

REGIANE LAURIANO BATISTA STRAPASSON

**ESTUDO QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DAS CASCAS DO TRONCO  
DE *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química, Área de Concentração: Química Orgânica, Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello

**CURITIBA**

**2010**

## **DEDICATÓRIA**

*A Deus e Nossa Senhora, pelo dom da  
vida e por me abençoarem com saúde,  
discernimento e perseverança;*

*Aos meus amados pais que, apesar de  
não terem estudo, ensinaram-me, com  
muita sabedoria os principais valores  
humanos: o amor e o respeito.  
Devo a vocês tudo que hoje sou!*

*Aos meus irmãos, Cristiane e Reinaldo,  
por todo apoio, incentivo e carinho.  
Obrigada por fazerem  
parte de minha vida!*

*Ao meu amado esposo, Leandro, pelo  
apoio incondicional, companheirismo,  
compreensão e respeito. Obrigada por me  
mostrar que a vida deve ser olhada de  
maneira mais simples.*

*Dedico a vocês, não só esta dissertação,  
mas também todo meu amor!*

*“Dê-me, Senhor, agudeza para entender,  
capacidade para reter, método e  
faculdade para aprender, sutileza para  
interpretar, graça e abundância para  
falar. Dê-me, Senhor, acerto ao começar,  
direção ao progredir e perfeição ao  
concluir.”*

*(São Tomás de Aquino)*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço imensamente a Deus que permitiu a realização deste trabalho, por sempre ter iluminado meu caminho e me dado forças para continuar e não desistir;*

*Agradeço a Nossa Senhora, minha mãezinha, que intercedeu por mim em todos os momentos e por ter me concedido tantas graças;*

*Aos meus pais, João e Raimunda, pelo exemplo de força e perseverança, pelo amor imensurável, incentivo e apoio durante esta caminhada;*

*Ao meu esposo Leandro pelo amor, carinho, compreensão e dedicação durante todos os momentos;*

*À minha irmã, Cristiane, pelo companheirismo durante os anos de graduação, na iniciação científica e por sempre estar ao meu lado durante toda minha vida, pelo carinho, pelas orações e por ouvir meus desabafos;*

*Ao meu irmão Reinaldo, que apesar da grande distância, durante quase toda a minha graduação e mestrado, sempre me apoiou, me deu força e rezou por mim;*

*Ao meu cunhado Maurício, por sempre me incentivar e me dar bons conselhos;*

*À professora Dra. Maria Éli da Alves Stefanello pela orientação, dedicação, paciência, confiança na condução deste trabalho e, sobretudo, por me proporcionar crescimento profissional;*

*Ao professor Dr. Armando Carlos Cervi, Departamento de Botânica - UFPR, pela coleta e identificação do material botânico;*

*Ao professor Dr. Andersson Barison, Departamento de Química - UFPR, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear;*

*Ao professor Dr. Marcos José Salvador, IB - UNICAMP, pela realização dos testes antimicrobianos;*

*Aos professores Dr. Aleksander Zamprônio e Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya e aos alunos René dos Reis Piornedo, Rita de Cássia Vilhena da Silva e Priscila de Souza, Departamento de Farmacologia - UFPR, pela realização dos testes de atividade antiinflamatória e vasorrelaxante;*

*Aos professores Dr. Francisco de Assis Marques e Dr. Claudiney Soares Cordeiro pela contribuição durante o exame de qualificação;*

*A todos os demais docentes do Departamento de Química que contribuíram para minha formação;*

*Aos colegas de laboratório, Maria Helena, Flávia, Luana, Carlos, Carolina e Nelissa, pela agradável convivência e auxílio;*

*Ao meu colega de graduação Gustavo Frensch que me ajudou nas medidas de rotação ótica;*

*Ao Marcelino, pela gentileza de sempre em todas as vezes que tive que recorrer à secretaria da pós-graduação;*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida;*

*Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ESPECTROS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....</b>	<b>xviii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 A família Asteraceae .....	3
1.2 O gênero <i>Gochnatia</i> .....	4
1.3 <i>Gochnatia polymorpha</i> .....	25
1.4 Lactonas sesquiterpênicas.....	28
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3 ESTUDO FITOQUÍMICO.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Materiais e Métodos.....</b>	<b>31</b>
3.1.1 Procedimentos gerais.....	31
3.1.2 Coleta e identificação do material botânico.....	32
3.1.3 Preparação dos extratos e frações do primeiro material.....	32
3.1.4 Preparação dos extratos e frações do segundo material.....	33
3.1.5 Isolamento dos metabólitos secundários.....	34
3.1.5.1 Fracionamento da fração <b>I (EP)</b> do primeiro material.....	34
3.1.5.2 Fracionamento da fração <b>II (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)</b> do primeiro material.....	35
3.1.5.3 Fracionamento da fração <b>II' (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)</b> do segundo material.....	36
<b>3.2 Dados físicos e espectrométricos das substâncias isoladas.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Identificação das substâncias <b>GPC1A</b> e <b>GPC1B</b> .....	42
3.3.2 Identificação das substâncias <b>GPC2A</b> e <b>GPC2B</b> .....	50

3.3.3 Identificação da substância <b>GPC3</b> .....	52
3.3.4 Identificação das substâncias <b>GPC4, GPC5, GPC6 e GPC7</b> .....	56
3.3.5 Identificação da substância <b>GPC8</b> .....	66
<b>4 REALIZAÇÃO DE ENSAIOS FARMACOLÓGICOS</b> .....	<b>70</b>
<b>4.1 Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>70</b>
4.1.1 Materiais e métodos.....	70
4.1.2 Resultados e discussão.....	70
<b>4.2 Atividade antiinflamatória</b> .....	<b>72</b>
4.2.1 Materiais e métodos.....	72
4.2.1.1 Animais.....	72
4.2.1.2 Edema e inflamação de pata induzidos pela carragenina.....	72
4.2.1.3 Medida da atividade da MPO no modelo de inflamação induzida pela carragenina.....	73
4.2.1.4 Pleurisia induzida pela carragenina.....	73
4.2.2 Resultados e discussão.....	74
4.2.2.1 Efeito sobre o edema induzido pela carragenina.....	74
4.2.2.2 Efeito sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela Cg.....	75
4.2.2.3 Efeito sobre a pleurisia induzida pela carragenina.....	77
<b>4.3 Atividade vasorrelaxante</b> .....	<b>79</b>
4.3.1 Materiais e métodos.....	79
4.3.2 Resultados e discussão.....	79
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>81</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>83</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>BuOH</b>	1-Butanol
<b>CC</b>	Cromatografia em coluna
<b>CCDC</b>	Cromatografia em camada delgada comparativa
<b>CCDP</b>	Cromatografia em camada delgada preparativa
<b>Cg</b>	Carragenina
<b>Dexa</b>	Dexametasona
<b><i>d</i></b>	Dupleto
<b><i>dd</i></b>	Duplo dupleto
<b><i>ddd</i></b>	Duplo duplo dupleto
<b><i>dt</i></b>	Duplo tripleto
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Éter etílico
<b>EP</b>	Éter de Petróleo
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FEN</b>	Fenilefrina
<b>GPC</b>	<i>Gochnatia polymorpha</i> cascas
<b>hex</b>	Hexano

<b>HI</b>	Halo de inibição
<b>HMBC</b>	Correlação heteronuclear em múltiplas ligações
<b>HSQC</b>	Correlação heteronuclear em única ligação
<b>Hz</b>	Hertz
<b>i.pl.</b>	intraplantar
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento
<b><i>m</i></b>	Multiplete
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfatos
<b>RM</b>	Relaxamento máximo
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C
<b><i>s</i></b>	Singleto
<b><i>s/</i></b>	Singleto largo
<b><i>t</i></b>	Triplete
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>V</b>	Veículo
<b>v.o.</b>	Via oral
<b>δ</b>	Deslocamento químico

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Relação de espécies de <i>Gochnatia</i> estudadas e metabólitos secundários encontrados.	5
<b>Tabela 2</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz), $^{13}\text{C}$ (50 MHz), HSQC e HMBC (400 MHz) em $\text{CDCl}_3$ para <b>GPC1A</b> .	44
<b>Tabela 3</b> – Dados de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para <b>GPC1B</b> .	45
<b>Tabela 4</b> – Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz), $^{13}\text{C}$ (50 MHz), HSQC e HMBC (400 MHz) em $\text{CDCl}_3$ para <b>GPC3</b> .	53
<b>Tabela 5</b> – Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para <b>GPC4</b> , <b>GPC5</b> , <b>GPC6</b> e <b>GPC7</b> .	58
<b>Tabela 6</b> – Dados de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para <b>GPC4</b> , <b>GPC5</b> , <b>GPC6</b> e <b>GPC7</b> .	59
<b>Tabela 7</b> – Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz), $^{13}\text{C}$ (50 MHz), HSQC e HMBC (400 MHz) em $\text{CDCl}_3$ para <b>GPC8</b> .	67
<b>Tabela 8</b> – Atividade antimicrobiana de extratos, frações e substâncias puras de <i>G. polymorpha</i> ssp. <i>floccosa</i> .	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Lactonas sesquiterpênicas (1-14) isoladas do gênero <i>Gochnatia</i> .	10
<b>Figura 2</b> – Lactonas sesquiterpênicas (15-29) isoladas do gênero <i>Gochnatia</i> .	11
<b>Figura 3</b> – Lactonas sesquiterpênicas (30-45) isoladas do gênero <i>Gochnatia</i> .	12
<b>Figura 4</b> – Lactonas sesquiterpênicas (46-53) isoladas do gênero <i>Gochnatia</i> .	13
<b>Figura 5</b> – Lactonas diméricas isoladas do gênero <i>Gochnatia</i> .	14
<b>Figura 6</b> – Sesquiterpenos isolados do gênero <i>Gochnatia</i> .	15
<b>Figura 7</b> – Diterpenos (77-86) isolados do gênero <i>Gochnatia</i> .	16
<b>Figura 8</b> – Diterpenos (87-89) isolados do gênero <i>Gochnatia</i> .	17
<b>Figura 9</b> – Triterpenos (90-98) isolados do gênero <i>Gochnatia</i> .	18
<b>Figura 10</b> – Triterpenos (99-104) isolados do gênero <i>Gochnatia</i> .	19
<b>Figura 11</b> – Triterpenos tetracíclicos e esteroides isolados do gênero <i>Gochnatia</i> .	20
<b>Figura 12</b> – Flavonóides (111-123) isolados do gênero <i>Gochnatia</i> .	21
<b>Figura 13</b> – Flavonóides (124-130) isolados do gênero <i>Gochnatia</i> .	22
<b>Figura 14</b> – Cumarinas isoladas do gênero <i>Gochnatia</i> .	23
<b>Figura 15</b> – Substâncias de outras classes isoladas do gênero <i>Gochnatia</i> .	24
<b>Figura 16</b> – Fotos de <i>G. polymorpha</i> (árvore, madeira bruta, madeira trabalhada, flores, capítulo floral e sementes).	26
<b>Figura 17</b> – Anel $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona.	28
<b>Figura 18</b> – Esqueletos básicos das lactonas sesquiterpênicas.	29
<b>Figura 19</b> – Rota biossintética dos principais grupos de lactonas sesquiterpênicas.	30
<b>Figura 20</b> – Principais correlações observadas nos espectros HMBC de <b>GPC1A</b> e <b>GPC1B</b> .	43
<b>Figura 21</b> – Principais correlações observadas no espectro HMBC de <b>GPC3</b> .	53

- Figura 22** – Principais correlações observadas nos espectros HMBC de **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**. 57
- Figura 23** – Principais correlações observadas no espectro HMBC de **GPC8**. 66
- Figura 24** – Efeito do tratamento com o extrato etanólico (EtOH) e com a fração butanólica (BuOH) de *G. polymorpha* ssp. *floccosa* sobre o edema induzido pela Cg. 74
- Figura 25** – Efeito do tratamento com a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e com os compostos **GPC1A** e **GPC3** de *G. polymorpha* ssp. *floccosa* sobre o edema induzido pela Cg. 75
- Figura 26** – Efeito do tratamento com o extrato etanólico (EtOH) e com a fração BuOH de *G. polymorpha* ssp. *floccosa* sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela Cg. 76
- Figura 27** - Efeito do tratamento com a substância **GPC3** sobre o aumento da atividade da mieloperoxidase induzido pela injeção intraplantar de Cg. 76
- Figura 28** – Efeito do tratamento com o extrato etanólico (EtOH) sobre o aumento dos leucócitos totais, neutrófilos, mononucleares e extravasamento protéico induzidos pela Cg na cavidade pleural de camundongos. 77
- Figura 29** – Efeito do tratamento com a fração BuOH sobre o aumento dos leucócitos totais, neutrófilos, mononucleares e extravasamento protéico induzidos pela Cg na cavidade pleural de camundongos. 78
- Figura 30** – Efeito vasorrelaxante do extrato etanólico (EtOH), fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (II) obtidas de *G. polymorpha* ssp. *floccosa* em anéis de aorta isolada de rato sem endotélio, pré contraídos com Fenilefrina (1 μM). 80

**LISTA DE ESQUEMAS**

- Esquema 1** – Extração, partição e fracionamento das cascas do tronco do primeiro material (março/2004) de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. 33
- Esquema 2** – Extração e fracionamento das cascas do tronco do segundo material (julho/2009) de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. 34
- Esquema 3** – Fracionamento da fração I (EP) das cascas do tronco do primeiro material de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*. 37
- Esquema 4** – Fracionamento da fração II (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) das cascas do tronco do primeiro material de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*. 38
- Esquema 5** – Fracionamento da fração II' (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) das cascas do tronco do segundo material de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*. 39

## LISTA DE ESPECTROS

<b>E1</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC1A</b> .	46
<b>E2</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC1A</b> .	46
<b>E3</b> – Espectro HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC1A</b> .	47
<b>E4</b> – Espectro HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC1A</b> .	47
<b>E5</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC1B</b> .	48
<b>E6</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC1B</b> .	48
<b>E7</b> – Espectro HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC1B</b> .	49
<b>E8</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC2A+GPC2B</b> .	51
<b>E9</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC2A+GPC2B</b> .	51
<b>E10</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC3</b> .	54
<b>E11</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC3</b> .	54
<b>E12</b> – Espectro HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC3</b> .	55
<b>E13</b> – Espectro HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC3</b> .	55
<b>E14</b> – Espectros de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC4</b> , <b>GPC5</b> , <b>GPC6</b> e <b>GPC7</b> .	60
<b>E15</b> – Ampliação da região olefínica dos espectros de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC4</b> , <b>GPC5</b> , <b>GPC6</b> e <b>GPC7</b> .	60
<b>E16</b> – Ampliação da região de hidrogênios carbinólicos dos espectros de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC4</b> , <b>GPC5</b> , <b>GPC6</b> e <b>GPC7</b> .	61
<b>E17</b> – Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC4</b> , <b>GPC5</b> , <b>GPC6</b> e <b>GPC7</b> .	61
<b>E18</b> – Ampliação da região olefínica dos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC4</b> , <b>GPC5</b> , <b>GPC6</b> e <b>GPC7</b> .	62
<b>E19</b> – Ampliação da região de carbonos oxigenados dos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC4</b> , <b>GPC5</b> , <b>GPC6</b> e <b>GPC7</b> .	62
<b>E20</b> – Espectro HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC4</b> .	63
<b>E21</b> – Espectro HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>GPC5</b> .	63

<b>E22</b> – Espectro HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>GPC6</b> .	64
<b>E23</b> – Espectro HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>GPC6</b> .	64
<b>E24</b> – Espectro HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>GPC7</b> .	65
<b>E25</b> – Espectro HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>GPC7</b> .	65
<b>E26</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>GPC8</b> .	68
<b>E27</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>GPC8</b> .	68
<b>E28</b> – Espectro HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>GPC8</b> .	69
<b>E29</b> – Espectro HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>GPC8</b> .	69

## RESUMO

*Gochnatia polymorpha* (Less) Cabr. (Asteraceae), conhecida como cambará, é uma espécie empregada na medicina popular contra doenças respiratórias. Lactonas sesquiterpênicas, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonóides, compostos fenólicos e cumarinas foram previamente isolados desta espécie. O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico biomonitorado, através de ensaios de atividade antimicrobiana, antiinflamatória e vasorrelaxante, das cascas do tronco de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*.

O material botânico foi coletado em Curitiba, PR (março/2004 e julho/2009). Após secagem e moagem, o material de cada coleta foi extraído com hexano e etanol, sucessivamente. O extrato etanólico foi submetido à partição com solventes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, BuOH) e os constituintes da fração solúvel em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram isolados e purificados através de técnicas cromatográficas, usando-se sílica gel como fase estacionária. Os compostos puros foram identificados através de análise dos seus espectros de RMN e comparação com dados da literatura. Deste modo foram obtidos os triterpenos acetato de bauerenila (**GPC1A**) e bauerenona (**GPC1B**); os esteróides sitosterol (**GPC2A**) e estigmasterol (**GPC2B**); a lactona sesquiterpênica 11 $\alpha$ H,13-diidrozaluzanin C (**GPC3**); as lactonas diméricas gochnatiolido A (**GPC4**), 8- $\beta$ -hidroxi-10-desoxigochnatiolido A (**GPC5**), 8- $\beta$ -hidroxigochnatiolido A (**GPC6**) e 10-desoxigochnatiolido A (**GPC7**) e ferulato de *n*-alquila (**GPC8**). Todos os compostos são conhecidos e, com exceção do **GPC1B**, **GPC3** e **GPC8**, já haviam sido relatados em *Gochnatia polymorpha*.

O extrato etanólico, as frações deste extrato obtidas por partição com solventes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e BuOH) e as substâncias **GPC1A** e **GPC3** foram avaliadas para atividade antimicrobiana, antiinflamatória e vasorrelaxante. A atividade antimicrobiana foi avaliada contra várias bactérias e fungos pelo método de difusão em ágar. A maior atividade foi observada na fração em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, que apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. As substâncias puras foram inativas. A atividade antiinflamatória foi avaliada em modelos de inflamação em camundongos. O tratamento por via oral com o extrato etanólico, as frações em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e BuOH, e **GPC3** reduziu de maneira significativa o edema, a migração leucocitária e também a inflamação pleural causada pela carragenina. A fração em AcOEt e **GPC1A** foram inativas. A atividade vasorrelaxante foi avaliada em anéis de aorta isolada de ratos. O extrato etanólico e as frações apresentaram atividade, sendo que a fração em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi a mais ativa. Os compostos puros foram inativos.

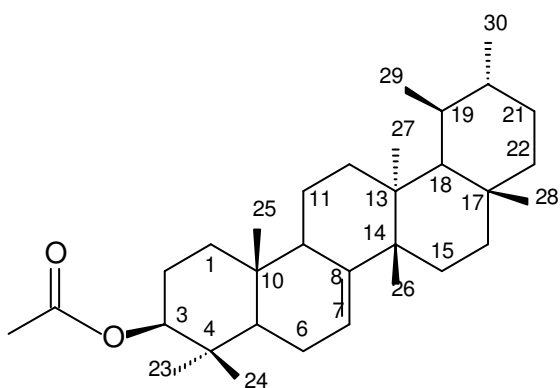
## ABSTRACT

*Gochnatia polymorpha* (Less) Cabr. (Asteraceae), known as “cambará”, have been used to treat respiratory diseases. Sesquiterpene lactones, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, flavonoids, phenolic compounds, and coumarins were previously reported in this specie. The present work describes the phytochemical study, bioassay-guided by antimicrobial, anti-inflammatory and vasorelaxant activities, of trunk bark of *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*.

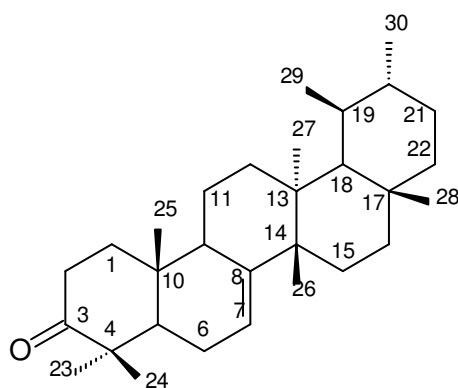
Plant material was collected in Curitiba, Paraná State, Brazil (March/2004 and July/2009). Each collection, dried and powdered, was extracted with hexane and EtOH. The EtOH extract was partitioned with solvents (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and 1-butanol) and the constituents from fraction CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, were isolated and purified by chromatographic methods, using silica gel as adsorbent. The pure compounds were identified by analysis of NMR spectra and comparison with literature data. This procedure yielded the triterpenes bauerenyl acetate (**GPC1A**) and bauerenone (**GPC1B**), the common mixture of sitosterol (**GPC2A**) and stigmasterol (**GPC2B**), the sesquiterpene lactone 11 $\alpha$ H,13-dihydrozaluzanin C (**GPC3**), the dimeric lactones gochnatiolide A (**GPC4**), 8- $\beta$ -hydroxy-10-desoxygochnatiolide A (**GPC5**), 8- $\beta$ -hydroxygochnatiolide A (**GPC6**) and 10-desoxygochnatiolide A (**GPC7**) and *n*-alkyl ferulate (**GPC8**). All compounds are known and, with exception of **GPC1B**, **GPC3** and **GPC8** had been previously reported in *Gochnatia polymorpha*.

The ethanol extract, their fractions obtained by partition with solvents (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and BuOH), and the compounds **GPC1A** and **GPC3** were assayed for antimicrobial, antiinflammatory and vasorelaxant activities. The antimicrobial activity was evaluated against several strains of bacteria and fungi, by the well-diffusion agar method. The highest activity was observed in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction, which showed antibacterial activity, mainly against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. The pure compounds were inactive. The antiinflammatory activity was evaluated in inflammation models in mice. The results demonstrated that oral treatment with the EtOH extract, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and BuOH fractions, and **GPC3** significantly reduced edema, leukocyte migration and also pleural inflammation caused by carragenine. The fraction in EtOAc and **GPC1A** did not exhibit activity. The vasorelaxant activity was evaluated in isolated aorta rings of rats. The ethanol extract and the fractions showed activity. The highest activity was observed in the fraction in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The compounds **GPC1A** and **GPC3** were inactive.

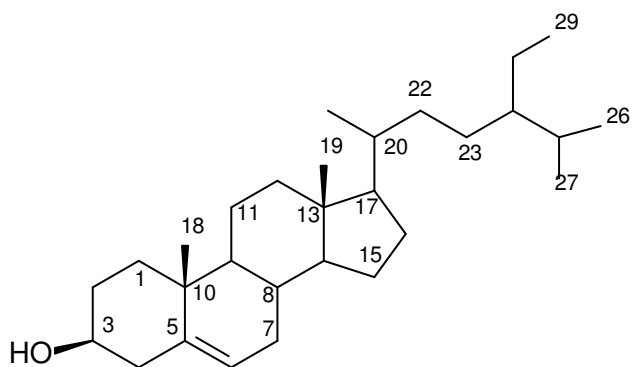
## ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



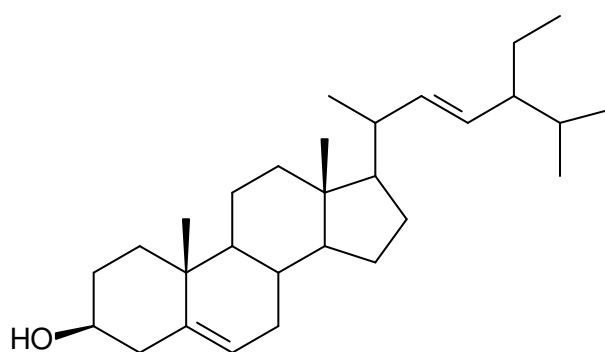
GPC1A



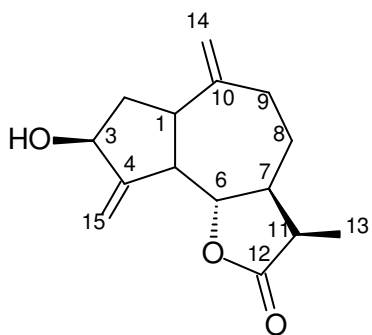
GPC1B



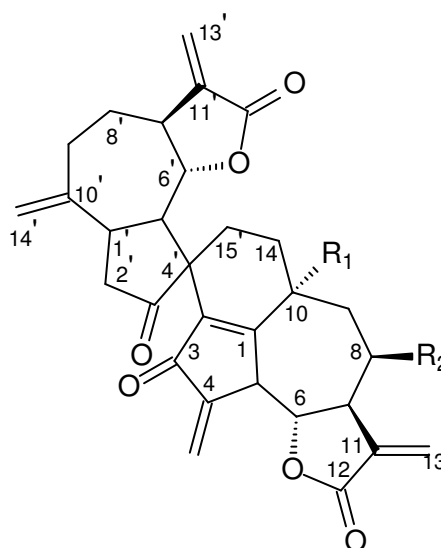
GPC2A



GPC2B



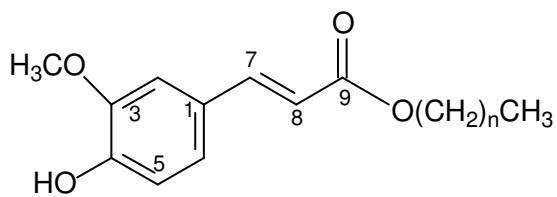
GPC3



GPC4 GPC5 GPC6 GPC7

R <sub>1</sub>	OH	H	OH	H
----------------	----	---	----	---

R <sub>2</sub>	H	OH	OH	H
----------------	---	----	----	---



GPC8

## 1. INTRODUÇÃO

O reino vegetal é uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas, os metabólitos secundários, os quais possuem em sua maioria, grande valor agregado em virtude das diversas possibilidades de aplicação industrial, como alvos terapêuticos (fitoterápicos), além de cosméticos, perfumes, pigmentos, alimentos, resinas, agroquímicos etc. Entretanto, esses metabólitos são, quase sempre, produzidos em quantidades insuficientes para qualquer utilidade econômica (PINTO *et al.*, 2002).

As plantas têm sido utilizadas pela humanidade como medicamentos desde os primórdios. É importante ressaltar que, embora várias plantas sejam utilizadas com fins terapêuticos, a maioria não apresenta informações científicas que comprovem a sua eficácia ou a sua toxicidade nos seres humanos. Falta ainda, metodologia para o controle da qualidade dos fitoterápicos (RATES, 2001). Portanto, pesquisas na área de produtos naturais são de extrema importância para o fornecimento de substâncias úteis e para o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes no tratamento de doenças humanas. O valor dos produtos naturais das plantas medicinais para a sociedade e para a economia de um país é inestimável (GARCIA, 1995).

As florestas tropicais constituem um enorme reservatório de constituintes químicos que podem ser explorados do ponto de vista econômico. Além disso, existe um grande número de substâncias orgânicas naturais, já isoladas e identificadas a partir de plantas da flora brasileira, que ainda não foram estudadas quanto às suas atividades biológicas.

Assim, o isolamento e a determinação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário de plantas desempenham um papel fundamental para o desenvolvimento científico, especialmente da química de produtos naturais (FILHO, 2010).

Os constituintes químicos dos vegetais são sintetizados e degradados através de uma série de reações químicas que ocorrem no interior das células e constituem o metabolismo das plantas. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário.

O metabolismo primário possui uma distribuição ampla no reino vegetal e origina as substâncias que desempenham uma função essencial para a sobrevivência das espécies vegetais, como os aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e clorofila. São compostos que estão envolvidos em processos fundamentais tais como a fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos que possuem uma distribuição restrita, sem uma função aparente, pois não são necessários para todas as plantas. No entanto, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, pois atuam em mecanismos de defesa e reprodução do vegetal (FILHO, 2010).

As substâncias fornecidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos são o objeto de estudo da química de produtos naturais. Os principais objetivos desta área são o isolamento e a caracterização estrutural, e a investigação das rotas biossintéticas das substâncias naturais. Isto envolve a participação efetiva de profissionais de outras áreas além da química, dentre as quais a farmacologia e a botânica (FILHO & YUNES, 1998).

A diversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais é imensa, o que torna complexo o estudo fitoquímico. Além disso, deve-se considerar que, geralmente, os compostos presentes em menor concentração nos vegetais são os que apresentam melhores resultados de atividades biológicas. Neste contexto, torna-se indispensável uma análise do potencial farmacológico de extratos brutos, frações e substâncias puras (FILHO & YUNES, 1998). Sob este aspecto, podemos destacar a importância de estudos fitoquímicos guiados por testes farmacológicos, ou seja, os extratos e as frações ativos é que são estudados quimicamente.

Outro fator importante é considerar os usos na medicina popular. Diversas plantas são utilizadas diretamente como agentes medicinais e encontram-se documentadas por dados etnobotânicos. Estima-se que, aproximadamente, 74 % dos fitoterápicos utilizados atualmente tiveram origem nas pesquisas realizadas com plantas usadas na cultura popular (FILHO, 2010).

## 1.1. A família Asteraceae

A família Asteraceae (nome antigo: Compositae) é o grupo sistemático mais numeroso dentro das angiospermas, compreendendo aproximadamente 1100 gêneros e cerca de 25.000 espécies, de distribuição cosmopolita, mas melhor representada nas regiões temperadas ou subtropicais (CRONQUIST, 1981; VERDI *et al.*, 2005). No Brasil, a família está representada por cerca de 190 gêneros e 1900 espécies.

As plantas da família Asteraceae são, em sua maioria, espécies herbáceas, subarborescentes ou arbustivas e raramente arbóreas.

Dependendo do sistema de classificação dos diferentes autores, o número de tribos, bem como o número de espécies, pode variar. De acordo com BREMER (1994 apud CANCELLI *et al.*, 2007) a família Asteraceae está dividida em 17 tribos: Barnadesieae Bremer & Jansen, Mutisieae Cass., Cardueae Cass., Lactuceae Cass., Vernonieae Cass., Liabeae (Cass.) Rybd., Arctoteae Cass., Inuleae Cass., Plucheeae Andreb., Gnaphaliinae Benth., Calenduleae Cass., Asteraeae Cass., Anthemideae Cass., Senecioneae Cass., Helenieae Benth, Heliantheae Cass. e Eupatorieae Cass.

A diversidade e a complexidade dos constituintes químicos nas plantas pertencentes à família Asteraceae são enormes. Diversas classes de compostos já foram encontradas como sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonóides, cumarinas, alcalóides e compostos acetilênicos (LIN *et al.*, 2008). Entretanto, a característica mais marcante é a produção de lactonas sesquiterpênicas, que são encontradas em todas as tribos.

São plantas muito estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos produtos, principalmente fármacos (VERDI *et al.*, 2005). Inúmeras espécies de Asteraceae têm sido utilizadas na medicina popular, apresentando uma ampla quantidade de metabólitos secundários com atividades biológicas comprovadas, tais como *Calendula officinalis* (calêndula), *Mikania glomerata* (guaco), *Arnica montana* (arnica), *Artemisia absinthium* (losna), entre outras. Em um estudo estatístico sobre plantas medicinais, Asteraceae destacou-se como a família mais usada na medicina popular, tendo sido catalogadas mais de 800 espécies com algum tipo de uso medicinal. Esse sucesso foi correlacionado com a sua diversidade química, aliada à ampla distribuição geográfica e à facilidade de cultivo (STEFANELLO, 1993).

## 1.2. O gênero *Gochnatia*

O gênero *Gochnatia* (tribo Mutisieae, subtribo Gochnatiinae) possui 70 espécies, sendo que a maioria é encontrada do México à Argentina e apenas 2 ocorrem na Ásia (China, Índia, Nepal, Paquistão e sudeste da Ásia) (KATINAS *et al.*, 2008). É um gênero formado por árvores ou arbustos, com importantes centros de dispersão no sudeste do Brasil e nas Antilhas (CABRERA & KLEIN, 1973).

No Brasil são encontradas 22 espécies distribuídas nos estados de Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Bahia e Ceará (KATINAS *et al.*, 2008).

Na região sul (PR e RS), ocorrem 6 espécies: *Gochnatia argyrea* (Dusén ex Malme) Cabr.; *Gochnatia ramboi* Cabr.; *Gochnatia orbiculata* (Malme) Cabr.; *Gochnatia sordida* (Less) Cabr.; *Gochnatia polymorpha* (Less) Cabr. e *Gochnatia velutina* (Bong.) Cabr. (KATINAS *et al.*, 2008).

Embora a química do gênero não seja muito conhecida, pois apenas 14 espécies foram estudadas (**Tabela 1**), mostra-se coerente com a família. Foram isoladas 144 substâncias de diversas classes de compostos: 53 lactonas sesquiterpênicas (**Figuras 1-4**), 10 lactonas diméricas (**Figura 5**), 13 sesquiterpenos (**Figura 6**), 13 diterpenos (**Figuras 7-8**), 21 triterpenos (**Figuras 9-11**), 20 flavonóides (**Figuras 12-13**), 7 cumarinas (**Figura 14**) e 7 substâncias de outras classes (**Figura 15**), dentre as quais, 3 compostos fenólicos, 1 composto acetilênico, 1 terpenóide, 1 lignana e 1 aminoácido.

É importante ressaltar que diversos trabalhos científicos realizados com espécies do gênero *Gochnatia* apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque para as lactonas sesquiterpênicas, consideradas como importantes marcadores quimiotaxonômicos do gênero (CATALAN *et al.*, 1996).

**Tabela 1** - Relação de espécies de *Gochnatia* estudadas e metabólitos secundários encontrados.

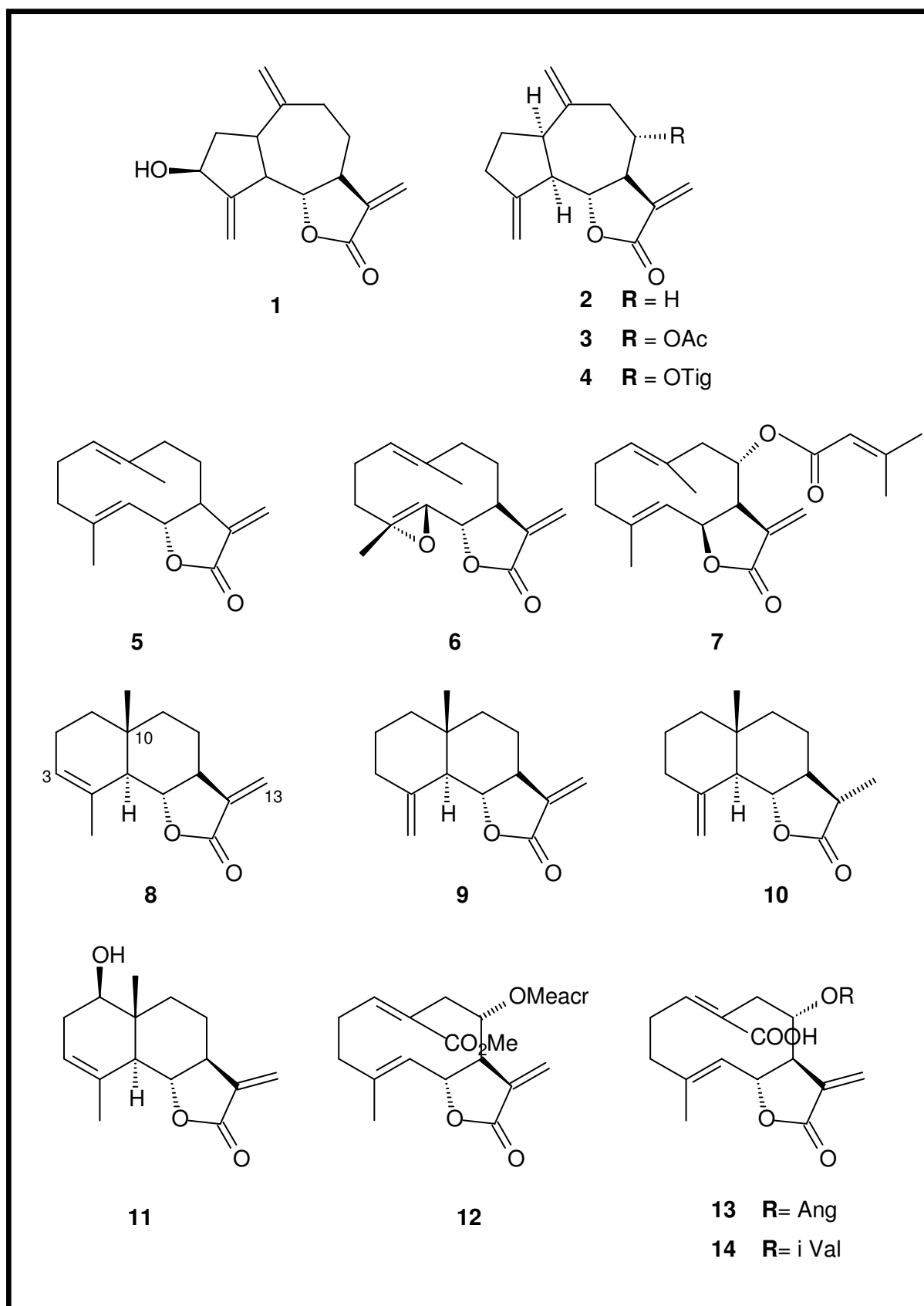
<b>Espécie</b>	<b>Metabólitos secundários</b>	<b>Referência</b>
<i>G. argentina</i> (Cabr.) Cabr.	FLAVONOIDES: 7- <i>O</i> -metilluteolina ( <b>112</b> ); hispidulina ( <b>113</b> ). CUMARINAS: capensina ( <b>131</b> ); fraxidina ( <b>132</b> ); fraxetina ( <b>133</b> ).	GARCIA & GUERREIRO, 1988
<i>G. blanchetiana</i> (DC.) Cabr.	TRITERPENOS: lupeol ( <b>99</b> ); acetato de lupeíla ( <b>100</b> ); ácido betulínico ( <b>101</b> ); dammareno diol ( <b>105</b> ); 3- $\beta$ - <i>O</i> - $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol ( <b>108</b> ). FLAVONÓIDES: 3- $\beta$ - <i>O</i> - $\beta$ -D-glicosil-canferol ( <b>125</b> ); tilirosídeo ( <b>126</b> ). AMINOÁCIDO: 4-hidroxi- <i>N</i> -metilprolina ( <b>142</b> ).	BOHLMANN <i>et al.</i> , 1981; LIMA <i>et al.</i> , 2003
<i>G. discoidea</i> (Less) Cabr.	TRITERPENOS: lupeol ( <b>99</b> ); acetato de lupeíla ( <b>100</b> ); 3 $\beta$ -acetoxi-lup-12-eno ( <b>102</b> ); 3 $\beta$ -acetoxi-lup-9-eno ( <b>104</b> ); acetato de dammadienila ( <b>106</b> ); acetato de eufoíla ( <b>109</b> ). LACTONAS: 14-hidroxi- <i>cis</i> , <i>cis</i> -artemisiifolin-6- <i>O</i> -[4- hidroxitiglato] ( <b>29</b> ); artemisiifolina ( <b>30</b> ); acetato de artemisiifolina ( <b>31</b> ); Artemisiifolin-15- <i>O</i> -acetil-sarracinato ( <b>32</b> ); Artemisiifolin-15- <i>O</i> -sarracinato ( <b>33</b> ); Artemisiifolin-15- <i>O</i> -[4-hidroxitiglato] ( <b>34</b> ); Artemisiifolin-15- <i>O</i> -[4-hidroxitiglato] ( <b>35</b> ).	BOHLMANN <i>et al.</i> , 1981
<i>G. foliolosa</i> var. <i>fascicularis</i> (Don) Cabr.	LACTONA: costunolido ( <b>5</b> ). FLAVONÓIDES: 3,7- <i>O</i> -dimetilcanferol ( <b>114</b> ); 3'- <i>O</i> -metilquercetina ( <b>115</b> ); 3,3'- <i>O</i> -dimetilquercetina ( <b>116</b> ); 3,7- <i>O</i> -dimetilquercetina ( <b>117</b> ).	FAINI <i>et al.</i> , 1983
<i>G. foliolosa</i> var. <i>foliolosa</i>	LACTONA: <i>trans-trans</i> germacra-1(10),4-dien- <i>cis</i> -6,12-olido ( <b>7</b> ).	HOENEISEN & BECKER, 1986

<p><i>G. glutinosa</i> Don</p>	<p>DITERPENOS: Ent-8(14),15-pimaradieno-3<math>\beta</math>,19-diol (<b>77</b>); Ent-8(14),15-pimaradieno-3<math>\beta</math>,18-diol (<b>78</b>).</p> <p>LACTONAS: 8-hidroxi-3,7,11-trimetil-2Z,6E,10-dodecatrien-13,1-olide (<b>51</b>); 8-hidroxi-3,7-dimetil-10-isopropil-2Z,6E,10-undecatrien-12,1-olide (<b>52</b>); 8-hidroxi-3,7,10,11-tetrametil-2Z,6E,11-dodecatrien-13,1-olide (<b>53</b>).</p> <p>FLAVONÓIDES: 3,3'-O-dimetilquercetina (<b>116</b>); 3,7-O-dimetilquercetina (<b>117</b>); 3,4'-O-dimetilquercetina (<b>118</b>); genkwanina (<b>119</b>); acacetina (<b>121</b>); sakuranetina (<b>127</b>); eriodictiol (<b>128</b>); 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-flavanona (<b>129</b>).</p> <p>CUMARINA: scopoletina (<b>134</b>).</p> <p>LIGNANA: pinorresinol (<b>144</b>).</p>	<p>GARCIA <i>et al.</i>, 1985; YBARRA <i>et al.</i>, 1994</p>
<p><i>G. haumaniana</i> Cabr.</p>	<p>TRITERPENOS: ácido oleanólico (<b>91</b>); ácido ursólico (<b>93</b>); <math>\alpha</math>-amirina (<b>94</b>).</p>	<p>CATALAN <i>et al.</i>, 2003</p>
<p><i>G. hypoleuca</i> Gray</p>	<p>TRITERPENOS: <math>\beta</math>-amirina (<b>92</b>); acetato de taraxeíla (<b>96</b>); taraxasterol (<b>97</b>); lupeol (<b>99</b>); acetato de lupeíla (<b>100</b>); sitosterol (<b>107</b>).</p> <p>LACTONAS: deidrocostuslactona (<b>2</b>); 14-metilcarboxilato-8<math>\alpha</math>-metacriloxi-germacra-1(10)<i>E</i>,4<i>E</i>,11-trien-6<math>\alpha</math>,12-olide (<b>12</b>); 14-metacriloxi-6<math>\alpha</math>-hidroxi-4<math>\beta</math>,5<math>\alpha</math>-epoxi-germacra-1(10)<i>E</i>,11-dien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>37</b>); 14-tigloiloxi-6<math>\alpha</math>-hidroxi-4<math>\beta</math>,5<math>\alpha</math>-epoxi-germacra-1(10)<i>E</i>,11-dien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>38</b>); 14-isobutiriloxi-6<math>\alpha</math>-hidroxi-4<math>\beta</math>,5<math>\alpha</math>-epoxi-germacra-1(10)<i>E</i>,11-dien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>39</b>);</p> <p>LACTONAS DIMÉRICAS: 10<math>\beta</math>-desoxigochnatiolido A (<b>60</b>); 8<math>\beta</math>-hidroxi-10<math>\beta</math>-desoxigochnatiolido A (<b>61</b>); 8<math>\beta</math>-hidroxi-10<math>\beta</math>-desoxigochnatiolido A (<b>62</b>); 8,8'<math>\beta</math>-dihidroxi-10<math>\beta</math>-desoxigochnatiolido A (<b>63</b>).</p>	<p>BOHLMANN <i>et al.</i>, 1986 CATALAN <i>et al.</i>, 1996</p>
<p><i>G. hypoleuca</i> ssp. <i>obtusata</i></p>	<p>TRITERPENOS: eritrodíol (<b>90</b>); ácido oleanólico (<b>91</b>); <math>\beta</math>-amirina (<b>92</b>).</p> <p>LACTONAS: Gochnatiolido (<b>36</b>).</p> <p>FLAVONÓIDES: luteolina (<b>111</b>).</p>	<p>MALDONADO <i>et al.</i>, 1988</p>

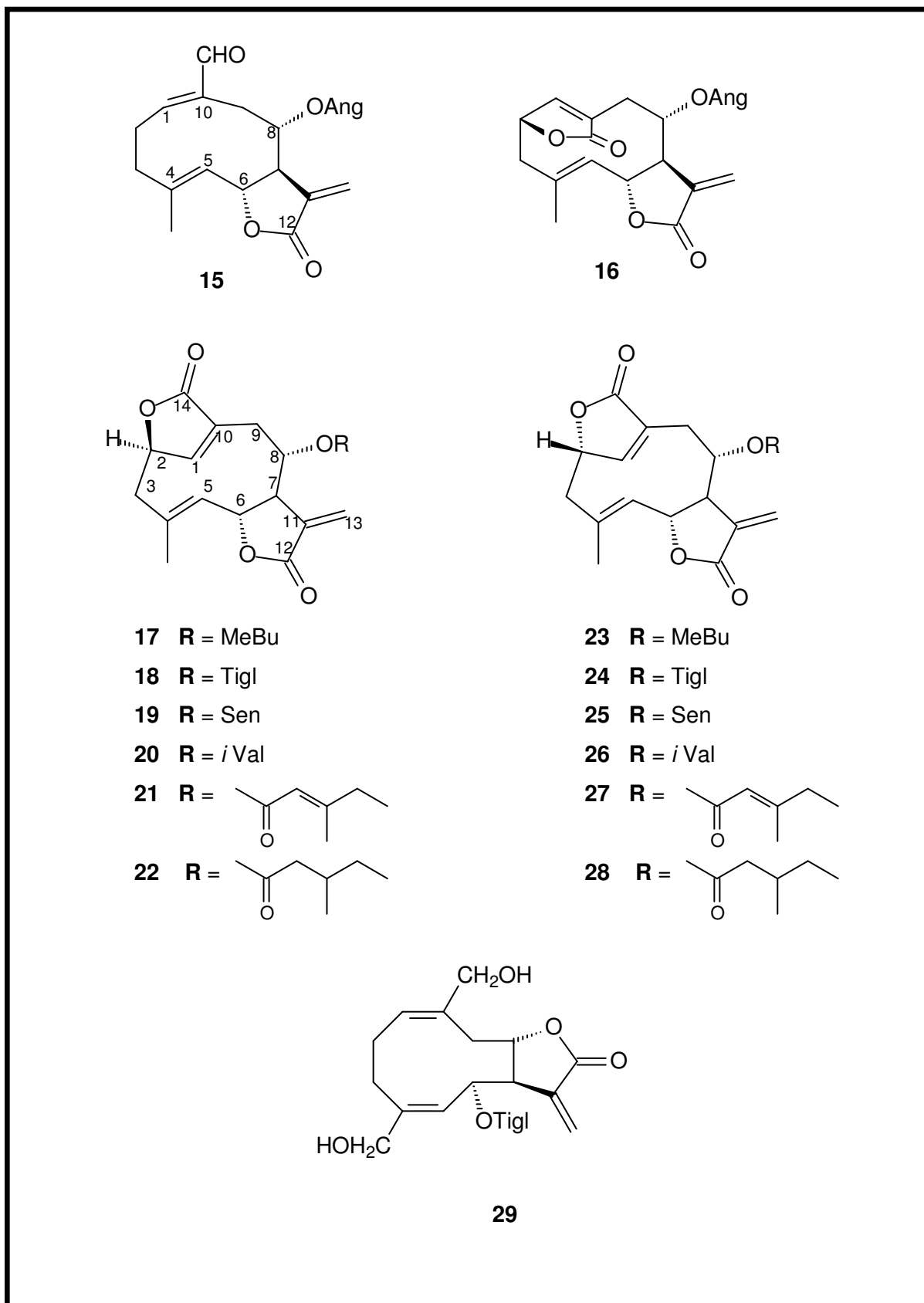
<p><i>G. palosanto</i></p>	<p>LACTONAS: (2R,6R,7R,8S)-8-(2-metilbutanoiloxi)-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>17</b>);  (2R,6R,7R,8S)-8-tigililoxi-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>18</b>);  (2R,6R,7R,8S)-8-senecioiloxi-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>19</b>); (2R,6R,7R,8S)-8-(3-metilbutanoiloxi)-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>20</b>);  (2R,6R,7R,8S)-8-(3-metil-2-pentenoiloxi)-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>21</b>);  (2R,6R,7R,8S)-8-(3-metilpentanoiloxi)-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>22</b>);  (2S,6R,7R,8S)-8-(2-metilbutanoiloxi)-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>23</b>);  (2S,6R,7R,8S)-8-tigililoxi-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>24</b>);  (2R,6R,7R,8S)-8-senecioiloxi-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>25</b>);  (2S,6R,7R,8S)-8-(3-metilbutanoiloxi)-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>26</b>);  (2S,6R,7R,8S)-8-(3-metil-2-pentenoiloxi)-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>27</b>);  (2S,6R,7R,8S)-8-(3-metilpentanoiloxi)-1(10),4,11,(13)-germacatrien-2,14,6,12-diolido (<b>28</b>).</p>	<p>GARCIA &amp; GUERREIRO, 1988;  YBARRA <i>et al.</i>, 1990</p>
<p><i>G. paniculata</i>  (Less.)  Cabr.</p>	<p>SESQUITERPENOS: 10,11-epoxi-9<math>\alpha</math>-angeloiloxi-3,7,11-trimetil-1,4,6-dodecatrien-3-ol (<b>64</b>);  <math>\alpha</math>-curcumen-12,15-dial (<b>72</b>);  12-hidroxi-<math>\alpha</math>-curcumen-15-al (<b>73</b>).</p> <p>DITERPENOS:</p> <p>6<math>\alpha</math>-hidroxi-17-fenilacetoxi-18-oxo-kolav-3-en-15-ol (<b>79</b>);  6<math>\alpha</math>-hidroxi-17-acetoxi-18-oxo-kolav-3-en-15-ol (<b>80</b>);  6<math>\alpha</math>-18-diidroxi-17-acetoxi-18-oxo-kolav-3-en-15-ol (<b>81</b>);  6<math>\alpha</math>-18-diidroxi-17-fenilacetoxi-18-oxo-kolav-3-en-15-ol (<b>82</b>);  6<math>\alpha</math>-18-diidroxi-17-acetoxi-kolavenoato (<b>83</b>);  6<math>\alpha</math>-18-diidroxi-17-fenilacetoxi-kolavenoato (<b>84</b>);  gochnatol-17-<i>O</i>-acetato (<b>85</b>);  gochnat-15-óico-17-<i>O</i>-fenilacetato (<b>86</b>).</p>	<p>BOHLMANN <i>et al.</i>, 1983</p>

	<p>LACTONAS: deidrocostuslactona (<b>2</b>); Costunolido (<b>5</b>);  <math>\beta</math>-ciclocostunolido (<b>9</b>); gochnatiolido A (<b>56</b>);  gochnatiolido B (<b>58</b>).</p> <p>FLAVONÓIDE:  7[(3-metil-2-buten-1-il)oxi]-3<math>\beta</math>,4',5-triidroxi-flavanona (<b>130</b>).</p>	
<b>G. polymorpha</b>	<p>SESQUITERPENOS: nuciferal (<b>65</b>); 15-oxo-nuciferal (<b>66</b>);  13-oxo-bisabol-1-ona (<b>69</b>); <math>\gamma</math>-curcumen-15-al (<b>70</b>);  <math>\gamma</math>-curcumen-12,15-dial (<b>71</b>).</p> <p>DITERPENOS:  ent-3<math>\alpha</math>,19-diacetoxi-12<math>\alpha</math>,15<math>\beta</math>-diidroxicaur-16-eno (<b>87</b>);  ent-17,19-diacetoxi-3<math>\alpha</math>,16<math>\alpha</math>-diidroxicaurano (<b>88</b>);  3<math>\alpha</math>,19<math>\alpha</math>-diidroxicaur-16-eno (<b>89</b>).</p> <p>TRITERPENOS: Ácido oleanólico (<b>91</b>); taraxerol (<b>95</b>);  acetato de bauerenila (<b>98</b>); cicloart-25-ene-3<math>\beta</math>-22<math>\alpha</math>-diol (<b>110</b>)</p> <p>LACTONAS: Deidrocostuslactona (<b>2</b>); costunolido (<b>5</b>);  santamarina (<b>11</b>)</p> <p>LACTONAS DIMÉRICAS: 10<math>\alpha</math>-desoxi-gochnatiolido A (<b>54</b>);  8<math>\beta</math>-hidroxi-10<math>\alpha</math>-desoxi-gochnatiolido A (<b>55</b>); gochnatiolido A  (<b>56</b>); 8<math>\beta</math>-hidroxi-gochnatiolido A (<b>57</b>); gochnatiolido B (<b>58</b>);  bis-11<math>\alpha</math>,13-diidro-gochnatiolido A (<b>59</b>).</p> <p>FLAVONOIDES: genkwanina (<b>119</b>); 3-O-metilquercetina  (<b>120</b>); rutina (<b>122</b>); hiperosídeo (<b>123</b>);  desmetoxicentaureidina (<b>124</b>).</p> <p>CUMARINAS: purpurasolol (<b>136</b>); purpurasol (<b>137</b>);  6,7-dimetoxi-8-(2,3-diidroxi-3-metilbutanoxi)-cumarina (<b>135</b>).</p> <p>SUBSTÂNCIAS DE OUTRAS CLASSES:  4-hidroxi-N-metil-prolina (<b>142</b>);  ácido cafeico (<b>138</b>); ácido clorogênico (<b>140</b>); lolilido (<b>141</b>).</p>	<p>FARIAS <i>et al.</i>,  1984;  BOHLMANN  <i>et al.</i>, 1986;  SACILOTO <i>et al.</i>, 1997;  MOREIRA <i>et al.</i>, 2000;  CATALAN <i>et al.</i>, 2003.</p>
<i>G. rusbyana</i> Cabrer.	<p>TRITERPENOS: 3<math>\beta</math>-hidroxi-lup-12-eno (<b>103</b>).</p> <p>LACTONAS: zaluzanin C (<b>1</b>).</p> <p>SUBSTÂNCIAS DE OUTRAS CLASSES:  cafeato de metila (<b>139</b>);  Tridec-1-eno-3,5,7,9,11-pentaino (<b>143</b>);</p>	<p>BOHLMANN &amp;  ZDERO, 1979</p>
<i>G. smithii</i> Robins & Greem	<p>LACTONAS: 8<math>\alpha</math>-acetoxi-deidrocostuslactona (<b>3</b>);  8<math>\alpha</math>-tigloiloxi-deidrocostuslactona (<b>4</b>)</p>	<p>ORTEGA &amp;  MALDONADO,  1984</p>

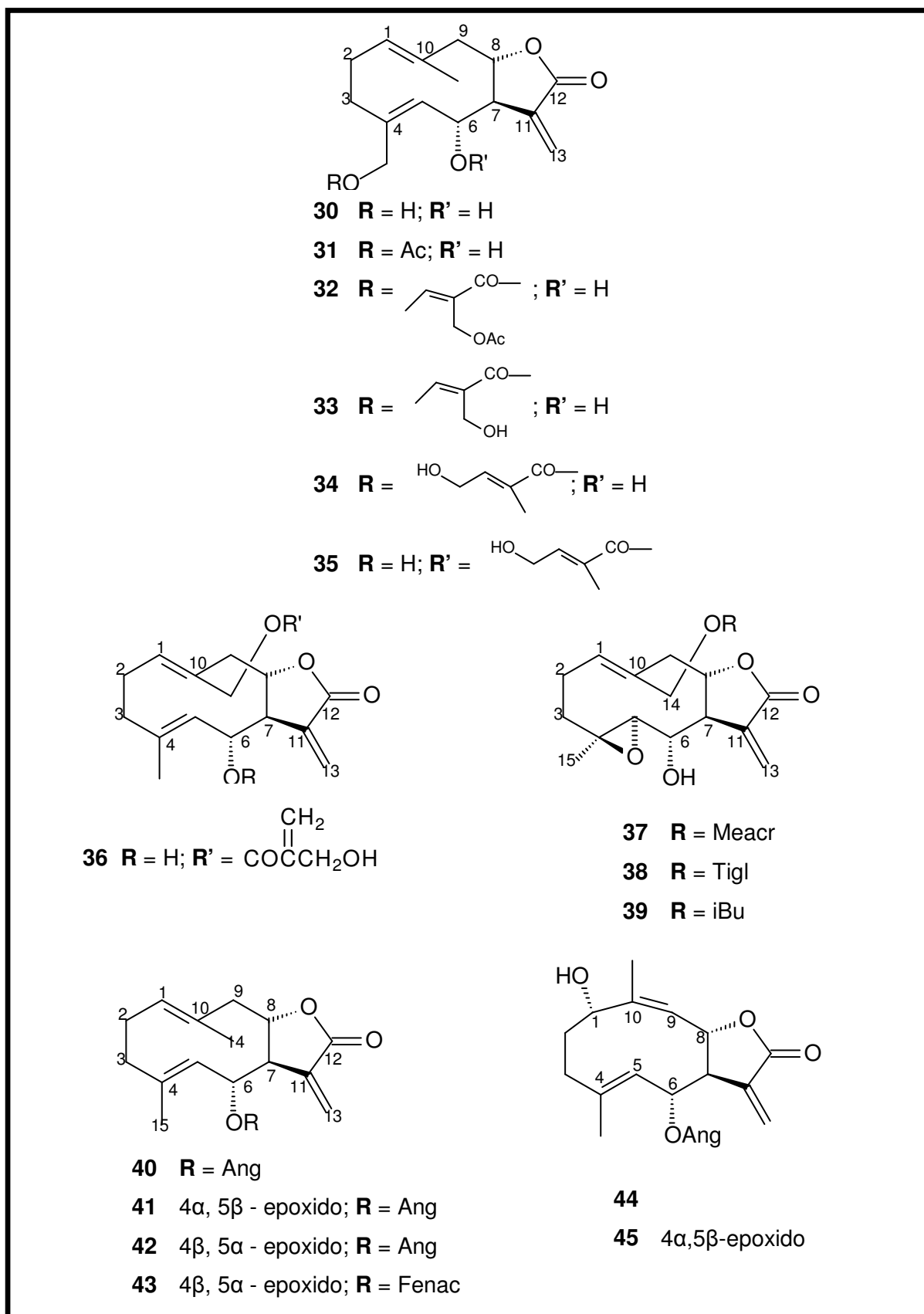
<p><i>G. velutina</i> (Bong.) Cabr.</p>	<p>LACTONAS: <math>\alpha</math>-ciclocostunolido (<b>8</b>); diidro-<math>\beta</math>-ciclocostunolido (<b>10</b>).</p>	<p>TOMASSINI &amp; GILBERT, 1972</p>
<p><i>G.</i> <i>vernonioides</i> H. B. K</p>	<p>SESQUITERPENOS: 7,10-epoxi-11-hidroxi-bisabol-2-en-15-al (<b>74</b>); 7,10-diidroxi-bisabol-2,11-dien-15-al (<b>75</b>); 7,11-diidroxi-bisabol-2,9<i>E</i>-dien-15-al (<b>76</b>)</p> <p>LACTONAS: zaluzanin C (<b>1</b>); deidrocostuslactona (<b>2</b>); ácido 8<math>\alpha</math>-angeloiloxitarácico (<b>13</b>); ácido 8<math>\alpha</math>-isovaleriloiloxitarácico (<b>14</b>); 8<math>\alpha</math>-angeloiloxi-14-al-germacra-1(10)<i>E,4E</i>,11-trien-8<math>\alpha</math>,12-olido (<b>15</b>); 8-desacil-desoxielephantopina angelato (<b>16</b>); desacetillaurenobiolido angelato (<b>40</b>); 6<math>\alpha</math>-angeloiloxi-4<math>\alpha</math>,5<math>\beta</math>-epoxigermacra-1(10)<i>E</i>,11-dien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>41</b>); 6<math>\alpha</math>-angeloiloxi-4<math>\beta</math>,5<math>\alpha</math>-epoxigermacra-1(10)<i>E</i>,11-dien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>42</b>); 6<math>\alpha</math>-fenilacetoxi-4<math>\beta</math>,5<math>\alpha</math>-epoxigermacra-1(10)<i>E</i>,11-dien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>43</b>); 6<math>\alpha</math>-angeloiloxi-1<math>\alpha</math>-hidroxi-germacra-4<i>E</i>,9<i>Z</i>,11-trien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>44</b>); 6<math>\alpha</math>-angeloiloxi-4<math>\alpha</math>,5<math>\beta</math>-epoxi-1<math>\alpha</math>-hidroxi-germacra-9<i>Z</i>,11-dien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>45</b>); 6<math>\alpha</math>-angeloiloxi-1<math>\alpha</math>-hidroxi-germacra-4<i>E</i>,10(14), 11-trien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>46</b>); 6<math>\alpha</math>-angeloiloxi-4<math>\alpha</math>,5<math>\beta</math>-epoxi-1<math>\alpha</math>-hidroxi-germacra-10(14),11-dien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>47</b>); 6<math>\alpha</math>-angeloiloxi-4<math>\alpha</math>,5<math>\beta</math>-epoxi-1<math>\beta</math>-hidroxi-germacra-10(14),11-dien-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>48</b>); 6<math>\alpha</math>-angeloiloxi-1<math>\beta</math>,10<math>\alpha</math>,4<math>\alpha</math>,5<math>\beta</math>-diepoxi-germacra-11-en-8<math>\alpha</math>,12-olide (<b>49</b>); desaciltanapsin-6-<i>O</i>-tiglato (<b>50</b>).</p>	<p>BOHLMANN <i>et al.</i>, 1984</p>



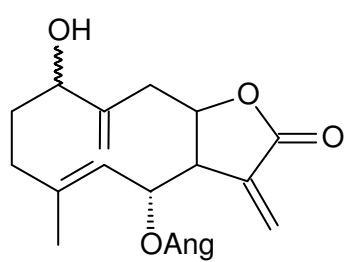
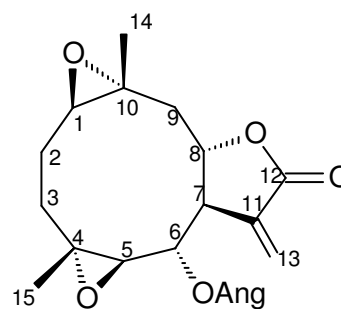
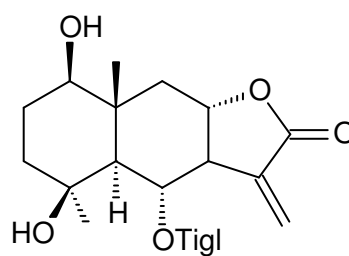
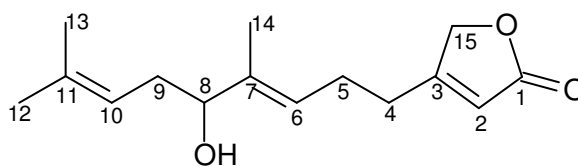
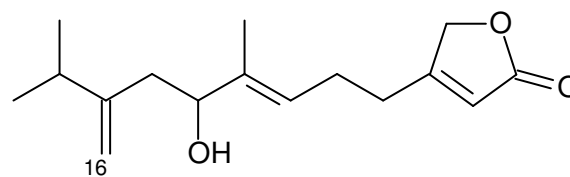
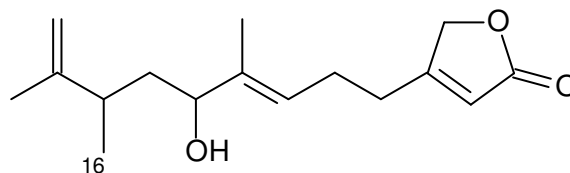
**Figura 1** - Lactonas sesquiterpênicas (1-14) isoladas do gênero *Gochnatia*.

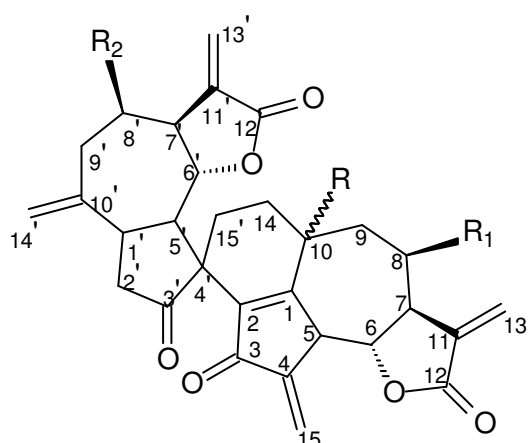


**Figura 2** - Lactonas sesquiterpênicas (15-29) isoladas do gênero *Gochnatia*.



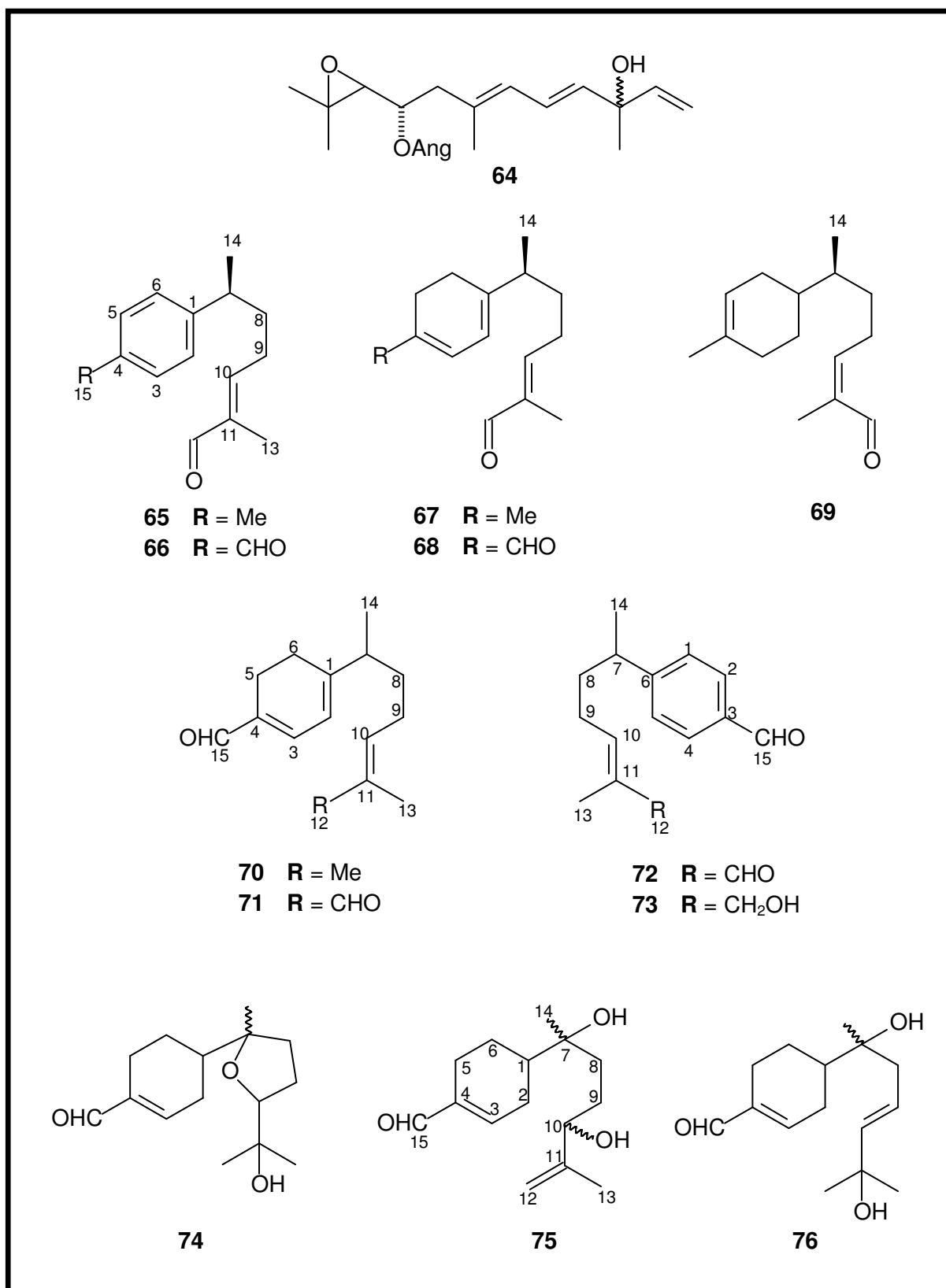
**Figura 3** - Lactonas sesquiterpênicas (**30-45**) isoladas do gênero *Gochnatia*.

**46** 1 $\alpha$  OH**47** 1 $\alpha$  OH; 4 $\alpha$ ,5 $\beta$ -epoxido**48** 1 $\beta$  OH; 4 $\alpha$ ,5 $\beta$ -epoxido**49****50****51****52****53****Figura 4** - Lactonas sesquiterpênicas (**46-53**) isoladas do gênero *Gochnatia*.

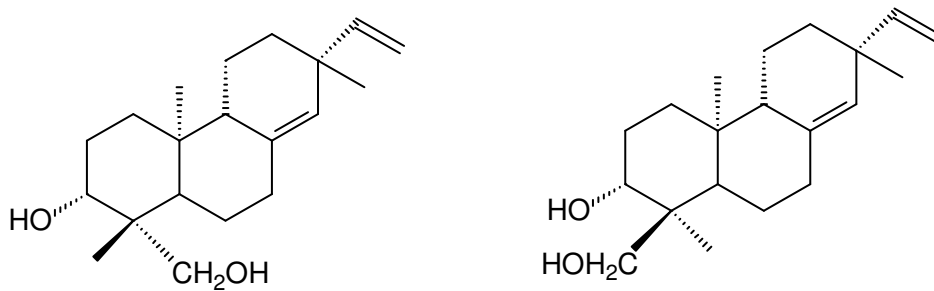


- 54  $R = \alpha H$ ;  $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$
- 55  $R = \alpha H$ ;  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$
- 56  $R = \alpha OH$ ;  $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$
- 57  $R = \alpha OH$ ;  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$
- 58  $R = \alpha H$ ;  $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$ ; 2  $\alpha OH$ ; 1,10 deidro
- 59  $R = \alpha H$ ;  $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$ ; 11,13H; 11',13'H
- 60  $R = \beta H$ ;  $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$
- 61  $R = \beta H$ ;  $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$
- 62  $R = \beta H$ ;  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$
- 63  $R = \beta H$ ;  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = OH$

**Figura 5** - Lactonas diméricas isoladas do gênero *Gochnatia*.

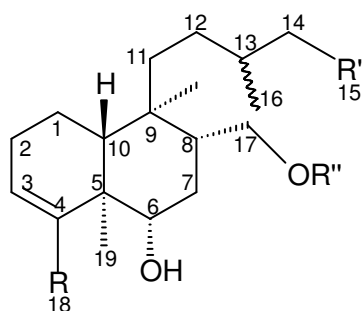
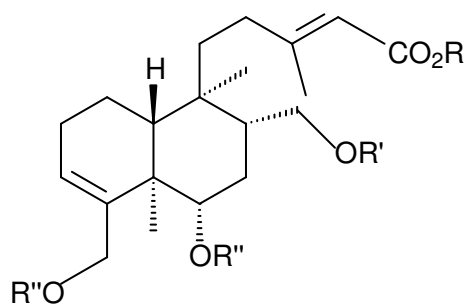


**Figura 6** - Sesquiterpenos isolados do gênero *Gochnatia*.

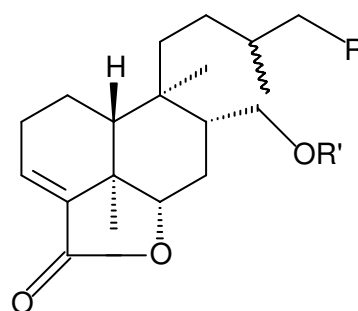


77

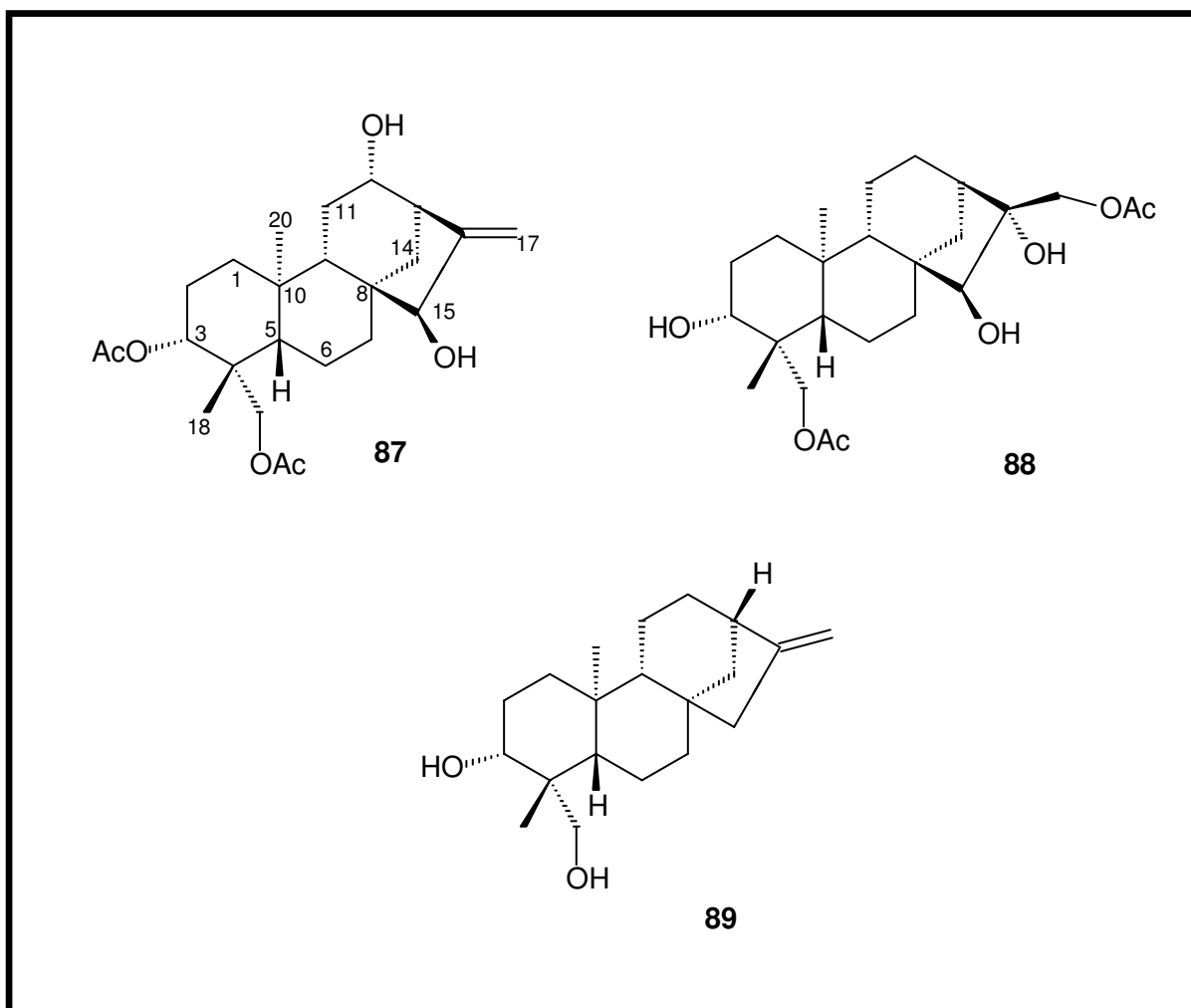
78

79 R = CHO; R' = CH<sub>2</sub>OH; R'' = COCH<sub>2</sub>Ph80 R = CHO; R' = CH<sub>2</sub>OH; R'' = Ac81 R = CH<sub>2</sub>OH; R' = CH<sub>2</sub>OH; R'' = Ac82 R = CH<sub>2</sub>OH; R' = CH<sub>2</sub>OH; R'' = COCH<sub>2</sub>Ph

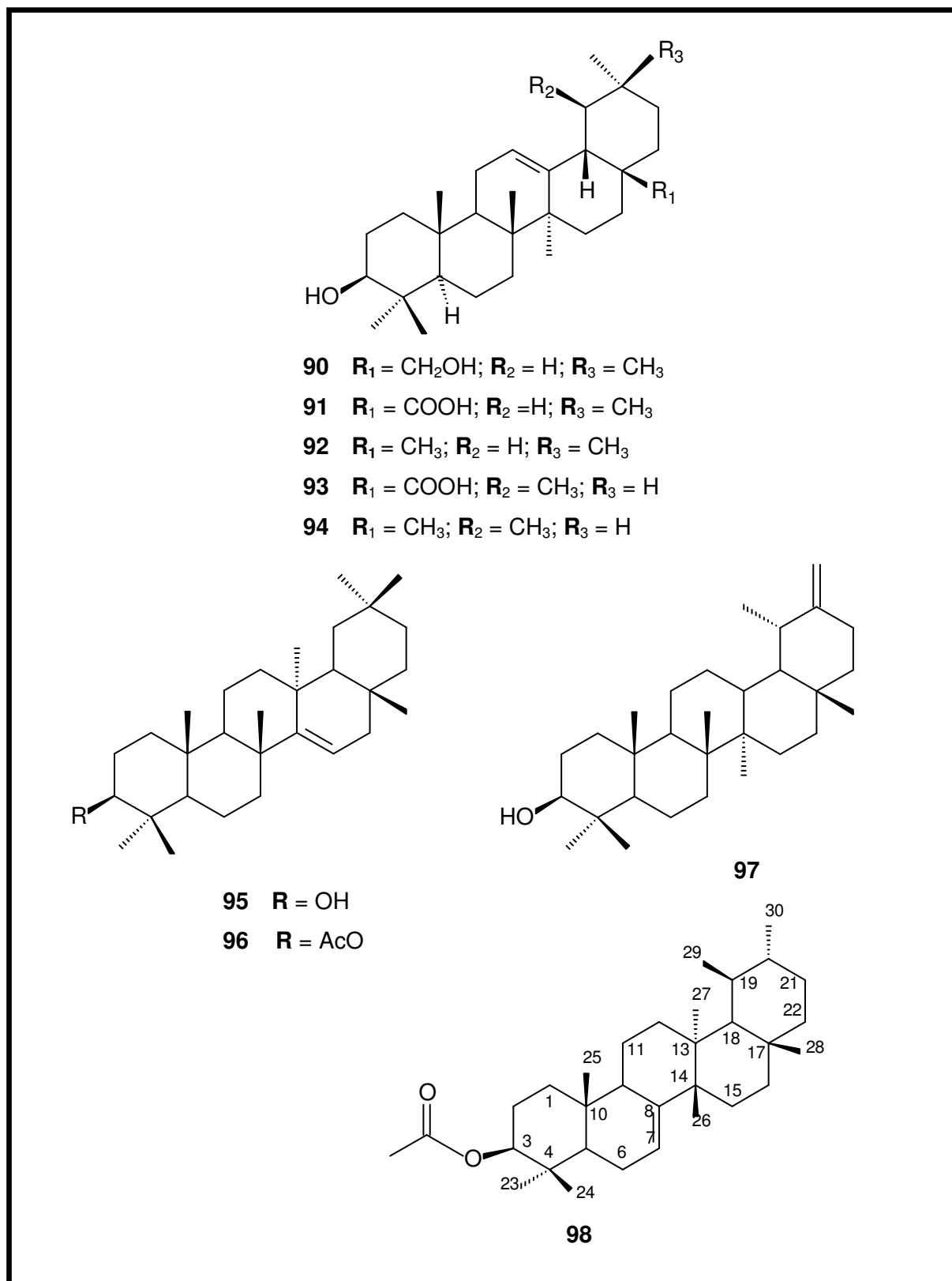
83 R = H; R' = Ac; R'' = H

84 R = H; R' = COCH<sub>2</sub>Ph; R'' = H85 R = CH<sub>2</sub>OH; R' = Ac86 R = CO<sub>2</sub>H; R' = COCH<sub>2</sub>Ph

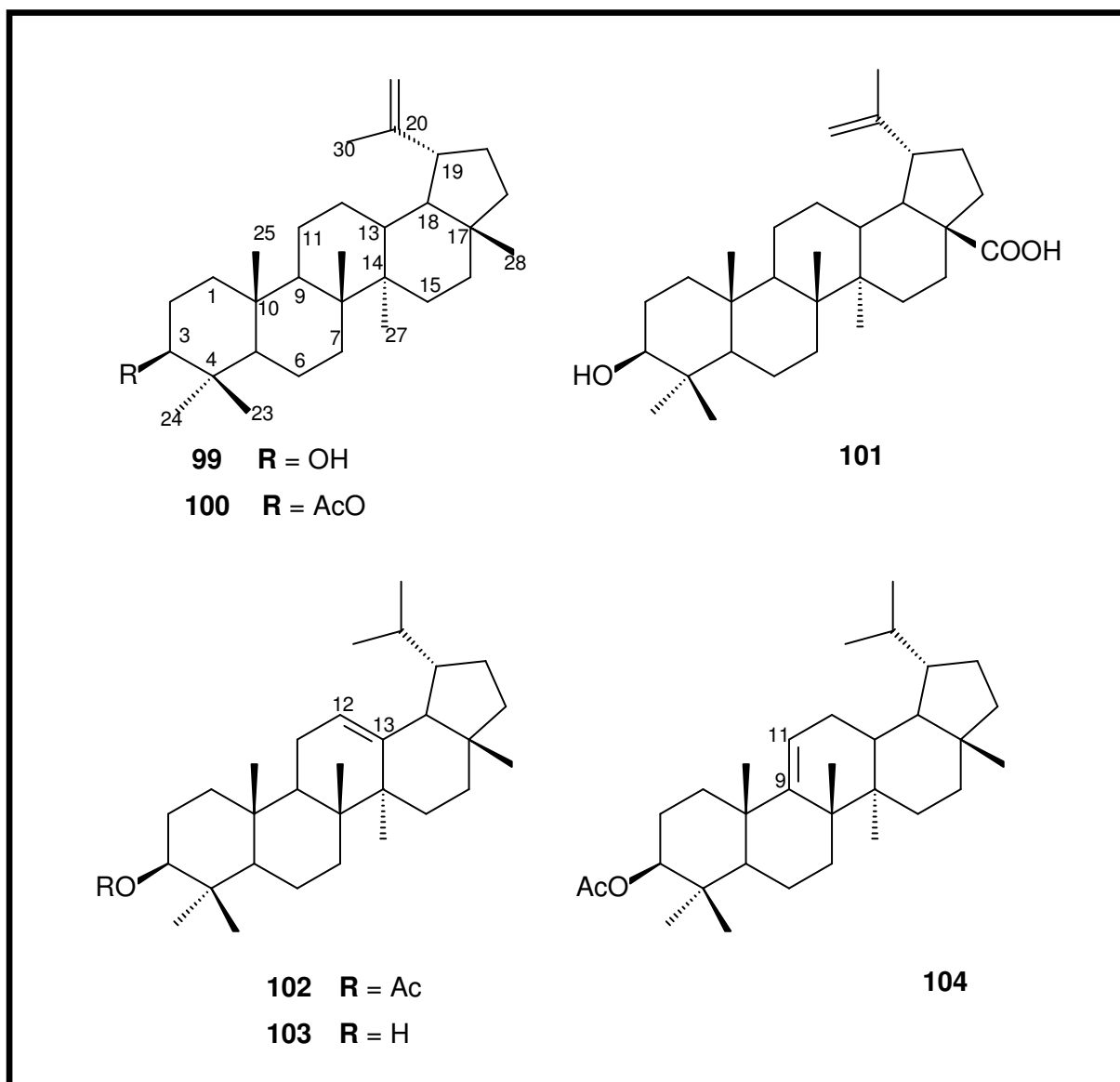
**Figura 7** - Diterpenos (77-86) isolados do gênero *Gochnatia*.



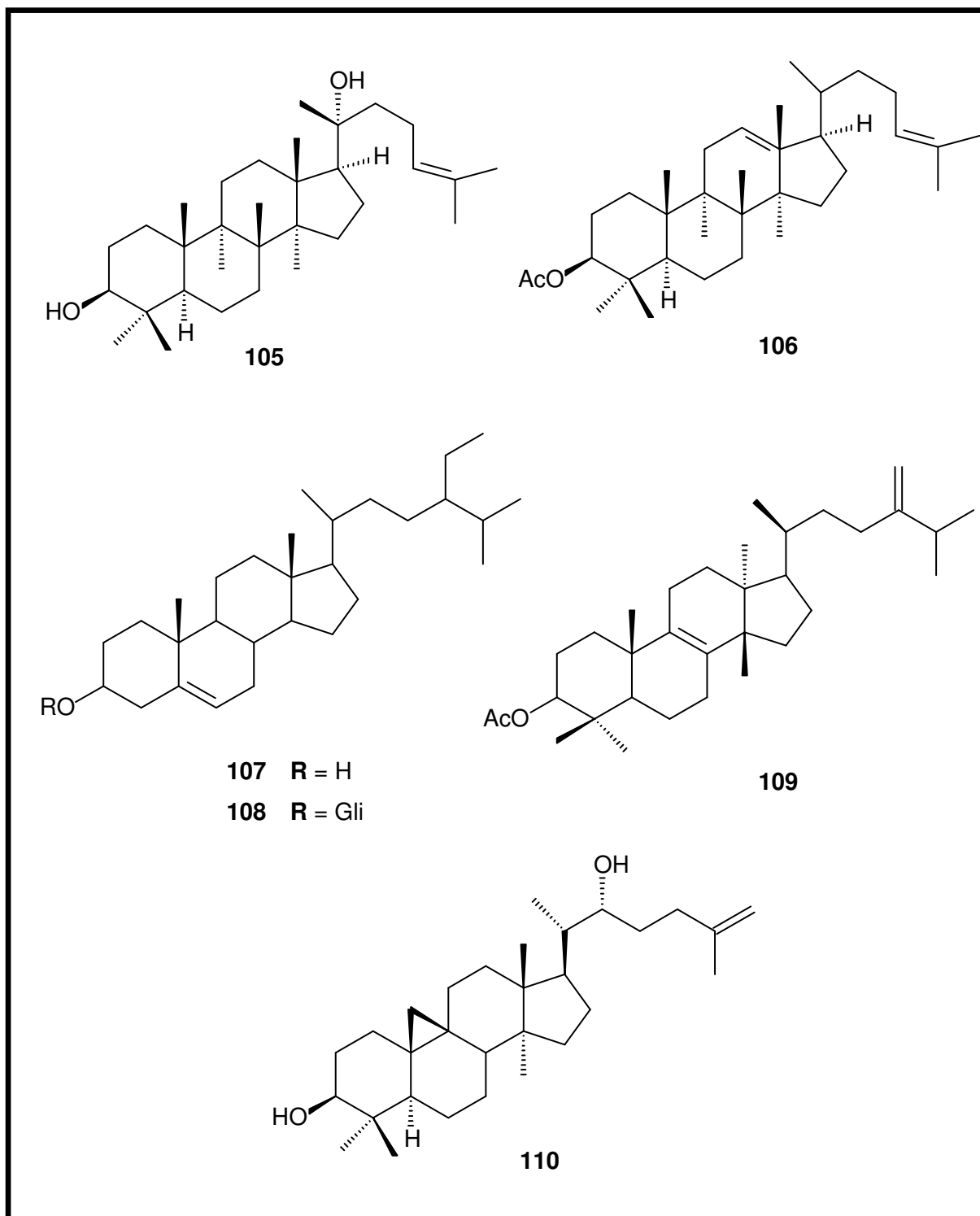
**Figura 8** - Diterpenos (87-89) isolados do gênero *Gochnatia*.



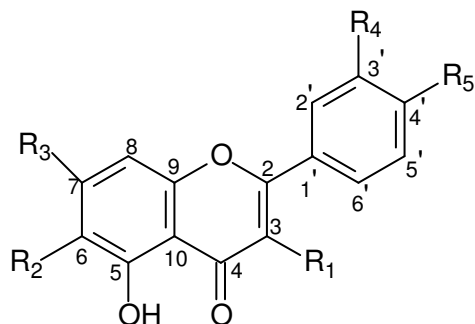
**Figura 9** - Triterpenos (**90-98**) isolados do gênero *Gochnatia*.



**Figura 10** - Triterpenos (**99-104**) isolados do gênero *Gochnatia*.

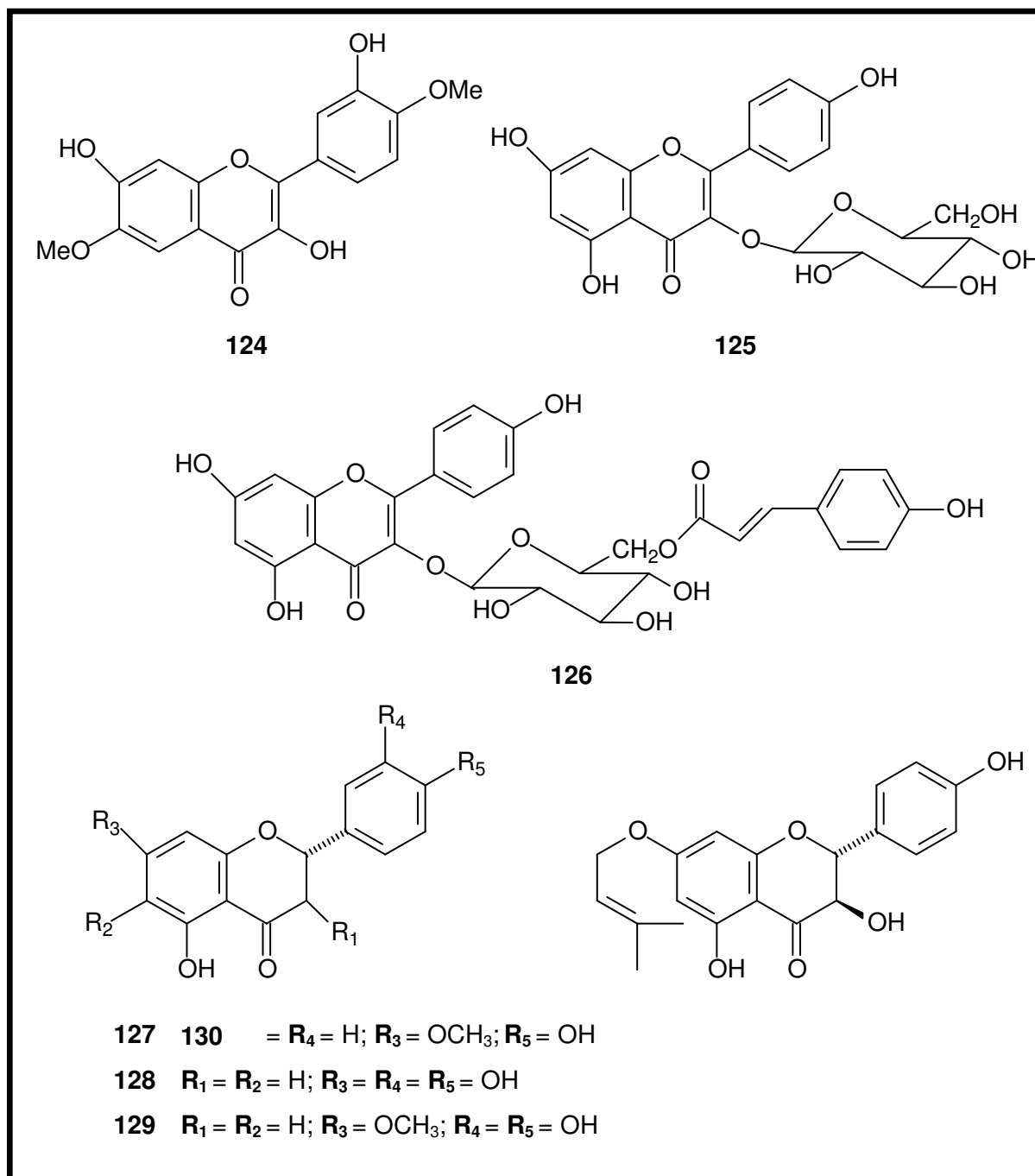


**Figura 11** - Triterpenos tetracíclicos e esteróides isolados do gênero *Gochnatia*.

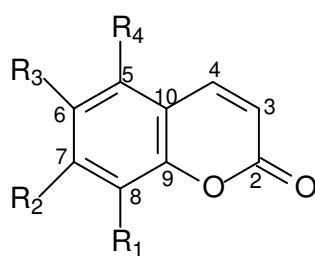


- 111  $R_1 = R_2 = H$ ;  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$
- 112  $R_1 = R_2 = H$ ;  $R_3 = OCH_3$ ;  $R_4 = R_5 = OH$
- 113  $R_1 = R_4 = H$ ;  $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = R_5 = OH$
- 114  $R_1 = R_3 = OCH_3$ ;  $R_2 = R_4 = H$ ;  $R_5 = OH$
- 115  $R_1 = R_3 = R_5 = OH$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_4 = OCH_3$
- 116  $R_1 = R_4 = OCH_3$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = R_5 = OH$
- 117  $R_1 = R_3 = OCH_3$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_4 = R_5 = OH$
- 118  $R_1 = R_5 = OCH_3$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = R_4 = OH$
- 119  $R_1 = R_2 = R_4 = H$ ;  $R_3 = OCH_3$ ;  $R_5 = OH$
- 120  $R_1 = OCH_3$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$
- 121  $R_1 = R_2 = R_4 = H$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_5 = OCH_3$
- 122  $R_1 = O\text{-rutinose}$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$
- 123  $R_1 = O\text{-galactose}$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = R_4 = R_5 = OH$

**Figura 12** - Flavonóides (111-123) isolados do gênero *Gochnatia*.



**Figura 13** - Flavonóides (124-130) isolados do gênero *Gochnatia*.

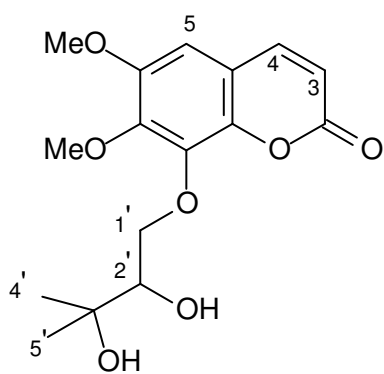


**131** R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = OCH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> = H

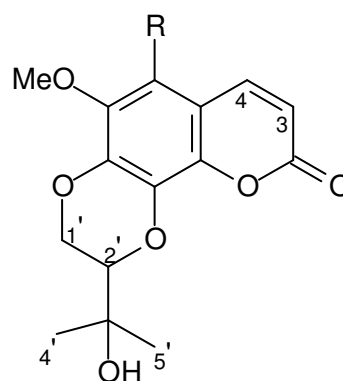
**132** R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> = H

**133** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> = H

**134** R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>



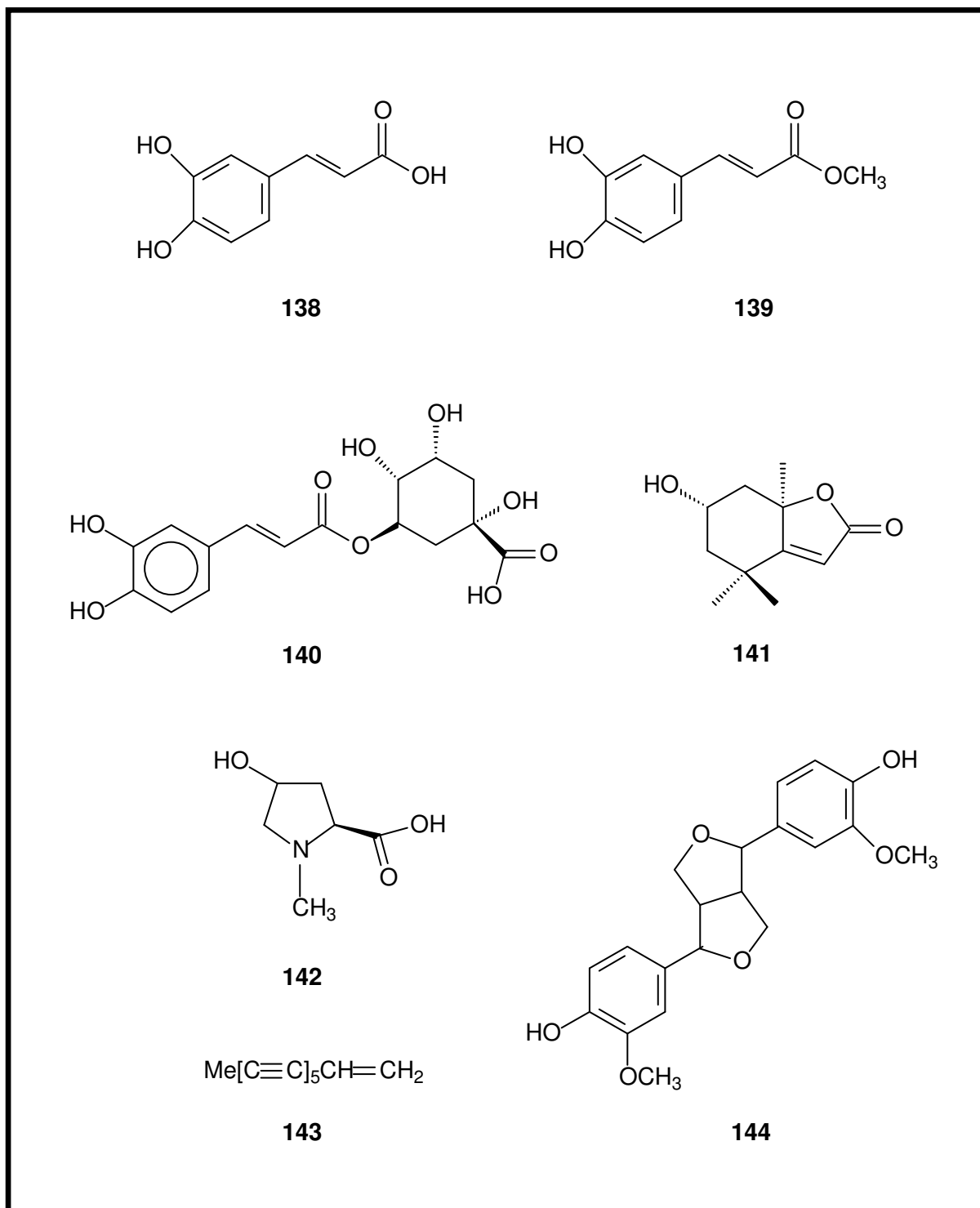
**135**



**136** R = OMe

**137** R = H

**Figura 14** - Cumarinas isoladas do gênero *Gochnatia*.



**Figura 15** - Substâncias de outras classes isoladas do gênero *Gochnatia*.

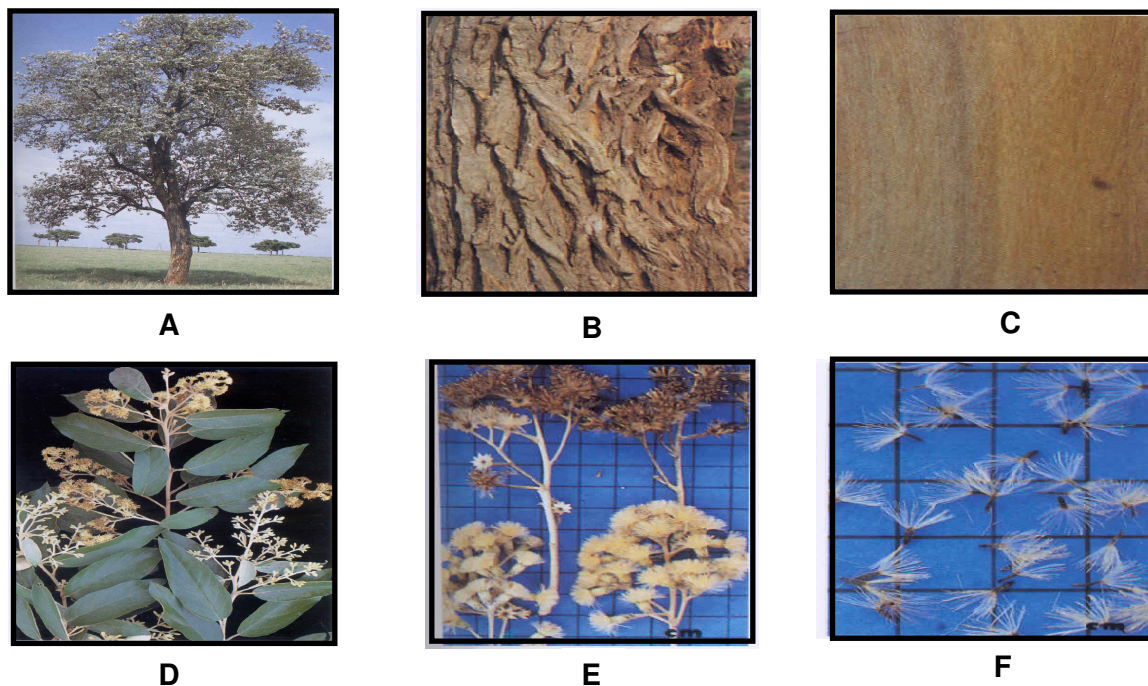
### 1.3. *Gochnatia polymorpha*

*G. polymorpha* (Less) Cabrera (nome antigo: *Moquinea polymorpha* (Less) DC, é uma árvore de médio porte, conhecida no Brasil como cambará, cambará-da-folha-grande ou cambará-do-mato. Floresce durante os meses de dezembro, janeiro e fevereiro, frutificando em seguida. Desenvolve-se bem em condições ruins, como terrenos arenosos e pouco férteis. Atua como espécie secundária inicial, colonizando áreas abertas; tolera geadas fracas, podendo ser encontrada às margens de rios (DURIGAN *et al.*, 2002). Por isso, é uma espécie muito recomendada para reconstrução de ecossistemas degradados.

Apresenta características ornamentais, sendo bastante empregada no paisagismo em geral (LORENZI, 2002). A sua madeira é muito aproveitada por ter um cerne compacto, pesado e de admirável resistência ao apodrecimento. Por isso o seu maior emprego na região sul é em moirões de cerca, que resistem dezenas de anos (CABRERA & KLEIN, 1973). A madeira do cambará é bastante durável ao ar livre e condições adversas, sendo considerada própria para obras imersas, pontes, esquadrias e curvas para a construção naval (LORENZI, 2002).

As suas folhas, flores e cascas do tronco são usadas na medicina popular no preparo de chás ou xaropes contra resfriados, tosses e outras doenças respiratórias (MORS *et al.*, 2000; GARLET & IRGANG, 2001; BUENO *et al.*, 2005; ARAMBARRI *et al.*, 2008).

São reconhecidas três subespécies dessa planta: *polymorpha*, *floccosa* e *ceanothifolia*, com diferentes áreas de distribuição (CABRERA & KLEIN, 1973; CATALAN *et al.*, 2003). A subespécie *polymorpha* é encontrada no sudeste do Brasil e no Paraguai. A subespécie *ceanothifolia* ocorre nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e também no Uruguai, Paraguai e nordeste da Argentina. A subespécie *floccosa* é exclusiva do Brasil, sendo encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.



**Figura 16** - Fotos de *G. polymorpha* (**A** – árvore; **B** – tronco da árvore (madeira bruta); **C** – madeira trabalhada; **D** – flores e folhas; **E** – capítulo floral; **F** – sementes). Fonte: LORENZI, 2002.

Uma revisão na literatura mostrou a existência de cinco trabalhos fitoquímicos envolvendo a espécie *G. polymorpha*, sendo três de exemplares brasileiros e dois de exemplares paraguaios. Esses trabalhos mostram que a espécie produz lactonas sesquiterpênicas, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonóides, cumarinas e compostos fenólicos (**Tabela 1**).

No primeiro trabalho publicado, ainda com o nome antigo de *Moquinea polymorpha*, Farias *et al.* (1984) relataram o isolamento da lactona sesquiterpênica deidrocostuslactona (**2**) e do triterpeno pentacíclico acetato de bauerenila (**95**), a partir do extrato hexânico do caule e cascas do caule de um exemplar de *G. polymorpha*, subespécie não identificada, coletado em Campinas, SP.

Dois anos mais tarde, Bohlmann *et al.* (1986) publicaram um artigo mostrando o isolamento, a partir das partes aéreas e raízes de um exemplar de *G. polymorpha*, subespécie não identificada, coletado no Paraguai, de duas lactonas sesquiterpênicas simples, deidrocostuslactona (**2**) e costunolido (**5**), além de lactonas diméricas (**54-59**), e de uma série de sesquiterpenos com esqueletos bisabolanos (**65, 66, 69, 70 e 71**).

Um terceiro trabalho, realizado também com as partes aéreas e as raízes, porém de um exemplar paulista da subespécie *polymorpha*, mostrou o isolamento de substâncias completamente diferentes do trabalho anterior. Desta vez, os autores identificaram, na fração em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , uma lactona sesquiterpênica, do tipo eudesmanolídeo, a santamarina (**11**); dois

diterpenos (**87 e 88**); dois triterpenos, sendo um deles o taraxerol (**95**) e o outro um derivado do cicloartenol (**110**); além dos flavonóides genkwanina (**119**) e desmetoxicentaureidina (**124**) (SACILOTTO *et al.*, 1997).

Pela primeira vez, um estudo químico guiado por testes farmacológicos, com outro exemplar brasileiro de *G. polymorpha*, subespécie não identificada, desta vez coletado no Rio Grande do Sul, foi possível verificar que a atividade antiinflamatória, no modelo de edema de pata, estava concentrada na fração em AcOEt das folhas de *G. polymorpha*. Com base nestes resultados, os autores realizaram um estudo fitoquímico com esta fração mais polar, a qual forneceu os flavonóides 3-*O*-metilquercetina (**120**), rutina (**122**) e hiperosídeo (**123**), os ácidos caféico (**138**) e clorogênico (**140**) e o aminoácido 4-hidroxi-*N*-metil-prolina (**142**) (MOREIRA *et al.*, 2000).

Finalmente, o último trabalho fitoquímico com a subespécie *polymorpha*, resultou no isolamento, a partir da fração em CHCl<sub>3</sub> das partes aéreas (folhas), de outro exemplar paraguaio, de um diterpeno (**89**), um triterpeno, o ácido oleanólico (**91**), de três cumarinas (**135-137**), e de um monoterpene, loliolido (**141**) (CATALAN *et al.*, 2003).

Além destes, também foi encontrado um estudo envolvendo o teor de fenóis e a composição do óleo essencial da madeira de *G. polymorpha*, subespécie não identificada (LIMA *et al.*, 2007).

É interessante notar que em cada trabalho foram isoladas substâncias diferentes, o que mostra a grande diversidade química da espécie. Essa variabilidade química pode ser atribuída a diversos fatores como, diferentes locais de coleta, variações sazonais ou mesmo a existência de quimiotipos nesta subespécie. Não foram encontrados estudos fitoquímicos envolvendo as subespécies *ceanothifolia* e *floccosa*.

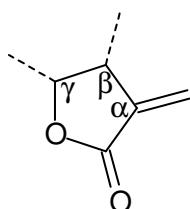
Sobre a subespécie *floccosa*, há um artigo relatando a composição do óleo essencial das flores e raízes, em que foram identificados fenilpropanóides, monoterpeneos e sesquiterpenos (STEFANELLO *et al.*, 2006<sup>a</sup>). E outro sobre a atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos e frações de várias partes de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*, que revelou que o extrato das cascas era o mais ativo, inibindo o crescimento de 14 bactérias e dois fungos, com halos de inibição de 6-17 mm. Além disso, os extratos demonstraram ausência de citotoxicidade no teste de letalidade contra *Artemia salina*, sugerindo que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico (STEFANELLO *et al.*, 2006<sup>b</sup>).

Considerando que *Gochnatia polymorpha* é uma das plantas mais usadas na medicina popular contra doenças respiratórias, torna-se importante documentar a sua composição química bem como as suas propriedades farmacológicas, de modo a contribuir para o desenvolvimento de um fitoterápico eficaz e seguro.

#### 1.4. Lactonas sesquiterpênicas

As lactonas sesquiterpênicas constituem um grande e diversificado grupo de compostos de grande ocorrência na natureza e representam a mais importante classe de metabólitos secundários da família Asteraceae, mas também ocorrem esporadicamente em outras famílias de angiospermas (NEERMAN *et al.*, 2003). Apresentam um potencial para utilização em várias áreas, principalmente na produção de fármacos, em virtude do seu amplo espectro de atividades biológicas, com destaque às atividades citotóxica, antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória, esquistossomicida, antimalárica, antifúngica, antimicrobiana, analgésica (RODRIGUEZ *et al.*, 1976; KEELER & TU, 1983; LYB *et al.*, 1998; NEERMAN *et al.*, 2003; JULIANA *et al.*, 2010).

Diversos estudos realizados para avaliar a relação de estrutura-atividade demonstraram que a presença de uma ligação dupla exocíclica C<sub>11</sub>-C<sub>13</sub> conjugada ao anel da  $\gamma$ -lactona é essencial para que o composto apresente citotoxicidade. Neste contexto, o principal grupo funcional que determina a atividade biológica nesses compostos é o anel  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona (**Figura 17**). É importante ressaltar a ocorrência de modificações estruturais no esqueleto básico, que envolvem a incorporação de outras funcionalidades como ésteres, anéis epóxidos, grupos hidroxilas (geralmente esterificados). Algumas lactonas sesquiterpênicas também contêm haletos, glicosídeos e grupos ácidos como tiglico e angelico (RODRIGUEZ *et al.*, 1976; NEERMAN *et al.*, 2003).

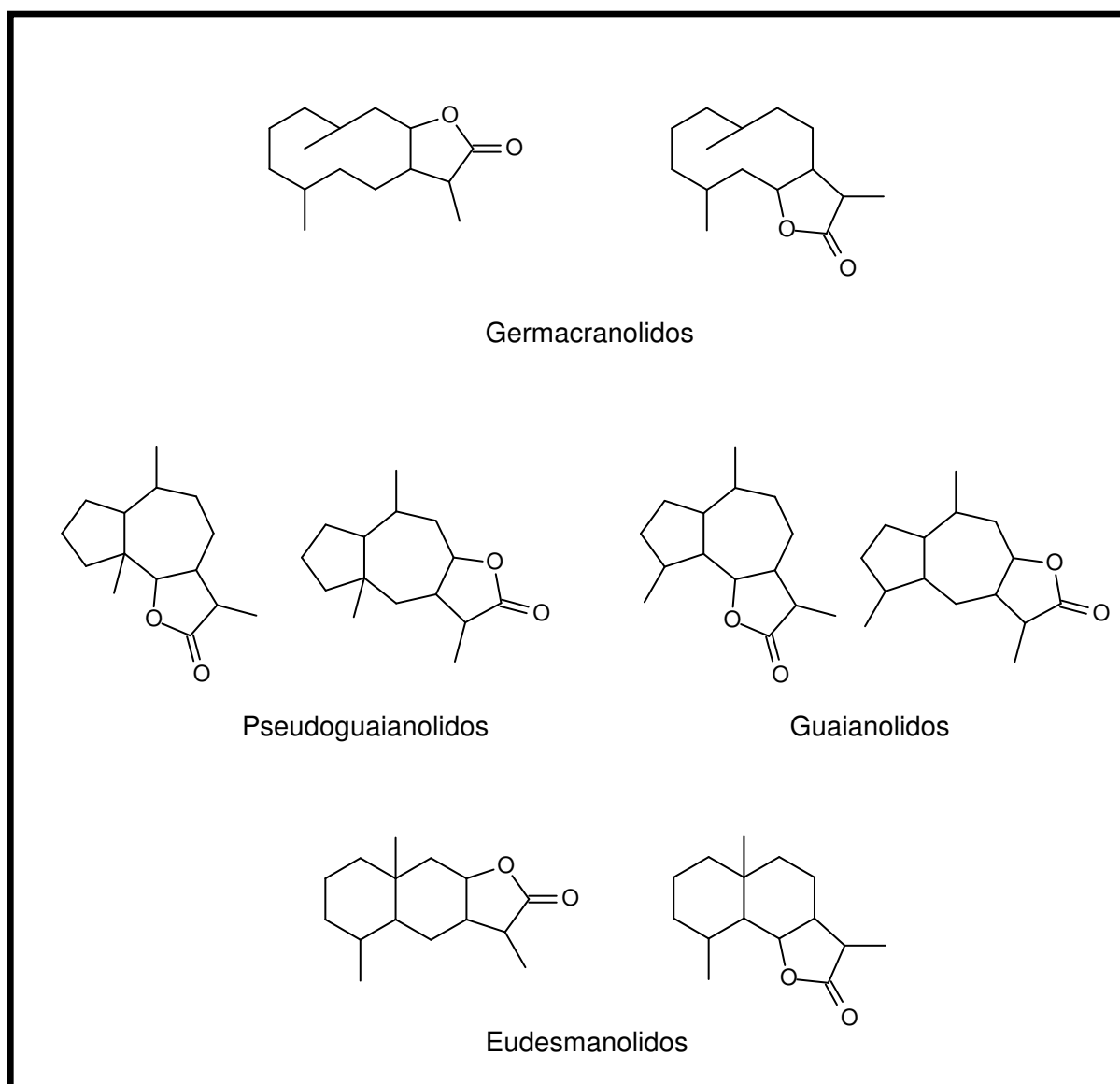


**Figura 17** - Anel  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona (RODRIGUEZ *et al.*, 1976; NEERMAN, 2003).

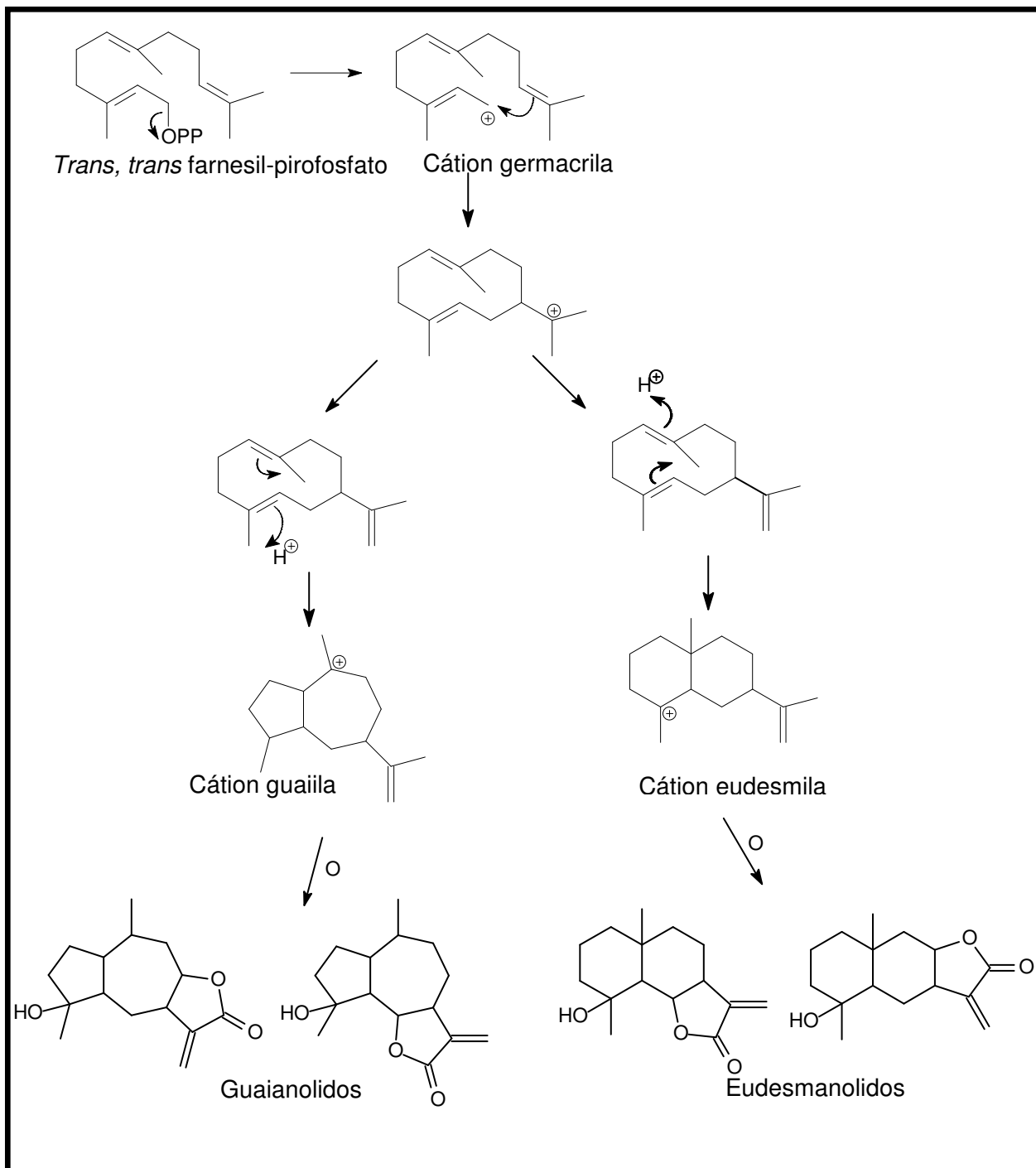
As lactonas sesquiterpênicas são em geral substâncias incolores, amargas, relativamente estáveis e lipofílicas. Com base nas diferenças do seu esqueleto carbocíclico, as lactonas sesquiterpênicas podem ser classificadas em quatro grupos: germacranolidos, guaianolidos, pseudoguaianolidos e eudesmanolidos (YOSHIOKA *et al.*, 1973; NEERMAN *et al.*, 2003) (**Figura 18**). O sufixo “olido” refere-se ao grupo lactona.

As lactonas sesquiterpênicas são biogeneticamente derivadas do *trans,trans*-farnesil-pirofosfato, seguido de uma ciclização inicial e subseqüentes modificações oxidativas (**Figura 19**) (RODRIGUEZ *et al.*, 1976).

Estudos detalhados sobre as atividades biológicas de lactonas sesquiterpênicas, com diferentes tipos de esqueletos, bem como o entendimento do mecanismo de ação das mesmas ainda são escassos. Torna-se necessário a busca de informações úteis para a compreensão do papel adaptativo desses compostos em plantas a fim de contribuir para uma compreensão maior de suas atividades em áreas relacionadas da medicina, farmacologia e botânica.



**Figura 18** - Esqueletos básicos das lactonas sesquiterpênicas (NEERMAN, 2003).



**Figura 19** - Rota biossintética dos principais grupos de lactonas sesquiterpênicas. (Adaptado de DEWICK, 2002; YOSHIOKA *et al.*, 1973).

## 2. OBJETIVOS

**Objetivos gerais:** Determinar a composição química e avaliar as propriedades farmacológicas de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*.

**Objetivos específicos:** isolar e identificar os metabólitos secundários dos extratos das cascas do tronco que foram ativos em ensaios farmacológicos (extratos em diclorometano). Realizar testes de atividade antimicrobiana, vasorrelaxante e antiinflamatória com os extratos, frações e substâncias puras isoladas, de modo a identificar o(s) princípio(s) ativo(s) da planta.

## 3. ESTUDO FITOQUÍMICO

### 3.1 - Materiais e métodos

#### 3.1.1 - Procedimentos gerais

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados solventes procedentes da marca Synth, com grau de pureza pró-análise (PA).

Nas separações cromatográficas em coluna (CC), foi utilizado Sílica-gel 7734 da Merck ou similar. A proporção de sílica utilizada para empacotar a coluna foi de aproximadamente 20 vezes a massa da amostra a ser purificada.

Para as cromatografias analíticas em camada delgada (CCD), placas cromatográficas foram preparadas espalhando-se uma suspensão de sílica-gel em água destilada sobre placas de vidro, usando-se um espalhador do tipo Quickft. Nas placas de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e preparativa (CCDP), foi utilizada Sílica-gel 7747 (60PF 254) da Merck, com espessura de 0,25 mm e 1,00 mm, respectivamente. As análises por CCD foram realizadas em cuba saturada, com migração ascendente.

A detecção das substâncias sobre as placas cromatográficas (CCD) se deu pela visualização sob luz ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, e aspersão da placa com solução etanólica de ácido sulfúrico (5% v/v) (revelador universal), seguida de aquecimento (HARBONE, 1998).

As frações obtidas de colunas foram agrupadas por semelhança após análise por CCDC. O critério de pureza adotado foi o aparecimento de uma única mancha quando a substância era analisada em, pelo menos, três diferentes sistemas de solventes.

As substâncias isoladas foram identificadas através de técnicas espectrométricas (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC) bem como comparação com dados da literatura.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos foram registrados em um espectrômetro Bruker, operando a 200 MHz e a 400 MHz para hidrogênio e a 100 MHz e a 50 MHz para carbono. Os espectros HSQC e HMBC foram registrados no aparelho operando a 400 MHz. Os experimentos foram conduzidos em aproximadamente 0,5 mL de clorofórmio deuterado como solvente, usando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna e ajuste da homogeneidade do campo magnético. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) em relação ao TMS ( $\delta = 0$  ppm). As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram medidas em Hertz (Hz).

As medidas de rotação específica foram realizadas em polarímetro Rudolph Research, modelo Autopol III com lâmpada de sódio (589 nm) e clorofórmio como solvente, à temperatura de 20 °C. Os valores de rotação específica foram calculados utilizando-se a seguinte fórmula:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\text{rotação observada em graus} \times 100}{[\text{comprimento da cubeta (dm)} \times \text{concentração g/100 mL}]}$$

### 3.1.2 - Coleta e identificação do material botânico

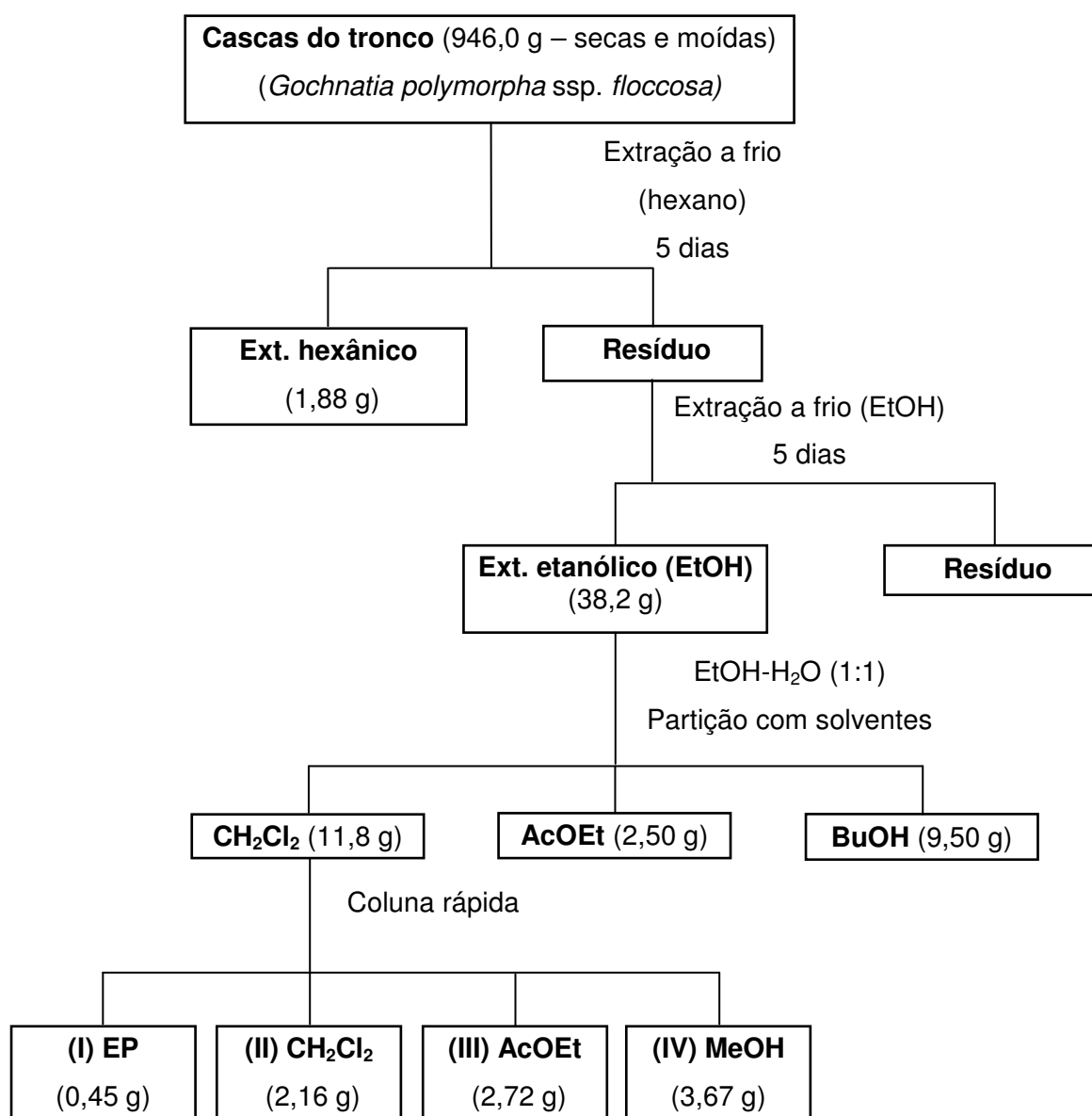
Foram realizadas duas coletas das cascas do tronco de exemplares de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* de ocorrência em Curitiba, PR. A primeira em março/2004 (primeiro material), e a segunda em julho/2009 (segundo material). A planta foi identificada pelo Prof. Dr. Armando Carlos Cervi, do Departamento de Botânica da UFPR. Uma exsicata foi depositada no herbário da mesma instituição (UPCB) sob o número 30100.

### 3.1.3 - Preparação dos extratos e frações do primeiro material

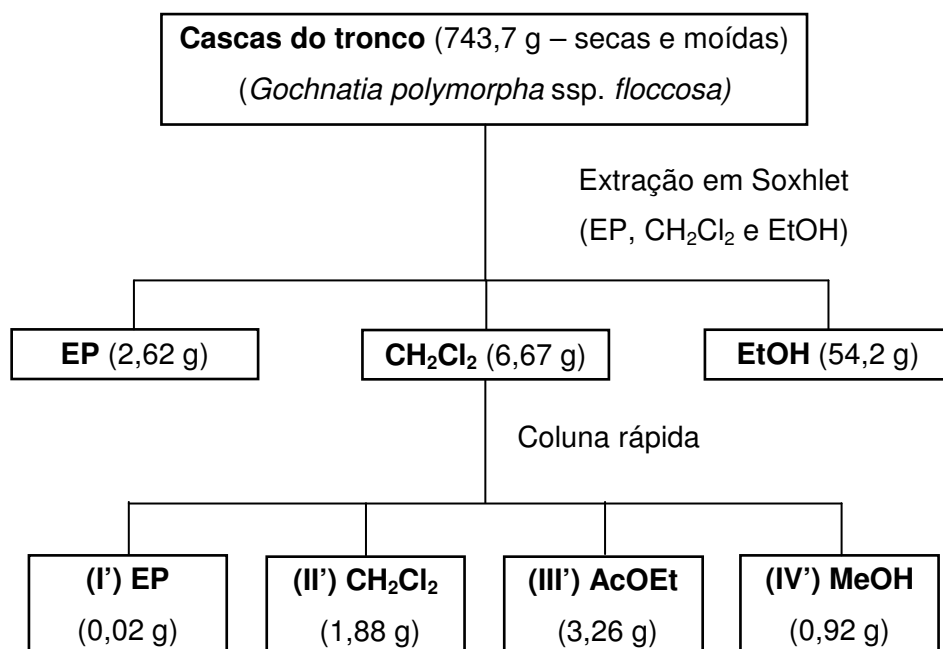
O primeiro material botânico (cascas do tronco – 946,0 g), seco, moído e pesado, foi submetido à extração em temperatura ambiente (maceração) com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano e etanol), com renovação de solvente em intervalo de 24 h. O volume de solvente utilizado foi de 500 mL para cada 100 g de material. As soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotativo à pressão reduzida, rendendo os extratos em hexano (1,80 g) e EtOH (38,2 g). Os resíduos vegetais foram descartados. O extrato em EtOH foi dissolvido em EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1) e submetido à partição seqüencial com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e 1-butanol, rendendo as respectivas frações. A fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11,8 g) foi submetida ao fracionamento em coluna rápida rendendo as frações em EP (I – 0,45 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (II – 2,16 g), AcOEt (III – 2,72 g) e MeOH (IV – 3,67 g). (**Esquema 1**, p. 33)

### 3.1.4 - Preparação dos extratos e frações do segundo material

O segundo material botânico (cascas do tronco – 743,7 g), seco, moído e pesado, foi submetido à extração em Soxhlet utilizando os solventes em ordem crescente de polaridade (hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e EtOH). Os solventes foram removidos em evaporador rotativo, rendendo os extratos em hexano (2,62 g),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6,67 g) e EtOH (54,2 g). O extrato em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foi submetido a um fracionamento em coluna rápida rendendo as frações EP (I' – 0,02 g),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (II' – 1,88 g), AcOEt (III' – 3,26 g) e MeOH (IV' – 0,92 g). (**Esquema 2**, p. 34)



**Esquema 1** – Extração, partição e fracionamento das cascas do tronco do primeiro material (março/2004) de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*.



**Esquema 2** – Extração e fracionamento das cascas do tronco do segundo material (julho/2009) de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*.

### 3.1.5 - Isolamento dos metabólitos secundários

#### 3.1.5.1 - Fracionamento da fração I (EP) do primeiro material

A fração I (452 mg) foi submetida à CC eluída com gradiente de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em hexano. Foram recolhidas 40 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas, após comparação por CCDC, em 8 frações (1-13; **14**; **15-17**; **18**; **19-26**; 27-32; 33; 34-40).

A fração **14** (18,4 mg) continha **GPC1A** quase puro. A fração **15-17** (59,1 mg) foi submetida à CCDP eluída, três vezes, com hexano- $\text{CHCl}_3$  8:2, sendo obtidas 2 subfrações. A subfração **GPCEP15B** (36,4 mg) foi recristalizada em hexano e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rendendo **GPC1A** (17,3 mg).

A fração 18 (20 mg) continha uma mistura de **GPC1A + GPC1B**. A fração **19-26** (41,6 mg) foi submetida à CCDP eluída, três vezes, com hexano-éter etílico 9:1, rendendo **GPC1A** (3,8 mg) e uma mistura de **GPC1A + GPC1B** (5,8 mg).

As outras frações não permitiram o isolamento de nenhuma substância pura (**Esquema 3**, p. 37).

### 3.1.5.2 - Fracionamento da fração II (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) do primeiro material

A fração II (2,10 g) foi submetida à CC eluída inicialmente com gradiente de AcOEt em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e posteriormente um gradiente de MeOH em AcOEt. Foram recolhidas 80 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em doze (1-2; **3-5**; 6; **7-16**; **17-20**; 21; **22-37**; 38-40; 41-49; 50-66; 67-74; 75-80).

A fração **3-5** (85,2 mg) foi submetida à CCDP eluída, três vezes, com hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, rendendo **GPC1A** (2,7 mg).

A fração **7-16** (337,7 mg) foi submetida à outra CC eluída com hexano puro, hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 1:1; e finalmente MeOH puro. Foram recolhidas 36 frações de aproximadamente 5 mL, agrupadas em nove (1-7; 8-10; **11-12**; 13; **14-17**; **18-19**; 20-27; 28-29; 30-36). Deste novo grupo, a fração **11-12** (17,6 mg) foi submetida à CCDP eluída, duas vezes, com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro, rendendo uma mistura de **GPC2A+2B** (2,9 mg). A fração **14-17** (72,8 mg) foi submetida à duas CCDP sucessivas, eluídas primeiramente com CHCl<sub>3</sub>-acetona 1% (3 vezes), e depois com hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:2 (4 vezes) rendendo duas frações com a mesma mistura de **GPC2A+2B** (2,1 mg) e (3,0 mg). A subfração **18-19** (24,9 mg) foi submetida à CCDP eluída com CHCl<sub>3</sub>-acetona 1%; rendendo novamente a mistura **GPC2A+2B** (1,0 mg).

A fração **17-20** (53,4 mg) foi submetida à CC eluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro. Foram recolhidas 20 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em seis (1-5; 6; **7-9**; 10-12; 13-15; 16-20). A fração **7-9** (12,6 mg), foi submetida à CCDP eluída, duas vezes, com hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 2:1:0,5, rendendo a mistura **GPC2A+2B** (3,0 mg).

A fração **22-37** (1,10 g) foi submetida à CC eluída com hexano-acetona nas proporções 8:2; 7:3; 1:1 e 3:7. Foram recolhidas 58 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em dez (1-3; 4-6; 7-15; **16-26**; 27-34; **35-37**; **38**; **39-44**; 45-50; 51-58). A fração **16-26** (350,0 mg) continha uma substância quase pura. Parte dessa fração (24,7 mg) foi recristalizada em hexano e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rendendo **GPC3** (9,6 mg). As frações **35-37** (45,8 mg) e **38** (50,2 mg) foram submetidas à CCDP, eluídas (3 vezes), em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 98:2, sendo obtida **GPC4** (35,1 mg). Ainda nesse grupo, a fração **39-44** (251,3 mg) foi submetida à CC eluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH nas proporções 98:2 e 1:1. Foram recolhidas 58 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em onze (1-17; 18-26; 27-30; 31; **32-37**; 38-39; 40-54; 55; 56; 57; 58). Deste novo grupo, a fração **32-37** (60,2 mg) foi submetida à CCDP eluída, duas vezes, em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5, obtendo-se **GPC5** (8,8 mg) e **GPC6** (9,7 mg).

As outras frações não permitiram o isolamento de nenhuma substância pura (**Esquema 4**, p. 38).

### 3.1.5.3 - Fracionamento da fração II' (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) do segundo material

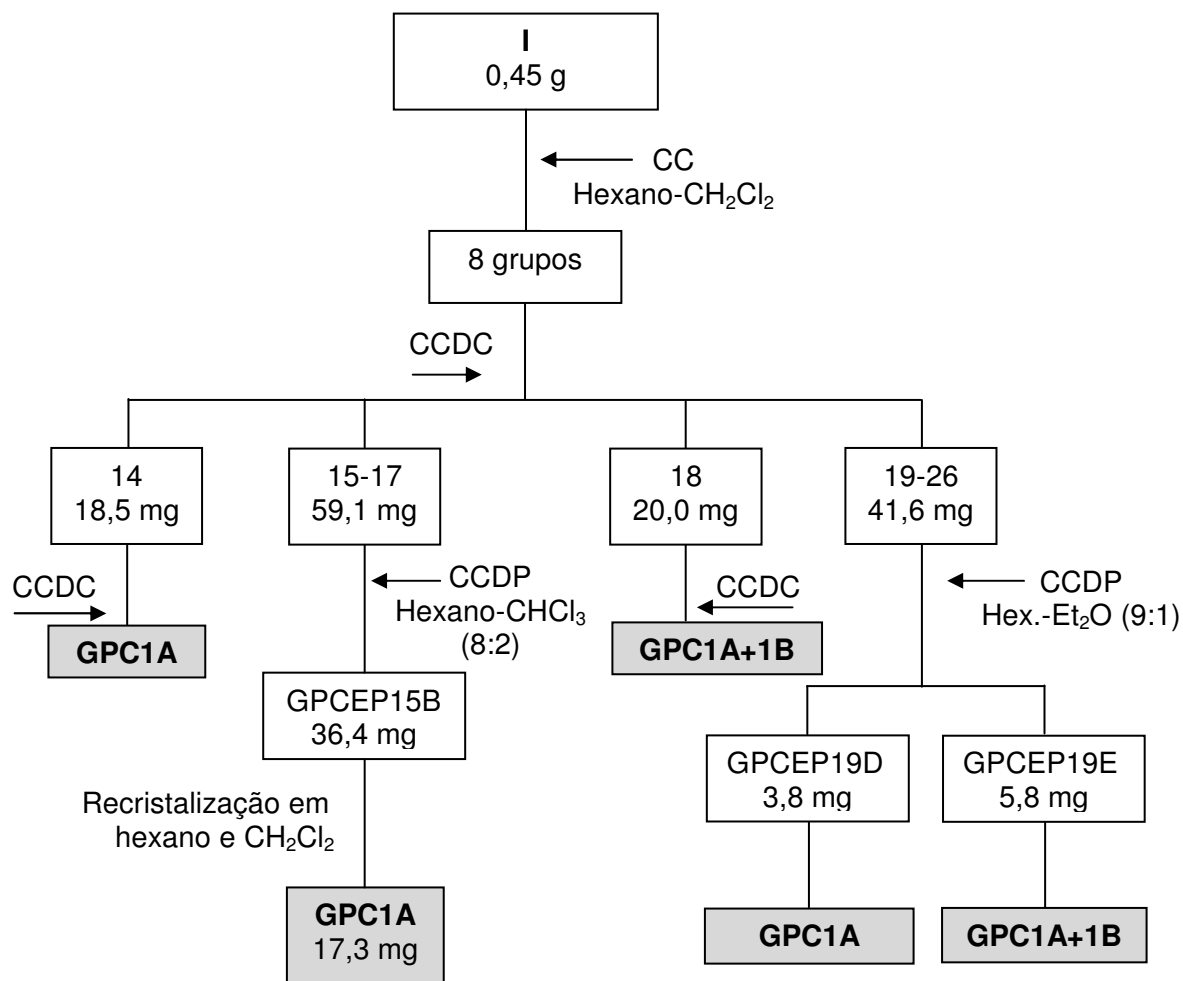
A fração II' (1,88 g) foi submetida à CC eluída com vários solventes em ordem crescente de polaridade, começando com um gradiente de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em hexano, depois um gradiente de AcOEt em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e finalmente um gradiente de MeOH em AcOEt. Foram recolhidas 39 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em onze (1-8; 9-10; 11; 12-13; 14; 15-16; 17-22; 23-26; 27-37; 38; 39).

A fração 14 (27,0 mg) foi submetida à CCDP eluída, duas vezes, com hexano-acetona 1:1, rendendo **GPC1B** (4,1 mg).

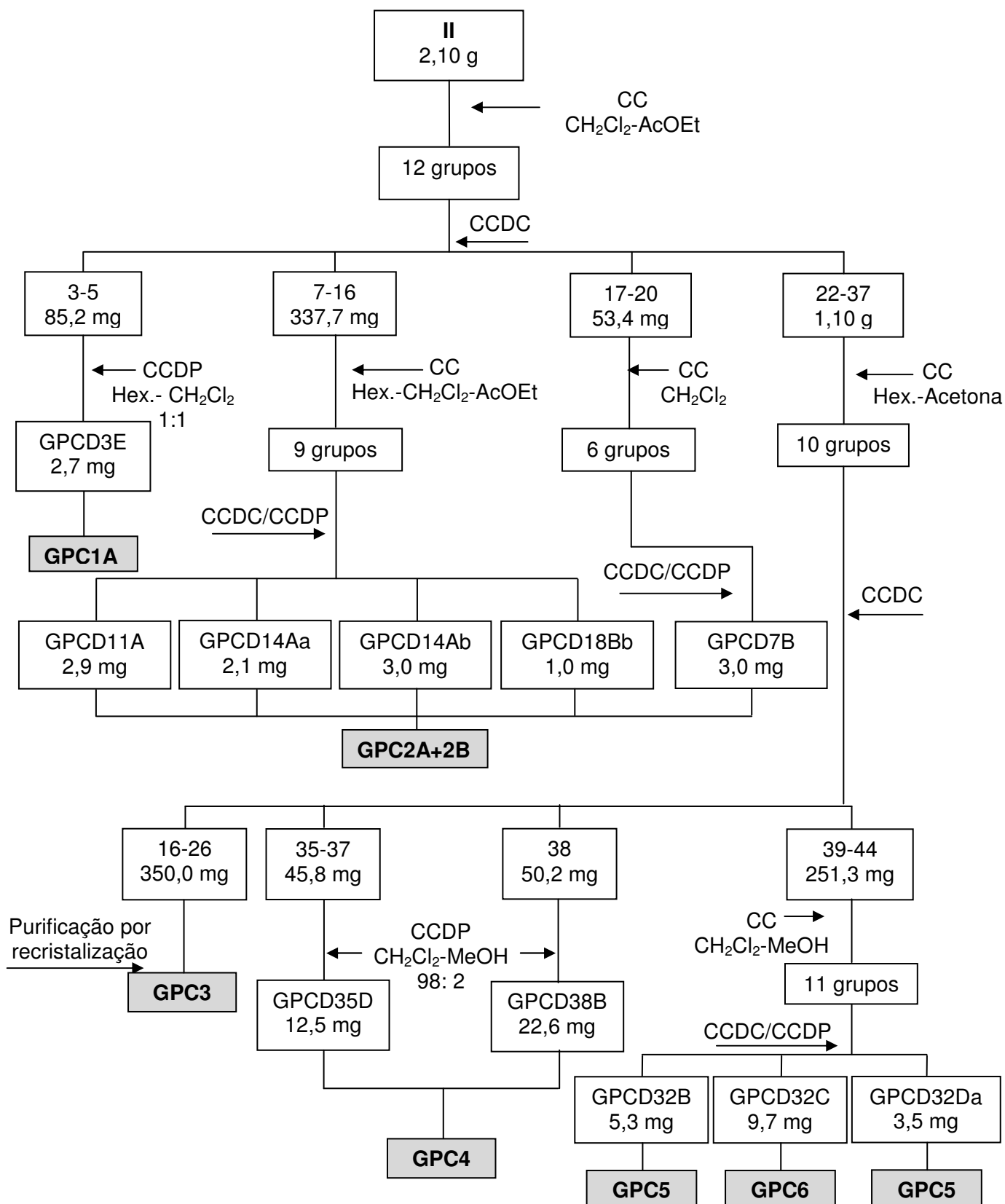
A fração 17-22 (131,4 mg) foi submetida à CC eluída com um gradiente de hexano em acetona. Foram recolhidas 24 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em sete (1-4; 5-7; 8-11; 12-15; 16-19; 20-22; 23-24). As frações 8-11 (71,1 mg) e 12-15 (23,0 mg), foram submetidas à CCDP eluída, duas vezes, com hexano-acetona 9:1, rendendo **GPC8** (13,3 mg). A fração 23-26 (562,6 mg) foi submetida à CC eluída com hexano-acetona 8:2; 7:3 e 1:1; seguida de AcOEt puro, e finalmente, acetona pura. Foram recolhidas 33 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em nove (1-11; 12-17; 18-23; 24; 25; 26-30; 31; 32; 33). As frações de 26 a 33 continham a mesma substância principal. Escolheu-se a fração 32 (71,0 mg), que foi purificada por recristalização CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e hexano, e identificada como **GPC7** (50,0 mg).

A fração 27-37 (518,5 mg), foi submetida à CC eluída com gradiente de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em MeOH. Foram recolhidas 47 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em nove (1-4; 5-15; 16-17; 18-21; 22-24; 25-27; 28-30; 31-32; 33-47). A fração 18-21 (50,1 mg), foi submetida à CCDP eluída, repetidamente, com hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona 1:1:1, rendendo **GPC3** (9,3 mg). Parte da fração 22-24 (141,1 mg), aproximadamente 79,0 mg, foi submetida à duas CCDP eluídas primeiramente com hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 1:1:0,2 (2 vezes) e depois com hexano-CHCl<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O 1:1:1 (3 vezes), rendendo **GPC7** (4,8 mg). A fração 28-30 (45,0 mg) foi submetida à CCDP eluída em hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 1:1:0,3; rendendo **GPC5** (10,9 mg) e uma outra subfração (21,5 mg) que foi submetida a nova CCDP, eluída em hexano-CHCl<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O 1:2:2, rendendo **GPC6** (10,0 mg) e **GPC4** (8,6 mg).

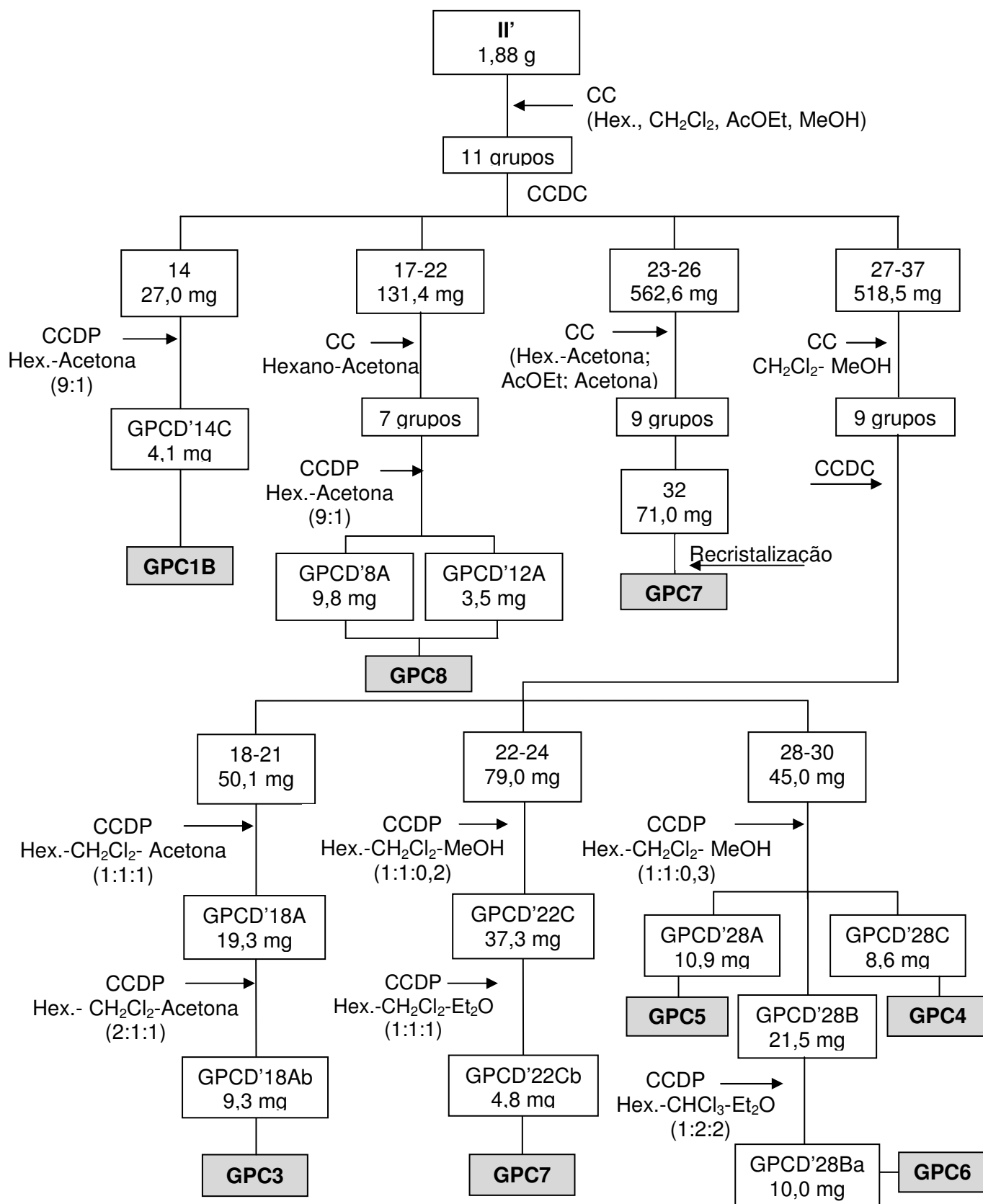
As outras frações não permitiram o isolamento de nenhuma substância pura (**Esquema 5**, p. 39).



**Esquema 3** – Fracionamento da fração I (EP) das cascas do tronco do primeiro material de *G. polymorpha ssp. floccosa*.



**Esquema 4** - Fracionamento da fração II (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) das cascas do tronco do primeiro material de *G. polymorpha ssp. floccosa*.



**Esquema 5** - Fracionamento da fração II' (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) das cascas do tronco do segundo material de *G. polymorpha ssp. floccosa*.

### 3.2. Dados físicos e espectrométricos das substâncias isoladas

#### GPC1A

**Acetato de bauerenila** (C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>, 468,7608): cristais incolores na forma de mica.

$[\alpha]_D^{20} = -22,50^\circ$  (C=0,16 g.mL<sup>-1</sup>; CHCl<sub>3</sub>); Lit.: -1,4<sup>o</sup> (OKANO *et al.*, 1983).

RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC: **Tabela 2** pág. 44; **E1-4** pág. 46-47.

#### GPC1B

**Bauerenona** (C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>O, 425,7161): cristais incolores.

$[\alpha]_D^{20} = -48,40^\circ$  (C=0,23 g.mL<sup>-1</sup>; CHCl<sub>3</sub>); Lit.: -47,50<sup>o</sup> (CAMPELLO & MARSAIOLI, 1975).

RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC: **Tabela 3** pág. 45; **E5-7** pág. 48-49.

#### GPC2A + GPC2B

**Sitosterol** (C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O, 414,7130) + **Estigmasterol** (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O, 412,6972): sólido branco com aspecto cristalino.

RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C: **E8-9** pág. 51.

#### GPC3

**11 $\alpha$ H-13diidroزالuzanin C** (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>, 248,3200): cristais incolores na forma de agulha.

$[\alpha]_D^{20} = +130,5^\circ$  (C=0,39 g.mL<sup>-1</sup>; CHCl<sub>3</sub>).

RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC: **Tabela 4** pág. 53; **E10-13** pág. 54-55.

#### GPC4

**Gochnatiolido A** (C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub>, 502,560): sólido branco.

$[\alpha]_D^{20} = -90,00^\circ$  (C=0,12 g.mL<sup>-1</sup>; CHCl<sub>3</sub>)

RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC: **Tabelas 5-6** pág. 58-59; **E14-20** pág. 60-63.

#### GPC5

**8-hidroxi-10-desoxigochnatiolido A** (C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub>, 502,560): sólido branco.

$[\alpha]_D^{20} = -34,50^\circ$  (C=0,32 g.mL<sup>-1</sup>; CHCl<sub>3</sub>).

RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC: **Tabelas 5-6** pág. 58-59; **E14-19** pág. 60-62; **E21** pág. 63.

**GPC6**

**8-hidroxi-gochnatiolido A** (C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>, 518,559): sólido branco.

$[\alpha]_D^{20} = -52,30^\circ$  (C=0,13 g.mL<sup>-1</sup>; CHCl<sub>3</sub>).

RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC: **Tabelas 5-6** pág. 58-59; **E14-19** pág. 60-62; **E22-23** pág. 64.

**GPC7**

**10-desoxigochnatiolido A** (C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>, 486,561): sólido branco.

$[\alpha]_D^{20} = -90,00^\circ$  (C=0,05 g.mL<sup>-1</sup>; CHCl<sub>3</sub>).

RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC: **Tabelas 5-6** pág. 58-59; **E14-19** pág. 60-62; **E24-25** pág.65.

**GPC8**

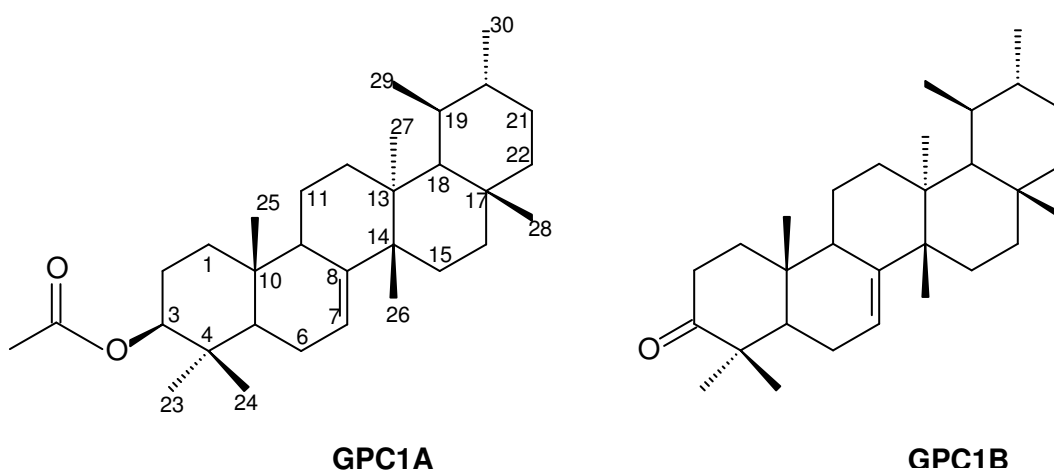
**Ferulato de *n*-alquila**: sólido branco.

RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC: **Tabela 7** pág. 67; **E26-29** pág. 68-69.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico resultou no isolamento e identificação de 10 substâncias, denominadas **GPC1A**, **GPC1B**, **GPC2A**, **GPC2B**, **GPC3**, **GPC4**, **GPC5**, **GPC6**, **GPC7** e **GPC8**. Todas são conhecidas e foram identificadas através de análise de espectros de RMN e comparação com dados da literatura. Entre os compostos isolados destacam-se as lactonas, constituintes característicos das espécies do gênero *Gochnatia* (**Tabela 1**, p. 5).

#### 3.3.1 - Identificação das substâncias GPC1A e GPC1B

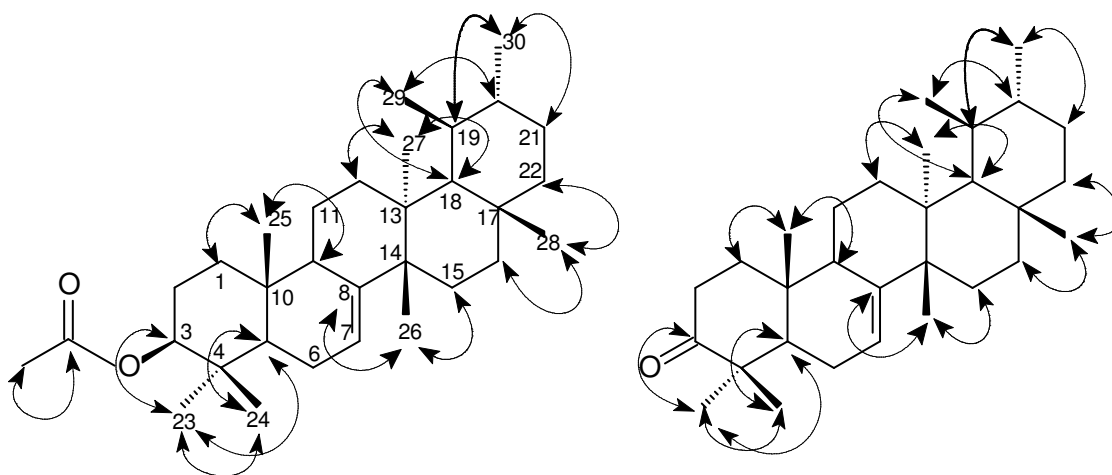


A substância **GPC1A** foi isolada como cristais na forma de mica. O seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**E1**; **Tabela 2**) mostrou sinais de um hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,41 (*dd*, 2,9; 6,7 Hz), um hidrogênio carbinólico em  $\delta$  4,52 (*dd*, 4,2 Hz; 10,9 Hz), um grupo acetila em  $\delta$  2,06 (*s*, 3 H) e oito grupos metila em  $\delta$  1,05 (*d*, 7,2 Hz, 3 H);  $\delta$  1,04 (*s*, 3 H);  $\delta$  0,99 (*s*, 3 H);  $\delta$  0,94 (*s*, 3 H);  $\delta$  0,93 (*s*, 3 H);  $\delta$  0,91 (*d*, 5,9 Hz, 3 H);  $\delta$  0,85 (*s*, 3 H);  $\delta$  0,76 (*s*, 3 H). Esses dados são compatíveis com um triterpeno acetilado.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (**E2**; **Tabela 2**) de **GPC1A** mostrou 31 sinais. Os sinais em  $\delta$  21,3, 81,1 e 171,0 confirmaram a presença de um acetato de triterpenila enquanto que os sinais dos carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  116,2 e 145,4 indicaram o esqueleto do bauerenol (OLEA & ROQUE, 1990). Através da análise dos espectros de RMN bidimensionais (HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura, **GPC1A** foi identificado como o acetato de bauerenila, um triterpeno previamente isolado de *G. polymorpha* (FARIAS *et al.*, 1984; CHAKRAVARTY & DAS, 1998).

A substância **GPC1B** foi isolada como um sólido branco com aspecto cristalino. Seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**E5**) foi muito similar ao de **GPC1A** (**E1**), indicando tratar-se de um triterpeno muito semelhante. Devemos destacar o sinal bem definido em  $\delta$  2,75 (*ddd*, 5,7; 5,7; 14,7 Hz), típico de um grupo metileno vizinho a um grupo carbonila, que estava ausente no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **GPC1A**. A presença de um grupo carbonila foi confirmada pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**E6**), que mostrou um sinal em  $\delta$  216,0, além de outros sinais característicos de um triterpeno com o mesmo esqueleto de **GPC1A**. O espectro HMBC (**E7**), apresentou uma grande sobreposição de sinais na região mais protegida, dificultando a interpretação. Apesar disso foi possível confirmar a estrutura através da observação das correlações principais (**Figura 20**). A comparação com dados da literatura permitiu identificar **GPC1B** como o triterpeno bauerenona (FARIAS *et al.*, 1984; CAMPELLO & MARSALOLI, 1975), uma substância conhecida que está sendo relatada pela primeira vez no gênero. Em estudo anterior, esta cetona havia sido sintetizada através de oxidação do acetato de bauerenila (FARIAS *et al.*, 1984).

As substâncias **GPC1A** e **GPC1B** eram os constituintes principais da fração menos polar do extrato etanólico e foram obtidos de várias frações, em misturas de diferentes proporções (**Esquema 3**, p. 37).



**Figura 20** - Principais correlações observadas nos espectros HMBC de **GPC1A** e **GPC1B**.

**Tabela 2** - Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (50 MHz), HSQC e HMBC (400 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para **GPC1A**.

Posição	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^*$	HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$
1	CH <sub>2</sub>	1,67 ( <i>m</i> )	36,5	3; 4; 5; 9
2	CH <sub>2</sub>	**	24,2	**
3	CH	4,52 ( <i>dd</i> , 4,2; 10,9)	81,1	1; 2; 4; C-O
4	Cq	-	37,8	-
5	CH	1,41 ( <i>m</i> )	50,6	3; 4; 6; 7; 9; 10; 23; 24; 25
6	CH <sub>2</sub>	2,00 ( <i>m</i> )	23,9	5; 7; 8; 10
7	CH	5,42 ( <i>dd</i> , 2,9; 6,7)	116,2	5; 6; 9; 14
8	Cq	-	145,4	-
9	CH	2,15 ( <i>m</i> )	48,2	4; 5; 7; 8
10	Cq	-	35,0	-
11	CH <sub>2</sub>	**	16,8	**
12	CH <sub>2</sub>	**	32,4	**
13	Cq	-	37,73	-
14	Cq	-	41,3	-
15	CH <sub>2</sub>	**	28,9	**
16	CH <sub>2</sub>	**	31,5	**
17	Cq	-	32,0	-
18	CH	1,31 ( <i>m</i> )	54,9	19; 20; 29; 30
19	CH	**	35,3	**
20	CH	-	32,0 (38,0)**	-
21	CH <sub>2</sub>	-	29,2	-
22	CH <sub>2</sub>	**	37,69	**
23	CH <sub>3</sub>	0,93 ( <i>s</i> )	15,8	3; 4; 5; 24
24	CH <sub>3</sub>	0,85 ( <i>s</i> )	27,5	3; 4; 5; 23
25	CH <sub>3</sub>	0,76 ( <i>s</i> )	13,0	1; 5; 9; 10
26	CH <sub>3</sub>	0,99 ( <i>s</i> )	23,7	8; 13; 14; 15
27	CH <sub>3</sub>	0,94 ( <i>s</i> )	22,6	12; 13; 14; 18
28	CH <sub>3</sub>	1,04 ( <i>s</i> )	38,0 (32,0)**	16; 18; 22
29	CH <sub>3</sub>	1,05 ( <i>d</i> , 7,2)	25,6	18; 19; 20
30	CH <sub>3</sub>	0,91 ( <i>d</i> , 5,9)	22,5	19; 20; 21
<u>CH<sub>3</sub>CO</u>	CH <sub>3</sub>	2,06 ( <i>s</i> )	21,3	C-O
<u>CH<sub>3</sub>CO</u>	Cq	-	171,0	<u>CH<sub>3</sub>CO</u>

\*Atribuições obtidas através de análise dos espectros HSQC e HMBC.

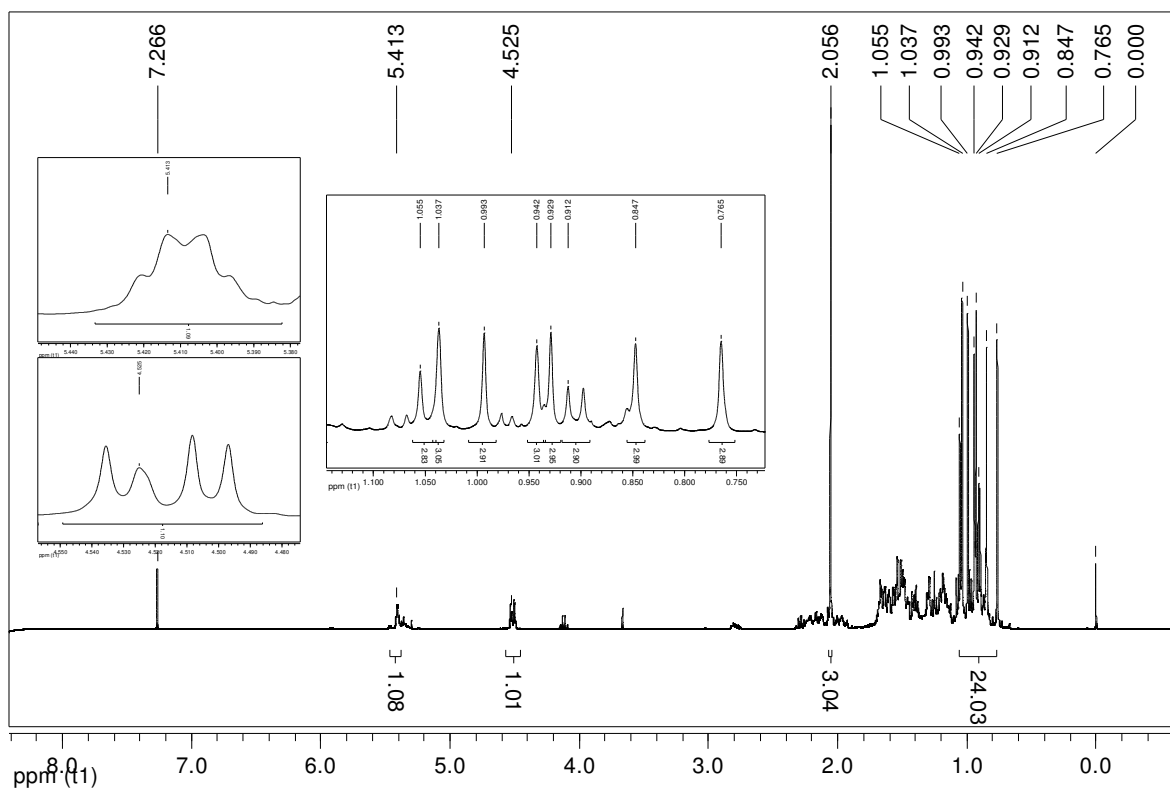
\*\*Sinais que podem estar trocados. A atribuição inequívoca não foi possível devido a grande sobreposição de sinais nos espectros de RMN 1D e 2D.

**Tabela 3** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para **GPC1B**.

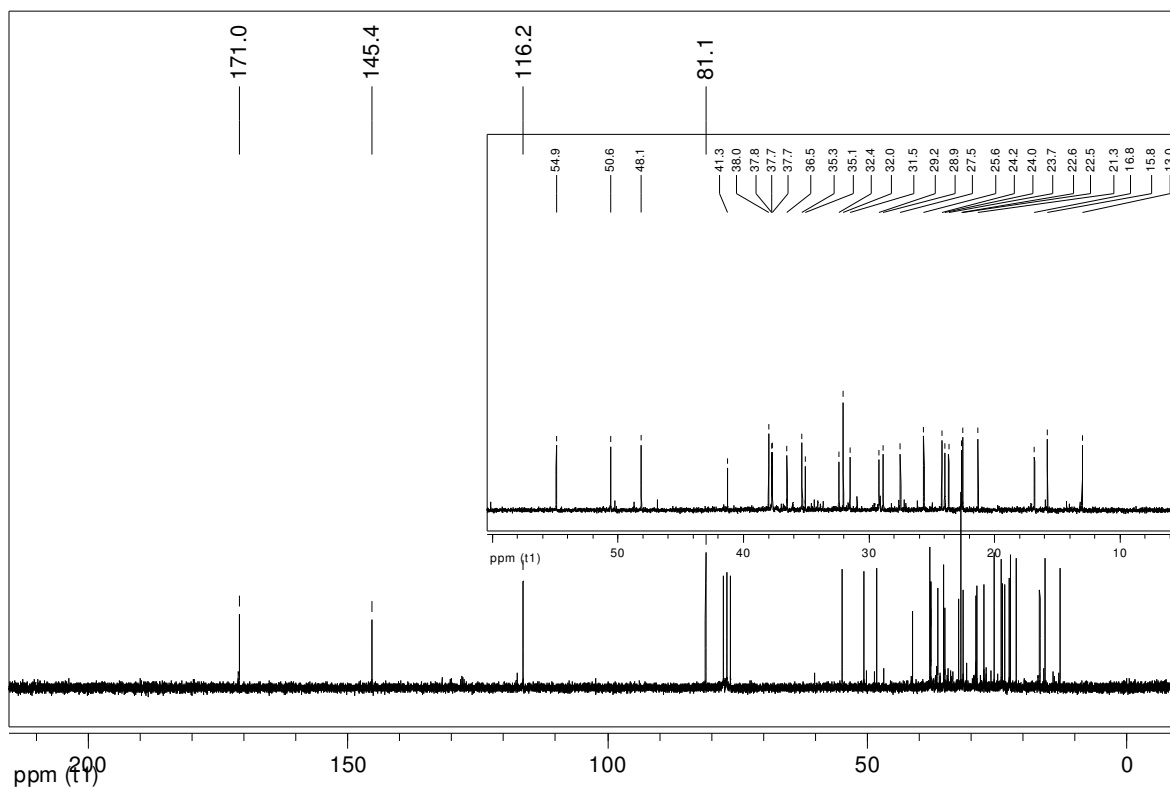
Posição	Tipo	$\delta_{\text{C}}^*$
1	$\text{CH}_2$	34,9
2	$\text{CH}_2$	38,3**
3	Cq	216,9
4	Cq	**
5	CH	52,1
6	$\text{CH}_2$	24,6**
7	CH	116,4
8	Cq	145,5
9	CH	47,8
10	Cq	35,4
11	$\text{CH}_2$	17,0
12	$\text{CH}_2$	32,4
13	Cq	**
14	Cq	41,4
15	$\text{CH}_2$	28,9
16	$\text{CH}_2$	31,5
17	Cq	**
18	CH	54,9
19	CH	35,3
20	CH	32,0**
21	$\text{CH}_2$	29,2
22	$\text{CH}_2$	37,7
23	$\text{CH}_3$	24,5**
24	$\text{CH}_3$	21,5**
25	$\text{CH}_3$	12,7
26	$\text{CH}_3$	22,6
27	$\text{CH}_3$	23,8
28	$\text{CH}_3$	38,0**
29	$\text{CH}_3$	25,7**
30	$\text{CH}_3$	22,5

\*Atribuições obtidas através de análise dos espectros HSQC e HMBC.

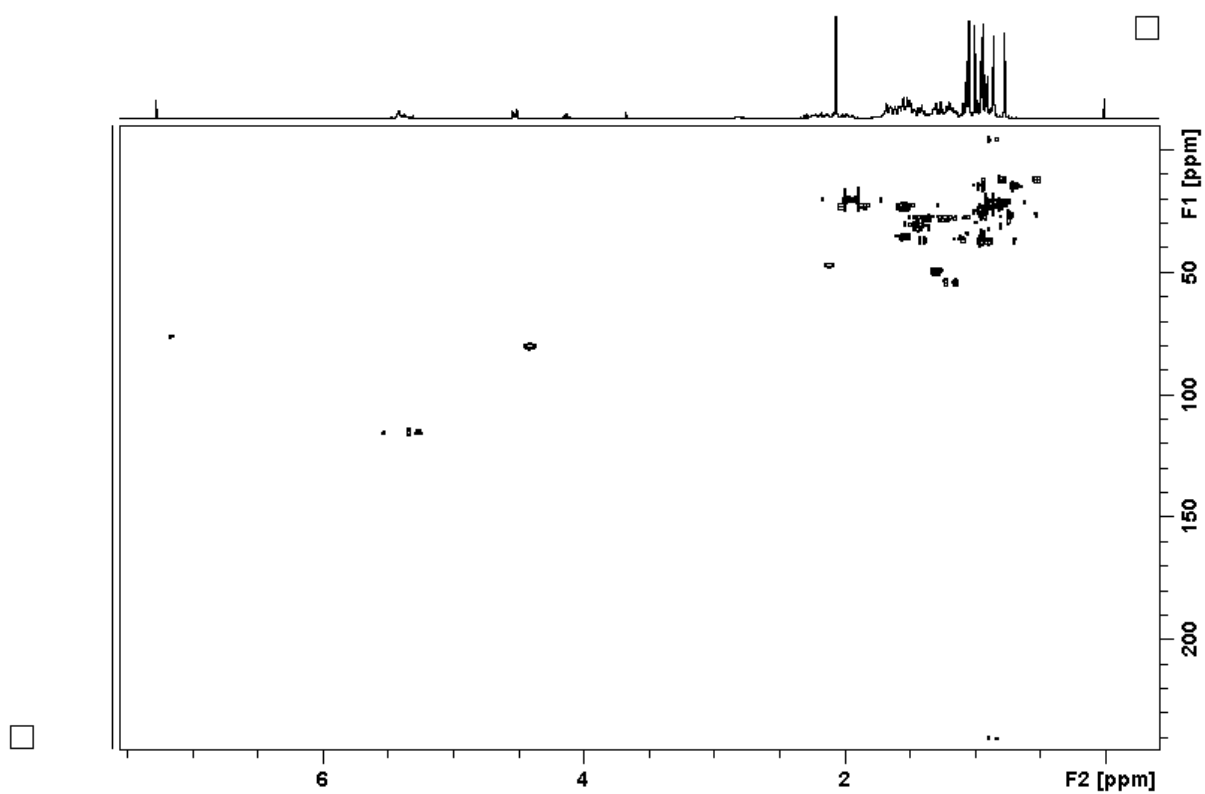
\*\*Sinais que podem estar trocados. A atribuição inequívoca não foi possível devido a grande sobreposição de sinais nos espectros de RMN 1D e 2D.



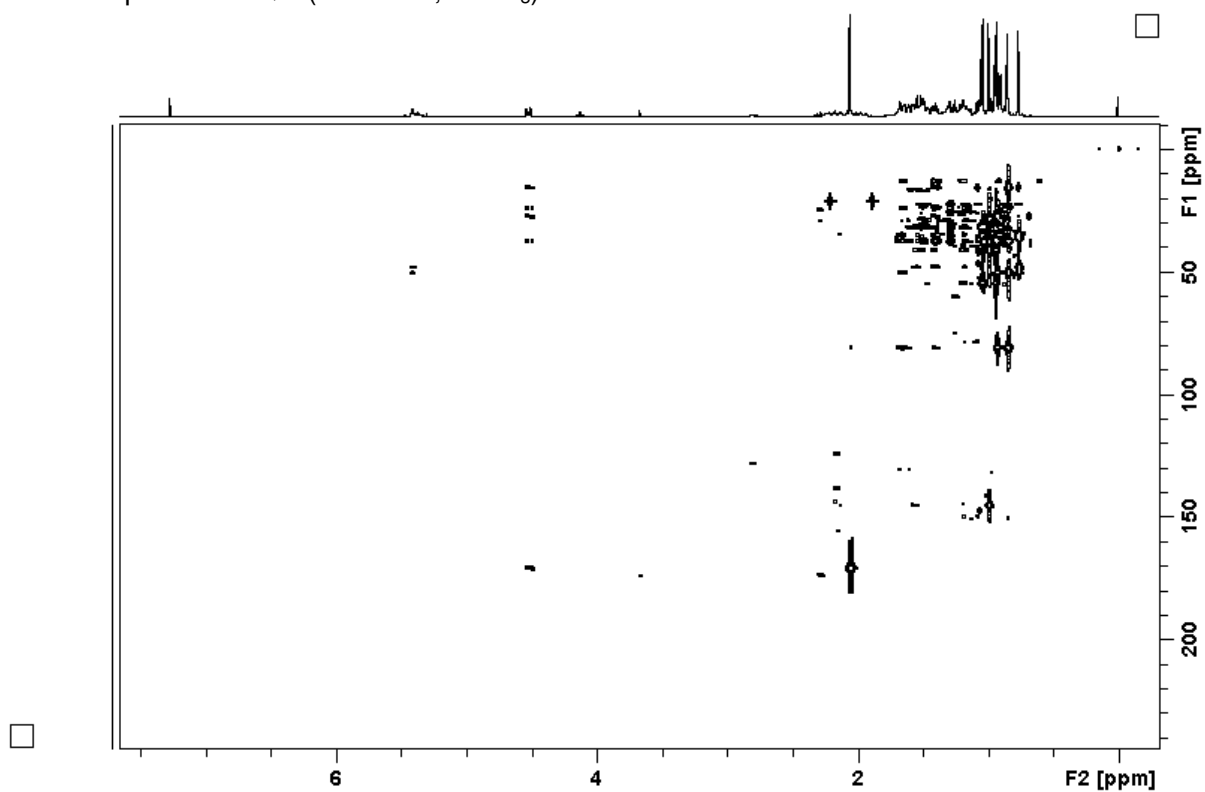
**E1** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC1A**.



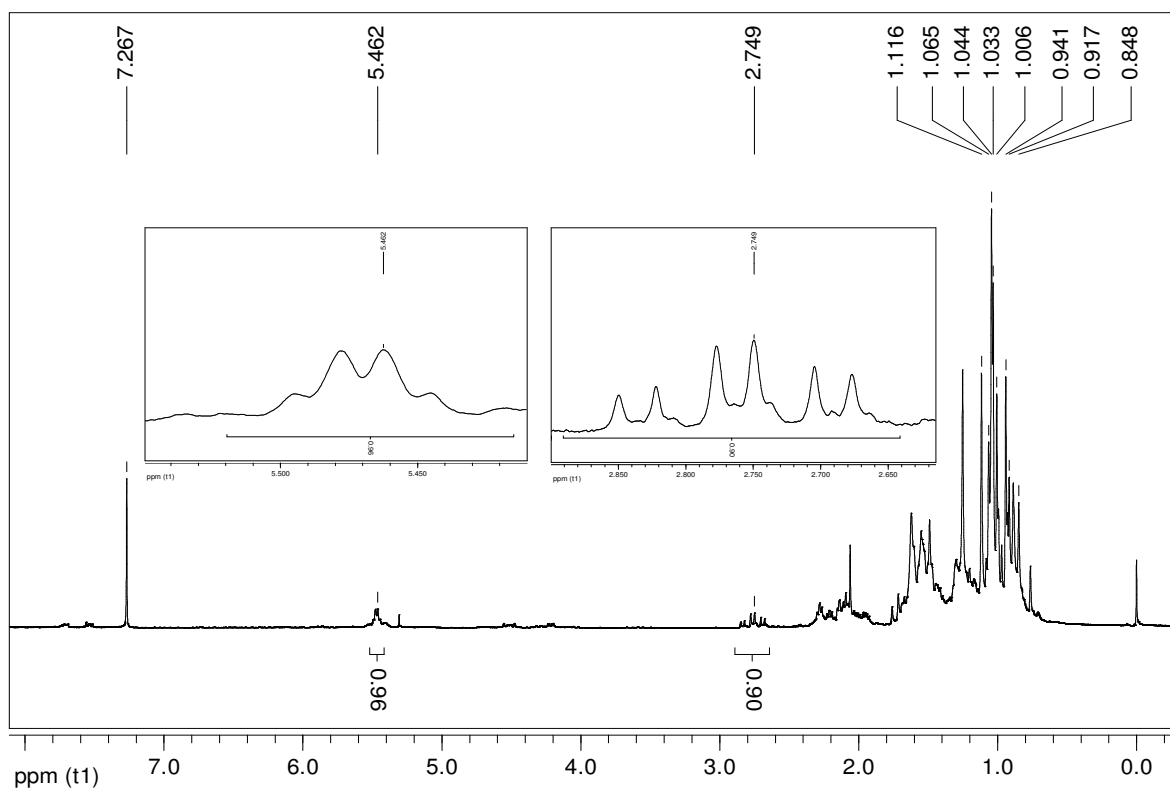
**E2** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC1A**.



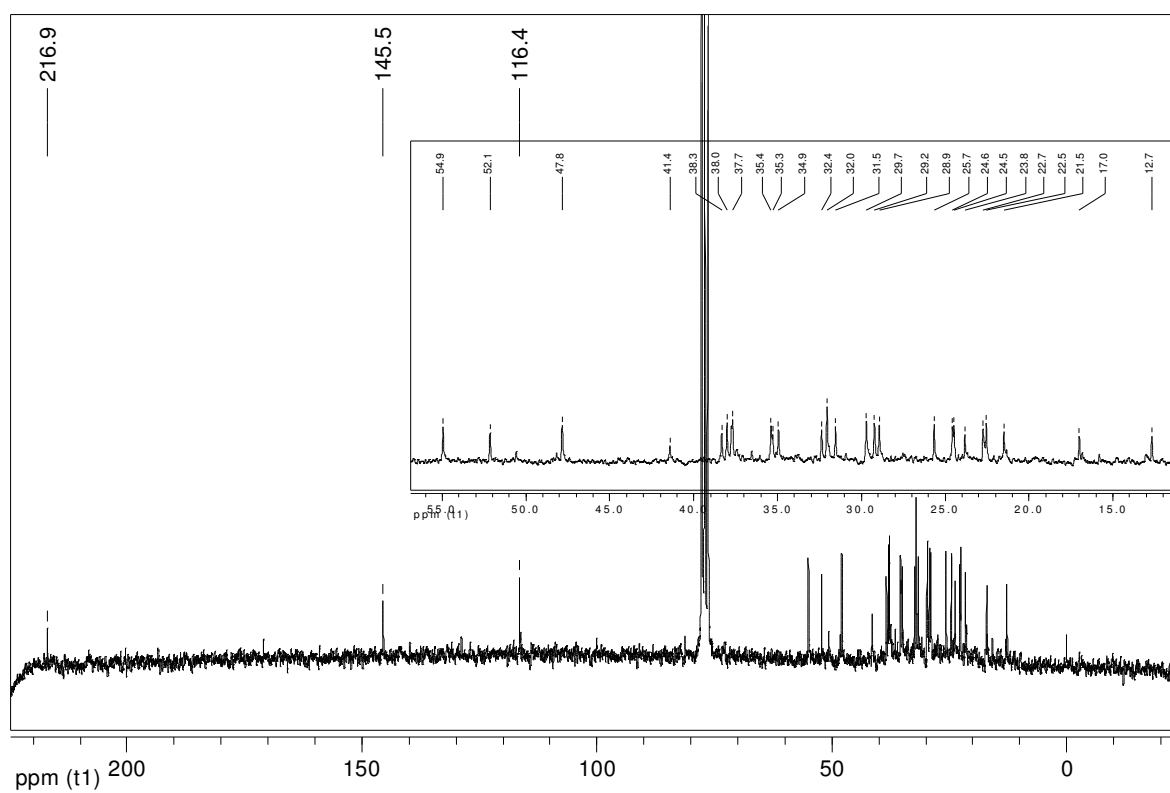
**E3** - Espectro HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **GPC1A**.



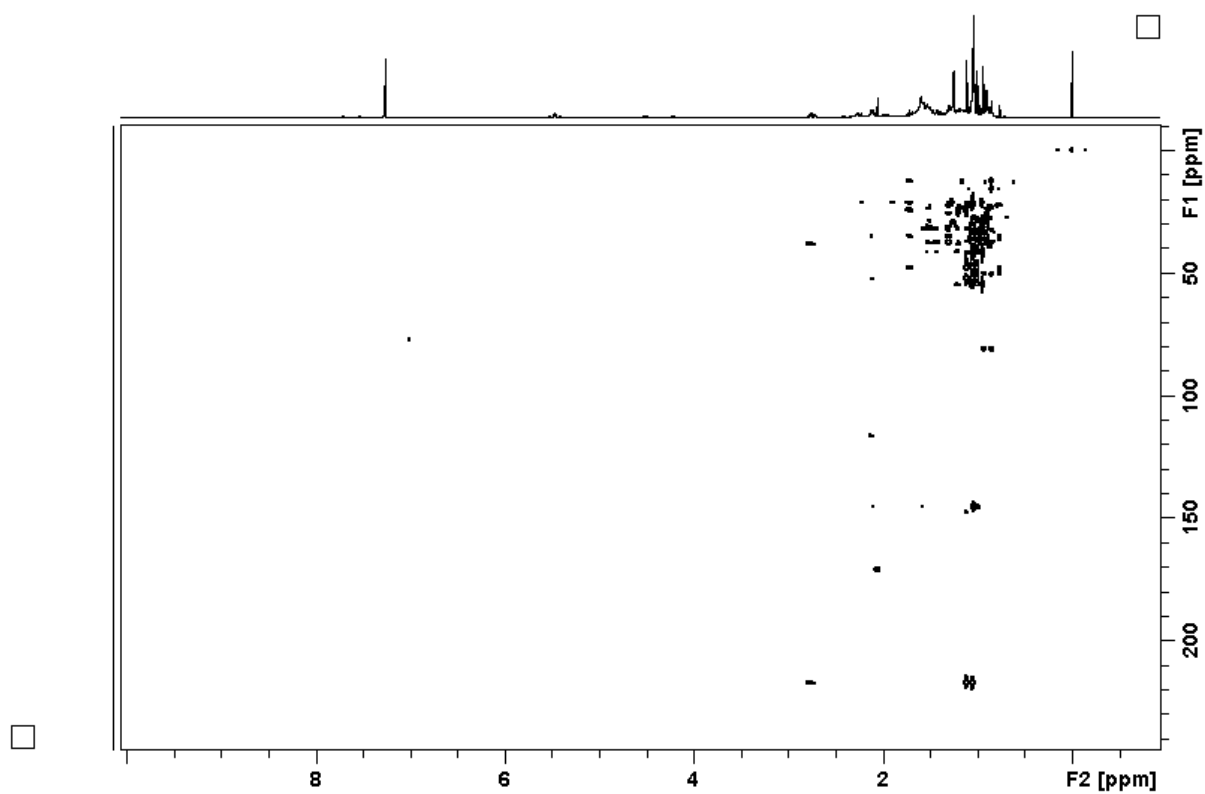
**E4** - Espectro HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **GPC1A**.



**E5** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC1B**.

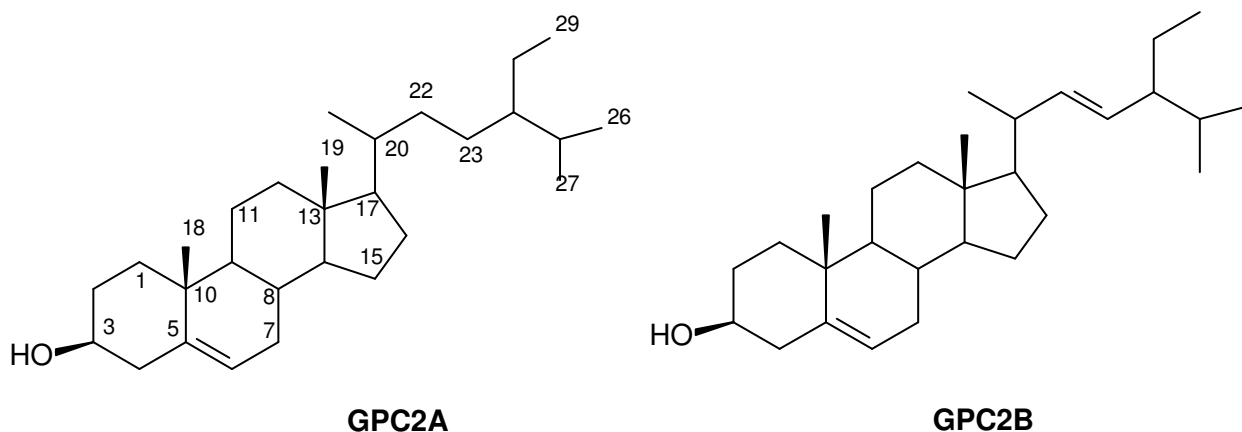


**E6** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC1B**.



**E7** - Espectro HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **GPC1B**.

### 3.3.2 - Identificação das substâncias GPC2A e GPC2B

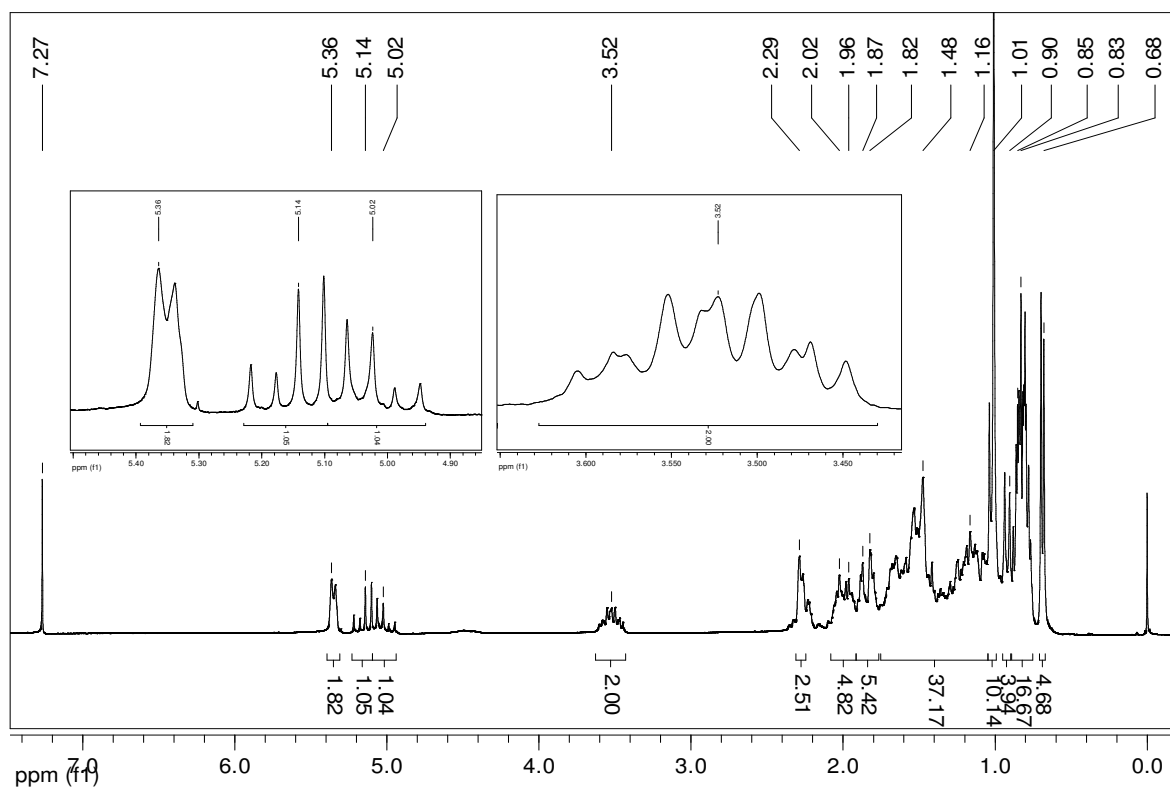


Os compostos **GPC2A** e **GPC2B** foram isolados como uma mistura sólida, branca com aspecto cristalino. O seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**E8**) apresentou sinais de diversos grupos metila na região de  $\delta$  0,68-1,04; característicos de triterpenos ou esteróides. Na região de hidrogênios olefínicos, foi observada a presença de um dubleto largo em  $\delta$  5,36, referente ao H-6, e dois duplo-dupletos em  $\delta$  5,02 e 5,14 (*dd*, 15,1; 8,0 Hz), referentes aos hidrogênios vinílicos H-22 e H-23. Estes sinais da dupla exocíclica confirma a presença do estigmasterol. Na região dos hidrogênios carbinólicos foi observado um multipletto centrado em  $\delta$  3,52, referente ao H-3 dos dois compostos.

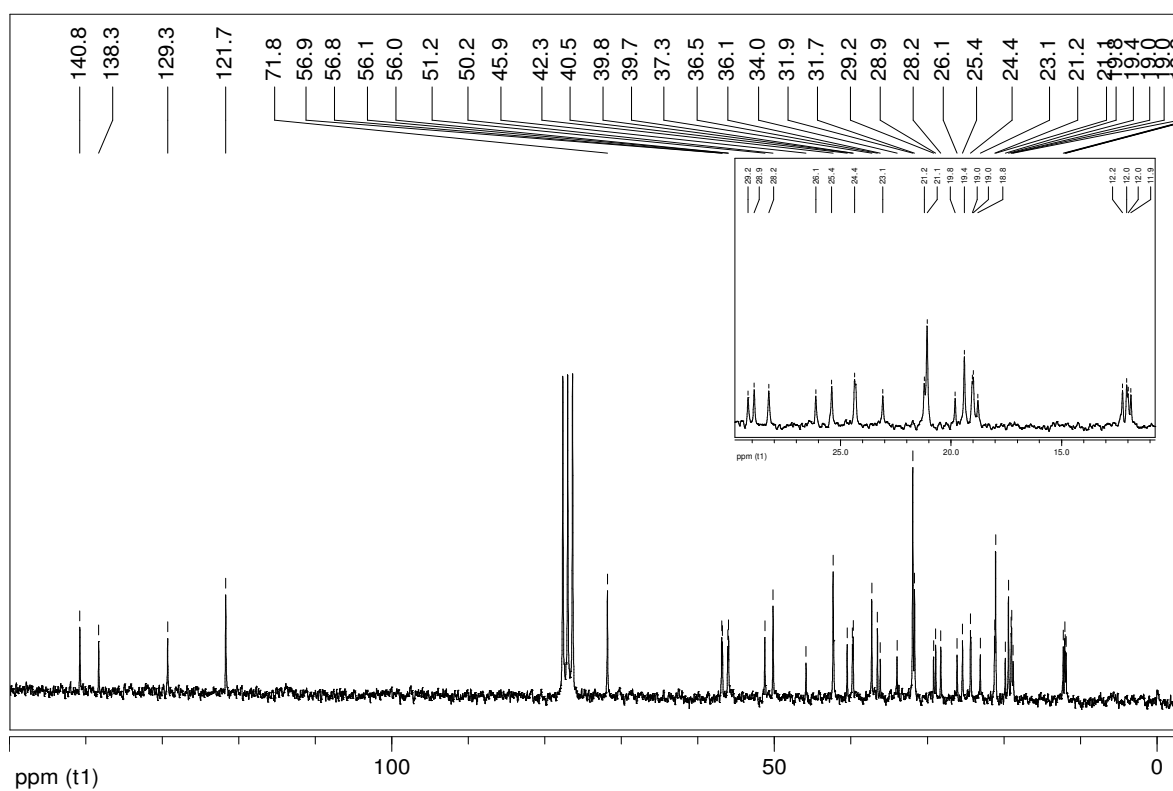
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**E9**) apresentou 40 sinais indicando a presença de uma mistura esteroidal. A comparação com dados da literatura (GOULART *et al.*, 1993; MACARI *et al.*, 1990; WRIGHT *et al.*, 1978) permitiu confirmar a presença dos esteróides sitosterol e estigmasterol. Na região olefínica, foi possível observar dois sinais em  $\delta$  140,8 e 121,7 referentes aos C-5 e C-6 pertencentes à dupla endocíclica presente nos dois compostos. A dupla exocíclica do estigmasterol foi confirmada pelos sinais em  $\delta$  138,3 e 129,3, referentes aos C-22 e C-23, respectivamente. Para o sitosterol, os C-22 e C-23 foram indicados pelos sinais em  $\delta$  34,0 e 26,1. Em adição, foi observado um sinal em  $\delta$  71,8 típico de carbono oxigenado, atribuído ao C-3 de ambos os compostos.

As percentagens aproximadas dos dois compostos constituintes na mistura foram calculadas com base na integração dos sinais correspondentes a H-6 (de ambos) e H-22 e H-23 (estigmasterol). Esta análise permitiu deduzir que a mistura contém 42,6 % de sitosterol e 57,4 % de estigmasterol.

Essa mistura é muito comum, ocorrendo em quase todos os extratos vegetais e neste trabalho foi isolada de várias frações.

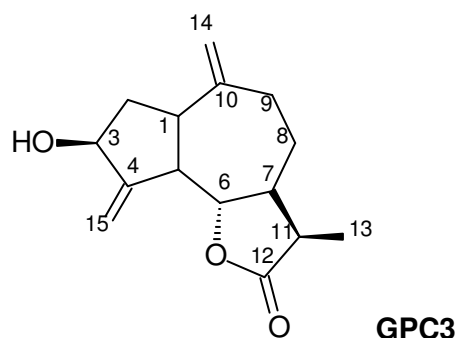


**E8** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura esteroidal **GPC2A+GPC2B**.



**E9** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura esteroidal **GPC2A+GPC2B**.

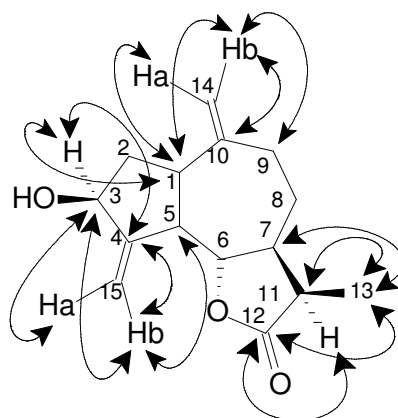
### 3.3.3 - Identificação da substância GPC3



A substância **GPC3** foi isolada como cristais em forma de agulha. O seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**E10**; **Tabela 4**) apresentou sinais característicos de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,40 (*t*, 1,9 Hz; 1H),  $\delta$  5,32 (*t*, 1,9 Hz; 1H),  $\delta$  4,96 (*s*l, 1H) e  $\delta$  4,93 (*s*l, 1H), hidrogênios carbinólicos em  $\delta$  4,54 (*tt*, 2,0 Hz; 7,6 Hz; 1H) e 4,14 (*t*, 9,7; 1H), vários multipletos referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos  $\text{sp}^3$  e um sinal intenso em  $\delta$  1,17 (*d*, 7,8 Hz; 1H) referente a um grupo metila ligado a carbono  $\text{sp}^3$ .

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (**E11**; **Tabela 4**) de **GPC3**, mostrou a presença de 15 carbonos, caracterizando um sesquiterpeno. Os sinais em  $\delta$  83,7 e 179,6 indicaram a presença de um anel lactônico. O sinal em  $\delta$  73,5 indicou a presença de um álcool secundário. Os demais sinais mostraram tratar-se de uma lactona sesquiterpênica com esqueleto guaiano (guaianolídeo).

Pela análise dos espectros HSQC e HMBC (**E12**; **E13**; **Tabela 4**), a estrutura foi confirmada através da observação das correlações mostradas abaixo. A estereoquímica relativa foi determinada através comparação com a literatura (BOHLMANN & CHEN, 1982). Assim, foi possível identificar **GPC3** como 11 $\alpha$ H,13-diidroزالuzanin C, uma lactona conhecida, isolada previamente de outras plantas como *Ainsliaea fragans* (Asteraceae) (BOHLMANN & CHEN, 1982; ANDO *et al.*, 1989), mas que está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Gochnatia*.

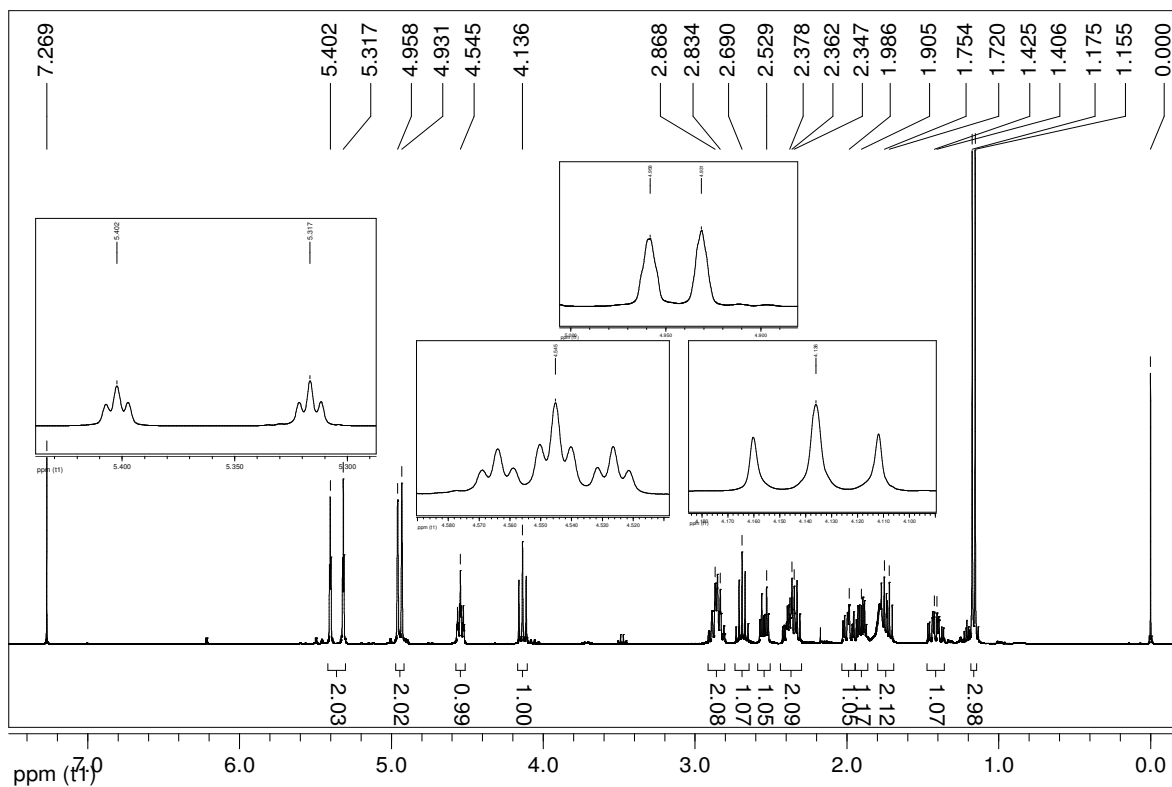


**Figura 21** – Principais correlações observadas no espectro HMBC de **GPC3**.

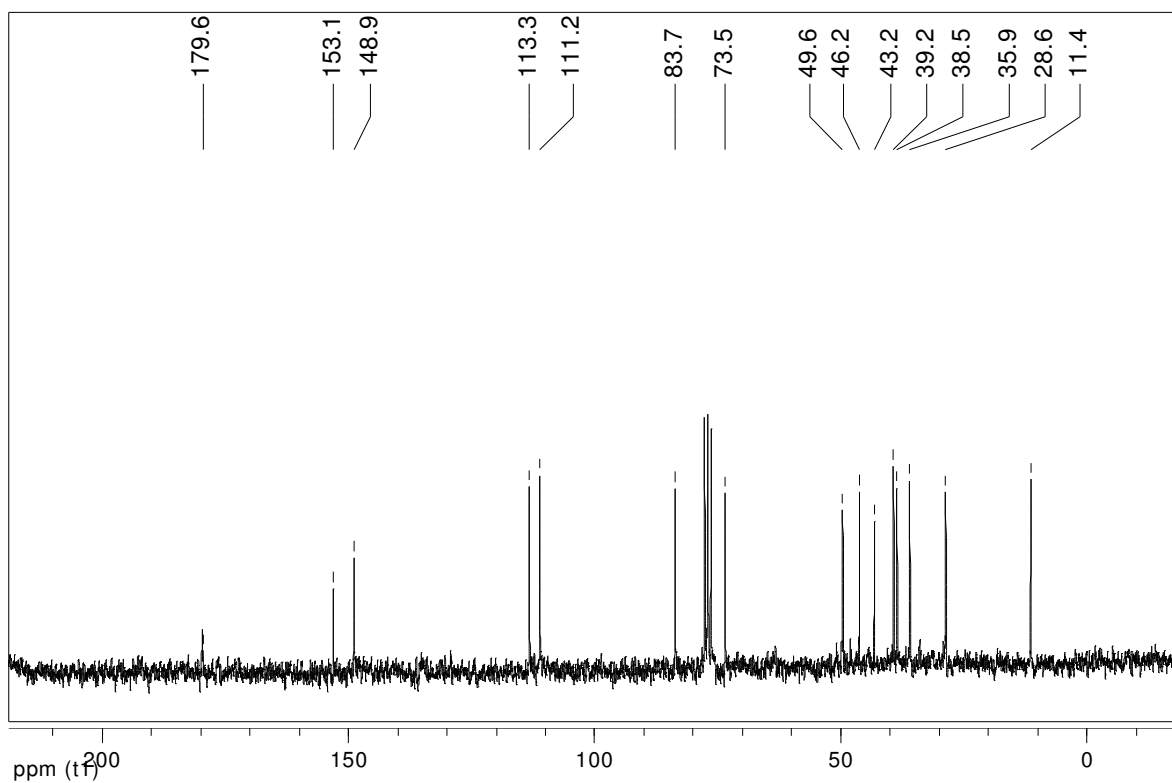
**Tabela 4** - Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (100 MHz), HSQC e HMBC (400 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para **GPC3**.

Posição	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}^*$	HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$
<b>1</b>	CH	2,89 ( <i>m</i> )	43,2	2; 3; 5; 6; 9; 10; 14
<b>2a</b> <b>2b</b>	$\text{CH}_2$	1,75 ( <i>m</i> ) 2,35 ( <i>m</i> )	38,5	1; 3; 4; 5; 10; 14
<b>3</b>	CH	4,54 ( <i>tt</i> ; 7,6; 2,0)	73,5	1; 2; 4; 5; 15
<b>4</b>	Cq	-	153,1	-
<b>5</b>	CH	2,83 ( <i>m</i> )	49,6	1; 2; 3; 4; 6; 7; 10
<b>6</b>	CH	4,14 ( <i>t</i> ; 9,6)	83,7	1; 4; 5; 7; 8; 11
<b>7</b>	CH	2,381 ( <i>m</i> )	46,2	5; 6; 8; 9; 11; 12; 13
<b>8a</b> <b>8b</b>	$\text{CH}_2$	1,42 ( <i>m</i> ) 1,86 ( <i>m</i> )	28,6	6; 7; 9; 10; 11
<b>9a</b> <b>9b</b>	$\text{CH}_2$	1,97 ( <i>m</i> ) 2,54 ( <i>m</i> )	35,9	1; 7; 8; 10; 11; 14
<b>10</b>	Cq	-	148,9	-
<b>11</b>	CH	2,69 ( <i>quint.</i> , 8,0; 7,9)	39,2	6; 7; 8; 12; 13
<b>12</b>	Cq	-	179,6	-
<b>13</b>	$\text{CH}_3$	1,17 ( <i>d</i> , 7,8)	11,4	7; 8; 11; 12
<b>14a</b> <b>14b</b>	$\text{CH}_2$	4,93 ( <i>s</i> ) 4,96 ( <i>s</i> )	113,2	1; 5; 9; 10
<b>15a</b> <b>15b</b>	$\text{CH}_2$	5,32 ( <i>t</i> , 1,9) 5,40 ( <i>t</i> , 1,9)	111,2	3; 4; 5; 6

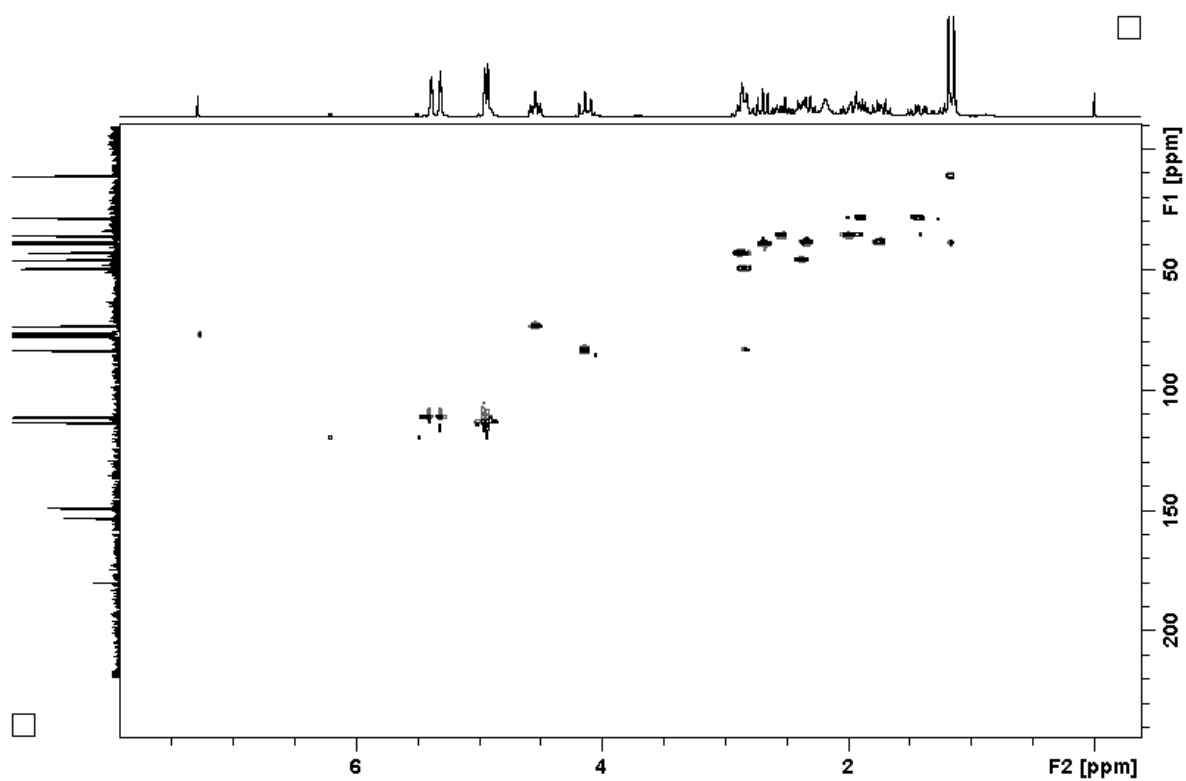
\*Atribuições inequívocas obtidas através de análise dos espectros HSQC e HMBC.



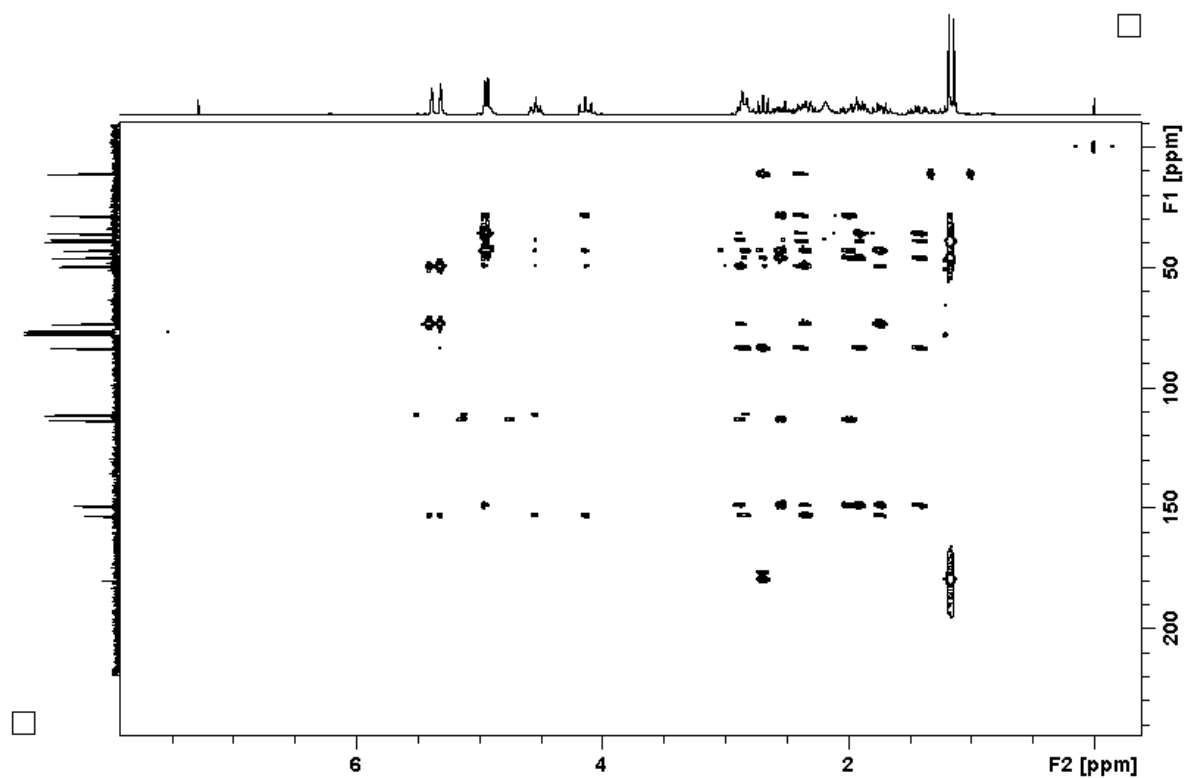
**E10** - Espectro RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC3**.



**E11** - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC3**.

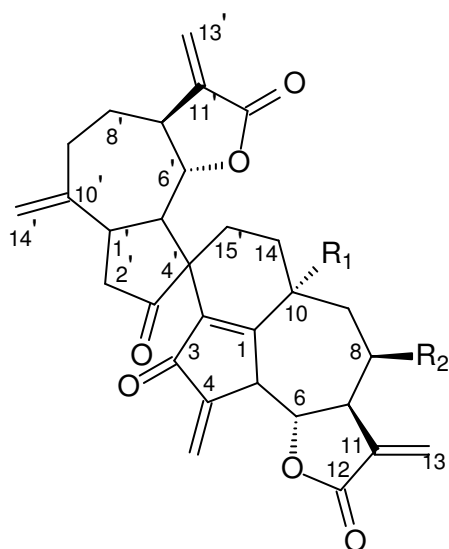


E12 - Espectro HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de GPC3.



E13 - Espectro HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de GPC3.

### 3.3.4 - Identificação das substâncias GPC4, GPC5, GPC6 e GPC7



	GPC4	GPC5	GPC6	GPC7
<b>R<sub>1</sub></b>	OH	H	OH	H
<b>R<sub>2</sub></b>	H	OH	OH	H

As substâncias **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7** foram isoladas como sólidos brancos. Os seus espectros de RMN <sup>1</sup>H foram muito semelhantes entre si, mostrando tratar-se de substâncias com o mesmo esqueleto básico. Como ilustração, está apresentada a sobreposição dos espectros de RMN <sup>1</sup>H de **GPC4** a **GPC7** (**E14**). Observa-se a presença de sinais de vários hidrogênios olefínicos na região de  $\delta$  6,30-4,75 (**E15**; **Tabela 5**), de hidrogênios carbinólicos em  $\delta$  4,20-3,75 (**E16**; **Tabela 5**), e diversos hidrogênios metínicos e metilênicos, mas não metílicos.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H dessas substâncias apresentaram algumas diferenças nos deslocamentos químicos em algumas regiões. Em particular, na região de hidrogênios olefínicos (**E15**; **Tabela 5**), a presença da hidroxila ligada no C-8 nas substâncias **GPC5** e **GPC6** leva a uma desproteção no deslocamento do hidrogênio H-13a. A região carbinólica (**E16**; **Tabela 5**), da substância **GPC7** apresenta dois grupos de sinais bem definidos em 3,91 (*dd*, 10,4; 9,4) e 4,20 (*dd*, 9,9; 9,0) atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-6', respectivamente. Para as demais substâncias, essa região é um pouco mais complexa. É possível observar um sinal adicional nesta região, atribuído ao H-8, em  $\delta$  4,24 para **GPC5** e em  $\delta$  4,04 para **GPC6**, em função da presença da hidroxila na posição C-8.

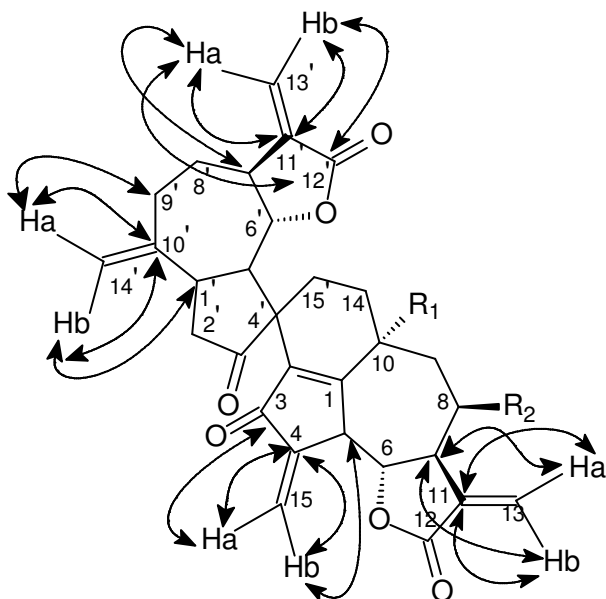
Os espectros RMN <sup>13</sup>C totalmente desacoplado das substâncias **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7** (**E17**; **Tabela 6**) também se mostraram muito semelhantes.

A substância **GPC7** não apresenta substituições nas posições C-8 e C-10 e foi utilizada como uma estrutura de referência na identificação das demais substâncias com o mesmo esqueleto. É importante ressaltar que as regiões olefínicas (**E18**) e carbinólicas (**E19**)

apresentaram algumas modificações nos deslocamentos químicos de alguns átomos de carbono, bem como as diferenças nos sinais de hidrogênios. Isto se deve à presença das hidroxilas nas posições C-8 e C-10 para estes compostos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**E17**) da substância **GPC7** mostrou 30 sinais, dos quais dois podem ser atribuídos a carbonos oxigenados ( $\delta$  82,6 e 84,0), dois a grupos carbonila de cetona ( $\delta$  193,8 e 220,4) e dois a grupos carbonila de éster ( $\delta$  169,4 e 169,7). Observa-se ainda, mais 10 carbonos  $\text{sp}^2$ , dentre os quais dois são referentes a uma ligação dupla endocíclica ( $\delta$  142,1 e 170,9) e oito são referentes a ligações duplas exocíclicas ( $\delta$  114,0; 120,7; 120,8; 121,5; 138,6; 139,3; 141,9 e 150,6). Por outro lado, a substância **GPC6** apresenta duas hidroxilas nas posições C-8 e C-10, o que justifica os dois sinais adicionais na região de carbonos oxigenados ( $\delta$  70,8 e 71,8) (**E19**). As substâncias **GPC4** e **GPC5** apresentam uma hidroxila nas posições C-10 e C-8, respectivamente; o que justifica um sinal adicional na região de carbonos oxigenados ( $\delta$  71,1 e 70,5, respectivamente) (**E19**).

Pela análise dos espectros HSQC e HMBC de **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**, as estruturas foram confirmadas através da observação das correlações mostradas abaixo.



**Figura 22** – Principais correlações observadas nos espectros HMBC de **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**.

Esses dados são compatíveis com o esqueleto de uma lactona sesquiterpêica dimérica. Várias substâncias deste tipo foram previamente isoladas de *Gochnatia polymorpha*, *G. hypoleuca* e *G. paniculata* (BOHLMANN *et al.*, 1983; 1986). Essas substâncias diferem entre si pelo padrão de substituição e pela estereoquímica. Através de análise dos espectros de RMN 1D e 2D e comparação com dados publicados (BOHLMANN *et al.*, 1986), **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7** foram identificadas como gochnatiolido A (**GPC4**), 8-hidroxi-10-

desoxigochnatiolido A (**GPC5**), 8-hidroxiogochinatiolido A (**GPC6**) e 10-desoxigochnatiolido A (**GPC7**). Essas lactonas diméricas foram encontradas nos dois extratos analisados, mas em quantidades diferentes. No primeiro material eram constituintes minoritários e foram isolados com menor grau de pureza.

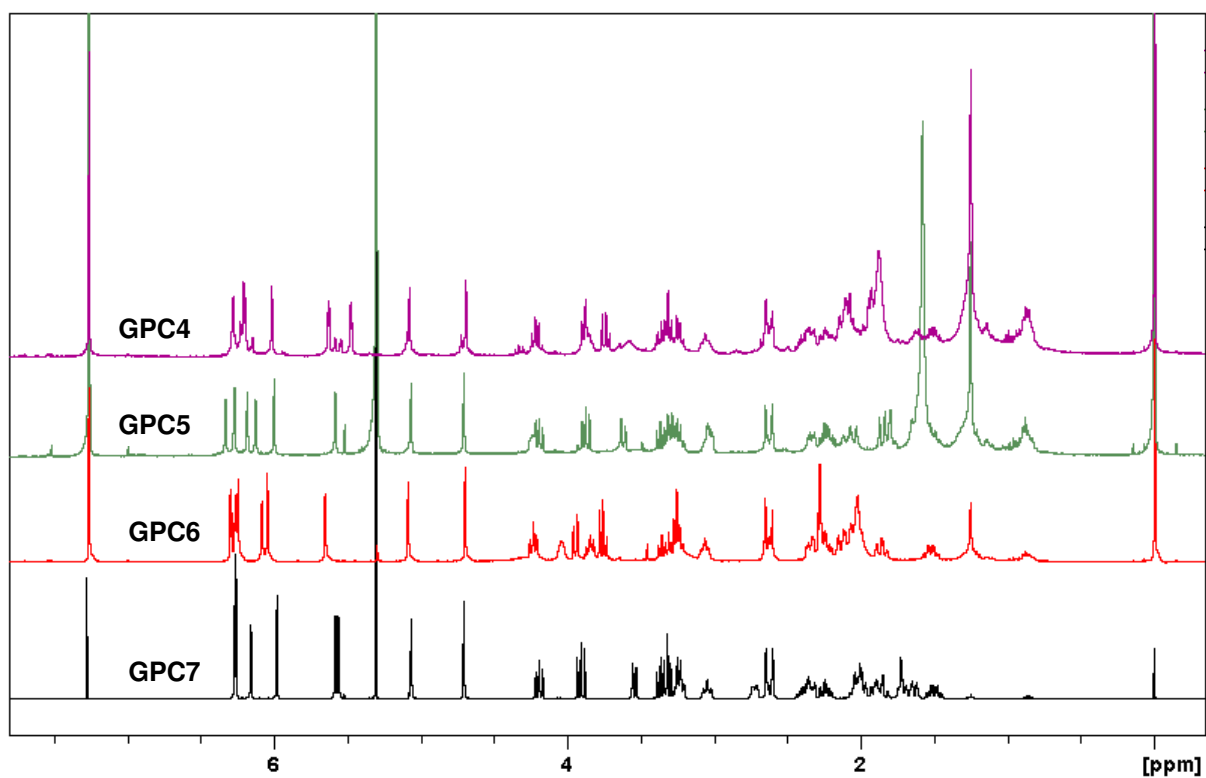
**Tabela 5** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**.

Posição	GPC4	GPC5	GPC6	GPC7
	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; $J$ em Hz)
<b>6</b>	3,74 ( <i>t</i> , 9,6)	3,88 ( <i>dd</i> , 10,4; 9,6)	3,76 ( <i>t</i> , 9,9)	3,91 ( <i>dd</i> , 10,4; 9,4)
<b>6'</b>	4,22 ( <i>t</i> , 9,5)	4,19 ( <i>dd</i> , 9,8; 9,2)	4,25 ( <i>t</i> , 9,6)	4,20 ( <i>dd</i> , 9,9; 9,0)
<b>7</b>	3,88 ( <i>dt</i> , 10,4; 1,1)	3,25 ( <i>m</i> )	3,94 ( <i>dt</i> , 10,3; 1,2)	3,24 ( <i>m</i> )
<b>7'</b>	3,06 ( <i>m</i> )	3,05 ( <i>m</i> )	3,07 ( <i>m</i> )	3,05 ( <i>m</i> )
<b>13a</b>	5,48 ( <i>d</i> , 3,4)	6,12 ( <i>d</i> , 3,2)	6,08 ( <i>d</i> , 3,3)	5,56 ( <i>d</i> , 3,2)
<b>13b</b>	6,20 ( <i>d</i> , 3,5)	6,33 ( <i>d</i> , 3,3)	6,26 ( <i>d</i> , 3,4)	6,26 ( <i>d</i> , 3,2)
<b>13'a</b>	5,63 ( <i>d</i> , 3,1)	5,58 ( <i>d</i> , 3,1)	5,65 ( <i>d</i> , 3,2)	5,59 ( <i>d</i> , 3,1)
<b>13'b</b>	6,28 ( <i>d</i> , 3,1)	6,27 ( <i>d</i> , 3,1)	6,30 ( <i>d</i> , 3,2)	6,26 ( <i>d</i> , 3,1)
<b>14'a</b>	5,08 ( <i>s</i> )	5,07 ( <i>s</i> )	5,09 ( <i>s</i> )	5,07 ( <i>s</i> )
<b>14'b</b>	4,70 ( <i>s</i> )	4,71 ( <i>s</i> )	4,70 ( <i>s</i> )	4,71 ( <i>s</i> )
<b>15a</b>	6,02 ( <i>t</i> , 1,0)	6,00 ( <i>t</i> , 1,0)	6,05 ( <i>t</i> , 1,1)	5,98 ( <i>dd</i> , 1,6; 1,1)
<b>15b</b>	6,21 ( <i>t</i> , 1,0)	6,19 ( <i>t</i> , 1,0)	6,25 ( <i>t</i> , 1,1)	6,16 ( <i>dd</i> , 1,6; 1,1)

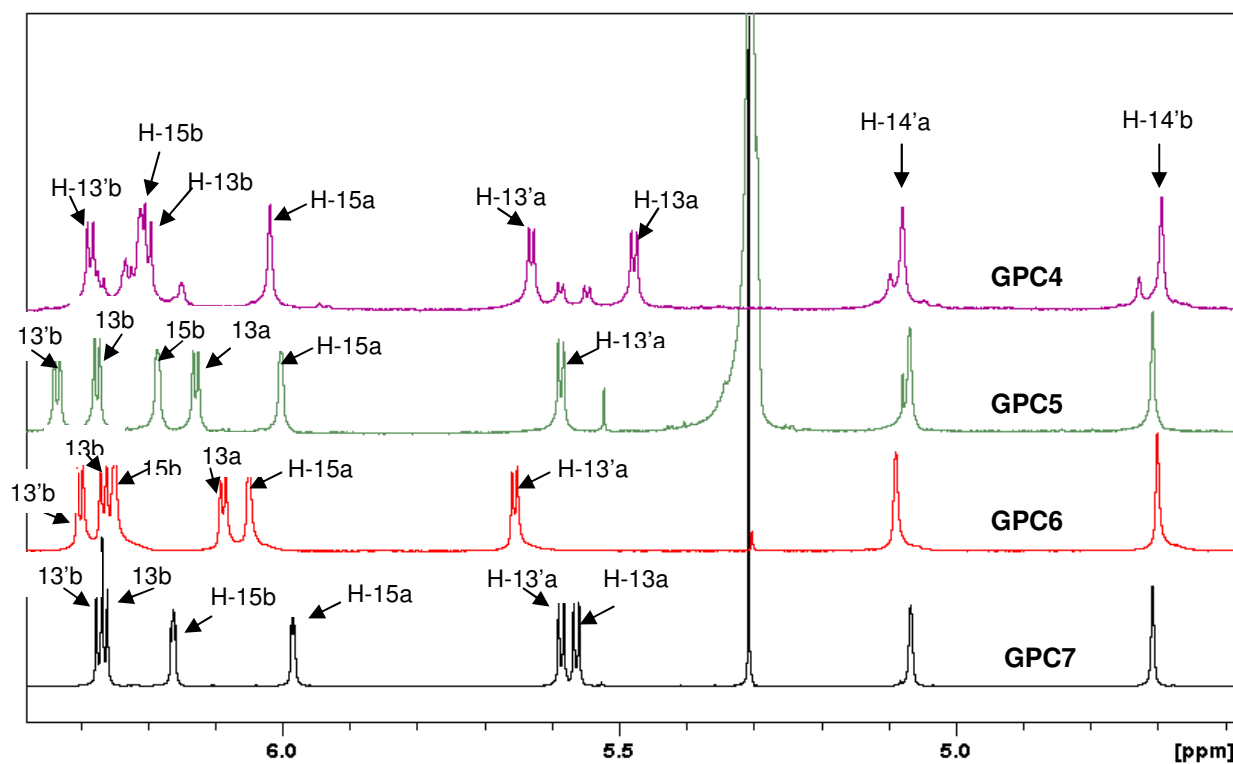
**Tabela 6** - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**.

Posição	GPC4	GPC5	GPC6	GPC7
	$\delta_{\text{C}}^*$	$\delta_{\text{C}}^*$	$\delta_{\text{C}}^*$	$\delta_{\text{C}}^*$
1	170.6	170.8	169.7	171.1
2	143.2	141.7	142.8	142.1
3	194.1	193.6	193.9	193.9
4	142.0	141.4	141.2	142.0
5	47.3	50.6	48.4	50.9
6	83.6	78.5	79.3	82.7
7	43.4	51.4	53.0	43.7
8	35.3	70.5	70.8	25.3
9	38.4	44.1	46.2	33.3
10	71.1	29.3	71.8	31.1
11	140.3	137.7	138.9	139.3
12	169.9	169.1	169.5	169.4
13	119.6	122.9	123.0	120.6
14	28.3	27.9	38.4	27.7
15	122.5	121.4	122.8	121.0
1'	39.9	40,0	39.9	40.0
2'	44.9	45.1	44.9	45.1
3'	219.7	220.6	219.7	220.4
4'	51.0	50.8	50.9	51.0
5'	49.1	49.5	49.2	49.5
6'	84.4	84.1	84.5	84.1
7'	43.5	43.5	43.6	43.6
8'	31.9	31.9	32.0	32.0
9'	39.4	39.5	39.4	39.5
10'	150.1	150.5	150.1	150.6
11'	138.1	138.5	138.0	138.7
12'	170.4	169.8	171.0	169.7
13'	121.8	121.7	121.7	121.6
14'	114.1	114.0	114.3	114.0
15'	23.0	26.3	28.0	26.1

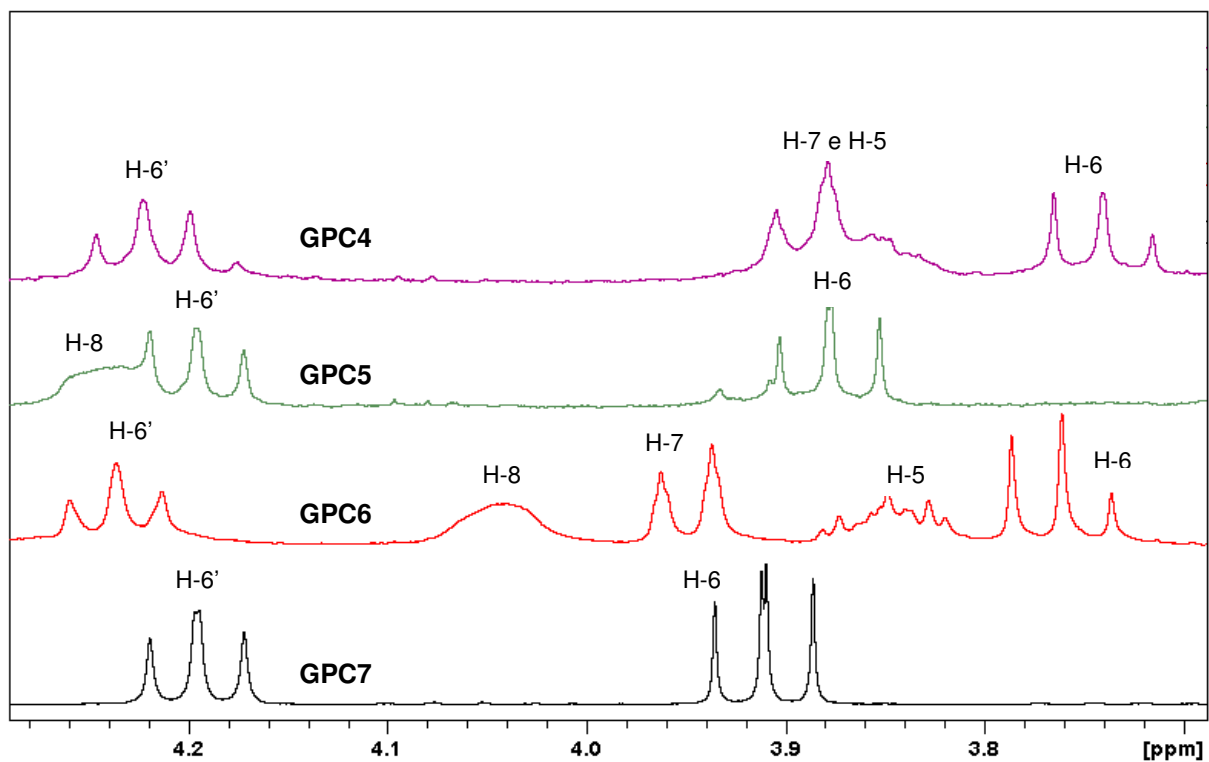
\*Atribuições inequívocas obtidas através de análise dos espectros HSQC e HMBC.



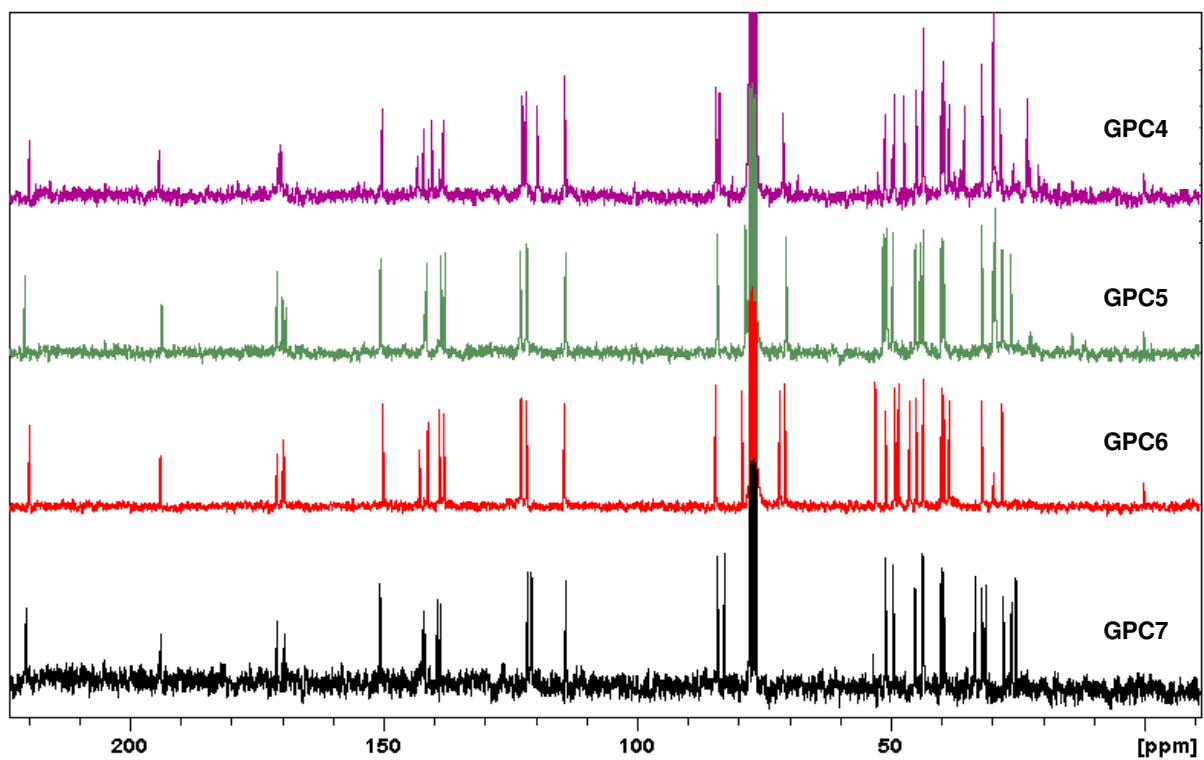
**E14** - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**.



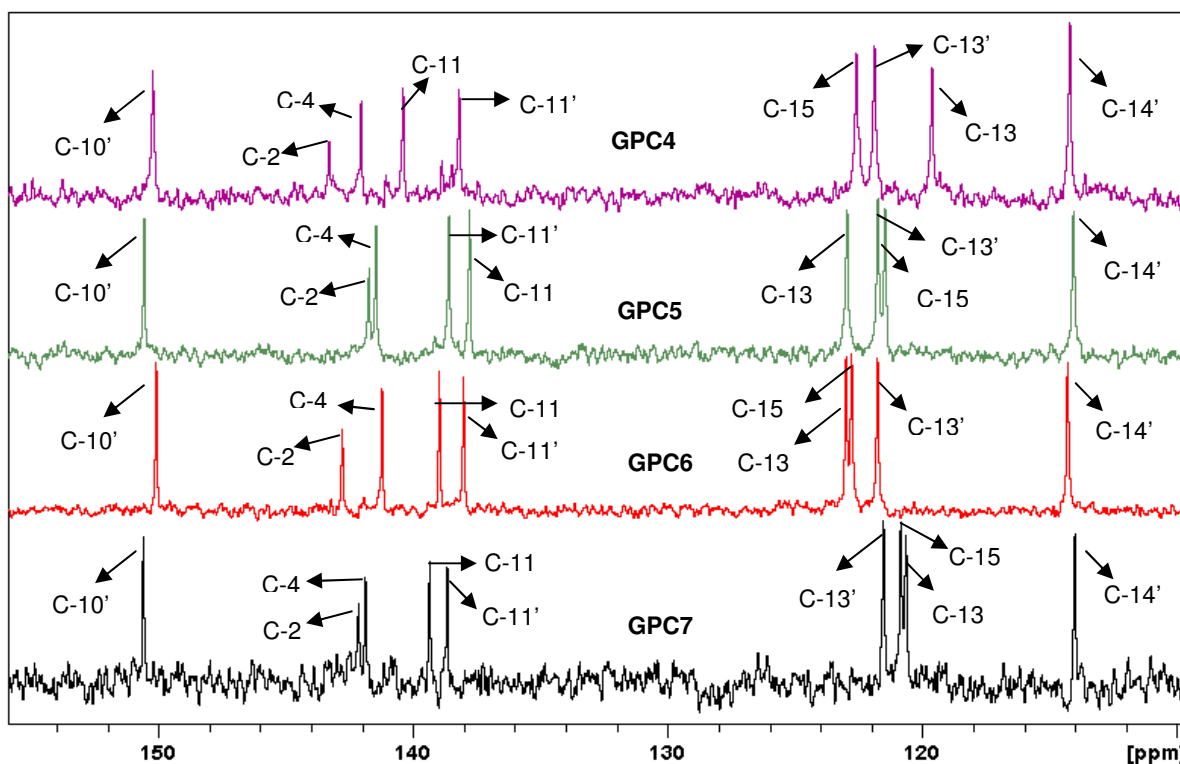
**E15** – Ampliação da região olefínica dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**.



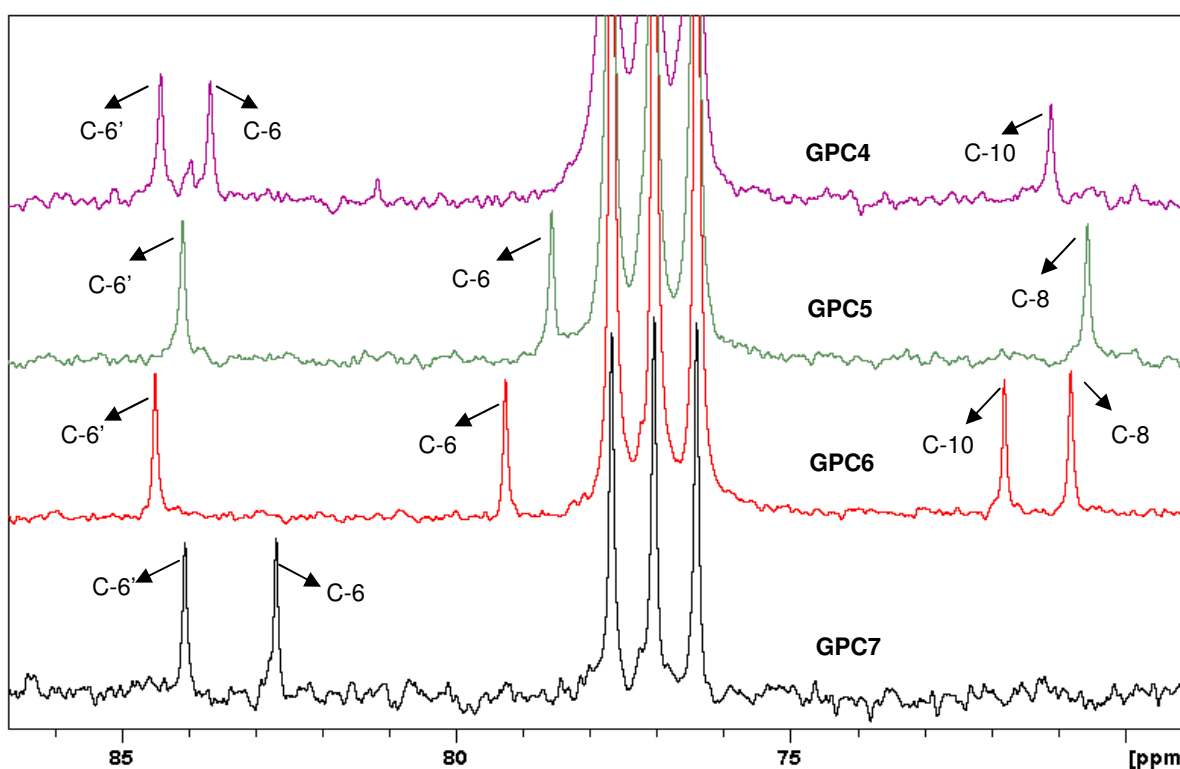
**E16** – Ampliação da região de hidrogênios carbinólicos dos espectros RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**.



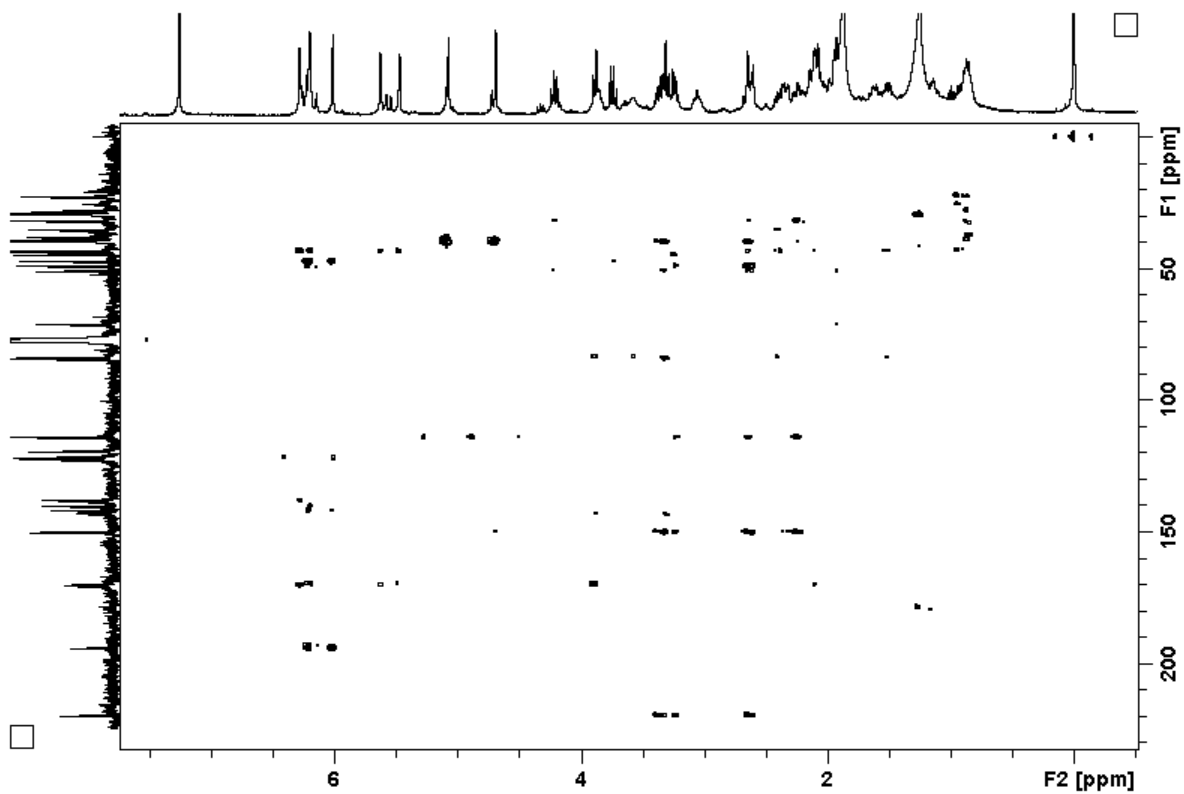
**E17** - Sobreposição dos espectros RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**.



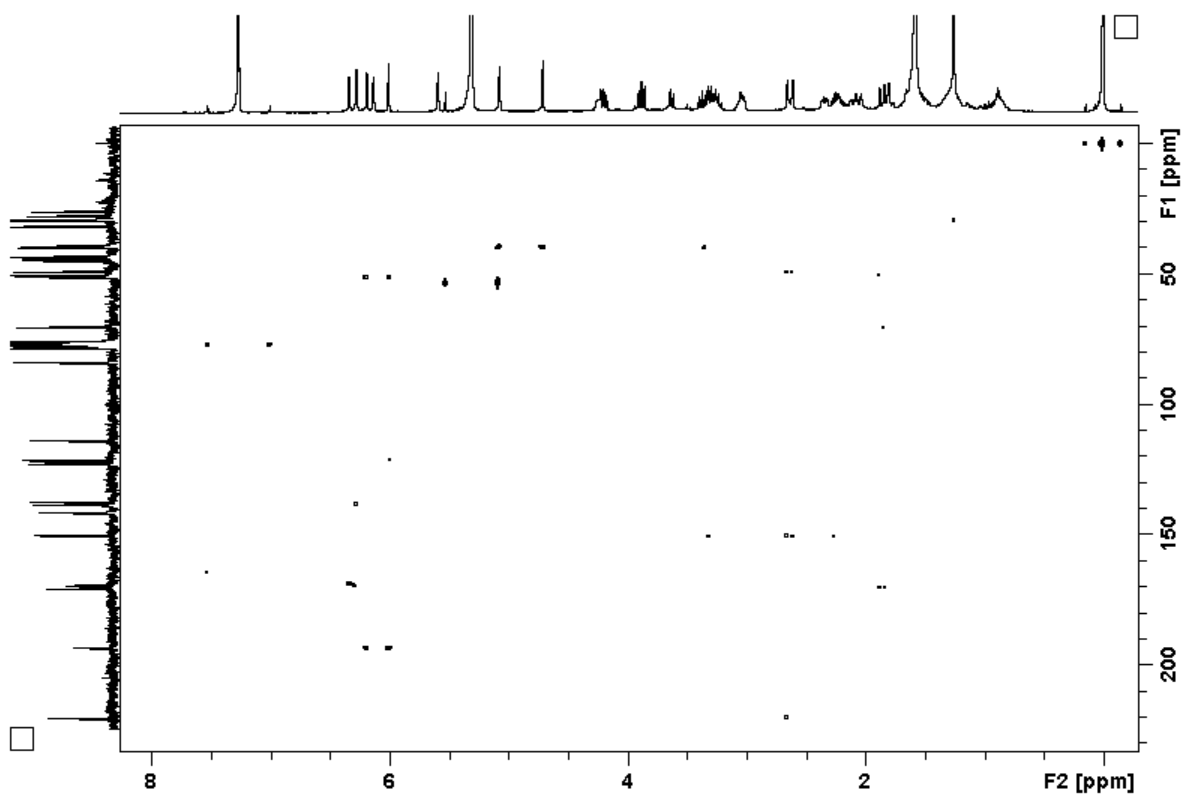
**E18** – Ampliação da região olefínica dos espectros RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**.



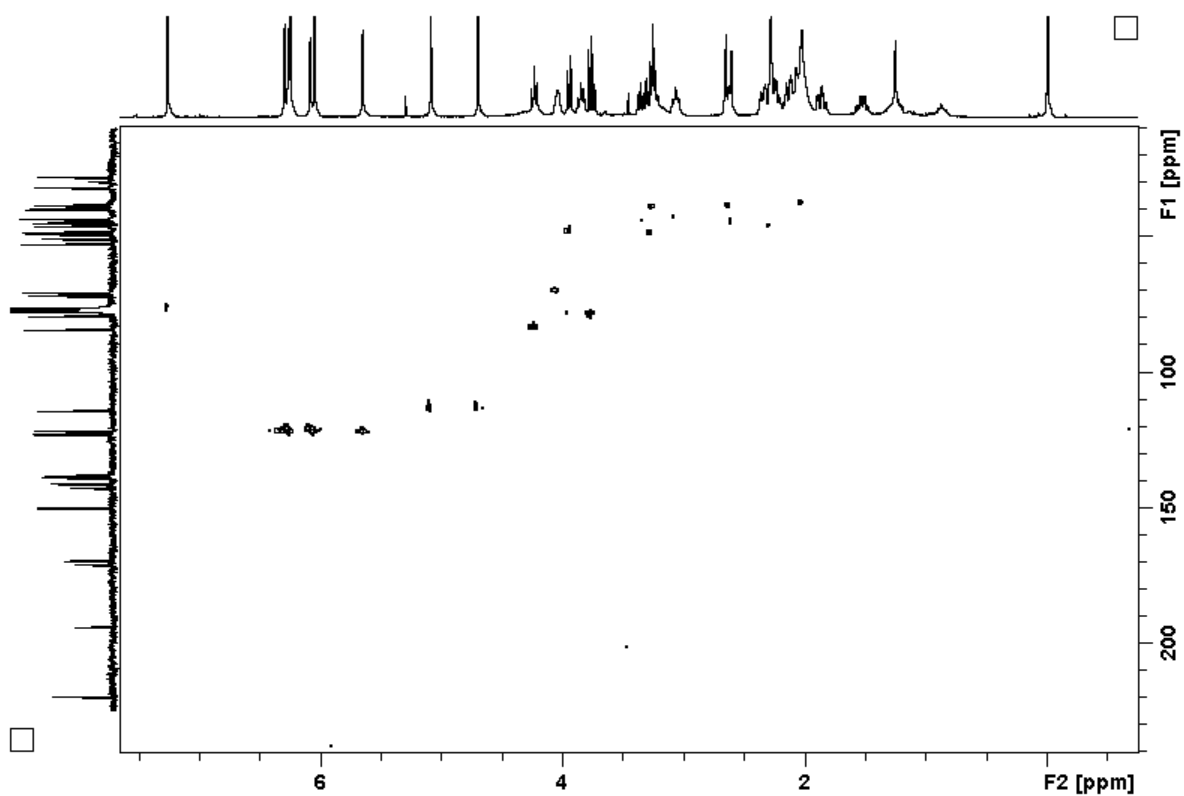
**E19** – Ampliação da região de carbonos oxigenados dos espectros RMN  $^{13}\text{C}$  (50MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC4**, **GPC5**, **GPC6** e **GPC7**.



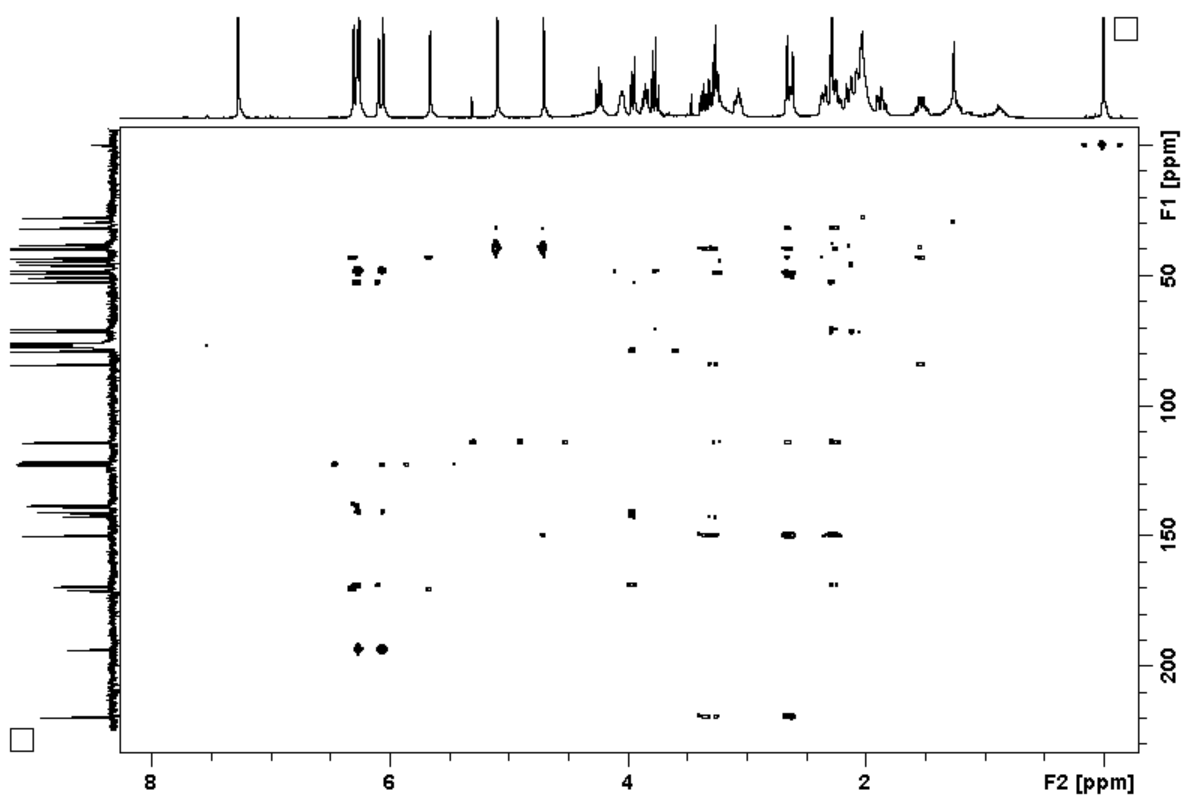
**E20** - Espectro HMBC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **GPC4**.



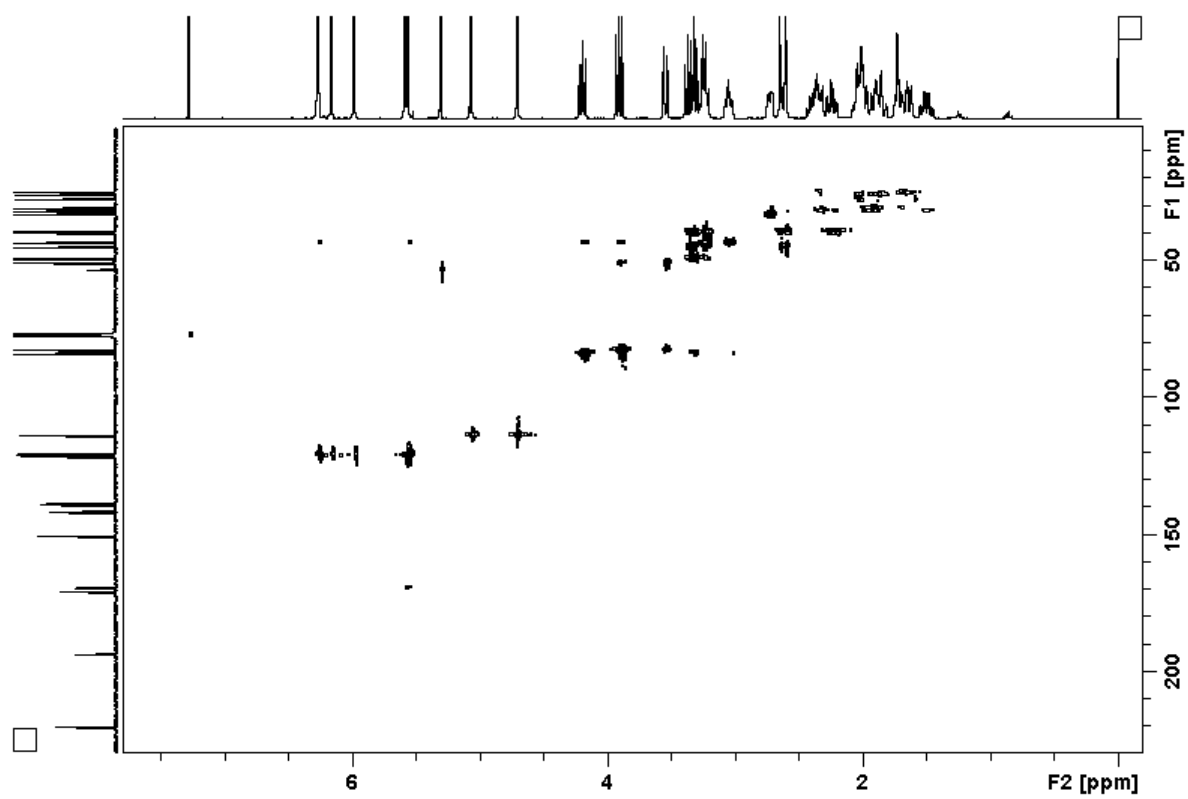
**E21** - Espectro HMBC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **GPC5**.



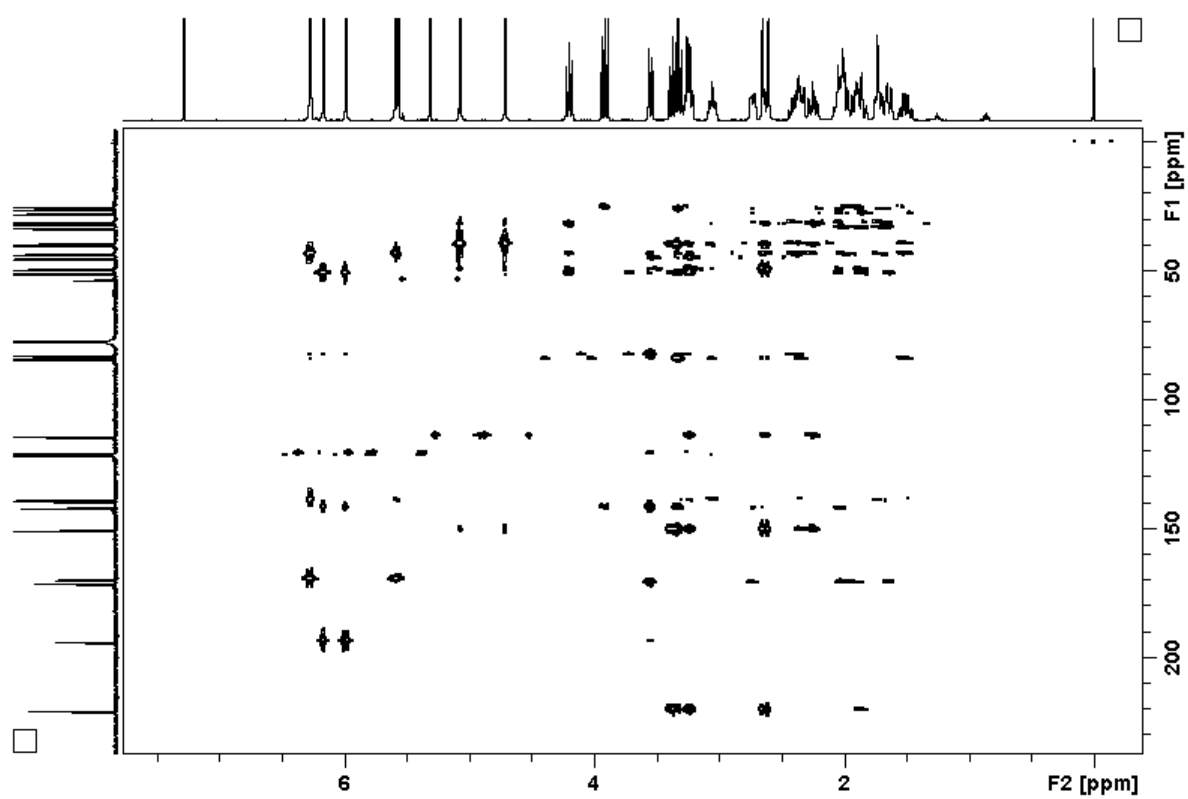
**E22** - Espectro HSQC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) de GPC6.



**E23** - Espectro HMBC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) de GPC6.

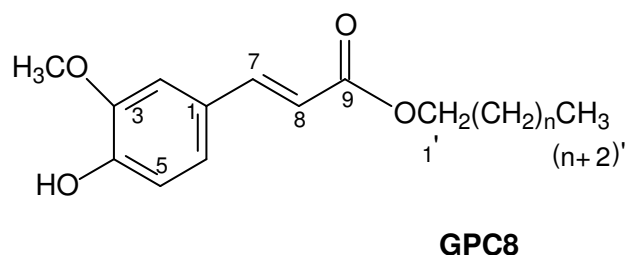


E24 - Espectro HSQC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) de GPC7.



E25 - Espectro HMBC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) de GPC7.

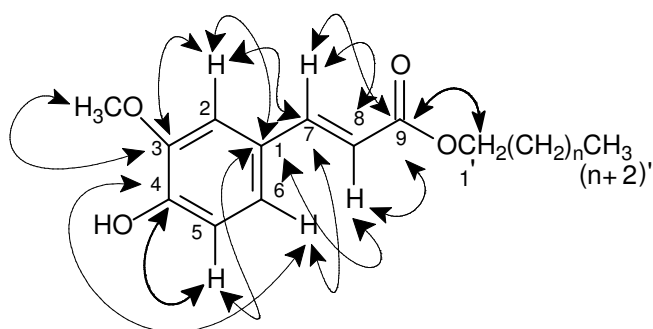
### 3.3.5 - Identificação da substância GPC8



O composto **GPC8** foi isolado como sólido branco. Seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**E26**; **Tabela 7**) mostrou a presença de um duplete em  $\delta$  6,93 (8,1 Hz; 1H), um duplo duplete em  $\delta$  7,09 (8,1 e 1,4 Hz; 1H), e um duplete em  $\delta$  7,04 (1,4 Hz; 1H). Este conjunto de sinais evidenciou a existência de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Em adição, o espectro RMN  $^1\text{H}$  mostrou outros sinais característicos de grupo *trans*-feruloíla (DAVID *et al.*, 2004), dentre os quais dois dupletos em  $\delta$  6,27 (*d*; 15,9 Hz; 1H) e  $\delta$  7,59 (*d*; 15,9 Hz; 1H), referentes ao hidrogênios olefínicos de uma ligação dupla com configuração *trans* e conjugada à carbonila (H-7 e H-8). O espectro RMN  $^1\text{H}$  apresentou ainda, na região de hidrogênios alifáticos, um tripleto desprotegido em  $\delta$  4,19 (6,7 Hz; 2H), referente a hidrogênios oximetilênicos (C-1').

Através da análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (**E27**; **Tabela 7**), foi possível confirmar a presença do sistema aromático 1,3,4-trissubstituído através dos sinais em  $\delta$  109,3; 114,7; 123,0; 127,1; 146,7 e 147,9. A presença de um grupo carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturado pode ser confirmado pelos sinais em  $\delta$  167,1; 144,6 e 115,7; correspondentes a um grupo carbonila (C-9) e aos dois carbonos metínicos  $\text{sp}^2$  (C-7 e C-8). Esses dados sugeriram um éster de cadeia longa do ácido ferúlico. Através da comparação com os dados da literatura (CORREIA *et al.*, 2003; DAVID, *et al.*, 2004) e pela análise dos espectros HSQC (**E28**) e HMBC (**E29**) de **GPC8** (**Tabela 7**), a estrutura foi confirmada através da observação das correlações mostradas abaixo. Esta substância é inédita no gênero *Gochnatia*.

Entretanto, o tamanho da cadeia alquílica não pode ser determinada apenas pelos dados de RMN, sendo necessário que a massa molecular do composto seja conhecida. O espectro de massas está sendo providenciado.

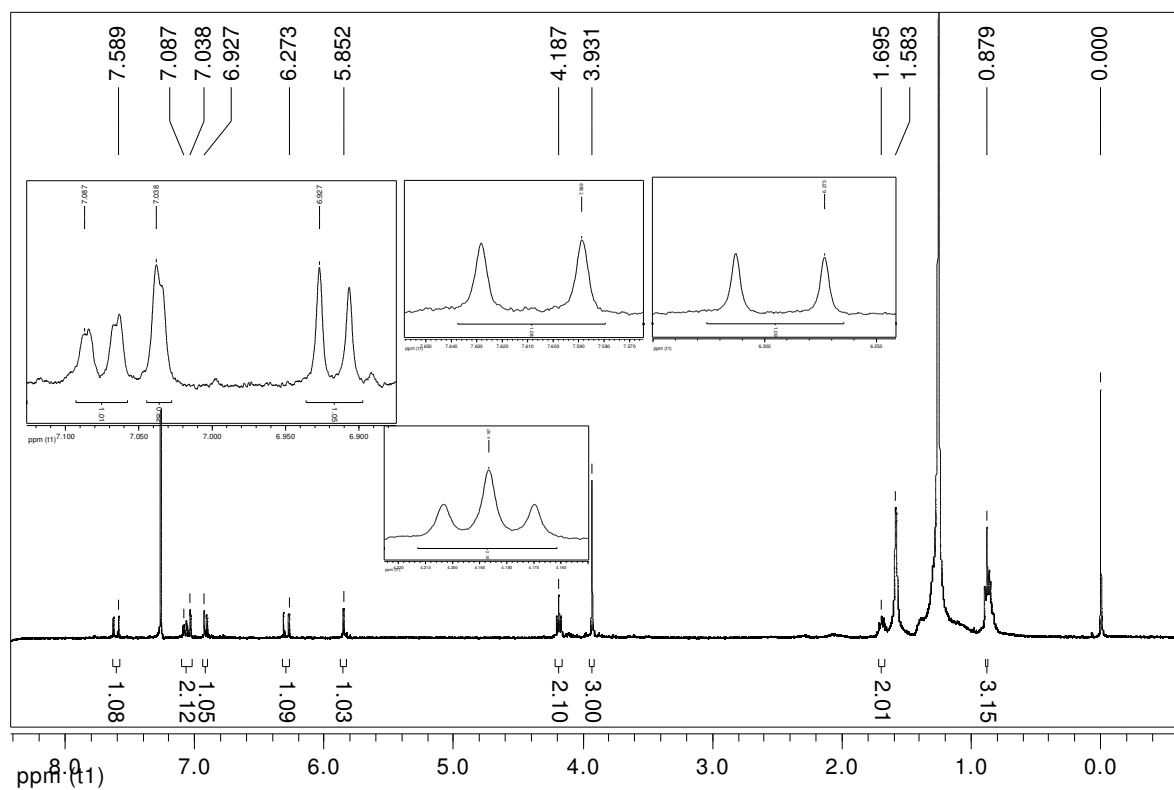


**Figura 23** – Principais correlações observadas no espectro HMBC de **GPC8**.

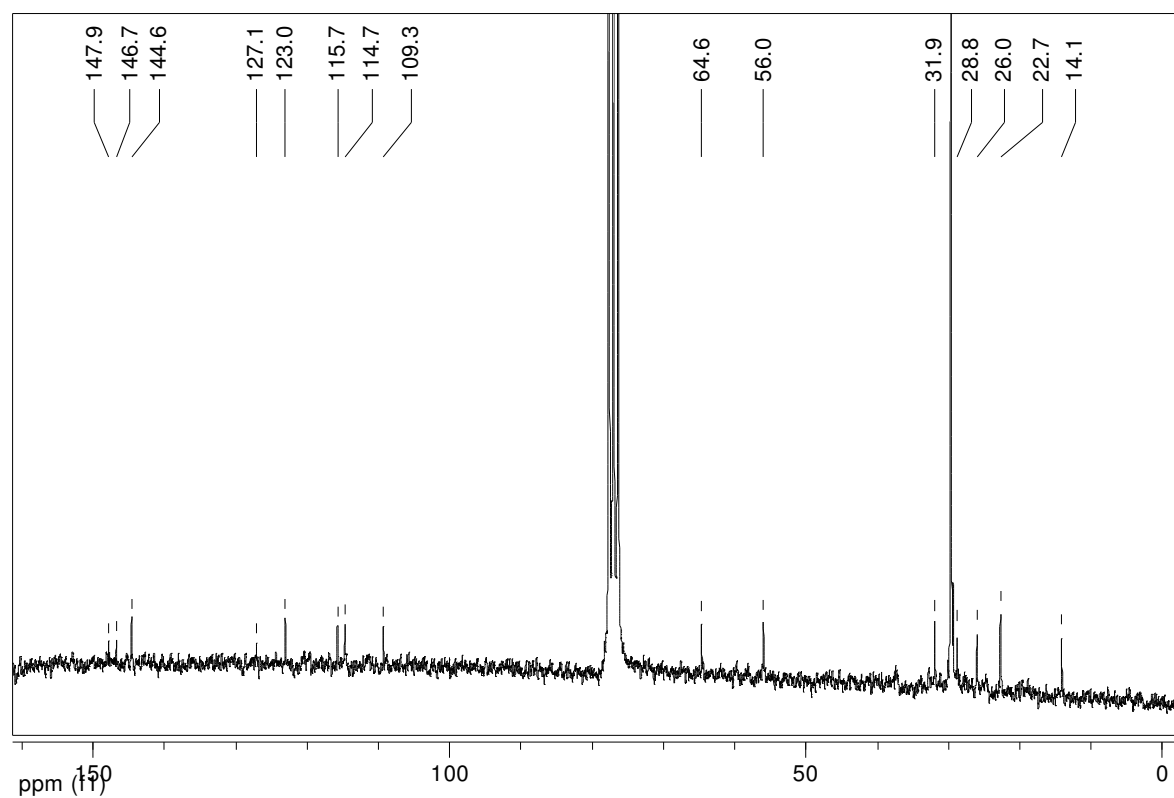
**Tabela 7** - Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (50 MHz), HSQC e HMBC (400 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para **GPC8**.

Posição	Tipo	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}^*$	HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$
1	Cq	-	127,1	-
2	CH	7,04 ( <i>d</i> , 1,9)	109,3	1; 3; 4; 6; 7
3	Cq	-	147,9	-
4	Cq	-	146,7	-
5	CH	6,93 ( <i>d</i> , 8,1)	114,7	1; 3; 4; 6
6	CH	7,09 ( <i>d</i> , 8,1; 1,4)	123,0	1; 2; 4; 5; 6; 7
7	CH	7,59 ( <i>d</i> , 15,9)	144,6	1; 2; 6; 8; 9
8	CH	6,27 ( <i>d</i> , 15,9)	115,7	1; 7; 9
9	Cq	-	167,1	-
1'	$\text{CH}_2$	4,19 ( <i>t</i> , 6,7)	64,6	2'; 3'; 9
2'	$\text{CH}_2$	1,69	31,9	1; 3; 4
$(\text{CH}_2)_n$	$\text{CH}_2$	1,25 ( <i>s</i> )	29,3	
$(n + 2)'$	$\text{CH}_3$	0,88	14,1	-
OH	-	5,85 ( <i>s</i> )	-	-
$\text{OCH}_3$	$\text{CH}_3$	3,93 ( <i>s</i> )	56,0	3

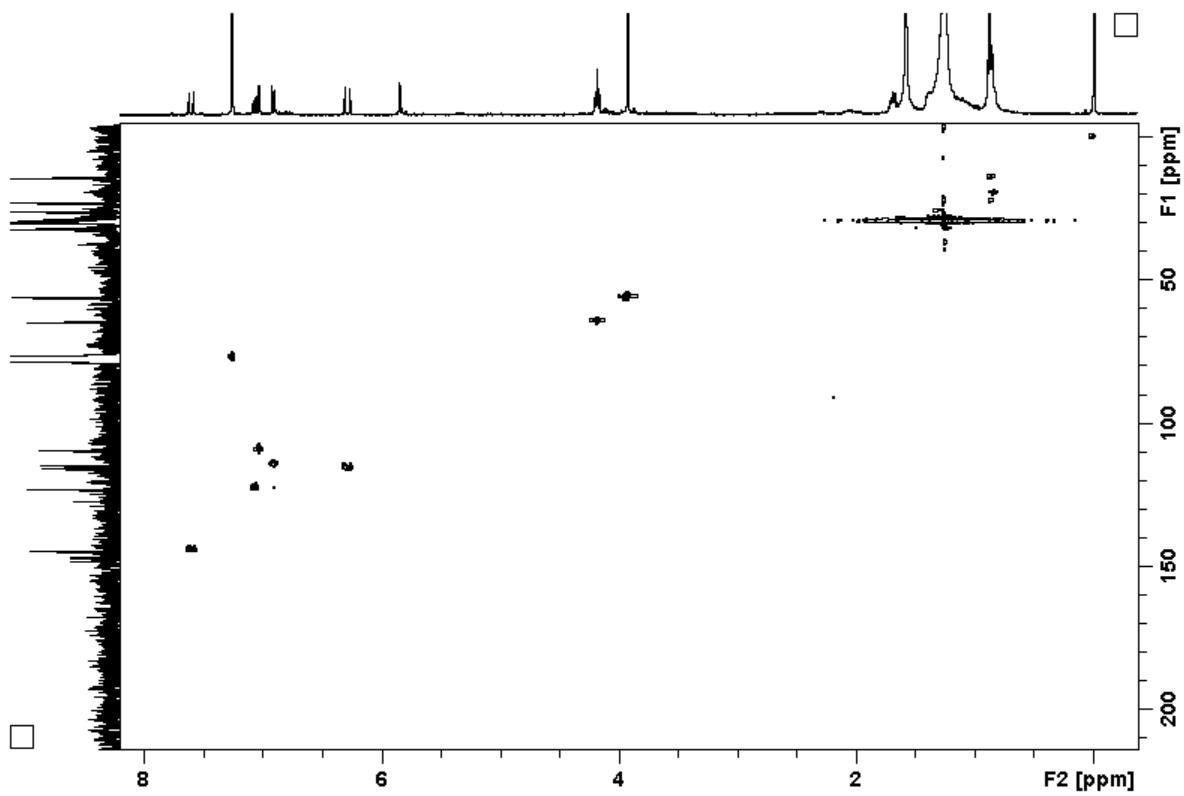
\*Atribuições inequívocas obtidas através de análise dos espectros HSQC e HMBC.



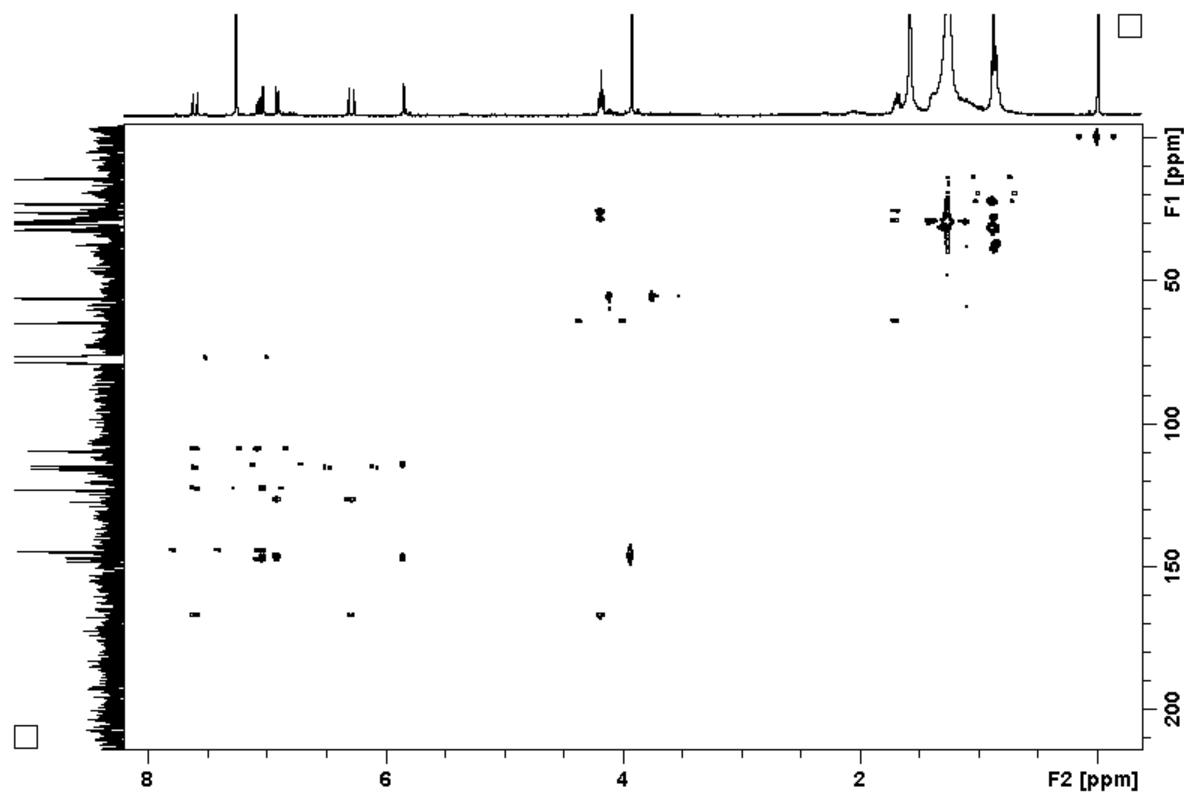
**E26** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC8**.



**E27** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **GPC8**.



**E28** - Espectro HSQC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **GPC8**.



**E29** - Espectro HMBC (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **GPC8**.

## 4. REALIZAÇÃO DE ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

### 4.1- Atividade antimicrobiana

#### 4.1.1 - Materiais e métodos

O extrato bruto das cascas do tronco em etanol, as frações obtidas por partição com solventes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e BuOH) e as substâncias **GPC1A** e **GPC3** foram testadas *in vitro* contra 21 microrganismos pelo método de difusão em ágar, segundo as normas descritas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards. Foram utilizados os seguintes microrganismos: *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 14458, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* 6ep, *Proteus vulgaris* ATCC, *Bacillus subtilis* ATCC, *Salmonella typhi* ATCC, *Enterococcus aerogenes* ATCC, *E. faecalis* ATCC 10100 (bactérias Gram-positivas), *Escherichia coli* ATCC 10538, *E. coli* ATCC 10799, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (bactérias Gram-negativas), *Candida albicans* ATCC 1023, *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 157, *C. tropicalis* ct, *C. glabrata* ATCC 30070, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. dubliniensis* ATCC 777, *C. dubliniensis* ATCC 778157 (fungos). Os extratos e frações foram testados na concentração de  $5,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e as substâncias puras na concentração de  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os ensaios foram realizados na Universidade Estadual de Campinas sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos José Salvador conforme metodologia previamente publicada (STEFANELLO *et al.*, 2006<sup>b</sup>)

#### 4.1.2 - Resultados e discussão

O extrato etanólico bruto inibiu o crescimento de apenas 6 bactérias Gram-positivas, com halos de inibição (HI) de 7-10 mm. Dentre as frações obtidas por partição, a fração em diclorometano inibiu o crescimento de 9 bactérias (HI = 6-12 mm), a fração em acetato inibiu o crescimento de apenas 6 bactérias (HI = 6 mm) e a fração em butanol inibiu o crescimento de 7 bactérias (HI = 6-12 mm). As substâncias puras inibiram o crescimento de apenas quatro bactérias (HI = 6-9 mm) (**tabela 8**). Neste ensaio, considera-se que uma amostra apresenta atividade quando o halo de inibição é igual ou maior que 10 mm. Adotando esse critério, observa-se que o extrato etanólico (EtOH) mostrou atividade apenas contra *K. rhizophila* e *Staphylococcus aureus*.

Considerando as frações obtidas por partição, a maior atividade foi observada na fração em diclorometano, principalmente contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Entretanto as duas substâncias obtidas desta fração (acetato de bauerenila - **GPC1A** e 11 $\alpha$ H,13-diidrozaluzanin C - **GPC3**) foram inativas. Nenhuma amostra

apresentou atividade antifúngica e apenas a fração em diclorometano foi ativa contra bactérias Gram-negativas. Estes resultados diferem ligeiramente daqueles previamente publicados para essa espécie, no qual a fração em diclorometano das cascas do tronco inibiu o crescimento de 14 bactérias e dois fungos, com halos de inibição de 6-17 mm (STEFANELLO *et al.*, 2006<sup>b</sup>).

**Tabela 8** - Atividade antimicrobiana de extratos, frações e substâncias puras de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*.

MICROORGANISMO	Diâmetro do halo de inibição - HI (mm)						C
	EtOH 5 mg/mL	AcOEt 5 mg/mL	BuOH 5 mg/mL	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 5 mg/mL	GPC1A 1 mg/mL	GPC3 1 mg/mL	
<i>K. rhizophila</i> (ATCC 9341)	10	6	6	6	-	-	25
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	10	6	8	12	9	8	23
<i>S. aureus</i> (ATCC 14458)	7	6	6	10	6	6	29
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	9	6	12	8	6	6	25
<i>S. epidermidis</i> (6ep)	9	6	6	10	6	8	31
<i>P. vulgaris</i> (ATCC)	-	-	-	-	-	-	25
<i>B. subtilis</i> (ATCC)	-	-	-	12	-	-	28
<i>Salmonela</i> TYPHI (ATCC)	-	-	-	-	-	-	23
<i>E. aerogenes</i> (ATCC)	-	-	-	-	-	-	25
<i>E. faecalis</i> (ATCC 10100)	7	6	6	7	-	-	28
<i>E. coli</i> (ATCC 10538)	-	-	-	12	-	-	32
<i>E. coli</i> (ATCC 10799)	-	-	6	8	-	-	32
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	-	-	-	-	-	22
<i>C. albicans</i> (ATCC 1023)	-	-	-	-	-	-	40
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	-	-	-	-	-	-	40
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 157)	-	-	-	-	-	-	40
<i>C. tropicalis</i> (ct)	-	-	-	-	-	-	20
<i>C. glabrata</i> (ATCC 30070)	-	-	-	-	-	-	40
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	-	-	-	-	-	-	40
<i>C. dubliniensis</i> (ATCC 777)	-	-	-	-	-	-	35
<i>C. dubliniensis</i> (ATCC 778157)	-	-	-	-	-	-	35

EtOH – extrato etanólico; AcOEt – fração em acetato de etila; BuOH – fração em 1-butanol; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – fração em diclorometano; C - controles positivos: bacitracina (20,0 UI/mL) para bactérias e cetoconazol (100,0 µg/mL) para fungos.

## 4.2 - Atividade antiinflamatória

### 4.2.1 - Materiais e métodos

A atividade antiinflamatória do extrato etanólico das cascas do tronco, das frações obtidas por partição com solventes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt, BuOH) e dos compostos isolados **GPC1A** e **GPC3** foi avaliada em camundongos através do teste de inflamação na pata induzida pela carragenina e de inflamação pulmonar (pleurisia) (OWOYELE *et al.*, 2005). Os testes foram realizados no Departamento de Farmacologia da UFPR pelos alunos de mestrado Renê dos Reis Piornedo e Priscila de Souza, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aleksander Zamprônio e Profa. Dra. Cândida A. Leite Kassuya.

#### 4.2.1.1 - Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos (25-35 g) mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, em temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade controlada (60-80 %), ciclo claro/escuro de 12 h e com livre acesso a água e ração. Os animais foram retirados do biotério e mantidos no laboratório para adaptação por um período de pelo menos 1 h antes do início dos experimentos, sendo utilizados somente uma vez em cada teste. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (processos nº 336).

#### 4.2.1.2 - Edema e inflamação de pata induzido pela carragenina

Neste ensaio grupos distintos de camundongos foram tratados por via oral com o extrato etanólico de *G. polymorpha* (EtOH – 30-300 mg/kg), fração em diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – 50 mg/kg), fração butanólica (BuOH – 0,2-200 mg/kg), **GPC1A** (1 mg/kg) e **GPC3** (10 e 30 mg/kg), ou com veículo. Após 1 h, os animais receberam na pata direita 50  $\mu\text{L}$  de salina contendo carragenina (Cg, 300  $\mu\text{g}$ ). Como fármaco de referência foi testado a dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, via subcutânea. A pata esquerda recebeu o mesmo volume de PBS e foi utilizada como controle. O aumento de volume da pata foi avaliado antes de qualquer tratamento com auxílio de um micrômetro (Mitutoyo série 293) 2 h após a aplicação da carragenina. Os dados foram expressos como a variação do volume da pata avaliado antes e após a aplicação de carragenina.

#### 4.2.1.3 - Medida da atividade da Mieloperoxidase no modelo de inflamação induzida pela carragenina

Para avaliação indireta do acúmulo de neutrófilos, grupos de camundongos receberam tratamento oral foram tratados por via oral com o extrato etanólico de *G. polymorpha* (EtOH – 30-300 mg/kg), fração butanólica (BuOH – 0,2-200 mg/kg), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – 50 mg/kg), a substância **GPC3** (1-30 mg/kg) ou com veículo. Um grupo distinto de animais recebeu somente injeção i.pl. de salina. Quatro horas após a injeção de Cg, ou somente da solução salina, os animais foram sacrificados e a pele das suas patas foi removida. As amostras para a medida da atividade da MPO foram preparadas como descrito por DE YOUNG *et al.* (1989). Os tecidos foram homogeneizados em 0,5 mL de tampão fosfato (80 mM, pH de 5,4) contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado 12000 g, por 15 minutos, a 4 °C. Um volume de 30 µL de sobrenadante das amostras foi pipetado em uma microplaca de 96 poços. Para o ensaio, 200 µL de uma solução contendo 100 µL PBS (80 mM, pH de 5,4), 85 µL de PBS (0,22 M, pH de 5,4) e 15 µL de peróxido de hidrogênio (0,017 %) foram adicionados em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de tetrametilbenzidina (18,4 mM, em 8 % de dimetilformamida). A placa foi incubada a 37 °C por 3 minutos e a reação foi terminada pela adição de 30 µL de acetado de sódio (1,46 M, pH de 3,0). A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente e expressa como mDO/mg proteína, sendo utilizado um leitor de ELISA (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc.) com filtro de 630 nm.

#### 4.2.1.4 - Pleurisia induzida pela carragenina

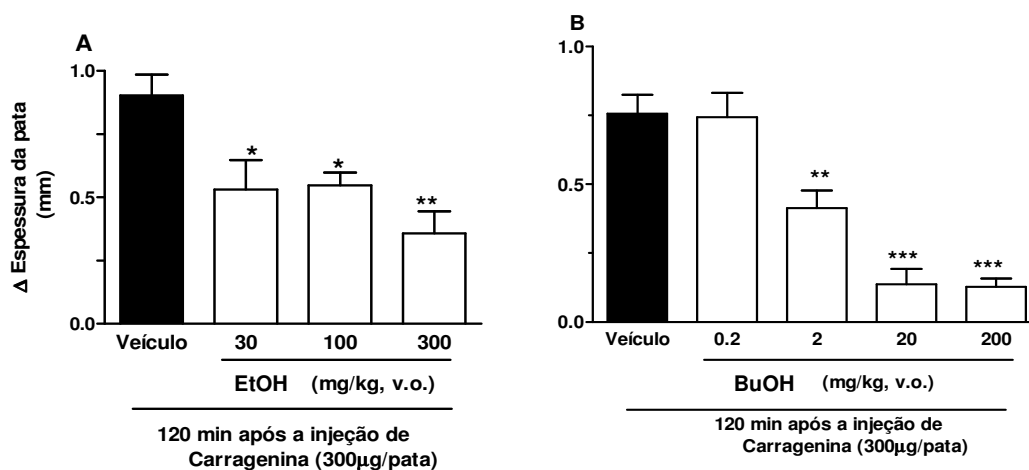
Neste ensaio, os camundongos foram tratados por via oral com o extrato etanólico (EtOH- 30-300 mg/kg), fração butanólica (BuOH – 0,2-200 mg/kg), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - 50 mg/kg) ou com veículo, 1 h antes da indução da pleurisia. A pleurisia foi realizada como descrito previamente por SPECTOR (1956) e modificada para camundongos (HENRIQUES *et al.*, 1990). Para a indução da pleurisia, a carragenina (100 µL/cavidade de solução de 1 % carragenina) foi administrada por via intratorácica no lado direito da cavidade pleural do camundongo utilizando-se uma agulha adaptada. Outro grupo distinto de animais recebeu injeção intratorácica de salina estéril e foi utilizado como controle. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina e xilazina e sacrificados 6 h após a injeção de carragenina, sendo a cavidade pleural aberta e lavada com 1 mL de PBS contendo heparina (10 UI/mL). O volume de exsudação foi medido utilizando-se uma pipeta automática e o valor multiplicado pela quantidade de proteínas totais por mL, quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), para obtenção do valor total de proteína por cavidade.

## 4.2.2 - Resultados e discussão

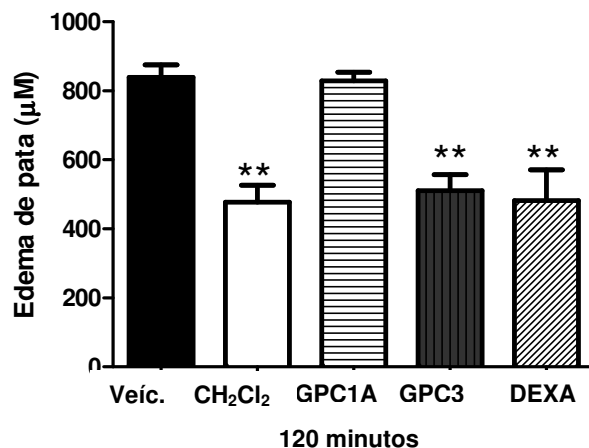
### 4.2.2.1 - Efeito sobre o edema induzido pela carragenina

O edema (aumento na espessura da pata) induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g) foi reduzido após a administração via oral de 30, 100 e 300 mg/kg do extrato bruto em etanol (EtOH) das cascas do tronco de *G. polymorpha*. Na dose de 100 mg/kg o tratamento via oral com o extrato etanólico causou inibição de  $39 \pm 5$  % (**Figura 24a**). Ensaio com as frações obtidas por partição com solventes mostraram que a maior atividade foi observada na fração butanólica (BuOH) que na dose de 2, 20 e 200 mg/kg foi eficaz em reduzir o edema, com a inibição significativa de  $69 \pm 5$ % (na dose de 200 mg/kg) quando analisada 2 h após injeção da carragenina (**Figura 24b**).

Além disso, a fração em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  inibiu de maneira significativa o edema induzido pela carragenina, na dose de 50 mg/kg (**Figura 25**). Com relação às substâncias puras, apenas a administração de 11 $\alpha$ H,13-diidrozaluzanin C (**GPC3** – 10 mg/kg), reduziu de maneira significativa o edema induzido pela carragenina (**Figura 25**). A inibição da fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e do composto isolado foi semelhante a inibição induzida pela injeção subcutânea de dexametasona (0,5 mg/kg).



**Figura 24** - Efeito do tratamento com o extrato etanólico (EtOH) e com a fração butanólica (BuOH) de *G. polymorpha* sobre o edema induzido pela injeção i.pl. de Cg. A espessura das patas dos animais foi avaliada e imediatamente após, os animais foram tratados por via oral com o EtOH (30-300 mg/kg), BuOH (0,2-200 mg/kg) ou com o veículo. Após 1 h os animais receberam a injeção i.pl. de Cg (300  $\mu$ g) e a espessura da pata foi medida após 2 h. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M. da variação ( $\Delta$ ) da espessura da pata em  $\mu$ m de 5-7 animais. \*diferença significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

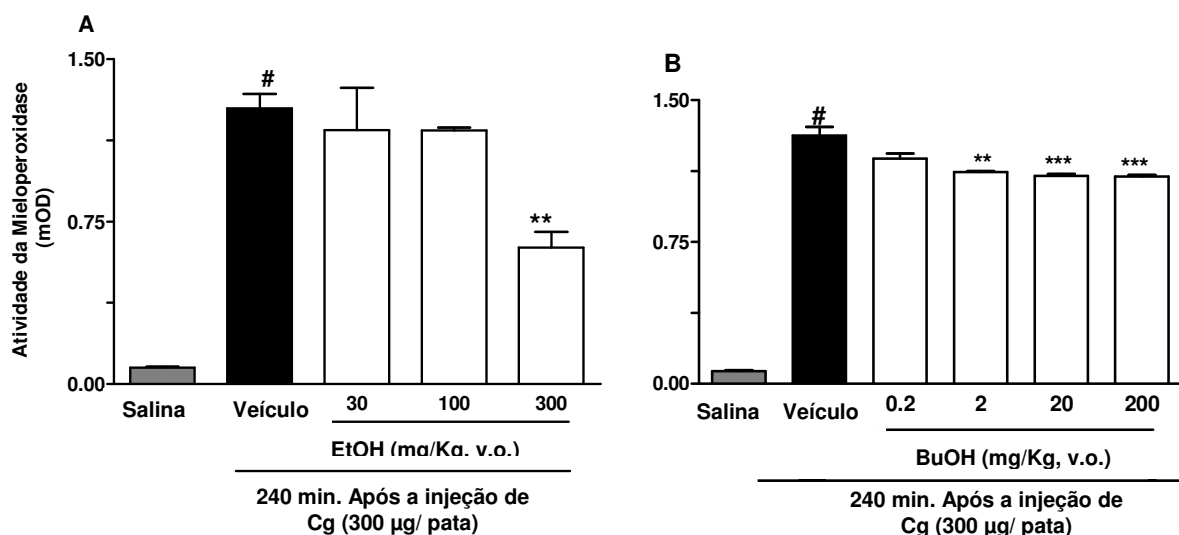


**Figura 25** - Efeito do tratamento com a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e com os compostos **GPC1A** e **GPC3** obtidos de *G. polymorpha* sobre o edema induzido pela injeção i.pl. de Cg. A espessura das patas dos animais foi avaliada e imediatamente após, os animais foram tratados por via oral com fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mg/kg), **GPC1A** (1 mg/kg), **GPC3** (10 mg/kg) ou com o veículo. Após 1 h os animais receberam a injeção intraplantar de carragenina (300 μg) e a espessura da pata foi medida após 2 h. Os pontos representam a média ± E.P.M. da variação (Δ) da espessura da pata em μm de 5-7 animais. \*diferença significativa em relação ao grupo controle (\**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01; \*\*\**P* < 0,001).

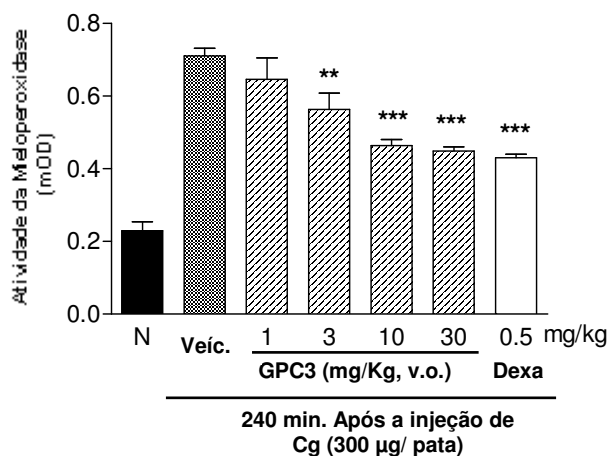
#### 4.2.2.2 - Efeito sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela Cg

A carragenina (Cg - 300 μg/pata) induz o aumento da atividade da MPO 4 h após a injeção i.pl. deste agente, quando comparado aos animais controle. Quatro horas após a injeção da Cg, o tratamento com a dose de 300 mg/kg de EtOH reduziu significativamente a atividade da MPO (47 ± 6 % de inibição). Similarmente, o tratamento dos animais via oral com as doses de 2, 20 e 200 mg/kg de BuOH foram capazes de inibir o aumento da atividade da MPO 4 h após a injeção de Cg (**Figura 26b**).

Tanto o tratamento via oral com a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (dados não mostrados) ou com **GPC3** (**Figura 27**) foi capaz de prevenir o aumento da atividade da mieloperoxidase induzido pela injeção intraplantar de carragenina.



**Figura 26** - Efeito do tratamento com o extrato etanólico (EtOH) e com a fração butanólica (BuOH) de *G. polymorpha* sobre o aumento da atividade da mieloperoxidase induzido pela injeção intraplantar de Cg. Os animais foram tratados por via oral com o EtOH (30-300 mg/kg), BuOH (0,2-200 mg/kg) ou com o veículo. Após 1 h os animais receberam a injeção intraplantar de carragenina (300 µg) e a atividade da mieloperoxidase foi avaliada após 4 h da injeção da Cg. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M. da atividade da mieloperoxidase de 5-7 animais. \*diferença significativa em relação ao grupo controle (\*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).



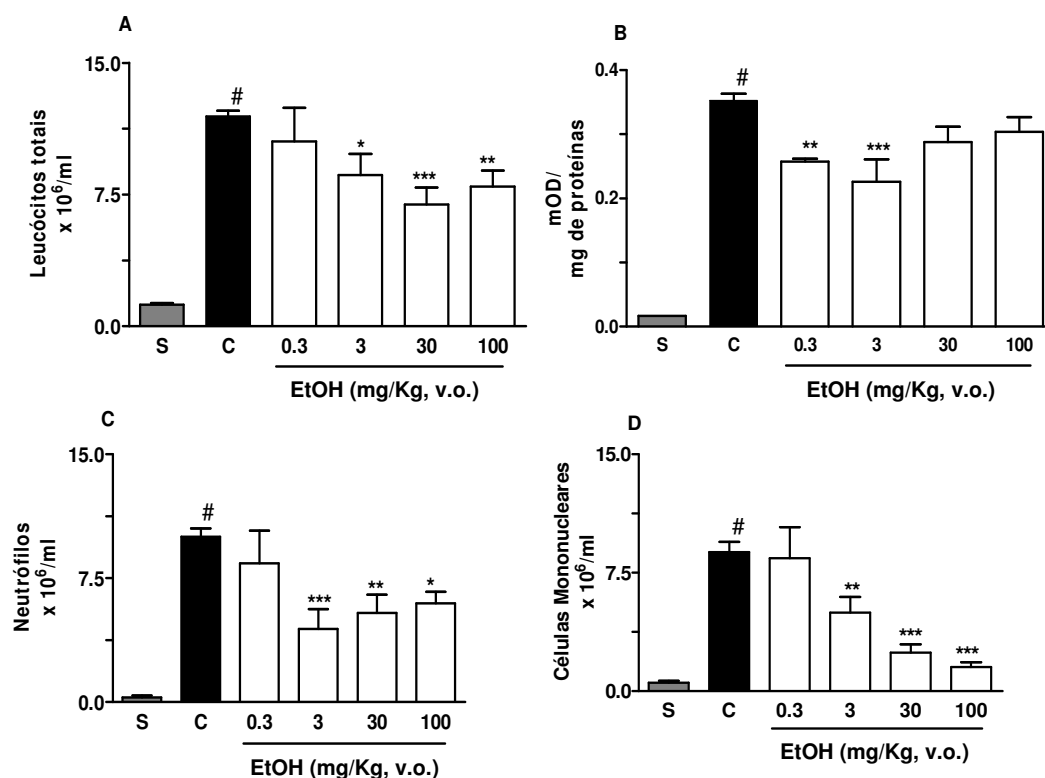
**Figura 27** - Efeito do tratamento com a substância **GPC3** sobre o aumento da atividade da mieloperoxidase induzido pela injeção intraplantar de Cg. Os animais foram tratados por via oral com **GPC3** (1-30 mg/kg) ou com o veículo. Após 1 h os animais receberam a injeção intraplantar de carragenina (300 µg) e a atividade da MPO foi avaliada após 4 h da injeção da Cg. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M. da atividade da mieloperoxidase de 5-7 animais. \*diferença significativa em relação ao grupo controle (\*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

#### 4.2.2.3 - Efeito sobre a pleurisia induzida pela carragenina

A administração intratorácica de carragenina em camundongos aumentou a quantidade total de leucócitos caracterizado pelo aumento de neutrófilos e células mononucleares, e também a quantidade de extravasamento plasmático (protéico) na cavidade pleural 6 h após a injeção quando comparados aos animais injetados com veículo.

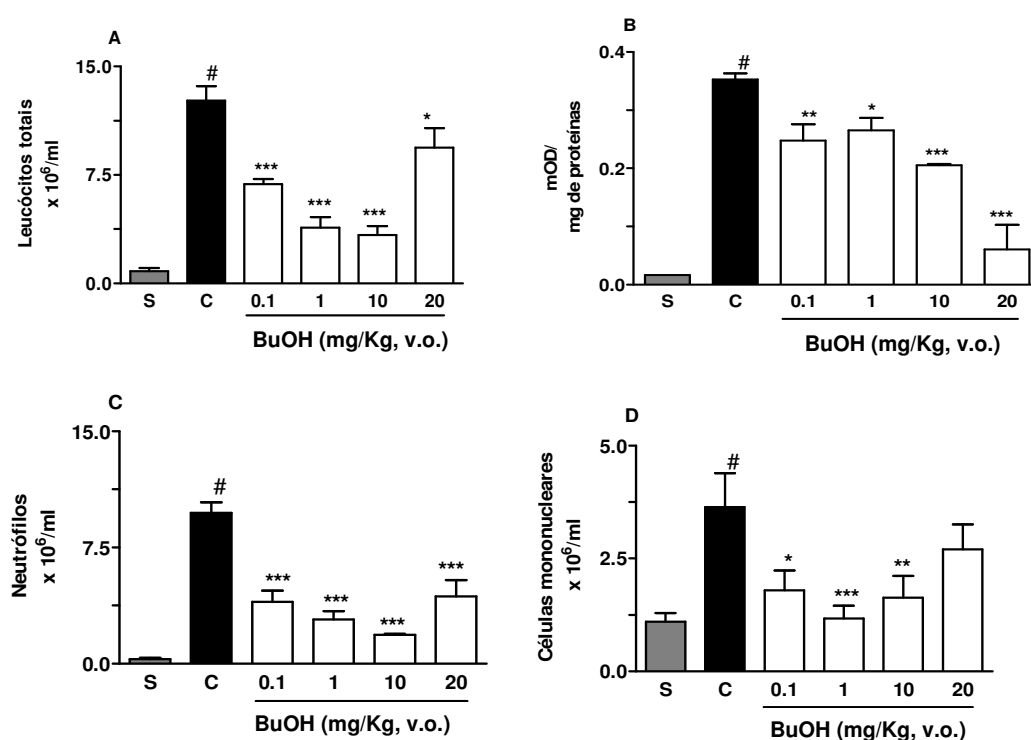
A administração oral do extrato EtOH (0,3 - 100 mg/kg) reduziu o aumento dos leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares nas doses de 3, 30 e 100 mg/kg (**Figura 28**). A fração BuOH também mostrou atividade nas doses de 0,1; 1,0; 10 e 20 mg/kg, sendo, portanto mais potente que o extrato bruto (**Figura 29**). Estes resultados demonstram que o tratamento por via oral com o extrato EtOH e a fração BuOH obtidas de *G. polymorpha* reduziram de maneira significativa o edema, migração leucocitária e também a inflamação pleural causada pela carragenina.

O tratamento por via oral com a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> na dose de 50 mg/kg não foi efetivo em inibir a inflamação pleural induzida pela carragenina em camundongos. Como o **GPC1A** e **GPC3** foram isolados da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, estes não foram testados pois a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> não causou inibição significativa (dados não mostrados).



**Figura 28** – Efeito do extrato EtOH sobre o aumento dos leucócitos totais (A), extravasamento protéico (B), neutrófilos (C) e células mononucleares (D), induzidos pela carragenina na

cavidade pleural de camundongos. Os animais receberam o extrato EtOH (0,3; 3,0; 30,0 ou 100,0 mg/kg) ou veículo (V) e após 1 h receberam a injeção intrapleural de carragenina (100  $\mu$ L de uma solução 1 % / cavidade). Os animais controles receberam somente o veículo via oral. Animais foram sacrificados 6 h após a injeção de carragenina. Cada barra representa média  $\pm$  S.E.M. dos 8 animais. #denota diferença significativa em relação aos animais tratados com o veículo ( $P < 0,01$ ). Asteriscos denotam as diferenças significativas: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , comparado com o V (grupo tratado com carragenina).



**Figura 29** – Efeito da fração BuOH sobre o aumento dos leucócitos totais (A), extravasamento proteico (B), neutrófilos (C) e células mononucleares (D), induzidos pela carragenina na cavidade pleural de camundongos. Os animais receberam a fração BuOH (0,1; 1,0; 10,0 ou 20,0 mg/kg) ou veículo (V) e após 1 h receberam a injeção intrapleural de carragenina (100  $\mu$ L de uma solução 1 % / cavidade). Os animais controles receberam somente o veículo via oral. Animais foram sacrificados as 6 h após a injeção de carragenina. Cada barra representa média  $\pm$  S.E.M. dos 8 animais. #denota diferença significativa em relação aos animais tratados com o veículo ( $P < 0,01$ ). Asteriscos denotam as diferenças significativas: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , comparado com o V (grupo tratado com carragenina).

### 4.3 - Atividade vasorrelaxante

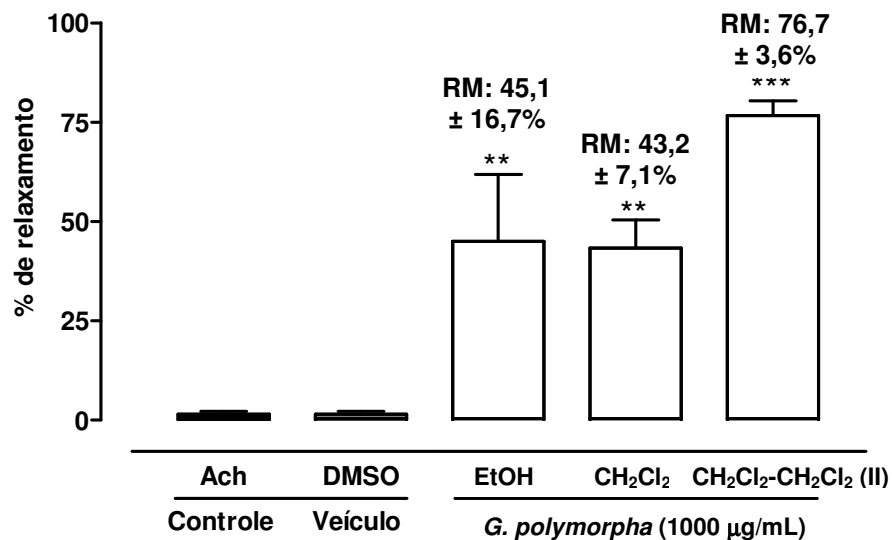
#### 4.3.1 - Materiais e métodos

Os testes foram realizados no Departamento de Farmacologia da UFPR pelas alunas de mestrado Rita de Cássia Vilhena F. da Silva e Priscila de Souza, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aleksander Zamprônio e Profa. Dra. Cândida A. Leite Kassuya.

O extrato etanólico das cascas do tronco, frações obtidas por partição de solventes e por cromatografia e os compostos **GPC1A** e **GPC3** foram testados em anéis de aorta isolada de rato, posicionadas em cubas contendo 3 mL de solução de Krebs, a 37 °C, aerada, tensão de 1 g e conectadas a um transdutor de força acoplados a um sistema computadorizado. A presença ou ausência de endotélio foi confirmada através da administração de acetilcolina (1 µM) nos anéis de aorta contraídos previamente pela fenilefrina (1 µM). Uma segunda resposta a fenilefrina foi obtida e na fase tônica da contração resultante foram adicionadas concentrações cumulativas do extrato, frações ou compostos (3-3000 µg/mL) de acordo com o protocolo previamente descrito por SILVA-SANTOS (2002).

#### 4.3.2 - Resultados e discussão

O extrato etanólico bruto (EtOH) promoveu um relaxamento de  $54 \pm 16$  % nos anéis de aorta isolada de ratos. As frações obtidas por partição de solventes mostraram diferentes graus de atividade ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  -  $43,3 \pm 7$  %; AcOEt -  $30 \pm 12$  %; BuOH -  $29 \pm 10$  %) com a concentração de 1000 µg/mL. Como a fração em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foi a mais ativa, esta foi fracionada em uma coluna rápida de sílica, eluída com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol (**Esquema 1**, p. 33). Deste modo foram obtidas 4 frações (I-IV) que foram avaliadas pelo mesmo método. A maior atividade foi observada na fração II ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), que apresentou um relaxamento máximo de  $76,7 \pm 4$  % (**FIGURA 29**). Os principais componentes desta fração, acetato de bauerenila (**GPC1A**) e 11 $\alpha$ H-13-diidrozaluzanin C (**GPC3**) foram ensaiados, mas mostraram-se inativos (dados não mostrados).



**Figura 30** - Efeito vasorrelaxante do extrato bruto etanólico (EtOH), fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (II) obtidas de *G. polymorpha* em anéis de aorta isolada de rato sem endotélio, pré contraídos com Fenilefrina (1 μM). Resultados expressos como o relaxamento máximo (RM) obtido com a dose de 1000 μg/mL, \*\**P* < 0,01; \*\*\**P* < 0,001 (ANOVA seguido do teste *t* de Bonferroni).

## 5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das frações em éter de petróleo e diclorometano, provenientes do extrato etanólico bruto das cascas do tronco de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*, resultou no isolamento e identificação de dois triterpenos, dois esteróides, uma lactona sesquiterpênica, quatro lactonas diméricas e um éster ferúlico. Destas, 3 substâncias (baurenona, 11 $\alpha$ H,13-diidrozaluzanin C e ferulato de n-alquila) estão sendo descritas pela primeira vez no gênero. Esses resultados confirmam a diversidade química de *G. polymorpha* e mostram que triterpenos e lactonas sesquiterpênicas são os compostos mais característicos da espécie, uma vez que foram encontrados em todos os estudos fitoquímicos realizados com os extratos menos polares.

Nossos resultados se mostraram muito semelhantes aos estudos fitoquímicos previamente realizados com *Gochnatia polymorpha*, subespécie não identificada (FARIAS *et al.*, 1984; BOHLMANN *et al.*, 1986), que também isolaram o acetato de bauerenila e as lactonas diméricas. Sendo compostos raros, as lactonas diméricas podem ser consideradas marcadores químicos de algumas populações de *G. polymorpha*.

Os dois materiais coletados em épocas diferentes, o primeiro de março/2004 e o segundo de julho/2009, diferiram principalmente nas quantidades relativas dos constituintes, mostrando a influência da época da coleta no acúmulo de metabólitos secundários. Isso pode ser relevante para explicar diferenças de atividade biológica entre diferentes extratos da planta.

Foram utilizados dois métodos diferentes de extração, a maceração a temperatura ambiente, com o primeiro material, e extração em Soxhlet, com o segundo material. Embora não tenha havido diferença qualitativa significativa, o segundo método se mostrou mais seletivo, facilitando o isolamento dos compostos com maior grau de pureza.

*G. polymorpha* é uma das plantas mais utilizadas na medicina popular na região Sul do Brasil, embora relativamente poucos estudos científicos validem as indicações deste uso.

A atividade antimicrobiana de extratos e frações revelou que o melhor resultado foi observado na fração em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, que apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Estes resultados estão de acordo com um trabalho anterior (STEFANELLO *et al.*, 2006<sup>b</sup>) que relatou que a atividade antimicrobiana estava concentrada no extrato em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, das cascas do tronco de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*. No entanto, o extrato testado anteriormente foi mais potente. As únicas substâncias puras obtidas desta fração (acetato de bauerenila e 11 $\alpha$ H,13-diidrozaluzanin C), que foram testadas se mostraram inativas. Isto pode ser explicado pelo fato de que, as substâncias ativas podem ser constituintes minoritários no extrato. Por outro lado, muitas vezes a atividade de um extrato é função de um sinergismo entre os seus vários componentes e não das substâncias isoladas.

A atividade antiinflamatória foi avaliada como um teste preliminar no intuito de validar o uso popular contra doenças inflamatórias do pulmão.

Um dos estudos prévios com *G. polymorpha* mostrou que a fração em acetato de etila do extrato etanólico das folhas possuía uma fraca atividade antiinflamatória (MOREIRA *et al.*, 2000). Nossos resultados mostraram que a maior atividade está na fração butanólica, seguida pela fração em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, sendo a fração em AcOEt inativa. Além disso, essas frações obtidas das cascas do tronco foram mais potentes do que as frações obtidas das folhas no estudo anterior (MOREIRA *et al.*, 2000). Portanto, as cascas do tronco são mais promissoras do que as folhas para o isolamento de substâncias com atividade antiinflamatória.

Das duas substâncias testadas, apenas a lactona 11 $\alpha$ H,13-diidrozaluzanin C (**GPC3**) mostrou atividade antiinflamatória. As lactonas sesquiterpênicas estão entre os princípios ativos de muitos fármacos usados tradicionalmente como antiinflamatórios. Outras lactonas sesquiterpênicas também apresentaram essa atividade como partenolido, helenalina; 11 $\alpha$ ,13-diidrohelenalina, entre outras (JULIANA *et al.*, 2010; LYB *et al.*, 1998).

Nossos resultados contribuem para validar o uso desta planta para o tratamento de afecções respiratórias, uma vez que foi demonstrada a eficácia desta sobre o modelo de inflamação induzida na pleura.

Os resultados de ensaios de atividade vasorrelaxante mostraram que dentre as frações do extrato EtOH ativo, a atividade estava concentrada na fração em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. No entanto, os compostos puros testados, provenientes desta fração ativa, foram inativos. Mais uma vez, podemos entender que estes compostos podem ter deixado de apresentar sua atividade quando isolados; ou que os compostos ativos são minoritários no extrato.

Este estudo demonstra o grande potencial farmacológico de *G. polymorpha* ssp. *floccosa* na busca por novos compostos biologicamente ativos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, M.; KUSAKA, H.; OHARA, H.; KAHEI, T.; HIROAKI, Y.; YANAGI, Y. *Studies on the syntheses of sesquiterpene lactones. 11. The syntheses of 3-epizaluzanin C, zaluzanin D, and related compounds 3.alpha.-hydroxyguaia-1(10),4(15),11(13)-trieno-12,6.alpha.-lactone and 3.alpha.-hydroxyguaia-4(15),9,11(13)-trieno-12,6.alpha.-lactone.* J. Org. Chem., v. 54, n. 8, p. 1952-1960, 1989.

ARAMBARRI, A. M.; FREIRE, S. E.; COLARES, M. N.; BAYON, N.D.; NOVOA, M.C.; MONTI, C.; STENGLEIN, S. A. *Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from misiones Forest of the Paranaense province (Argentina). Part 2.* Bol. Soc. Argent. Bot., v. 43, n.1-2, p.31-60, 2008.

BOHLMANN, F.; AHMED, M.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. *Dimeric sesquiterpene lactones and kolavane derivatives from Gochnatia paniculata.* Phytochemistry, v. 22, n. 1, p. 191-195, 1983.

BOHLMANN, F.; ANG, W.; TRINKS, C.; JAKUPOVIC, J.; HUNECK, S. *Dimeric guaianolides from Artemisia sieversiana.* Phytochemistry, v. 24, n. 5, p. 1009-1015, 1985.

BOHLMANN, F.; CHEN, Z. *Guaianolides from Ainsliaea fragans.* Phytochemistry, v. 21, n. 8, p. 2120-2122, 1982.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; ROBINSON, H.; KING, R. M. *Five germacranolides from Gochnatia discoidea.* Phytochemistry, v. 20, n. 1, p. 109-112, 1981.

BOHLMANN, F.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. *Germacranolides from Gochnatia vernonioides.* Phytochemistry, v. 23, n. 9, p. 1989-1993, 1984.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. *Neue germacranolide und andere inhaltsstoffe aus vertretern der subtribus gochnatiinae.* Phytochemistry, v. 18, n. 1, p. 95-98, 1979.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; JAKUPOVIC, J.; DOMINGUEZ, X. A.; KING, R. M.; ROBINSON, H. *Dimeric guaionolides and other constituents from Gochnatia species.* Phytochemistry, v. 25, n. 5, p. 1175-1178, 1986.

BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem., v. 72 p. 248-254, 1976.

BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O.; COSTA, R. B.; POTT, A.; POTT, V. J.; SHCEIDT, G. N.; BATISTA, M. S. *Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil.* Acta Bot. Bras., v. 19, n. 1, p. 39-44, 2005.

CABRERA, L. A. & KLEIN, R.M. *Compostas - tribo Mutisieae*, in Reitz, R. *Flora Ilustrada Catarinense*, Ed. por Raulino Reitz, p. 1-124, 1973.

CAMPELLO, J. DE PAIVA.; MARSALIOI, A. J. *Terebenthifolic acid and bauerenone: new triterpenoid ketones from Schinus terebenthifolius*. *Phytochemistry*, v. 14, p. 2300-2302, 1975.

CANCELLI, R. R.; EVALDT, A. C. P.; BAUERMANN, S. G. *Contribuição à morfologia polínica da família asteraceae martinov. no Rio Grande do Sul - Parte I*. *Pesquisas, Botânica*. São Leopoldo: Instituto Anchietano de Pesquisas, n. 58, p. 347-374, 2007.

CATALAN, C.A.N.; BORKOSKY, S.A. e NATHAN, P.J. (1996) *The secondary metabolite chemistry of the subtribe Gochnatiinae (Tribe Mutisieae, Family Compositae)*. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 24, n. 7/8, p. 659-718, 1996.

CATALAN, C. A. N.; VEGA, M. I.; LOPEZ, M. E.; CUENCA, M. R.; GEDRIS, T. E.; HERZ, W. *Coumarins and a kaurane from Gochnatia polymorpha ssp. Polymorpha from Paraguay*. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 31, p. 417-22, 2003.

CHAKRAVARTY, A. K.; DAS, B. *Peracid induced oxidative rearrangements of triterpenoids: Products of new skeleton from bauerenyl acetate*. *Tetrahedron*, v.54, p. 6065-6078, 1998.

CRONQUIST, A., *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia Univ. Press, 1981.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. *Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents*. *Agents Actions*, v. 26, p. 335-341, 1989.

DEWICK, P.M., *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Chichester: 2<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, Ltda, 2002.

DURIGAN, G.; FIGLIOLIA, M. B.; KAWABATA, M.; GARRIDO, M. A. O.; BAITELLO, J. B. *Sementes e mudas de árvores tropicais*. 2<sup>a</sup> ed., São Paulo: Instituto Florestal, p.65, 2002.

FAINI, F.; TORRES, R.; CASTILLO, M. *Costunolide and flavonols from Gochnatia foliolosa var. fascicularis*. *J. Nat. Prod.*, v. 47, n. 3, p.552, 1984.

FARIAS, A. C. M.; DA SILVA, J. R.; TOMASSINI, T. C. B. *Constituents of mochinea polymorpha*. *J. Nat. Prod.*, v. 47, 363-364, 1984.

FILHO, R. B. *Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente*. *Quím. Nova*, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A.. *Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para otimização da atividade*. *Quím. Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

GARCIA, E. E.; GUERREIRO, E. *Sesquiterpene lactones from Gochnatia palosanto and coumarins from G. argentina*. *Phytochemistry*, v. 27, n. 1, p. 288-290, 1988.

GARCIA, E. E.; GUERREIRO, E.; JOSEPH-NATHAN, P. *Ent-pimaradiene diterpenes from Gochnatia glutinosa*. *Phytochemistry*, v. 24, n. 12, p. 3059-3060, 1985.

GARCIA, E. S. *Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde*. Cad. Saúde Públ., Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 495-500, 1995.

GARLET, T. M. B. & IRGANG, B. E. *Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil*. Rev. Bras. Pl. Med., v. 4, n. 1, p. 9-18, 2001.

GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; DE LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; DE CARVALHO, M. G.; FILHO, R. B. *Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos Jatrolonas A e B*. Quím. Nova, v. 16, n. 2, p. 95-100, 1993.

HARBONE, J.B. *Phytochemical Methods. A guide to Modern Technique of Plant Analysis*, 3<sup>th</sup> ed., Chapman & Hal, London, 1998.

HENRIQUES, M.G.; SILVA, P.M.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S. *Mouse paw edema. A new model for inflammation?* Braz. J. Med. Biol. Res., v. 20, n. 2, p. 243-249, 1987.

HOENEISEN, M.; BECKER, H. *New germacranolide from *Gochnatia foliolosa* var. *foliolosa**. J. Nat. Prod., v. 49, n. 2, p.360-361, 1986.

JAIN, N. K.; KULKARNI, S. K. *Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Tanacetum parthenium* L. extract in mice and rats*. J. Ethnopharmacol., v. 68, p. 251–259, 1999.

JULIANA, C.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; DATTA, P.; SOLORZANO, L.; YU, J.; MENG, R.; QUONG, A. A.; LATZ, E.; SCOTT, C. P.; ALNEMRI, E. S. *Anti-inflammatory compounds parthenolide and bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome*. J. Biol. Chem., v. 285, n. 13, p. 9792-9802, 2010.

KATINAS, L.; PRUSKI, J.; SANCHO, G.; TELLERIA, M. C. *The subfamily Mutisioideae (Asteraceae)*. Bot. Rev., v. 74, p. 551-559, 2008.

KEELER, R. F.; TU, A. T. *Plant and fungal toxins*. Handbook of natural toxins, v. 1, p. 543-554, Marcel Dekker, Inc, 1983.

LIMA, M. C. L.; LEMOS, T. L. G.; FILHO, R. B.; PESSOA, O. D. L. *Chemical constituents from the flowers of *Gochnatia blanchetiana* (DC) Cabrera*. Rev. Latinoamer. Quim., v. 31, n.3, p.85-88, 2003.

LIMA, S. R.; OLIVEIRA, G. S.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. *Estudo dos constituintes macromoleculares, extrativos voláteis e compostos fenólicos da madeira de candeia – *Moquinia polymorpha* (Less) DC*. Ciencia Florestal (Santa Maria), v. 17, n.2, p.145-155, 2007.

LIN, YUN-LIAN; CHANG, CHIA-CHUAN; LEE, I-JUNG. *Rewiew on Phytochemical study of Asteraceae in Taiwan (1996~2005)*. J. Chin. Med., v. 19, n. 3/4, p. 135-149, 2008.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4ª ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1, p.368, 2002.

LYB, G.; KNORRE, A.; SCHMIDT, T. J.; PAHL, H.; MERFORT, I. *The Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactone Helenalin Inhibits the Transcription Factor NF- $\kappa$ B by Directly Targeting p65*. J. Biolog. Chem., v. 273, n. 50, p. 33508-33516, 1998.

MACARI, P. T. A.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. S. *Identificação dos triterpenos de Miconia albicans Triana através de análise por microcomputador*. Quím. Nova, v. 13, p. 260-262, 1990.

MALDONADO, E.; FLORES, A. M.; ORTEGA, A. *A germacranolide from Gochnatia hypoleuca and its transformation into a melampolide*. Phytochemistry, v. 27, n. 3, p. 861-863, 1988.

MOREIRA, A. S.; SPITZER, V.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SCHENKEL, E. P. *Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of Gochnatia polymorpha*. Phytother. Res., v. 14, p. 638-640, 2000.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. *Medicinal Plants of Brazil*, Michigan: Reference Publications Inc., p. 60, 2000.

NEERMAN, M. F. *Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties*. Int. J. Aromather., v. 13, n. 2/3, p. 114-120, 2003.

OKANO, A.; NOMURA, Y.; TEZUKA, T. *Identification of bauerenyl in solidago altissima*. J. Nat. Prod., v. 46, n. 5, p.750-751, 1983.

OLEA, R.S.G., ROQUE, N.F. *Análise de misturas de triterpenos por RMN de  $^{13}$ C*. Quím. Nova, v. 13, p. 278-281, 1990.

ORTEGA, A. & MALDONADO, E. *Guaianolides from Gochnatia smithii*. Phytochemistry, v. 23, n. 7, p. 1507-1509, 1984.

OWOYELE, V.B.; OLORIEGBE, Y.Y.; BALOGEN, E.A. *Analgesic and anti-inflammatory properties of Nelsonia canescens leaf extract*. J. Ethnopharmacol., v. 99, p. 153-156, 2005.

PINTO, C.A.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A. *Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas*. Quím. Nova, v. 25, p. 45-61, 2002.

RATES, S.M.K. *Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia*. Rev. Bras. Farmacogn., v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A; SILVA-SANTOS, J. E. *Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of Maytenus ilicifolia Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves*. J. Ethnopharmacol., v.104, p.328–335, 2006.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. *Biological activities of sesquiterpene lactones*. Phytochemistry, v.15, n. 11, p. 1573-1580, 1976.

SACILOTTO, A. C. B.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. *Ent-kaurene diterpenes from Gochnatia polymorpha var. polymorpha*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 4, p. 659-661, 1997.

SILVA-SANTOS, J. E.; SILVA, M. C. S.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J. *The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v 300, p. 946-951, 2002.

SPECTOR, W.G. *The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation*. *J. Pathol. Bact.*, v. 72, p. 367-80, 1956.

STEFANELLO, M.E.A. *Avaliação Estatística de Plantas Mediciniais*. Tese de doutoramento, Universidade de São Paulo, 1993.

STEFANELLO, M.E.A.; CERVI, A.C.; WISNIEWSKI JR, A. e SIMIONATTO, E.L. *Óleo essencial de Gochnatia polymorpha (LESS) CABR. ssp. floccosa CABR*. *Quím. Nova*, v. 29, p. 999-1002, 2006<sup>a</sup>.

STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y. e MACARI, P.A.T. *Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de Gochnatia polymorpha ssp. floccosa*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, p. 525-530, 2006<sup>b</sup>.

TOMASSINI, T. C. B.; GILBERT, B.  *$\alpha$ -Cyclocostunolide and dihydro- $\beta$ -costunolide from Moquinea velutina*. *Phytochemistry*, v. 11, p. 1177-1179, 1972.

VERDI, L. G., BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. *Gênero Baccharis (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos*. *Quím. Nova*, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

YBARRA, M. I.; CATALAN, C. A. N.; DÍAZ, J. G.; HERZ, W. *Two homofarnesane derivatives and other constituents from Gochnatia glutinosa*. *Phytochemistry*, v. 35, n. 6, p. 1585-1587, 1994.

YBARRA, M. I.; CATALAN, C. A. N.; GUERREIRO, E.; GUTIÉRREZ, A. B.; HERZ, W. *Deoxyelephantopin and 2-Epideoxyelephantopin analogues from Gochnatia palosanto*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 6, p. 2020-2024, 1990.

YOSHIOKA, H.; MABRY, T. J.; TIMMERMANN, B. N. *Sesquiterpene lactones. Chemistry, NMR and Plant distribution*. University of Tokyo Press, Japan, 1973.

WRIGHT, M.; MCLNNES, A.G.; SHIMIZU, S.; SMITH, D.G.; WALTER, J.A.; IDLER, D.; KHALIL, W. *Identification of C-24 Alkyl Epimers of Marine Sterols by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. *Can. J. Chem.*, v. 56, p. 1893-1903, 1978.