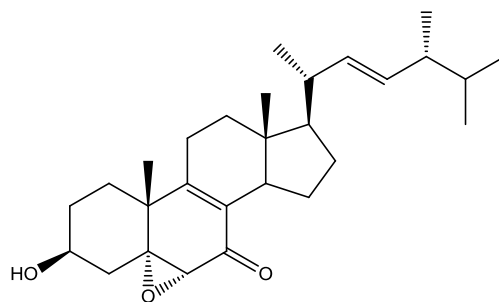
Espécie	Parte analisada	Classe	Composto (nº)	Atividade	Referência
<i>M. cochinchinensis</i>	Sementes	Triterpeno Pentacíclico	1.89	Atividade antiproliferativa nas células humanas do cancro do pulmão	(Jung <i>et al</i> , 2013; Yu <i>et al</i> , 2017)
<i>M. charantia</i>	Frutos	Esteroide	1.90		(Wang <i>et al</i> , 2012)
<i>M. charantia</i>	Caules	Esteroide	1.91		(Liao <i>et al</i> , 2011)



1.89



1.90



1.91

1.4. O cancro e a multirresistência farmacológica

O cancro foi o responsável por 8,8 milhões de mortes no ano de 2015, sendo considerado a segunda principal causa de morte em todo o mundo. O termo cancro, também designado por tumor maligno ou neoplasia, engloba um conjunto de doenças que podem ocorrer em qualquer parte do corpo e caracteriza-se pelo crescimento celular anormal que pode invadir tecidos adjacentes e espalhar-se por outros órgãos, originando metástases (World Health Organization (WHO), 2017).

A quimioterapia é o tratamento de eleição no tratamento de cancros com diagnóstico tardio, localmente avançados e metastizados. Contudo num número significativo de doentes não se observa resposta ao tratamento com os fármacos antitumorais (Gillet e Gottesman, 2010). Uma das principais causas do fracasso da quimioterapia é a resistência farmacológica. Estima-se que apenas 50% dos cancros sejam suscetíveis à quimioterapia, sendo que, mais de 50% desenvolve rapidamente resistência farmacológica (Palmeira *et al*, 2012).

A multirresistência farmacológica (MDR) é definida pela capacidade das células tumorais desenvolverem simultaneamente resistência a fármacos com diferentes estruturas e funcionalidades. A resistência à quimioterapia pode ser intrínseca ou adquirida. A primeira surge no início da terapêutica e a segunda no decorrer do tratamento (Abdallah *et al*, 2015).

São vários os mecanismos descritos como responsáveis pela MDR, entre eles destacam-se os seguintes: fatores farmacocinéticos envolvidos na ADME (absorção, distribuição; metabolização e excreção do fármaco); alterações no metabolismo lipídico; impacto do microambiente; desregulação dos genes relacionados com a apoptose; alteração da capacidade de reparação dos danos no ADN das células tumorais; alteração na atividade de sistemas enzimáticos específicos; presença de células estaminais tumorais e alterações nas proteínas de transporte membranar. Este último tem merecido especial atenção por ser considerado um dos principais mecanismos de MDR (Gillet e Gottesman, 2010; Krishna e Mayer, 2000).

1.4.1. Mecanismo de MDR mediado pela P-gp

De entre os transportadores membranares responsáveis pelo transporte de substâncias endógenas, fármacos e outras substâncias exógenas, os mais estudados consistem na superfamília de transportadores ABC (designada por *ATP-Binding cassette*), composta por mais de 48 canais/transportadores. Estes transportadores efetuam o efluxo dos seus substratos entre o meio intracelular e o meio extracelular

contra o gradiente de concentração, utilizando a energia resultante da hidrólise de ATP. Uma das principais proteínas pertencente a esta subfamília é a glicoproteína-P (P-gp). Dado o seu contributo no desenvolvimento do fenómeno de multirresistência farmacológica e, por conseguinte, no fracasso da quimioterapia, tornou-se num dos principais alvos de estudo (Silva *et al*, 2015).

A P-gp faz parte das proteínas de transporte membranar dependente de ATP. É codificada por dois genes humanos *MDR1/ABCB1* e *MDR3/ABCB4* (também conhecido por *MDR2*), sendo o primeiro responsável pela MDR. Esta proteína foi identificada pela primeira vez em 1976, em células de ovário de hamster que apresentavam permeabilidade reduzida aos fármacos (Juliano e Ling, 1976). A sua estrutura apresenta um peso molecular de 170 kDa (cadeia de 1280 aminoácidos), sendo composta por dois domínios transmembranares hidrofóbicos (610 aminoácidos - TMD), unidos por uma região de ligação (60 aminoácidos). Cada domínio é constituído por seis hélices transmembranares (TMH) e por uma região de ligação a nucleótidos (designada por NBD - *nucleotide binding domain*), localizada no lado citoplasmático da membrana e onde ocorre a ligação e hidrólise de ATP (Figura 1.3). A P-gp encontra-se amplamente distribuída numa grande variedade de tecidos, entre os quais, o colon, rins, placenta, fígado, pâncreas, útero e, ainda, em órgãos altamente especializados como o cérebro e os testículos. Como transportador transmembranar, esta proteína tem um papel importante na manutenção da homeostase celular, na biodisponibilidade dos fármacos, pelo seu transporte através das membranas, podendo atuar ao nível da proteção do organismo contra substâncias potencialmente tóxicas limitando a sua absorção e distribuição. Contudo, a sobre-expressão da P-gp nas células tumorais traduz-se numa redução da concentração intracelular do fármaco antitumoral e, consequentemente, numa diminuição da sua citotoxicidade (Abdallah *et al*, 2015; Palmeira *et al*, 2012; Silva *et al*, 2015; Syed e Coumar, 2016).

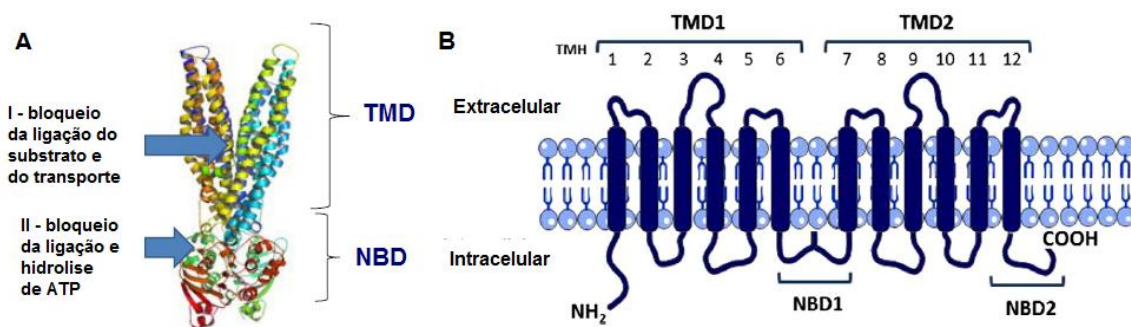


Figura 1.3 (A) Representação tridimensional da P-gp. Possíveis locais de ligação do inibidor da P-gp. **(B)** Estrutura da P-gp. Constituída por dois domínios transmembranares hidrofóbicos (TMD), cada um constituído por seis hélices transmembranares (TMH) e por uma região de ligação a nucleótidos (NBD). (Adaptado de Palmeira *et al*, 2012 e Silva *et al*, 2015).

Relativamente aos seus substratos, a P-gp possui uma grande diversidade de substratos sem relação química ou estrutural, podendo variar em tamanho, estrutura e função. O mesmo se verifica para os fármacos antitumorais, uma vez que esta proteína transporta fármacos de diferentes classes, como por exemplo, alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina), taxanos (paclitaxel e docetaxel), epipodofilotoxinas (etopósido), antimetabolitos (metotrexato, citarabina), agentes alquilantes (cisplatina) e antraciclinas (doxorrubicina e daunorrubicina) (Silva *et al*, 2015).

O mecanismo de ação da P-gp não é totalmente conhecido, contudo, vários modelos têm sido apresentados para explicar o mecanismo pelo qual a P-gp efetua o transporte do substrato, nomeadamente, o modelo do "poro membranar", do "aspirador hidrofóbico" e da "flipase" (Figura 1.4). O primeiro modelo pressupõe que a substância é transportada diretamente do meio intracelular, para o meio extracelular por intermédio de um canal formado pela P-gp, ficando assim protegido da fase lipídica hidrofóbica. Por sua vez, o modelo do "aspirador hidrofóbico" sugere que a P-gp interage com o substrato hidrofóbico presente no folheto interno da membrana plasmática e o transporta para o meio extracelular. No modelo "flipase", a P-gp faz a translocação dos substratos do folheto interno da membrana plasmática para o folheto externo, onde estes podem ser difundidos para o meio extracelular. Os dois últimos modelos são os mais amplamente aceites, dada a conhecida afinidade da P-gp para substratos hidrofóbicos, pelo que faz sentido que a interação com o transportador ocorra na bicamada lipídica. Em ambos os modelos o processo é acompanhado pela ligação e hidrólise de ATP (Casco e Soto-Vega, 2016; Silva *et al*, 2015).

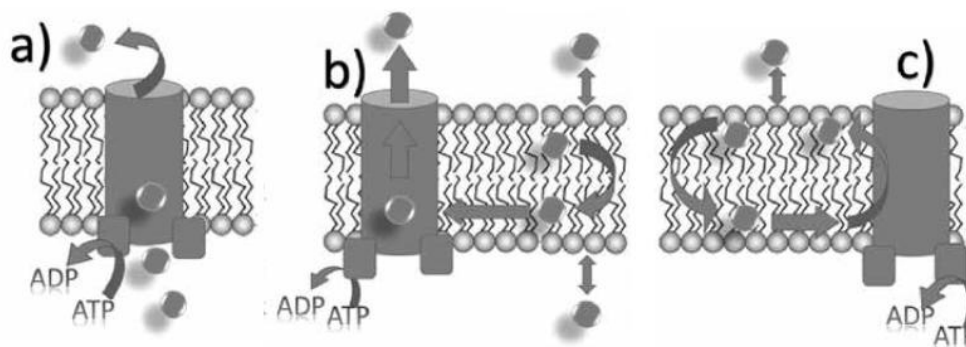


Figura 1.4 Mecanismo de ação da P-gp: **a)** modelo do "poro membranar"; **b)** modelo do "aspirador hidrofóbico"; **c)** modelo da "flipase". (adaptado de Casco e Soto-Vega, 2016).

1.4.2. Estratégias para reversão da MDR

A modulação da atividade da P-gp e o processo de quimiossensibilização vai de encontro à necessidade de aumentar a biodisponibilidade do fármaco antitumoral no seu local de ação e na concentração citotóxica para exercer a sua atividade, envolvendo a coadministração do fármaco antitumoral com um inibidor da P-gp. No que se refere ao tipo de inibição, o modelador da P-gp pode atuar como um inibidor competitivo, competindo pelo lugar de ligação do fármaco, como um antagonista não competitivo, ligando-se a um local diferente para induzir uma mudança conformacional na proteína, como inibidor da função ATPase da P-gp e, ainda, por alteração da integridade dos lípidos da membrana. O desenho de inibidores que sejam substrato da P-gp devem ter em consideração as principais características da maioria dos seus substratos, tais como, natureza relativamente hidrofóbica e ligeiramente anfipática, para além disso, apresentam muitas vezes anéis aromáticos e átomos de azoto. Alguns estudos também sugerem o contributo de fatores físico-químicos para aumento da afinidade do substrato para a P-gp, como a lipofilia, capacidade de estabelecer ligações de hidrogénio, peso molecular e área superficial (Abdallah *et al*, 2015; Silva *et al*, 2015).

Os inibidores da P-gp são classificados em três gerações distintas: primeira geração, segunda geração e terceira geração (Figura 1.5).

Os inibidores de primeira geração incluem, entre outros, bloqueadores dos canais de cálcio como o verapamil, antiarrítmicos como a quinidina, anti-estrogénios como o tamoxifeno e imunossuppressores como a ciclosporina A. O intervalo de concentrações no qual estes inibidores exercem atividade varia entre 1 a 50 μM . Contudo uma das principais limitações da utilização destes inibidores são os seus efeitos imunossuppressores e cardiovasculares indesejáveis, que ocorrem em concentrações obtidas com a dose necessária para inibir a P-gp (Abdallah *et al*, 2015; Silva *et al*, 2015).

A procura pelo desenvolvimento de inibidores da P-gp menos tóxicos, levou ao aparecimento de uma segunda geração de inibidores. Por conseguinte, desta geração resultaram compostos análogos dos inibidores de primeira geração, mais potentes e menos tóxicos, tais como, o dexverapamil (enantiómero *R* do verapamil), emopamil, galopamil e Ro11-2993, análogos do verapamil e o valsopodar análogo da ciclosporina A. Apesar do aumento da atividade inibitória da P-gp, estes compostos não eram seletivos para este transportador e, para além disso, ainda manifestaram efeitos tóxicos (Abdallah *et al*, 2015; Silva *et al*, 2015).

Os inibidores de terceira geração surgem da necessidade de superar os problemas encontrados nas gerações anteriores, aumentando a potência e a especificidade dos inibidores. Com o objetivo de reverter a MDR, a estratégia passou pelo desenvolvimento de compostos desenhados e sintetizados através de estudos de relação estrutura-atividade e química combinatória. Estes compostos foram ativos num intervalo de concentrações de 20 a 100 nM. Desta geração fazem parte o zosuquidar, elacridar, XR9051, OC144-093, biricodar, timcodar e tariquidar. Ainda que estes compostos apresentem um perfil de toxicidade aceitável, precisam de ser testados outros fatores determinantes para a sua eficácia na reversão da MDR, nomeadamente a interação com os fármacos antitumorais. Por exemplo, o inibidor tariquidar foi testado em ensaios clínicos de fase III em combinação com fármacos antitumorais, tendo sido observados efeitos tóxicos que limitaram a sua utilização (Abdallah *et al*, 2015; Silva *et al*, 2015).

Relativamente ao mecanismo de ação, os inibidores de primeira e segunda geração atuam por inibição competitiva, isto é, são também substratos da P-gp; competem com o fármaco pelo transporte e, deste modo, limitam o efluxo do fármaco antitumoral e, por conseguinte, aumentam a sua concentração intracelular. Por sua vez, os inibidores de terceira geração não são substratos da P-gp e atuam por inibição não competitiva, ou seja, ligam-se com alta afinidade à P-gp e induzem a sua mudança conformacional, impedindo deste modo, a hidrólise de ATP e o transporte dos fármacos antitumorais, com consequente aumento da sua concentração intracelular (Thomas e Coley, 2003).

A pesquisa de novos moduladores é emergente, pelo que, estabelecer fatores que determinem a especificidade do substrato e que promovam a interação com a P-gp, é um ponto de partida para o desenho de novos inibidores mais potentes e seletivos para a reversão da MDR.

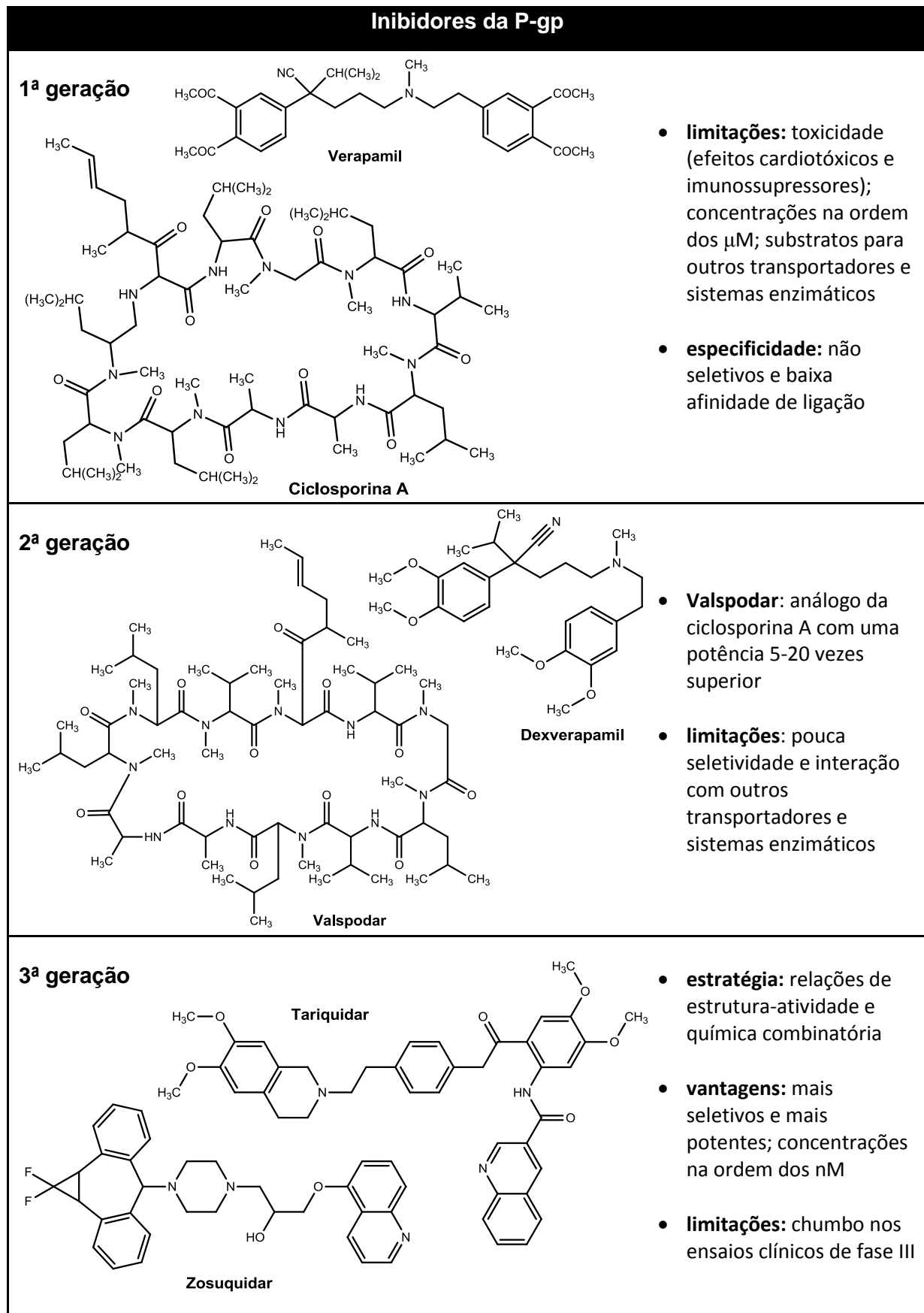


Figura 1.5 Exemplos de modeladores da P-gp de primeira, segunda e terceira geração.

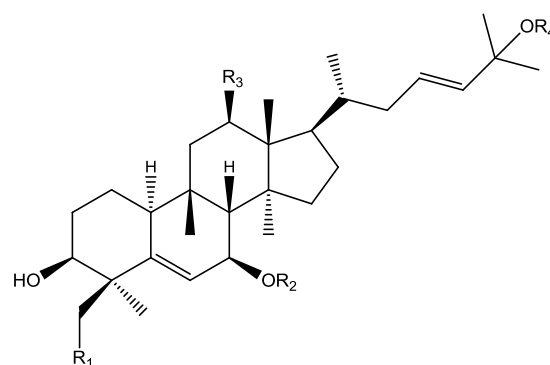
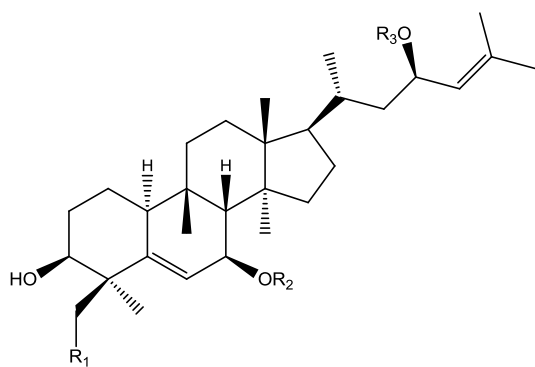
1.4.3. O papel dos produtos naturais: cucurbitacinas como moduladoras da P-gp

O insucesso verificado com os compostos de terceira geração, uma vez que a maioria dos compostos não atingiu o objetivo nos ensaios clínicos, devido à toxicidade inesperada e a interações farmacocinéticas indesejáveis, levou a que os investigadores direcionassem a sua atenção, de novo, para os produtos naturais. Deste modo, foram avaliados compostos isolados a partir de produtos naturais quanto à sua capacidade de inibição da P-gp. Por sua vez, compostos inicialmente identificados como ativos foram derivatizados com vista à obtenção de novos inibidores da P-gp mais seletivos e com maior afinidade (Palmeira *et al*, 2012).

Em estudos anteriores com cucurbitacinas, isoladas a partir das partes aéreas de *Momordica balsamina*, nomeadamente os compostos, karavelagenina C (1.92), balsaminol A (1.93), balsaminol B (1.94), balsaminol C (1.101), balsaminol E (1.102), balsaminagenina B (1.97), balsaminagenina C (1.99), balsaminoside A (1.98), balsaminoside B (1.95), cucurbalsaminol B (1.100), cucurbalsaminol C (1.88), karavilagenina E (1.103) e kuguaglicoside A (1.96), demonstraram uma forte reversão da MDR nas células de linfoma de rato transfetadas com o gene humano *MDR-1* quando comparados com o verapamil. Quando testados em combinação com a doxorrubicina, observou-se que aumentaram sinergicamente o efeito deste fármaco antitumoral, exceto o composto kuguaglicoside A. A partir da análise das relações estrutura-atividade destacou-se a importância da presença de grupos metoxilo em C-7 e C-25 e de grupos hidroxilo livres em C-3 e C-23 (Ramalhete *et al*, 2009b; Ramalhete *et al*, 2016).

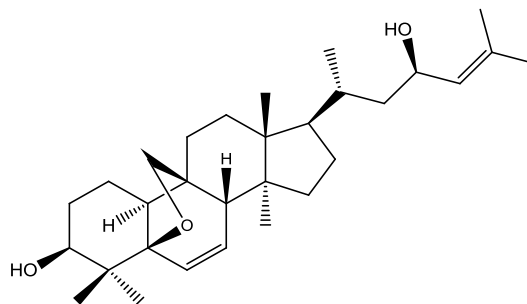
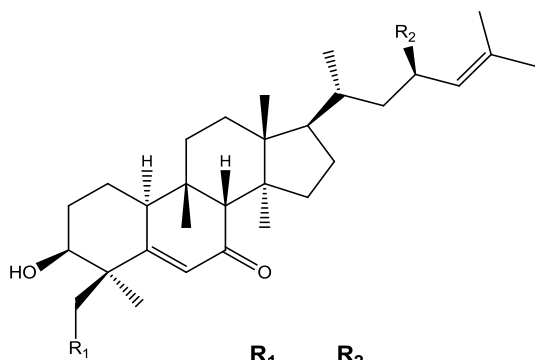
Noutro estudo realizado a partir dos extratos das folhas da planta *Momordica charantia*, foi isolado o composto kuguacina J (1.104), que demonstrou ser um ativo inibidor da P-gp, com consequente aumento da sensibilidade aos fármacos antitumorais, vimblastina e paclitaxel numa linhagem de células humanas de carcinoma cervical multirresistentes (Pitchakarn *et al*, 2012).

Deste modo, os triterpenos representam um recurso natural para o desenvolvimento de novos inibidores pela diversidade das suas estruturas e pelo potencial demonstrado em vários estudos na reversão da MDR. Pelo que, no decorrer dos últimos anos, os inibidores da P-gp provenientes de produtos naturais têm sido referidos por alguns autores, como os inibidores de quarta geração (Yan *et al*, 2014).



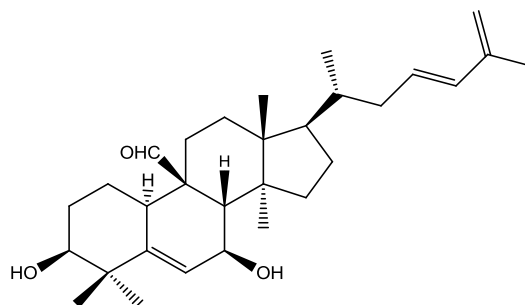
	R_1	R_2	R_3
1.92	H	Me	H
1.93	OH	H	H
1.94	OH	Me	H
1.95	H	All	H
1.96	H	Me	Glc

	R_1	R_2	R_3	R_4
1.97	OH	H	H	Me
1.98	H	All	H	Me
1.99	H	H	H	H
1.100	H	Me	OH	H



	R_1	R_2
1.101	OH	=O
1.102	H	OH

1.103



1.104

Capítulo 2

Apresentação e Discussão dos Resultado

2. Estudo fitoquímico de *Momordica balsamina*

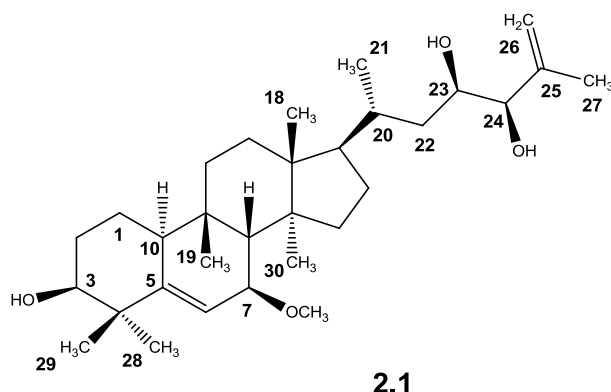
Conforme referido no capítulo de Introdução, a espécie *Momordica balsamina* revelou ser uma importante fonte de triterpenos do tipo cucurbitano. No sentido de dar continuidade à pesquisa de novos compostos anticancerígenos, neste trabalho, foram estudadas duas frações, resultantes do fracionamento do extrato de metanol, obtido a partir das partes aéreas desta planta. Deste processo resultou o isolamento de dez triterpenos do tipo cucurbitano, dos quais, cinco compostos são novos e quatro foram isolados pela primeira vez nesta espécie. Isolou-se, ainda um esteroide. Foram preparados dois derivados (Tabela 2.1).

Neste capítulo, serão apresentados os dados espectroscópicos, que permitiram a elucidação estrutural de todos os compostos.

Tabela 2.1 Compostos isolados a partir da *Momordica balsamina* e derivados.

Número	Composto	
Triterpenos do tipo Cucurbitano		
2.1	Estruturas novas	Balsacurbitriol [7 β -metoxicucurbita-5,25-dieno-3 β ,23(<i>R</i>),24(<i>R</i>)-triol]
2.2		Balsacurbepoxitol [24 <i>S</i> ,25-Epoxi-7 β -metoxicucurbit-5-en-3 β ,23(<i>R</i>)-diol]
2.3		Ácido balsacurbitóico [ácido 24,25,26,27- <i>tetranor</i> -7 β -metoxicucurbit-5-en-3 β -ol-23-oico]
2.4		Balsacurbital [24,25,26,27- <i>tetranor</i> -7 β -metoxicucurbit-5-en-3 β -ol-23-al]
2.5		Balsacurbinol [25-metoxicucurbita-5,23(<i>E</i>)-dien-7-on-3 β -ol]
1.92	Estruturas conhecidas	Karavilagenina C [7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3 β ,23(<i>R</i>)-diol]
2.6		Karavilagenina A [7 β ,25-dimetoxicucurbita-5,23(<i>E</i>)-dien-3 β -ol]
2.7		Karavilagenina B [7 β -metoxicucurbita-5,23(<i>E</i>)-dieno-3 β ,25-diol]
2.8		Kuguacina B [cucurbita-5,23(<i>E</i>)-dien-7-ona-3 β ,25-diol]
2.9		Kuguacina C [25,26,27- <i>trinor</i> -cucurbit-5-eno-7,23-dion-3 β -ol]
Esteróide		
2.10	24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol	
Derivados		
2.11	7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona	
2.12	24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona	

2.1. Balsacurbitriol [7 β -metoxicucurbita-5,25-dieno-3 β ,23(*R*),24(*R*)-triol]



O composto **2.1**, ao qual foi atribuída a estrutura 7 β -metoxicucurbita-5,25-dieno-3 β ,23(*R*),24(*R*)-triol, é um composto novo, designado por balsacurbitriol, tendo sido isolado na forma de pó branco amorfo com $[\alpha]_D^{20} + 79,12$ (*c* 0,1, CHCl₃). O espectro de massa de baixa resolução ESIMS exibiu o ião $[M + H]^+$ a *m/z* 489. A sua fórmula molecular, C₃₁H₅₂O₄, foi deduzida a partir do espectro de HR-ESITOFMS que apresentou o ião $[M + Na]^+$ (molécula cationizada) a *m/z* 511,37739 (massa calculada para C₃₁H₅₂O₄Na: 511,37578), para a qual foi calculado um índice de deficiência de hidrogénios (IDH) de seis.

No espectro de infravermelho (IV) observou-se a banda de absorção característica do grupo hidroxilo a 3405 cm⁻¹.

O espectro de ¹H-RMN exibiu sete sinais característicos de grupos metilo, dos quais seis correspondem a metilos terciários, incluindo um alílico (singuletos a δ_H 0,69, 0,94, 0,97, 1,01, 1,19 e 1,71), e um grupo metilo secundário (δ_H 0,92 *d*, *J* = 6,4 Hz). Neste espectro, foram ainda observados um sinal correspondente a um grupo metoxilo a δ_H 3,32, e sinais de prótons vinílicos correspondentes a uma ligação dupla tri-substituída a δ_H 5,81 (*d*, *J* = 4,7 Hz) e uma ligação dupla terminal a δ_H 4,93 (*s largo*) e δ_H 4,98 (*s*). Por sua vez, foram também observados quatro oximetinos a δ_H 3,41 (*d largo*, *J* = 5,4 Hz), 3,50 (*s largo*), 3,67 (*ddd*, *J* = 10,9, 6,6, 1,9 Hz) e 3,77 (*d*, *J* = 6,6 Hz). O singuleto largo observado para o próton H-3 resulta da semelhança entre os valores do acoplamento equatorial-equatorial e equatorial-axial com os prótons 2 α e 2 β .

Os espectros de ¹³C-RMN e DEPT suportaram a hipótese de se tratar de um esqueleto de um triterpeno do tipo cucurbitano, mostrando a presença de 31 carbonos, correspondentes a oito grupos metilos (um deles atribuído ao grupo metoxilo a δ_C

56,4), oito grupos metileno (um metileno com hibridação sp^2 a δ_C 114,2), nove metinos (dos quais quatro oximetinos a δ_C 69,6, 76,9, 77,4 e 80,3, e um com hibridação sp^2 a δ_C 121,0) e seis carbonos quaternários (dois carbonos vinílicos a δ_C 144,8 e 146,9).

Os espectros de 1H - 1H COSY e HMQC permitiram a identificação dos seguintes fragmentos (Figura 2.1): $-CH_2-CH(OH)-$ (A); $-CH-C=CH-CH(OCH_3)-$ (B); $-CH(CH_3)-CH_2-CH(OH)-CH(OH)-C(CH_3)=CH_2$ (cadeia lateral). A localização dos grupos funcionais foi comprovada pela análise do espectro de HMBC (ver Tabela 2.2).

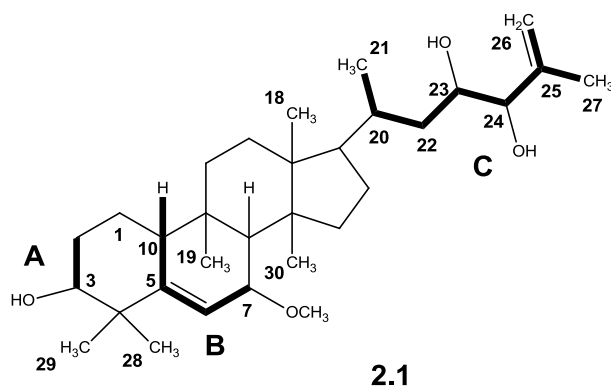


Figura 2.1 Fragmentos estruturais (A, B e C) estabelecidos através dos espectros de 1H - 1H COSY, HMQC e HMBC para o composto 2.1.

A localização do grupo metoxilo no carbono alílico C-7 foi corroborada pelas correlações de HMBC entre os carbonos vinílicos C-5 (δ_C 146,9) e C-6 (δ_C 121,0) e o carbono do grupo metoxilo (δ_C 56,4) com o próton H-7 (δ_H 3,41). A presença de um sistema diol em C-23 e C-24, determinada pelos acoplamentos entre o H-23 (δ_H 3,67) e o H-24 (δ_H 3,77), no espectro de COSY, foi corroborada através do espectro de HMBC, pelas correlações observadas entre C-22 (δ_C 39,8), C-23 (δ_C 69,6), C-25 (δ_C 144,8), C-26 (δ_C 114,2) e C-27 (δ_C 18,0), com o H-24 (δ_H 3,77). A ligação dupla terminal foi confirmada pelas correlações observadas entre o carbono vínico C-26 e os prótons alílicos H-24 (δ_H 3,77 e Me-27 (δ_H 1,71).

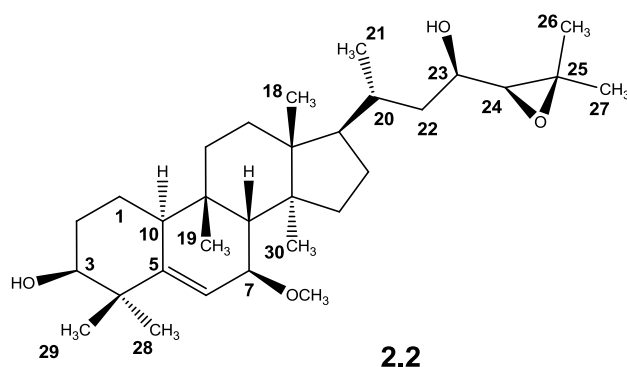
Tabela 2.2 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto **2.1**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC ^{13}C - ^1H	NOESY
1	1,56 <i>m</i>	21,2	CH_2	10	3	
2	1,73 <i>m</i>	28,7	CH_2	3		
3	3,50 <i>s largo</i>	76,9	CH	2	28, 29	28, 30
4	--	41,9	C		6, 24, 28, 29	
5	--	146,9	C		3, 7, 28, 29	
6	5,81 <i>d</i> (4,7)	121,0	CH	7	7, 8	
7	3,41 <i>d largo</i> (5,4)	77,4	CH	6	8, 7-OMe	30
8	2,04 <i>s largo</i>	47,9	CH		6, 7, 19	
9	--	34,1	C		7, 8, 19	
10	2,26 <i>dd</i> (11,8,5,1)	38,8	CH	1	6, 8, 19	30
11	1,49 <i>m</i> , 1,61 <i>m</i>	32,8	CH_2			
12	1,53 <i>m</i>	30,3	CH_2		18	
13	--	46,3	C		18	
14	--	48,0	C		8, 30	
15	1,31 <i>m</i>	34,7	CH_2		30	
16	1,33 <i>m</i> , 1,87 <i>m</i>	28,0	CH_2			
17	1,42 <i>m</i>	51,0	CH		18	
18	0,94 <i>s</i>	15,5	CH_3			
19	0,97 <i>s</i>	29,0	CH_3		8	
20	1,73 <i>m</i>	32,6	CH	21	21	
21	0,92 <i>d</i> (6,4)	18,6	CH_3	20		
22	0,93 <i>m</i> , 1,52 <i>m</i>	39,8	CH_2	23	21, 24	
23	3,67 <i>ddd</i> (10,9, 6,6,1,9)	69,6	CH	22, 24	24	
24	3,77 <i>d</i> (6,6)	80,3	CH	23	26, 27	
25	--	144,8	C		24, 27	
26	4,93 <i>s largo</i> , 4,98 <i>s</i>	114,2	CH_2	27	24, 27	
27	1,71 <i>s</i>	18,0	CH_3	26	24, 26	
28	1,01 <i>s</i>	27,8	CH_3		29	3
29	1,19 <i>s</i>	25,5	CH_3		28	
30	0,69 <i>s</i>	18,1	CH_3		8, 16	3, 7, 10
7-OMe	3,32 <i>s</i>	56,4	CH_3		7	

A estereoquímica relativa do composto **2.1** foi determinada com recurso ao espectro de NOESY, assumindo como referência a orientação α para o protão H-10, característica da biogénese das cucurbitacinas (Xu *et al*, 2004) e, também, por comparação com as constantes de acoplamento descritas na literatura para estruturas similares. As correlações observadas entre o H-10/Me-30, Me-30/H-3 e o Me-30/H-7 confirmaram a configuração β para o grupo hidroxilo em C-3 e para o grupo metoxilo em C-7. O efeito nuclear de *Overhauser* (NOE) observado entre o H-3 e o Me-28 permitiu atribuir a orientação α para o Me-28. Relativamente à cadeia lateral, a configuração *R,R* para os carbonos C-23 e C-24 foi deduzida por comparação dos valores das constantes de acoplamento do composto **2.1** [H-23 ($J = 10,9, 6,6, 1,9$ Hz); H-24 ($J = 6,6$ Hz)] com os descritos na literatura para um derivado do cicloartenol [H-23 ($J = 10,7, 6,5, 1,7$ Hz); H-24 ($J = 6,5$ Hz)] e para o balsaminapentaol [H-23 ($J = 10,8, 7,0, 1,7$ Hz); H-24 ($J = 7,0$ Hz)], com igual cadeia lateral (Mohamad *et al*, 1997; Ramalhete *et al*, 2009a).

A estrutura do composto balsacurbitriol foi comprovada por comparação de todos os dados espectroscópicos obtidos com os descritos na literatura para compostos similares (Cheng *et al*, 2013; Nakamura *et al*, 2006; Ramalhete *et al*, 2009a; Zhao *et al*, 2014).

2.2. Balsacurbepoxitol [24*S*,25-Epoxi-7 β -metoxicucurbit-5-en-3 β ,23(*R*)-diol]



O composto **2.2**, de carácter dextrógiro, $[\alpha]_D^{20} + 92,1$ (c 0,095, CHCl_3), e isolado sob forma de pó branco amorfo, é um composto novo, nomeado balsacurbepoxitol, ao qual foi atribuída a estrutura 24*S*,25-epoxi-7 β -metoxicucurbit-5-eno-3 β ,23(*R*)-diol. A fórmula molecular, $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_4$, foi deduzida a partir da presença do ião $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (molécula cationizada) a m/z 511,37696 (massa calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{Na}$:

511,37578) no espectro de HR-ESITOFMS (IDH de seis). O espectro de massa de baixa resolução ESIMS exibiu o íon $[M + 2Na - 2H_2O]^+$ a m/z 498 (molécula cationizada).

A existência de grupos hidroxilo foi evidenciada no espectro de IV, com uma banda de absorção larga a 3441 cm^{-1} .

No espectro de ^1H -RMN, foi possível observar oito sinais característicos de grupos metilo (singuletos a δ_{H} 0,67, 0,90, 0,93, 0,97, 1,15, 1,23, 1,25 e um duplete a δ_{H} 0,89), e um sinal de um grupo metoxilo (δ_{H} 3,28). Destacaram-se, ainda, sinais atribuíveis a quatro oximetinos a δ_{H} 2,65 (d , $J = 7,8\text{ Hz}$), 3,37, (d largo, $J = 5,0\text{ Hz}$), 3,45 (s largo) e 3,50 (dd , $J = 8,5, 2,3\text{ Hz}$). O próton vinílico típico da ligação dupla do anel B foi observado a δ_{H} 5,77 (d , $J = 5,0\text{ Hz}$).

O esqueleto cucurbitano de 31 carbonos foi confirmado pelos espectros de ^{13}C -RMN e o DEPT, observando-se nove grupos metilo (um deles pertencente ao grupo metoxilo a δ_{C} 56,3), sete grupos metileno, nove metinos (um carbono sp^2 a δ_{C} 120,7 e quatro oximetinos a 68,1, 68,3, 76,7 e 77,2) e seis carbonos quaternários (um carbono sp^2 a δ_{C} 146,9 e um carbono oxigenado a δ_{C} 59,2).

A comparação dos espectros de RMN dos compostos **2.1** (Tabela 2.2) e **2.2** (Tabela 2.3), permitiu concluir que estes compostos possuíam o mesmo núcleo triterpênico, diferindo apenas na estrutura da cadeia lateral. Esta diferença foi confirmada pela análise dos espectros bidimensionais (^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC), através dos quais foi possível encontrar o fragmento (Figura 2.2) referente à cadeia lateral: $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH-O-C}(\text{CH}_3)_2$.

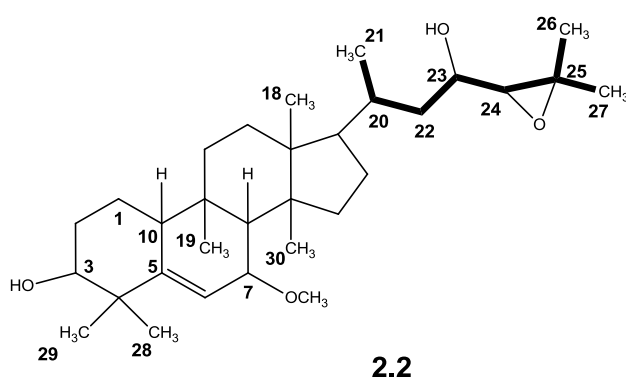


Figura 2.2 Fragmento estrutural estabelecido através dos espectros de ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC para o composto **2.2**.

A estrutura da cadeia lateral, com um grupo hidroxilo na posição C-23 e um epóxido em C-24 foi determinada com base nos sinais observados no espectro de ^{13}C -RMN a campo mais baixo, nomeadamente a δ_{C} 59,2, 68,1 e 68,3, correspondentes a C-25, C-23 e C-24, respetivamente. Estas atribuições foram corroboradas pelas correlações observadas no espectro de HMBC entre C-24 e os prótons H-23, Me-26 e Me-27 e o C-23 e os prótons H-20 e H-24.

A estereoquímica relativa do composto **2.2** foi determinada pelo espectro de NOESY (Figura 2.3) e por comparação dos valores das constantes de acoplamento com os descritos na literatura para compostos semelhantes, assumindo como referência a orientação α para o próton H-10, característico da biogénese das cucurbitacinas (Xu *et al*, 2004). As correlações observadas entre H-10/Me-28, H-10/Me-30, Me-28/H-3 e o Me-30/H-7 corroboraram a configuração β para o grupo hidroxilo em C-3, o grupo metoxilo em C-7 e o metilo C-29. Relativamente à cadeia lateral, a configuração em C-23 foi atribuída com base no efeito de NOE observado entre o H-23 e o Me-21. A estereoquímica do epóxido em C-24 foi determinada com base no efeito de NOE visualizado entre o H-23 e o H-24. Por sua vez, os valores das constantes de acoplamento observadas para o H-23 ($J = 8,4, 2,2$ Hz) e o H-24 ($J = 7,8$ Hz) são semelhantes aos valores descritos na literatura para o composto alisol B (Tabela 2.4) com igual cadeia lateral [H-23 ($J = 8,1, 10,6, 2,0$ Hz); H-24 ($J = 8,1$ Hz)] (Jin *et al*, 2012; Nakajima *et al*, 1994).

A caracterização do composto **2.2** foi corroborada pela comparação dos seus dados espectroscópicos com os descritos na literatura para compostos semelhantes (Jin *et al*, 2012; Nakajima *et al*, 1994; Nakamura *et al*, 2006; Ramalhete *et al*, 2009a).

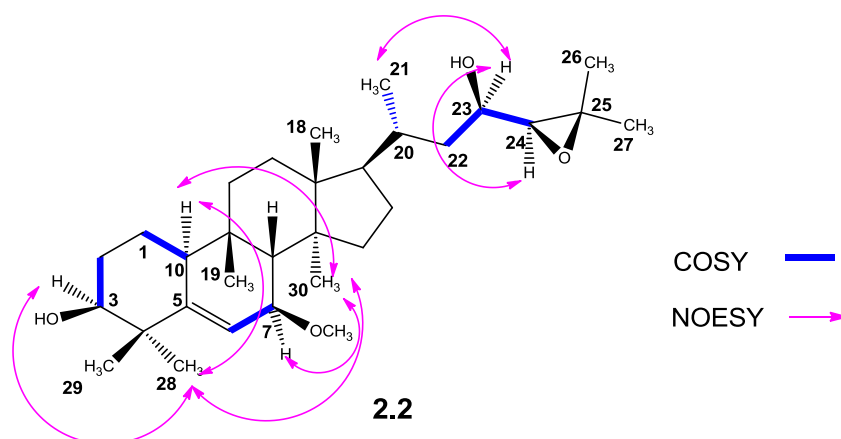
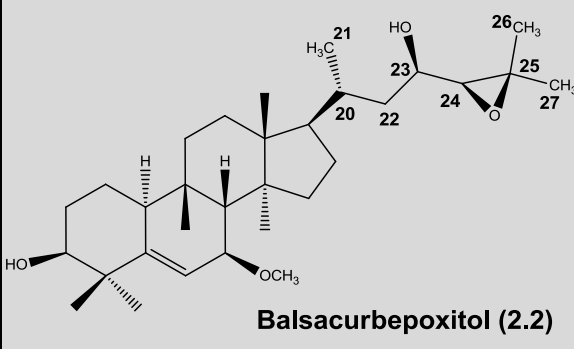
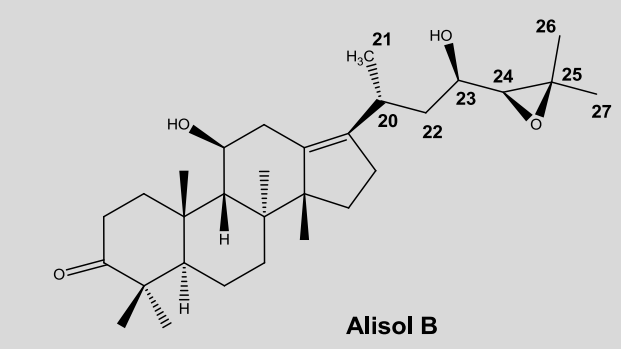


Figura 2.3 Principais correlações observadas nos espectros de COSY e de NOESY.

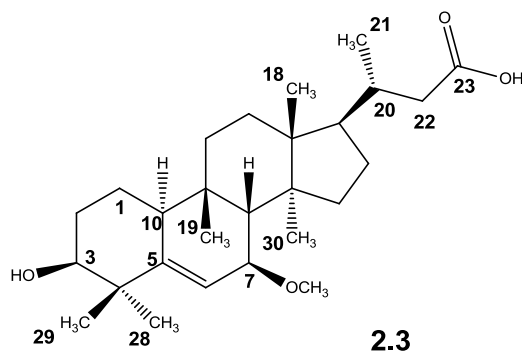
Tabela 2.3 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto **2.2**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H	NOESY
1	1,51 <i>m</i>	21,1	CH_2	10	3, 10	
2	1,73 <i>m</i> ; 1,91 <i>m</i>	28,7	CH_2	3	10	
3	3,45 <i>s largo</i>	76,7	CH	2	28, 29	28
4		41,7	C		6, 28, 29	
5		146,9	C		3, 7, 10, 28, 29	
6	5,77 <i>d</i> (5,0)	120,7	CH	7	7, 8, 10	
7	3,37 <i>d largo</i> (5,0)	77,2	CH	6	7-OMe, 8	27, 30
8	1,99 <i>d</i> (3,0)	47,8	CH		6, 7, 10	
9		34,0	C		7	
10	2,21 <i>dd</i> (11,0; 6,0)	38,7	CH	1	6, 8	28, 30
11	1,61 <i>m</i>	32,7	CH_2			
12	1,44 <i>m</i>	30,2	CH_2		18	
13		46,2	C		18	
14		47,9	C		8, 30	
15	1,30 <i>m</i>	34,6	CH_2		30	
16		27,8	CH_2		8	
17	1,39 <i>m</i>	50,9	CH		18, 21	
18	0,90 <i>s</i>	15,4	CH_3			
19	0,93 <i>s</i>	28,8	CH_3		8, 10	
20	1,77 <i>m</i>	32,0	CH	21	21	
21	0,89 <i>d</i> (6,4)	18,6	CH_3	20	20	23
22	0,88 <i>m</i> , 1,69 <i>m</i>	40,3	CH_2	23	21	
23	3,50 <i>dd</i> (8,4, 2,2)	68,1	CH	24, 22	20, 24	21, 24, 26
24	2,65 <i>d</i> (7,8)	68,3	CH	23	23, 26, 27	23, 27
25		59,2	C		26, 27	
26	1,23 <i>s</i>	19,2	CH_3		27	23
27	1,25 <i>s</i>	25,0	CH_3		24, 26	7, 24
28	0,97 <i>s</i>	27,8	CH_3		29	3, 10
29	1,15 <i>s</i>	25,4	CH_3		28	
30	0,67 <i>s</i>	18,0	CH_3		8	7, 10
7-OMe	3,28 <i>s</i>	56,3	CH_3		7	

Tabela 2.4 Estudo comparativo de alguns valores observados no espectro de ^{13}C -RMN, entre o composto **2.2** e um composto análogo (alisol B), descrito na literatura.

^{13}C -RMN e ^1H -RMN (CDCl_3 , δ (ppm), (J em Hz))						
						
Posição	Balsacurbepoxitol (2.2)		Alisol B (Nakajima <i>et al</i> , 1994)		Alisol B (Jin <i>et al</i> , 2012)	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
22	40,3		38,7		38,7	
23	68,1	3,50 <i>dd</i> (8,4, 2,2)	69,0	3,21 <i>ddd</i> (2,0, 8,1, 10,6)	69,1	3,21 <i>ddd</i> (2,0, 8,1, 10,6)
24	68,3	2,65 <i>d</i> (7,8)	67,9	2,69 <i>d</i> (8,1)	67,7	2,69 <i>d</i> (8,1)
25	59,2		59,1		59,2	

2.3. Ácido balsacurbitóico [ácido 24,25,26,27-*tetranor*-7 β -metoxicucurbit-5-en-3 β -ol-23-oico]



O composto **2.3**, designado por ácido balsacurbitóico e isolado na forma de pó branco amorfo, ao qual foi atribuída a estrutura de ácido 24,25,26,27-*tetranor*-7 β -metoxicucurbit-5-en-3 β -ol-23-oico, é um composto novo, de carácter dextrogiro, $[\alpha]_D^{20} + 49,5$ (*c* 0,1, MeOH). O espectro de massa de baixa resolução ESIMS exibiu um ião $[M + Na]^+$ a *m/z* 455 (molécula cationizada). A fórmula molecular, $C_{27}H_{44}O_4$ (IDH de seis), foi determinada pela presença do ião $[M + Na]^+$ a *m/z* 455,31404 (massa calculada para $C_{27}H_{44}O_4Na$: 455,31318) no espectro de HR-ESITOFMS.

A presença da função ácido carboxílico e do grupo hidroxilo foi indicada pelas bandas de absorção observadas no espectro de IV a 3422 cm^{-1} e a 1703 cm^{-1} .

A comparação dos dados de RMN do composto **2.3** (Tabela 2.5) com os compostos anteriormente descritos permitiu concluir que contêm o mesmo núcleo triterpénico, diferindo apenas na constituição da cadeia lateral.

No espectro de ^1H -RMN, observaram-se seis sinais correspondentes a grupos metilo (singletos a δ_{H} 0,59, 0,81, 0,92, 1,17, 1,20 e um duplete a δ_{H} 1,05), um sinal pertencente ao grupo metoxilo a δ_{H} 3,24. Os sinais dos oximetinos foram visíveis a δ_{H} 3,33 (*d*, $J = 5,3\text{ Hz}$) e 3,37 (*s largo*). O sinal atribuível à ligação dupla foi observado a δ_{H} 5,88 (*d*, $J = 4,9\text{ Hz}$).

A análise dos espectros de ^{13}C -RMN e o DEPT fundamentaram a estrutura de uma *nor*-cucurbitacina, composta por 27 carbonos e concordante com a ausência dos carbonos C-24, C-25, C-26 e C-27. Nestes espectros, foi possível observar sete grupos metilo (um dos quais correspondente ao grupo metoxilo), sete grupos metileno, sete metinos (um carbono sp^2 a δ_{C} 120,9 e dois oximetinos a δ_{C} 76,6 e a 77,3) e seis carbonos quaternários (um carbono sp^2 a δ_{C} 146,7 e um carbono carbonílico a δ_{C} 178,6).

A análise dos espectros bidimensionais (^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC), tornou possível a identificação do fragmento (Figura 2.4) referente à cadeia lateral: -CHCH(CH₃)-CH₂-COOH. Este fragmento foi sustentado pelas correlações observadas, no espectro de COSY, entre H-20 (δ_{H} 2,01) e os protões H-17 (δ_{H} 1,38 e 1,43), Me-21 (δ_{H} 1,05) e H-22 (δ_{H} 1,96 e 2,38). Por sua vez, o sinal visível a δ_{C} 178,6, atribuído a C-23, corroborou a existência da função carboxilo na molécula. A sua localização foi baseada nas correlações 3J e 2J , observadas no espectro de HMBC, entre o carbono C-23 e os protões H-20 e H-22, respetivamente.

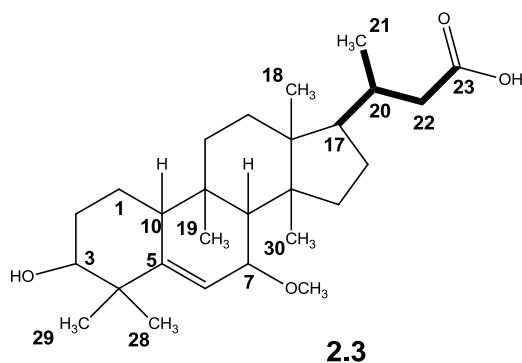


Figura 2.4 Fragmento estrutural estabelecido através dos espectros de ^1H - ^1H COSY e HMBC para o composto **2.3**.

A configuração relativa dos estereocentros tetraédricos do composto **2.3** foi determinada pelo espectro de NOESY e por comparação dos valores das constantes de acoplamento com os descritos na literatura (Figura 2.5). As correlações observadas no espectro de NOESY foram idênticas às dos compostos descritos anteriormente para o núcleo triterpênico.

Os dados espectroscópicos foram comparados com os descritos na literatura para compostos semelhantes, corroborando, deste modo, a estrutura do composto (Nakamura *et al*, 2006; Ramallete *et al*, 2009a; Xia *et al*, 2012).

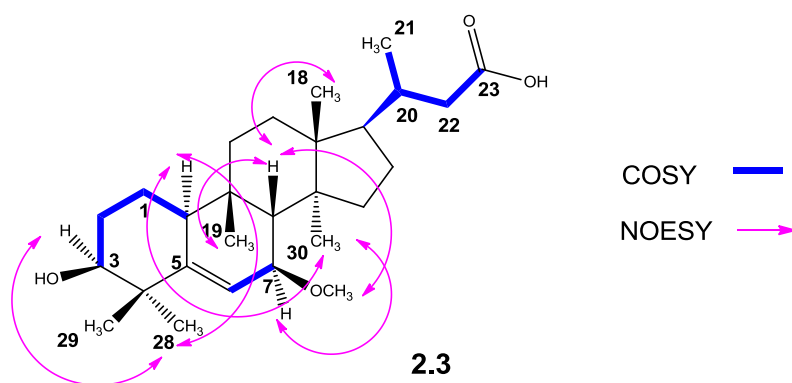
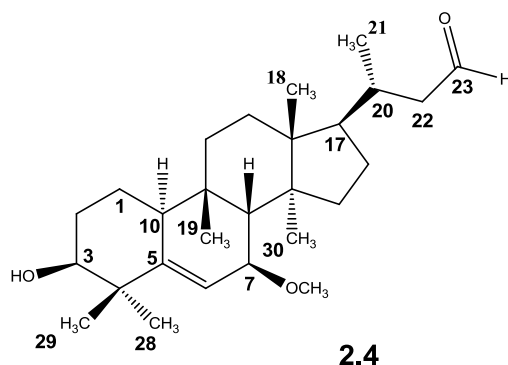


Figura 2.5 Principais correlações observadas nos espectros de COSY e de NOESY.

Tabela 2.5 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [C_6D_6 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto **2.3**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H	NOESY
1	1,43 <i>m</i> ; 1,72 <i>m</i>	21,4	CH ₂	2, 10	3	
2	1,63 <i>m</i> ; 1,71 <i>m</i>	29,3	CH ₂	1, 3		
3	3,37 <i>s largo</i>	76,6	CH	2	28, 29	28
4		41,8	C		3, 6, 28, 29	
5		146,7	C		3, 7, 28, 29	
6	5,88 <i>d</i> (4,9)	120,9	CH	7	7, 8	
7	3,33 <i>d</i> (5,3)	77,3	CH	6	7-OMe, 8	30
8	2,08 <i>s</i>	48,8	CH		6, 18	18, 19, 7-OMe
9		34,3	C		7, 8	
10	2,14 <i>m</i>	39,1	CH	1	6, 8	28, 30
11	1,41 <i>m</i> ; 1,55 <i>m</i>	32,9	CH ₂			
12	1,32 <i>m</i>	30,4	CH ₂		18	
13		46,3	C		18	
14		48,3	C		8, 30	
15	1,18 <i>m</i>	34,9	CH ₂		30	
16	1,73 <i>m</i>	27,9	CH ₂			
17	1,38 <i>m</i> ; 1,43 <i>m</i>	50,3	CH	20	21	
18	0,81 <i>s</i>	15,4	CH ₃		30	8
19	1,20 <i>s</i>	29,3	CH ₃		8	8
20	2,01 <i>m</i>	34,1	CH	17, 21, 22	21	
21	1,05 <i>d</i> (6,0)	19,8	CH ₃	20	20, 22	
22	1,96 <i>m</i> ; 2,38 <i>m</i>	41,7	CH ₂	20	21	
23		178,6	C		20, 22	
28	0,92 <i>s</i>	27,9	CH ₃		29	3, 10
29	1,17 <i>s</i>	25,7	CH ₃		28	
30	0,59 <i>s</i>	18,2	CH ₃		8, 18	7, 10
7-OMe	3,24 <i>s</i>	56,2	CH ₃		7	8

2.4. Balsacurbital [24,25,26,27-tetranor-7 β -metoxicucurbit-5-en-3 β -ol-23-al]



O composto **2.4**, ao qual foi atribuída a estrutura 24,25,26,27-tetranor-7 β -metoxicucurbit-5-en-3 β -ol-23-al, trata-se de um composto novo, denominado balsacurbital, isolado sob a forma de pó branco amorfo e de carácter dextrogiro, $[\alpha]_D^{20} + 10,2$ (c 0,1, CHCl_3). O espectro de massa de baixa resolução ESIMS exibiu uma molécula cationizada, $[\text{M} + \text{K}]^+$, a m/z 455. A sua fórmula molecular, $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$ (IDH de seis), foi deduzida a partir da presença do ião $[\text{M} + \text{H}]^+$ (molécula protonada) a m/z 417,33678 (massa calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_3$: 417,33632) no espectro de HR-ESITOFMS.

O espectro de IV exibiu a banda de absorção característica do grupo hidroxilo a 3418 cm^{-1} , bem como uma banda a 1716 cm^{-1} , atribuível ao aldeído.

Relativamente ao espectro de ^1H -RMN, foram possíveis de observar seis sinais característicos dos grupos metilo (singuletos a δ_{H} 0,71, 0,97, 1,00, 1,03, 1,21 e um duplete a δ_{H} 0,98), um sinal a δ_{H} 3,34 correspondente ao grupo metoxilo, dois oximetinos a δ_{H} 3,41 (d , $J = 5,3\text{ Hz}$) e 3,51 (s largo) e o protão vinílico da ligação dupla a δ_{H} 5,84 (d , $J = 4,6\text{ Hz}$). Neste espectro, foi ainda visível um sinal a campo mais baixo, δ_{H} 9,75, característico dos protões aldeídicos.

Os espectros de ^{13}C -RMN e o DEPT evidenciaram a presença no composto de 27 carbonos, suportando a estrutura de uma nor-cucurbitacina e, por conseguinte, a ausência dos sinais para os carbonos C-24, C-25, C-26 e C-27. Estes espectros revelaram a presença de sete grupos metilo (incluindo o grupo metoxilo), sete grupos metilenos, oito metinos (um carbono sp^2 a δ_{C} 121,0 e dois oximetinos a δ_{C} 76,9 e a 77,4) e cinco carbonos quaternários (um carbono sp^2 a δ_{C} 147,0 e um carbono carbonílico a δ_{C} 203,6, confirmando a presença de um aldeído).

Os dados de RMN do composto **2.4** (Tabela 2.6) são semelhantes aos do composto **2.3**, diferindo apenas na cadeia lateral. Por conseguinte, a interpretação dos

espectros bidimensionais (^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC) permitiu a identificação do fragmento (Figura 2.6) representativo da cadeia lateral: $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CHO}$.

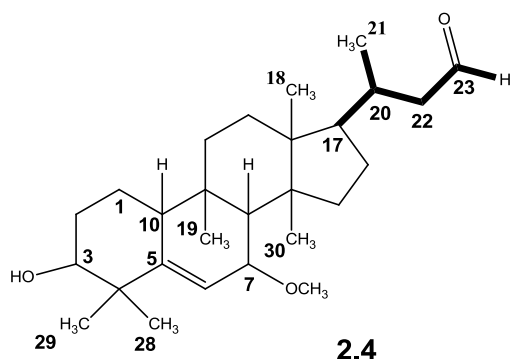


Figura 2.6 Fragmento estrutural estabelecido através dos espectros de ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC para o composto **2.4**.

A localização da função aldeído no C-23 da cadeia lateral foi indicada pelo valor do sinal atribuído ao C-22 (δ_{C} 51,3), que sofreu um efeito paramagnético de aproximadamente 10 ppm quando comparado com os valores obtidos para o mesmo carbono em relação aos compostos descritos anteriormente, e corroborada pelas correlações $^2J_{\text{C-H}}$, observadas no espectro de HMBC, do C-23 (δ_{C} 203,6) com o H-22 [δ_{H} 2,46 (*dd*, $J = 15, 4,1$ Hz) e 2,16 *m*]. Por sua vez, a atribuição dos restantes sinais da cadeia lateral foi baseada nas correlações observadas, no espectro de COSY, entre o próton H-20 (δ_{H} 2,13) e os prótons H-22 e o Me-21 (δ_{H} 0,98) e entre os prótons H-22 e os prótons H-20 e H-23 (δ_{H} 9,75).

A estereoquímica relativa foi determinada pelos dados do espectro de NOESY, revelando-se ser idêntica aos compostos anteriormente descritos (Figura 2.7).

A caracterização do composto **2.4** foi confirmada pela comparação dos seus dados espectroscópicos com os descritos na literatura para compostos semelhantes (Cabrera e Seldes, 1997; Nakamura *et al*, 2006; Ramalhete *et al*, 2009a).

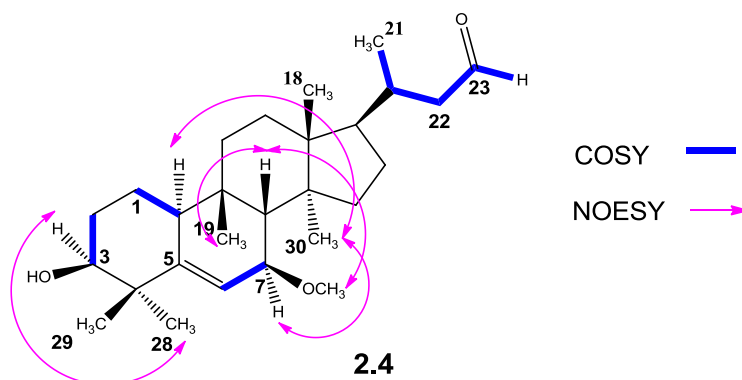
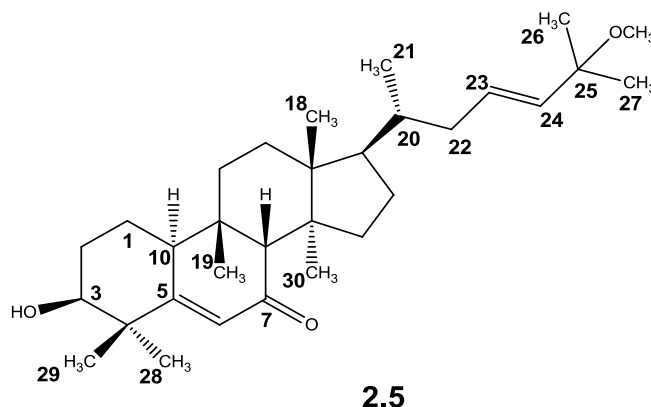


Figura 2.7 Principais correlações observadas nos espectros de COSY e de NOESY.

Tabela 2.6 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto **2.4**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H	NOESY
1	1,59 <i>m</i>	21,2	CH_2	10	3, 10	
2	1,74 <i>m</i>	28,7	CH_2	3		
3	3,51 <i>s largo</i>	76,9	CH	2	28, 29	28
4		41,9	C		6, 28, 29	
5		147,0	C		3, 7, 10, 28, 29	
6	5,84 <i>d</i> (4,6)	121,0	CH	7	7, 8, 10	
7	3,41 <i>d</i> (5,3)	77,4	CH	6	7-OMe, 8	30
8	2,05 <i>s largo</i>	48,1	CH		6, 7	7-OMe, 19
9		34,1	C		7, 8	
10	2,27 <i>dd</i> (11,8; 5,3)	38,8	CH	1	6, 8	30
11	1,63 <i>m</i>	32,7	CH_2		19	
12	1,30 <i>m</i> ; 1,66 <i>m</i>	30,2	CH_2		17, 18	
13		46,4	C		17	
14		48,1	C		8, 18, 30	
15	1,35 <i>m</i>	34,7	CH_2		17, 30	
16	1,33 <i>m</i> ; 1,89 <i>m</i>	28,1	CH_2			
17	1,49 <i>m</i>	50,3	CH			
18	0,97 <i>s</i>	15,5	CH_3			
19	1,00 <i>s</i>	29,0	CH_3		8	8
20	2,13 <i>m</i>	32,0	CH	21, 22	21	
21	0,98 <i>d</i> (6,6)	20,2	CH_3	20	22	
22	2,16 <i>m</i> ; 2,46 <i>dd</i> (15; 4,1)	51,3	CH_2	20, 23	21	
23	9,75 <i>m</i>	203,6	CH	22	22	
28	1,03 <i>s</i>	27,9	CH_3		29	3
29	1,21 <i>s</i>	25,5	CH_3		28	
30	0,71 <i>s</i>	18,1	CH_3		8	7, 10
7-OMe	3,34 <i>s</i>	56,4	CH_3		7	8

2.5. Balsacurbinol [25-metoxicucurbita-5,23(*E*)-dien-7-on-3 β -ol]



O composto **2.5**, designado por balsacurbinol, é um composto novo, que foi isolado sob a forma de pó branco amorfo, de carácter dextrogiro, $[\alpha]_D^{20} + 76$ (*c* 0,1, CHCl_3), ao qual foi atribuída a estrutura 25-metoxicucurbita-5,23(*E*)-dien-7-on-3 β -ol. O espectro ESIMS exibiu o ião $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (molécula cationizada) a *m/z* 493. A fórmula molecular, $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$, foi deduzida com base na presença do ião $[\text{M} + \text{H}]^+$ (molécula protonada) a *m/z* 471,38403 (massa calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{O}_3$: 471,38327) no espectro de HR-ESITOFMS, à qual corresponde um IDH de sete.

No espectro de IV observou-se a 3447 cm^{-1} a banda de absorção da ligação OH, assim como, a 1645 cm^{-1} , a banda característica de uma cetona α,β -insaturada.

O espectro de ^1H -RMN revelou a existência de oito grupos metilo, dos quais, sete singletos a δ_{H} 0,81, 0,87, 0,96, 1,13, 1,23 (sobreposição de sinais H-26 e H-27), 1,24 e um duplete a δ_{H} 0,89; um sinal característico do grupo metoxilo a δ_{H} 3,13; um sinal de um oximetino δ_{H} a 3,64 (*s largo*). Foi também visível a presença de protões vinílicos, a campo mais baixo, correspondentes a uma ligação dupla em C-5, a δ_{H} 6,08 (*d*, $J = 2,1\text{ Hz}$, H-6) e a uma ligação dupla localizada na cadeia lateral, a δ_{H} 5,49 (*ddd*, $J = 15,6, 8,1, 5,4\text{ Hz}$, H-23) e a δ_{H} 5,37 (*d*, $J = 15,6\text{ Hz}$, H-24).

Os espectros de ^{13}C -RMN e DEPT confirmaram a estrutura triterpénica do tipo cucurbitano para este composto, sendo constituído por 31 carbonos, correspondentes a nove grupos metilo (incluindo o grupo metoxilo a δ_{C} 50,4), sete grupos metileno, oito metinos (salientando-se um oximetino a δ_{C} 76,8 e três carbonos com hibridação sp^2 a δ_{C} 126,0, 128,5 e 136,9) e sete carbonos quaternários (um carbono vinílico a δ_{C} 169,2, um carbono carbonílico a δ_{C} 203,0, formando um sistema α,β -insaturado, e um carbono ligado a um grupo metoxilo a δ_{C} 75,0).

A interpretação dos espectros bidimensionais, ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC (Tabela 2.7) permitiu localizar as diferenças observadas ao nível do anel B do núcleo cucurbitano e da cadeia lateral para este composto, relativamente aos anteriormente descritos. Por conseguinte, estes espectros revelaram os seguintes fragmentos (Figura 2.8) diferenciados: $-\text{CH}-\text{C}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}$ (**A**) e $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{OCH}_3$ (**B**).

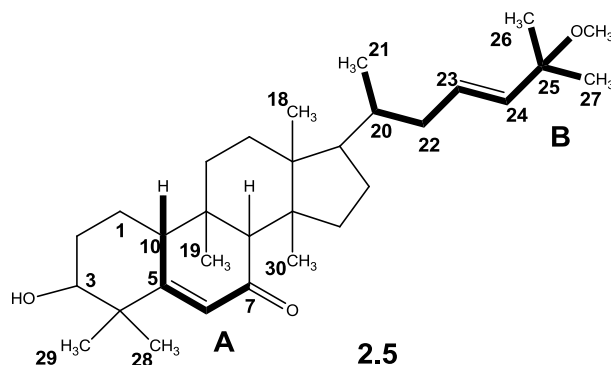


Figura 2.8 Fragmentos estruturais estabelecidos através dos espectros de ^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC para o composto **2.5**.

A localização do carbono carbonílico α,β -insaturado em C-7 (δ_{C} 203,0) foi corroborada pela correlação $^2J_{\text{C-H}}$ observada, no espectro de HMBC, entre este carbono e o protão H-8 (δ_{H} 2,40) e, ainda, pelos efeitos paramagnéticos observados, no espectro de ^{13}C -RMN, para o C-5 (δ_{C} 169,2, $\Delta\delta \approx + 22$), C-6 (δ_{C} 126,0, $\Delta\delta \approx + 5$) e para o C-8 (δ_{C} 59,9, $\Delta\delta \approx + 12$).

A cadeia lateral apresenta uma ligação dupla em C-23 (δ_{C} 128,5) e um grupo metoxilo em C-25 (δ_{C} 75,0), dados suportados pela análise dos espectros de RMN, nomeadamente, pela existência de sinais característicos da presença de um grupo metoxilo (δ_{H} 3,13 e δ_{C} 50,4) e pelas correlações observadas, no espectro de HMBC, entre o carbono C-25 e os protões do grupo metoxilo (25-OMe, δ_{H} 3,13) e entre o carbono 25-OMe (δ_{C} 50,4) e os protões Me-26 e Me-27 (δ_{H} 1,23, sobreposição de sinal). Por sua vez, a localização de ligação dupla di-substituída em C-23, foi comprovada pelas correlações observadas, no espectro de HMBC, entre: o C-22 (δ_{C} 39,5) e os protões vinílicos H-23 (δ_{H} 5,49) e H-24 (δ_{H} 5,37); C-23 e os protões diastereotópicos H-22 (δ_{H} 1,78 e 2,17) e H-24; C-24 (δ_{C} 136,9) e o protão H-23 e os protões dos grupos metilo, Me-26 e Me-27 e entre C-25 e os protões vinílicos H-23/H-24.

A configuração relativa dos centros quirais deste composto, determinada com base no espectro de NOESY (Figura 2.9) e no valor das constantes de acoplamento, é idêntica à observada para os compostos descritos anteriormente. No que diz respeito à ligação dupla da cadeia lateral, foi atribuída a configuração *E*, indicada pelo valor da constante de acoplamento dos prótons vinílicos H-23 e H-24 (*d*, $J = 15,6$ Hz).

A estrutura do composto **2.5** foi corroborada através da comparação dos seus dados, com os valores descritos na literatura para compostos semelhantes (Akihisa *et al*, 1994; Chen *et al*, 2008; Nakamura *et al*, 2006; Ramalhete *et al*, 2009a).

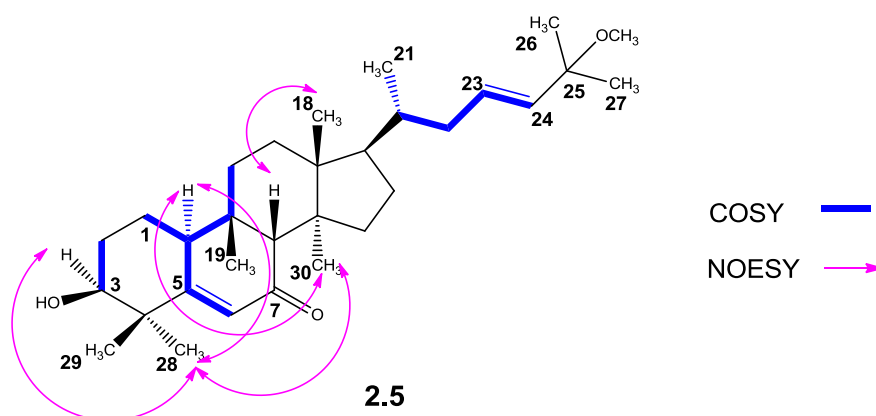
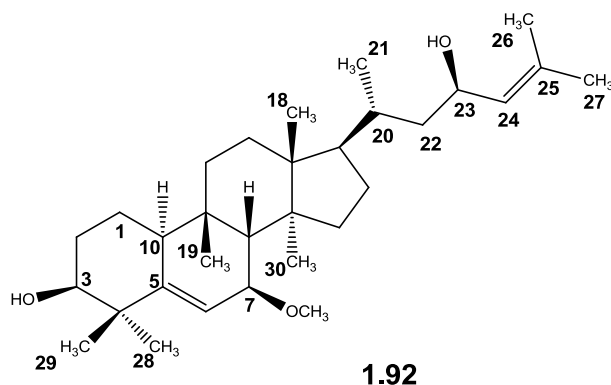


Figura 2.9 Principais correlações observadas nos espectros de COSY e de NOESY.

Tabela 2.7 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto **2.5**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H	NOESY
1	1,72 <i>m</i>	21,0	CH ₂	10	3, 10	
2	1,82 <i>m</i> ; 1,98 <i>m</i>	28,8	CH ₂	3	3	
3	3,64 <i>s largo</i>	76,8	CH	2	1, 2, 28, 29	28
4		42,9	C		3, 6, 28, 29	
5		169,2	C		3, 10, 28, 29	
6	6,08 <i>d</i> (2,1)	126,0	CH	10	8, 10	
7		203,0	C		8	
8	2,40 <i>s</i>	59,9	CH		6, 10, 11, 19, 30	18
9		36,0	C		8, 10, 19	
10	2,70 <i>m</i>	40,4	CH	6, 11, 1	6, 8, 11, 19	28, 30
11	1,45 <i>m</i> ; 1,78 <i>m</i>	31,4	CH ₂	10	8, 10, 19	
12	1,60 <i>m</i> ; 1,73 <i>m</i>	29,9	CH ₂		18	
13		45,8	C		8, 11, 18	
14		48,6	C		8, 30	
15	1,06 <i>m</i> ; 1,57 <i>m</i>	34,7	CH ₂		30	
16	1,35 <i>m</i> ; 1,88 <i>m</i>	27,9	CH ₂			
17	1,45 <i>m</i>	49,7	CH		21	
18	0,87 <i>s</i>	15,5	CH ₃		11	8
19	0,96 <i>s</i>	28,0	CH ₃		8, 10	
20	1,54 <i>m</i>	36,3	CH	21, 22	21, 22	
21	0,89 <i>d</i> (6,1)	19,0	CH ₃	20	22	
22	1,78 <i>m</i> ; 2,17 <i>m</i>	39,5	CH ₂	20, 23	21, 23, 24	
23	5,49 <i>ddd</i> (15,6;8,1;5,4)	128,5	CH	22, 24	22, 24, 26, 27	
24	5,37 <i>d</i> (15,6)	136,9	CH	23	22, 23, 26, 27	
25		75,0	C		23, 24, 25-OMe, 26, 27	
26	1,23 <i>s</i>	26,2	CH ₃		24, 27	
27	1,23 <i>s</i>	25,9	CH ₃		24	
28	1,13 <i>s</i>	28,0	CH ₃		29	3, 10, 30
29	1,24 <i>s</i>	25,0	CH ₃		28	
30	0,81 <i>s</i>	18,1	CH ₃		8	10, 28
25-OMe	3,13 <i>s</i>	50,4	CH ₃		26, 27	

2.6. Karavilagenina C [7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3 β ,23(R)-diol]



O composto **1.92** isolado sob a forma de um sólido cristalino e de carácter dextrogiro, $[\alpha]_D^{20} + 159,8$ (c 0,1, CHCl_3), foi identificado como sendo uma cucurbitacina conhecida, designada por karavilagenina C. A sua fórmula molecular, $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_3$ (IDH de seis), foi deduzida a partir da interpretação do espectro de ^{13}C -RMN.

O espectro de IV exibiu a banda de absorção característica do grupo hidroxilo a 3447 cm^{-1} .

No espectro de ^1H -RMN, observaram-se oito sinais característicos de grupos metilo (singletos a δ_{H} 0,69, 0,94, 0,98, 1,03, 1,20, 1,68, 1,70 e um duplete a δ_{H} 0,97); um grupo metoxilo em C-7 a δ_{H} 3,34; três sinais de oximetinos a δ_{H} 3,42 (*d largo*, $J = 4,0$ Hz), 3,51 (*s largo*) e 4,46 (*ddd*, $J = 9,7, 8,3, 3,1$ Hz), e os prótons vínicos da ligação dupla endocíclica a δ_{H} 5,83 (*d*, $J = 4,8$ Hz) e da ligação dupla da cadeia lateral, a δ_{H} 5,19 (*d largo*, $J = 8,5$ Hz).

Quanto aos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT, a sua análise confirmou a estrutura triterpénica, composta por 31 carbonos, que compreendem nove grupos metilos (incluindo o grupo metoxilo a δ_{C} 56,4 e os metilos alílicos a δ_{C} 18,3 e 25,9); sete metilenos, nove metinos (com três oximetinos a δ_{C} 66,1, 76,9 e 77,4 e dois carbonos com hibridação sp^2 a δ_{C} 121,1 e 129,1) e seis carbonos quaternários (com dois carbonos vinílicos a δ_{C} 134,0 e 146,9).

Com base nos dados espectroscópicos (Tabela 2.8), verificou-se que este composto apresentava o mesmo núcleo triterpénico dos compostos **2.1 - 2.4**, diferindo apenas na constituição da cadeia lateral. Com efeito, os desvios químicos observados no espectro de ^{13}C -RMN indicaram a presença de um grupo hidroxilo (δ_{C} 66,1, C-23) e de uma ligação dupla (δ_{C} 129,1 e 134,0, C-24 e C-25, respetivamente) na cadeia lateral. Deste modo, a comparação dos dados espectroscópicos com os descritos na

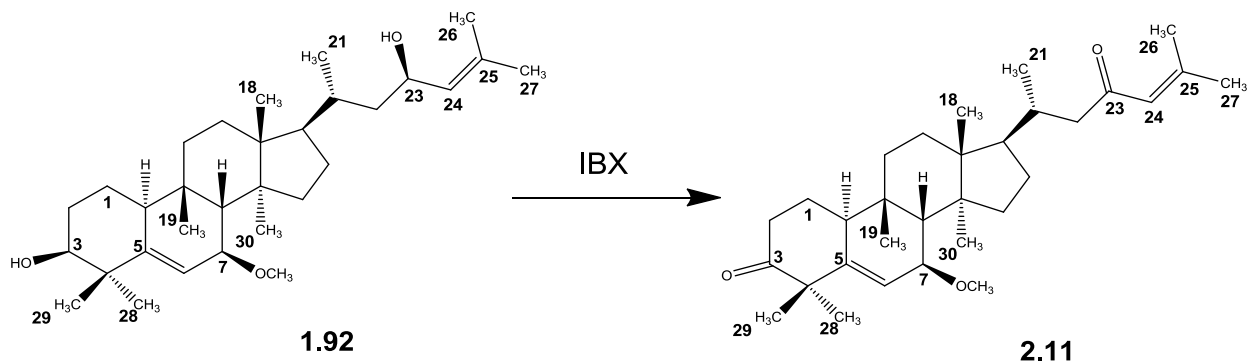
literatura, permitiram a identificação do composto como sendo a karavilagenina C, isolado pela primeira vez a partir dos frutos secos de *Momordica charantia* (Nakamura *et al*, 2006).

Tabela 2.8 Espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e DEPT [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto **1.92**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	Posição	^1H	^{13}C	DEPT
1		21,2	CH ₂	17		50,9	CH
2		28,7	CH ₂	18	0,94 s	15,5	CH ₃
3	3,51 s largo	76,9	CH	19	0,98 s	29,0	CH ₃
4		41,9	C	20		32,8	CH
5		146,9	C	21	0,97 d (6,3)	18,9	CH ₃
6	5,83 d (4,8)	121,1	CH	22		44,6	CH ₂
7	3,42 d largo (4,0)	77,4	CH	23	4,46 ddd (9,7;8,3;3,1)	66,1	CH
8	2,08 s largo	47,9	CH	24	5,19 d largo (8,5)	129,1	CH
9		34,1	C	25		134,0	C
10	2,27 dd (12,8;4,0)	38,8	CH	26	1,68 s largo	18,3	CH ₃
11		32,8	CH ₂	27	1,70 s largo	25,9	CH ₃
12		30,3	CH ₂	28	1,03 s	27,9	CH ₃
13		46,3	C	29	1,20 s	25,5	CH ₃
14		48,1	C	30	0,69 s	18,1	CH ₃
15		34,8	CH ₂	7-OMe	3,34 s	56,4	CH ₃
16		28,0	CH ₂				

2.6.1. Oxidação da karavilagenina C: dicetona em C-3 e C-23

O composto **1.92** foi oxidado a dicetona, via reacção com o ácido 2-iodoxibenzoico (IBX). Nesta reacção ocorreu a oxidação das duas funções hidroxilo presentes na molécula (Esquema 2.1). O produto resultante foi elucidado por análise espectroscópica (Tabela 2.9) e por comparação com os dados espectroscópicos do composto **1.92**.



Esquema 2.1 Reação de oxidação do composto **1.92**.

O composto **2.11**, de carácter dextrogiro, $[\alpha]_D^{20} + 42,8$ (*c* 0,1, CHCl_3), foi obtido sob a forma de um óleo amarelado. O espectro ESIMS exibiu um ião a m/z 507 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (molécula cationizada). A sua fórmula molecular, $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (IDH de oito), foi deduzida a partir dos espectros de RMN.

No espectro de ^1H -RMN destacou-se a ausência dos sinais dos prótons H-3 e H-23 devido à oxidação da função hidroxilo nessas localizações. De salientar, ainda, a presença de apenas um sinal atribuível a um grupo metino ligado a oxigénio a δ_{H} 3,45 (*d largo*, $J = 4,7$ Hz, H-7) e o efeito paramagnético ($\Delta\delta_{\text{H}} \approx + 0,85$ ppm) sofrido pelo sinal do H-24. Estas observações corroboraram a presença de um grupo cetona nos carbonos C-3 e C-23.

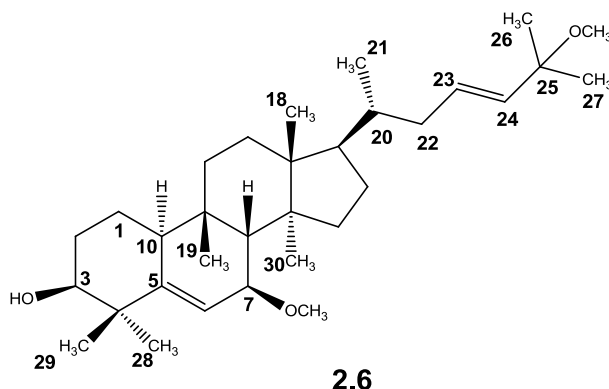
No espectro de ^{13}C -RMN, observaram-se os sinais característicos de nove grupos metilo, sete metilenos (destacando-se aqueles que sofreram efeito paramagnético mais acentuado, como o C-1, C-2 e C-22, com um desvio para campo mais baixo, $\Delta\delta_{\text{C}} \approx +3,5, +9,9$ e $+7,2$ ppm, respetivamente), sete metinos (de salientar a ausência dos metinos em C-3 e C-23 presentes no composto **1.92** e o efeito diamagnético registado no C-24, $\Delta\delta_{\text{C}} \approx - 4,7$ ppm) e oito carbonos quaternários (dois sinais característicos da função carbonilo, C-3 a δ_{C} 214,4 e C-23 a δ_{C} 201,6, para além dos efeitos paramagnéticos observados para o C-4 e C-25, a $\Delta\delta_{\text{C}} \approx +8,9$ e $+21,0$ ppm, respetivamente).

Os espectros bidimensionais (^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC) permitiram confirmar a estrutura do composto **2.11** como 7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona.

Tabela 2.9 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.11.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H
1	1,55 <i>m</i> ; 1,96 <i>m</i>	24,7	CH ₂	10	2, 10
2	2,47 <i>m</i>	38,6	CH ₂		
3		214,4	C		28, 29
4		50,8	C		6, 10, 28, 29
5		147,4	C		7, 28, 29
6	5,90 <i>d</i> (5,0)	120,2	CH	7	7, 8
7	3,45 <i>d largo</i> (4,7)	77,1	CH	6	7-OMe, 8
8	2,04 <i>s</i>	47,9	CH	10, 30	6, 7, 19, 30
9		34,3	C		7, 8
10	2,47 <i>m</i>	39,5	CH	1, 8	2, 6, 8, 19
11	1,52 <i>m</i> ; 1,62 <i>m</i>	32,6	CH ₂		
12	1,55 <i>m</i> ; 1,63 <i>m</i>	30,1	CH ₂		18
13		46,3	C		18
14		48,1	C		8, 30
15	1,34 <i>m</i>	34,8	CH ₂	30	30
16	1,34 <i>m</i>	27,9	CH ₂		
17	1,50 <i>m</i>	50,6	CH	20	
18	0,96 <i>s</i>	15,6	CH ₃		30
19	0,93 <i>s</i>	27,8	CH ₃		8
20	2,07 <i>m</i>	33,4	CH	17, 21, 22	21, 22
21	0,89 <i>d</i> (5,7)	19,9	CH ₃	20	22
22	2,08 <i>m</i> ; 2,46 <i>m</i>	51,8	CH ₂	20	21
23		201,6	C		22, 24, 26, 27
24	6,04 <i>s largo</i>	124,4	CH	26, 27	26, 27
25		155,0	C		26, 27
26	2,12 <i>s</i>	20,8	CH ₃	24, 27	24, 27
27	1,87 <i>s</i>	27,9	CH ₃	24, 26	24, 26
28	1,21 <i>s</i>	28,7	CH ₃		29
29	1,29 <i>s</i>	23,3	CH ₃		28
30	0,74 <i>s</i>	18,1	CH ₃	8, 15	8, 18
7-OMe	3,33 <i>s</i>	56,6	CH ₃		7

2.7. Karavilagenina A [7 β ,25-dimetoxicucurbita-5,23(*E*)-dien-3 β -ol]



O composto **2.6**, isolado sob a forma de pó branco amorfo, com $[\alpha]_D^{20} + 76,98$ (*c* 0,097, MeOH), foi identificado como sendo um cucurbitano já conhecido, designado por karavilagenina A. O espectro ESIMS exibiu um íão a m/z 487 $[M + H]^+$ (molécula protonada). A sua fórmula molecular, $C_{32}H_{54}O_3$ (IDH de seis), foi deduzida a partir dos espectros ESIMS, 1H -RMN e ^{13}C -RMN.

No espectro de IV observou-se a banda de absorção característica da função hidroxilo (3441 cm^{-1}).

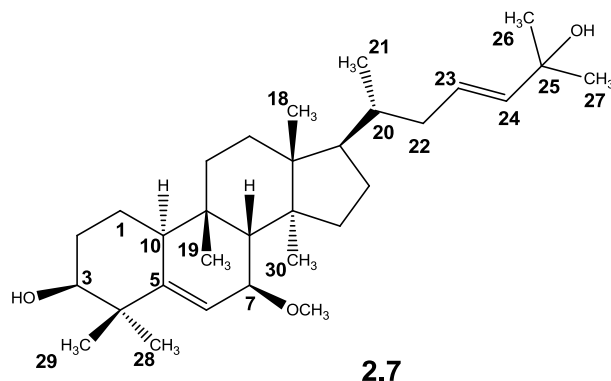
A análise estrutural do composto **2.6** foi realizada por comparação com os espectros de RMN do composto **1.92**, cuja estrutura difere unicamente na constituição da cadeia lateral. A presença da ligação dupla em C-23 foi suportada pela observação dos sinais dos prótons vinílicos a δ_H 5,49 (*ddd*, $J = 15,6, 8,2, 5,5$ Hz, H-23) e a δ_H 5,36 (*d*, $J = 15,6$ Hz, H-24) e dos carbonos com hibridação sp^2 a δ_C 128,6 e 136,8. A presença de um grupo metoxilo em C-25 foi determinada pela observação dos sinais a δ_H 3,12 e δ_C 56,4 e de um carbono quaternário a δ_C 75,0. Por sua vez, as correlações obtidas pelos espectros bidimensionais confirmaram a estrutura da cadeia lateral, nomeadamente, os acoplamentos $^3J_{C-H}$ entre o sinal do carbono 25-OMe (δ_C 50,3) e os prótons Me-26 e Me-27 (δ_H 1,23, sobreposição de sinal) e $^2J_{C-H}$ entre o C-23 (δ_C 128,6) e os prótons H-22 (δ_H 1,76 e 2,19) e H-24 (δ_H 5,36). Deste modo, os dados de RMN (Tabela 2.10) permitiram concluir que o composto **2.6** apresenta uma cadeia lateral idêntica ao do composto **2.5**.

A karavilagenina A (7 β ,25-dimetoxicucurbita-5,23(*E*)-dien-3 β -ol) foi isolada pela primeira vez a partir dos frutos secos de *Momordica charantia* (Nakamura *et al*, 2006) e mais tarde, a partir dos caules amadurecidos da *Momordica charantia* (Chang *et al*, 2008). Com o presente estudo, foi obtida pela primeira vez a partir das partes aéreas de *Momordica balsamina*.

Tabela 2.10 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.6.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H
1	1,55 <i>m</i>	21,2	CH_2	10	3, 10
2	1,73 <i>dd</i> (6,3;2,9)	28,7	CH_2	3	10
3	3,49 <i>t</i> (2,8)	76,8	CH	2	28, 29
4		41,8	C		6, 28, 29
5		146,9	C		3, 7, 10, 28, 29
6	5,81 <i>d</i> (5,5)	120,9	CH	7, 10	7, 8, 29
7	3,40 <i>d largo</i> (5,5)	77,3	CH	6	6, 7-OMe, 8, 10
8	2,02 <i>s largo</i>	48,1	CH		6, 7, 10, 19, 30
9		34,1	C		7, 8, 10, 19
10	2,25 <i>dd</i> (11,4;5,3)	38,8	CH	1, 6, 19	6, 8, 19
11	1,44 <i>m</i> ; 1,59 <i>m</i>	32,7	CH_2		10, 19
12	1,49 <i>m</i> ; 1,62 <i>m</i>	30,1	CH_2		18
13		46,2	C		18
14		48,0	C		8
15	1,32 <i>m</i>	34,8	CH_2		30
16	1,31 <i>m</i> ; 1,88 <i>m</i>	27,7	CH_2		
17	1,46 <i>m</i>	50,0	CH		18
18	0,91 <i>s</i>	15,5	CH_3		
19	0,96 <i>s</i>	28,9	CH_3	10	8, 10
20	1,50 <i>m</i>	36,3	CH	21	21, 22
21	0,88 <i>d</i> (6,0)	18,9	CH_3	20	22
22	1,76 <i>m</i> ; 2,19 <i>m</i>	39,5	CH_2	23	21, 23, 24
23	5,49 <i>ddd</i> (15,6;8,2;5,5)	128,6	CH	22, 24	22, 24, 26, 27
24	5,36 <i>d</i> (15,6)	136,8	CH	23	22, 23, 26, 27
25		75,0	C		23, 24, 26, 27
26	1,23 <i>s</i>	26,2	CH_3		
27	1,23 <i>s</i>	25,9	CH_3		24, 26
28	1,01 <i>s</i>	27,9	CH_3		29
29	1,18 <i>s</i>	25,5	CH_3		28
30	0,67 <i>s</i>	18,1	CH_3		8
7-OMe	3,32 <i>s</i>	56,4	CH_3		7
25-OMe	3,12 <i>s</i>	50,3	CH_3		26, 27

2.8. Karavilagenina B [7 β -metoxicucurbita-5,23(*E*)-dieno-3 β ,25-diol]



O composto **2.7**, com $[\alpha]_D^{20} + 39,2$ (*c* 0,1, MeOH), foi isolado sob a forma de pó branco amorfo e identificado como sendo um triterpeno do tipo cucurbitano, designado por karavilagenina B. O espectro ESIMS exibiu um íão a m/z 495 $[M + Na]^+$ (molécula cationizada). A partir dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$ e ESIMS, deduziu-se a fórmula molecular do composto, $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_3$ (IDH de seis).

O espectro de IV apresentou uma banda de absorção a 3408 cm^{-1} compatível com a existência de grupos hidroxilo na molécula.

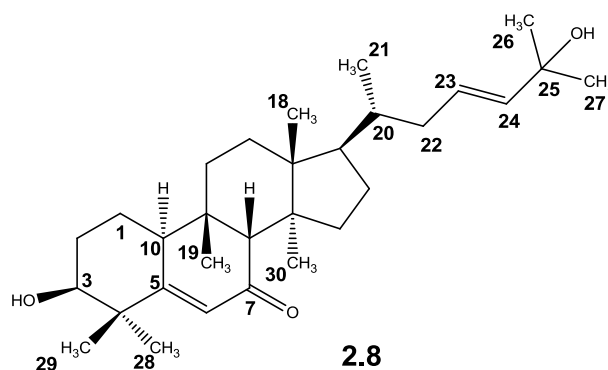
Ao comparar os espectros de RMN do composto **2.7** (Tabela 2.11) com os do composto **2.6**, foi possível verificar que a única diferença entre os dois compostos reside na substituição do grupo metoxilo por um grupo hidroxilo, no carbono C-25. Deste modo, a estrutura do composto **2.7** foi corroborada pela presença, no espectro de $^1\text{H-RMN}$, de apenas um sinal característico de um grupo metoxilo, a δ_{H} 3,30, localizado em C-7, conforme indicou a correlação observada, no espectro de HMBC, entre o carbono 7-OMe (δ_{C} 56,4) e o próton H-7 (δ_{H} 3,44) e entre o carbono C-7 (δ_{C} 78,9) e os prótons 7-OMe (δ_{H} 3,30). Por sua vez, a existência de um sinal, no espectro de $^{13}\text{C-RMN}$, atribuído ao carbono quaternário em C-25 (δ_{C} 71,2), que sofreu um efeito diamagnético de 4 ppm quando comparado com o composto **2.6**, indicou a presença da função hidroxilo.

A identificação da karavilagenina B (7 β -metoxicucurbita-5,23(*E*)-dieno-3 β ,25-diol) foi confirmada pela comparação dos seus dados espectroscópicos com os descritos na literatura. Este composto foi isolado primeira vez a partir dos frutos secos de *Momordica charantia* (Nakamura *et al*, 2006), mais tarde, a partir dos caules amadurecidos dessa mesma espécie (Chang *et al*, 2008), tendo sido pela primeira vez, com o presente estudo, obtido a partir das partes aéreas de *Momordica balsamina*.

Tabela 2.11 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [MeOD_4 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.7.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H
1	1,56 <i>m</i>	22,4	CH_2	10	3
2	1,68 <i>m</i>	30,1	CH_2		
3	3,46 <i>m</i>	77,5	CH		28, 29
4		42,5	C		28, 29
5		149,4	C		3, 7, 28, 29
6	5,76 <i>d</i> (4,7)	120,3	CH	7	7, 8
7	3,44 <i>m</i>	78,9	CH	6	7-OMe, 8
8	2,03 <i>s</i>	49,5	CH		6, 7
9		35,1	C		7, 8
10	2,31 <i>dd</i> (11,3;4,8)	40,3	CH	1	6, 8, 19
11	1,46 <i>m</i> ; 1,66 <i>m</i>	33,8	CH_2		19
12	1,51 <i>m</i> ; 1,90 <i>m</i>	31,3	CH_2		18
13		47,3	C		18
14		49,1	C		8, 18, 30
15	1,34 <i>m</i>	35,8	CH_2		18, 30
16	1,35 <i>m</i> ; 1,90 <i>m</i>	28,7	CH_2		
17	1,51 <i>m</i>	51,2	CH	21	
18	0,94 <i>s</i>	15,9	CH_3		
19	0,95 <i>s</i>	29,4	CH_3		8
20	1,52 <i>m</i>	37,7	CH	21	
21	0,90 <i>d</i> (5,7)	19,3	CH_3	17, 20	
22	2,15 <i>m</i> ; 1,77 <i>m</i>	40,3	CH_2		23, 24
23	5,52 <i>m</i>	125,9	CH		
24	5,52 <i>m</i>	140,8	CH		26, 27
25		71,2	C		23, 24, 26, 27
26	1,23 <i>s</i>	30,1	CH_3		27
27	1,23 <i>s</i>	30,0	CH_3		26
28	1,01 <i>s</i>	28,8	CH_3		29
29	1,16 <i>s</i>	26,0	CH_3		28
30	0,73 <i>s</i>	18,8	CH_3		8
7-OMe	3,30 <i>s</i>	56,4	CH_3		7

2.9. Kuguacina B [cucurbita-5,23(E)-dien-7-ona-3 β ,25-diol]



O composto **2.8** isolado sob a forma de pó branco amorfo e de carácter dextrógiro, $[\alpha]_D^{20} + 81,2$ (c 0,1, CHCl_3), foi identificado como sendo um conhecido triterpeno do tipo cucurbitano designado por kuguacina B. O espectro ESIMS exibiu um ião a m/z 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (molécula protonada) que, conjuntamente com os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, permitiu deduzir a fórmula molecular, $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (IDH de sete).

O espectro de IV apresentou, para além da banda de absorção característica da função hidroxilo (3419 cm^{-1}), uma banda de absorção típica de um grupo carbonilo de uma cetona α,β -insaturada (1645 cm^{-1}).

Com base na análise dos dados espectroscópicos da kuguacina B (Tabela 2.12), concluiu-se que este composto possuía igual cadeia lateral ao composto karavilagenina B (**2.8**) e um núcleo triterpénico semelhante ao composto balsacurbinol (**2.5**).

No espectro de ^1H -RMN observou-se um sinal de um protão oximetino a δ_{H} 3,63 (*s largo*), três sinais de protões vínicos, um atribuível a H-6 a δ_{H} 6,07 (*s largo*) e os outros dois à ligação dupla na cadeia lateral a δ_{H} 5,56 (*m*, H-23 e H-24).

Pela análise dos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT confirmou-se o esqueleto triterpénico tetracíclico do tipo cucurbitano, constituído por 30 carbonos, sendo possível distinguir a presença de oito grupos metilo; sete metilenos; oito metinos, entre os quais, um oximetino a δ_{C} 76,7 e três carbonos com hibridação sp^2 a δ_{C} 125,2, 126,0 e 136,7; um carbono vinílico quaternário a δ_{C} 169,3; um carbono quaternário ligado a um grupo hidroxilo a δ_{C} 70,8 e um carbono carbonílico a δ_{C} 203,1, formando um sistema α,β -insaturado. A presença da função carbonilo α,β -insaturado foi confirmada pela correlação observada entre o carbono C-7 (δ_{C} 203,1) e o sinal do protão H-8 (δ_{H} 2,38), no espectro de HBMC.

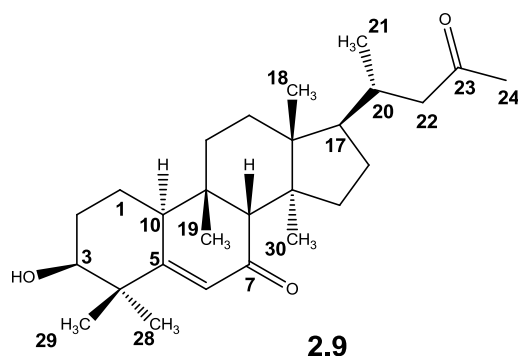
Tabela 2.12 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto **2.8**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H
1	1,71 <i>m</i>	21,0	CH ₂	10	3, 10, 19
2	1,81 <i>m</i> ; 1,96 <i>m</i>	28,8	CH ₂	3	
3	3,63 <i>t</i> (2,6)	76,7	CH	2	28, 29
4		42,9	C		6, 28, 29
5		169,3	C		3, 10, 28, 29
6	6,07 <i>s largo</i>	126,0	CH	10	8, 10
7		203,1	C		8
8	2,38 <i>s</i>	59,9	CH		6, 19, 30
9		35,9	C		8, 10, 19
10	2,69 <i>m</i>	40,4	CH	1, 6	6, 8, 19
11	1,44 <i>m</i> ; 1,75 <i>m</i>	31,4	CH ₂		10, 19
12	1,55 <i>m</i> ; 1,67 <i>m</i>	29,9	CH ₂		18
13		45,8	C		18, 30
14		48,6	C		8, 30
15	1,05 <i>m</i> ; 1,54 <i>m</i>	34,6	CH ₂	16, 30	18, 30
16	1,33 <i>m</i> ; 1,86 <i>m</i>	27,9	CH ₂	15	
17	1,45 <i>m</i>	49,6	CH		21
18	0,86 <i>s</i>	15,5	CH ₃		
19	0,94 <i>s</i>	28,0	CH ₃		8, 10
20	1,47 <i>m</i>	36,4	CH	21	21
21	0,87 <i>d</i> (7,8)	18,9	CH ₃	20	
22	1,72 <i>m</i> ; 2,15 <i>m</i>	39,2	CH ₂	23	21, 23, 24
23	5,56 <i>m</i>	125,2	CH	22	22, 24
24	5,56 <i>m</i>	139,7	CH		22, 23, 26, 27
25		70,8	C		23, 24, 26, 27
26	1,28 <i>s</i>	30,0	CH ₃		27
27	1,28 <i>s</i>	30,1	CH ₃		26
28	1,23 <i>s</i>	24,9	CH ₃		29
29	1,12 <i>s</i>	28,0	CH ₃		28
30	0,81 <i>s</i>	18,1	CH ₃	15	8

Os espectros bidimensionais (^1H - ^1H COSY, HMQC e HMBC), corroboraram as atribuições de carbonos e de prótons.

Deste modo, a estrutura do composto **2.8**, cucurbita-5,23(*E*)-dien-7-ona-3 β ,25-diol, foi comprovada por comparação dos dados espectroscópicos obtidos com os descritos na literatura para o composto Kuguacina B. Este composto foi isolado pela primeira vez a partir das raízes de *Momordica charantia* (Chen *et al*, 2008). Com o presente estudo foi possível obter, pela primeira vez, a Kuguacina B a partir das partes aéreas de *Momordica balsamina*.

2.10. Kuguacina C [25,26,27-*trinor*-cucurbit-5-eno-7,23-dion-3 β -ol]



O composto **2.9** foi obtido sob a forma de um pó branco amorfo e identificado como sendo um triterpeno conhecido designado por kuguacina C, o qual apresentou um carácter dextrógiro, $[\alpha]_D^{20} + 135,3$ (c 0,093, CHCl₃). O espectro ESIMS exibiu um ião a m/z 415 [M + H]⁺ (molécula protonada). A sua fórmula molecular, C₂₇H₄₂O₃ (IDH de sete), foi deduzida a partir dos espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN e ESIMS.

No espectro de IV foram observadas bandas de absorção características da vibração do grupo hidroxilo (3448 cm⁻¹) e de grupos carbonilo, incluindo um grupo carbonilo conjugado (1705 e 1645 cm⁻¹).

Através da análise dos dados espectroscópicos, concluiu-se que a estrutura do composto **2.9** diferia do composto **2.8**, na dimensão e na constituição da cadeia lateral, apresentando idêntico núcleo triterpénico (Tabela 2.13). No espectro de ¹H-RMN, quando comparado com o composto **2.8**, observou-se a presença de um grupo metilo a campo mais baixo, δ_H 2,10. Salienta-se ainda um efeito paramagnético ($\Delta\delta_H \approx + 0,42$ e $+ 0,34$ ppm) sofrido pelos sinais dos prótons diastereotópicos H-22.

Os espectros de ¹³C-RMN e DEPT sustentaram a condição de se tratar de um composto com o esqueleto triterpénico do tipo *trinor*-cucurbitano, constituído por 27 carbonos. Para além da ausência dos sinais C-25, C-26 e C-27, foi possível observar a presença de dois carbonos carbonílicos a δ_C 202,8 e 209,4, atribuíveis a um sistema α,β -insaturado em C-7 e a um grupo carbonilo em C-23, respetivamente, originando este último um efeito paramagnético em C-22 ($\Delta\delta_H \approx + 12,1$ ppm).

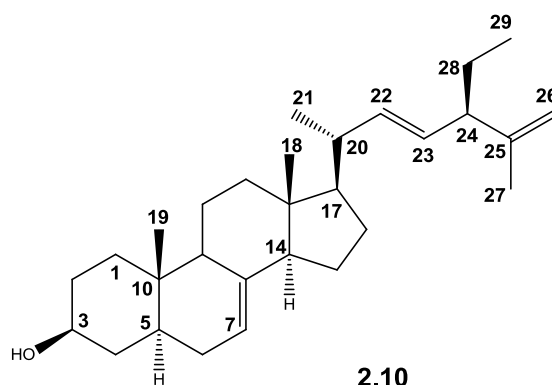
A análise dos espectros bidimensionais (¹H-¹H COSY, HMQC e HMBC) confirmou a localização do grupo carbonilo em C-23, através das correlações ²J_{C-H} observadas entre o C-23 (δ_C 209,4) e o Me-24 (δ_H 2,10) e das correlações ³J_{C-H} entre C-22 (δ_C 51,3) e o Me-24.

Tabela 2.13 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.9.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H
1	1,72 <i>m</i>	21,0	CH ₂	10, 2	3, 10, 19
2	1,82 <i>m</i> ; 1,99 <i>m</i>	28,8	CH ₂	1, 3	11
3	3,65 <i>s largo</i>	76,8	CH	2	1, 28, 29
4		42,9	C		28, 29
5		169,2	C		1, 3, 10, 28, 29
6	6,08 <i>s largo</i>	126,0	CH	10	8, 10, 28
7		202,8	C		8
8	2,40 <i>s</i>	59,8	CH		6, 11, 19, 30
9		35,9	C		8, 10, 11, 19
10	2,69 <i>m</i>	40,4	CH	1, 6	1, 6, 8, 11, 19
11	1,48 <i>m</i> ; 1,75 <i>m</i>	31,4	CH ₂		1, 10, 12, 19
12	1,59 <i>m</i> ; 1,70 <i>m</i>	29,9	CH ₂		
13		45,9	C		8, 11, 12, 18, 30
14		48,7	C		8, 19, 18, 30
15	1,08 <i>m</i> ; 1,55 <i>m</i>	34,6	CH ₂	16, 30	8, 30
16	1,29 <i>m</i> ; 1,82 <i>m</i>	28,2	CH ₂	15	
17	1,48 <i>m</i>	49,8	CH	20	22
18	0,91 <i>s</i>	15,5	CH ₃		11, 12
19	0,96 <i>s</i>	28,0	CH ₃		8, 10, 12
20	2,03 <i>m</i>	33,0	CH	17, 21	21, 22
21	0,90 <i>d</i> (5,6)	19,9	CH ₃	20	22
22	2,14 <i>m</i> ; 2,49 <i>d largo</i> (15,2)	51,3	CH ₂		21, 24
23		209,4	C		22, 24
24	2,10 <i>s</i>	30,7	CH ₃		21
28	1,24 <i>s</i>	25,0	CH ₃		29
29	1,13 <i>s</i>	28,0	CH ₃		28
30	0,83 <i>s</i>	18,2	CH ₃	15	8

Por comparação dos dados espectroscópicos com os valores descritos na literatura para a kuguacin C, foi possível comprovar a identificação da sua estrutura 25,26,27-*trinor*-cucurbit-5-eno-7,23-dion-3 β -ol. Este composto foi isolado pela primeira vez a partir das raízes de *Momordica charantia* (Chen *et al*, 2008). Com o presente estudo foi possível isolar, pela primeira vez, a kuguacina C a partir das partes aéreas de *Momordica balsamina*.

2.11. 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol



O composto **2.10**, isolado sob a forma de um pó branco amorfo e de carácter dextrogiro, $[\alpha]_D^{20} + 1,4$ (c 0,1, CHCl_3), foi identificado como sendo o 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol, um dos principais esteróides presente em várias plantas da família Cucurbitaceae. O espectro ESIMS exibiu um ião a m/z 393 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$. A fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}$, deduzida através da análise dos seus espectros de ESIMS, ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (Tabela 2.14), corresponde a um IDH de sete.

O espectro de IV, exibiu bandas características do grupo hidroxilo a 3421 cm^{-1} , bem como do grupo metileno terminal a 1639 cm^{-1} .

No espectro de ^1H -RMN foram visíveis cinco sinais característicos de grupos metilo (singuletos a δ_{H} 0,54 e 0,79, singuleto largo a δ_{H} 1,65, um duplete a δ_{H} 1,01 e um tripleto a δ_{H} 0,83), um sinal característico de um protão geminal a um grupo hidroxilo a δ_{H} 3,58 (*m*) e sinais pertencentes a protões vínilicos (δ_{H} 5,22, 5,20, 5,15 e 4,70).

A constituição da estrutura por 29 carbonos foi indicada pelos espectros de ^{13}C -RMN e DEPT, nos quais se observaram cinco grupos metilo, dez metilenos (salientando-se o carbono vínilico da ligação dupla terminal a δ_{C} 109,7), dez metinos (um oximetino a δ_{C} 71,2, três carbonos com hibridação sp^2 a δ_{C} 117,6, 130,3 e 137,2) e quatro carbonos quaternários (dois carbonos vínilicos a δ_{C} 139,6 e 148,7).

Por comparação dos dados físicos e espectroscópicos obtidos com os descritos na literatura para o composto 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol, confirmou-se estar perante o mesmo composto. A configuração em C-24 do composto **2.10** foi corroborada pela análise do espectro de NOESY.

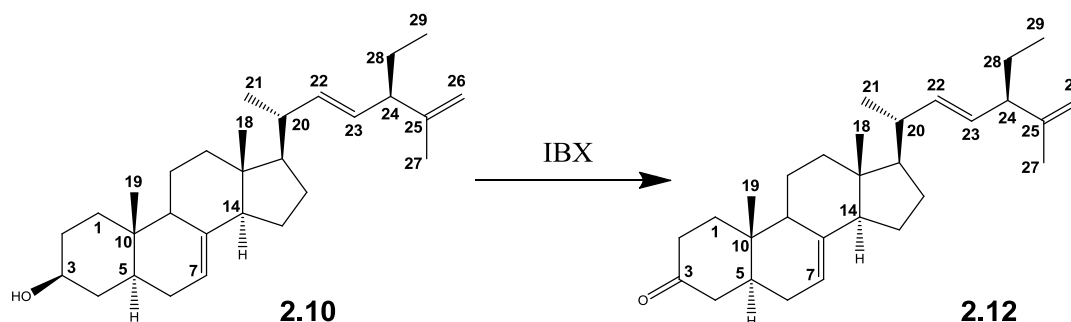
Tabela 2.14 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY e HMBC [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto 2.10.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H	NOESY
1	1,08 m; 1,76 m	37,3	CH ₂		19	
2	1,41 m; 1,80 m	31,6	CH ₂		19	
3	3,58 m	71,2	CH	4		14
4	1,68 m	38,1	CH ₂	3		
5	1,30 m	40,4	CH		19	
6	1,75 m	29,8	CH ₂	7		
7	5,15 m	117,6	CH	6		
8		139,6	C			
9	1,65 m	49,6	CH		7, 12, 19	
10		34,4	C		19	
11	1,56 m	21,7	CH ₂		12, 19	
12	1,23 m; 1,97 m	39,6	CH ₂		18	
13		43,5	C		12, 18	
14	1,77 m	55,2	CH		12, 18	3, 22, 23
15	1,46 m	23,1	CH ₂			
16	1,75 m	28,5	CH ₂			
17	1,26 m	55,9	CH	20	21	22, 23
18	0,54 s	12,2	CH ₃			20, 28
19	0,79 s	13,2	CH ₃			28
20	2,03 m	40,7	CH	17, 21, 22	21, 22, 23	18
21	1,01 d (6,6)	21,1	CH ₃	20		22, 23, 29
22	5,20 m	137,2	CH	20, 23	20, 21, 23, 24	14, 21, 17, 24
23	5,22 m	130,3	CH	22, 24	20, 22, 24	14, 21, 17, 24
24	2,42 q (7,0)	52,2	CH	23, 28	22, 23, 26, 27, 28, 29	22, 23, 29
25		148,7	C		24, 26, 27	
26	4,70 m	109,9	CH ₂	27	24, 27	
27	1,65 s largo	20,4	CH ₃	26	24, 26	
28	1,42 m	25,8	CH ₂	24, 29	24, 29	18, 19
29	0,83 t (7,4)	12,3	CH ₃	28	24	21, 24

Este composto foi isolado anteriormente a partir folhas de *Cucurbits maxima* em 2005, não tendo sido ainda descrito o seu isolamento a partir de *Momordica balsamina* (Ragasa e Lim, 2005; Sucrow, 1966).

2.11.1. Oxidação do 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol: cetona em C-3

Da reação do composto **2.10** com IBX resultou o composto **2.12** (Esquema 2.2). A oxidação do grupo hidroxilo a cetona, em C-3, foi confirmada através dos dados espectroscópicos obtidos para este composto (Tabela 2.15).



Esquema 2.2 Reação de oxidação do composto **2.10**.

O composto **2.12**, com $[\alpha]_D^{20} + 29$ (c 0,1, CHCl₃), foi obtido sob a forma de pó branco amorfo, com a correspondente fórmula molecular, C₂₉H₄₄O (IDH de oito), deduzida a partir dos espectros de RMN e de ESIMS. O espectro de ESIMS exibiu um ião a m/z 454 [M + 2Na]⁺ (molécula cationizada).

A presença de uma função cetona na molécula foi evidente no espectro de IV através da banda observada a 1716 cm⁻¹, característica do grupo carbonilo.

As principais diferenças entre o composto **2.10** e **2.12** foram observadas no anel A. No espectro de ¹H-RMN, a ausência do próton H-3 indicou a oxidação da função hidroxilo nesta posição. Por outro lado, a presença de uma cetona em C-3 foi corroborada pela observação de um efeito paramagnético nos deslocamentos químicos dos prótons H-2 ($\Delta\delta_H \approx + 0,86$; + 0,60 ppm) e H-4 ($\Delta\delta_H \approx + 0,55$ ppm).

No espectro de ¹³C-RMN, salienta-se a ausência do metino em C-3 e a observação de um sinal de um carbono quaternário, característico da função carbonilo em C-3, a δ_C 212,2. Os sinais dos dois metilenos, C-2 e C-4, sofreram um efeito paramagnético acentuado ($\Delta\delta_C \approx + 6,7$ e + 6,3 ppm, respetivamente).

Os espectros bidimensionais (¹H-¹H COSY, HMQC e HMBC) permitiram confirmar a identificação do composto e estabelecer a estrutura 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona.

Tabela 2.15 Espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT e principais correlações observadas nas experiências de COSY, HMBC e NOESY [CDCl_3 , 300 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C), δ (ppm), (J em Hz)] para o composto **2.12**.

Posição	^1H	^{13}C	DEPT	^1H - ^1H COSY	HMBC C-H	NOESY
1	1,45 <i>m</i> ; 2,12 <i>ddd</i> (13,3; 5,9; 2,4)	38,9	CH_2	2	2, 19	
2	2,27 <i>m</i> ; 2,42 <i>m</i>	38,3	CH_2	1	1	
3		212,2	C		1, 2, 4	
4	2,23 <i>m</i>	44,4	CH_2	5		
5	1,83 <i>m</i>	43,0	CH	4	4, 19	17, 21
6	1,83 <i>m</i>	30,2	CH_2	7	4	
7	5,17 <i>m</i>	117,2	CH	6		
8		139,6	C			
9	1,73 <i>m</i>	49,0	CH		7, 12, 19	
10		34,5	C		1, 2, 4, 19	
11	1,60 <i>m</i>	21,8	CH_2			
12	1,28 <i>m</i> ; 2,02 <i>m</i>	39,5	CH_2		18	
13		43,4	C		12, 18, 20	
14	1,83 <i>m</i>	55,1	CH		7, 12, 18	
15	1,40 <i>m</i> ; 1,50 <i>m</i>	23,1	CH_2			
16	1,28 <i>m</i> ; 1,75 <i>m</i>	28,4	CH_2			
17	1,27 <i>m</i>	55,9	CH	20	21	5
18	0,57 <i>s</i>	12,3	CH_3			19, 20
19	1,01 <i>s</i>	12,6	CH_3			18, 20
20	2,03 <i>m</i>	40,7	CH	17, 21, 22	21, 22, 23	18, 19
21	1,02 <i>d</i> (6,2)	21,1	CH_3	20	20	5, 24
22	5,21 <i>m</i>	137,1	CH	20	20, 21, 24	
23	5,21 <i>m</i>	130,4	CH	24	20, 21, 22, 24, 28	
24	2,42 <i>m</i>	52,1	CH	23, 28	22, 23, 26, 27, 28, 29	21, 29
25		148,7	C		24, 26, 27, 28	
26	4,70 <i>m</i>	109,7	CH_2	27	24, 27	
27	1,65 <i>s</i>	20,4	CH_3	26	22, 23, 24, 26, 28	
28	1,42 <i>m</i>	25,8	CH_2	24, 29	24, 29	
29	0,83 <i>t</i> (7,3)	12,3	CH_3	28	24, 28	24

2.12. Reversão da multirresistência mediada pela glicoproteína-P

Os ensaios de reversão da MDR em células tumorais decorreram na Universidade de Szeged, Hungria, no Institute of Medical Microbiology sob a coordenação do Professor Joseph Molnar e da Dra. Gabriella Sengler.

Neste estudo, analisou-se a capacidade dos compostos **1.92** e **2.1-2.12**, reverterem a MDR, através da avaliação da sua capacidade de inibir a atividade da P-gp. A sobre-expressão da P-gp, como mencionado anteriormente, está associada ao comprometimento da eficácia dos fármacos antitumorais, sendo um dos possíveis mecanismos responsáveis pela ocorrência da MDR.

Por conseguinte, os compostos foram avaliados quanto ao seu efeito citotóxico e pela capacidade de modular a P-gp em células T L5178Y de linfoma de rato transfetadas (células MDR) ou não (células PAR) com o gene humano *ABCB1* e em células do adenocarcinoma do colón humano multirresistentes (Colo 320 células MDR) ou quimiossensíveis (Colo 205).

2.12.1. Ensaio de citotoxicidade in vitro

A atividade citotóxica dos compostos (**1.92** e **2.1 - 2.12**) foi determinada nas duas linhas de células acima referidas, através do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT).

A análise dos valores de IC_{50} obtidos (Tabela 2.16) permitiu concluir que os compostos na sua globalidade apresentaram uma citotoxicidade baixa, como é o caso do composto **2.12** com um $IC_{50} = 18,3 \pm 1,8 \mu\text{M}$ (células Colo 205), ou foram inativos nas concentrações testadas ($IC_{50} > 20 \mu\text{M}$) para as células do adenocarcinoma do colón humano (Colo 205 e Colo 320).

Relativamente às células T L5178Y de linfoma de rato, os efeitos citotóxicos não foram significativos, exceto para os compostos **2.12** ($IC_{50} = 6,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$) e **2.10** ($IC_{50} = 18,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$) nas células sensíveis.

Tabela 2.16 Atividade citotóxica dos compostos (1.92 e 2.1 - 2.12) nas células de linfoma de rato L5178Y (células PAR), nas células T de linfoma de rato transfetadas com o gene humano *ABCB1* (células MDR) e nas células do adenocarcinoma do cólon humano quimiossensíveis (Colo 205) e multirresistentes (Colo 320).

Composto	IC ₅₀ ^a (μM)			
	células T de linfoma de rato L5178Y		células do adenocarcinoma do cólon humano	
	Células PAR	Células MDR	Colo 205	Colo 320
1.92	73,7 ± 0,0	60,3 ± 0,0	48,4 ± 1,7	40,4 ± 0,0
2.1	31 ± 1,8	49,4 ± 0,0	43 ± 1,7	48,6 ± 1,4
2.2	44,7 ± 0,0	28,7 ± 1,2	46,3 ± 2,7	25,9 ± 2,5
2.3	> 100	> 100	> 100	> 100
2.4	> 100	71,4 ± 4,0	> 100	81,5 ± 0,0
2.5	54,6 ± 0,0	81,5 ± 0,0	54,6 ± 0,0	44,4 ± 0,5
2.6	44,7 ± 0,0	66,7 ± 0,0	33,7 ± 1,0	32,2 ± 1,3
2.7	44,7 ± 0,0	65,1 ± 2,3	60,3 ± 0,0	54,6 ± 0,0
2.8	35,4 ± 2,0	60,3 ± 0,0	66,7 ± 0,0	54,6 ± 0,0
2.9	73,7 ± 0,0	78,8 ± 2,4	> 100	> 100
2.10	18,6 ± 0,6	47,8 ± 2,3	23,6 ± 2,4	37,8 ± 1,6
2.11	57,2 ± 1,9	54,6 ± 0,0	60,3 ± 0,0	46,4 ± 1,5
2.12	6,2 ± 0,2	25,4 ± 1,5	18,3 ± 1,8	41,7 ± 1,8

^a Valores de IC₅₀ são expressos pela média ± desvio padrão da média de três ensaios independentes

2.12.2. Modulação da multirresistência farmacológica em células de linfoma de rato e do adenocarcinoma do cólon humano

Para avaliar a capacidade moduladora da MDR dos compostos em estudo, utilizou-se o ensaio de acumulação intracelular da rodamina 123, através da técnica de citometria de fluxo, nas linhas celulares de linfoma de rato e do adenocarcinoma do cólon humano.

O potencial dos compostos na modulação da P-gp foi avaliado através do valor da razão da atividade de fluorescência (FAR) obtido a partir da equação descrita nos procedimentos experimentais:

$$FAR = \frac{(FL-1)_{MDR + composto} / (FL-1)_{MDR \text{ controle}}}{(FL-1)_{PAR + composto} / (FL-1)_{PAR \text{ controle}}}$$

Relativamente às células de linfoma de rato, compostos que apresentem valores de FAR > 1, a uma determinada concentração, são considerados ativos como moduladores da P-gp. Por sua vez, aqueles que apresentem valores de FAR superiores a 10 são considerados moduladores fortes da P-gp (Voigt *et al*, 2007).

Os compostos foram testados em concentrações de 2 μ M e 20 μ M, e, em alguns casos, a 0,2 μ M. Como controlo positivo utilizou-se o verapamil. Os resultados obtidos foram expressos na tabela 2.17.

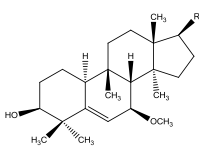
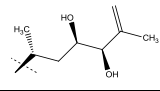
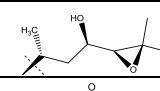
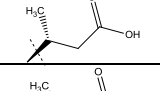
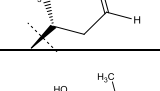
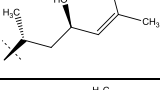
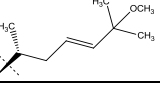
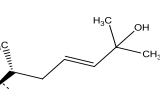
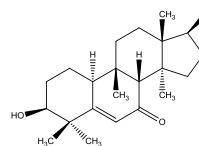
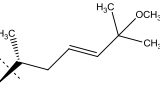
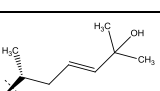
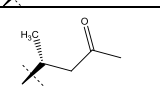
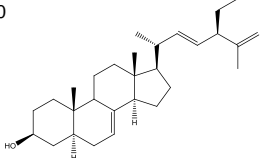
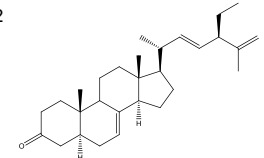
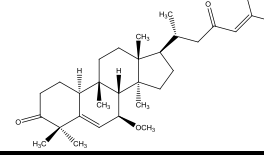
A análise da tabela 2.17 permite-nos concluir que, quando comparados com o controlo positivo, a maioria dos compostos, a 20 μ M, exibiu um forte efeito inibitório da P-gp, observando-se um aumento dos valores de FAR até cerca de 20 vezes superior para as células de linfoma de rato e até cerca de 6 vezes superior nas células do adenocarcinoma do cólon humano, em relação aos valores obtidos para o verapamil.

Relativamente às células L5178Y, a 20 μ M, dos treze compostos em estudo, dez mostraram ser moduladores muito fortes da P-gp, destacando-se os compostos karavilagenina C (**1.92**), balsacurbitriol (**2.1**), balsacurbepoxitol (**2.2**), balsacurbinol (**2.5**), karavilagenina B (**2.7**) e o 7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona (**2.11**) com valores de FAR de 80,38, 74,01, 70,88, 137,77, 91,31 e 105,46, respetivamente. A esta concentração, apenas o composto ácido balsacurbitóico (**2.3**) e o esteroide oxidado (**2.12**) não apresentaram atividade significativa. A 2 μ M, a maioria dos compostos demonstraram ser ativos, tendo os compostos karavilagenina C (**1.92**), balsacurbinol (**2.5**), karavilagenina B (**2.7**) e o 7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona (**2.11**), mostrando forte atividade inibitória, com valores de FAR de 12,83, 14,82, 40,40 e 27,17, respetivamente. Quando testados a 0,2 μ M, a karavilagenina B (**2.7**) e o composto 7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona (**2.11**), demonstraram manter a sua atividade como moduladores (FAR = 1,11 e 1,07, respetivamente; verapamil, FAR = 1,05).

No que diz respeito às células do Colo 320, na concentração de 20 μ M, cinco compostos, karavilagenina C (**1.92**), balsacurbitriol (**2.1**), balsacurbepoxitol (**2.2**), balsacurbinol (**2.5**) e karavilagenina B (**2.7**), mostraram uma forte atividade inibitória com valores de FAR de 21,77, 29,75, 23,8, 14,66 e 18,2, respetivamente. Os restantes compostos foram ativos, excetuando o composto 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona (**2.12**). Quando testados a 2 μ M, verificou-se que na sua grande maioria, os compostos apresentaram atividade como moduladores da P-gp.

Os compostos 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol (**2.10**) e 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona (**2.12**), para os quais foram encontrados os menores valores de FAR, foram simultaneamente os que apresentaram uma maior atividade citotóxica.

Tabela 2.17 Efeito dos compostos **1.92** e **2.1 - 2.12** na reversão da MDR em células T de linfoma de rato transfetadas com o gene humano *ABCB1* (L5178Y) e do adenocarcinoma do cólon humano multirresistentes (Colo 320).

Composto			Conc. (μM)	FAR		
Núcleo	Nº	Cadeia lateral		L5178Y	Colo 320	
Cucurbitacinas						
	2.1		2	5,11	3,12	
			20	74,01	29,75	
	2.2		2	9,69	3,47	
			20	70,88	23,8	
	2.3		2	1,11	1,18	
			20	1,59	1,61	
	2.4		2	1,36	0,68	
			20	58,24	4,86	
	1.92		0,2	0,93	-	
			2	12,83	3,09	
20			80,38	21,77		
2.6		2	6,99	1,73		
		20	54,95	7,36		
2.7		0,2	1,11	-		
		2	40,40	3,43		
		20	91,31	18,2		
	2.5		0,2	0,96	-	
			2	14,82	1,90	
			20	137,77	14,66	
	2.8		2	6,14	1,62	
			20	56,97	7,63	
	2.9		2	1,52	1,39	
20			16,36	2,22		
Esteroides						
2.10				2	1,29	1,24
				20	7,30	2,00
Derivados						
2.12				2	1,11	0,99
				20	1,05	0,56
2.11				0,2	1,07	-
				2	27,17	1,84
				20	105,46	9,93
Verapamil				0,2	1,05	-
				20	6,02	4,49

2.12.3. Relação estrutura-atividade

De modo a poder tecer algumas considerações de relação estrutura-atividade, nas Figuras 2.10 a 2.13 apresenta-se a atividade dos compostos (**1.92**, **2.1-2.9** e **2.11**), por ordem decrescente de valores de FAR, obtidos a 20 μM e a 2 μM . Para facilitar a análise, organizaram-se os compostos em três grupos de acordo com a estrutura do núcleo triterpénico (**A**, **B** e **C**). Como se pode observar, diferentes grupos substituintes levaram a diferentes atividades inibidoras da P-gp. As próprias características intrínsecas das duas linhas celulares em estudo pareceram exercer igualmente influência no desempenho dos compostos na reversão da MDR.

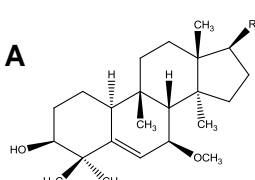
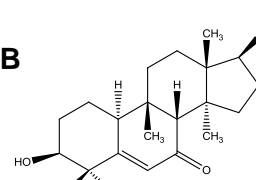
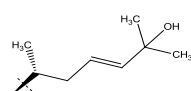
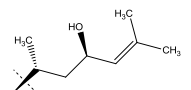
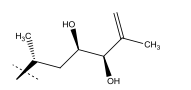
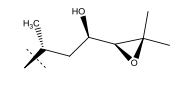
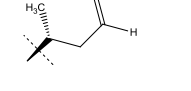
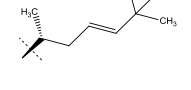
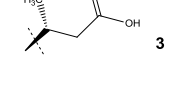
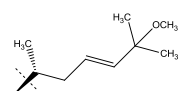
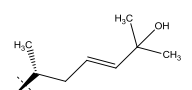
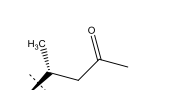
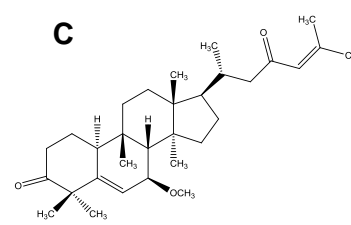
FAR (L5178Y)			
 <p>A</p>	20 μM	 <p>B</p>	20 μM
<p>Nº</p> <p>2.7</p>  <p>1.92</p>  <p>2.1</p>  <p>2.2</p>  <p>2.4</p>  <p>2.6</p>  <p>2.3</p>  <p>3</p>	<p>91,31</p> <p>80,38</p> <p>74,01</p> <p>70,88</p> <p>58,24</p> <p>54,95</p> <p>1,59</p>	<p>Nº</p> <p>2.5</p>  <p>2.8</p>  <p>2.9</p>  <p>Nº</p> <p>2.11</p>  <p>C</p>	<p>137,77</p> <p>56,97</p> <p>16,36</p> <p>105,46</p>

Figura 2.10 Relação estrutura-atividade e respetivos valores de FAR para os compostos **1.92**, **2.1 - 2.9** e **2.11**, para as células L5178Y a 20 μM .

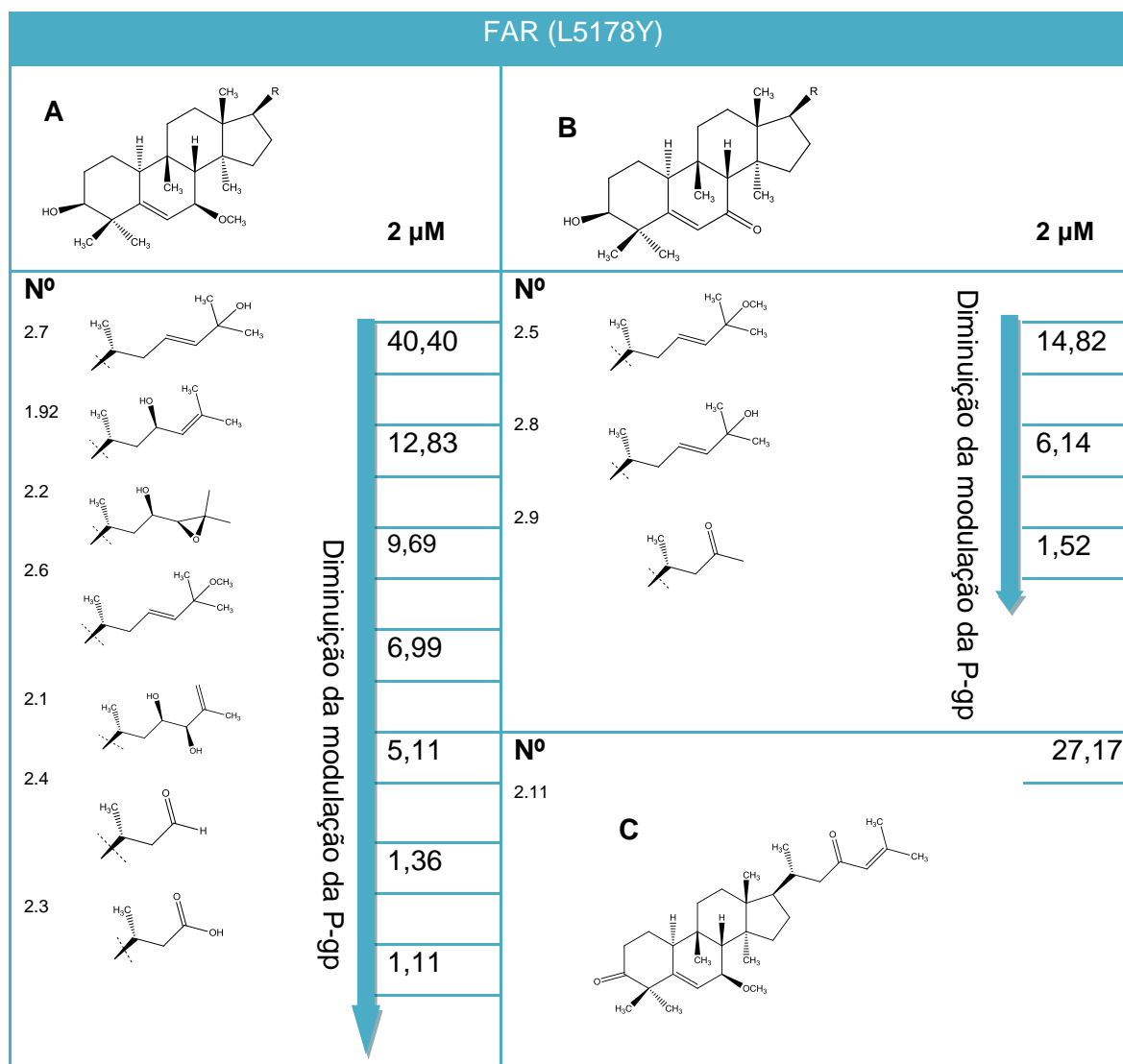


Figura 2.11 Relação estrutura-atividade e respectivos valores de FAR para os compostos **1.92**, **2.1 - 2.9** e **2.11**, para as células L5178Y a 2 μM.

Como se pode observar nas Figuras 2.10 e 2.11, de entre os compostos com o núcleo cucurbitano do tipo **A**, quando testados a 20 μM e a 2 μM, nas células de linfoma de rato, a karavilagenina **B (2.7)** foi o composto mais ativo (FAR = 91,31 e 40,40, a 20 e a 2 μM, respetivamente). A atividade diminui na karavilagenina **A (2.6)** (FAR = 54,95 e 6,9, a 20 e a 2 μM, respetivamente) que difere de karavilagenina **B (2.7)** devido à presença de um grupo metoxilo em C-25, o que sugere que a presença do grupo hidroxilo neste carbono poderá ser importante na atividade moduladora da P-gp. Quando se comparam os resultados obtidos para os compostos *tetranor* com o núcleo cucurbitano **A (2.3 e 2.4)**, a função aldeído em C-23 no balsacurbital (**2.4**) (FAR = 58,24 e 1,36, a 20 e a 2 μM, respetivamente) parece ter contribuído para a atividade

deste composto. Com efeito, o ácido balsacurbitóico (**2.3**), com uma função ácido carboxílico em C-23, não apresentou atividade significativa (FAR = 1,59 e 1,11, a 20 e a 2 μ M, respetivamente). Por sua vez, de entre os compostos com o núcleo cucurbitano do tipo **B**, o balsacurbinol (**2.5**) foi o mais ativo (FAR = 137,77 e 14,82, a 20 e a 2 μ M, respetivamente). Ao contrário do par de compostos **2.6** e **2.7** (tipo **A**), a substituição do grupo metoxilo em C-25, presente no balsacurbinol (**2.5**), por um grupo hidroxilo na kuguacina B (**2.8**) levou a uma diminuição significativa da atividade (FAR = 56,97 e 6,14, a 20 e a 2 μ M, respetivamente). Quando comparado com a karavilagenina A (**2.6**) (grupo **A**), com a mesma cadeia lateral, poderá concluir-se que a presença de uma cetona α,β -insaturada em C-7 no composto **2.5** aumentou a afinidade com a P-gp. Os menores valores de FAR da kuguacina C (**2.9**), com uma cadeia lateral mais curta (FAR = 16,36 e 1,52, a 20 e a 2 μ M, respetivamente), quando comparados com os valores obtidos para os compostos **2.5** e **2.8**, corroboram a importância dos grupos funcionais e do número de carbonos da cadeia lateral, na atividade moduladora.

De salientar ainda o aumento da atividade moduladora do derivado oxidado em C-3 e C-23 (**2.11**) (FAR = 105,46 e 27,17, a 20 e a 2 μ M, respetivamente) da karavilagenina C (**1.92**) (FAR = 80,38 e 12,83, a 20 e a 2 μ M, respetivamente).

Quando testados nas células multirresistentes do adenocarcinoma do colón humano a 20 μ M (Figura 2.12), o balsacurbitriol (**2.1**) mostrou ser o mais ativo (FAR = 29,75), reforçando a hipótese de que a atividade moduladora da P-gp depende das próprias características das linhas celulares. Por sua vez, a 2 μ M (Figura 2.13), a maior atividade observada correspondeu ao balsacurbepoxitol (**2.2**) (FAR = 3,47). Apesar de haver diferenças significativas nas duas linhas celulares, a maioria dos resultados obtidos nas células do adenocarcinoma do colón permitiu reforçar as conclusões referidas anteriormente. Salientam-se por exemplo as diferenças de atividade da karavilagenina A (**2.6**) a 20 μ M (FAR = 7,36 e 1,73, a 20 e a 2 μ M, respetivamente), em relação à karavilagenina B (**2.7**) (FAR = 18,2 e 3,43, a 20 e a 2 μ M, respetivamente), que corroboram os resultados obtidos com as células de linfoma de rato em relação à influência do substituinte em C-25. Do mesmo modo, o balsacurbinol (**2.5**) foi mais ativo (FAR = 14,66 e 1,90, a 20 e a 2 μ M, respetivamente) que o composto kuguacina B (**2.8**) (FAR = 7,63 e 1,62, a 20 e a 2 μ M, respetivamente). Destaca-se, no entanto, a diminuição da atividade do derivado oxidado (**2.11**) (FAR = 9,93 e 1,84, a 20 e a 2 μ M, respetivamente) da karavilagenina C (**1.92**) (FAR = 21,77 e 3,09, a 20 e a 2 μ M, respetivamente), ao contrário do que aconteceu nas células de linfoma de rato.

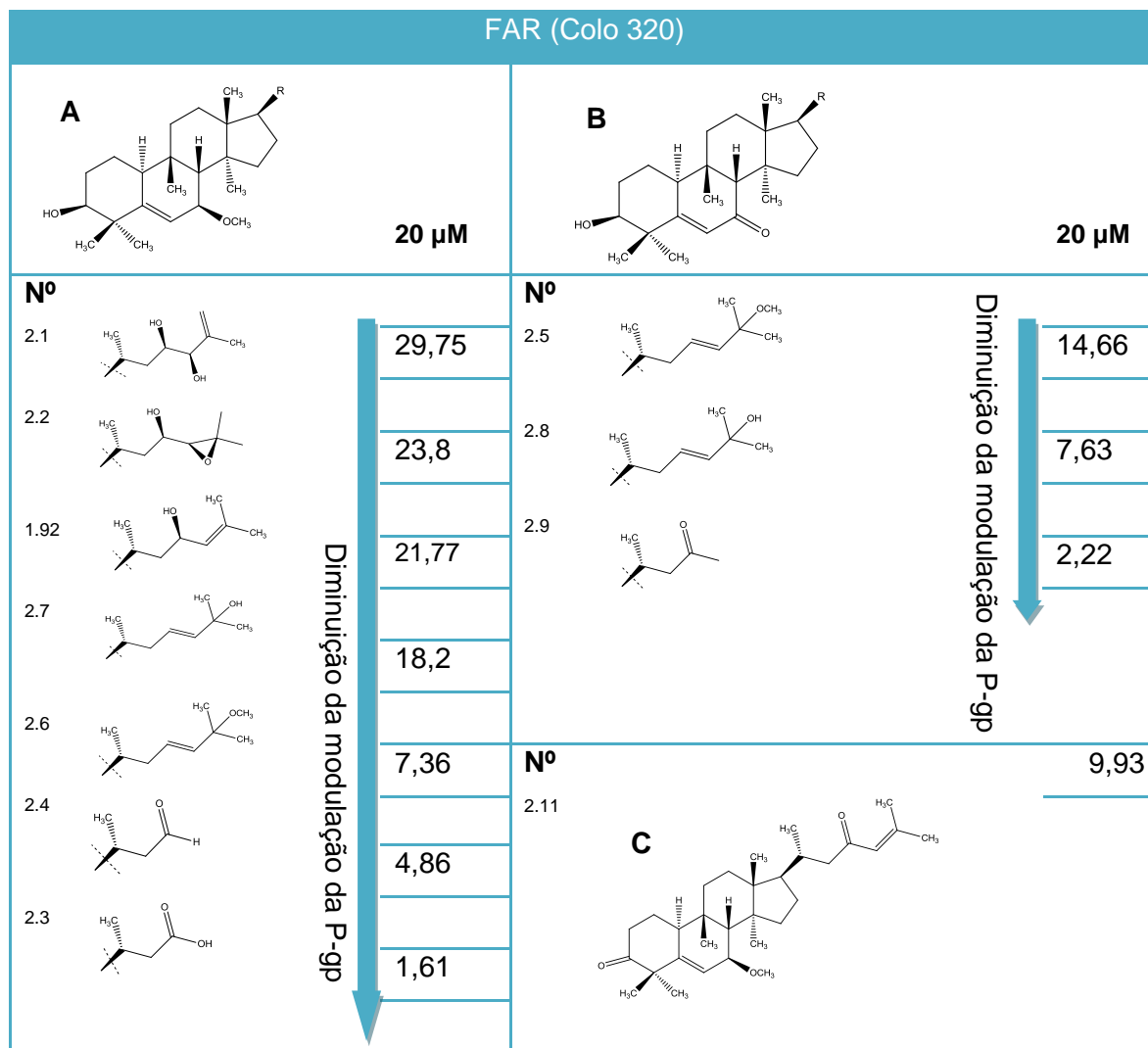


Figura 2.12 Relação estrutura-atividade e respectivos valores de FAR para os compostos 1.92, 2.1 - 2.9 e 2.11, para as células Colo 320 a 20 μM.

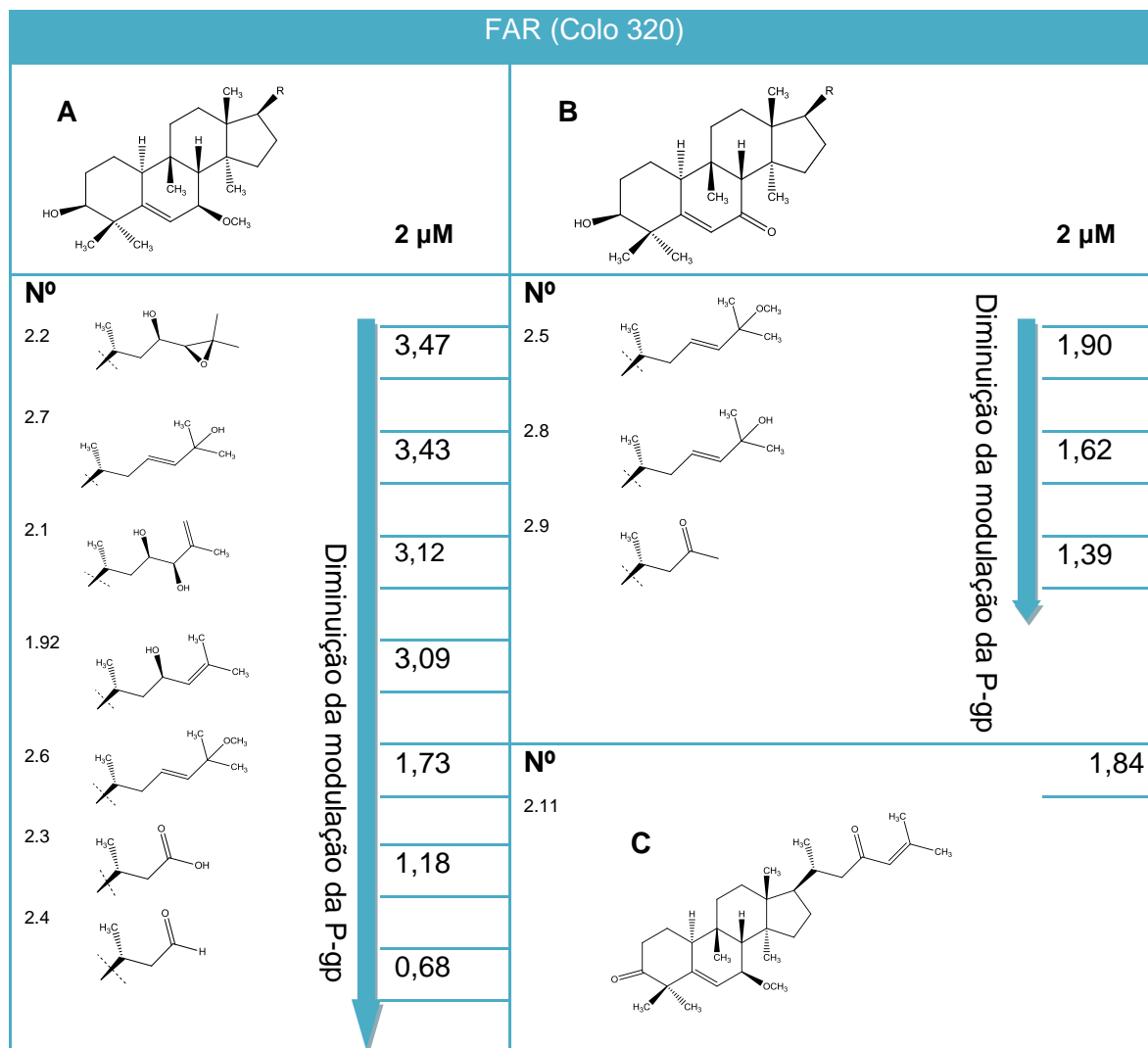


Figura 2.13 Relação estrutura-atividade e respectivos valores de FAR para os compostos 1.92, 2.1 - 2.9 e 2.11, para as células Colo 320 a 2 μM.

Na tabela 2.18 apresentam-se algumas propriedades físico-químicas calculadas para os compostos **1.92** e **2.1 - 2.12**. De modo a avaliar a influência destas propriedades, foi realizado um estudo estatístico, no qual nenhuma correlação significativa foi encontrada ($0,0 \leq r^2 \leq 0,6$) dada a reduzida dimensão da amostra. Os compostos mais ativos (**2.5** e **2.7**) nas células L5178Y apresentaram elevados valores de $\log P$ (7,0 e 6,7), uma TPSA de 46,5 e 49,7 Å², possibilidade de estabelecer entre 4 a 5 ligações de hidrogénio, um peso molecular de 470,7 e 472,8 g/mol e um volume de 493,4 e 499,3 Å³. Por sua vez, os compostos **2.1** e **2.2**, que apresentaram maior atividade nas células do adenocarcinoma do cólon humano, possuem valores de $\log P$ de 5 e 5,2, o maior peso molecular (448,8 g/mol), volumes moleculares entre os mais elevados (508,2 e 503,7 Å³), TPSA mais elevadas de 69,9 e 62,2 Å² e o maior número de possibilidades de estabelecer ligações de hidrogénio (7 e 6). Conforme se pode verificar pela análise da tabela 2.18, os compostos 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol (**2.10**) e 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona (**2.12**), aos quais está associada uma baixa atividade/inatividade, apresentam o maior valor de $\log P$ (7,6 e 7,4), a menor TPSA (20,2 e 17,1) e a menor possibilidade de estabelecer pontes de hidrogénio (uma ligação como aceitador e uma a nenhuma ligação como dador) em relação aos compostos em estudo, realçando, deste modo, a importância destes parâmetros na atividade de modulação da P-gp. Com estes resultados pode-se concluir que a modulação da P-gp para estes compostos não depende apenas da lipofilia, mas sim de um conjunto de outros fatores, incluindo as características intrínsecas das linhas celulares em estudo, podendo os valores obtidos para os compostos de maior atividade servir de base para encontrar valores ótimos para as propriedade físico-químicas que maximizem a atividade de modulação da P-gp deste tipo de compostos.

Tabela 2.18 Propriedades físico-químicas dos compostos **1.92** e **2.1 - 2.12** (PM - peso molecular; VM - volume molecular; log *P* - coeficiente de partilha octanol/água; TPSA - área da superfície polar topológica; n° de aceptadores e dadores de ligações de hidrogénio).

Compostos	Propriedades físico-químicas					
	PM ^a (g/mol)	VM ^a (Å ³)	log <i>P</i> ^b	TPSA ^a (Å ²)	N° aceptadores de H ^a	N° dadores de H ^a
Balsacurbitriol (2.1)	488,8	508,2	5,0	69,9	4	3
Balsacurbepoxitol (2.2)	488,8	503,7	5,2	62,2	4	2
Ácido balsacurbitóico (2.3)	432,6	441,2	4,9	66,8	4	2
Balsacurbital (2.4)	416,7	433,2	5,6	46,5	3	1
Balsacurbinol (2.5)	470,7	493,4	7,0	46,5	3	1
Kuguacina B (2.8)	456,7	475,9	6,1	57,5	3	2
Kuguacina C (2.9)	414,6	426,4	5,1	54,4	3	1
Karavilagenina A (2.6)	486,8	516,8	6,9	38,7	3	1
Karavilagenina B (2.7)	472,8	499,3	6,7	49,7	3	2
Karavilagenina C (1.92)	472,8	499,6	5,7	49,7	3	2
7β-metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona (2.11)	468,7	487,9	5,9	43,4	3	0
24-etil-5α-colesta-7,22,25-trien-3β-ol (2.10)	410,7	444,7	7,6	20,2	1	1
24-etil-5α-colesta-7,22,25-trien-3-ona (2.12)	408,7	438,8	7,4	17,1	1	0

^aPropriedade físico-químicas foram calculadas usando o programa "JSME molecular editor" (versão 2017, www.molinspiration.com).

^bLog *P* calculado usando o programa "ALOGPS 2.1" (www.vcclab.org/lab/alogps/)

2.12.4. Combinação dos compostos com um fármaco antitumoral

Alguns dos compostos em estudo foram testados em combinação com um fármaco antitumoral, para avaliar os seus efeitos sobre a sua toxicidade, nas células resistentes de linfoma de rato (Tabela 2.19). O fármaco antitumoral utilizado foi a doxorrubicina, que é simultaneamente um substrato da P-gp. A maioria dos compostos

interagiu sinergicamente com a doxorrubicina, com exceção dos esteroides 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol (**2.10**) e 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona (**2.12**) que apresentaram um efeito aditivo e antagonista, respetivamente, para os quais simultaneamente foram encontrados os menores valores de FAR. Os compostos mais eficazes foram o balsacurbital (**2.4**) e o balsacurbinol (**2.5**) que demonstraram um forte sinergismo com a doxorrubicina, com um índice combinatório (CI) de $0,29 \pm 0,05$ e $0,29 \pm 0,05$, respetivamente. Paralelamente a estes resultados, uma forte atividade inibitória foi observada para estes dois compostos (FAR= 58,24 e 137,77, a 20 μ M, respetivamente).

Tabela 2.19 Efeito de alguns dos compostos estudados em combinação com a doxorrubicina nas células L5178Y.

Composto	IC ₅₀ (μ M)		
	Ratio ^a	CI \pm SD ^b	Interação
Balsacurbitriol (2.1)	1 : 20	0,66 \pm 0,084	Sinergismo
Balsacurbepoxitol (2.2)	2 : 12,5	0,35 \pm 0,08	Sinergismo
Balsacurbital (2.4)	1 : 50	0,29 \pm 0,05	Forte Sinergismo
Balsacurbinol (2.5)	0,5 : 25	0,29 \pm 0,07	Forte Sinergismo
Kuguacina B (2.8)	1 : 50	0,72 \pm 0,13	Sinergismo Moderado
Karavilagenina A (2.6)	1 : 100	0,69 \pm 0,11	Sinergismo
Karavilagenina B (2.7)	2 : 25	0,55 \pm 0,04	Sinergismo
Karavilagenina C (1.92)	2 : 25	0,40 \pm 0,16	Sinergismo
7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona (2.11)	1 : 20	0,44 \pm 0,06	Sinergismo
24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol (2.10)	2 : 80	0,94 \pm 0,09	Efeito aditivo
24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona (2.12)	4 : 12,5	1,48 \pm 0,35	Antagonismo

^a Dados mostrados em função do melhor rácio combinatório entre os compostos testados e a doxorrubicina; ^b Valores do índice combinatório (CI) consistem na média \pm desvio padrão (SD) para uma concentração inibitória de 50% (IC₅₀). 0,1 < CI < 0,3 forte sinergismo; 0,3 < CI < 0,7 sinergismo; 0,7 < CI < 0,9 sinergismo moderado a ligeiro; 0,9 < CI < 1,1 efeito aditivo; CI > 1,1 antagonismo.

Capítulo 3

Parte Experimental

3. Procedimento Experimental

3.1. Equipamentos e técnicas gerais

A cromatografia em coluna foi realizada usando como adsorventes, sílica gel (SiO_2 , Merck ref. 9385) ou sílica gel de fase reversa (RP 18, YMC, ODS-A, 12 nm, S - 50 μm). Nas cromatografias em *Combiflash* Rf200 (RediSep[®], Teledyne Isco) foram utilizadas colunas pré-embaladas com sílica (SiO_2) ou RP18 padrão. Os eluídos foram controlados por cromatografia em camada fina (TLC) utilizando placas de sílica com 0,2 mm de espessura (SiO_2 , Merck ref. 5554) e diferentes eluentes consoante as características das amostras aplicadas. Após eluição, as placas foram visualizadas sob luz UV ($\lambda = 254$ e 366 nm), seguindo-se a sua pulverização com uma solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) e aquecimento, sendo por fim visualizadas novamente sob luz UV. Por sua vez, na cromatografia preparativa utilizaram-se placas de sílica de 20 x 20 cm, com 0,5 mm de espessura (Merck, ref. 1.05744).

A técnica de HPLC foi realizada com recurso ao equipamento Merck-Hitachi com detector de UV Hitachi L-2400 e integrador Merck-Hitachi D-7500. Para o HPLC analítico foi utilizada uma coluna Merck Lichrospher 100 RP-18 (5 μm , 125 x 4 mm, fluxo de 1 ml/min). O HPLC semipreparativo foi efectuado numa coluna Merck Lichrospher 100 RP-18 (10 μm , 250 mm x 10 mm, fluxo de 4 ml/min, λ 220 nm). Como eluente foram utilizados diferentes gradientes de misturas de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$.

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrómetro Bruker 300 (^1H 300 MHz e ^{13}C 100 MHz), recorrendo-se a solventes deuterados, nomeadamente, CDCl_3 , CD_3OD e C_6D_6 . Os desvios químicos foram expressos em δ (ppm) e as constantes de acoplamento dos prótons (J) em *hertz* (Hz). O *software* utilizado para análise dos espectros traçados foi o MestreNova versão 9.0.

Os espectros de IV foram determinados num espectrofotómetro Shimadzu IRAffinity-1, usando discos de NaCl.

As rotações específicas $[\alpha]_D^{25}$ foram medidas, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa, usando um polarímetro Perkin-Elmer 241, em células de quartzo com 10 cm de comprimento. Para tal, as amostras foram dissolvidas em CHCl_3 ou MeOH de espectroscopia.

Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos no espectrómetro de massa - Micromass Quattro Micro AP1, de triplo quadropolo (QT), utilizando ionização por "electrospray" (ESI), em modo positivo. Por sua vez, os espectros de massa de

alta resolução foram obtidos através do equipamento FTICR-MS Apex Qe (Brüker Daltonics) 7 Tesla.

3.2. Estudo fitoquímico

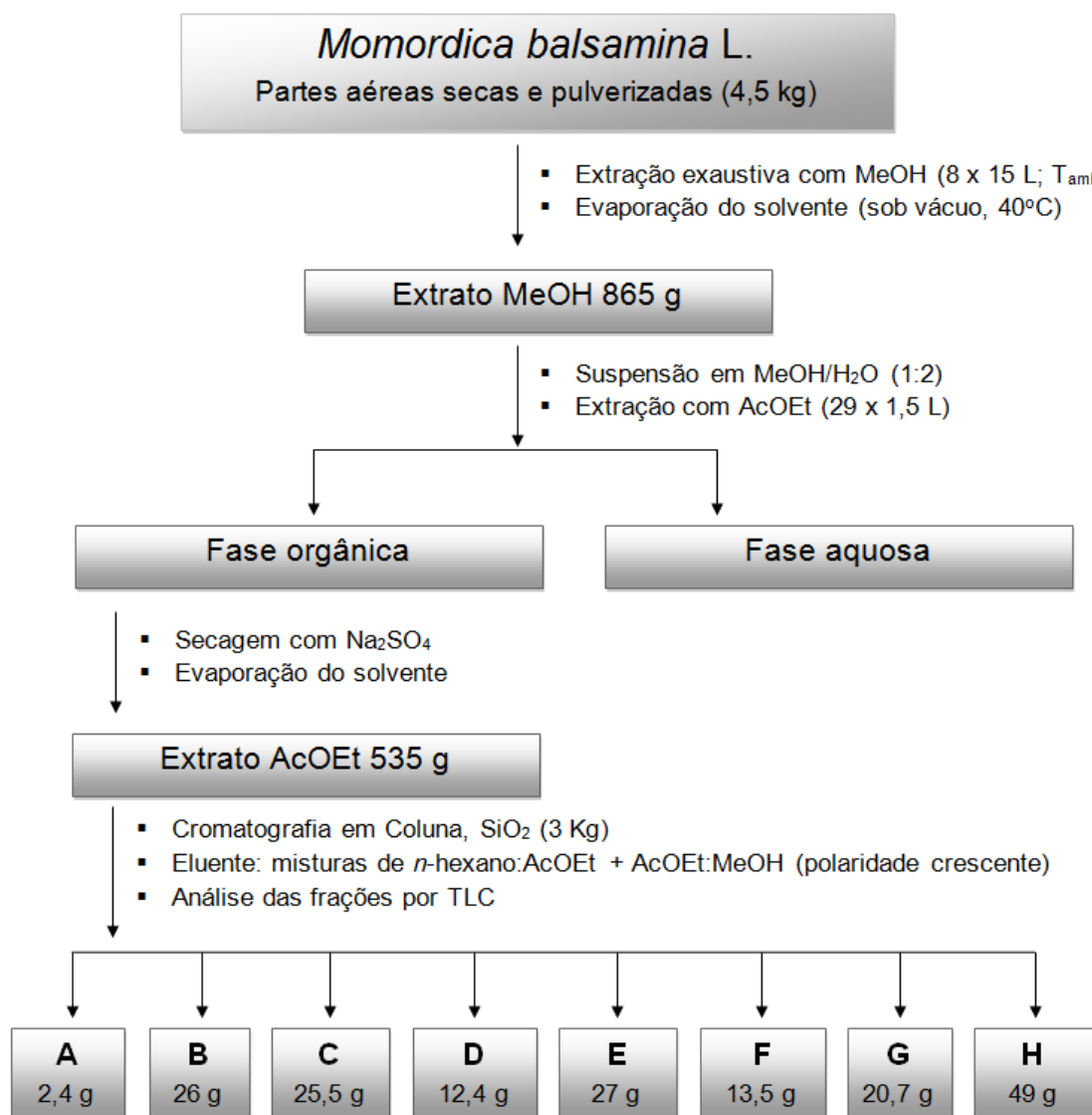
A planta *Momordica balsamina* L. foi colhida na província de Gaza, em Moçambique, tendo sido identificada pelo botânico Prof. Silva Mulhovo, encontrando-se um exemplar depositado no herbário do Instituto de Investigação Agronómica em Maputo (Moçambique).

3.2.1. Processo extrativo e Isolamento

As partes aéreas da espécie *Momordica balsamina* (4,5 Kg) foram secas, moídas e extraídas à exaustão com metanol à temperatura ambiente. Após evaporação do extrato, o resíduo obtido foi sujeito a uma extração líquido-líquido resultando no extracto de acetato de etilo (535 g) (Ramalhete *et al*, 2009a; Ramalhete *et al*, 2009b). Este extracto por cromatografia em coluna com misturas de hexano-acetato de etilo de polaridade crescente originou oito frações (A-H) principais (Esquema 3.1). Após a análise dos espectros de ^1H -RMN obtidos para cada uma das frações, prosseguiu-se o estudo fitoquímico de duas das frações, a C e a E, eluídas da coluna com misturas de *n*-hexano/AcOET (80:20) e *n*-hexano/AcOET (60:40), respetivamente (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Cromatografia em coluna do extrato de AcOET

Fração	Massa (g)	Eluente (V/V)
A	2,4	<i>n</i> -hexano:AcOEt (100:0)
B	26	<i>n</i> -hexano:AcOEt (90:10 a 80:20)
C	25,5	<i>n</i> -hexano:AcOEt (80:20)
D	12,4	<i>n</i> -hexano:AcOEt (70:30)
E	27	<i>n</i> -hexano:AcOEt (60:40)
F	13,5	<i>n</i> -hexano:AcOEt (50:50 a 30:70)
G	20,7	<i>n</i> -hexano:AcOEt (30:70 a 0:100);
H	49	AcOEt:MeOH (100:0 a 50:50)



Esquema 3.1 Resumo do processo de extração e fracionamento (frações iniciais) da *Momordica balsamina*.

3.2.2. Estudo da fração C

A fração C (25,51 g) obtida com *n*-hexano:AcOEt (80:20) foi fracionada por cromatografia em coluna (Tabela 3.2), utilizando-se como fase estacionária 1 kg de sílica gel e como fase móvel misturas de polaridade crescente de *n*-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 100:50). Após a análise por TLC dos eluídos recolhidos, foram obtidas sete frações (C1 a C7). Destas, devido ao seu perfil cromatográfico, prosseguiu-se com o estudo da fração C3 e C4.

Tabela 3.2 Cromatografia em coluna da fração C

Fração	Massa (g)	Eluente (V/V)
C1 (9-11)	0,654	<i>n</i> -hexano:AcOEt (85:15)
C2 (12-18)	2,25	<i>n</i> -hexano:AcOEt (85:15 a 80:20)
C3 (19-24)	5,60	<i>n</i> -hexano:AcOEt (75:25)
C4 (25-28)	5,06	<i>n</i> -hexano:AcOEt (70:30)
C5 (29-32)	4,15	<i>n</i> -hexano:AcOEt (70:30 a 65:35)
C6 (33-43)	4,20	<i>n</i> -hexano:AcOEt (65:35 a 40:60)
C7 (44-56)	1,36	<i>n</i> -hexano:AcOEt (30:70 a 0:100); AcOEt:MeOH (100:0 a 0:100)

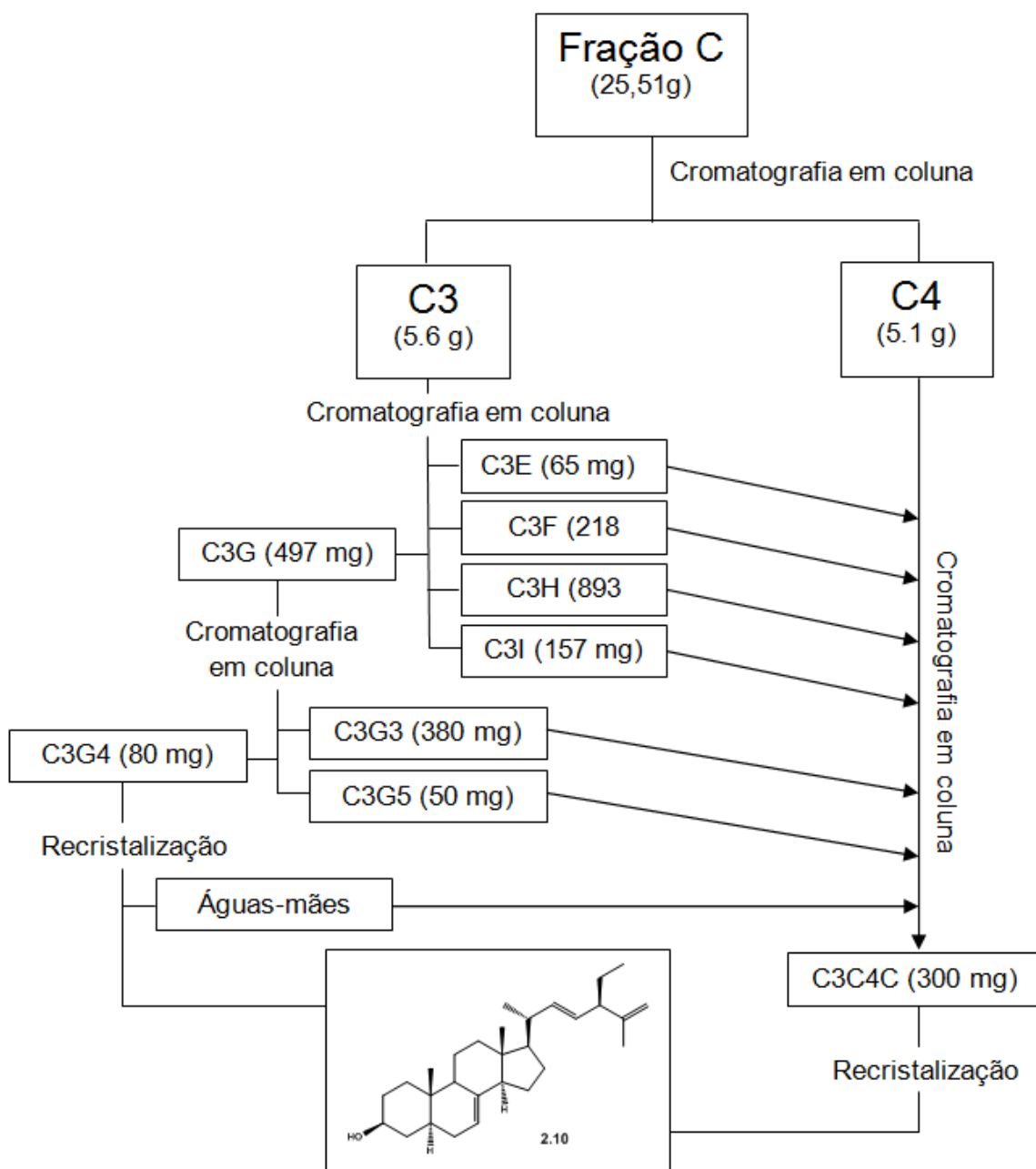
3.2.2.1. Estudo da fração C3 e C4

A fração C3 (5,60 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel, com misturas de *n*-hexano:CH₂Cl₂ (70:30 a 0:100) e de CH₂Cl₂:MeOH (100:0 a 50:50), da qual se obtiveram onze frações (C3A a C3L). A fração C3G (497 mg, eluída com uma mistura de *n*-hexano/CH₂Cl₂, 20:80), constituiu interesse, pela presença, na placa de TLC, de uma mancha visível após coloração passível de purificação, comparativamente às frações restantes. Por conseguinte, para a purificação da fração C3G foi realizada uma cromatografia em coluna (sílica gel), utilizando como mistura de eluentes *n*-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100), da qual foram obtidas cinco frações (C3G1 a C3G5). A fração C3G4 (80 mg, *n*-hexano/AcOEt, 82,5:17,5) por sucessivas recristalizações, usando como par de solventes *n*-hexano/AcOEt, permitiu a obtenção de 55 mg de um precipitado puro, posteriormente identificado como sendo o 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol (**2.10**).

Uma amostra de 6,9 g resultante da adição das frações provenientes do estudo da fração C3 nomeadamente as frações C3E, C3F, C3H, C3I, C3G3, C3G5 e das águas mães da recristalização da fração C3G4, juntamente com a fração C4 (5,1 g), cuja a análise por TLC demonstrava a presença da mesma banda, foi submetida a uma cromatografia em coluna (eluída com misturas de *n*-hexano:AcOEt e AcOEt:MeOH). Como resultado obtiveram-se quatro frações (C3C4A a C3C4D). A fração C3C4C (eluída a *n*-hexano:AcOEt, 82,5:17,5) foi sujeita a sucessivas

recristalizações (*n*-hexano:AcOEt), permitindo isolar e purificar uma maior quantidade do composto acima referido, obtendo-se um total de 210 mg.

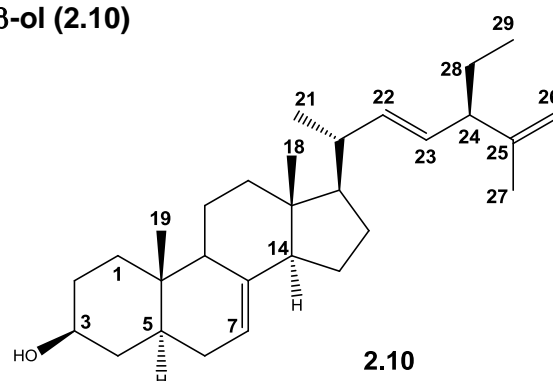
No esquema 3.2, apresentam-se, de forma resumida, as várias subfrações estudadas a partir da fração C e o respetivo composto isolado.



Esquema 3.2 Representação esquemática do estudo da Fração C.

Esteróide, 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol (2.10)

Pó branco amorfo

 $[\alpha]_D^{20} + 1,4$ (c 0.1, CHCl₃)IV, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (NaCl): 3412, 2957, 2360, 1639ESIMS, m/z : 393 [M+H -H₂O]⁺

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5,22 (1H, *m*, H-23), 5,20 (1H, *m*, H-22), 5,15 (1H, *m*, H-7), 4,70 (2H, *m*, H-26), 3,58 (1H, *m*, H-3), 2,42 (1H, *q*, $J = 7,0$ Hz, H-24), 2,03 (1H, *m*, H-20), 1,97 (1H, *m*, H-12a), 1,80 (1H, *m*, H-2a), 1,77 (1H, *m*, H-14), 1,76 (1H, *m*, H-1a), 1,75 (2H, *m*, H-6), 1,75 (2H, *m*, H-16), 1,68 (2H, *m*, H-4), 1,65 (1H, *m*, H-9), 1,65 (3H, *s largo*, Me-27), 1,56 (2H, *m*, H-11), 1,46 (2H, *m*, H-15), 1,42 (2H, *m*, H-28), 1,41 (1H, *m*, H-2b), 1,30 (1H, *m*, H-5), 1,26 (1H, *m*, H-17), 1,23 (1H, *m*, H-12b), 1,08 (1H, *m*, H-1b), 1,01 (3H, *d*, $J = 6,6$ Hz, Me-21), 0,83 (3H, *t*, $J = 7,4$ Hz, Me-29), 0,79 (3H, *s*, Me-19), 0,54 (3H, *s*, Me-18).

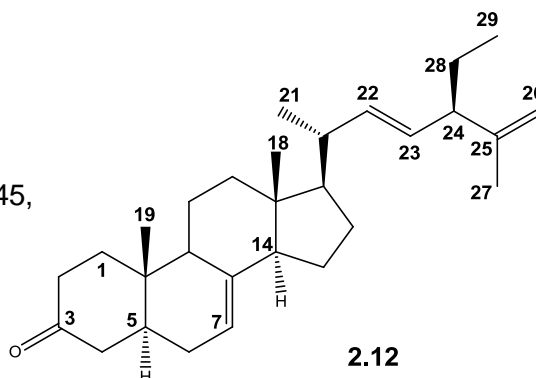
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 148,7 (C-25), 139,6 (C-8), 137,2 (C-22), 130,3 (C-23), 117,6 (C-7), 109,7 (C-26), 71,2 (C-3), 55,9 (C-17), 55,2 (C-14), 52,2 (C-24), 49,6 (C-9), 43,5 (C-13), 40,4 (C-5), 40,7 (C-20), 39,6 (C-12), 38,1 (C-4), 37,3 (C-1), 34,4 (C-10), 31,6 (C-2), 29,8 (C-6), 28,5 (C-16), 25,8 (C-28), 23,1 (C-15), 21,7 (C-11), 21,1 (C-21), 20,4 (C-27), 13,2 (C-19), 12,3 (C-29), 12,2 (C-18).

3.2.2.2. Derivatização do esteroide: Oxidação com IBX

O esteroide (191 mg, 0.465 mmol) foi oxidado na presença de ácido 2-iodoxibenzóico (IBX, 1.2 eq). A mistura reacional foi dissolvida com DMSO e mantida à temperatura ambiente, com agitação constante, durante 6 h. Posteriormente, procedeu-se à extração da fase aquosa com sucessivos volumes de acetato de etilo. A fase orgânica obtida foi seca usando Na₂SO₄ anidro e evaporada a pressão reduzida (Lapitskaya *et al*, 2008; Nicolaou *et al*, 2002). O resíduo resultante da evaporação do solvente (247 mg) foi purificado através de cromatografia em coluna (sílica gel), eluída com misturas de *n*-hexano:AcOEt e AcOEt:MeOH de polaridade crescente, obtendo-se 100 mg (52.6 %) de um sólido branco amorfo, designado por 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona (2.12).

24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona (2.12).

Pó branco amorfo

 $[\alpha]_D^{20} + 29$ (c 0.1, CHCl₃)IV, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (NaCl): 2957, 2100, 1716, 1645,
1442, 1383, 968, 885ESIMS, m/z : 454 [M + 2Na]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 5,21 (1H, *m*, H-23), 5,21 (1H, *m*, H-22), 5,17 (1H, *m*, H-7), 4,70 (2H, *m*, H-26), 2,42 (1H, *m*, H-24), 2,42 (1H, *m*, H-2a), 2,27 (1H, *m*, H-2b), 2,23 (2H, *m*, H-4), 2,12 (1H, *ddd*, $J = 13,3, 5,9$ e $2,4$ Hz, H-1a), 2,03 (1H, *m*, H-20), 2,02 (1H, *m*, H-12a), 1,83 (1H, *m*, H-14), 1,83 (2H, *m*, H-6), 1,83 (1H, *m*, H-5), 1,75 (1H, *m*, H-16a), 1,73 (1H, *m*, H-9), 1,65 (3H, *s largo*, Me-27), 1,60 (2H, *m*, H-11), 1,50 (1H, *m*, H-15a), 1,45 (1H, *m*, H-1b), 1,42 (2H, *m*, H-28), 1,40 (1H, *m*, H-15b), 1,28 (1H, *m*, H-12b), 1,28 (1H, *m*, H-16b), 1,27 (1H, *m*, H-17), 1,02 (3H, *d*, $J = 6,2$ Hz, Me-21), 1,01 (3H, *s*, Me-19), 0,83 (3H, *t*, $J = 7,3$ Hz, Me-29), 0,57 (3H, *s*, Me-18).

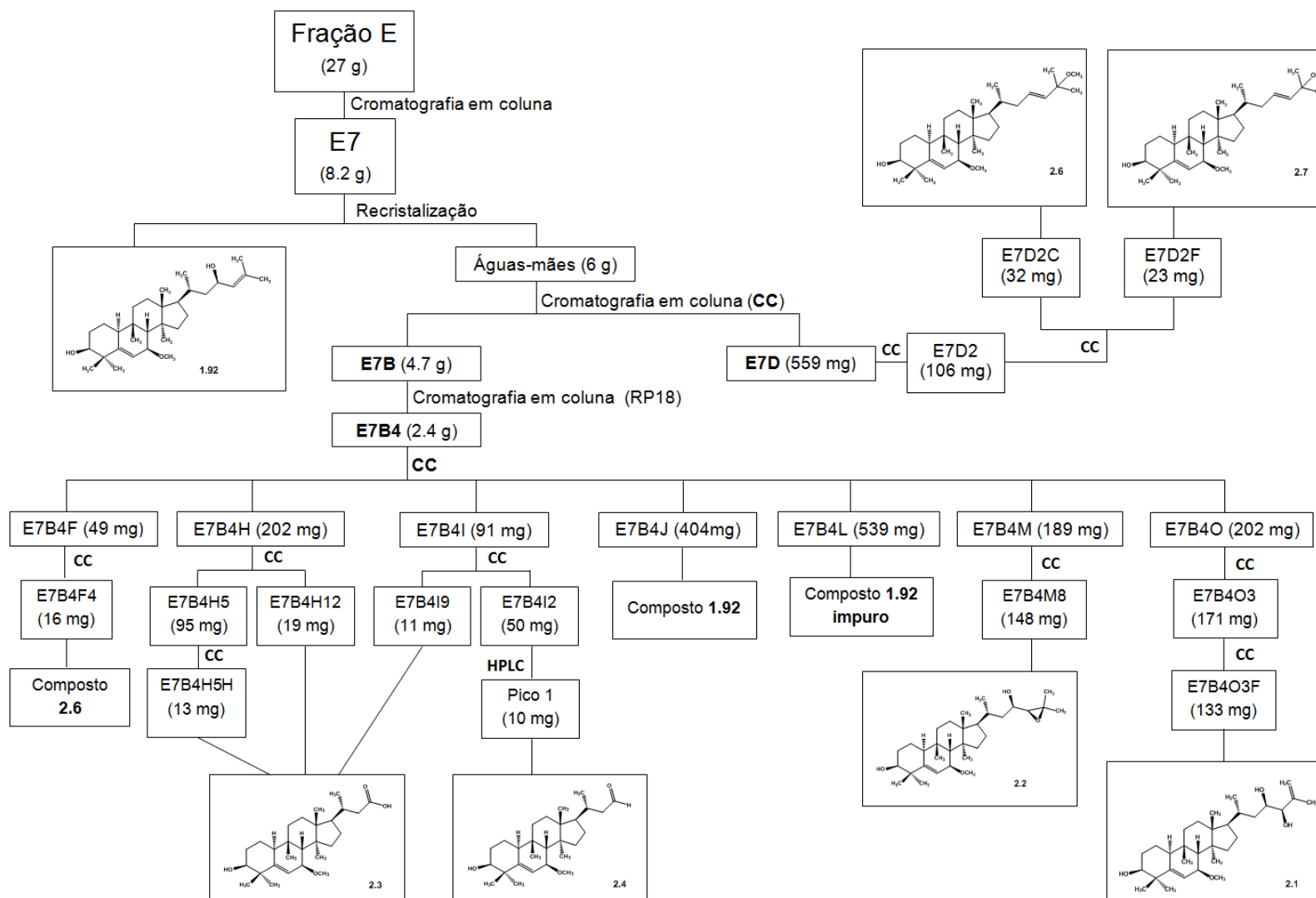
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 212,2 (C-3), 148,7 (C-25), 139,6 (C-8), 137,1 (C-22), 130,4 (C-23), 117,2 (C-7), 109,7 (C-26), 55,9 (C-17), 55,1 (C-14), 52,1 (C-24), 49,0 (C-9), 44,4 (C-4), 43,4 (C-13), 43,0 (C-5), 40,7 (C-20), 39,5 (C-12), 38,9 (C-1), 38,3 (C-2), 34,5 (C-10), 30,2 (C-6), 28,4 (C-16), 25,8 (C-28), 23,1 (C-15), 21,8 (C-11), 21,1 (C-21), 20,4 (C-27), 12,6 (C-19), 12,3 (C-29), 12,3 (C-18).

3.2.3. Estudo da fração E

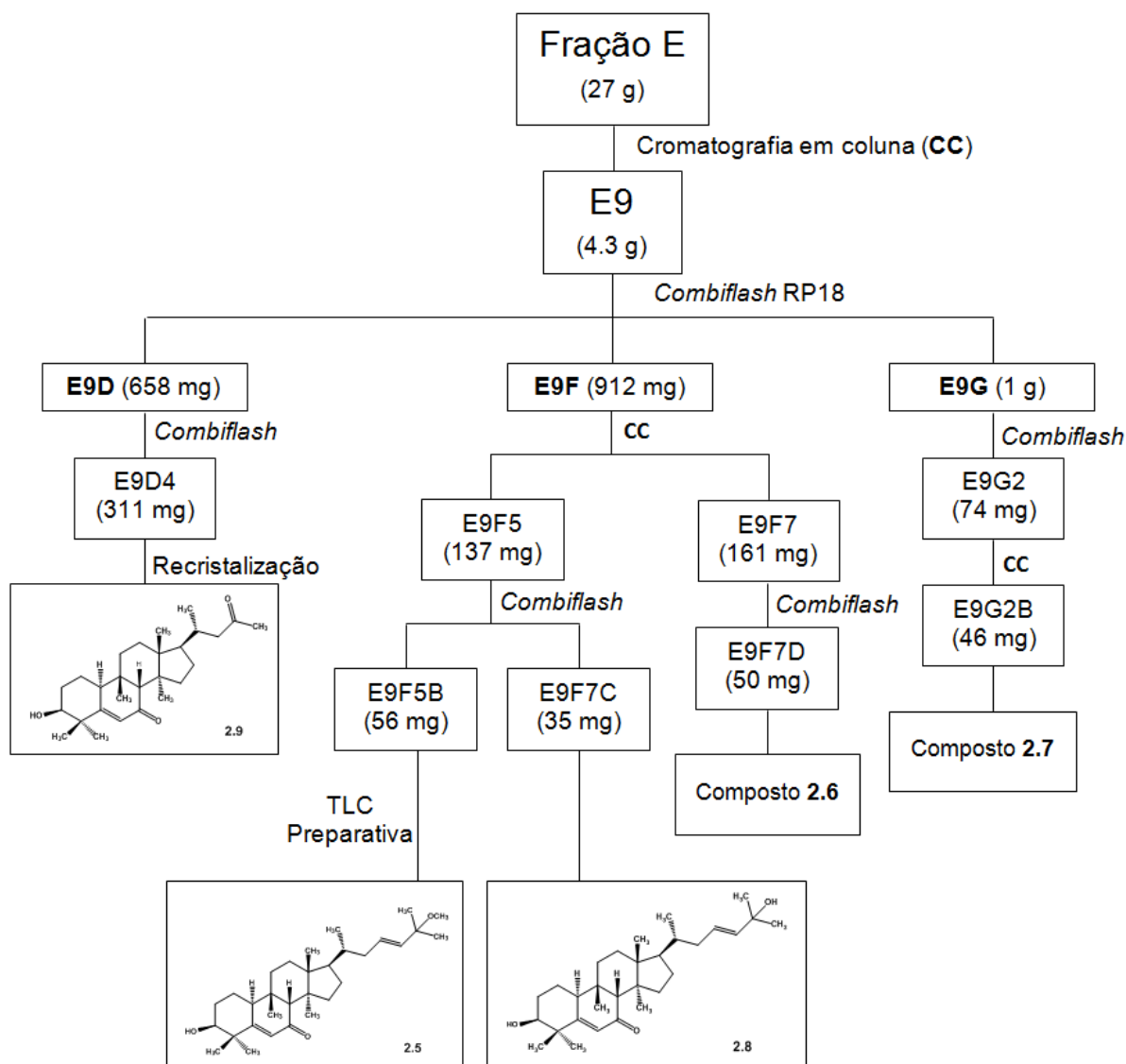
A fração E (27 g, eluída em *n*-hexano:AcOEt, 60:40) foi cromatografada numa coluna de sílica gel (SiO₂, 1 kg), com misturas de *n*-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 100:50) de polaridade crescente. Após monitorização por TLC os eluídos foram associados em 15 frações (Tabela 3.3). Destas foram estudadas as frações E7 e E9, nas quais se observou a formação de cristais. Nos esquemas 3.3 e 3.4 é apresentado um resumo dos compostos obtidos a partir da fração E7 e E9, respetivamente.

Tabela 3.3 Cromatografia em coluna da fração E

Fração	Massa (g)	Eluente (V/V)	
		<i>n</i> -hexano:AcOEt	AcOEt:MeOH
E1 (1-4)	1,0	100:0 a 90:10	
E2 (5-6)	0,095	85:15	
E3 (7-10)	0,143	80:20 a 75:25	
E4 (11-16)	0,202	75:25 a 70:30	
E5 (17-22)	0,255	70:30 a 65:35	
E6 (23-27)	0,778	65:35	
E7 (28-38)	8,2	60:40 a 55:45	
E8 (39-42)	1,86	55:45	
E9 (43-57)	4,3	55:45 a 40:60	
E10 (58-63)	0,636	35:65 a 25:75	
E11 (64-67)	0,268	20:80	
E12 (68-72)	1,58	20:80 a 5:95	
E13 (73-74)	0,292	5:95	
E14 (75-80)	0,415	5:95 a 0:100	
E15 (81-89)	0,122	100:0 a 50:50	



Esquema 3.3 Representação esquemática do estudo da fração E7.



Esquema 3.4 Representação esquemática do estudo da fração E9.

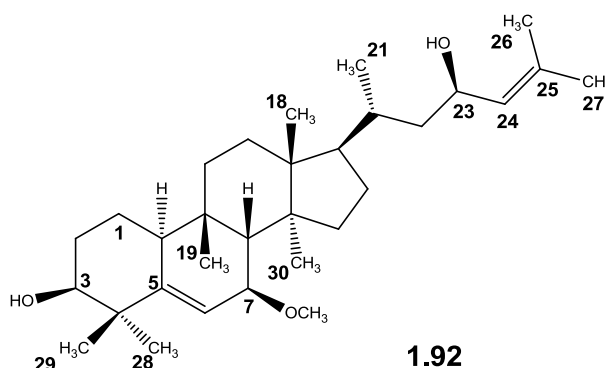
3.2.3.1. Estudo da fração E7

A fração E7 (8,2 g, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 60:40 a 55:45) foi recristalizada usando o par de solventes *n*-hexano:AcOEt, obtendo-se 2,2 g de cristais de um composto puro designado de Karavilagenina C (**1.92**). O resíduo resultante da evaporação das águas mães (6 g) foi sujeito a uma cromatografia em coluna (sílica gel), usando misturas de *n*-hexano: CH₂Cl₂ (10:90 a 0:100) e CH₂Cl₂:MeOH (100:0 a 70:30). Desta separação resultaram quatro frações (E7A a E7D), sendo que apenas as frações E7B e a E7D constituíram objeto de estudo mais detalhado.

Karavilagenina C, 7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3 β ,23(*R*)-diol (1.92)

Sólidos cristalino branco

P.f. = 190 °C

 $[\alpha]_D^{20} + 159.8$ (c 0.1, CHCl₃)IV, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (NaCl): 3447, 2928, 1662, 1452, 1086

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 5,83 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-6), 5,19 (1H, *d largo*, *J* = 8,5 Hz, H-24), 4,46 (1H, *ddd*, *J* = 9,7, 8,3 e 3,1 Hz, H-23), 3,51 (1H, *s largo*, H-3), 3,42 (1H, *d largo*, *J* = 4,0 Hz, H-7), 3,34 (3H, *s*, 7-OMe), 2,27 (1H, *dd*, *J* = 12,8 e 4,0 Hz, H-10), 2,08 (1H, *s largo*, H-8), 1,70 (3H, *s largo*, Me-27), 1,68 (3H, *s largo*, Me-26), 1,20 (3H, *s*, Me-29), 1,03 (3H, *s*, Me-28), 0,98 (3H, *s*, Me-19), 0,97 (3H, *d*, *J* = 6,3 Hz, Me-21), 0,94 (3H, *s*, Me-18), 0,69 (3H, *s*, Me-30).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 146,9 (C-5), 134,0 (C-25), 129,1 (C-24), 121,1 (C-6), 77,4 (C-7), 76,9 (C-3), 66,1 (C-23), 56,4 (7-OMe), 50,9 (C-17), 48,1 (C-14), 47,9 (C-8), 46,3 (C-13), 44,6 (C-22), 41,9 (C-4), 38,8 (C-10), 34,8 (C-15), 34,1 (C-9), 32,8 (C-20), 32,8 (C-11), 30,3 (C-12), 29,0 (C-19), 28,7 (C-2), 28,0 (C-16), 27,9 (C-28), 25,9 (C-27), 25,5 (C-29), 21,2 (C-1), 18,3 (C-26), 18,1 (C-30), 18,9 (C-21), 15,5 (C-18).

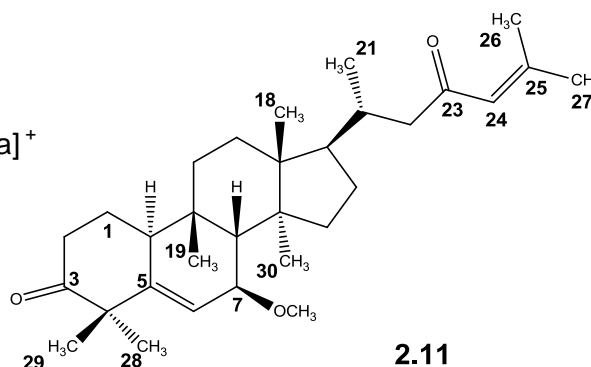
3.2.3.1.1. Derivatização da Karavilagenina C: Oxidação com IBX

A karavilagenina C (**1.92**) (700 mg, 1.48 mmol) foi oxidada na presença de IBX (ácido 2-iodoxibenzóico, 2.4 eq), obtendo-se como produto final o composto **2.11**, com a estrutura 7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona. A mistura reacional foi dissolvida com DMSO e mantida à temperatura ambiente, com agitação constante, durante 3 h. Em seguida, procedeu-se à extração da fase aquosa com acetato de etilo. A fase orgânica foi sujeita a secagem com Na₂SO₄ anidro e a evaporada a pressão reduzida (Lapitskaya *et al*, 2008; Nicolaou *et al*, 2002).

O resíduo resultante da evaporação do solvente (802 mg) foi purificado através de cromatografia em coluna (sílica gel), eluída com misturas de *n*-hexano:AcOEt e AcOEt:MeOH de polaridade crescente. Por fim, obteve-se 567 mg de um sólido branco amorfo, com um rendimento de 82 %.

Derivado da Karavilagenina C, 7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona (2.11)

Óleo amarelo

 $[\alpha]_D^{20} + 42.8$ (c 0.1, CHCl₃)**ESIMS**, m/z : 507 [M + K]⁺, 530 [M + K + Na]⁺

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6,04 (1H, *s largo*, H-24), 5,90 (1H, *d*, $J = 5,0$ Hz, H-6), 3,45 (1H, *d largo*, $J = 4,7$ Hz, H-7), 3,33 (3H, *s*, 7-OMe), 2,47 (2H, *m*, H-2), 2,47 (1H, *m*, H-10), 2,46 (1H, *m*, H-22a), 2,12 (3H, *s*, Me-26), 2,08 (1H, *m*, H-22b), 2,07 (1H, *m*, H-20), 2,04 (1H, *s*, H-8), 1,96 (1H, *m*, H-1a), 1,87 (3H, *s*, Me-27), 1,63 (1H, *m*, H-12a), 1,62 (1H, *m*, H-11a), 1,55 (1H, *m*, H-1b), 1,55 (1H, *m*, H-12b), 1,52 (1H, *m*, H-11b), 1,50 (1H, *m*, H-17), 1,34 (2H, *m*, H-15), 1,34 (2H, *m*, H-16), 1,29 (3H, *s*, Me-29), 1,21 (3H, *s*, Me-28), 0,96 (3H, *s*, Me-18), 0,93 (3H, *s*, Me-19), 0,89 (3H, *d*, $J = 5,7$ Hz, Me-21), 0,74 (3H, *s*, Me-30)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 214,4 (C-3), 201,6 (C-23), 155,0 (C-25), 147,4 (C-5), 124,4 (C-24), 120,2 (C-6), 77,1 (C-7), 56,6 (7-OMe), 51,8 (C-22), 50,8 (C-4), 50,6 (C-17), 48,1 (C-14), 47,9 (C-8), 46,3 (C-13), 39,5 (C-10), 38,6 (C-2), 34,8 (C-15), 34,3 (C-9), 33,4 (C-20), 32,6 (C-11), 30,1 (C-12), 28,7 (C-28), 27,9 (C-16), 27,9 (C-27), 27,8 (C-19), 24,7 (C-1), 23,3 (C-29), 20,8 (C-26), 19,9 (C-21), 18,1 (C-30), 15,6 (C-18)

3.2.3.1.2. Estudo da fração E7B

A fração E7B (4,9 g, CH₂Cl₂:MeOH, 98:2 a 97.5:2.5) apresentava por TLC um grande arrastamento de manchas de cor verde correspondentes a clorofilas. De modo a retirá-las, o resíduo da fração E7B foi sujeito a uma cromatografia em coluna onde foi usada como fase estacionária sílica RP 18. Como eluentes usaram-se misturas de MeOH:H₂O (50:50 a 100:0). Os eluídos recolhidos, após monitorização por TLC, foram associados em treze frações (E7B1 a E7B13), tendo-se prosseguido o estudo com a fração E7B4.

3.2.3.1.2.1. Estudo da fração E7B4

A fração E7B4 (2,4 g, MeOH:H₂O, 80:20) foi cromatografada em coluna de (sílica gel) recorrendo a misturas de *n*-hexano:AcOEt e AcOEt:MeOH de polaridade crescente (Tabela 3.4). Deste fracionamento e após monitorização por TLC resultaram dezasseis frações (E7B4A a E7B4Q). Destas foram estudadas as frações E7B4F, E7B4H, E7B4I, E7B4J, E7B4L, E7B4M e E7B4O.

Tabela 3.4 Cromatografia em coluna da fração E7B4

Fração	Massa (mg)	Eluente (V/V)	
		<i>n</i> -hexano:AcOEt	AcOEt:MeOH
E7B4A (1-17)	62,7	100:0 a 95:5	
E7B4B (18-40)	12,5	95:5 a 90:10	
E7B4C (41-47)	5,2	90:10 a 87,5:12,5	
E7B4D (48-53)	41,5	87,5:12,5	
E7B4E (54-85)	16,5	87,5:12,5 a 80:20	
E7B4F (86-92)	49,1	75:25	
E7B4G (93-98)	56,4	75:25	
E7B4H (99-110)	202,4	75:25	
E7B4I (111-115)	90,6	75:25	
E7B4J (116-123)	404	70:30	
E7B4L (124-148)	539,4	70:30 a 55:45	
E7B4M (149-161)	188,8	55:45 a 50:50	
E7B4N(162-167)	82,9	50:50 a 40:60	
E7B4O (168-174)	202,2	40:60 a 20:80	
E7B4P (175-188)	241,1	0:100	70:30
E7B4Q (189-193)	106,3		70:30

3.2.3.1.2.1.1. Estudo da fração E7B4F

A fração E7B4F (49 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 75:25) foi fracionada por cromatografia em coluna (sílica gel), usando misturas de *n*-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 70:30). Após monitorização por TLC as frações foram associadas em oito frações principais (E7B4F1 a E7B4F8). A fração E7B4F4, eluída com *n*-hexano:AcOEt 80:20, após análise dos espectros de RMN, revelou a presença de uma mistura constituída por dois compostos. Um deles foi possível identificar como

sendo o composto karavilagenina A (**2.6**), o outro apresentava os picos característicos de um ácido gordo. Tendo em conta a quantidade reduzida da mistura e a dificuldade em arranjar uma mistura de solventes que permitisse a separação, não foi feita a purificação dos compostos.

3.2.3.1.2.1.2. Estudo da fração E7B4H

A fração E7B4H (202 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 75:25), foi cromatografada utilizando como eluentes misturas de *n*-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 70:40). Após análise cromatográfica por TLC, os eluídos recolhidos foram associados em catorze frações (E7B4H1 a E7B4H14). A fracção E7B4H12, eluída com AcOEt:MeOH a 70:30, apresentava-se pura, observando-se apenas uma banda quando analisada por TLC. As análises dos seus dados espectroscópicos revelaram a presença de um composto novo puro (19 mg) denominado de ácido balsacurbitóico (**2.3**). O mesmo composto foi novamente isolado a partir do fracionamento da fração E7B4H5 (95 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt 70:30), por coluna cromatográfica (sílica gel). Desta coluna resultaram onze frações (E7B4H5A a E7B4H5L), após análise por TLC. Da fração E7B4H5H (CH₂Cl₂:MeOH a 70:30) resultaram mais 13 mg do composto ácido balsacurbitóico (**2.3**).

Ácido balsacurbitóico,

ácido 24,25,26,27-tetranor-7β-metoxicucurbit-5-en-3β-ol-23-oico (**2.3**)

Pó branco amorfo

$[\alpha]_D^{20} + 49.5$ (c 0.1, MeOH)

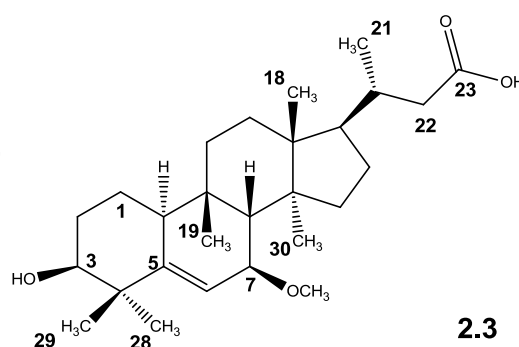
IV, $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ (NaCl): 3422, 2951, 2874, 1703,

1643, 1454, 1383, 1080, 756

ESIMS, m/z : 455 [M + Na]⁺

HR-ESITOFMS, m/z : 455,31404

(calculado para C₂₇H₄₄O₄Na: 455,31318)



2.3

¹H-NMR (300 MHz, C₆D₆): δ 5,88 (1H, *d*, *J* = 4,9 Hz, H-6), 3,37 (1H, *s* largo, H-3), 3,33 (1H, *d*, *J* = 5,3 Hz, H-7), 3,24 (3H, *s*, 7-OMe), 2,38 (1H, *m*, H-22a), 2,14 (1H, *m*, H-10), 2,08 (1H, *s*, H-8), 2,01 (1H, *m*, H-20), 1,96 (1H, *m*, H-22b), 1,73 (2H, *m*, H-16), 1,72 (1H, *m*, H-1a), 1,71 (1H, *m*, H-2a), 1,63 (1H, *m*, H-2b), 1,55 (1H, *m*, H-11a), 1,43 (1H, *m*, H-

1b), 1,43 (1H, *m*, H-17a), 1,41 (1H, *m*, H-11b), 1,38 (1H, *m*, H-17b), 1,32 (2H, *m*, H-12), 1,18 (2H, *m*, H-15), 1,20 (3H, *s*, Me-19), 1,17 (3H, *s*, Me-29), 1,05 (3H, *d*, $J = 6,0$ Hz, Me-21), 0,92 (3H, *s*, Me-28), 0,81 (3H, *s*, Me-18), 0,59 (3H, *s*, Me-30)

¹³C-NMR (100 MHz, C₆D₆): δ 178,6 (C-23), 146,7 (C-5), 120,9 (C-6), 77,3 (C-7), 76,6 (C-3), 56,2 (7-OMe), 50,3 (C-17), 48,8 (C-8), 48,3 (C-14), 46,3 (C-13), 41,8 (C-4), 41,7 (C-22), 39,1 (C-10), 34,9 (C-15), 34,3 (C-9), 34,1 (C-20), 32,9 (C-11), 30,4 (C-12), 29,3 (C-2), 29,3 (C-19), 27,9 (C-28), 27,9 (C-16), 25,7 (C-29), 21,4 (C-1), 19,8 (C-21), 18,2 (C-30), 15,4 (C-18)

3.2.3.1.2.1.3. Estudo da fração E7B4I

A fração E7B4I (91 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 75:25) foi cromatografada por cromatografia em coluna (sílica gel), usando gradientes de polaridade crescente de CH₂Cl₂:MeOH (100:0 a 50:50). Após monitorização por TLC, os eluídos foram associados em dez frações (E7B4I1 a E7B4I10). A fração E7B4I9 (11 mg, CH₂Cl₂:MeOH, 85:15 a 80:20) apresentava-se pura, tendo-se obtido o composto ácido balsacurbitóico (**2.3**) já isolado anteriormente.

A fração E7B4I2 (50 mg, eluída com CH₂Cl₂:MeOH, 98:2) apresentava um perfil cromatográfico complexo em TLC, onde se observavam a presença de vários produtos não separáveis pelas técnicas cromatográficas clássicas. Deste modo, optou-se pela separação dos compostos por HPLC. A optimização do método de separação foi realizada por HPLC analítico, com um fluxo de 1 ml/min e um volume de injeção de 20 μ l da amostra previamente dissolvida em metanol. Posteriormente, a fração foi purificada por HPLC preparativa de fase reversa (MeOH:H₂O, 80:20, λ 220 nm) com um fluxo de 3 ml/min e um volume de injeção de 200 μ l de amostra. Com esta separação obteve-se 10 mg de um composto puro (R_f : 29 min). Após a análise espectroscópica, foi possível identificar um novo composto designado por balsacurbital (**2.4**).

Balsacurbital, 24,25,26,27-tetranor-7 β -metoxicucurbit-5-en-3 β -ol-23-al (2.4)

Pó branco amorfo

R_t (HPLC, MeOH:H₂O, 80:20, λ 220 nm, 3 ml/min): 29 min

$[\alpha]_D^{20} + 10.2$ (c 0.1, CHCl₃)

IV, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (NaCl): 3418, 2955, 2926, 2872, 1716,

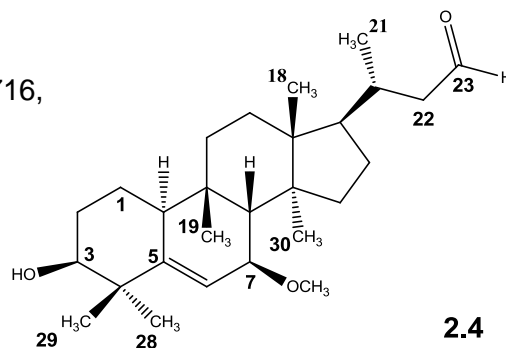
1653, 1456, 1379, 1084, 758

ESIMS, m/z : 439 [M+Na]⁺, 455 [M+K]⁺,

399 [M+H-H₂O]⁺

HR-ESITOFMS, m/z : 417,33678

(calculado para C₂₇H₄₅O₃: 417,33632)



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9,75 (1H, *m*, H-23), 5,84 (1H, *d*, $J = 4,6$ Hz, H-6), 3,51 (1H, *s* largo, H-3), 3,41 (1H, *d*, $J = 5,3$ Hz, H-7), 3,34 (3H, *s*, 7-OMe), 2,46 (1H, *dd*, $J = 15$ e 4,1 Hz, H-22a), 2,27 (1H, *dd*, $J = 11,8$ e 5,3 Hz, H-10), 2,16 (1H, *m*, H-22b), 2,13 (1H, *m*, H-20), 2,05 (1H, *s* largo, H-8), 1,89 (1H, *m*, H-16a), 1,74 (2H, *m*, H-2), 1,66 (1H, *m*, H-12a) 1,63 (2H, *m*, H-11), 1,59 (2H, *m*, H-1), 1,49 (1H, *m*, H-17), 1,35 (2H, *m*, H-15), 1,33 (1H, *m*, H-16b), 1,30 (1H, *m*, H-12b), 1,21 (3H, *s*, Me-29), 1,03 (3H, *s*, Me-28), 1,00 (3H, *s*, Me-19), 0,98 (3H, *d*, $J = 6,6$ Hz, Me-21), 0,97 (3H, *s*, Me-18), 0,71 (3H, *s*, Me-30)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 203,6 (C-23), 147,0 (C-5), 121,0 (C-6), 77,4 (C-7), 76,9 (C-3), 56,4 (7-OMe), 51,3 (C-22), 50,3 (C-17), 48,1 (C-14), 48,1 (C-8), 46,4 (C-13), 41,9 (C-4), 38,8 (C-10), 34,7 (C-15), 34,1 (C-9), 32,7 (C-11), 32,0 (C-20), 30,2 (C-12), 29,0 (C-19), 28,7 (C-2), 28,1 (C-16), 27,9 (C-28), 25,5 (C-29), 21,2 (C-1), 20,2 (C-21), 18,1 (C-30), 15,5 (C-18)

3.2.3.1.2.1.4. Estudo das frações E7B4J e E7B4L

A fração E7B4J (404 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 70:30) apresentava-se pura tendo-se obtido o composto karavilagenina C (**1.92**). Por sua vez, a fração E7B4L (539 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 70:30 a 55:45) continha algumas impurezas, tendo sido possível, no entanto, identificar a presença do composto karavilagenina C.

Uma vez que este composto já tinha sido anteriormente isolado e caracterizado, não se procedeu à sua purificação.

3.2.3.1.2.1.5. Estudo da fração E7B4M

A fração E7B4M (189 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 55:45 a 50:50) foi fracionada por cromatografia em coluna (sílica gel), usando como mistura de eluentes *n*-hexano:AcOEt (80:20 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 60:40). Após análise cromatográfica por TLC, os eluídos foram associados em doze frações (E7B4M1 a E7B4M12). A fração E7B4M8 (148 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 50:50) apresentava-se pura por TLC. Por análise espectroscópica identificou-se a presença de um novo composto, designado por balsacurpetoxitol (**2.2**).

Balsacurbepoxitol, 24*S*,25-Epoxi-7β-metoxicucurbit-5-en-3β,23(*R*)-diol (**2.2**)

Pó branco amorfo

$[\alpha]_D^{20} + 92.1$ (c 0.095, CHCl₃)

IV, $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ (NaCl): 3418, 2955, 2926, 2872, 1716,

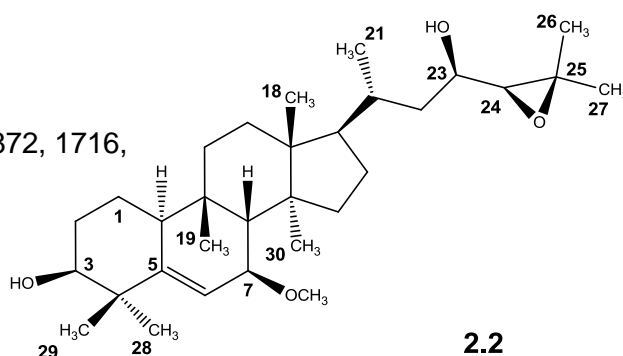
1653, 1456, 1379, 1084, 758

ESIMS, m/z : 498 [M+ 2Na -2H₂O]⁺,

530 [M+ 2K -2H₂O]⁺

HR-ESITOFMS, m/z : 511,37696

(calculado para C₃₁H₅₂O₄Na: 511,37578)



2.2

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5,77 (1H, *d*, $J = 5,0$ Hz, H-6), 3,50 (1H, *dd*, $J = 8,4$ e $2,2$ Hz, H-23), 3,45 (1H, *s largo*, H-3), 3,37 (1H, *d largo*, $J = 5,0$ Hz, H-7), 3,28 (3H, *s*, 7-Ome), 2,65 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, H-24), 2,21 (1H, *dd*, $J = 11,0$ e $6,0$ Hz, H-10), 1,99 (1H, *d*, $J = 3,0$ Hz, H-8), 1,91 (1H, *m*, H-2a) 1,77 (1H, *m*, H-20), 1,73 (1H, *m*, H-2b), 1,69 (1H, *m*, H-22a) 1,61 (2H, *m*, H-11), 1,51 (2H, *m*, H-1), 1,44 (2H, *m*, H-12), 1,39 (1H, *m*, H-17), 1,30 (2H, *m*, H-15), 1,25 (3H, *s*, Me-27), 1,23 (3H, *s*, Me-26), 1,15 (3H, *s*, Me-29), 0,97 (3H, *s*, Me-28), 0,93 (3H, *s*, Me-19), 0,90 (3H, *s*, Me-18), 0,89 (3H, *d*, $J = 6,4$ Hz, Me-21), 0,88 (1H, *m*, H-22b), 0,67 (3H, *s*, Me-30)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 146,9 (C-5), 120,7 (C-6), 77,2 (C-7), 76,7 (C-3), 68,3 (C-24), 68,1 (C-23), 59,2 (C-25), 56,3 (7-OMe), 50,9 (C-17), 47,9 (C-14), 47,8 (C-8), 46,2 (C-13), 41,7 (C-4), 40,3 (C-22), 38,7 (C-10), 34,6 (C-15), 34,0 (C-9), 32,7 (C-11), 32,0 (C-20), 30,2 (C-12), 28,8 (C-19), 28,7 (C-2), 27,8 (C-28), 27,8 (C-16), 25,4 (C-29), 25,0 (C-27), 21,1 (C-1), 19,2 (C-26), 18,6 (C-21), 18,0 (C-30), 15,4 (C-18)

3.2.3.1.2.1.6. Estudo da fração E7B4O

A fração E7B4O (202 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 40:60 a 80:20) foi fracionada por cromatografia em coluna (sílica gel), utilizando como misturas de eluentes *n*-hexano:AcOEt (70:30 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 60:40). Desta separação resultaram nove frações (E7B4O1 a E7B4O9). A fração E7B4O3 (171 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 50:50 a 40:60) apresentava por TLC uma demarcada banda corada de castanho escuro aquando da revelação com ácido, seguida de aquecimento. Esta fração foi cromatografada em coluna de sílica gel, eluída com um gradiente de polaridade crescente de CH_2Cl_2 :MeOH (100:0 a 50:50). Os eluídos recolhidos foram associados em treze frações (E7B4O3A a E7B4O3N). A fração E7B4O3F (133 mg, eluída com CH_2Cl_2 :MeOH, 97.5:2.5) apresentava-se pura na análise por TLC, pelo que seguiu para estudos espectroscópicos, tendo-se identificado um novo composto que se designou por balsacurbitriol (**2.1**)

Balsacurbitriol, 7 β -metoxicucurbita-5,25-dieno-3 β ,23(*R*),24(*R*)-triol (**2.1**)

Pó branco amorfo

$[\alpha]_D^{20} + 79.12$ (*c* 0.1, CHCl_3)

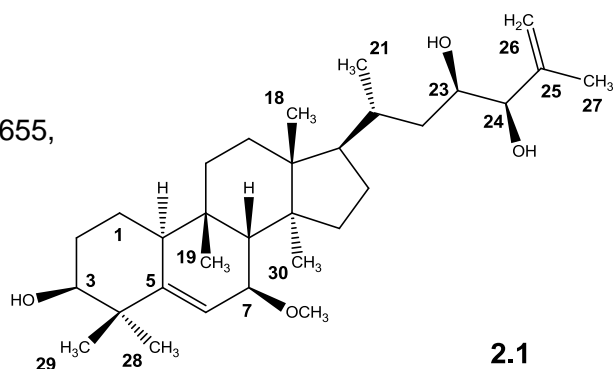
IV, $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ (NaCl): 3405, 2951, 2874, 1655,

1466, 1454, 1381, 1082, 936, 758

ESIMS, *m/z*: 489 $[\text{M} + \text{H}]^+$

HR-ESITOFMS, *m/z*: 511,37739

(calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{Na}$: 511,37578).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5,81 (1H, *d*, H-6), 4,98 (1H, *s*, H-26a), 4,93 (1H, *s largo*, H-26b), 3,77 (1H, *d*, *J* = 6,6 Hz, H-24), 3,67 (1H, *ddd*, *J* = 10,9, 6,6 e 1,9 Hz, H-23) 3,50 (1H, *s largo*, H-3), 3,41 (1H, *d largo*, *J* = 5,4 Hz, H-7), 3,32 (3H, *s*, 7-OMe), 2,26 (1H, *dd*, *J* = 11,8 e 5,1, H-10), 2,04 (1H, *s largo*, H-8), 1,87 (1H, *m*, H-16a) 1,73 (2H, *m*, H-2), 1,73 (1H, *m*, H-20), 1,71 (3H, *s*, Me-27), 1,61 (1H, *m*, H-11a) 1,56 (2H, *m*, H-1), 1,53 (2H, *m*, H-12) 1,52 (1H, *m*, H-22a), 1,49 (1H, *m*, H-11b), 1,42 (1H, *m*, H-17), 1,33 (1H, *m*, H-16b), 1,31 (2H, *m*, H-15), 1,19 (3H, *s*, Me-29), 1,01 (3H, *s*, Me-28), 0,97 (3H, *s*, Me-19), 0,94 (3H, *s*, Me-18), 0,93 (1H, *m*, H-22b), 0,92 (3H, *d*, *J* = 6,4 Hz, Me-21), 0,69 (3H, *s*, Me-30)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 146,9 (C-5), 144,8 (C-25), 121,0 (C-6), 114,2 (C-26), 80,3 (C-24), 77,4 (C-7), 76,9 (C-3), 69,6 (C-23), 56,4 (7-OMe), 51,0 (C-17), 48,0 (C-14), 47,9 (C-8), 46,3 (C-13), 41,9 (C-4), 39,8 (C-22), 38,8 (C-10), 34,7 (C-15), 34,1 (C-9), 32,8 (C-11), 32,6 (C-20), 30,3 (C-12), 29,0 (C-19), 28,7 (C-2), 28,0 (C-16), 27,8 (C-28), 25,5 (C-29), 21,2 (C-1), 18,6 (C-21), 18,1 (C-30), 18,0 (C-27), 15,5 (C-18)

3.2.3.1.3. Estudo da fração E7D

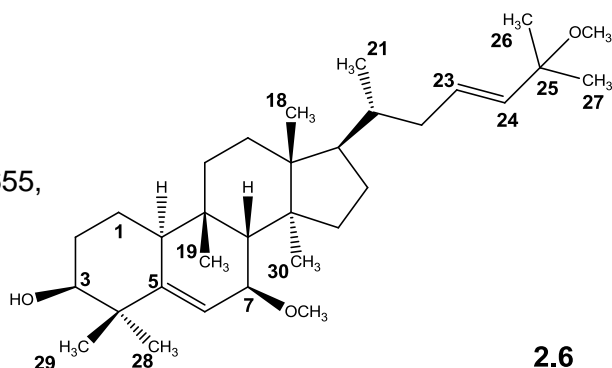
A fração E7D (559 mg, eluída com CH₂Cl₂:MeOH, 97.5:2.5 a 90:10 - cf. ponto 3.2.3.1) foi cromatografada em coluna de sílica gel, com misturas de CH₂Cl₂:MeOH (100:0 a 70:30), da qual resultaram seis frações (E7D1 a E7D6). A fração E7D2 (106 mg, eluída com CH₂Cl₂:MeOH, 97.5:2.5) apresentou, na placa de TLC, duas manchas de coloração castanha, quando revelada com ácido, seguida de aplicação de calor. Por conseguinte, esta fração foi submetida a uma cromatografia em coluna, eluída com misturas de CH₂Cl₂:MeOH (100:0 a 70:30) de polaridade crescente. Os eluídos recolhidos foram associados em nove frações (E7D2A a E7D2I). Por análise cromatográfica por TLC, verificou-se que as frações E7D2C (32 mg, eluída com CH₂Cl₂:MeOH, 99:1) e E7D2F (22 mg, eluída com CH₂Cl₂:MeOH, 98.5:1.5) eram constituídas por compostos puros. Deste modo, por análise espectroscópica identificaram-se os compostos karavilagenina A (**2.6**) e karavilagenina B (**2.7**), correspondentes às frações E7D2C (32 mg) e E7D2F (22 mg), respetivamente.

Karavilagenina A, 7 β ,25-dimetoxicucurbita-5,23(E)-dien-3 β -ol (2.6)

Pó branco amorfo

 $[\alpha]_D^{20} + 76,98$ (c 0.097, MeOH)**IV**, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (NaCl): 3441, 2933, 2874, 1655,

1464, 1381, 1080, 977, 937, 754

ESIMS, m/z : 487 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 509 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ **2.6**

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 5,81 (1H, *d*, $J = 5,5$ Hz H-6), 5,49 (1H, *ddd*, $J = 15,6, 8,2$ e 5,5 Hz, H-23) 5,36 (1H, *d*, $J = 15,6$ Hz, H-24), 3,49 (1H, *t*, $J = 2,8$ Hz, H-3), 3,40 (1H, *d* *largo*, $J = 5,5$ Hz, H-7), 3,32 (3H, *s*, 7-OMe), 3,12 (3H, *s*, 25-OMe), 2,25 (1H, *dd*, $J = 11,4$ e 5,3 Hz, H-10), 2,19 (1H, *m*, H-22a) 2,02 (1H, *s* *largo*, H-8), 1,88 (1H, *m*, H-16a), 1,76 (1H, *m*, H-22b), 1,73 (2H, *dd*, $J = 6,3$ e 2,9 Hz, H-2), 1,62 (1H, *m*, H-12a), 1,59 (1H, *m*, H-11a) 1,55 (2H, *m*, H-1), 1,50 (1H, *m*, H-20), 1,49 (1H, *m*, H-12b), 1,46 (1H, *m*, H-17), 1,44 (1H, *m*, H-11b), 1,32 (2H, *m*, H-15), 1,31 (1H, *m*, H-16b), 1,23 (3H, *s*, Me-26), 1,23 (3H, *s*, Me-27), 1,18 (3H, *s*, Me-29), 1,01 (3H, *s*, Me-28), 0,96 (3H, *s*, Me-19), 0,91 (3H, *s*, Me-18), 0,88 (3H, *d*, $J = 6,0$ Hz, Me-21), 0,67 (3H, *s*, Me-30)

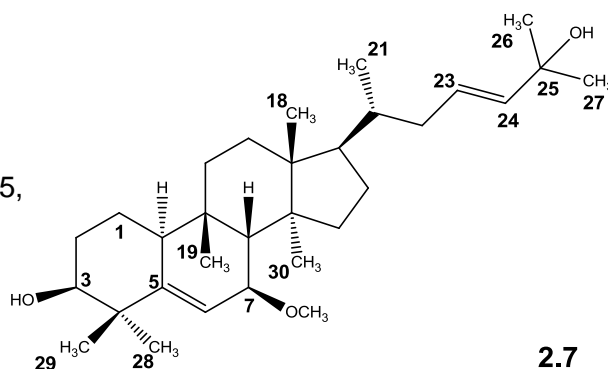
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 146,9 (C-5), 136,8 (C-24), 128,6 (C-23), 120,9 (C-6), 77,3 (C-7), 76,8 (C-3), 75,0 (C-25), 56,4 (7-OMe), 50,3 (25-OMe), 50,0 (C-17), 48,1 (C-8), 48,0 (C-14), 46,2 (C-13), 41,8 (C-4), 39,5 (C-22), 38,8 (C-10), 36,3 (C-20), 34,8 (C-15), 34,1 (C-9), 32,7 (C-11), 30,1 (C-12), 28,9 (C-19), 28,7 (C-2), 27,9 (C-28), 27,7 (C-16), 26,2 (C-26), 25,9 (C-27), 25,5 (C-29), 21,2 (C-1), 18,9 (C-21), 18,1 (C-30), 15,5 (C-18)

Karavilagenina B, 7 β -metoxicucurbita-5,23(E)-dieno-3 β ,25-diol (2.7)

Pó branco amorfo

 $[\alpha]_D^{20} + 39,2$ (c 0.1, MeOH)**IV**, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (NaCl): 3408, 2928, 2874, 1655,

1464, 1380, 1080, 977, 935, 758

ESIMS, m/z : 495 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ **2.7**

¹H-NMR (300 MHz, MeOD₄): δ 5,76 (1H, *d*, J = 4,7 Hz, H-6), 5,52 (1H, *m*, H-23), 5,52 (1H, *m*, H-24), 3,46 (1H, *m*, H-3), 3,44 (1H, *m*, H-7), 3,30 (3H, *s*, 7-OMe) 2,31 (1H, *dd*, J = 11,3 e 4,8, H-10), 2,15 (1H, *m*, H-22a), 2,03 (1H, *s*, H-8), 1,90 (1H, *m*, H-12a), 1,90 (1H, *m*, H-16a), 1,77 (1H, *m*, H-22b), 1,68 (2H, *m*, H-2), 1,66 (1H, *m*, H-11a), 1,56 (2H, *m*, H-1), 1,52 (1H, *m*, H-20), 1,51 (1H, *m*, H-12b), 1,51 (1H, *m*, H-17), 1,46 (1H, *m*, H-11b), 1,35 (1H, *m*, H-16b), 1,34 (2H, *m*, H-15), 1,23 (3H, *s*, Me-26), 1,23 (3H, *s*, Me-27), 1,16 (3H, *s*, Me-29), 1,01 (3H, *s*, Me-28), 0,95 (3H, *s*, Me-19), 0,94 (3H, *s*, Me-18), 0,90 (3H, *d*, J = 5,7 Hz, Me-21), 0,73 (3H, *s*, Me-30)

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD₄): δ 149,4 (C-5), 140,8 (C-24), 125,9 (C-23), 120,3 (C-6), 78,9 (C-7), 77,5 (C-3), 71,2 (C-25), 56,4 (7-OMe), 51,2 (C-17), 49,5 (C-8), 49,1 (C-14), 47,3 (C-13), 42,5 (C-4), 40,3 (C-22), 37,7 (C-20), 35,8 (C-15), 35,1 (C-9), 33,8 (C-11), 31,3 (C-12), 30,1 (C-26), 30,1 (C-2), 30,0 (C-27), 29,4 (C-19), 28,8 (C-28), 28,7 (C-16), 26,0 (C-29), 22,4 (C-1), 19,3 (C-21), 18,8 (C-30), 15,9 (C-18)

3.2.3.2. Estudo da fração E9

Na análise cromatográfica por TLC da fração E9 (4.3 g, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 55:45 a 60:40 - cf. ponto 3.2.3) observou-se a presença de bandas visíveis a 254 nm, até então inexistentes, o que constituiu interesse para estudo. Para além disso, foi também visível uma forte coloração verde, indicativa da presença de clorofilas. Deste modo, o fracionamento foi realizado num sistema cromatográfico automático, designado por *Combiflash* (fluxo de 8 ml/min e deteção parametrizada entre 200 a 360 nm), no qual foi utilizada uma coluna de sílica RP 18 de fase reversa com 43 g, eluída com misturas de H₂O:MeOH (100:0 e 0:100) de polaridade crescente (Tabela 3.5). Desta separação resultaram um total de nove frações (E9A a E9I). Após análise do perfil cromatográfico por TLC, apenas as frações E9D, E9F e E9G constituíram interesse para um estudo mais detalhado.

Tabela 3.5 Cromatografia em coluna da fração E9

Fração	Massa (mg)	Eluente (V/V) H ₂ O:MeOH
E9A (1-23)	49,9	100:0 a 47,5:52,5
E9B (24-36)	226,3	45:55 a 35:65
E9C (37-43)	170,3	35:65 a 25:75
E9D(44-51)	658,2	25:75 a 20:80
E9E (52-54)	189	20:80 a 15:85
E9F (55-65)	911,8	15:85 a 10:90
E9G (66-72)	1026	10:90 a 0:100
E9H (73-90)	1150	0:100
E9I (91-108)	66,3	0:100

3.2.3.2.1. Estudo da fração E9D

A fração E9D (658 mg, eluída com H₂O:MeOH, 25:75 a 20:80) foi cromatografada por *Combiflash* (fluxo de 6 ml/min e amplitude de deteção entre os 200 a 360 nm), usando uma coluna de sílica de 12 g, eluída com misturas de polaridade crescente de *n*-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 70:30). Os eluídos recolhidos foram analisados por TLC e associados em seis frações (E9D1 a E9D6). A fração E9D4 (311 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 40:60) foi recristalizada usando a mistura de solventes *n*-hexano:AcOEt. O precipitado obtido foi isolado (75 mg) e analisado por espectroscopia, tendo sido identificado o composto kuguacina C (**2.9**).

Kuguacina C, 25,26,27-trinor-cucurbit-5-eno-7,23-dion-3β-ol (**2.9**)

Pó branco amorfo

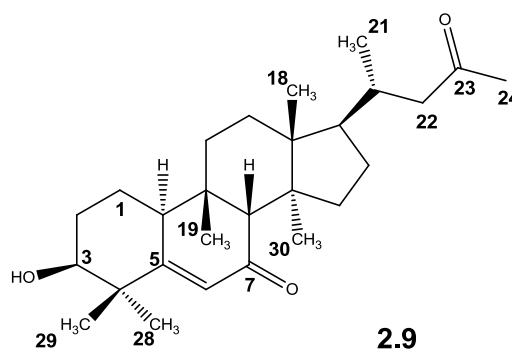
$[\alpha]_D^{20} + 135.3$ (*c* 0.093, CHCl₃)

IV, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (NaCl): 3448, 2957, 2931, 2876,

1705, 1645, 1467, 1379, 1361, 1298,

1263, 1157, 1087, 977, 754

ESIMS, *m/z*: 415 [M+H]⁺, 437 [M+Na]⁺



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6,08 (1H, *s largo*, H-6), 3,65 (1H, *s largo*, H-3), 2,69 (1H, *m*, H-10), 2,49 (1H, *d largo*, *J* = 15,2 Hz, H-22a), 2,40 (1H, *s*, H-8), 2,14 (1H, *m*, H-22b), 2,10 (3H, *s*, Me-24), 2,03 (1H, *m*, H-20), 1,99 (1H, *m*, H-2a), 1,82 (1H, *m*, H-2b), 1,82 (1H, *m*, H-16a), 1,75 (1H, *m*, H-11a), 1,72 (2H, *m*, H-1), 1,70 (1H, *m*, H-12a), 1,59 (1H, *m*, H-12b), 1,55 (1H, *m*, H-15a), 1,48 (1H, *m*, H-11b), 1,48 (1H, *m*, H-17), 1,29 (1H, *m*, H-16b), 1,24 (3H, *s*, Me-28), 1,13 (3H, *s*, Me-29), 1,08 (1H, *m*, H-15b), 0,96 (3H, *s*, Me-19), 0,91 (3H, *s*, Me-18), 0,90 (3H, *d*, *J* = 5,6 Hz, Me-21), 0,83 (3H, *s*, Me-30)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 209,4 (C-23), 202,8 (C-7), 169,2 (C-5), 126,0 (C-6), 76,8 (C-3), 59,8 (C-8), 51,3 (C-22), 49,8 (C-17), 48,7 (C-14), 45,9 (C-13), 42,9 (C-4), 40,4 (C-10), 35,9 (C-9), 34,6 (C-15), 33,0 (C-20), 31,4 (C-11), 30,7 (C-24), 29,9 (C-12), 28,8 (C-2), 28,2 (C-16), 28,0 (C-19), 28,0 (C-29), 25,0 (C-28), 21,0 (C-1), 19,9 (C-21), 18,2 (C-30) 15,5 (C-18)

3.2.3.2.2. Estudo da fração E9F

A fração E9F (912 mg, eluída com H₂O:MeOH, 15:85 a 10:90) foi sujeita a uma cromatografia em coluna (sílica gel), eluída com misturas de *n*-hexano:CH₂Cl₂ (20:80 a 0:100) e CH₂Cl₂:MeOH (100:0 a 70:30). A junção dos eluídos foi feita de acordo com a análise do seu perfil cromatográfico por TLC, resultando num total de treze frações (E9F1 a E9F13). A E9F5 representou interesse pela presença de dois compostos que absorviam a 254 nm e coravam de castanho quando revelados com a solução ácida. Destacou-se, ainda, a fração E9F7 pela presença de um composto que não absorvia a 254 nm e corava de castanho.

3.2.3.2.2.1. Estudo da fração E9F5

O fracionamento da fração E9F5 (137 mg, eluída com CH₂Cl₂:MeOH, 97.5:2.5) foi realizado por *Combiflash* (fluxo de 6 ml/min e um intervalo de detecção compreendido entre os 200 e 360nm), utilizando uma coluna de sílica gel de 24 g, eluída com um gradiente de polaridade crescente de *n*-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 70:30). A partir da análise por TLC, os eluídos resultantes foram associados em cinco frações (E9F5A a E9F5E). O estudo prosseguiu com a fração E9F5B. A fração E9F5C, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 55:45 a 50:50, era constituída por

um composto puro (35 mg) em TLC . As análises dos seus dados espectroscópicos revelaram a presença do composto kuguacina B (**2.8**).

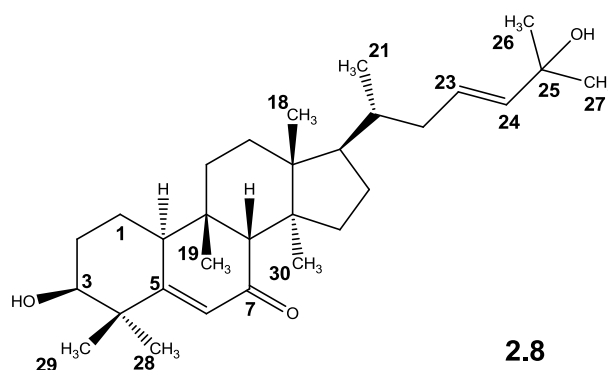
Kuguacina B, cucurbita-5,23(*E*)-dien-7-ona-3 β ,25-diol (**2.8**)

Pó branco amorfo

$[\alpha]_D^{20} + 81,2$ (c 0.1, CHCl₃)

IV, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ (NaCl): 3419, 2957, 2930, 2874, 1645, 1464, 1381, 1298, 977, 756

ESIMS, m/z : 457 [M+H]⁺, 479 [M+Na]⁺,



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6,07 (1H, *s largo*, H-6), 5,56 (1H, *m*, H-23), 5,56 (1H, *m*, H-24), 3,63 (1H, *t*, $J = 2,6$ Hz, H-3), 2,69 (1H, *m*, H-10), 2,38 (1H, *s*, H-8), 2,15 (1H, *m*, H-22a), 1,96 (1H, *m*, H-2a), 1,86 (1H, *m*, H-16a), 1,81 (1H, *m*, H-2b), 1,75 (1H, *m*, H-11a), 1,72 (1H, *m*, H-22b), 1,71 (2H, *m*, H-1), 1,67 (1H, *m*, H-12a), 1,55 (1H, *m*, H-12b), 1,54 (1H, *m*, H-15a), 1,47 (1H, *m*, H-20), 1,45 (1H, *m*, H-17), 1,44 (1H, *m*, H-11b), 1,33 (1H, *m*, H-16b), 1,28 (3H, *s*, Me-26), 1,28 (3H, *s*, Me-27), 1,23 (3H, *s*, Me-28), 1,12 (3H, *s*, Me-29), 1,05 (1H, *m*, H-15b), 0,94 (3H, *s*, Me-19), 0,87 (3H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Me-21), 0,86 (3H, *s*, Me-18), 0,81 (3H, *s*, Me-30)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 203,1 (C-7), 169,3 (C-5), 139,7 (C-24), 126,0 (C-6), 125,2 (C-23), 76,7 (C-3), 70,8 (C-25), 59,9 (C-8), 49,6 (C-17), 48,6 (C-14), 45,8 (C-13), 42,9 (C-4), 40,4 (C-10), 39,2 (C-22), 36,4 (C-20), 35,9 (C-9), 34,6 (C-15), 31,4 (C-11), 30,1 (C-27), 30,0 (C-26), 30,0 (C-12), 28,8 (C-2), 28,0 (C-29), 28,0 (C-19), 27,9 (C-16), 24,9 (C-28), 21,0 (C-1), 18,9 (C-21), 18,1 (C-30), 15,5 (C-18)

3.2.3.2.2.1.1. Estudo da fração E9F5B

A fração E9F5B (56 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 75:25 a 60:40) foi purificada por cromatografia preparativa (duas placas), eluída com uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH (95:5). O resíduo resultante (51 mg) foi novamente sujeito a TLC preparativa (duas placas), eluída com uma mistura de CH₂Cl₂:acetona (90:10), tendo-se

obtido 23 mg de um composto puro. Pela análise espectroscópica concluiu-se estar perante um novo composto que foi designado por balsacurbinol (**2.5**).

Balsacurbinol, 25-metoxicucurbita-5,23(*E*)-dien-7-on-3 β -ol (**2.5**)

Pó branco amorfo

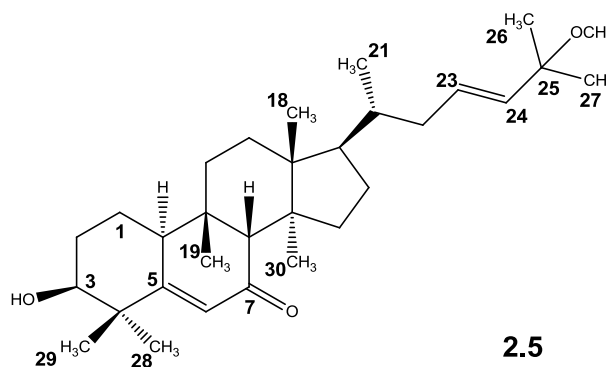
$[\alpha]_D^{20} + 76$ (*c* 0.1, CHCl₃)

IV, $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ (NaCl): 3447, 2957, 2928, 2874, 1645, 1464, 1379, 1298, 1076, 978, 754

ESIMS, *m/z*: 493 [M + Na]⁺,

HR-ESITOFMS, *m/z*: 471,38403

(calculado para C₃₁H₅₁O₃: 471,38327)



2.5

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6,08 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz, H-6), 5,49 (1H, *ddd*, *J* = 15,6, 8,1 e 5,4 Hz, H-23), 5,37 (1H, *d*, *J* = 15,6 Hz, H-24), 3,64 (1H, *s largo*, H-3), 3,13 (3H, *s*, 25-OMe), 2,70 (1H, *m*, H-10), 2,40 (1H, *s*, H-8), 2,17 (1H, *m*, H-22a), 1,98 (1H, *m*, H-2a), 1,88 (1H, *m*, H-16a), 1,82 (1H, *m*, H-2b), 1,78 (1H, *m*, H-22b), 1,78 (1H, *m*, H-11a), 1,73 (1H, *m*, H-12a), 1,72 (2H, *m*, H-1), 1,60 (1H, *m*, H-12b), 1,57 (1H, *m*, H-15a), 1,54 (1H, *m*, H-20), 1,45 (1H, *m*, H-11b), 1,45 (1H, *m*, H-17), 1,35 (1H, *m*, H-16b), 1,24 (3H, *s*, Me-29), 1,23 (3H, *s*, Me-26), 1,23 (3H, *s*, Me-27), 1,13 (3H, *s*, Me-28), 1,06 (1H, *m*, H-15b), 0,96 (3H, *s*, Me-19), 0,89 (3H, *d*, *J* = 6,1 Hz, Me-21), 0,87 (3H, *s*, Me-18), 0,81 (3H, *s*, Me-30)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 203 (C-7), 169,2 (C-5), 136,9 (C-24), 128,5 (C-23), 126,0 (C-6), 76,8 (C-3), 75,0 (C-25), 59,9 (C-8), 50,4 (25-OMe), 49,7 (C-17), 48,6 (C-14), 45,8 (C-13), 42,9 (C-4), 40,4 (C-10), 39,5 (C-22), 36,3 (C-20), 36,0 (C-9), 34,7 (C-15), 31,4 (C-11), 29,9 (C-12), 28,8 (C-2), 28,0 (C-28), 28,0 (C-19), 27,9 (C-16), 26,2 (C-26), 25,9 (C-27), 25,0 (C-29), 21 (C-1), 19,0 (C-21), 18,1 (C-30), 15,5 (C-18)

3.2.3.2.2.2. Estudo da fração E9F7

O fracionamento da fração E9F7 (161 mg, eluída com CH₂Cl₂:MeOH, 97.5:2.5 a 95:5) foi realizado por *Combiflash* (fluxo de 4 ml/min e amplitude de detenção entre 200 e 360 nm), usando uma coluna de sílica gel de 6 g, eluída com misturas de polaridade crescente de *n*-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 70:30). Após análise cromatográfica por TLC, os eluídos recolhidos foram associados em sete frações (E9F7A a E9F7G). A fração E9F7D (50 mg), eluída com *n*-hexano:AcOEt (60:40 a 55:45), encontrava-se pura, pelo que foi analisada por RMN, concluindo tratar-se do composto balsacurbitriol (**2.1**) isolado anteriormente (cf. ponto 3.2.3.1.2.1.6).

3.2.3.2.2.3. Estudo da fração E9G

A fração E9G (1 g, eluída com H₂O:MeOH, 10:90 a 0:100) foi cromatografada por *Combiflash* (fluxo de 6ml/min e intervalo de deteção definido entre 200 e 360 nm), utilizando uma coluna de sílica gel de 24 g, eluída com gradientes de polaridade crescente de *n*-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 a 70:30). Os eluídos recolhidos foram associados em seis frações (E9G1 a E9G6). No perfil cromatográfico por TLC observou-se uma banda que não absorvia a 254 nm e corava de castanho quando revelada com a solução ácida, correspondente à fração E9G2.

3.2.3.2.2.3.1. Estudo da fração E9G2

A fração E9G2 (74 mg, eluída com *n*-hexano:AcOEt, 80:20 a 75:25) foi submetida a uma cromatografia em coluna (sílica gel), eluída com misturas de *n*-hexano:CH₂Cl₂ (20:80 a 0:100) e CH₂Cl₂:MeOH (100:0 a 70:30). Desta separação resultaram oito frações (E9G2A a E9G2H). A fração E9G2B (46 mg, eluída com CH₂Cl₂:MeOH, 98:2) apresentava-se pura em TLC. A análise espectroscópica revelou a presença do composto karavilagenina A (**2.6**).

3.3. Ensaio biológicos

Os ensaios biológicos, para avaliar a capacidade dos compostos isolados para reverterem a resistência aos fármacos anticancerígenos, foram realizados pela equipa de investigação do Prof. Joseph Molnár, no Departamento de Microbiologia e Imunobiologia Médica, da University of Szeged, na Hungria.

Todos os compostos isolados neste trabalho (1.92 e 2.1 - 2.9), bem como os produtos resultantes das reações de oxidação (2.10 - 2.11), foram incluídos neste ensaio.

3.3.1. Caracterização das linhas celulares e do meio de cultura

Neste ensaio utilizaram-se células de linfoma T L5178 Y de rato (ECACC cat. no. 87111908, U.S. FDA, Silver Spring, MD, EUA) transfetadas ou não com o retrovírus pHa *MDR1/A* conforme descrito na literatura (Pastan et al., 1988). Ao meio das células que expressaram o gene *MDR-1* foi adicionado 60 ng/mL de colchicina (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha), de modo a manter a expressão do fenótipo MDR. As células de linfoma T L5178 Y de rato (células parentais, PAR) e as transfetadas foram cultivadas em meio McCoy 5A com 10% de soro de cavalo inativado, 100 U/L de L-glutamina e 100 mg/L de uma mistura de penicilina-estreptomicina (todos da Sigma Aldrich). Estas linhas celulares foram cultivadas em atmosfera húmida a 37°C, contendo 5% de CO₂.

Para além das anteriores, foram também utilizadas linhas celulares do adenocarcinoma do cólon humano (Colo 205 parentais e Colo 320/MDR-LPR que expressam o MDR-1), ATCC-CCL-220.1 (Colo 320) e CCL-222 (Colo 205), que foram adquiridas da LGC Promochem, Teddington, Inglaterra. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio e 100mM de HEPES. As células humanas do cancro do cólon semi-aderentes foram destacadas com 0.25% de tripsina e 0.02% de EDTA durante cinco minutos a 37°C.

3.3.2. Ensaio de citotoxicidade

A atividade citotóxica de todos os compostos foi testada para um intervalo de concentrações decrescentes, utilizando como modelos experimentais as linhas celulares de linfoma de rato e as de adenocarcinoma do cólon humano, em placas de 96 poços

de fundo plano. A concentração máxima testada para cada composto foi de 100 μM . Inicialmente, os compostos foram diluídos num volume de 100 μL de meio. Em seguida, 2×10^4 células diluídas em 100 μL de meio foram adicionadas a cada poço, com exceção dos poços para controlo do meio. As placas de cultura foram incubadas a 37°C, durante 24 h. No final do período de incubação, 20 μL de uma solução (5 mg/ml em PBS) de MTT (azul de tiazolilo, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) foram adicionados a cada poço. Após incubação a 37°C durante 4 h, foram adicionados 100 μL de uma solução (10% em 0.01M de HCl) de SDS (dodecil sulfato de sódio, Sigma) em cada poço. Em seguida, as placas foram novamente sujeitas a incubação a 37°C durante a noite. O crescimento celular foi determinado mediante a medição da densidade óptica (OD) a 550 nm (ref. 630 nm) por um leitor ELISA Multiskan EX (Thermo Labsystems, Cheshire, WA, EUA). A inibição do crescimento celular, expressa em percentagem, foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$100 - \left[\frac{\text{OD}_{\text{Amostra}} - \text{OD}_{\text{controlo do meio}}}{\text{OD}_{\text{controlo celular}} - \text{OD}_{\text{controlo do meio}}} \right] \times 100$$

Todas as experiências foram realizadas em triplicado. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, e os valores de IC_{50} foram obtidos pelo melhor ajuste na curva de inibição dose-dependente através da utilização do *software* GraphPad Prism 5. Apenas foram apresentados os resultados de análise com $r > 0.90$.

3.3.3. Teste de acumulação da Rodamina 123 (R123)

Inicialmente procedeu-se ao ajuste da densidade das suspensões de células em meio McCoy 5A ou RPMI 1640 (dependendo das duas linhas de células acima referidas, assim o respetivo meio), sem adição de soro, a 2×10^6 cels/mL e à distribuição de aliquotas de 500 μL de cultura de células por tubos Eppendorf. Em seguida, foram adicionadas aliquotas de 10 μL dos compostos testados em várias concentrações (0.2, 2 ou 20 μM), tendo-se adicionando, também, 20 μM de verapamil (EGIS Pharmaceuticals PLC, Budapest, Hungria), como controlo positivo. Adicionou-se DMSO a 4% como controlo de solvente. Posteriormente as amostras foram incubadas durante 10 min à temperatura ambiente. Depois disto, adicionaram-se 10 μL de rodamina 123 (concentração final - 5,2 μM), incubando-se as amostras 20 min a 37°C. Findo este tempo, as amostras foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 500 μL de tampão

fosfato salino (PBS). A fluorescência emitida pelas células foi determinada por citometria de fluxo (Partec CyFlow Space Instrument, Partec GmbH, Münster, Alemanha).

A razão da atividade de fluorescência (FAR) foi calculada com base nos valores de intensidade média de fluorescência (FL-1) das linhas de células resistentes tratadas/não tratadas (linfoma de rato transfectado (MDR) ou células do adenocarcinoma do colón humano Colo 320) e as respectivas linhas de células sensíveis tratadas/não tratadas (linfoma de rato (PAR) ou células do adenocarcinoma do colón humano Colo 205), de acordo com a equação:

$$\text{FAR} = \frac{\text{FL-1 MDR}_{\text{tratados}} / \text{FL-1 MDR}_{\text{n\~{a}o tratados}}}{\text{FL-1 PAR}_{\text{tratados}} / \text{FL-1 PAR}_{\text{n\~{a}o tratados}}}$$

3.3.4. Ensaio de combinação dos compostos com a doxorrubicina.

Este estudo foi realizado com os compostos que demonstraram ser ativos nas células de linfoma de rato multirresistentes com o objectivo de avaliar o seu efeito quando combinados com o fármaco anti-tumoral doxorrubicina.

Inicialmente a doxorrubicina (2mg/ml, Teva Pharmaceuticals, Budapeste, Húngria), bem como os compostos em estudo foram diluídos, na direcção horizontal e vertical, respetivamente. Por cada poço da placa foram distribuídas 2×10^5 células/mL, num volume final de 200 μL de meio por poço. Seguidamente, as placas de cultura foram incubadas durante 48 h e findo esse período, a taxa de crescimento foi determinada pelo método de coloração pelo MTT.

As interações com o fármaco foram avaliadas por intermédio do software CompuSyn. Apenas foram apresentados os dados com um coeficiente de correlação linear (r) em que $r > 0,90$. A interação entre o composto e o fármaco foi expressa através do índice combinatório (CI). Para tal, foi utilizada a seguinte classificação: $0,1 < \text{CI} < 0,3$ forte sinergismo; $0,3 < \text{CI} < 0,7$ sinergismo; $0,7 < \text{CI} < 0,9$ sinergismo moderado a ligeiro; $0,9 < \text{CI} < 1,1$ efeito aditivo; $\text{CI} > 1,1$ antagonismo (Chou, 2010).

Capítulo 4

Conclusões

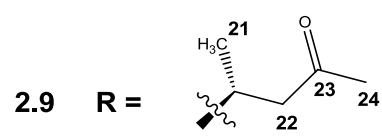
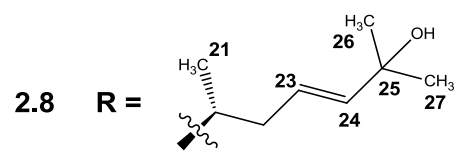
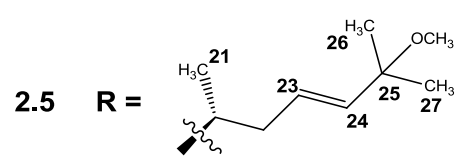
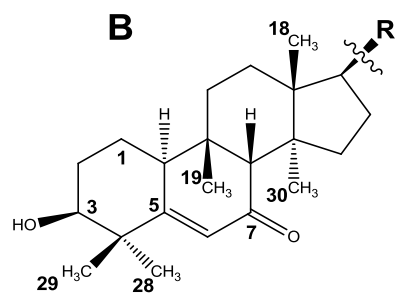
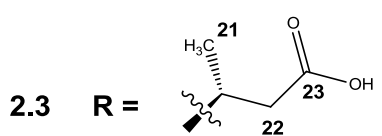
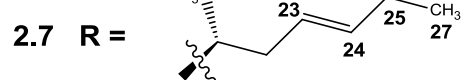
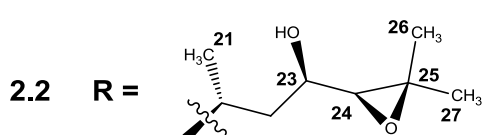
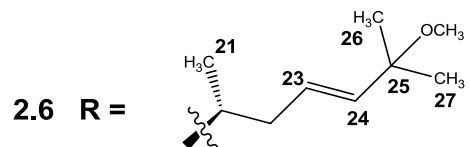
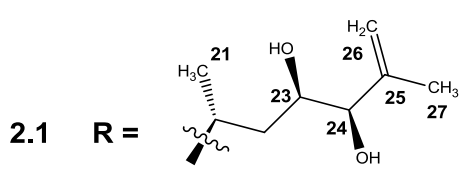
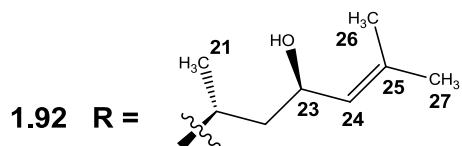
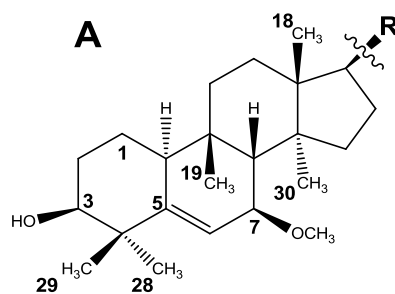
4. Conclusões

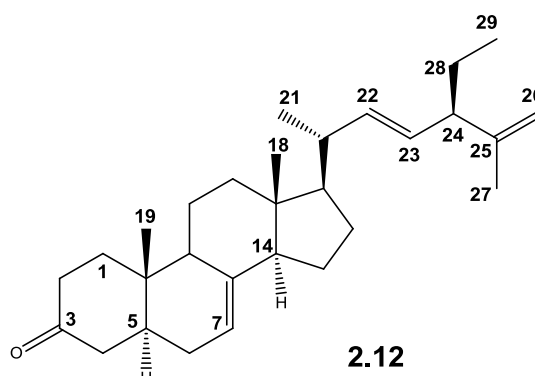
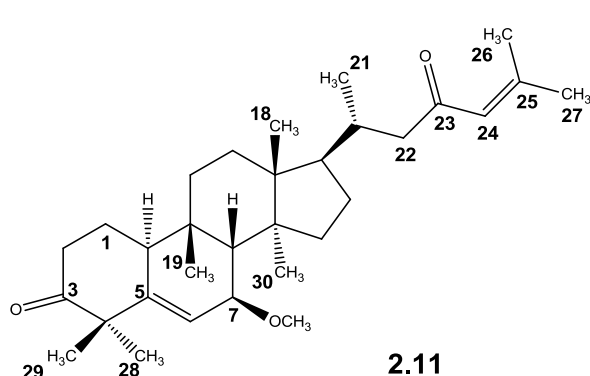
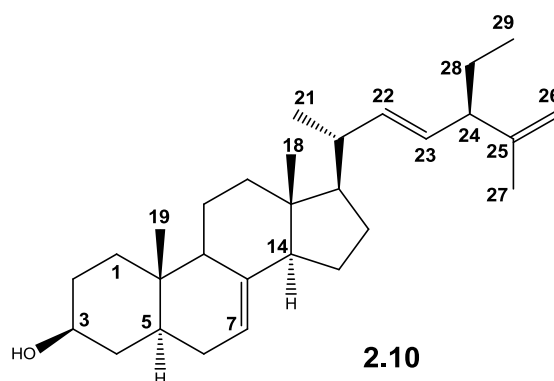
A multirresistência farmacológica (MDR) é uma das principais causas para a ineficácia da quimioterapia no tratamento do cancro. Um dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento de MDR é a sobre-expressão da P-gp. Este trabalho teve como principal objetivo a obtenção de uma pequena biblioteca de moduladores da P-gp, a partir do estudo fitoquímico do extrato metanólico da planta Africana *Momordica balsamina*, utilizada na medicina tradicional pelas suas inúmeras propriedades terapêuticas.

Do fracionamento do extrato metanólico das partes aéreas de *Momordica balsamina*, por processos cromatográficos, resultaram cinco compostos novos com o esqueleto cucurbitano, denominados balsacurbitriol (**2.1**), balsacurbepoxitol (**2.2**), ácido balsacurbitóico (**2.3**), balsacurbital (**2.4**) e balsacurbinol (**2.5**), e cinco compostos já descritos anteriormente com o mesmo esqueleto: karavilagenina C (**1.92**), karavilagenina A (**2.6**), karavilagenina B (**2.7**), kuguacina B (**2.8**) e kuguacina C (**2.9**) e o esteroide, 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol (**2.10**). A oxidação da karavilagenina C (**1.92**) e do esteroide (**2.10**) originou os compostos **2.11** e **2.12**, respetivamente. O estabelecimento das estruturas dos compostos foi realizado através da análise dos seus dados físicos e espectroscópicos: infravermelho, espectrometria de massa e estudos de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C , DEPT) e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY).

Todos os compostos (**1.92** e **2.1-2.12**) foram avaliados como moduladores da P-gp. Para tal, recorreu-se ao teste de acumulação da rodamina 123, por citometria de fluxo, utilizando-se células de linfoma T L5178Y de rato transfetadas com o gene humano *MDR-1* (L5178Y) e células do adenocarcinoma do colon humano multirresistentes (colo 320).

Na análise dos resultados obtidos para as células L5178Y, observou-se que quando comparados com o controlo positivo (verapamil), dez dos treze compostos em estudo (**1.92**, **2.1-2.2**, **2.4-2.9** e **2.11**) apresentaram uma forte capacidade de modular a P-gp (FAR > 10) a 20 μM , sendo que o composto balsacurbinol (**2.5**) foi o mais ativo (FAR = 137.77). Quando analisados numa concentração mais baixa, a 2 μM , a maioria dos compostos mostraram ser ativos, destacando-se o composto karavilagenina B (**2.7**) para o qual se registou uma maior atividade (FAR = 40.40). Por sua vez, numa concentração de 0,2 μM os compostos karavilagenina B (**2.7**) e 7 β -metoxicucurbita-5,24-dieno-3,23-diona (**2.11**) demonstraram manter a sua atividade (FAR = 1.11 e 1.07, respetivamente; verapamil, FAR = 1.05).





Nas células do colo 320, cinco dos compostos (**1.92**, **2.1-2.2**, **2.5** e **2.7**), quando testados a 20 μM , apresentaram uma forte atividade de modulação da P-gp, tendo sido observado o maior valor de FAR para o balsacurbitriol (**2.1**) (FAR = 29.75). Quando testados a 2 μM , a maioria dos compostos foram ativos, destacando-se o balsacurbepoxitol (**2.2**) que apresentou o maior valor de FAR (FAR = 3.47).

No ensaio de citotoxicidade, os compostos na sua globalidade apresentaram uma baixa ou nula citotoxicidade nas concentrações estudadas para as duas linhas celulares, com exceção dos compostos **2.10** ($\text{IC}_{50} = 6.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$) e **2.12** ($\text{IC}_{50} = 18.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$) que apresentaram efeitos citotóxicos para as células L5178Y sensíveis.

A análise dos resultados permitiu concluir que as características intrínsecas das duas linhas celulares (L5178Y e Colo 320) pareceram exercer influência na atividade dos compostos, registrando-se algumas diferenças. Os resultados obtidos sugeriram para os compostos com o núcleo **A**, a presença de um grupo hidroxilo em C-25 como preferencial. Pelo contrário, para os composto com o núcleo **B**, obtiveram-se melhores resultados quando o substituinte era um grupo metoxilo em C-25. Por sua vez, a presença de uma cetona α,β -insaturada em C-7 aumentou a afinidade com a P-gp. Para além disso, observou-se uma acentuada diminuição da atividade para alguns dos

compostos que apresentavam uma cadeia lateral mais curta, sugerindo que o comprimento da cadeia lateral poderá ter influência na atividade destes compostos.

Alguns dos compostos em estudo foram testados em combinação com o fármaco antitumoral doxorrubicina, verificando-se que, na sua maioria, existia um sinergismo com o efeito citotóxico deste fármaco nas células de linfoma T L5178Y de rato transfetadas com o gene humano *MDR-1*. Os compostos mais eficazes foram o balsacurbital (**2.4**) e o balsacurbinol (**2.5**) que demonstraram um forte sinergismo com a doxorrubicina, com um índice combinatório (CI) de 0.29 ± 0.05 e 0.29 ± 0.05 , respetivamente. Paralelamente a estes resultados, uma forte atividade inibitória foi observada para estes dois compostos (FAR= 58.24 e 137.77, a 20 μ M, respetivamente). Pelo contrário, os compostos 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3 β -ol (**2.10**) e 24-etil-5 α -colesta-7,22,25-trien-3-ona (**2.12**) resultaram num efeito aditivo e antagonista, respetivamente, o que é concordante com os restantes resultados, uma vez que para estes compostos não apresentaram valores de FAR significativos.

Estes resultados confirmam a importância do esqueleto cucurbitano como estrutura de referência no desenvolvimento de moduladores da P-gp mais potentes, realçando deste modo a importância dos compostos derivados de plantas medicinais, nomeadamente da planta africana *Momordica balsamina*, para a reversão da MDR em células tumorais. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados de relação estrutura-atividade para poder melhorar a atividade destes compostos ou como contributo para o *design* racional de novos moduladores.

Referências bibliográficas

- Abdallah, H. M., Al-Abd, A. M., El-Dine, R. S., and El-Halawany, A. M. (2015). P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *Journal of advanced research*, 6(1), 45-62.
- Ajikumar, P. K., Tyo, K., Carlsen, S., Mucha, O., Phon, T. H., and Stephanopoulos, G. (2008). Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm*, 5(2), 167-190.
- Ajuru M., and Nmom F. (2017). A Review on the Economic Uses of Species of Cucurbitaceae and Their Sustainability in Nigeria. *American Journal of Plant Biology*, 2(1), 17-24.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Kimura, Y., Takido, M., Kokke, W. C., and Tamura, T. (1994). 7-OXO-10 α -Cucurbitadienol from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* and its anti-inflammatory effect. *Phytochemistry*, 36(1), 153-157.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., and Croteau, R. (1998). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4126-4133.
- Bot, Y., Mgbojikwe, L., Nwosu, C., Abimiku, A., Dadik, J., and Damshak, D. (2007). Screening of the fruit pulp extract of *Momordica balsamina* for anti HIV property. *African journal of Biotechnology*, 6(1), 047-052.
- Cabrera, G. M., and Seldes, A. M. (1997). Short side-chain cycloartanes from *Tillandsia usneoides*. *Phytochemistry*, 45(5), 1019-1021.
- Cao, J. Q., Zhang, Y., Cui, J. M., and Zhao, Y. Q. (2011). Two new cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* L. *Chinese Chemical Letters*, 22(5), 583-586.
- Casco, S., and Soto-Vega, E. (2016). Novel strategies against multidrug resistance mediated by P-glycoprotein. *Drugs of the Future*, 41(3), 169-175.
- Chang, C. I., Chen, C. R., Liao, Y. W., Cheng, H. L., Chen, Y. C., and Chou, C. H. (2008). Cucurbitane-type triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *J Nat Prod*, 71(8), 1327-1330.
- Chen, C. R., Liao, Y. W., Kuo, Y. H., Hsu, J. L., and Chang, C. I. (2017a). Cucurbitane-Type Triterpenoids from *Momordica charantia*. *Nat Prod Commun*, 12(6), 889-892.
- Chen, C. R., Liao, Y. W., Kuo, Y. H., Hsu, J. L., and Chang, C. I. (2017b). New Norcucurbitane Triterpenoids from *Momordica charantia* var. *abbreviata*. *Nat Prod Commun*, 12(7), 1013-1016.
- Chen, J., Li, W., Yao, H., and Xu, J. (2015a). Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia*, 103, 231-241.
- Chen, J., Tian, R., Qiu, M., Lu, L., Zheng, Y., and Zhang, Z. (2008). Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. *Phytochemistry*, 69(4), 1043-1048.
- Chen, J. C., Chiu, M. H., Nie, R. L., Cordell, G. A., and Qiu, S. X. (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat Prod Rep*, 22(3), 386-399.
- Chen, J. C., Lau, C. B., Chan, J. Y., Fung, K. P., Leung, P. C., Liu, J. Q., Zhou, L., Xie, M. J., and Qiu, M. H. (2015b). The antigluconeogenic activity of cucurbitacins from *Momordica charantia*. *Planta Med*, 81(4), 327-332.
- Chen, J. C., Yuan, X. X., Zhou, L., Liu, J. Q., Nian, Y., Li, Z. R., Li, Y., Xie, M. J., and Qiu, M. H. (2014). Four new cucurbitacins from the fruit of *Momordica charantia*. *Helvetica Chimica Acta*, 97(11), 1546-1554.
- Chen, X., Bao, J., Guo, J., Ding, Q., Lu, J., Huang, M., and Wang, Y. (2012). Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anti-cancer drugs*, 23(8), 777-787.
- Cheng, B. H., Chen, J. C., Liu, J. Q., Zhou, L., and Qiu, M. H. (2013). Cucurbitane-Type Triterpenoids from *Momordica charantia*. *Helvetica Chimica Acta*, 96(6), 1111-1120.

- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70(2), 440-446.
- Cragg, G. M., and Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*, 1830(6), 3670-3695.
- Dandawate, P. R., Subramaniam, D., Padhye, S. B., and Anant, S. (2016). Bitter melon: a panacea for inflammation and cancer. *Chin J Nat Med*, 14(2), 81-100.
- Dhiman, K., Gupta, A., Sharma, D.K., Gill, N.S., and Goyal, A. (2012). A Review on the Medicinally Important Plants of the Family Cucurbitaceae. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, 4, 16-26.
- Flyman, M. V., and Afolayan, A. J. (2007). Proximate and mineral composition of the leaves of *Momordica balsamina* L.: an under-utilized wild vegetable in Botswana. *Int J Food Sci Nutr*, 58(6), 419-423.
- Franchi, G. G., and Pacini, E. (2017). *Momordica* (Cucurbitaceae) types and accuracy of representation of the diagnostic characters: from *Tacuinum sanitatis* to American still lifes. *Rendiconti Lincei*, 28(3), 569-581.
- Ghosh, S. (2016). Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: the role of oxidosqualene cyclases. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 82(4), 1189-1210.
- Gillet, J. P., and Gottesman, M. M. (2010). Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Multi-drug resistance in cancer*, 47-76.
- Haque, M. E., Alam, M. B., and Hossain, M. S. (2011). The efficacy of cucurbitane type triterpenoids, glycosides and phenolic compounds isolated from *Momordica charantia*: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(5), 1135.
- Hsiao, P. C., Liaw, C. C., Hwang, S. Y., Cheng, H. L., Zhang, L. J., Shen, C. C., Hsu, F. L., and Kuo, Y. H. (2013). Antiproliferative and hypoglycemic cucurbitane-type glycosides from the fruits of *Momordica charantia*. *J Agric Food Chem*, 61(12), 2979-2986.
- Hsu, C., Hsieh, C. L., Kuo, Y. H., and Huang, C. J. (2011). Isolation and identification of cucurbitane-type triterpenoids with partial agonist/antagonist potential for estrogen receptors from *Momordica charantia*. *J Agric Food Chem*, 59(9), 4553-4561.
- Jiang, Y., Peng, X. R., Yu, M. Y., Wan, L. S., Zhu, G. L., Zhao, G. T., Zhou, L., Qiu, M. H., and Liu, J. (2016). Cucurbitane-type triterpenoids from the aerial parts of *Momordica charantia* L. *Phytochemistry Letters*, 16, 164-168.
- Jin, H. G., Jin, Q., Ryun Kim, A., Choi, H., Lee, J. H., Kim, Y. S., Lee, D. G., and Woo, E. R. (2012). A new triterpenoid from *Alisma orientale* and their antibacterial effect. *Arch Pharm Res*, 35(11), 1919-1926.
- Juliano, R. L., and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 455(1), 152-162.
- Jung, K., Chin, Y. W., Yoon, K. d., Chae, H.-S., Kim, C. Y., Yoo, H., and Kim, J. (2013). Anti-inflammatory properties of a triterpenoidal glycoside from *Momordica cochinchinensis* in LPS-stimulated macrophages. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 35(1), 8-14.
- Kaushik, U., Aeri, V., and Mir, S. R. (2015). Cucurbitacins—an insight into medicinal leads from nature. *Pharmacognosy reviews*, 9(17), 12.
- Krishna, R., and Mayer, L. D. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*, 11(4), 265-283.
- Kushiro, T., and Ebizuka, Y. (2010). 1.18 - Triterpenes *Comprehensive Natural Products II* (pp. 673-708). Oxford: Elsevier.
- Lapitskaya, M. A., Vasiljeva, L. L., and Pivnitsky, K. K. (2008). o-Iodoxybenzoic acid in dimethylformamide as a convenient reagent for the oxidation of alcohols to aldehydes and ketones. *Mendeleev Communications*, 18(6), 309-311.

- Li, Y. C., Xu, X. J., Yang, J., Wu, X. G., and Fu, Q. Y. (2016). One new 19-nor cucurbitane-type triterpenoid from the stems of *Momordica charantia*. *Nat Prod Res*, 30(8), 973-978.
- Li, Z. J., Chen, J. C., Deng, Y. Y., Song, N. L., Yu, M. Y., Zhou, L., and Qiu, M. H. (2015). Two New Cucurbitane Triterpenoids from Immature Fruits of *Momordica charantia*. *Helvetica Chimica Acta*, 98(10), 1456-1461.
- Liao, Y. W., Chen, C. R., Chuu, J. J., Huang, H. C., Hsu, J. L., Huang, T. C., Kuo, Y. H., and Chang, C. I. (2013a). Cucurbitane Triterpenoids from the Fruit Pulp of *Momordica charantia* and Their Cytotoxic Activity. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 60(5), 526-530.
- Liao, Y. W., Chen, C. R., Hsu, J. L., Cheng, H. L., Shih, W. L., Kuo, Y. H., Huang, T. C., and Chang, C. I. (2011). Sterols from the Stems of *Momordica charantia*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58(7), 893-898.
- Liao, Y. W., Chen, C. R., Hsu, J. L., Lin, Y. S., Cheng, H. L., Shih, W. L., Kuo, Y. H., and Chang, C. I. (2013b). Norcucurbitane triterpenoids from the fruits of *Momordica charantia* var. *abbreviata*. *Nat Prod Commun*, 8(1), 79-81.
- Liao, Y. W., Chen, C. R., Kuo, Y. H., Hsu, J. L., Shih, W. L., Cheng, H. L., Huang, T. C., and Chang, C. I. (2012). Cucurbitane-type triterpenoids from the fruit pulp of *Momordica charantia*. *Nat Prod Commun*, 7(12), 1575-1578.
- Liaw, C. C., Huang, H. C., Hsiao, P. C., Zhang, L. J., Lin, Z. H., Hwang, S. Y., Hsu, F. L., and Kuo, Y. H. (2015). 5beta,19-epoxycucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* and their anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Planta Med*, 81(1), 62-70.
- Lin, K. W., Yang, S. C., and Lin, C. N. (2011). Antioxidant constituents from the stems and fruits of *Momordica charantia*. *Food chemistry*, 127(2), 609-614.
- Ma, L., Yu, A. H., Sun, L. L., Gao, W., Zhang, M. M., Su, Y. L., Liu, H., Ji, T. F., and Li, D. Z. (2014). Two new cucurbitane triterpenoids from the seeds of *Momordica charantia*. *J Asian Nat Prod Res*, 16(5), 476-482.
- Mohamad, K., Martin, M. T., Leroy, E., Tempête, C., Sévenet, T., Awang, K., and Païs, M. (1997). Argenteanones C-E and Argenteanols B-E, Cytotoxic Cycloartanes from *Aglaiia argentea*. *J Nat Prod*, 60(2), 81-85.
- Nagarani, G., Abirami, A., and Siddhuraju, P. (2014). Food prospects and nutraceutical attributes of *Momordica* species: A potential tropical bioresources – A review. *Food Science and Human Wellness*, 3(3), 117-126.
- Nakajima, Y., Satoh, Y., Katsumata, M., Tsujiyama, K., Ida, Y., and Shoji, J. (1994). Terpenoids of *Alisma orientale* rhizome and the crude drug *alismaticis rhizoma*. *Phytochemistry*, 36(1), 119-127.
- Nakamura, S., Murakami, T., Nakamura, J., Kobayashi, H., Matsuda, H., and Yoshikawa, M. (2006). Structures of new cucurbitane-type triterpenes and glycosides, karavilagenins and karavilosides, from the dried fruit of *Momordica charantia* L. in Sri Lanka. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 54(11), 1545-1550.
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, 79(3), 629-661.
- Nicolaou, K. C., Baran, P. S., Zhong, Y. L., Barluenga, S., Hunt, K. W., Kranich, R., and Vega, J. A. (2002). Iodine(V) reagents in organic synthesis. Part 3. New routes to heterocyclic compounds via o-iodoxybenzoic acid-mediated cyclizations: generality, scope, and mechanism. *J Am Chem Soc*, 124(10), 2233-2244.
- Palmeira, A., Sousa, E., Vasconcelos, M. H., and Pinto, M. M. (2012). Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem*, 19(13), 1946-2025.
- Pastan, I., Gottesman, M. M., Ueda, K., Lovelace, E., Rutherford, A. V., and Willingham, M. C. (1988). A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(12), 4486-4490.

- Pitchakarn, P., Ohnuma, S., Pintha, K., Pompimon, W., Ambudkar, S. V., and Limtrakul, P. (2012). Kuguacin J isolated from *Momordica charantia* leaves inhibits P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance. *J Nutr Biochem*, 23(1), 76-84.
- Ragasa, C. Y., and Lim, K. (2005). Sterols from *Cucurbita maxima*. *Philippine Journal of Science*, 134(2), 83.
- Ramalhete, C., Lopes, D., Molnar, J., Mulhovo, S., Rosario, V. E., and Ferreira, M. J. (2011a). Karavilagenin C derivatives as antimalarials. *Bioorg Med Chem*, 19(1), 330-338.
- Ramalhete, C., Lopes, D., Mulhovo, S., Molnar, J., Rosario, V. E., and Ferreira, M. J. (2010). New antimalarials with a triterpenic scaffold from *Momordica balsamina*. *Bioorg Med Chem*, 18(14), 5254-5260.
- Ramalhete, C., Mansoor, T. A., Mulhovo, S., Molnar, J., and Ferreira, M. J. (2009a). Cucurbitane-type triterpenoids from the African plant *Momordica balsamina*. *J Nat Prod*, 72(11), 2009-2013.
- Ramalhete, C., Molnar, J., Mulhovo, S., Rosario, V. E., and Ferreira, M. J. (2009b). New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 17(19), 6942-6951.
- Ramalhete, C., Mulhovo, S., Molnar, J., and Ferreira, M. U. (2016). Triterpenoids from *Momordica balsamina*: Reversal of ABCB1-mediated multidrug resistance. *Bioorg Med Chem*, 24(21), 5061-5067.
- Ramalhete, C., Spengler, G., Martins, A., Martins, M., Viveiros, M., Mulhovo, S., Ferreira, M.J., Amaral, L. (2011b). Inhibition of efflux pumps in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*. *Int J Antimicrob Agents*, 37(1), 70-74.
- Roberts, S. C. (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol*, 3(7), 387-395.
- Rocha, E. S. L. F., Ramalhete, C., Nogueira, K. L., Mulhovo, S., Ferreira, M. J., and Pohlit, A. M. (2015). In vivo evaluation of isolated triterpenes and semi-synthetic derivatives as antimalarial agents. *Eur J Med Chem*, 102, 398-402.
- Shah, S. S., Hussain, M. I., Aslam, M. K., and Rivera, G. (2014). Natural products; pharmacological importance of family Cucurbitaceae: a brief review. *Mini Rev Med Chem*, 14(8), 694-705.
- Shibuya, M., Adachi, S., and Ebizuka, Y. (2004). Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis. *Tetrahedron*, 60(33), 6995-7003.
- Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., and Remiao, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*, 149, 1-123.
- Singh, B., and Sharma, R. A. (2015). Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, 5(2), 129-151.
- Sucrow, W. (1966). Inhaltsstoffe von *Momordica charantia* L., II. Zwei neue Δ^7 -Sterine aus *Momordica charantia*. *Chemische Berichte*, 99(11), 3559-3567.
- Syed, S. B., and Coumar, M. S. (2016). P-Glycoprotein Mediated Multidrug Resistance Reversal by Phytochemicals: A Review of SAR & Future Perspective for Drug Design. *Curr Top Med Chem*, 16(22), 2484-2508.
- Thakur, G. S., Bag, M., Sanodiya, B. S., Bhadouriya, P., Debnath, M., Prasad, G. B., and Bisen, P. S. (2009). *Momordica balsamina*: a medicinal and nutraceutical plant for health care management. *Curr Pharm Biotechnol*, 10(7), 667-682.
- Thakur, G. S., Pandey, M., Sharma, R., Sanodiya, B. S., Prasad, G. B., and Bisen, P. S. (2011). Factors affecting in vitro propagation of *Momordica balsamina*: a medicinal and nutritional climber. *Physiol Mol Biol Plants*, 17(2), 193-197.

- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 148, 63-106.
- Thomas, H., and Coley, H. M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*, 10(2), 159-165.
- Tuan, N. Q., Lee, D. H., Oh, J., Kim, C. S., Heo, K. S., Myung, C. S., and Na, M. (2017). Inhibition of Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells by Cucurbitanes from *Momordica charantia*. 80(7), 2018-2025.
- Voigt, B., Coburger, C., Monár, J., and Hilgeroth, A. (2007). Structure–activity relationships of novel N-acyloxy-1,4-dihydropyridines as P-glycoprotein inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 15(15), 5110-5113.
- Wang, G., Tang, W., and Bidigare, R. R. (2005). Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. *Natural products* (pp. 197-227): Springer.
- Wang, S., Li, Z., Yang, G., Ho, C. T., and Li, S. (2017). *Momordica charantia*: a popular health-promoting vegetable with multifunctionality. *Food Funct*, 8(5), 1749-1762.
- Wang, X., Sun, W., Cao, J., Qu, H., Bi, X., and Zhao, Y. (2012). Structures of New Triterpenoids and Cytotoxicity Activities of the Isolated Major Compounds from the Fruit of *Momordica charantia* L. *J Agric Food Chem*, 60(15), 3927-3933.
- Wehner, T. C., and Maynard, D. N. (2001). *Cucurbitaceae (Vine Crops) eLS*: John Wiley and Sons, Ltd.
- World Health Organization (WHO). (2017). Cancer. Retrieved 28 Oct, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Xia, J. H., Zhang, S. D., Li, Y. L., Wu, L., Zhu, Z. J., Yang, X. W., Zeng, H. W., Li, H. L., Wang, N., Steinmetz, A., and Zhang, W. D. (2012). Sesquiterpenoids and triterpenoids from *Abies holophylla* and their bioactivities. *Phytochemistry*, 74, 178-184.
- Xu, R., Fazio, G. C., and Matsuda, S. P. (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65(3), 261-291.
- Yan, X. J., Gong, L. H., Zheng, F. Y., Cheng, K. J., Chen, Z. S., and Shi, Z. (2014). Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. *Drug Discovery Today*, 19(4), 482-488.
- Yu, J. S., Roh, H. S., Lee, S., Jung, K., Baek, K.-H., and Kim, K. H. (2017). Antiproliferative effect of *Momordica cochinchinensis* seeds on human lung cancer cells and isolation of the major constituents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(3), 329-333.
- Yuan, R., Hou, Y., Sun, W., Yu, J., Liu, X., Niu, Y., Lu, J. J., and Chen, X. (2017). Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. *Ann N Y Acad Sci*, 1401(1), 19-27.
- Yue, J. Y., Xu, J., Cao, J. Q., Zhang, X. S., and Zhao, Y. Q. (2017). Cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* L. and their inhibitory activity against alpha-glucosidase, alpha-amylase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). *Journal of Functional Foods*, 37, 624-631.
- Zhang, J., Huang, Y., Kikuchi, T., Tokuda, H., Suzuki, N., Inafuku, K., Miura, M., Motohashi, S., Suzuki, T., and Akihisa, T. (2012). Cucurbitane triterpenoids from the leaves of *Momordica charantia*, and their cancer chemopreventive effects and cytotoxicities. *Chem Biodivers*, 9(2), 428-440.
- Zhang, L. J., Liaw, C. C., Hsiao, P. C., Huang, H. C., Lin, M. J., Lin, Z. H., Hsu, F. L., and Kuo, Y. H. (2014a). Cucurbitane-type glycosides from the fruits of *Momordica charantia* and their hypoglycaemic and cytotoxic activities. *Journal of Functional Foods*, 6(Supplement C), 564-574.
- Zhang, Y. B., Liu, H., Zhu, C. Y., Zhang, M. X., Li, Y. L., Ling, B., and Wang, G. C. (2014b). Cucurbitane-type triterpenoids from the leaves of *Momordica charantia*. *J Asian Nat Prod Res*, 16(4), 358-363.

- Zhao, G. T., Liu, J. Q., Deng, Y. Y., Li, H. Z., Chen, J. C., Zhang, Z. R., Zhou, L., and Qiu, M. H. (2014). Cucurbitane-type triterpenoids from the stems and leaves of *Momordica charantia*. *Fitoterapia*, 95(Supplement C), 75-82.
- Zheng, X., Luo, X., Ye, G., Chen, Y., Ji, X., Wen, L., Xu, Y., Xu, H., Zhan, R., and Chen, W. (2015). Characterisation of two oxidosqualene cyclases responsible for triterpenoid biosynthesis in *Ilex asprella*. *Int J Mol Sci*, 16(2), 3564-3578.