UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lupinus lanatus*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alexandre Tiburski Neto

Santa Maria, RS, Brasil

2011

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lupinus lanatus*

por

Alexandre Tiburski Neto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de

MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil

2011

Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós-Graduação em Química

A comissão Examinadora, abaixo assinada,

aprova a Dissertação de Mestrado

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lupinus lanatus*

Elaborada por

Alexandre Tiburski Neto

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

_____

Ademir Farias Morel, PhD.

(Presidente/Orientador)

_____

Ionara Irion Dalcol, PhD. (UFSM)

_____

Fabiana Cristina Missau, PhD. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 10 de janeiro de 2011

DEDICATÓRIA

Este trabalho e dedicado a Evaldo Tiburski e Odila Bossoni Tiburski

Pelas lições de vida,

Por todo o carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Muitas foram às pessoas que tornaram este trabalho exeqüível, tanto em seu aspecto profissional, quanto em seu aspecto pessoal, onde um complementou o outro. Além de fazer um agradecimento especial a quem se mostrou uma pessoa altamente profissional e científica, amiga e conselheira, a qual foi fonte de modelo adotado no desenvolvimento deste trabalho, Professor-orientador Ademir Farias Morel, que possibilitou o desenvolvimento de minha proposta de estudo e pesquisa através de seu conhecimento e de sua experiência; a ele o obrigado pelo respaldo a todos os questionamentos técnico-científico exigidos para viabilizar o desenvolvimento deste tema e pela confiança depositada.

As Professoras Ionara I. Dalcol e Fabiana C. Missau, pelas importantes contribuições, apoio e disponibilidade durante a trajetória deste estudo; a eles o obrigado pela consideração e apreço.

Estendo também os meus agradecimentos à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em química, em especial, ao senhor Ademir Sartori, e aos demais Docentes do Curso de química da Universidade Federal de Santa Maria, com especial apreço e gratidão, pelo conhecimento técnico-científico doutrinário e legal, transmitidos no decorrer do curso, bem como a equipe técnica-administrativa desta IES e aos colegas de curso que direta ou indiretamente promoveram o intercâmbio de idéias, favorecendo a produção deste estudo. Um apreço especial aos órgãos financiadores, CAPES e CNPq, por proporcionar as condições necessárias para a realização dessa pesquisa.

Aos amigos pessoais, Carlos E. Blanco Linares, Daniel Scapin Sandro R. Giacomelli, Alexandre Shubert, Mario Jose Juges, Karine Arend, Vinicius, Marcelo, Carolina, Caroline, Tanise, Denise e Ubiratan, Janice, Karine, Lú, Nalin, que em um gesto de solicitude, desprendimento e amizade, materializaram seu apoio através de palavras e sentimentos de carinho, fortaleceram a trajetória de mais esta etapa de vida.

Aos meus irmãos, Giovane e Analisa, sobrinho, Lucas, cunhados, Katiane, Lindomar e Gabriel, parentes e minha namorada, Luma, com quem pude durante esta etapa dividir minhas alegrias e aflições, os meus mais singelos votos de gratidão.

Não menos importante, gostaria de expressar a minha eterna gratidão aos meus queridos pais, pelo incentivo constante, apoio incondicional e afeição, que de todas as formas possíveis me proporcionaram a oportunidade de crescer plenamente como ser humano.

E, finalmente a Deus, por ter me colocado todas estas pessoas maravilhosas no meu caminho e por me proporcionar saúde física e mental, coragem, paciência e perseverança, para enfrentar o dia-a-dia, e por ter iluminado e garantido a saúde de todas estas pessoas, que neste período, talvez, tenham me ensinado mais sobre a vida do que eu tenha lhes oferecido.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Química

Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lupinus lanatus*

Autor: Alexandre Tiburski Neto

Orientador: Ademir Farias Morel

Como parte da nossa busca permanente por novos metabólitos secundários bioativos de origem vegetal, as partes aéreas de *Lupinus lanatus* foram submetidas a investigação fitoquímica. O gênero *Lupinus*, pertencente à família das leguminosas (*Fabaceae*), é amplamente distribuída no sul e oeste da América do Norte, na região mediterrânica e na África, representado por cerca de 600 espécies. No Rio Grande do Sul, Brasil, o gênero está representado por 13 espécies, entre elas, *L. lanatus*. Este apresenta-se como um pequeno arbusto e está presente na América do Sul, no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina. No Rio Grande do Sul, *L. lanatus* é conhecido popularmente Tremoço, e seu gênero é utilizado na medicina popular como agente antidiabético, antitumoral, antifúngico e antioxidante. Os alcalóides Quinolizidínicos, como lupanina, multiflorina, esparteína e argirina, são amplamente distribuídas em plantas do gênero. Seus efeitos biológicos, como antiarrítmicos, hipoglicemiante, hipotensor, depressor do SNC, alucinógenos e estimulante respiratório, entre outros, tem sido amplamente estudados. No presente trabalho, é descrito o isolamento e elucidação estrutural de um novo alcalóide quinolizidínico, Lanatina A, juntamente com o 13-α-cinnamoiloxilupanina e 13-α-hidroxilupanina oriundos das folhas, e (-)multiflorina e (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina isolados a partir das sementes de *L. Lanatus.*

Palavras-chave: *Lupinus lanatus,* Quinolizidínicos, Lanatina A, *Leguminoseae, Faboideae.*

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Post-Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria

PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Lupinus lanatus*

Author: Alexandre Neto Tiburski
Academic Advisor: Ademir Farias Morel

As a part of our ongoing search of new bioactive secondary metabolites of plant origin, the aerial parts of *Lupinus lanatus* were subjected to phytochemical investigation. *Lupinus* genus, belonging to the family of Leguminosae (Fabaceae), is widely distributed in south and western North America, in the Mediterranean region and Africa, with approximately 600 species. In Rio Grande do Sul, Brazil, the genus is represented by 13 species, among them, *L. lanatus.* This is a small shrub native to South America, mainly south Brazil (Rio Grande do Sul), Uruguai, Paraguai and Argentine. In Rio Grande do Sul, *L. lanatus* is called *tremoço*, and it is used in folk medicine as an antidiabetic, antifungal, antitumor and antioxidant agent. Quinolizidine alkaloids, such as lupanine, multiflorine, sparteine and argirine, are widely distributed in plants of the genus. Their biological effects, as antiarrhythmic, hypoglycemic, hypotensive, depressing CNS, hallucinogenic and respiratory stimulant activities, among others, has been studied previously. In the present paper, we describe the isolation and structural elucidation of a new quinolizidine alkaloid, lanatine A together with 13-α-cinnamoyloxylupanine, and hydroxylupanine from the leaves, and (-)multiflorine and (-)13-α-*cis*-tigloyloxymultiflorine from the seeds of *L. lanatus*.

Keywords: *Lupinus lanatus*, Quinolizidine, Lanatine A, *Leguminosae, Faboideae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Núcleos dos alcalóides comumente encontrados no Gênero L*upinus*: (1) lupanina, presente em todos os lupinos; (2) multiflorina, lupinos do velho mundo da América do Sul e (3) lupinina espécies de lupinos do velho mundo e da América do norte.....2

Figura 2 - *Lupinus lanatus*.....3

Figura 3 - Estrutura Química de Alcalóides Quinolizidínicos Biologicamente Ativos.....9

Figura 4 - Esquema de Fracionamento das Sementes de *Lupinus lanatus*.....24

Figura 5 - Esquema de Fracionamento das Folhas de *Lupinus lanatus*.....30

Figura 6 - Método de Diluição Utilizado na Determinação da CIM.....40

Figura 7 - Redução do DPPH via Radical Livre.....44

Figura 8 - Gráfico da Atividade Antioxidante do Extrato Bruto e Frações de *Lupinus lanatus*.....56

Figura 9 - Estrutura Química do Alcalóide (-)multiflorina.....57

Figura 10 - Estrutura Química do Alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina.....59

Figura 11 - Espectro de RMN ^{1}H do composto (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....61

Figura 12 - Espectro de RMN de ^{1}H expandido (região de δ 5,0 a δ 7,35 ppm) de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....62

Figura 13 - Espectro de RMN de ^{1}H expandido (região de δ 1,5 a δ 3,8 ppm) do alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....63

Figura 14 - Espectro de RMN de ^{1}H expandido (região de δ 0,8 a δ 2,7 ppm) do alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....64

Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.....66

Figura 16 - Espectro de RMN de correlação ^{1}H - ^{1}H COSY de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 25 ºC.....67

Figura 17 - Espectro de RMN de correlação ^{1}H – ^{13}C HMQC de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 25 ºC.....68

Figura 18 - Estrutura Química do Alcalóide (+)13-α-hidroximultiflorina.....71

Figura 19 - Estrutura química de (+)13α-*trans*-cinamoiloxilupanina.....74

Figura 20 - Espectro de RMN ^{1}H do composto (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....75

Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C de (+)13α-*trans*-cinamoiloxilupanina em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.....77

Figura 22 - Espectro de Massas ESIMS/CG/EM de (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina.....79

Figura 23 - Estrutura Química do Alcalóide Lanatina A.....80

Figura 24 - Espectro de RMN ^{1}H do composto Lanatina A em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....82

Figura 25 - Espectro de RMN de ^{1}H de Lanatina A expandido (região de δ 6,60 a δ 7,90 ppm) $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 º.....83

Figura 26 - Espectro de RMN de ^{1}H de Lanatina A, expandido (região de δ 4,50 a δ 5,80 ppm) $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....84

Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C de Lanatina A em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC..86

Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C de Lanatina A expandido (região de δ 111,0 a δ 117,0 ppm) $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.....87

Figura 29 - Espectro de RMN 2D COSY ^{1}H – ^{1}H de Lanatina A.....88

Figura 30 - Espectro de RMN 2D COSY ^{1}H – ^{1}H de Lanatina A expandido (δ 6,60 a δ 8,40 ppm).....89

Figura 31 - Espectro de RMN 2D ^{13}C - ^{1}H HETCOR de Lanatina A.....91

Figura 32 - Espectro de massas ESIMS/CG/EM de Lanatina A.....92

Figura 33 - Espectro de Infravermelho de (+)Lanatina A.....93

Figura 34 - Estrutura Química de Lanatina A obtida por Difração de Raios-X.....94

Figura 35 - Espectro de RMN ^{1}H do composto (-)multiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....106

Figura 36 - Espectro de RMN ^{13}C do composto (-)multiflorina em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.....107

Figura 37 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H Expandido (região δ 0,5 a δ 4,5 ppm) do composto (-)13α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$.....108

Figura 38 - Espectro de RMN ^{1}H do composto (+)13-α-Hidroxilupanina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....109

Figura 39 - Espectro de RMN ^{13}C do composto (+)13-α-Hidroxilupanina em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.....110

Figura 40 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido (região δ 1,5 a δ 8,5 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....111

Figura 41 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido (região δ 0,0 a δ 10,0 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....112

Figura 42 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido (região δ 0,5 a δ 7,5 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....113

Figura 43 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido (região δ 0,0 a δ 10,0 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....114

Figura 44 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{13}C, HETCOR, Expandido (região δ 60,0 a δ 155,2 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....115

Figura 45 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{13}C, HETCOR, Expandido (região δ 15,0 a δ 77,0 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....116

Figura 46 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{13}C, HETCOR, do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....117

Figura 47 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido (região δ 1,2 a δ 3,8 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....118

Figura 48 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido (região δ 0,5 a δ 6,0 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....119

Figura 49 - Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido (região δ 6,0 a δ 8,5 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.....120

Figura 50 - Espectro de RMN ^{1}H - ^{1}H, COSY, do composto (+)LanatinaA em $CDCl_3$..121

Figura 51 - Espectro de RMN de ^{1}H Expandido (região δ 1,0 a δ 3,5 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....122

Figura 52 - Espectro de RMN de ^{1}H Expandido (região δ 1,5 a δ 3,4 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....123

Figura 53 - Espectro de RMN de ^{1}H Expandido (região δ 4,5 a δ 5,8 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....124

Figura 54 - Espectro de RMN de ^{1}H Expandido (região δ 6,6 a δ 7,9 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.....125

Figura 55 - Espectro de RMN, DEPT 90, do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$.....126

Figura 56 - Espectro de RMN, DEPT 90, Expandido (região δ 20,0 a δ 80,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$.....127

Figura 57 - Espectro de RMN, DEPT 90, Expandido (região δ 0,0 a δ 160,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$.....128

Figura 58 - Espectro de RMN de ^{13}C Expandido (região δ 15,0 a δ 70,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.....129

Figura 59 - Espectro de RMN de ^{13}C Expandido (região δ 115,0 a δ 175,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.....130

Figura 60 - Espectro de RMN de ^{13}C Expandido (região δ 115,0 a δ 175,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.....131

Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C Expandido (região δ 110,0 a δ 117,2 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.....132

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Exemplos de Atividades Biológicas de Alcalóides Quinolizidínicos.....9

TABELA 2 - Alcalóides Quinolizidínicos Isolados de Espécies de *lupinus*.....13

TABELA 3 - Sistemas de Reagentes e Solventes mais Utilizados nos Ensaios Cromatográficos.....21

TABELA 4 - Frações Reunidas após Comparação por CCD da Fração Etérea Básica de *Lupinus lanatus*.....26

TABELA 5 - Frações Reunidas após Comparação por CCD da Fração Dicloro Básica de *Lupinus lanatus*.....33

TABELA 6 **-** Microorganismos Indicadores.....39

TABELA 7 - Rendimento do Óleo Fixo e das Frações Obtidas do Extrato Bruto das Sementes de *Lupinus lanatus*.....46

TABELA 8 - Rendimento das Frações Obtidas do Extrato Bruto das Folhas de *Lupinus lanatus*.....47

TABELA 9 - Atividade Antimicrobiana do Óleo Fixo, Estrato Bruto e Fração Etérea Básica das Sementes de *Lupinus lanatus* em μg/mL.....48

TABELA 10 - Atividade Antimicrobiana de (-)multiflorina e (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina Isoladas das Sementes de *Lupinus lanatus* em μg/mL.....50

TABELA 11 - Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto, Fração Hexânica Neutra e Fração Diclorometano Neutra Obtidas das Folhas de *Lupinus lanatus* em μg/mL.....52

TABELA 12 - Atividade Antimicrobiana das Frações Acetato de Etila, n-butanol e Diclorometano Básica Obtidas das Folhas de *Lupinus lanatus* em μg/mL.....53

TABELA 13 - Atividade Antimicrobiana dos Compostos Isolados e Identificados, (**36**) (+)13α-hidroxilupanina, a (**37**) (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina e (**38**)Lanatina A, da Fração Básica do Extrato Bruto das Folhas de *Lupinus lanatus* em µg/mL.....55

TABELA 14 - Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C Obtidos da Amostra Isolada das Sementes de *Lupinus lanatus* Comparados aos dados de RMN de ^{13}C da Literatura[37].....58

TABELA 15 - Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C Obtidos da Amostra Isolada da Fração Etérea Básica do Extrato Bruto das Sementes Comparados aos da Literatura[8].....70

TABELA 16 - Dados de RMN de ^{13}C Obtidos para (+)13-α-hidroxilupanina Comparada com os Dados de (+)lupanina da Literatura[11], Ambos em $CDCl_3$.....73

TABELA 17 - Dados de RMN de ^{13}C Obtidos de (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina Comparada com os Dados de (+)lupanina da Literatura[11, 40].....78

TABELA 18 - Dados Cristalográficos de (+)Lanatina A.....95

TABELA 19 - Dados Cristalográficos Referentes a Estereoquímica do Alcalóide (+)Lanatina A.....96

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Proposta de Biossíntese para os Alcalóides Quinolizidínicos.....12

Esquema 2 - Proposta para a rota biossintéica dos alcaloódes quinolizidínicos de *Lupinus lanatus*.....97

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Espectro de RMN de ^{1}H do Alcalóide (-)multiflorina.....106

ANEXO 2 - Espectro de RMN de ^{13}C do Alcalóide (-)multiflorina.....107

ANEXO 3 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H Expandido do Alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina.....108

ANEXO 4 - Espectro de RMN de ^{1}H do Alcalóide (+)13-α-Hidroxilupanina.....109

ANEXO 5 - Espectro de RMN de ^{13}C do Alcalóide (+)13-α-Hidroxilupanina.....110

ANEXO 6 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....111

ANEXO 7 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....112

ANEXO 8 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....113

ANEXO 9 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....114

ANEXO 10 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....115

ANEXO 11 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....116

ANEXO 12 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{13}C do Alcalóide (+)Lanatina A....117

ANEXO 13 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....118

ANEXO 14 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....119

ANEXO 15 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....120

ANEXO 16 - Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, COSY, do Alcalóide (+)Lanatina A.....121

ANEXO 17 - Espectro de RMN de ^{1}H Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....122

ANEXO 18 - Espectro de RMN de ^{1}H Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....123

ANEXO 19 - Espectro de RMN de ^{1}H Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....124

ANEXO 20 - Espectro de RMN de ^{1}H Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....125

ANEXO 21 - Espectro de RMN, DEPT 90, do Alcalóide (+)Lanatina A.....126

ANEXO 22 - Espectro de RMN, DEPT 90, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....127

ANEXO 23 - Espectro de RMN, DEPT 90, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....128

ANEXO 24 - Espectro de RMN de ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....129

ANEXO 25 - Espectro de RMN de ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....130

ANEXO 26 - Espectro de RMN de ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....131

ANEXO 27 - Espectro de RMN de ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A.....132

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MHz	Mega Hertz
TMS	Tetrametilsilano
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
UV	Ultravioleta
IV	Infravermelho
EM	Espectrometria de Massas
DEPT	Distorsioniess Enhancement by Polarization Tranfer
COSY	Correlated Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ºC	Graus Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
FDA	Food and Drug Administration
CIM	Concentração Inibitória Mínima
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
CLM	Concentração Letal Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
UFC	Unidade Formadora de Colônias
Rf	Fator de Retenção

δ	Deslocamento químico
ppm	Parte por milhão
PFº	Ponto de fusão
s	Singleto
d	Dubleto
t	Tripleto
m	Multipleto
m/z	Relação massa/carga

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....1
2 OBJETIVOS.....4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....5
3.1 FAMÍLIA *Fabaceae* ou *Leguminoseae*.....5
3.2 GÊNERO *Lupinus*.....6
3.3 USO POPULAR DO GÊNERO *Lupinus*.....7
3.4 ALCALÓIDES QUINOLIZIDÍNICOS PRESENTES EM ESPÉCIES DE *Lupinus*.....8
3.5 BIOSSÍNTESE DOS ALCALÓIDES QUINOLIZIDÍNICOS.....10
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....17
4.1 INSTRUMENTOS UTILIZADOS.....17
4.1.1 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....17
4.1.2 Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG/EM).....17
4.1.3 Espectrômetro de Difração de Raios-X.....18
4.1.4 Espectrômetro de Infravermelho.....18
4.1.5 Aparelho de Ponto de Fusão.....18
4.1.6 Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro.....19
4.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS.....19
4.2.1 Cromatografia em Coluna (CC).....19
4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Preparativa (CCDP).....19
4.3 REAGENTES E MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADOS.....20
4.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Lupinus lanatus*.....22
4.5 SECAGEM, EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO.....22
4.6 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DAS SEMENTES.....23
4.6.1 Análise das Frações Obtidas.....24
4.6.1.1 Frações Neutras Obtidas.....24
4.6.1.2 Fração Etérea Básica das Sementes.....25

4.6.2. Substâncias Isoladas e Identificadas da Fração Etérea Básica das Sementes de *Lupinus lanatus*.....27

4.6.2.1 (-)Multiflorina.....27

4.6.2.2 (-)13-α-Tigloiloximultiflorina.....28

4.7 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Lupinus lanatus*.....29

4.7.1 Análise das Frações Obtidas.....31

4.7.1.1 Frações Neutras Obtidas.....31

4.7.1.2 Fração diclorometano Básica.....31

4.7.2 Substâncias Isoladas e Identificadas da Fração Dicloro Básica das Folhas de *Lupinus lanatus*.....34

4.7.2.1(+)13-α-Hidroxilupanina.....34

4.7.2.1.1Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C de (+)13-α-Hidroxilupanina.....35

4.7.2.2(+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina.....35

4.7.2.3(+)Lanatina A.....36

4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*.....38

4.8.1 Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Micro-diluição.....38

4.8.1.1 Método de Determinação da Atividade da CIM.....39

4.8.1.2 Método de Concentração Letal Mínima.....41

4.8.1.3 Meios de Cultura Empregados.....41

4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....42

4.9.1 Método de Determinação da Atividade do Radical Livre DPPH.....42

4.9.2 Método Qualitativo, *screening*.....43

4.9.3 Método Quantitativo.....43

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....45

5.1 ANÁLISE DOS RENDIMENTOS DE FRACIONAMENTOS E EXTRATOS OBTIDOS DO MATERIAL COLETADO *Lupinus lanatus*.....46

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO FIXO, EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ETÉREA BÁSICA DAS SEMENTES DE *Lupinus lanatus*.....47

5.2.1 Atividade Antimicrobiana dos compostos Isolados da Fração Etérea Básica de *Lupinus lanatus*.....49

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES NEUTRAS, FRAÇÃO ETÉREA ÁCIDA E DOCLORO BÁSICA DAS FOLHAS DE *Lupinus lanatus*.....50

5.3.1 Atividade Antimicrobiana dos compostos Isolados da Fração Dicloro Básica de *Lupinus lanatus*.....54

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DAS SEMENTES E FOLHAS DE *Lupinus lanatus*.....55

5.5 METABÓLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ETÉREA BÁSICA DAS SEMENTES.57

5.5.1 Alcalóide (-)Multiflorina, RMN ^{1}H e ^{13}C.....57

5.5.2 Alcalóide (-)13-α-*cis*-Tigloiloximultiflorina.....59

5.5.2.1 Alcalóide (-)13-α-*cis*-Tigloiloximultiflorina, RMN de ^{1}H.....60

5.5.2.2 Alcalóide (-)13-α-*cis*-Tigloiloximultiflorina, RMN de ^{13}C.....65

5.5.2.3 RMN de correlação ^{1}H – ^{1}H (COSY).....66

5.5.2.4 RMN de correlação ^{1}H – ^{13}C (HMQC).....67

5.6 METABÓLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO DICLOROMETANO BÁSICA DAS FOLHAS DE *Lupinus lanatus*.....71

5.6.1 Alcalóide (+)13-α-Hidroxilupanina.....71

5.6.2 Alcalóide (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina.....74

5.6.2.1 Alcalóide (+)13-α-*trans*-Cinamoiloxilupanina, RMN de ^{1}H.....75

5.6.2.2 Alcalóide (+)13-α-trans-Cinamoiloxilupanina, RMN de ^{13}C.....76

5.6.2.3 Alcalóide (+)13-α-*trans*-Cinamoiloxilupanina, Espectrometria de Massas.....79

5.6.3 Alcalóide (+)Lanatina A ou (+)13-α-Antraniloxilupanina.....80

5.6.3.1 Alcalóide (+)Lanatina A ou (+)13-α-antraniloxilupanina, RMN de ^{1}H.....81

5.6.3.2 Alcalóide (+)Lanatina A ou (+)13-α-antraniloxilupanina, RMN de ^{13}C.....85

5.6.3.3 Alcalóide (+)Lanatina A, RMN correlação ^{1}H–^{1}H COSY.....88

5.6.3.4 Alcalóide (+)Lanatina A, RMN de correlação ^{13}C – ^{1}H HMBC.....90

5.6.3.5 Alcalóide (+)Lanatina A, Espectrometria de Massas.....92

5.6.3.6 Alcalóide (+)Lanatina A, Espectroscopia de Infravermelho.....93

5.6.3.7 Alcalóide (+)Lanatina A ou (+)13α-antraniloxilupanina, Difração de Raios-X.....94

6 CONCLUSÕES.....98

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....99

ANEXOS.....105

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas data desde o início da humanidade, sendo os derivados de origem vegetal, animal e mineral, os constituintes principais das bases da terapêutica nos primórdios da civilização. Atualmente, os fármacos derivados de plantas representam aproximadamente 25% dos fármacos prescritos mundialmente, sendo que, 80% das prescrições em países em desenvolvimento são produtos naturais, 50% são sintéticos, cujos, protótipos têm origem nos princípios isolados de plantas medicinais, e dos 252 fármacos considerados como essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são exclusivamente de origem vegetal.[1]

Com isso, o Brasil desponta como promissor para o avanço e descoberta de novos fármacos de origem vegetal com utilidade clínica, uma vez que este país possui a maior diversidade vegetal do mundo, contando com um número estimado entre 350.000 a 550.000 espécies. Entre estas, apenas 55.000 espécies vegetais foram catalogadas. Do número de espécies conhecidas, somente 8% foram estudadas na busca de compostos bioativos e aproximadamente 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais.[2]

Estes dados tornam-se significativos quando se demonstra a importância das plantas medicinais no tratamento e na prevenção de enfermidades, e também serve de estímulo para os estudos com espécies, as quais, o conhecimento popular de seus benefícios para a saúde humana, incentiva as pesquisas científicas com as mesmas. Dentre as espécies presentes no Rio Grande do Sul, pouco estudada em seus constituintes secundários, está *Lupinus lanatus* pertencente à família *Leguminoseae* ou *Fabaceae* e subfamília *Faboideae*.[2,3]

Uma característica universal dos lupinos, é que são plantas de habitats abertos e ensolarados e são intolerantes a muita proteção vegetal como nas florestas.[4] No Brasil não é diferente, as espécies de *Lupinus* são encontradas em solos pobres como os serrados e campos rupestres de cima da serra.[5]

Dentro do gênero *Lupinus,* os alcalóides quinolizidínicos perfazem boa parte da constituição química secundária da planta, juntamente com flavonóides, terpenos, entre outros compostos.[5,6] O interesse pelo isolamento e identificação desses alcalóides se dá devido ao grande significado quimiossistemático que eles desempenham para o gênero, além, das atividades farmacológicas potencialmente úteis para os mesmos, juntamente com a toxicidade que alguns apresentam para os humanos e animais após sua ingestão.[6,7]

Os alcalóides deste gênero possuem o núcleo quinolizidínico, norlupinano, derivados do aminoácido L-lisina. Dentre eles estão a (1) lupanina, a (2) multiflorina e a (3) lupinina como compostos majoritários (Fig. 1). Pode-se citar alguns exemplos de atividades biológicas referentes a essa classe de substâncias como: atividade Uterotônica, estimulante/depressora respiratória, anti-arrítmica, diurética, hipoglicemiante, depressora do SNC, teratogênica e alucinógena.[7-9]

Dessa forma, a partir dos dados apresentados, referente a estes compostos, despertou-se o interesse pelo estudo químico e farmacológico de *Lupinus lanatus,* por esta possuir uma alta concentração dessa classe de alcalóides.[2]

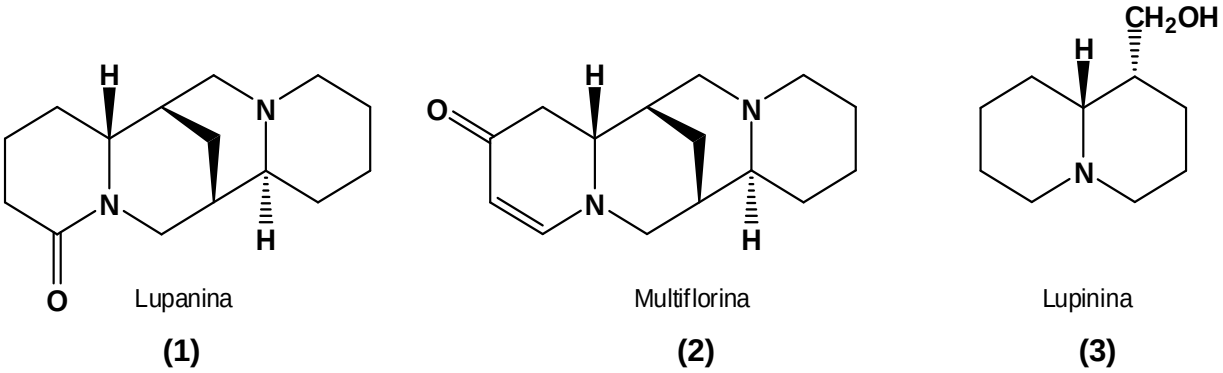


Figura 1. Núcleos dos alcalóides comumente encontrados no Gênero *Lupinus*: (1) lupanina, presente em todos os lupinos; (2) multiflorina, lupinos do velho mundo, e da América do Sul e (3) lupinina, espécies de lupinos do velho mundo e da América do norte.

Figura 2. *Lupinus lanatus.*

A literatura apresenta poucos registros de pesquisas com a espécie *Lupinus lanatus* (Fig. 2). Assim, tendo em vista o potencial do gênero *Lupinus* como agente antidiabético, antitumoral, entre outras atividades já realizadas para esse grupo de leguminosas, surgiu o interesse de estudar essa espécie e avaliar algumas atividades relacionadas ao seu gênero. O principal objetivo deste estudo foi o isolamento dos alcalóides presentes na mesma, os quais, fazem parte do grupo de alcalóides quinolizidínicos. Este estudo foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Maria que proporcionou total apoio a pesquisa. O trabalho junto ao grupo também teve o objetivo de ampliar o conhecimento fitoquímico e trazer uma nova classe de alcalóides, os quinolizidínicos, ainda não estudada pelo mesmo. Sob a orientação do professor Ademir Farias Morel e co-orientação da professora Ionara I. Dalcol, foi possível ampliar os conhecimentos sobre essa classe de compostos, bem como, avaliar o potencial desta espécie na medicina popular.

2. OBJETIVOS

A investigação química de *Lupinus lanatus* (*Leguminoseae*) teve como principais objetivos:

a) Isolar os metabólitos de características básicas, presentes nas partes aéreas de *Lupinus lanatus*, tendo como foco principal os alcalóides quinolizidínicos, os quais, estão presentes em alta concentração na espécie, a partir do extrato bruto metanólico.
b) Identificar estruturalmente os compostos isolados utilizando métodos comparativos e a aplicação de técnicas de RMN, ^{1}H, ^{13}C unidimensionais e bidimensionais como DEPT 90 e 135, NOESY, COSY, HMQC, HMBC, Espectrometria de Massas EI e Espectroscopia de Infravermelho.
c) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos das sementes e folhas, bem como suas frações e as substâncias puras isoladas e identificadas, através da metodologia de Micro-diluição em Caldo (MIC).
d) Avaliar a atividade antioxidante utilizando a técnica de DPPH dos extratos brutos e suas frações das partes aéreas, sementes e folhas de *Lupinus lanatus.*

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FAMÍLIA *Fabaceae* ou *Leguminoseae*

A família *Leguminoseae* ou *Fabaceae* é composta por uma ampla variedade de ervas, arbustos e árvores presentes em um grande número de habitats, incluindo aquáticas, xerófitas e trepadeiras. Esta família de plantas, depois da *Gramineae*, é a mais útil para o homem devido a alta concentração de proteínas em suas folhas e sementes.[9] Economicamente, também fica em segundo lugar perdendo somente para a *Gramineae*, e em tamanho ocupa o terceiro lugar atrás apenas de *Orquidaceae* e *Asteraceae*.[10]

A *Leguminoseae* compreende 18.000 espécies e 650 gêneros de plantas distribuídas por todas as partes do mundo. Mesmo sendo uma família cosmopolita, encontra-se em maior número nas regiões tropicais e subtropicais, sendo o Brasil, portador de 196 gêneros distribuídos por todas as regiões.[11-13]

A família *Fabaceae* apresenta-se dividida em três subfamílias bem distintas. A primeira subfamília é a *Caesalpinioideae*, na qual estão presentes 152 gêneros e cerca de 2.800 espécies distribuídas por regiões tropicais e subtropicais do globo. A segunda subfamília, em que a *Leguminoseae* está dividida, é a *Mimosoideae*, que compreende aproximadamente 60 gêneros e 2.800 espécies presentes nas regiões tropicais, subtropicais e cálido-temperadas. Por último, vem a subfamília *Papilionoideae* ou *Faboideae*, sendo esta, a maior de todas, possuindo aproximadamente 400 gêneros e mais de 12.000 espécies distribuídas em 32 tribos, estando representada pelas herbáceas, nas regiões temperadas e pelas espécies lenhosas em regiões tropicais. Essa subfamília possui as características mais avançadas dentro da família *Leguminoseae*.[13-15]

Fazendo parte da subfamília *Caesalpinioideae*, oito gêneros somente são conhecidos por formação de nódulos, e todos são árvores, enquanto na *Mimosoideae*,

todas as tribos apresentam representantes formadores de nódulos. Na *Faboideae*, a única tribo não formadora de nódulos é a *Dipterygeae*. A não formação de nódulos está relacionada a uma característica primitiva de todas as subfamílias da *Leguminoseae*.[15] A grande importância desta última subfamília (*Faboideae*), se dá, devido às sementes e legumes de muitas de suas espécies herbáceas servirem como fonte de alimento e proteínas para homens e animais em todo o globo. Como exemplos de espécies utilizadas para alimentação desta subfamília, pode-se citar: (*Pisum sativum*) ervilha, (*Cicer arietivum*) grão-de-bico, (*Phaseolus vulgaris*) feijão, (*Glycine max*) soja, entre outras.[3,15,16]

3.2 GÊNERO *Lupinus*

O gênero *Lupinus* é pertencente a família *Leguminoseae* e subfamília *Faboideae*. Este gênero apresenta-se como ervas ou arbustos que podem ser anuais ou perenes e estão presentes em grande número, principalmente no oeste da America do Norte, Alasca, México, Peru, Brasil, Uruguai e Argentina. Desta forma, o gênero *Lupinus* cobre uma ampla zona climática ao redor do globo, indo de regiões subárticas, Alasca, até regiões de clima tropical, subtropical e temperado, Brasil e Sul da Argentina respectivamente.[4,17]

As espécies de lupinos encontradas no Brasil estão presentes em solos pobres como os serrados e campos rupestres. Por sua característica quase singular de sobreviverem bem em ambientes abertos e ensolarados, são intolerantes a muita proteção vegetal. Nas florestas, encontram-se principalmente em regiões de clareiras como plantas primárias em solos recentemente perturbados e pobres de nutrientes.[5] Seu nome, *Lupinus*, vem do latim, *lúpus* (lobo), pela grande capacidade de adaptação em todos os tipos de ambientes sendo necessário, para isso, somente uma leve camada de solo.[14,15]

GLADSTONE (1998) separou os lupinos do velho mundo em dois grupos distintos baseando-se no tipo de revestimento, rugoso ou liso, de suas sementes, denominando assim os grupos de *rough-seed e smooth-seed* respectivamente, os quais, deram origem aos lupinos Americanos. Estes ainda podem ser divididos em dois grupos, os de folhas compostas ou multifolhados e os de folhas simples ou unifolhados.[4,16]

O gênero *Lupinus,* no Rio Grande do Sul, está representado por 13 espécies, sendo estas, distribuídas por todas as regiões, porém, com uma maior incidência nos campos de cima da serra onde são conhecidas popularmente como “tremoço”.[17]

3.3 USO POPULAR DO GÊNERO *Lupinus*

Os lupinos são utilizados mundialmente de diversas formas. No continente Americano, as sementes de *L. mutabilis* são largamente utilizadas na alimentação da população andina e comumente denominadas de *Tarwi ou chocho* por esse povo.[18] No Brasil as sementes de *L. angustifolius* foram utilizadas na falsificação de café. Já no continente Europeu, os *L. hirsutus e angustifolius* são usados na medicina popular como agentes antidiabéticos, devido suas propriedades hipoglicemiante.[19-21] Por fim, estas plantas também são utilizadas como forragem, adubo verde, ornamental e na alimentação a mais de 3.000 anos, principalmente as espécies de *L. albus, angustifolius, luteus* e algumas variedades de *L. mutabilis* por conterem uma baixa concentração de alcalóides, os quais, conferem um sabor amargo a planta, e possuírem um alto valor protéico.[22-24]

3.4 ALCALÓIDES QUINOLIZIDÍNICOS PRESENTES EM ESPÉCIES DE LUPINOS

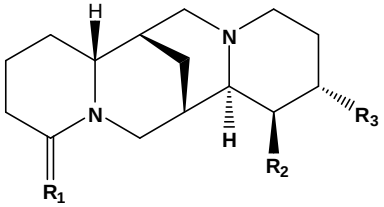
Este gênero de plantas possui em sua constituição secundária os alcalóides do tipo quinolizidínicos (norlupinano). Estes alcalóides são compostos de dois anéis saturados de seis membros divididos por um átomo de nitrogênio, e são derivados do aminoácido L-lisina e denominados de alcalóides lupínicos, devido sua larga ocorrência em plantas deste gênero. [25]

Esse grupo de alcalóides, representam para o gênero *Lupinus*, um importante papel quimiotaxonômico, pois estes estão presentes em todas as 56 espécies do gênero já estudadas em sua constituição secundária. Este estudo também determinou a presença de núcleos tetracíclicos em quase todas as espécies analisadas. Já o núcleo bicíclico, representado pela lupinina, é mais abundante nas espécies do Velho Mundo e da América do Norte. A multiflorina e seus derivados estão em maior concentração nos indivíduos localizados na America do sul. Os alcalóides quinolizidínicos com núcleo α-piridona estão presentes na subfamília *Faboideae*, porém ausentes nos lupinos, exceto os lupinos do Velho Mundo que apresentam traços desses compostos. As lupaninas fazem parte da constituição química secundária de todos os lupinos. Este gênero de plantas também produz alcalóides do tipo bipiperidínicos como amondedrina e seus derivados, os quais, são encontrados em espécies da America do Norte.[23,26-28]

A importância destes alcalóides também está relacionada com sua atividade tóxica para animais e humanos além de algumas atividades biológicas potencialmente úteis (TABELA 1, Fig. 3).[6,7]

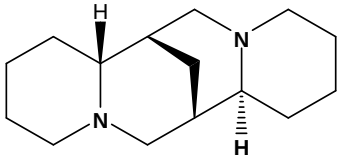
TABELA 1. Exemplos de Atividades Biológicas de Alcalóides Quinolizidínicos.

ALCALÓIDES	ATIVIDADES	REFERÊNCIAS
Esparteína	Ulcerotônica, Estimulante / Depressora Respiratória, Anti-arrítmica, Diurética e Hipoglicemiante	7, 8
Lupanina	Anti-arrítmica, Hipotensora e Hipoglicemiante	7
13-Hidroxilupanina	Anti-arrítmica, Hipotensora	7
Multiflorina	Depressora do SNC	7
Argirina	Teratogênica	7, 8
Cistisina	Teratogênica, Alucinógena e Estimulante Respiratório	7

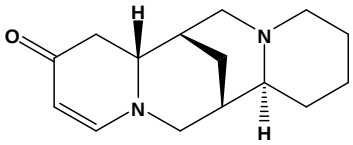


(4) R^1 = O; R^2 = R^3 = H, Lupanina

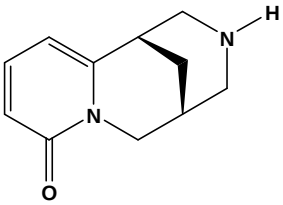
(5) R^1 = O; R^2 = H; R^3 = OH, 13-Hidroxilupanina



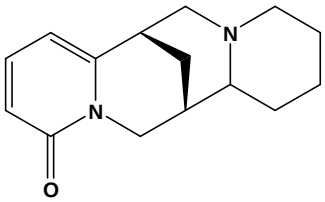
(6) Esparteína



(7) Multiflorina



(8) Cistisina



(9) Argirina

Figura 3. Estrutura Química de Alcalóides Quinolizidínicos Biologicamente Ativos.

3.5 BIOSSÍNTESE DOS ALCALÓIDES QUINOLIZIDÍNICOS

Os alcalóides quinolizidínicos são biossintetizados a partir da ciclização da cadaverina. Esta, é oriunda da descarboxilação enzimática do aminoácido L-lisina, pela cadaverina-lisina-descarboxilase (LDC), no interior dos cloroplastos das células vegetais.[29-30] Após alguns passos reacionais, cujo, mecanismo ainda não foi totalmente elucidado, a cadaverina é transformada em um intermediário amino-cátion tetracíclico, que originará os dois núcleos básicos precursores de muitos dos alcalóides quinolizidínicos, a (-)multiflorina e a (+)lupanina. Também, nos cloroplastos, ocorre a formação de um núcleo bicíclico básico, (+/-)Epilupinina, que será precursor de outra subclasse de alcalóides quinolizidínicos.

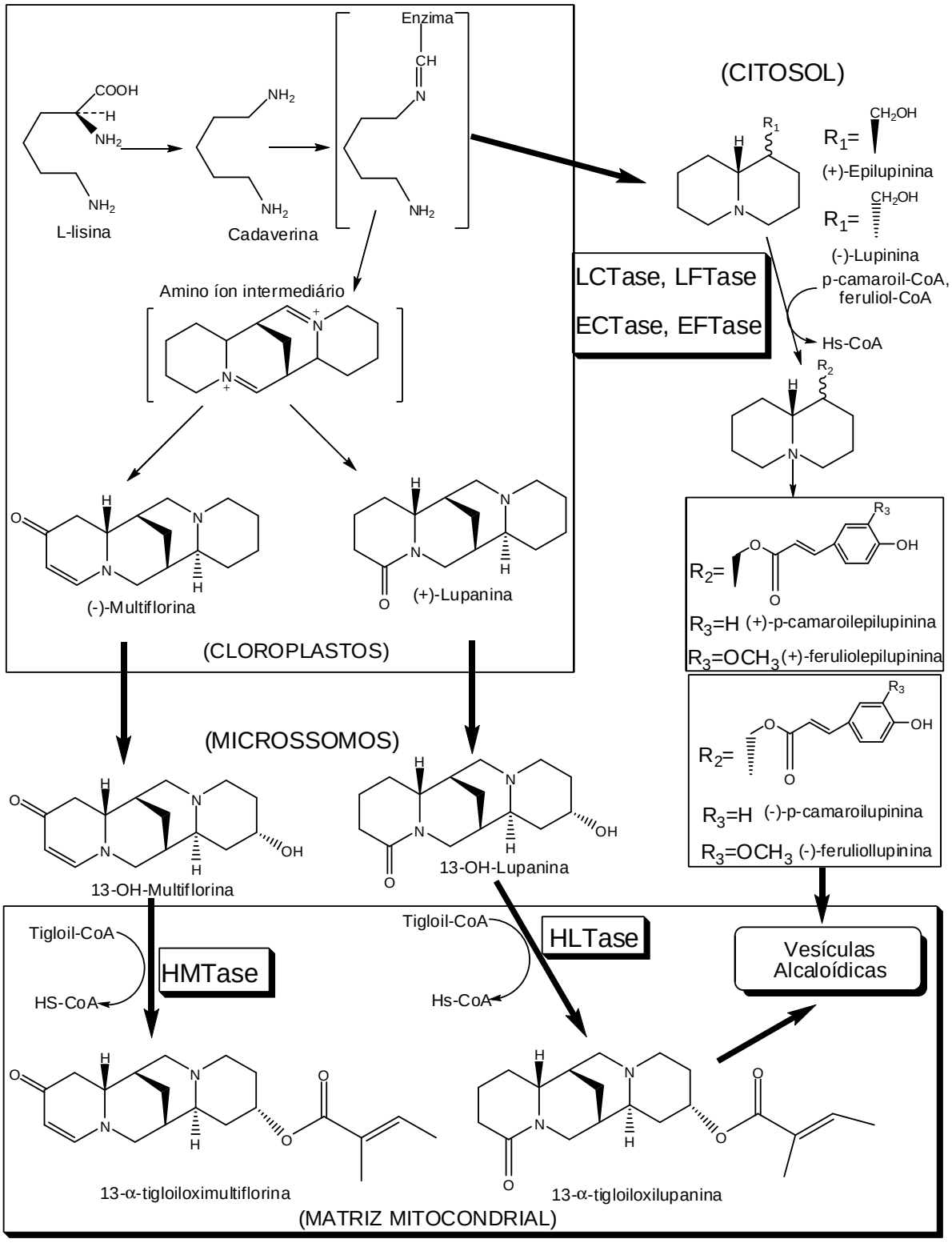
Os núcleos básicos (-)multiflorina e (+)lupanina são transferidos até os microssomos da célula vegetal onde sofrem uma reação de hidroxilação em C-13 catalisada por enzima, formando a (-)13-α-hidroximultiflorina e a (+)13-α-hidroxilupanina. Depois de formadas, essas estruturas são novamente carreadas, agora para a matriz mitocondrial. Nela, a (-)13-α-hidroximultiflorina e a (+)13-α-hidroxilupanina, vão sofrer reações de esterificação, mediante enzimas transferases específicas, como a Hidroximultiflorina-Aciltransferase (HMTase) e a Hidroxilupanina-Aciltransferase (HLTase), as quais, irão catalisar a migração do grupamento ligado a Acil-CoA formando o éster lupânico mais HS-CoA.[30-31] Os grupamentos ligados a Acil-CoA podem variar de acordo com a espécie de lupinos.

Como exemplo, pode-se citar a 13-Hidroximultiflorina-*O*-Tigloiltransferase, que promove a esterificação da (-)13-α-hidroximultiflorina, transferindo o grupamento *O*-Tigloil ligado à Coenzima-A (Tigloil-CoA) e levando a formação de (-)13-α-*O*tigloiloximultiflorina. O mesmo ocorre com o núcleo da lupanina, quando catalisado pela HLTase/O-tigloil-CoA, originando a (+)13-α-tigloiloxilupanina em espécies de *lupinus* como *Lupinus albus*.[32]

A (+/-)Epilupinina é transportada para o citosol celular, onde também sofre ação de enzimas transferases, como a *p*-Coumaroil-Epilupinina-Transferase (ECTase), que promove a transferência de grupamentos ligados a Acil-CoA, como *p*-Coumaroil-CoA.[33]

Utilizando-se dessa rota biossintética, as plantas que contém este grupo de compostos, já proporcionaram o isolamento e elucidação de mais de 200 estruturas dessa classe de alcalóides, os quinolizidínicos.[33-34]

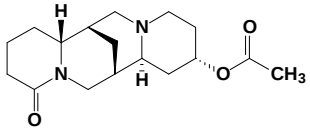
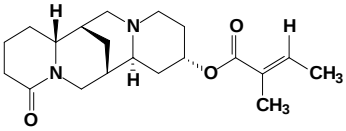
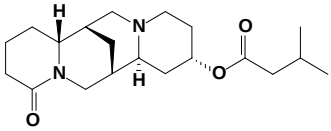
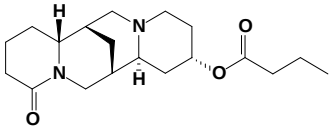
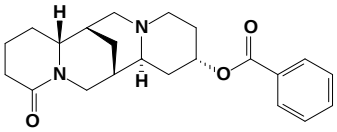
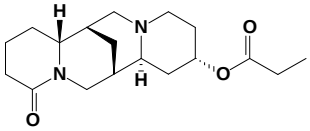
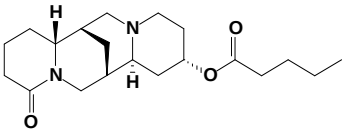
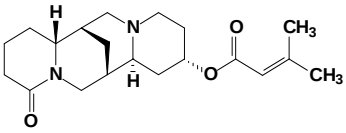
Após a biossíntese, os alcalóides formados são transportados para as vesículas alcaloídicas onde ficam armazenados até o momento em que a planta necessite de sua utilização.[35] O Esquema 1 apresenta a rota biossintética proposta para os alcalóides quinolizidínicos.

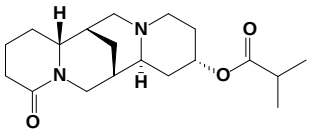


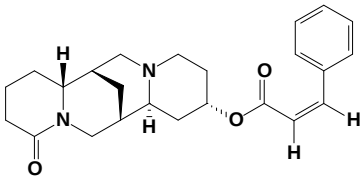
Esquema 1. Proposta de Biossíntese para os Alcalóides Quinolizidínicos.

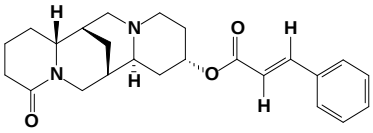
A tabela 2 lista algumas estruturas de alcalóides já isoladas e identificadas de espécies de *lupinus*.

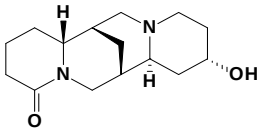
TABELA 2. Alcalóides Quinolizidínicos Isolados de Espécies de *lupinus*.

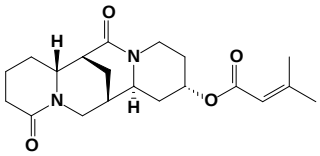
COMPOSTO	ESTRUTURA	REFERÊNCIAS
(10) 13-α-Acetiloxilupanina		44-47
(11) 13-α-Tigloiloxilupanina		44-47
(12) 13-α-Isovaleroiloxilu-panina		44-47
(13) 13-α-Butiriloxilupanina		44-47
(14) 13-α-Benzoiloxilu-panina		44-47
(15) 13-α-Propiloxilupanina		44-47
(16) 13-α-Valeroiloxilupa-nina		44-47
(17) 13-α-Angeloxilupanina		44-47

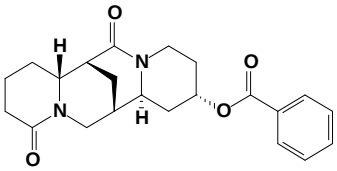
(18) 13-α-Isobutiriloxilupanina  44-47

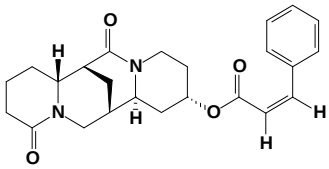
(19) 13-α-*cis*-Cinamoiloxilupanina  44-47

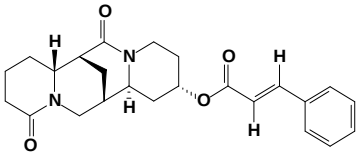
(20) 13-α-*trans*-Cinamoiloxilupanina  44-47

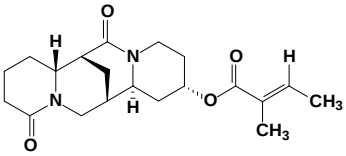
(20) 13-α-Hidroxilupanina  44-47

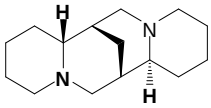
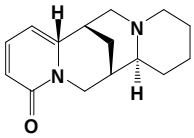
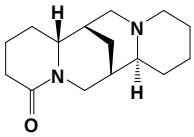
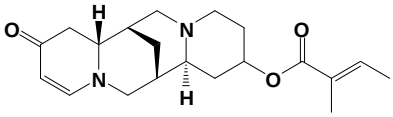
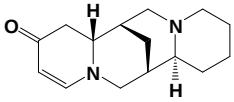
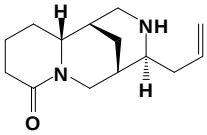
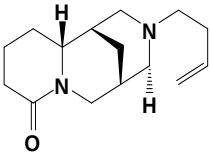
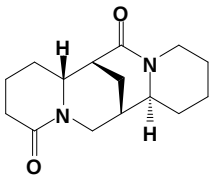
(21) 13-α-Angeloiloxi- 17-oxolupanina  44-47

(22) 13-α-Benzoiloxi- 17-oxolupanina  44-47

(23) 13-α-*cis*-Cinamoiloxi-17-oxolupanina  44-47

(24) 13-α-*trans*-Cinamoiloxi-17-oxolupanina  44-47

(25) 13-α-Tigloiloxi- 17-oxolupanina  44-47

(26) Esparteina		44-47
(27) Anagirina		44-47
(28) Lupanina		44-47
(29) 13-α-Tigloiloximulti-florina		44-47
(30) Multiflorina		44-47
(31) Angustifolina		44-47
(32) Tetrahidrorhombifolina		44-47
(33) 17-Oxilupanina		44-47

Desta forma, após a análise da literatura e dos conhecimentos populares referentes a esse gênero de *Leguminoseae*, o gênero *Lupinus,* surgiu o interesse de se estudar esse grupo de alcalóides, os quinolizidínicos, devido suas atividades biológicas e o variado número de estruturas já isoladas e identificadas. Assim, o estudo se deu com a espécie *Lupinus lanatus*, uma das treze representantes do gênero *Lupinus*

presentes no Rio Grande do Sul, e que, de acordo com o levantamento bibliográfico, não apresenta nenhum estudo químico de seu conteúdo alcaloídico.

Lupinus lanatus caracteriza-se por ser uma erva perene, ereta, ramificada ao longo do caule, medindo em torno de 10 à 60 cm de altura, podendo desenvolver touceiras com cerca de 1 metro de diâmetro. Possui um caule densamente lenhoso e as folhas da base podem apresentar-se unifolhadas ou trifolhadas somente visíveis em indivíduos jovens. As flores possuem coloração azul celeste, porém, raramente podem ser de coloração branca. Cálice, internamente é glabro, e externamente lanoso. Ovário com 8 óvulos e legumes com tamanho de 54-74 x 10-11,5 mm. As sementes possuem forma elíptica.[29]

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTOS UTILIZADOS

4.1.1 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a obtenção dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C, foi utilizado um Espectrômetro da marca Bruker DPX 400, que opera nas faixas de freqüências de 400,13 MHz para ^{1}H e 100,62 MHz para ^{13}C. Os espectros obtidos com a utilização deste espectrômetro foram os espectros 1D, ^{1}H, ^{13}C e 2D, DEPT 90 e DEPT 135, COSY, HMBC, HMQC, NOESY e HETCOR, proporcionando excelentes parâmetros para a elucidação das estruturas químicas isoladas.

Os tubos de ressonância utilizados para as análises foram de 5 mm de diâmetro e os solventes utilizados para solubilizar as amostras foram, clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) e metanol deuterado (CD_3OD). Como padrão interno foi utilizado o TMS, Tetrametilsilano.

4.1.2 Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG/EM)

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas utilizando um Cromatógrafo Gasoso HP 6890, acoplado a um Espectrômetro de Massas HP 5973 (CG/EM) com injetor automático HP 6890 com coluna HP-5MS (Cosslinked 5% de PH ME Siloxane). As condições utilizadas foram: Temperatura máxima de 325 ºC – (30 m x 0.32 mm, 0,25 µm); fluxo de gás Hélio de 2 mL/min., pressão de 5,05 psi; temperatura do injetor 250 ºC; seringa de 10 µL, com injeção de 1 µL; temperatura inicial do forno de 70 ºC por 1 min. e rampa de aquecimento de 12 ºC/min. até 280 ºC.

A fragmentação dos compostos foi processada por impacto de elétrons de 70 eV no Espectrômetro de Massas.

4.1.3 Espectrômetro de Difração de Raios-X

As medidas Cristalográficas foram obtidas utilizando um aparelho Bruker X8 Kappa-Apex II CCD empregando radiação Mo Kα de propriedade do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM. Os programas utilizados para o refinamento e resolução das estruturas foram SHELXS-97, SHELXL-97 e ROTAZ-2001.

4.1.4 Espectrômetro de Infravermelho

A obtenção dos espectros de infravermelho foi possível através de um aparelho Espectrofotômetro Bruker Tensor – 27, utilizando pastilha sólida da amostra em KBr (2,0 a 3,0 mg do composto para cada 100 mg de KBr) e uma Janela espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1}.

4.1.5 Aparelho de Ponto de Fusão

Para a determinação do ponto de fusão das substâncias cristalinas, foi utilizado um aparelho MQAPF-301 Digital da Micro-Química, com rampa de aquecimento de 5 ºC/min. até a temperatura de 200 ºC e posteriormente com rampa de aquecimento de 1,5 ºC/min., até os compostos atingirem sua temperatura de fusão.

4.1.6 Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro

Para realizar os estudos de rotação óptica das estruturas isoladas e identificadas, foi utilizado um polarímetro automático da marca Perkin Almmer, modelo 343 e lâmpada de 589 nm.

4.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS

4.2.1 Cromatografia em Coluna (CC)

Para as cromatografias em coluna foram utilizadas diversas dimensões de colunas de vidro, cada uma de acordo com o tipo de extrato e mistura de substâncias que se desejava separar, além do tipo de granulação da fase estacionária, proporcionando o melhor fator de retenção (Rf) possível para o isolamento dos compostos. O tipo de sílica gel empregada como suporte sólido foi sílica-gel 70-230 e 230-400 mesh (MERCK).

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Preparativa (CCDP)

Para a cromatografia em camada delgada, foram empregadas cromatofolhas de sílica gel 60 F_{254} (MERCK e Sorbent Technologies). Também utilizaram-se placas preparadas em laboratório com sílica gel PF_{254} (MERCK) sobre lâminas de vidro de 2 cm x 7 cm.

As placas cromatográficas foram preparadas em laboratório com o objetivo de isolar substâncias, que mesmo passando por coluna cromatográfica, ainda permaneceram misturadas. Para este fim, foram processadas placas preparativas

(CCDP) que consistiram de lâminas de vidro de medida 20 cm x 20 cm cobertas de sílica gel PF_{254} (MERCK) com espessura de 0,75 mm.

4.3 REAGENTES E MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADOS

Para realização dos ensaios de cromatografia de *Lupinus lanatus*, os solventes e reagentes utilizados foram produtos de grau analítico Merck e Vetec. A Tabela 3 apresenta os principais sistemas de solventes utilizados nas técnicas cromatográficas de separação de substâncias.

TABELA 3. Sistemas de Reagentes e Solventes mais Utilizados nos Ensaios Cromatográficos.

Sistema de Solvente	Gradiente de Polaridade
Hexano	100%
Diclorometano	100%
Acetato de Etila	100%
Metanol	100%
Ácido Clorídrico	2 N
Hidróxido de Amônio	2 Mol/L
Diclorometano/Metanol	(98 : 2 v/v)
Diclorometano/Metanol	(95 : 5 v/v)
Diclorometano/Metanol	(90 : 10 v/v)
Diclorometano/Metanol	(85 : 15 v/v)
Diclorometano/Metanol	(80 : 20 v/v)
Diclorometano/Metanol	(75 : 25 v/v)
Diclorometano/Metanol	(70 : 30 v/v)
Diclorometano/Metanol	(65 : 35 v/v)
Diclorometano/Metanol	(60 : 40 v/v)
Diclorometano/Metanol	(55 : 45 v/v)
Diclorometano/Metanol	(50 : 50 v/v)
Metanol	100%

Para a revelação das placas de CCD e CCDP, utilizou-se câmara escura com lâmpada de irradiação Ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda λ = 254 nm e λ = 365 nm (Biothec). Para determinar a presença de nitrogênio básico nas cromatoplacas, borrifou-se reativo de Dragendorff modificado segundo Munier e Macheboenf[36], determinando assim, a presença de alcalóides. Os outros compostos presentes foram revelados com uma solução de ácido sulfúrico e etanol (95 : 5 v/v) seguido de aquecimento em chapa quente.

Outros métodos mais específicos de identificação como Espectrometria de Massas (EM), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C uni e bidimensionais como DEPT, COSY, NOESY, HMBC, HMQC, Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV) e Difração de Raios-X foram de fundamental importância na identificação e caracterização estrutural dos metabólitos isolados.

4.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *Lupinus lanatus*

A espécie *Lupinus lanatus* foi coletada no município de Frederico Westphalen – RS no mês de outubro de 2008. A identificação botânica desta espécie foi realizada pelo departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, e uma exsicata foi depositada no herbário da mesma instituição com o número SMDB nº 12.953.

4.5 SECAGEM, EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

O material vegetal coletado foi seco em estufa de circulação de ar a temperatura de 50 ºC durante cinco dias. Posteriormente, foram separados as vagens, as sementes, as folhas, os caules e a raiz da planta. Deste material, foi selecionado as sementes e as folhas, as quais, apresentaram, através de testes quantitativos, a maior concentração de alcalóides.

4.6 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DAS SEMENTES

As sementes secas, foram trituradas em moinho de facas e pesadas obtendo-se 1,250 Kg. Após a pesagem, as mesmas passaram por uma extração com Hexano, a quente, para a retirada de seu óleo fixo. Este foi concentrado sob pressão reduzida e obteve-se 1,30 g de um óleo de coloração amarelada. A extração Hexânica foi submetida a análise em placa de CCD, verificando-se a presença, em baixíssima concentração, de alcalóides. Após a retirada do óleo fixo das sementes, foi realizada uma segunda extração, a quente, com metanol. O solvente foi rotaevaporado obtendo-se 489,0 g de extrato metanólico.

O extrato bruto foi dissolvido em 200 ml de água, e posteriormente suspenso em Hexano, em pH neutro, na proporção de 1:1. Após, foram efetuadas várias extrações, para remover gorduras e demais substâncias neutras apolares ainda presentes. Ao solvente retirado das extrações, foi adicionado Sulfato de sódio anidro e posteriormente, este foi filtrado, em papel filtro, e rotaevaporado sob pressão reduzida, para originar 28,0 g da fração hexânica neutra. A solução aquosa restante passou por novas extrações com diclorometano, acetato de etila e n-butanol, obtendo-se então 16,0 g, 12,0 g e 13,5 g das respectivas frações neutras.

O próximo passo foi submeter essa solução aquosa neutra remanescente a uma extração ácido-base. Primeiramente, a solução mãe foi acidificada, com HCl 2 N, até atingir um pH~2. Em seguida, efetuaram-se sucessivas extrações com éter etílico até este tornar-se incolor. No fim do procedimento, adicionou-se Sulfato de sódio anidro, ao solvente das extrações, e a fração ácida foi concentrada, em rotaevaporador rotatório, originando 14,5 g da fração etérea ácida.

Por fim, a fração aquosa foi alcalinizada com NH_4OH a 2 Mol/L até pH~9 e foram efetuadas várias extrações com éter etílico. Após, a fração etérea básica foi concentrada e foram obtidos aproximadamente 10,0 g de um sólido de coloração marrom claro. A Figura 4 esquematiza o fracionamento do material vegetal seco das sementes.

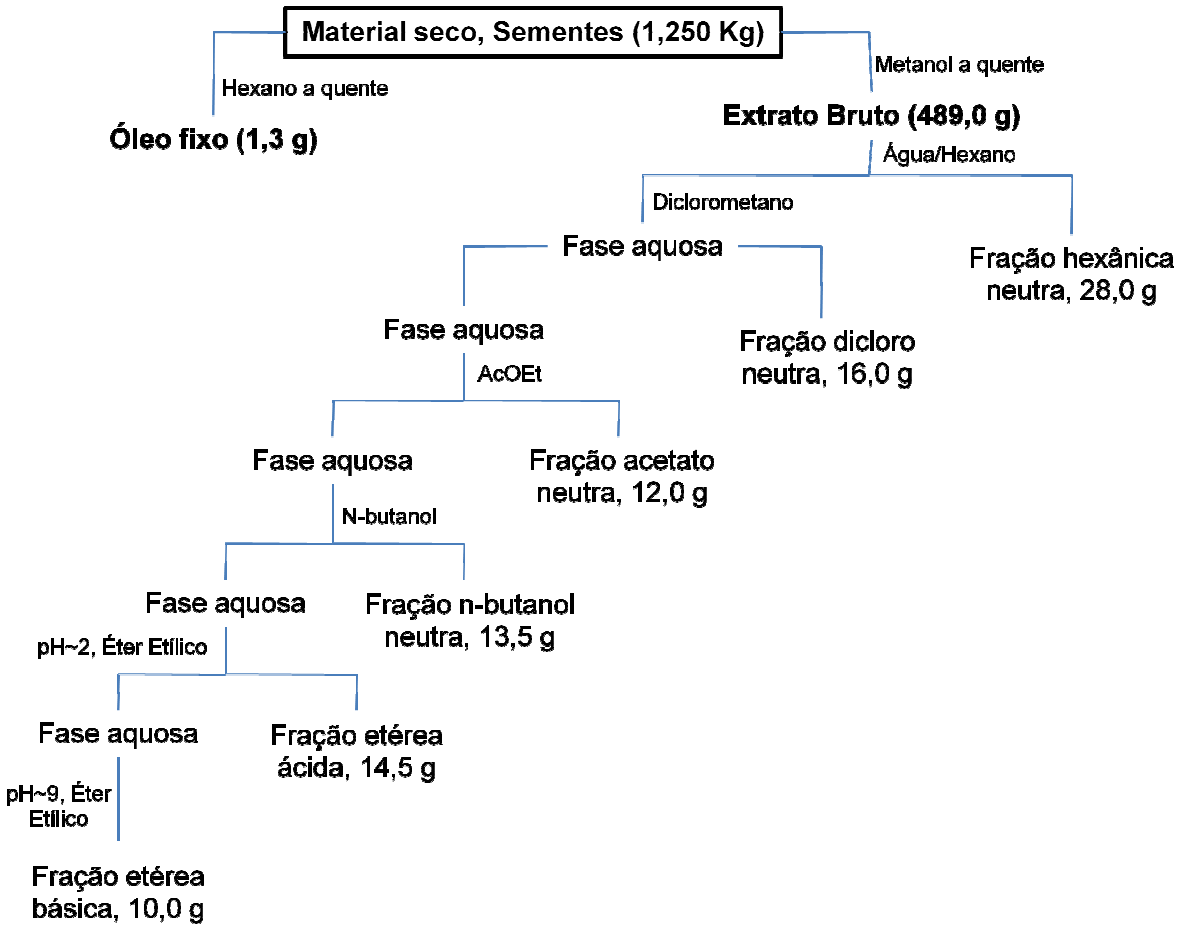


Figura 4. Esquema de Extração e Fracionamento das Sementes de *Lupinus lanatus*.

4.6.1 Análise das Frações Obtidas

4.6.1.1 Frações Neutras Obtidas

As frações neutras foram originadas das extrações utilizando solventes com gradientes de polaridade crescente. Os solventes utilizados foram Hexano, Diclorometano, Acetato de etila e n-butanol. Ao fim dessas extrações, uma pequena quantidade de cada fração foi solubilizada, em solventes apropriados, respeitando-se o grau de polaridade de cada amostra, e uma alíquota mínima de cada uma, foi aplicada

em placa de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Sob um sistema eluente apropriado, as amostras foram eluídas. A placa CCD foi analisada em câmara escura de UV (254 e 365 nm), verificando-se várias bandas presentes e com uma boa separação para todas as amostras. Por fim, foi borrifado o reativo de Dragendorff, o qual, não detectou a presença de nitrogênio básico nas mesmas. O mesmo procedimento foi realizado com a fração etérea ácida que também revelou-se negativo para o reagente de Dragendorff. O óleo fixo das sementes apresentou uma baixíssima concentração de alcalóides. Desta forma, como o objetivo do trabalho foi a obtenção destes compostos, as frações neutras, juntamente com a fração etérea ácida e o óleo fixo das sementes, não foram trabalhadas. Assim, os esforços foram dedicados a fração etérea básica que apresentou um alto teor de alcalóides.

4.6.1.2 Fração Etérea Básica das Sementes

A fração etérea básica (10,0 g) foi analisada primeiramente por CCD, em câmara escura sob lâmpada UV (254 e 365 nm) e reativo de Dragendorff. Após essa análise preliminar, observou-se a presença de uma grande quantidade de alcalóides. Dessa forma, pode-se propor que estes alcalóides, pertencentes ao grupo dos quinolizidínicos, são bastante polares, pois os mesmos permanecem na fase aquosa, mesmo quando é utilizado solvente de alta polaridade como n-butanol para extração destes. Após essa verificação, a fração foi cromatografada em coluna, utilizando como suporte sólido sílica gel (230-400 Mesh) na proporção (1:10) e diclorometano e metanol como solventes, e mistura destes, com gradiente crescente de polaridade. Dessa coluna, foram retiradas 78 subfrações, as quais foram monitoradas por CCD durante o processo de colunamento. Com o acompanhamento por CCD, foi possível determinar grupos de bandas, que apresentavam o mesmo Fator de Retenção (Rf). Essas subfrações foram unidas e submetidas a novos processos de separação, CCDP. Esse procedimento, permitiu o isolamento de dois alcalóides, o alcalóide **(34)** (-)multiflorina e o **(35)** (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina, sendo estes, isolados pela primeira vez da espécie em questão,

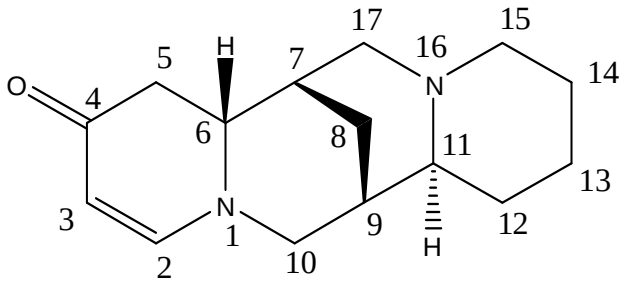
Lupinus lanatus. Um levantamento bibliográfico confirmou que ainda não foram realizados estudos com alcalóides da espécie mencionada acima. A Tabela 4 apresenta as subfrações que foram reunidas, os solventes utilizados e as substâncias.

TABELA 4. Frações Reunidas após Comparação por CCD da Fração Etérea Básica de *Lupinus lanatus.*

Frações	Solventes (%)	Substâncias
I – 1 a 4	CH_2Cl_2 (100)	Mistura de Substâncias
II – 5 a 8	CH_2Cl_2 (100)	Mistura de Substâncias
III – 9 e 10	CH_2Cl_2 : MeOH (98:2)	Mistura de Substâncias
IV – 11	CH_2Cl_2 : MeOH (95:5)	Mistura de Substâncias
V – 12 e 13	CH_2Cl_2 : MeOH (95:5)	Mistura de Substâncias
VI – 14 a 16	CH_2Cl_2 : MeOH (90:10)	Mistura de Substâncias
VII – 18	CH_2Cl_2 : MeOH (90:10)	Mistura de Substâncias
VIII – 19 a 23	CH_2Cl_2 : MeOH (85:15)	(-)multiflorina + mistura
IX – 24 e 25	CH_2Cl_2 : MeOH (85:15)	Mistura de Substâncias
X – 26 e 27	CH_2Cl_2 : MeOH (85:15)	Mistura de Substâncias
XI – 28 e 29	CH_2Cl_2 : MeOH (80:20)	Mistura de Substâncias
XII – 30 a 34	CH_2Cl_2 : MeOH (80:20)	Mistura de Substâncias
XIII – 35 a 38	CH_2Cl_2 : MeOH (75:25)	(-)13α-cis-tigloiloximultiflorina + mistura
XIV – 39 a 43	CH_2Cl_2 : MeOH (75:25)	Mistura de Substâncias
XV – 44 a 49	CH_2Cl_2 : MeOH (70:30)	Mistura de Substâncias
XVI – 50 a 57	CH_2Cl_2 : MeOH (70:30)	Mistura de Substâncias
XVII – 58 a 65	CH_2Cl_2 : MeOH (60:40)	Mistura de Substâncias
XVIII – 66 a 70	CH_2Cl_2 : MeOH (50:50)	Mistura de Substâncias
XIX – 71 a 78	MeOH (100)	Mistura de Substâncias

4.6.2 Substâncias Isoladas e Identificadas da Fração Etérea Básica das Sementes de *Lupinus lanatus*

4.6.2.1 (-)Multiflorina

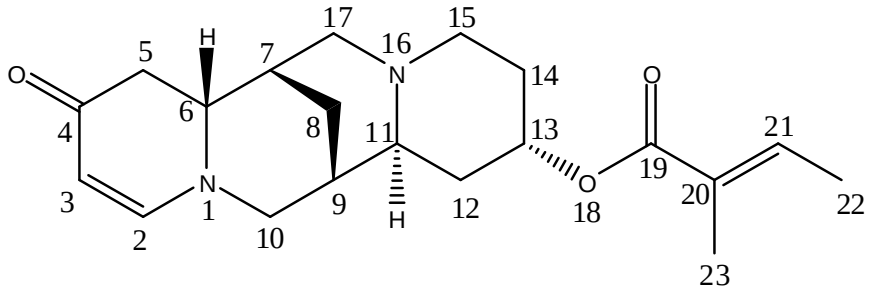


(34)

O alcalóide (-)multiflorina foi isolado da mistura das subfrações 19 – 23 (TABELA 4, pag. 26) da coluna de sílica gel (230-400 Mesh) por placa preparativa. A realização deste procedimento se deu através da análise de vários sistemas eluentes em CCD.

Deste estudo, o sistema eluente que se mostrou mais eficiente, foi o diclorometano/metanol, na proporção (72:28), com algumas gotas de NH_4OH. A placa preparativa foi então preparada e a mistura aplicada sobre a mesma. Após eluída, em sistema de solvente já mencionado, esta foi observada em lâmpada UV (254 e 365 nm), verificando uma banda na região superior da placa e outras na região inferior. A banda superior foi então removida e lavada, com mistura de diclorometano e metanol, e filtrada em papel filtro. A amostra foi concentrada dando origem a 17,0 mg de uma substância oleosa de coloração amarelo claro. Posteriormente, em placa de CCD, foi confirmada a pureza do composto referido e realizados estudos de RMN de ^{1}H e ^{13}C. Os espectros de RMN mencionados possibilitaram a comparação da estrutura obtida com a literatura[37-39], sendo a mesma identificada como o alcalóide (-)multiflorina.

4.6.2.2 (-)13-α-*cis*-Tigloiloximultiflorina



(35)

Este composto foi obtido das subfrações 35 – 38 (TABELA 4, pag. 26) da fração etérea básica das sementes por CCDP. Como na substância anterior, foram analisados vários sistemas eluentes em placas de CCD até chegar ao sistema que se mostrou mais efetivo. O melhor sistema obtido para o isolamento dessa substância, foi a utilização de diclorometano/metanol na proporção de (70:30) com algumas gotas de éter diisopropílico.

Após a validação da fase móvel, a mistura foi aplicada sob a CCDP e eluída. Ao final do procedimento, a placa preparativa foi observada em Lâmpada UV (254 e 365 nm) e sua porção inferior foi removida e lavada com metanol sob papel filtro em um balão. O solvente foi rotaevaporado sob pressão reduzida, obtendo-se 13,0 mg de uma substância, também de aspecto oleoso, e coloração amarelada. A pureza da mesma foi testada em CCD e confirmada por RMN. O estudo de RMN de ^{1}H e ^{13}C tornou possível a identificação do núcleo básico como sendo o alcalóide (-)multiflorina. Porém, os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, apresentaram outros sinais além dos picos do núcleo básico mencionado, sendo necessário o processamento de espectros de RMN bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC) para a elucidação da estrutura. Depois de analisar os dados obtidos por RMN, os resultados foram comparados aos da literatura[46,52], confirmando a estrutura química como sendo o alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina.

4.7 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Lupinus lanatus*

As folhas secas de *Lupinus lanatus*, foram separadas do caule e trituradas em moinho de facas. Após pesadas, obteve-se 980,0 g do material vegetal seco. Posteriormente, as mesmas passaram por uma extração, a quente, com metanol para a obtenção do extrato bruto metanólico das folhas. Este foi concentrado em rotaevaporador rotatório, sob pressão reduzida, originando 287,0 g de uma massa extrativa de coloração verde escuro.

O extrato bruto foi dissolvido em 150 ml de água e posteriormente suspenso em Hexano, em pH neutro, na proporção de 1:1. Após, foram realizadas várias extrações em funil de separação, para remover gorduras e demais substâncias neutras apolares, presentes no mesmo. O solvente foi retirado da extração e, a ele, adicionado Sulfato de sódio anidro. O mesmo foi filtrado, em papel filtro, e rotaevaporado, obtendo-se 16,1 g da fração hexânica neutra. Este procedimento foi repetido, com a solução mãe remanescente, com solventes de gradiente de polaridade crescente (diclorometano, acetato de etila e n-butanol) obtendo-se então, 8,0 g, 7,0 g e 11,4 g das respectivas frações neutras mencionadas.

O passo posterior, foi submeter a solução aquosa neutra restante a uma extração ácido-base. Primeiramente, a fração aquosa foi acidificada com HCl 2 N até atingir um pH~2. Em seguida, efetuou-se sucessivas extrações com éter etílico até o mesmo causar a exaustão total dos compostos ácidos e neutros. Ao final do procedimento, foi adicionado Sulfato de sódio anidro ao solvente das extrações, e o mesmo foi filtrado e rotaevaporado sob pressão reduzida, originando 12,7 g da fração etérea ácida.

Por fim, a fração aquosa foi alcalinizada com NH_4OH a 2 Mol/L até pH~9 sendo efetuadas sucessivas extrações com diclorometano, que se mostrou mais eficiente na extração desta classe de alcalóides que o éter etílico. Através da análise dos dados de testes de extrações comparando os dois solventes, o diclorometano mostrou-se cerca

de 8 a 10% mais eficiente que o éter etílico para a obtenção desses alcalóides. A conclusão a que se chega, é que essa diferença possa estar relacionada com a presença do cloro que interage melhor com os alcalóides, pois estes têm preferência por solventes clorados. Após, ao solvente da extração básica, foi adicionado Sulfato de sódio anidro, esse foi filtrado e concentrado. No final do procedimento, obteve-se aproximadamente 5,1 g de um sólido de coloração marrom café.

A Figura 5 esquematiza o fracionamento do material vegetal seco das folhas.

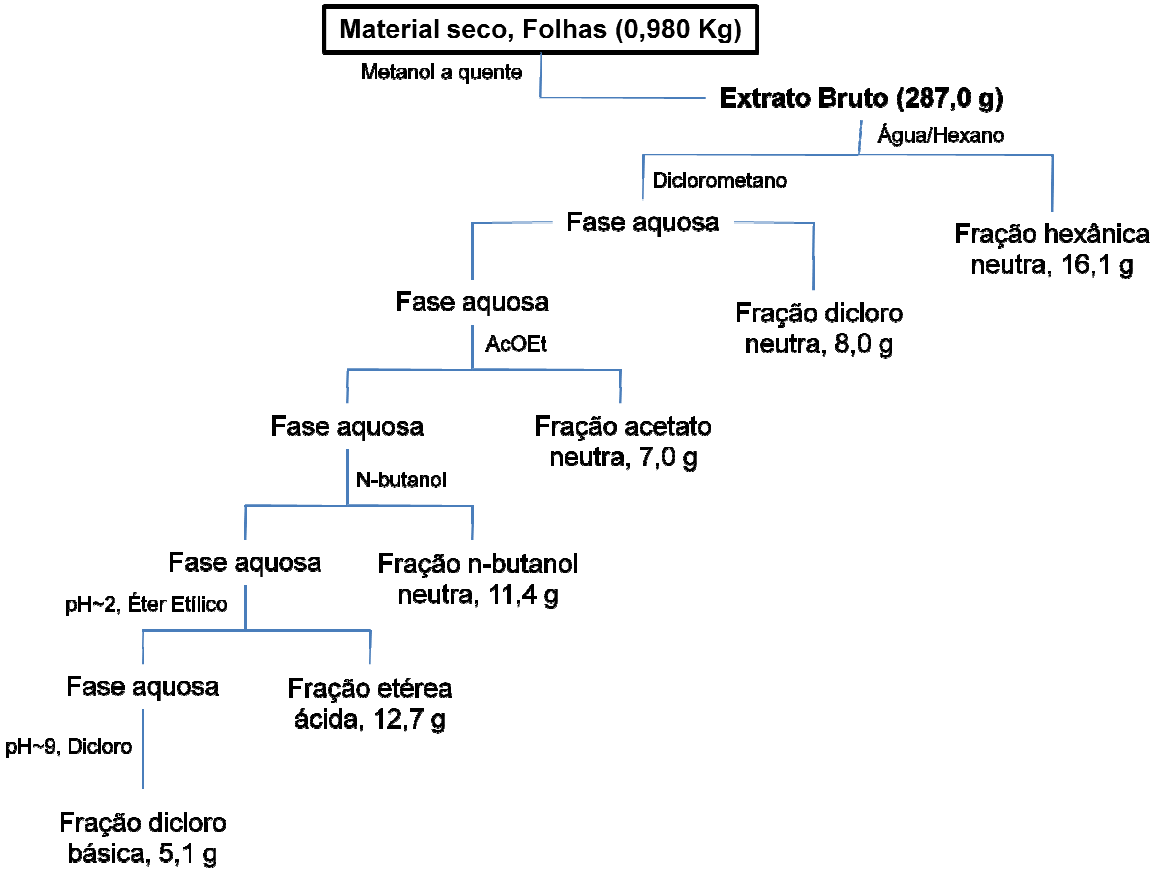


Figura 5. Esquema de Extração e Fracionamento das Folhas de *Lupinus lanatus.*

4.7.1 Análise das Frações Obtidas

4.7.1.1 Frações Neutras Obtidas

As frações neutras obtidas utilizando solventes com gradiente de polaridade crescente, Hexano, Diclorometano, Acetato de etila e n-butanol, foram solubilizadas, respeitando-se o grau de polaridade de cada amostra, e uma alícota mínima de cada uma, foi aplicada em placa de CCD. Sob um sistema eluente apropriado, essas frações foram eluídas e observadas em câmara escura de UV (254 e 365 nm). Após a análise, foram verificadas várias bandas presentes, e com uma boa separação para todas as amostras. Por fim, foi borrifado o reativo de Dragendorff, que não detectou a presença de nitrogênio básico em nenhuma das frações testadas. O mesmo procedimento foi realizado com a fração etérea ácida, a qual, também apresentou um resultado negativo para o reagente de Dragendorff. Do mesmo modo que as sementes, como o objetivo do trabalho foi a obtenção dos alcalóides, estas frações não foram trabalhadas, sendo os esforços concentrados na fração CH_2Cl_2 básica, que apresentou uma alta concentração de alcalóides da classe dos quinolizidínicos.

4.7.1.2 Fração Diclorometano Básica

A fração diclorometano básica (5,1 g) foi analisada por CCD em câmara escura sob lâmpada UV (254 e 365 nm) e reativo de Dragendorff. Após essa análise preliminar, determinou-se a presença de uma alta concentração de alcalóides. Como nas sementes, pode-se propor que este grupo de alcalóides é bastante polar, pois esses permaneceram na fase aquosa, mesmo quando utilizado solvente com alto grau de polaridade como n-butanol para extração dos mesmos.

Posteriormente, a fração diclorometano básica foi cromatografada em coluna utilizando como suporte sólido sílica gel (230-400 Mesh) na proporção (1:10) e diclorometano e metanol como solventes, e mistura destes, com gradiente crescente de polaridade. Desta coluna, foram retiradas 83 subfrações, as quais foram monitoradas por CCD durante todo o procedimento.

Com o acompanhamento por CCD, foi possível determinar grupos de bandas que apresentavam o mesmo Fator de Retenção (Rf). Essas subfrações foram unidas e submetidas a novos processos de separação, CCDP, que permitiu o isolamento de três alcalóides, **(36)** (+)13-α-hidroxilupanina, **(37)** (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina e **(38)** (+)Lanatina A. Após um levantamento bibliográfico, verificou-se que o alcalóide (+)Lanatina A (nome originado da espécie que foi isolado pela primeira vez, *Lupinus lanatus*) ainda não havia sido identificado dentro da classe dos quinolizidínicos, caracterizando essa estrutura como inédita.

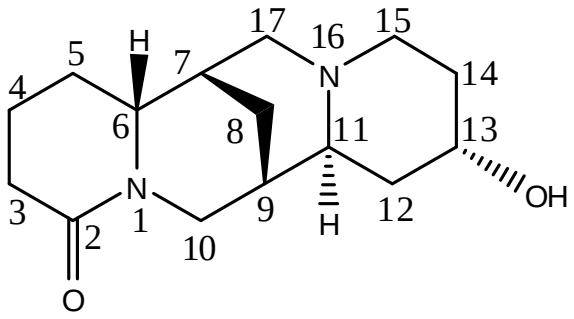
A Tabela 5 apresenta as subfrações que foram reunidas, os solventes utilizados e as substâncias presentes nas mesmas.

TABELA 5. Frações Reunidas após Comparação por CCD da Fração Dicloro Básica das Folhas de *Lupinus lanatus.*

Frações	Solventes (%)	Substâncias
I – 1 a 7	CH_2Cl_2 (100)	Mistura de Substâncias
II – 8 a 10	CH_2Cl_2 : MeOH (99:1)	Mistura de Substâncias
III – 11 a 14	CH_2Cl_2 : MeOH (98:2)	Mistura de Substâncias
IV – 15 a 19	CH_2Cl_2 : MeOH (95:5)	(+)Hidroxilupanina + mistura
V – 20 a 27	CH_2Cl_2 : MeOH (95:5)	Mistura de Substâncias
VI – 28 a 30	CH_2Cl_2 : MeOH (90:10)	Mistura de Substâncias
VII – 31 a 33	CH_2Cl_2 : MeOH (90:10)	Mistura de Substâncias
VIII – 34 a 36	CH_2Cl_2 : MeOH (85:15)	Mistura de Substâncias
IX – 37 a 38	CH_2Cl_2 : MeOH (85:15)	Mistura de Substâncias
X – 39 a 41	CH_2Cl_2 : MeOH (80:20)	(+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina + mistura
XI – 42 a 45	CH_2Cl_2 : MeOH (80:20)	Mistura de Substâncias
XII – 46 a 50	CH_2Cl_2 : MeOH (75:25)	Mistura de Substâncias
XIII – 51 a 58	CH_2Cl_2 : MeOH (65:35)	(+)Lanatina A + mistura
XIV – 59 a 63	CH_2Cl_2 : MeOH (60:40)	Mistura de Substâncias
XV – 64 a 70	CH_2Cl_2 : MeOH (60:40)	Mistura de Substâncias
XVI – 71 a 74	CH_2Cl_2 : MeOH (50:50)	Mistura de Substâncias
XVII – 75 a 83	MeOH (100)	Mistura de Substâncias

4.7.2 Substâncias Isoladas e Identificadas da Fração CH_2Cl_2 Básica das Folhas de *Lupinus lanatus*

4.7.2.1 (+)13-α-Hidroxilupanina



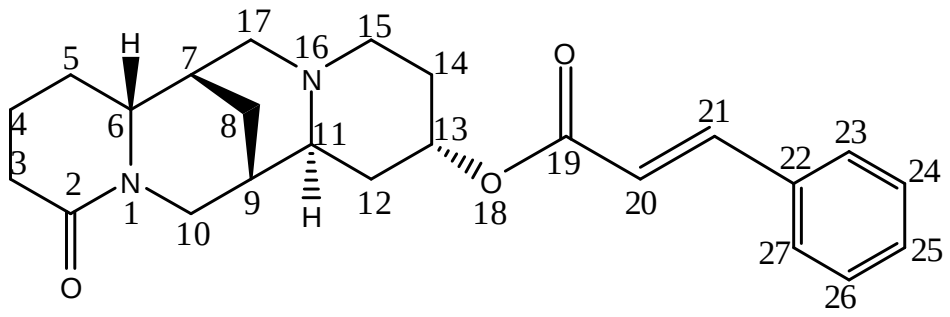
(36)

O alcalóide (+)13-α-hidroxilupanina foi obtido da mistura das subfrações 15 – 19 (TABELA 5, pag. 33) da coluna de sílica gel (230-400 Mesh) por placa preparativa. Este procedimento se deu através da análise de vários sistemas eluentes em CCD. O sistema de eluente mais eficiente para a separação, foi diclorometano/metanol (95:5) com algumas gotas de NH_4OH. A placa preparativa foi então preparada e a mistura aplicada sobre a mesma. Após eluída, com o sistema de solvente mencionado, observou-se esta em lâmpada UV (254 e 365 nm), verificando uma banda na região superior da placa e outras na região inferior. A banda superior foi removida e lavada com mistura de CH_2Cl_2 e metanol e filtrada em papel filtro. Após a evaporação do solvente em rotaevaporador, sob pressão reduzida, e secagem sob nitrogênio, obteve-se 25,0 mg de uma substância oleosa de coloração amarelo claro. Posteriormente, aplicou-se uma alícota de amostra sob uma placa de CCD e a pureza do composto foi confirmada. Foram realizados então, estudos de RMN de ^{1}H e ^{13}C, que possibilitaram a comparação da estrutura obtida com a literatura[40-43], seguida da identificação da mesma como (+)13-α-hidroxilupanina.

4.7.2.1.1 Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C de (+)13-α-hidroxilupanina

$[\alpha]_D^{25}$ = + 45°, ($_C$ = 0,1, MeOH); Rf: 0,48 em CH_2Cl_2/MeOH (75:25); RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400,13 MHz) δ 1,32 (1H, m, H_b-12); 1,36 (1H, m, H_b-8); 1,57 (1H, m, H_a-12); 1,61 (1H, m, H_b-5); 1,66 (2H, m, H-14); 1,67 (1H, m, H-9); 1,68 (1H, m, H-11); 1,79 (1H, m, H_b-4); 1,87 (1H, m, H_a-5); 1,88 (1H, m, H-13); 1,91 (1H, m, H_a-4); 1,92 (1H, m, H_b-15); 1,97 (1H, m, H_b-17); 12,11 (1H, m, H-7); 2,22 (1H, m, H_a-8); 2,32 (1H, m, H_b-3); 2,51 (1H, m, H_b-10); 2,56 (1H, m, H_a-3); 2,78 (1H, m, H_a-15); 3,03 (1H, m, H_a-17); 3,74 (1H, dt, J = 14 e 2,5 Hz, H_a-10); 4,82 (1H, s, H-18). RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100,62 MHz) δ 19,9 (C-4, CH_2); 27,4 (C-8, CH_2); 27,8 (C-5, CH_2); 29,9 (C-9, CH); 22,4 (C-14, CH_2); 32,8 (C-3, CH_2); 34,2 (C-7, CH); 30,9 (C-12, CH_2); 46,7 (C-10, CH_2-N); 55,8 (C-15, CH_2-N); 53,3 (C-17, CH_2-N); 67,0 (C-11, CH-N); 60,6 (C-6, CH-N); 65,9 (C-13, CH-O); 169,5 (C-2, C=O).

4.7.2.2 (+)13-α-*trans*-Cinamoiloxilupanina

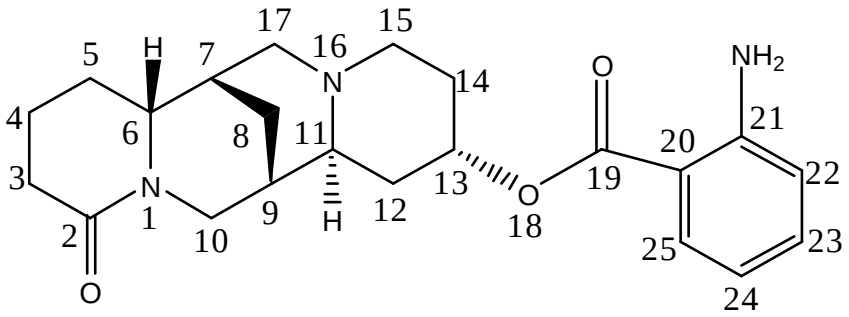


(37)

A substância referida foi purificada das subfrações 39 – 41 (TABELA 5, pag. 33) da fração diclorometano básica por CCDP. Como na substância anterior foram

avaliados vários sistemas eluentes em placas CCD até chegar a mistura de solventes mais apropriada. O melhor sistema obtido, foi diclorometano/metanol (80:20) com algumas gotas de NH_4OH. Após a preparação da placa preparativa, a mistura foi aplicada sobre a mesma, e esta eluída. Ao final do procedimento, a CCDP foi observada em Lâmpada UV (254 e 365 nm), verificando bandas bem separadas. A banda da porção superior da foi removida e lavada com mistura de metanol e dicloro, sob papel filtro em balão. Após concentrada a amostra, obteve-se 10 mg de uma substância que foi cristalizada em diclorometano. A pureza da mesma foi testada em CCD e confirmada por RMN. O estudo de RMN de ^{1}H e ^{13}C possibilitou a identificação do núcleo básico como sendo do alcalóide (+)lupanina. Os resultados do estudo de RMN foram comparados aos da literatura[44-47], confirmando a estrutura deste composto como (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina. Devido a pouca quantidade e ao tamanho dos cristais não foi possível realizar estudos de cristalografia por difração de Raios-X.

4.7.2.3 (+)Lanatina A



(38)

O alcalóide (+)Lanatina A, foi purificado das subfrações 51 – 58 (TABELA 5, pag. 33) da coluna sílica gel (230-400 Mesh) da fração CH_2Cl_2 básica das folhas de *L. lanatus* por CCDP. Como mencionado no item anterior, foram realizados vários ensaios

com diferentes sistemas eluentes em placas CCD. O sistema mais apropriado para a separação deste composto da mistura foi diclorometano/metanol na proporção de (60:40). Após a preparação da CCDP, a mistura foi aplicada e eluída. Ao final do procedimento, a placa preparativa foi observada em Lâmpada UV (254 e 365 nm) verificando bandas bem separadas.

A banda da porção superior foi removida e a substância foi retirada da sílica da preparativa com lavagens sucessivas com misturas de dicloro e metanol. Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se 27,0 mg de uma substância que cristalizou na forma de agulhas em diclorometano. A pureza foi determinada em CCD e confirmada por RMN.

O estudo de RMN de ^{1}H e ^{13}C tornou possível a identificação do núcleo básico como sendo uma (+)lupanina. Os resultados do estudo de RMN bidimensionais, DEPT, COSY, NOESY, HMQC e HMBC, da Espectrometria de Massas e Cristalografia por Difração de Raios-X, foram de suma importância para determinação da estrutura química, bem como elucidação da estereoquímica absoluta deste composto isolado. As buscas na literatura mostraram resultado negativo indicado assim, que esta é uma substância inédita tanto para a classe de alcalóides quinolizidínicos, de que ela faz parte, quanto para a planta de origem, *Lupinus lanatus*.

4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*

4.8.1 Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Micro-diluição em caldo

A Concentração Inibitória Mínima é a menor concentração de um composto testado capaz de inibir o crescimento de microorganismos, podendo ser bacteriostático ou fungiostático, sob condições de cultura adequadas e padronizadas. Trata-se de um ensaio quantitativo aplicado a avaliação do potencial de misturas de substâncias ou substâncias puras.

As cepas padrão ATCC (american Type Culture Coletion) constituídas por microorganismos Gram-postivos, Gram-negativos e fungos estão descritos na Tabela 6.

Os padrões de antibióticos de referência utilizados nos ensaios foram Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para os fungos. Estes padrões foram preparados conforme a FDA.

TABELA 6. Microorganismos Indicadores

Características	Microorganismos	ATCC
Gram-positivos	*Staphylococcus aureus*	ATCC 6538p
	Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228
	Bacillus subtilis	ATCC 6633
	Staphylococcus saprophyticus	ATCC 15305
Gram-negativos	*Escherichia coli*	ATCC 25792
	Klebsiella pneumoniae	ATCC 10031
	Pseudomonas aeroginosa	ATCC 27853
	Shiguella sonnei	ATCC 25931
Fungos	*Candida albicans*	ATCC 10231
	Candida tropicalis	Squibb 1600
	Cryptococcus neoformans	ATCC 28952
	Sacharomyces cerivisae	ATCC 2601

4.8.1.1 Método de Determinação da Atividade da CIM

Para a determinação da CIM pelo método de Micro-diluição em Caldo, empregou-se a técnica descrita pela NCCLS modificada.[48,49] Este método é determinado em placas de cultura estéreis de 96 micro-poços onde se realiza uma diluição seriada das amostras em meio líquido, contendo 2% de surfactante Tween 80. Nessa metodologia os poços foram inoculados com os microorganismos na concentração de $1x10^6$ células viáveis. Após a inoculação dos microorganismos, as amostras foram adicionadas no primeiro micro-poço e posteriormente foram realizadas diluições em série das mesmas, começando em 100 μg/mL indo até 3,12 μg/mL. As placas foram então incubadas por 24 horas a 35 ºC para bactérias e 48 horas a 25 ºC para fungos. Após a incubação, determinou-se o crescimento microbiano verificando-se

a turvação do meio para determinação da CIM. Todos os testes foram realizados em triplicata e comparados com os padrões. Também, para garantia de reprodutibilidade do ensaio, foi efetuado um controle positivo e um negativo para cada amostra testada.

Como padrões foram utilizados Cloranfenicol nas concentrações de 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,625 μg/mL para bactérias e Nistatina nas concentrações de 41,15, 20,6, 10,3, 5,15, 2,58 e 1,30 μg/mL para fungos.

A Figura 6 ilustra o método de Micro-diluição em Caldo para teste de CIM.

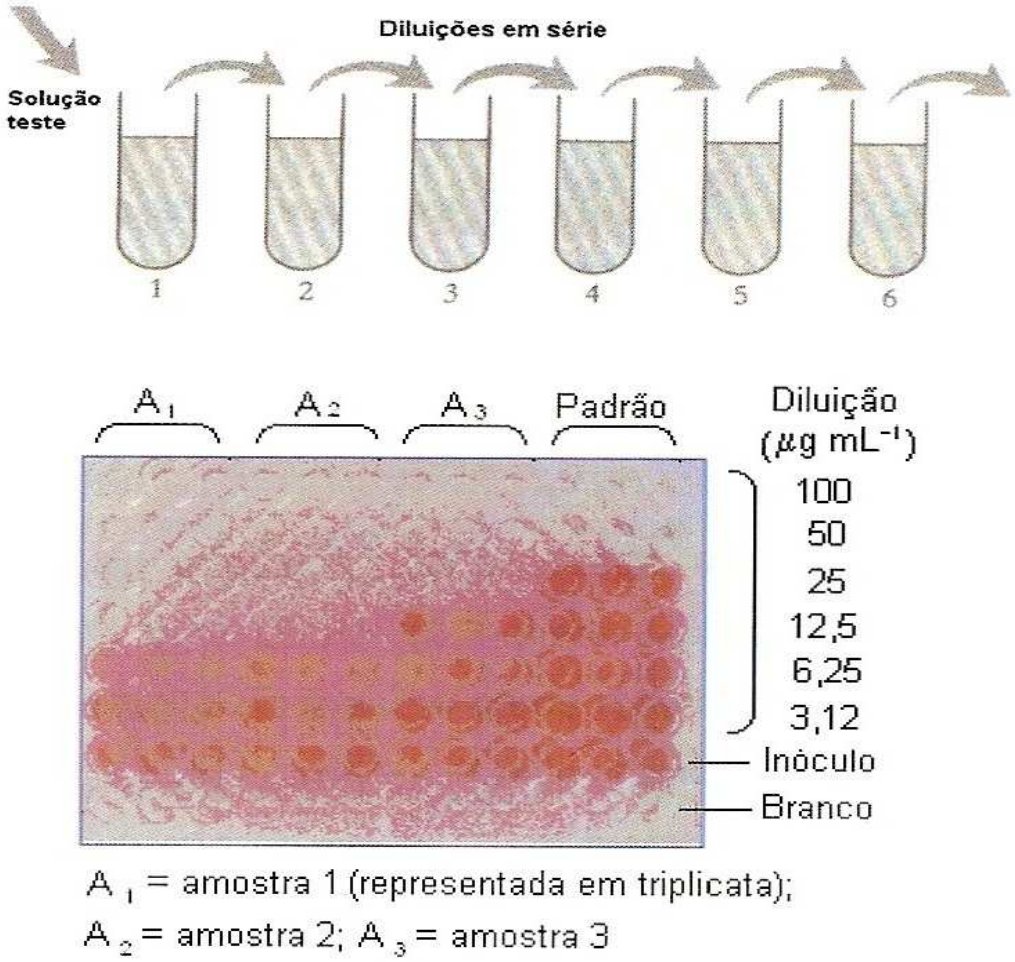


Figura 6. Método de Diluição Utilizado na Determinação da CIM.

4.8.1.2 Método de Concentração Letal Mínima

A Concentração Letal Mínima (CLM), segundo Hammer[50], é a menor concentração da substância capaz de alcançar uma redução maior que 99,9% do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

As culturas de microorganismos, que no teste CIM não apresentaram crescimento, ou foram inibidas, foram inoculadas em placas de petri contendo meio ágar específico para cada classe de microorganismo, ágar Saboraund para fungos e ágar Muller Hinton para bactérias.

Após a incubação, também respeitando o tempo para o crescimento de cada microorganismo, (24h, 35-37 ºC, bactérias e 48h, 25-27 ºC, fungos) foi determinado então a CLM. Esta foi dividida em CBM (Concentração Bactericida Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima) para cada substância testada, nos pontos de aplicação da placa de petri em que não houve crescimento microbiano.

4.8.1.3 Meios de Cultura Empregados

Para a determinação da atividade antimicrobiana pelo método de CIM de amostras puras, foram empregados os seguintes meios de cultura:

Caldo caseína de soja: utilizado no cultivo de bactérias. Contém: cloreto de sódio (5,0 g), dextrose (2,5 g), fosfato dibásico de potássio (2,5 g), peptona de caseína (17,0 g), peptona de soja (3,0 g), água destilada (1000,0 mL).

Caldo Saboraund dextrosado: utilizado no cultivo de fungos. Contém: dextrose (40,0 g), peptona de carte (5,0 g), peptona de caseína (5,0 g), água destilada (1000,0 mL).

4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atualmente, os radicais livres são precursores do desenvolvimento de um grande número de doenças, entre elas, o câncer, que afeta um alto número de indivíduos a cada ano em todo o mundo. Essa enfermidade acaba por trazer sofrimento e muita dor a parentes, e principalmente para os pacientes acometidos por essa doença. Sendo assim, é de fundamental importância, o equilíbrio entre a formação e remoção das espécies radicalares no organismo para que haja uma boa manutenção fisiológica das células. Dessa forma, há um grande interesse na descoberta de novos compostos capazes de remover estes radicais, a fim de prevenir o envelhecimento precoce das células e os efeitos indesejados provocados por essa classe de substâncias. Nada mais lógico então, que buscarmos estruturas de origem natural, pois estas estão o tempo todo sofrendo com as interperes do ambiente, e encontram mecanismos fantásticos de defesa contra esses radicais gerados. Por isso a importância de buscarmos nos produtos naturais a essência para a prevenção de doenças e outros males que as reações radicalares nos acometem.

4.9.1 Método de Determinação da Atividade do Radical Livre DPPH

Esta metodologia de avaliação da atividade antioxidante, método *screening,* empregou o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidazina, radical livre estável) para a avaliação da habilidade de ação deste como Radical oxidante, ou dos compostos testados como doadores de hidrogênio, capacidade antioxidante.

4.9.2 Método Qualitativo, *screening*

Para a realização da atividade com DPPH, quantidades conhecidas das amostras foram aplicadas em cromatoplacas de sílica gel juntamente com um antioxidante padrão conhecido, a Quercetina na concentração de 2 mg/mL.

Posteriormente, foi borrifado uma solução de DPPH (2 mg/mL em metanol), de coloração violeta λ_{max} = 517 nm, provocada pelo elétron desemparelhado, sobre a amostra, o radical pode ou não se reduzir recebendo um átomo de hidrogênio da substância ou grupo delas analisada. Os compostos ativos foram visualizados como manchas claras sobre o fundo violeta devido ao emparelhamento do elétron do radical DPPH e também a presença do resíduo de um grupo picril.[51]

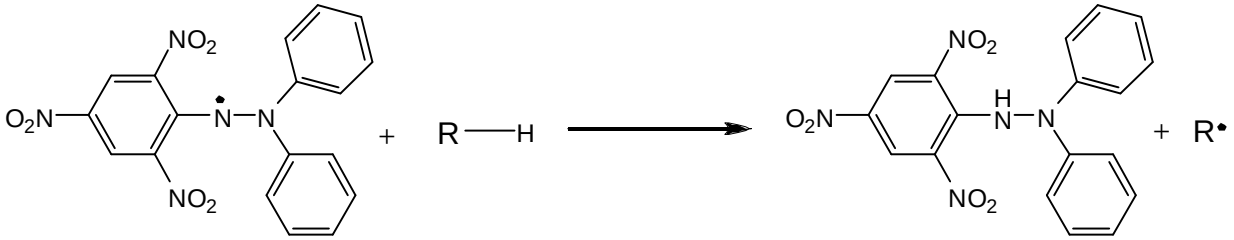
4.9.3 Método Quantitativo

A atividade antioxidante quantitativa dos compostos foi analisada pela capacidade da amostra de captar o radical livre DPPH. Para a avaliação dessa capacidade quantitativa, as amostras e o padrão BHT (di-terc-butil metilfenol) foram diluídos em etanol (3 mg/mL). A 2 mL de etanol, acrescentou-se 1 mL de amostra diluída. Procedeu-se uma diluição em série, obtendo-se as concentrações de 250 μg/mL a 7,81 μg/mL, e, a cada amostra, acrescentou-se 0,5 mL de solução metanólica de DPPH 0,004%. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a redução do radical livre DPPH foi obtida pela leitura da absorbância em 517 nm, comparando com um branco específico para cada amostra, nas suas respectivas diluições. Como controle (0% de inibição) utilizou-se uma solução de 2 mL de etanol acrescido de 0,5 mL de solução metanólica de DPPH 0,004%.

Para a avaliação da atividade captadora do radical, obteve-se a porcentagem de inibição, conforme a fórmula abaixo:

% de inibição = [(absorbância do controle – absorbância da amostra)/absorbância do controle] x 100

A determinação da IC_{50}, concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição do DPPH, foi obtida por regressão linear, a partir de pontos plotados pela média de porcentagem obtida. A estrutura do DPPH e sua redução por um agente antioxidante é mostrada na Figura 7.



DPPH

(39)

DPPH-H

(40)

Figura 7. Redução do DPPH via Radical Livre.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Dando continuidade ao estudo realizado com plantas pertencentes a família *Leguminoseae*, são apresentados os resultados obtidos da investigação dos compostos secundários referentes a espécie *Lupinus lanatus*. O objetivo deste trabalho foi de explorar a espécie mencionada em seus constituintes químicos, dentre eles, os alcalóides quinolizidínicos, os quais, estão presentes em altas concentrações e são responsáveis pela maior parte das atividades biológicas da mesma.

Durante o período de trabalho, foi possível efetuar os fracionamentos necessários do material coletado e subseqüente análise das frações, etérea e diclorometano básica, originadas dos extratos metanólicos das sementes e folhas, respectivamente. Essas duas frações, por apresentarem grande quantidade dos metabólitos de interesse, exigiram a totalidade do tempo disponível de estudo para a espécie. Sendo assim, não foi dado prioridade as demais frações.

5.1 ANÁLISE DOS RENDIMENTOS DE FRACIONAMENTOS E EXTRATOS OBTIDOS DO MATERIAL COLETADO

Após o término das extrações, as frações foram devidamente secas e pesadas com a finalidade de se conhecer o rendimento de cada uma delas em relação ao material seco das sementes, folhas e aos extratos brutos obtidos das mesmas. As Tabelas 7 e 8, apresentam os rendimentos de cada fração obtida em relação ao material seco e extrato bruto provenientes das sementes e folhas de *Lupinus lanatus*.

TABELA 7. Rendimento do Óleo Fixo e das Frações Obtidas do Extrato Bruto das Sementes de *Lupinus lanatus.*

Frações	Massa obtida em (g)	Rendimento em relação as sementes secas (%)	Rendimento em relação ao extrato bruto (%)
Extrato Bruto	489,0	33,0	-
Óleo fixo	1,302	0,104	-
Hexânica neutra	28,012	2,241	5,601
Diclorometano neutra	16,051	1,284	3,265
Acetato de etila neutra	12,032	0,962	2,450
n-butanol neutra	13,504	1,080	2,650
Etérea ácida	14,546	1,163	2,857
Etérea básica	10,063	0,805	2,041

TABELA 8. Rendimento das Frações Obtidas do Extrato Bruto das Folhas de *Lupinus lanatus.*

Frações	Massa obtida em (g)	Rendimento em relação as folhas secas (%)	Rendimento em relação ao extrato bruto (%)
Extrato bruto	287,0	27,0	-
Hexânica neutra	16,105	1,632	5,572
Diclorometano neutra	8,056	0,816	2,787
Acetato de etila neutra	7,044	0,714	2,432
n-butanol neutra	11,403	1,123	3,820
Etérea ácida	12,701	1,295	4,181
Diclorometano básica	5,107	0,510	1,742

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO FIXO, EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO ETÉREA BÁSICA DAS SEMENTES DE *Lupinus lanatus*

A determinação da atividade antimicrobiana utilizando o método de Micro-diluição em Caldo foi realizada com: o óleo fixo, extrato bruto metanólico e fração etérea básica das sementes.

De acordo com os resultados obtidos, podemos considerar o óleo fixo das sementes fracamente ativo frente aos microorganismos testados, exceto, em relação a *Staphylococcus aureus* e a *Sacharomyces cerevisae,* onde este obteve uma CIM de 250 μg/mL e uma CIM e uma CLM de 250 μg/mL, respectivamente. Dessa forma, para esses dois microorganismos, o óleo fixo pode ser considerado moderadamente ativo.

Para o extrato bruto metanólico, os resultados das atividades antimicrobianas também foram considerados fracamente ativos em relação aos microorganismos

analisados. Nesse caso, este extrato obteve uma CIM de 500 μg/mL ou maior, como é o caso do microorganismo *Bacillus subtilis.*

Os resultados da atividade antimicrobiana referente a fração etérea básica das sementes, demonstraram novamente uma fraca atividade em relação as cepas avaliadas, sendo que, para quatro delas, a CIM permaneceu acima de 500 μg/mL, como é o caso dos microorganismos *Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis*, *Escherichia coli e Klebsiella pneumoneae.*

A Tabela 9 lista os resultados obtidos da atividade antimicrobiana referida acima.

TABELA 9. Atividade Antimicrobiana do Óleo Fixo, Extrato Bruto e Fração Etérea Básica das Sementes de *Lupinus lanatus* em μg/mL.

Microorganismos	Óleo fixo sementes		Extrato bruto sementes		Fração etérea básica sementes		Padrão
	CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM
S. aureus	250	>500	500	>500	500	>500	3,12
S. epidermidis	500	>500	500	>500	>500	-	3,12
B. subtilis	500	>500	>500	-	>500	-	3,12
E. coli	500	>500	500	>500	>500	-	3,12
K. pneumonia	500	>500	500	>500	>500	-	3,12
S. pyogenes	500	>500	500	>500	500	>500	6.25
S. cerevisae	250	250	500	>500	500	500	10,3
C. albicans	500	>500	500	>500	500	500	5,15

5.2.1 Atividade Antimicrobiana dos Compostos Isolados da Fração Básica do Extrato Bruto das Sementes

Da fração etérea básica das sementes, foram isolados e identificados dois alcalóides, (-)multiflorina e (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina. Ambos foram avaliados quanto a suas capacidades de inibição de microorganismos pela metodologia de Micro-diluição em Caldo.

A (-)multiflorina demonstrou uma atividade interessante frente aos treze microorganismos testados, apresentando uma maior capacidade de inibir bactérias do que fungos. Este alcalóide exibiu uma média de CIM, para bactérias gram-positivas e gram-negativas, de aproximadamente 50 μg/mL, podendo ser considerado como moderadamente ativo.

Já as CLM para o alcalóide (-)multiflorina, com exceção do microorganismo *Staphylococcus saprophyticus,* que foi de 100 μg/mL, ficaram acima de 100 μg/mL.

Isso demonstra, que este alcalóide possui somente um efeito de inibição de crescimento e não de letalidade para microrganismos avaliados, nas concentrações utilizadas.

O composto (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina mostrou-se moderadamente ativo frente aos microorganismos avaliados. Este também foi mais ativo frente a bactérias do que a fungos. A substância referida exibiu uma CIM e uma CLM de 100 μg/mL para *S.epidermidis* e uma CIM de 25 μg/mL e uma CLM de 100 μg/mL para *S. saprophyticus,* demonstrando uma atividade moderada para ambos. Para os demais microorganismos avaliados, o alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina apresentou somente efeito inibitório nas concentrações testadas. Frente a fungos, também demonstrou uma fraca atividade.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos da atividade antimicrobiana realizada com os alcalóides (-)multiflorina e (-)13-α-*cis*-Tigloiloximultiflorina.

TABELA 10. Atividade Antimicrobiana de (-)multiflorina e (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina Isolados das Sementes de *Lupinus lanatus* em μg/mL.

Microorganismos	(-)multiflorina		(-)13-α -*cis*-tigloiloximultiflorina		Padrões
	CIM/CLM		CIM/CLM		CIM
Staphylococcus aureus	50	>100	100	>100	3,12
Staphylococcus epidermidis	50	>100	100	100	3,12
Bacillus subtilis	>100	>100	50	>100	3,12
Escherichia coli	100	>100	100	>100	3,12
Klebsiella pneumonia	50	>100	100	>100	3,12
Streptococcus pyogenes	50	>100	50	>100	3,12
Staphylococcus saprophyticus	50	100	25	100	3,12
Pseudomonas aeroginosa	50	>100	50	>100	3,12
Shigella sonnei	100	>100	100	>100	3,12
Sacharomyces cerevisae	100	>100	>100	-	5,15
Candida albicans	>100	-	>100	-	6,25
Candida tropicalis	>100	-	>100	-	6,25
Cryptococcus neoformans	>100	-	>100	-	10,3

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES NEUTRAS, FRAÇÕES ETÉREA ÁCIDA E DICLOROMETANO BÁSICA DAS FOLHAS DE *Lupinus lanatus*

O extrato bruto metanólico das folhas de *Lupinus lanatus* apresentou uma baixa atividade antimicrobiana, sendo ativo nas concentrações de 500 μg/mL para *Bacillus subtilis, Staphylococcus saprophyticus, Sacharomyces cerevisae* e 250 μg/mL para

Candida albicans. As CLM para esses microorganismos ficaram acima de 500 μg/mL caracterizando assim uma baixa atividade para o mesmo.

As frações hexânicas e diclorometano neutras apresentaram uma maior atividade antimicrobiana frente aos microorganismos testados, porém, ainda é uma atividade considerada baixa. Das duas frações testadas, o melhor resultado foi obtido pela fração diclorometano neutra em relação ao microorganismo *E. coli*, a qual apresentou uma CIM e uma CLM de 250 μg/mL.

Os resultados referentes a atividade antimicrobiana das frações acetato de etila e n-butanol neutras das folhas de *Lupinus lanatus* apresentaram uma melhora modesta. Das duas frações avaliadas, a fração acetato de etila, se destacou em relação a n-butanol frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus,* onde, para ambos, esta obteve uma CIM e uma CLM de 250 μg/mL. A fração n-butanol mostrou-se mais ativa frente a fungos que as outras frações.

A fração ácida apresentou uma baixa atividade, porém, com destaque em relação ao microorganismo *Staphylococcus saprophyticus* com uma CIM e uma CLM de 250 μg/mL. Os resultados desta fração não foram listados em tabela, devido a pouca expressividade dos mesmos em relação as outras frações.

A fração básica mostrou-se modestamente mais ativa que a fração ácida e também se destacou frente ao microorganismo *Staphylococcus saprophyticus* com uma CIM de 125 μg/mL e uma CLM de 250 μg/mL.

As Tabelas, 11 e 12, listam os resultados das atividades antimicrobianas referidos acima.

TABELA 11. Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto, Fração Hexânica Neutra e Fração Diclorometano Neutra Obtidas das Folhas de *Lupinus lanatus* em µg/mL.

Microorganismos	Extrato bruto folhas		Fração Hexânica neutra		Fração CH_2Cl_2 neutra		Padrões
	CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM
S. aureus	-	-	-	-	500	>500	3,12
S. epidermidis	-	-	-	-	-	-	3,12
B. subtilis	500	>500	500	>500	-	-	3,12
E. coli	-	-	500	>500	250	250	3,12
K. pneumonia	-	-	500	>500	500	>500	3,12
S. pyogenes	-	-	-	-	-	-	3,12
S. saprophyticus	500	>500	250	>500	500	>500	3,12
P. aeroginosa	-	-	-	-	500	>500	3,12
S.sonnei	-	-	-	-	-	-	3,12
S. cerevisae	500	>500	500	>500	-	-	5,15
C. albicans	250	>500	250	>500	500	>500	6,25
C. tropicalis	-	-	500	>500	-	-	6,25
C neoformans	-	-	-	-	-	-	10,3

TABELA 12. Atividade Antimicrobiana das Frações Acetato de Etila, n-butanol e Diclorometano Básica Obtidas das Folhas de *Lupinus lanatus* em μg/mL.

Microorganismos	Fração Acetato neutra		Fração n-butanol neutra		Fração CH_2Cl_2 Básica Folhas		Padrões
	CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		CIM
S. aureus	250	250	-	-	-	-	3,12
S. epidermidis	500	>500	-	-	-	-	3,12
B. subtilis	500	>500	-	-	-	-	3,12
E. coli	-	-	-	-	-	-	3,12
K. pneumonia	500	>500	500	>500	-	-	3,12
S. pyogenes	250	>500	250	>500	500	>500	3,12
S. saprophyticus	250	250	-	-	125	250	3,12
P. aeroginosa	500	>500	500	>500	500	>500	3,12
S.sonnei	500	>500	500	>500	-	-	3,12
S. cerevisae	-	-	500	>500	-	-	5,15
C. albicans	500	>500	500	>500	500	>500	6,25
C. tropicalis	-	-	500	>500	-	-	6,25
C neoformans	-	-	250	>500	250	>500	10,3

5.3.1 Atividade Antimicrobiana dos Compostos Isolados da Fração Diclorometano Básica das Folhas de *Lupinus lanatus*

As substâncias isoladas e identificadas, da fração diclorometano básica do extrato bruto das folhas foram: **(36)** (+)13-α-hidroxilupanina, **(37)** (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina e **(38)** (+)Lanatina A.

Todas elas foram avaliadas quanto sua atividade antimicrobiana, a fim de verificar o potencial das mesmas frente aos microorganismos analisados.

Com excessão da substância (+)13-α-hidroxilupanina, os outros dois compostos, (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina e (+)Lanatina A, apresentaram uma boa atividade antimicrobiana. A Lanatina A se destacou por apresentar uma CIM na concentração de 25 μg/mL para os microorganismos *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus saprophyticus* e *Shigella sonnei,* sendo que, para *Staphylococcus saprophyticus,* a substância referida apresentou uma CLM de 50 μg/mL.

Os resultados das atividades antimicrobianas com os compostos isolados e identificados das folhas de *Lupinus lanatus* estão listados na Tabela 13.

TABELA 13. Atividade Antimicrobiana dos Compostos Isolados e Identificados, (**36**) (+)13α-hidroxilupanina, a (**37**) (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina e (**38**)Lanatina A, da Fração Básica do Extrato Bruto das Folhas de *Lupinus lanatus* em µg/mL.

Microorganismos	**36**		**37**		**38**		Padrões
	CIM/CLM		CIM/CLM		CIM/CLM		
S. aureus	-	-	50	>100	50	>100	3,12
S. epidermidis	100	>100	50	>100	25	>100	3,12
B. subtilis	-	-	100	>100	100	>100	3,12
E. coli	-	-	100	>100	50	>100	3,12
K. pneumonia	100	>100	100	>100	50	>100	3,12
S. pyogenes	-	-	50	>100	25	>100	3,12
S. saprophyticus	50	>100	50	>100	25	50	3,12
P. aeroginosa	-	-	50	>100	50	>100	3,12
S. sonnei	-	-	50	>100	25	>100	3,12
S. cerevisae	-	-	100	>100	100	>100	5,15
C. albicans	50	>100	50	>100	50	>100	6,25
C. tropicalis	-	-	-	-	-	-	6,25
C. neoformans	-	-	100	>100	100	>100	10,3

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DAS SEMENTES E FOLHAS DE *Lupinus lanatus*

Para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH, as amostras foram testadas, pelo método qualitativo, na concentração de 50 µg/mL. Nesta concentração, todas as amostras, exceto a substância (+)13-α-hidroxilupanina, isolada da fração básica, proveniente do extrato bruto metanólico das folhas de *Lupinus lanatus,* apresentaram resultado positivo para o método de DPPH.

A análise da atividade antioxidante utilizando a metodologia mencionada, pelo método quantitativo, demonstrou uma atividade muito interessante para todas as amostras avaliadas. Em destaque, a Fração Acetato de etila neutra, obtida do extrato metanólico das folhas de *Lupinus lanatus,* apresentou uma capacidade de inibir radicais livres, muito semelhante a do padrão utilizado, BHT. A fração em questão, foi ativa até a concentração de 3,10 μg/mL, última concentração testada, como mostra o gráfico da Figura 8.

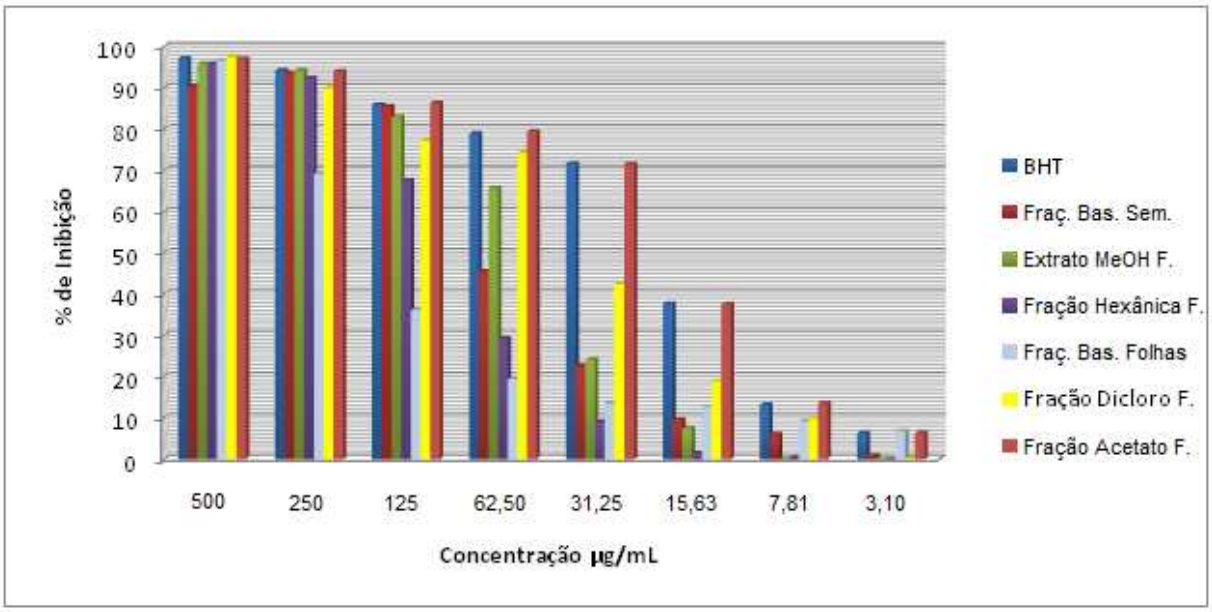
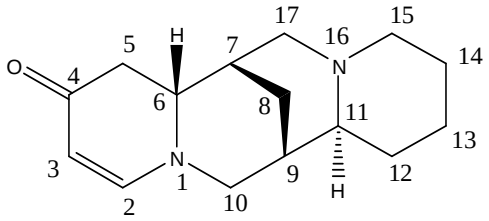


Figura 8. Gráfico da Atividade Antioxidante do Extrato Bruto e Frações de *Lupinus lanatus.*

5.5 METABÓLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ETÉREA BÁSICA DAS SEMENTES

5.5.1 Alcalóide (-)Multiflorina, RMN ^{1}H e ^{13}C



(34)

Figura 9. Estrutura Química do Alcalóide (-)multiflorina.

Este metabólito foi isolado das sementes de *Lupinus lanatus* como referido no item 4.6.2.1 (pag. 27). Os dados obtidos dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Anexo 1-2, pag. 106-107), foram comparados aos da literatura[37] (Tabela 13), resultando na elucidação da estrutura como sendo a de (-)multiflorina.

O espectro de ^{13}C apresenta algumas características do núcleo quinolizidínico deste alcalóide como a presença de uma carbonila (C=O) α-β-insaturada, com deslocamento químico de δ 192,5 ppm, e dois sinais nas regiões de δ 99,4 ppm e δ 155,6 ppm, representando os carbonos da dupla ligação.

O espectro de ^{1}H obtido dessa estrutura, apresenta um dubleto na região de δ 5,01 ppm e outro na região de δ 6,85 ppm, ambos com um J = 7,6 Hz representando os hidrogênios na posição *cis,* ligados aos carbonos da dupla ligação do núcleo quinolizidínico.

Os dados obtidos do estudo de luz plano polarizada, bem como o sistema eluente utilizado na CCDP para o isolamento e purificação desta molécula, e os aspectos físicos da mesma, $[\alpha]_D^{25}$= -290°, ($_C$ = 0,1, MeOH); Rf: 0,43 em CH_2Cl_2/MeOH (72:28), também conferem com os resultados da literatura.[37] A referência em questão,

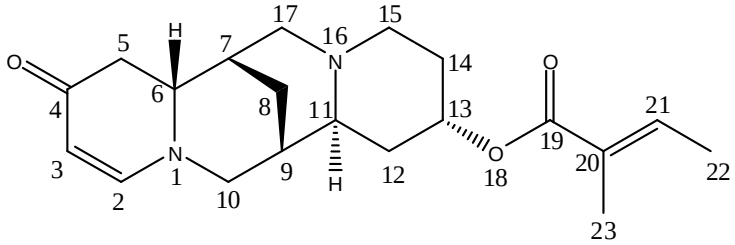
apresenta um $[\alpha]_D^{25}$= -299°, ($_C$ = 0,1, MeOH). A pouca variação dos dados de luz plano polarizada, também vem a somar na confirmação da estrutura como sendo o alcalóide (-)multiflorina.

A Tabela 14 lista os dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C obtidos dos respectivos espectros da substância isolada e comparados aos dados de RMN de ^{13}C obtidos da literatura.[37]

TABELA 14. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C Obtidos da Amostra Isolada das Sementes de *Lupinus lanatus* Comparados aos dados de RMN de ^{13}C da Literatura[37].

	Comparação dos dados de ^{13}C		
Posição	δ ^{13}C, obtido (ppm)	δ ^{13}C, literatura[37]	δ ^{1}H (*J* em Hz) obtidos
2	155,6, CH	155,6, CH	6,85 (d, J = 7,6 Hz; 1H)
3	99,4, CH	99,1, CH	5,01 (d, J = 7,6 Hz; 1H)
4	192,5, C=O	192,5, C=O	-
5	39,2, CH_2	39,3, CH_2	H_a 3,15 (m, 1H); H_b 2,67 (m, 1H)
6	60,2, CH-N	60,3, CH-N	3,12 (m, 1H)
7	30,4, CH	31,1, CH	1,74 (m, 1H)
8	25,5, CH_2	25,7, CH_2	H_a 1,55 (m, 1H); H_b 1,26 (m, 1H)
9	34,2, CH	34,4, CH	1,81 (m, 1H)
10	57,2, CH_2-N	57,4, CH_2-N	H_a 3,11 (dt, J = 16,4 e 2,8 Hz, 1H); H_b 2,69 (m, 1H)
11	63,3, CH-N	63,6, CH-N	2,21 (m, 1H)
12	30,9, CH_2	31,4, CH_2	H_a 1,59 (m, 1H); H_b 1,36 (m, 1H)
13	24,4, CH_2	24,7, CH_2	H_a 1,55 (m, 1H); H_b 1,45 (m, 1H)
14	23,1, CH_2	23,6, CH_2	1,34 (m, 2H)
15	54,9, CH_2-N	54,4, CH_2-N	H_a 2,52 (m, 1H); H_b 2,49 (m, 1H)
17	50,5, CH_2-N	51,1, CH_2-N	H_a 2,22 (m, 1H); H_b 2,15 (m, 1H)

5.5.2 Alcalóide (-)13-α-*cis*-Tigloiloximultiflorina



(35)

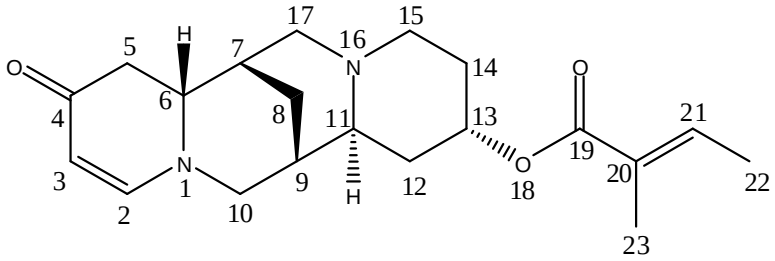
Figura 10. Estrutura Química do Alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina.

Conforme descrito no item 4.6.2.2 (pag. 28), foi possível o isolamento de 13,0 mg deste composto.

Esta substância apresenta-se também, como um óleo de coloração amarelo claro com um $[\alpha]_D^{25}$= -194 °, ($_C$ = 0,1, MeOH); Rf: 0,48 em CH_2Cl_2/MeOH (70:30).

A utilização de técnicas de RMN unidimensionais (^{1}H e ^{13}C) e bidimensionais (COSY, DEPT, HMBC e HMQC), proporcionaram a elucidação do grupamento ligado ao C-13 do núcleo do alcalóide (-)multiflorina. O grupamento em questão foi identificado como sendo um resíduo de ácido-(E)-2-metilbut-2-enóico. Assim, a estrutura foi definida como (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina.

5.5.2.1 Alcalóide (-)13-α-*cis*-Tigloiloximultiflorina, RMN de ^{1}H



(35)

O espectro de ^{1}H de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina (Fig. 11) mostra dois dubletos, um na região de δ 5,01 e outro na região de δ 6,85 ppm, ambos com um J = 7,6 Hz a exemplo do composto (-)multiflorina. Esse mesmo espectro também apresenta uma região de sinais complexos em campo alto. Porém, neste caso, ocorre a presença de um quarteto em δ 3,75 ppm (1H, q, J = 7,2 Hz), cuja, a integração dos sinais indica somente a presença de um próton, hidrogênio esse que se correlaciona com os prótons de C-22, uma das metilas, e por isso esse desdobramento de sinais.

O espectro de ^{1}H do composto em questão, também apresenta sinais sobrepostos na região de δ 1,25 ppm e um multipleto na região de δ 0,8 a δ 1,0 ppm, em que a integração dos sinais aponta a presença de seis hidrogênios, representando as metilas que fazem parte do grupamento ligado ao núcleo básico (-)multiflorina.

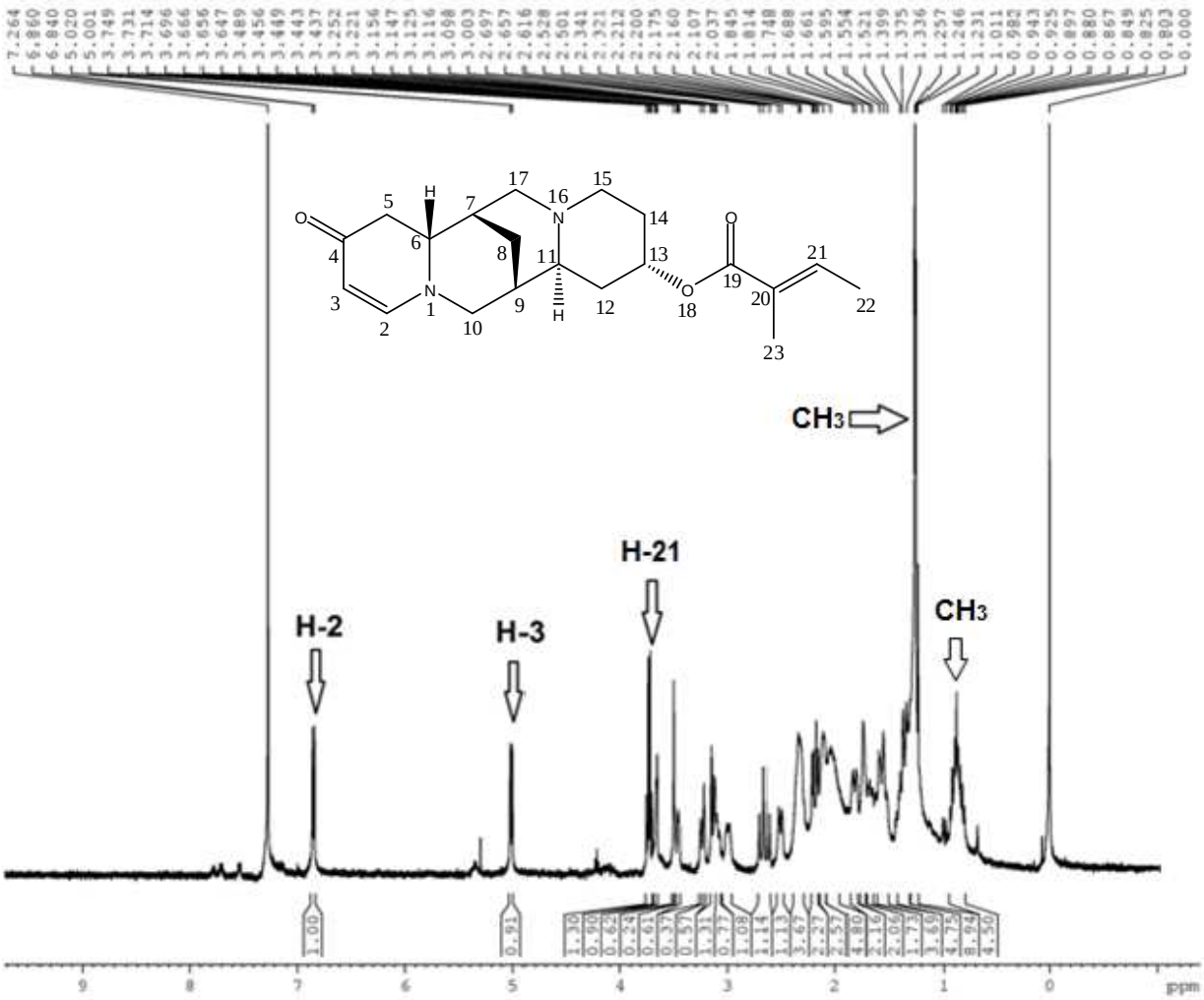


Figura 11. Espectro de RMN ^{1}H do composto (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

A Figura 12 mostra a expansão do espectro de RMN de ^{1}H do composto relacionado, onde é possível observar os desdobramentos, os dubletos correspondentes ao, H-2 e H-3, que fazem parte do núcleo básico do alcalóide (-)multiflorina na região de campo mais baixo do espectro. Como já mencionado, o J = 7,6 Hz, indica que os hidrogênios relacionados estão em posição *cis.*

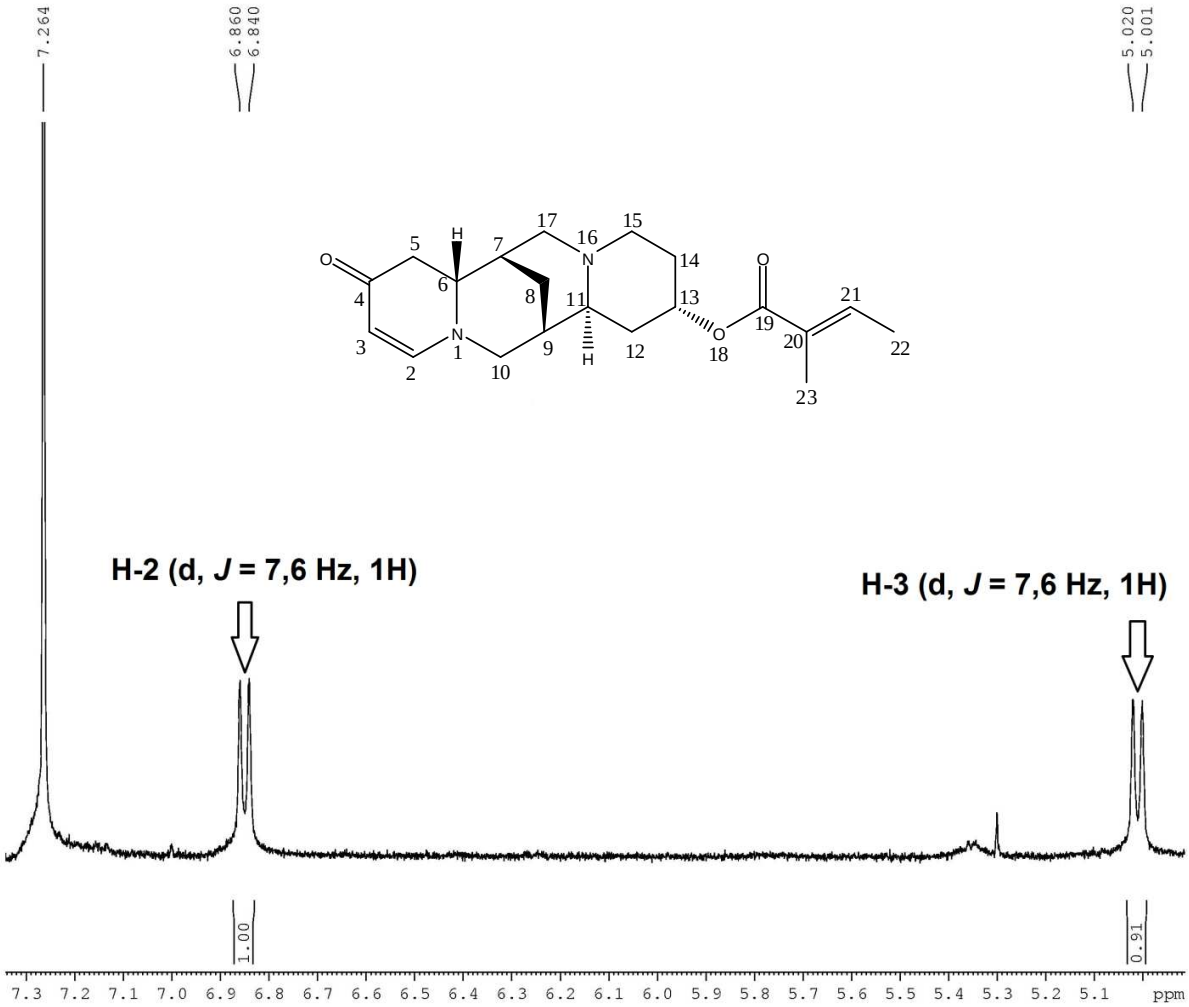


Figura 12. Espectro de RMN de ^{1}H expandido (região de δ 5,0 a δ 7,35 ppm) de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

O quarteto que representa H-21 está indicado na Figura 13, a qual, mostra uma expansão da região do espectro de RMN de ^{1}H entre δ 1,5 a δ 3,8 ppm de (-)13α-*cis*-tigloiloximultiflorina. Este desdobramento de sinais fornece um J = 7,2 Hz, e a integração dos mesmos, aponta para a presença de somente 1H. Assim, os resultados dos cálculos de *J* Resolvido, juntamente com a análise dos desdobramentos, a integração dos sinais e o deslocamento químico, apresentado por este próton, permitiu

concluir que o mesmo está correlacionado com os hidrogênios da metila de C-22. O valor de *J* Resolvido também deu margem para determinar que as duas metilas do grupamento ligado ao núcleo de (-)multiflorina, encontram-se em posição *cis* uma em relação a outra.

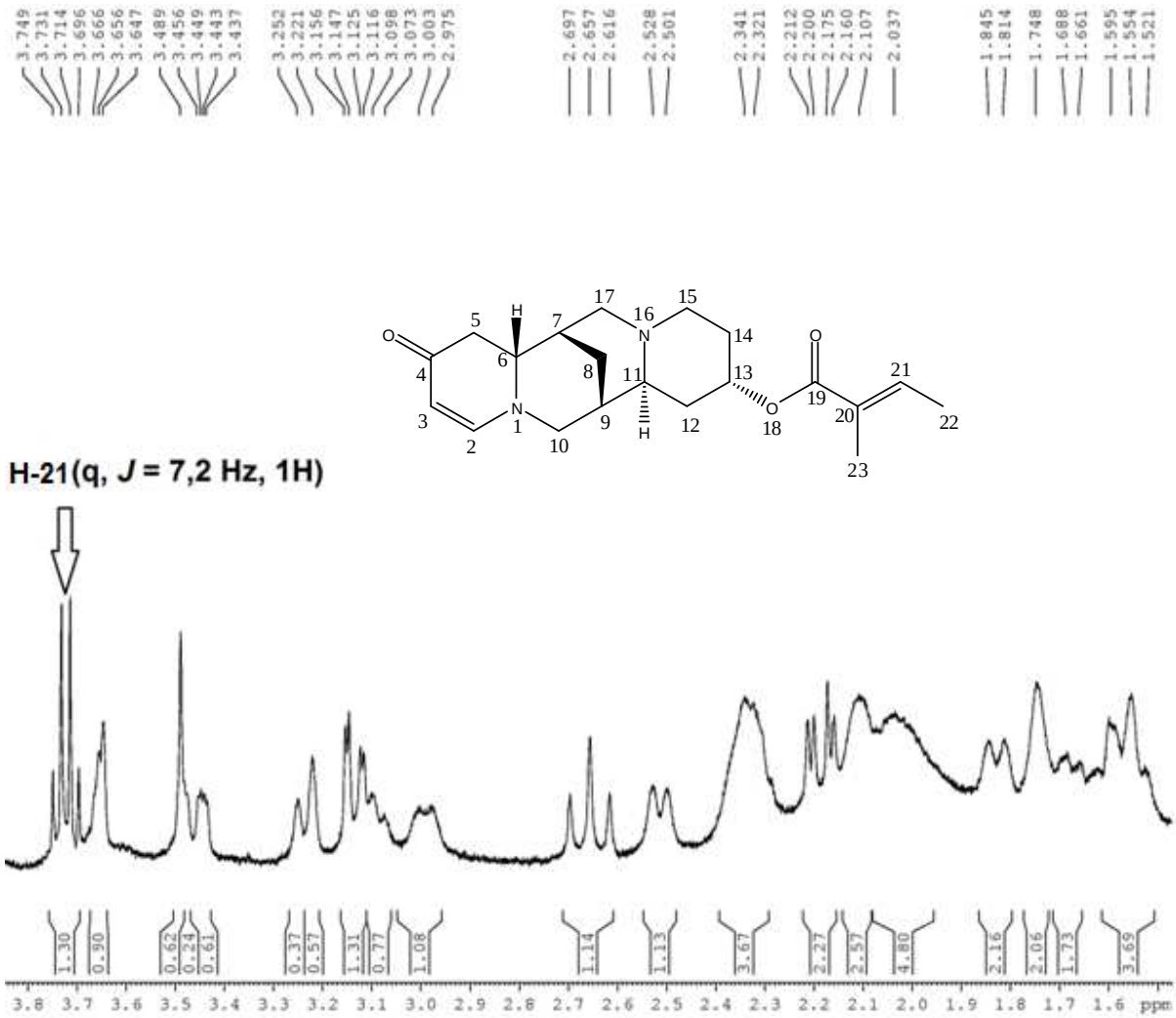


Figura 13. Espectro de RMN de ^{1}H expandido (região de δ 1,5 a δ 3,8 ppm) do alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

As metilas podem ser observadas no espectro de RMN de ^{1}H expandido (região de δ 0,7 a δ 2,7 ppm). Os picos correspondentes as mesmas, estão na região de campo

mais alto do espectro e apresentam um deslocamento químico entre δ 0,80 a δ 1,26 ppm. A Figura 14 mostra a localização das mesmas no espectro de RMN de ^{1}H expandido.

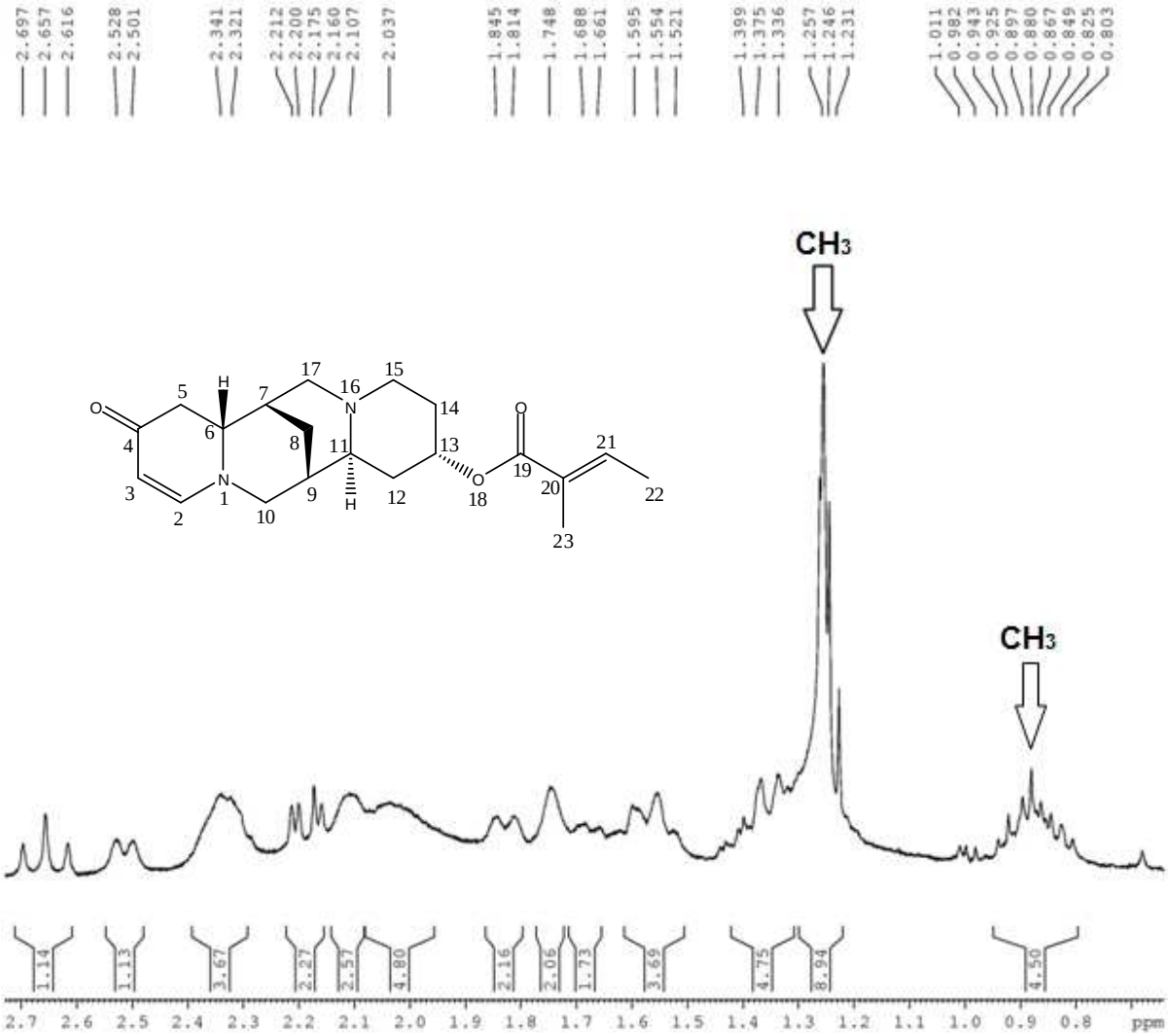


Figura 14. Espectro de RMN de ^{1}H expandido (região de δ 0,8 a δ 2,7 ppm) do alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

5.5.2.2 Alcalóide (-)13-α-*cis*-Tigloiloximultiflorina, RMN de ^{13}C

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 15) da substância identificada como (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina apresentou vinte sinais.

De todos os sinais, quinze deles foram comparados aos da literatura[37] e caracterizaram parte da molécula como sendo o núcleo quinolizidínico de (-)multiflorina. Os outros cinco, correspondem ao grupamento associado a este alcalóide.

Os picos mais característicos referentes ao núcleo básico de (-)multiflorina são os sinais de carbonila α-β-insaturada δ 192,4 ppm, e os sinais de dupla ligação presente no núcleo básico, com deslocamentos de δ 155,6 e δ 99,4 ppm, correspondendo aos C-2 e C-3 respectivamente.

Uma diferença que caracteriza a presença de um oxigênio ligado ao C-13, é uma alteração no deslocamento do mesmo, que passou de δ 24,4 ppm, na molécula original, para δ 68,1 ppm no espectro obtido para esta substância. O espectro de RMN de ^{13}C do composto, também apresentou picos na região de campo alto em δ 10,8 e δ 13,9 ppm, caracterizando as metilas na posição *cis* uma em relação a outra. Em campo baixo, outros dois sinais apareceram na região de δ 128,7 e δ 138,0 ppm, indicando os carbonos da dupla ligação presente no grupamento associado ao alcalóide (-)multiflorina.

Também foi observado um pico característico de carbonila de éster em δ 167,8 ppm.

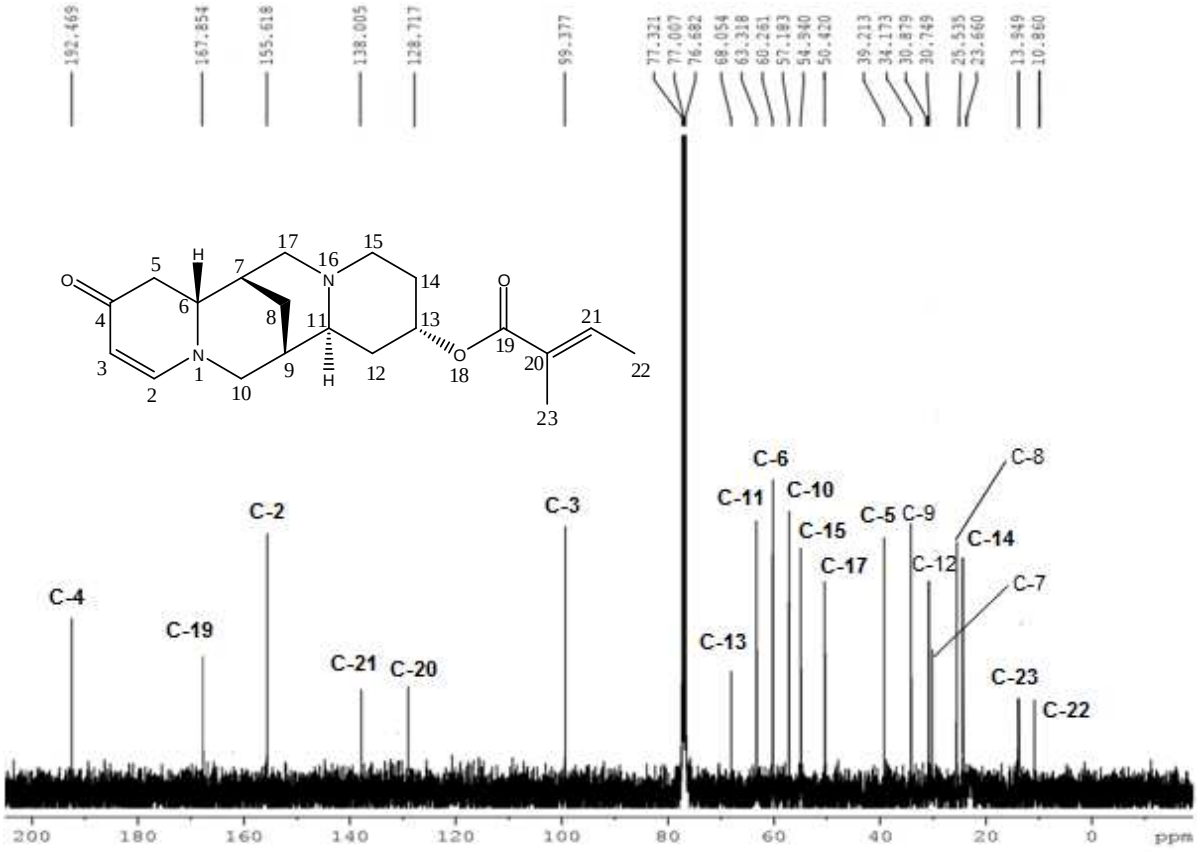


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.

5.5.2.3 RMN de correlação ^{1}H – ^{1}H (COSY)

Através da análise do espectro de RMN de correlação ^{1}H – ^{1}H COSY (Fig. 16), pode-se verificar a relação entre os prótons do núlceo do alcalóide (-)multiflorina H-2, δ 6,85 ppm e H-3, δ 5,02 ppm. Em adição, o grupamento ligado ao alcalóide, pela relação entre os hidrogênios metílicos, δ 1,25 ppm de C-23, δ 0,88 ppm de C-22 e o hidrogênio metínico δ 3,74 ppm de C-21, confirmou a estrutura sugerida para o mesmo. Através da análise deste espectro de RMN de correlação ^{1}H – ^{1}H, foi possível determinar a posição dos hidrogênios do grupamento substituinte, bem como, a confirmação da estrutura de (-)multiflorina.

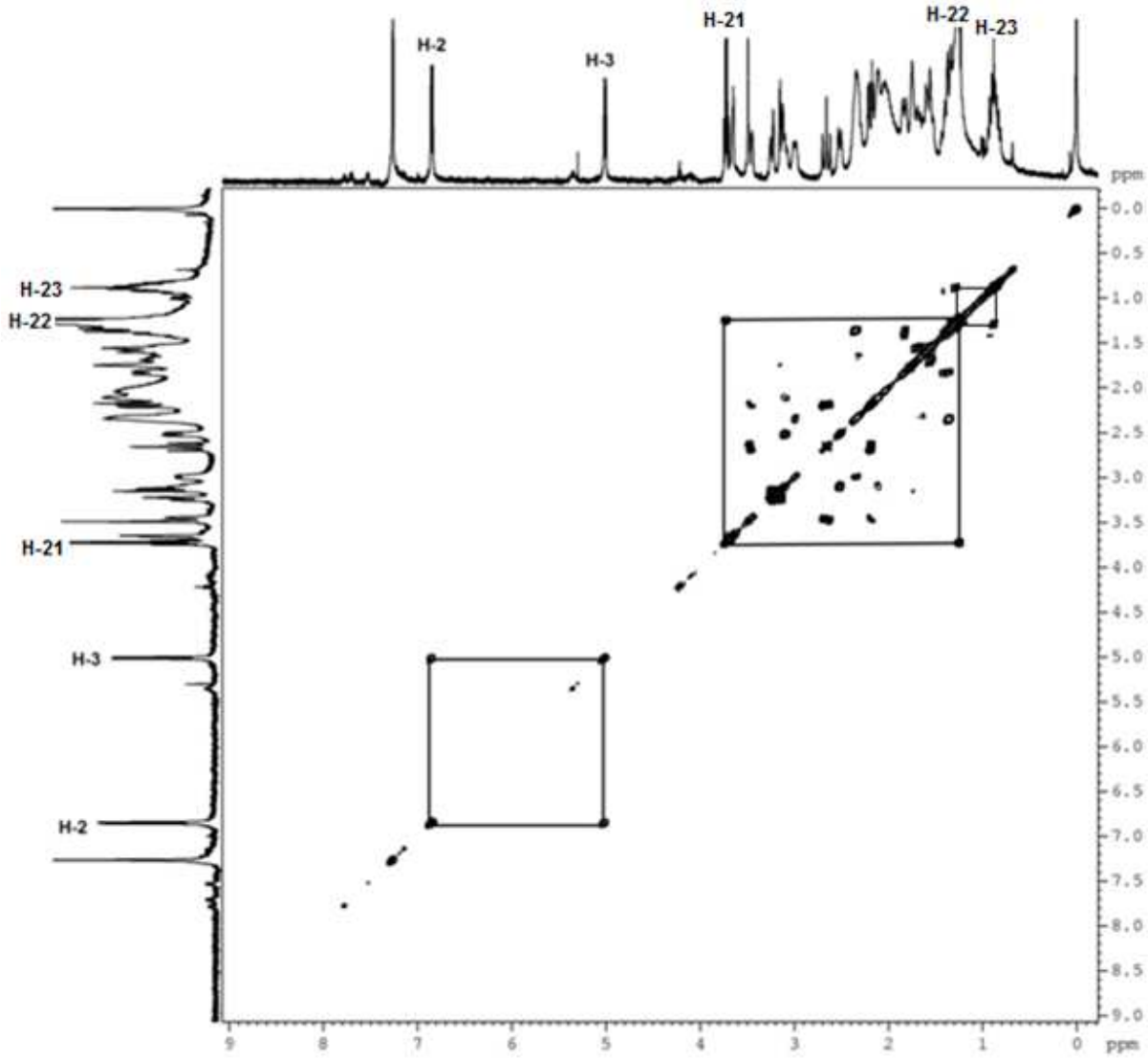


Figura 16. Espectro de RMN de correlação ^{1}H - ^{1}H COSY de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$.

5.5.2.4 RMN de correlação ^{1}H – ^{13}C (HMQC)

O espectro de RMN bidimensional heteronuclear HMQC (Fig. 17) auxiliou na confirmação dos deslocamentos químicos dos carbonos protonados de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina através da correlação com seu(s) respectivo(s) hidrogênio(s). A

análise deste espectro proporcionou a atribuição dos sinais referentes a H-13 ligado ao carbono do éster na região de δ 3,65 ppm. Também proporcionou a confirmação do núcleo básico de (-)multiflorina, através dos sinais de H-2 e H-3 (δ 6,80 e δ 5,02 ppm), respectivamente, bem como, a confirmação da estrutura do grupamento ligado ao núcleo básico mencionado acima. Isso pode ser verificado pela correlação de H-21 (δ 3,74 ppm) e seu respectivo carbono, e dos hidrogênios ligados aos carbonos das metilas (H-23 e H-22).

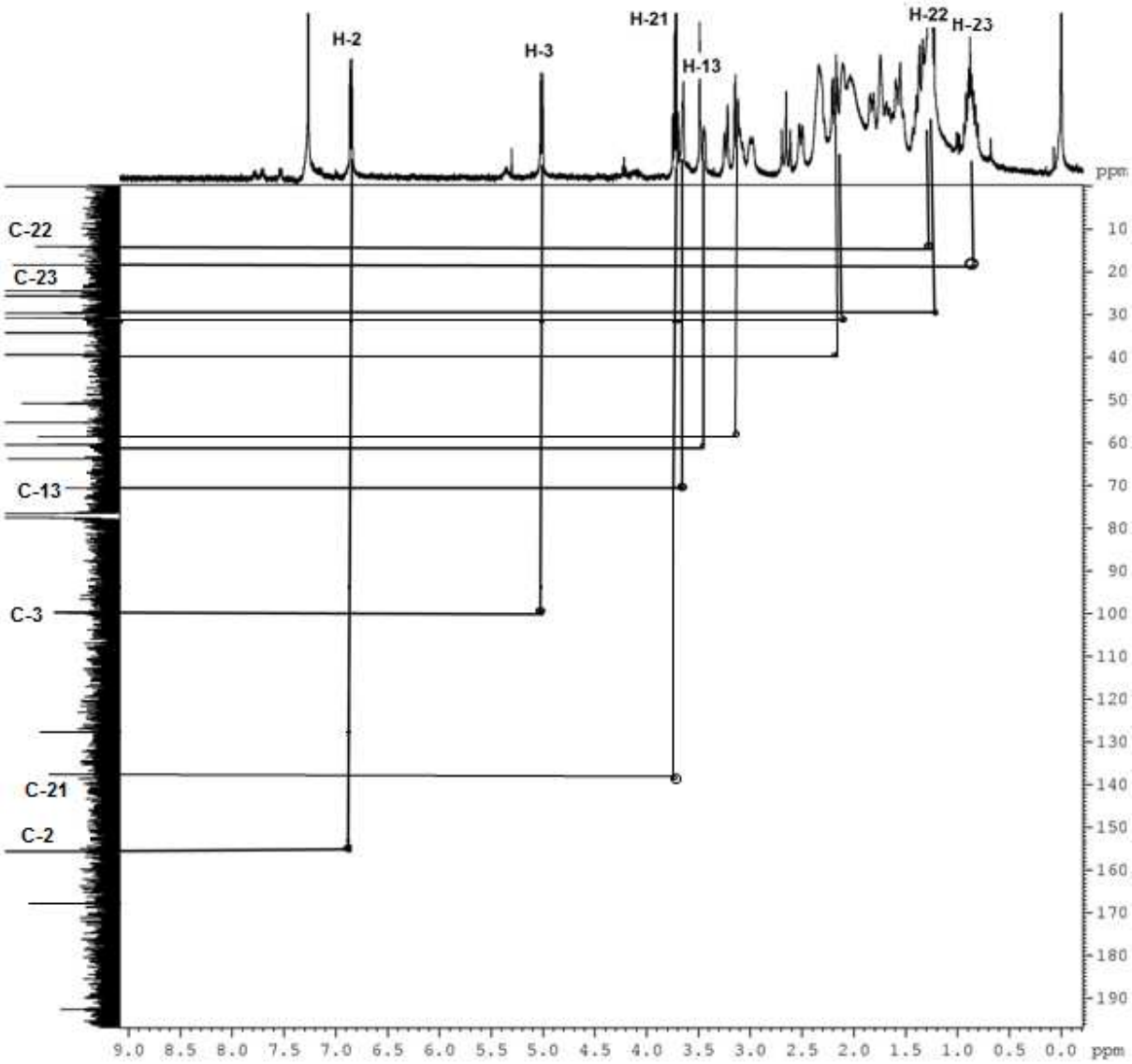


Figura 17. Espectro de RMN de correlação ^{1}H – ^{13}C HMQC de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$.

Como resultado dos estudos de RMN de ^{1}H e ^{13}C uni e bidimensionais, concluiu-se que esta estrutura é de fato o alcalóide (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina, embora não inédito na literatura, ainda não havia sido isolado desta espécie de *Lupinus*, *Lupinus lanatus.*

A estereoquímica deste composto não foi totalmente elucidada devido a pouca quantidade do produto isolado. Porém, acredita-se que seja a mesma estereoquímica presente na molécula de (-)multiflorina, isso devido ao valor obtido do desvio da luz plano polarizada, sentido negativo, bem como da pouca variação dos deslocamentos químicos que os espectros de ^{13}C e ^{1}H apresentaram quando comparados aos da literatura.[37,52] A posição espacial de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina também é sugerida através do estudo do esquema de biossíntese, segundo Okada et. al. (2005)[52], em que o núcleo básico de (-)multiflorina é sintetizado através de enzimas específicas, e estas optam pela estereoquímica observada na estrutura apresentada na Figura 9 (Pag. 55) em mais de 99% dos casos.

O Anexo 3 (pag. 108) apresenta o espectro de RMN de correlação expandido ^{1}H - ^{1}H COSY de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$.

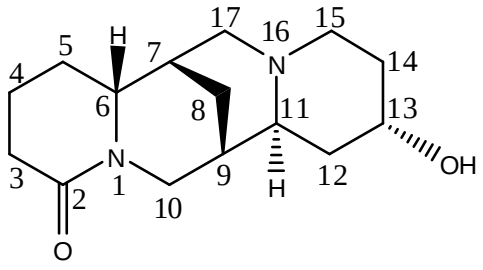
A Tabela 15 lista os dados de RMN de ^{13}C e ^{1}H de (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina.

TABELA 15. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C Obtidos da Amostra Isolada da Fração Etérea Básica do Extrato Bruto das Sementes Comparados aos da Literatura[8].

	(-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina/(-)multiflorina, RMN ^{13}C		
Posição	*δ* ^{13}C, *obtido*	*δ* ^{13}C, literatura[8]	*δ* ^{1}H (*J* em Hz)
2	155,6 CH	155,6, CH	6,86 (d, J = 7,6 Hz; 1H)
3	99,3, CH	99,1, CH	5,02 (d, J = 7,6 Hz; 1H)
4	192,4, C=O	192,5, C=O	-
5	39,1, CH_2	39,3, CH_2	H_a 3,16 (m, 1H); H_b 2,65 (m, 1H)
6	60,2, CH-N	60,3, CH-N	3,14 (m, 1H)
7	30,7, CH	31,1, CH	1,81 (m, 1H)
8	25.5, CH_2	25,7, CH_2	H_a 1,55 (m, 1H); H_b 1,25 (m, 1H)
9	34,2, CH	34,4, CH	1,84 (m, 1H)
10	57,2, CH_2-N	57,4, CH_2-N	H_a 3,11 (dt, J = 16,4 e 2,8 Hz, 1H); H_b 2,69 (m, 1H)
11	63,3, CH-N	63,6, CH-N	2,32 (m, 1H)
12	30,9, CH_2	31,4, CH_2	H_a 1,66 (m, 1H); H_b 1,37 (m, 1H)
13	68,0, CH-O	24,7, CH_2	3,65 (t, J = 4,0 e 7,6 Hz, 1H)
14	23,1, CH_2	23,6, CH_2	1,33 (m, 2H)
15	54,9, CH_2-N	54,4, CH_2-N	H_a 2,52 (m, 1H); H_b 2,49 (m, 1H)
17	50,5, CH_2-N	51,1, CH_2-N	H_a 2,20 (m, 1H); H_b 2,12 (m, 1H)
19	167,8, C=O	-	-
20	128,8, C=C	-	-
21	138,7, C=C	-	3,72 (q, J = 7,2 Hz, 1H)
22	10,8, CH_3	-	1,25 (m, 3H)
23	13,9, CH_3	-	0,85 (m, 3H)

5.6 METABÓLITOS ISOLADOS DA FRAÇÃO DICLOROMETANO BÁSICA DAS FOLHAS DE *Lupinus lanatus*

5.6.1 Alcalóide (+)13-α-Hidroxilupanina



(36)

Figura 18. Estrutura Química do Alcalóide (+)13-α-hidroximultiflorina.

O alcalóide (+)13-α-hidroxilupanina foi obtido conforme procedimento descrito no item 4.7.2.1 (pag. 34)**.** A substância em questão apresentou-se como um óleo de coloração amarelo claro.

Os estudos de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Anexo 4-5, Pag. 109-110) possibilitaram a comparação dos dados da estrutura obtida com a literatura[53,54], seguida da identificação da mesma como (+)13-α-hidroxilupanina.

O espectro de RMN de ^{13}C deste alcalóide quinolizidínico, apresentou algumas características particulares do núcleo (+)lupanina do qual é originado. Este composto apresenta, em seu espectro de RMN de ^{13}C, um pico de C=O de lactama na região de δ 169,5 ppm, que caracteriza a carbonila de C-2 do núcleo básico mencionado, e um sinal em δ 65,9 ppm que caracteriza uma ligação CH-OH de C-13.

Após a análise chegou-se a estrutura desta molécula observando a variação do deslocamento químico de C-13, já mencionado, que passou de δ 22,7 ppm, na molécula original, para δ 65,9 ppm, para este alcalóide.

O espectro de RMN ^{1}H desta molécula apresenta uma região de sobreposição de sinais em campo alto do espectro e de difícil identificação, porém, quando comparado com a literatura[11,54], nota-se uma semelhança do mesmo com o núcleo básico de (+)lupanina.

O espectro de RMN ^{1}H da substância analisada, ainda mostra um singleto na região de δ 4,82 ppm correspondente ao hidrogênio da hidroxila de C-13, cuja a integração dos sinais indica 1H.

Assim, os resultados obtidos por RMN de ^{1}H e ^{13}C de (+)13-α-hidroxilupanina estão de acordo com a literatura, mostrando uma variação dos deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C dentro do normal.

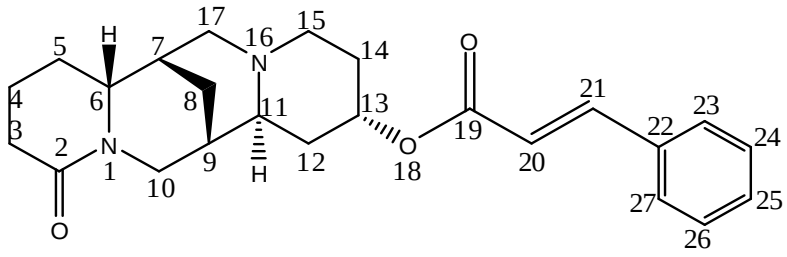
Essa pequena variação é decorrente do solvente, tipo de aparelho de RMN utilizado e condições de análise utilizadas. A partir da observação dos resultados e da comparação dos mesmos com a literatura, foi possível elucidar a estrutura e identificá-la como sendo o alcalóide (+)13-α-hidroxilupanina.

A Tabela 16 compara os resultados obtidos pelo espectro de RMN ^{13}C de (+)13-α-hidroxilupanina aos resultados da literatura[11] do núcleo de (+)lupanina.

TABELA 16. Dados de RMN de ^{13}C Obtidos para (+)13-α-hidroxilupanina Comparados com os Dados de (+)lupanina da Literatura[11], Ambos em $CDCl_3$.

Posição	Comparação dos dados de RMN de ^{13}C	
	δ ^{13}C, obtido	δ ^{13}C, literatura[11]
2	169,5, C=O	172,0, C=O
3	32,8, CH_2	32,9, CH_2
4	19,9, CH_2	19,1, CH_2
5	27,8, CH_2	27,4, CH_2
6	60,6, CH-N	60,5, CH-N
7	34,2, CH	30,7, CH
8	27,4, CH_2	25,9, CH_2
9	29,9, CH	33,3, CH
10	46,7, CH_2-N	46,1, CH_2-N
11	67,0, CH-N	65,4, CH-N
12	30,9, CH_2	31,1, CH_2
13	65,9, CH-O	22,7, CH_2
14	22,4, CH_2	22,5, CH_2
15	55,9, CH_2-N	55,8, CH_2-N
17	53,3, CH_2-N	51,3, CH_2-N

5.6.2 Alcalóide (+)13-α-*trans*-Cinamoiloxilupanina



(37)

Figura 19. Estrutura química de (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina.

Esta substância foi isolada das subfrações 39 – 41, conforme o item 4.7.2.2 (pag. 35).

Após o procedimento de isolamento, obteve-se 10,0 mg de uma substância que foi cristalizada em diclorometano. A pureza da mesma foi testada em CCD e confirmada por RMN.

O estudo de RMN de ^{1}H e ^{13}C tornou possível a identificação do núcleo básico como sendo uma (+)lupanina. Os resultados da espectroscopia de RMN e Espectrometria de Massas foram comparados com a literatura[46,47], confirmando a estrutura deste composto como sendo (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina.

Esta substância apresentou-se na forma de cristal com um PFº = 276-278 ℃ (Literatura[47], PFº= 276 ℃); Rf: 0,45 em CH_2Cl_2/MeOH (80:20); $[\alpha]_D^{25}$ = + 42° (c = 0,1, CH_2Cl_2).

Devido a pouca quantidade e ao tamanho dos cristais não foi possível realizar estudos de cristalografia por difração de Raios-X.

5.6.2.1 Alcalóide (+)13-α-*trans*-Cinamoiloxilupanina, RMN de ^{1}H

O espectro de RMN de ^{1}H (Fig. 20) mostrou uma região de sobreposição de sinais em campo alto, característico dos CH_2 que compõem no núcleo básico de (+)lupanina. Em campo mais baixo, este apresentou um dubleto na região de δ 6,34 e δ 7,50 ppm com um J = 16,2 Hz e a multiplicidade apontando a presença de somente 1H. Esse valor de *J* Resolvido é indicativo de hidrogênios em posição *trans*.

Na região de campo mais baixo, o espectro de RMN de ^{1}H também apresenta um conjunto de sinais, também em sobreposição, indicando que há um benzeno monossubstituido fazendo parte do composto.

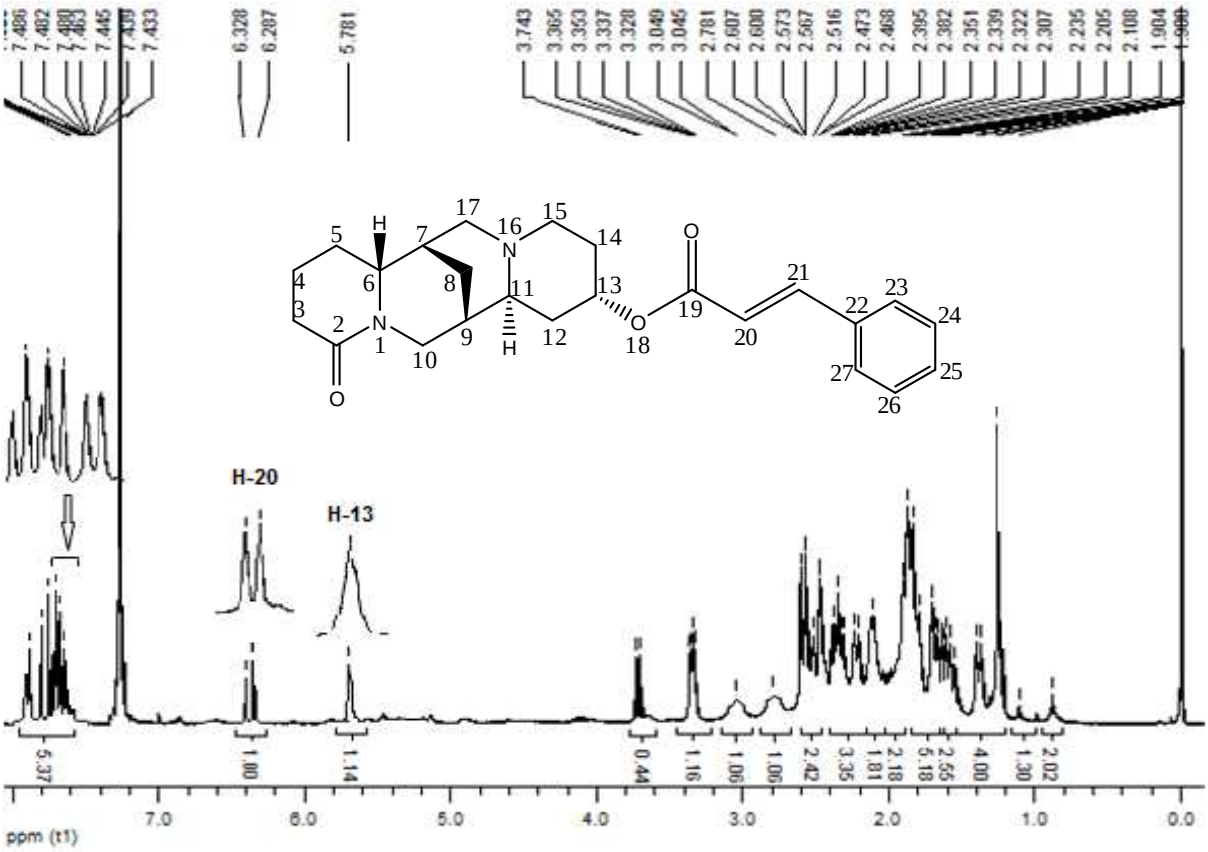
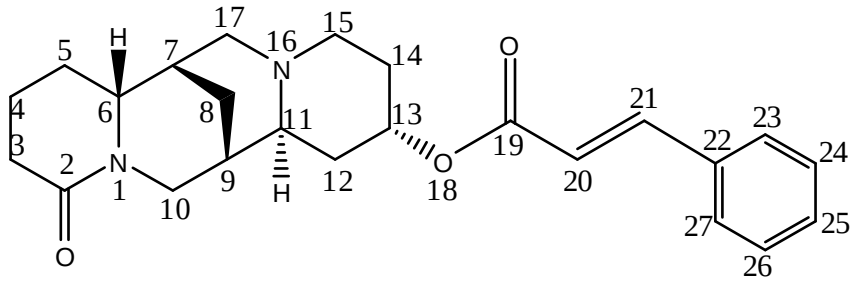


Figura 20. Espectro de RMN ^{1}H do composto (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

5.6.2.2 Alcalóide (+)13-α-*trans*-Cinamoiloxilupanina, RMN de ^{13}C



(37)

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 21) deste composto apresentou dois sinais de C=O, um em δ 171,0, indicando a presença de C=O de lactama, e um segundo sinal em δ 167,2 ppm indicando uma carbonila de éster. A lactama faz parte do núcleo básico da (+)lupanina, enquanto o sinal de C=O de éster, pertence ao grupamento associado a este. O espectro de RMN de ^{13}C ainda apresentou dois picos referentes a dupla ligação, C=C, na região de δ 116,0 e δ 145,1 ppm. Observou-se também quatro sinais na região de aromáticos em δ 127,9, δ 128,7, δ 128,9 e δ 135,2 ppm, sugerindo a presença de um benzeno monossubstituido. Um sinal de CH-O referente a C-13 com um deslocamento de δ 67,5 ppm, caracterizando assim uma substituição presente neste carbono também foi observado. Comparando os resultados, nota-se uma variação no deslocamento químico de C-13 que passa de δ 22,7 para δ 67,5 ppm indicando a presença do oxigênio do éster ligado a ele.

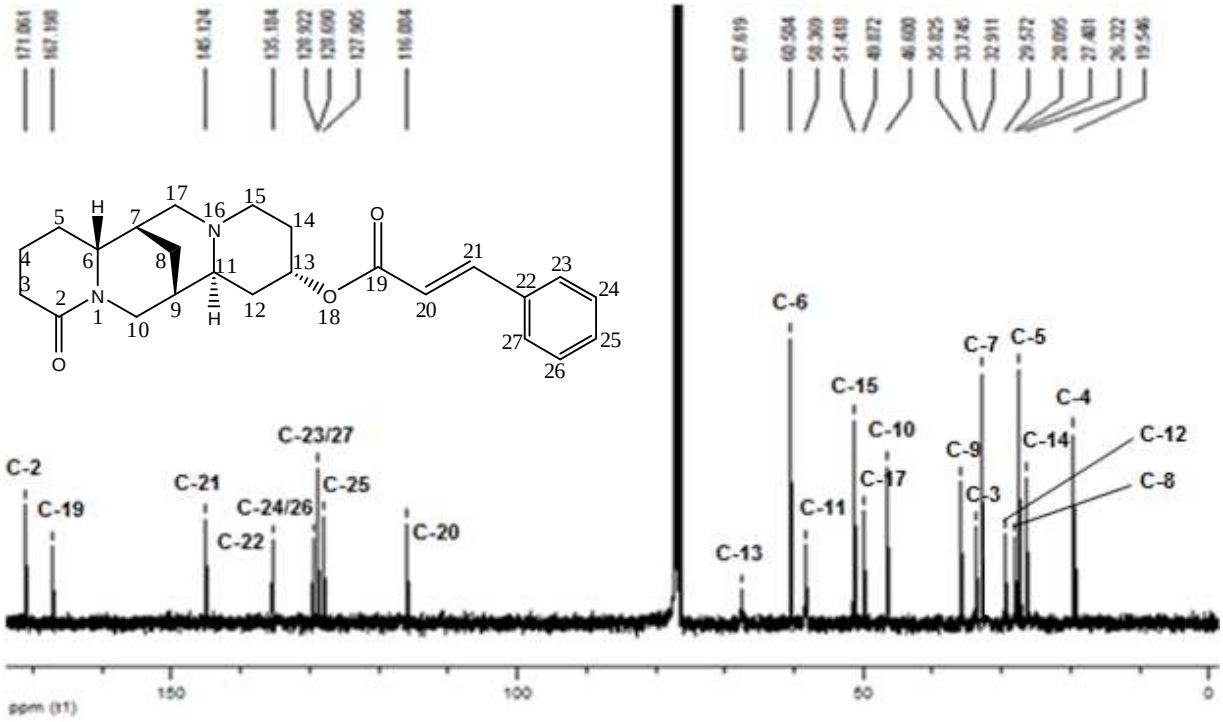


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C de (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.

A Tabela 17 lista os resultados obtidos pelo espectro de RMN de ^{13}C do alcalóide (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina comparados aos deslocamentos do núcleo básico (+)Lupanina.

TABELA 17. Dados de RMN de ^{13}C Obtidos de (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina Comparada com os Dados de (+)lupanina da Literatura[11,40].

Posição	(+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina/(+)lupanina	
	δ ^{13}C, obtido	δ ^{13}C, literatura[11,40]
2	171,0, C=O	172,0, C=O
3	32,9, CH_2	32,9, CH_2
4	19,5, CH_2	19,1, CH_2
5	27,4, CH_2	27,4, CH_2
6	60,5, CH-N	60,5, CH-N
7	32,9, CH	30,7, CH
8	26,3, CH_2	25,9, CH_2
9	33,7, CH	33,3, CH
10	46,6, CH_2-N	46,1, CH_2-N
11	58,3, CH-N	65,4, CH-N
12	29,5, CH_2	31,1, CH_2
13	67,6, CH-O	22,7, CH_2
14	26,3, CH_2	22,5, CH_2
15	51,4, CH_2-N	55,8, CH_2-N
17	49,8, CH_2-N	51,3, CH_2-N
19	167,2, O-C=O	-
20	116,0, C=C	-
21	145,1, C=C	-
22	135,1, C_{Ar}	-
23/27	128,6, C_{Ar}	-
24/26	128,9, C_{Ar}	-
25	127,9, C_{Ar}	-

5.6.2.3 Alcalóide (+)13-α-*trans*-Cinamoiloxilupanina, Espectrometria de Massas

A substância em questão apresentou fórmula molecular $C_{24}H_{29}N_2O_3$. A Espectrometria de Massas foi obtida por CG/EM, sendo observado para esse composto, um pico de íon molecular ESI/MS [m/z = 246,2]$^+$ indicando o núcleo básico de (+)lupanina e um pico base ESI/MS [m/z = 149,0]$^+$ representando o resíduo de ácido-cinâmico. Os dados obtidos foram comparados aos da literatura[40] comprovando assim a estrutura de (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina.

A Figura 22 apresenta o espectro de massas de (+)13α-*trans*-cinamoiloxilupanina.

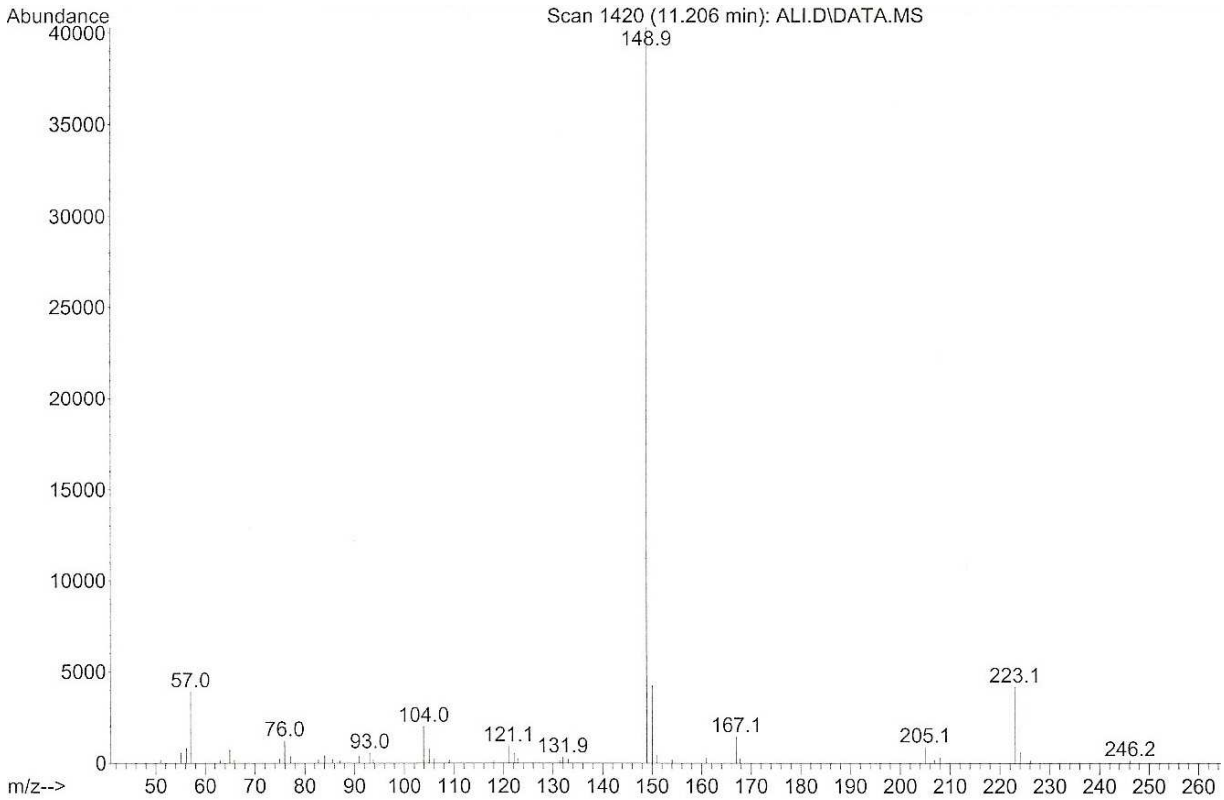
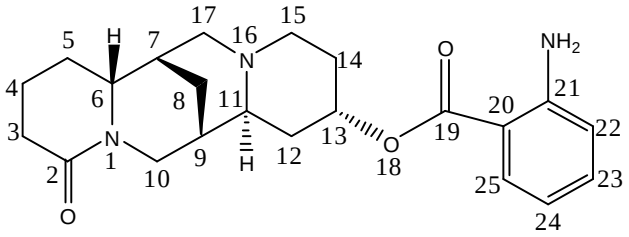


Figura 22. Espectro de Massas ESIMS/CG/EM de (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina.

5.6.3 Alcalóide (+)Lanatina A ou (+)13-α-Antraniloxilupanina



(38)

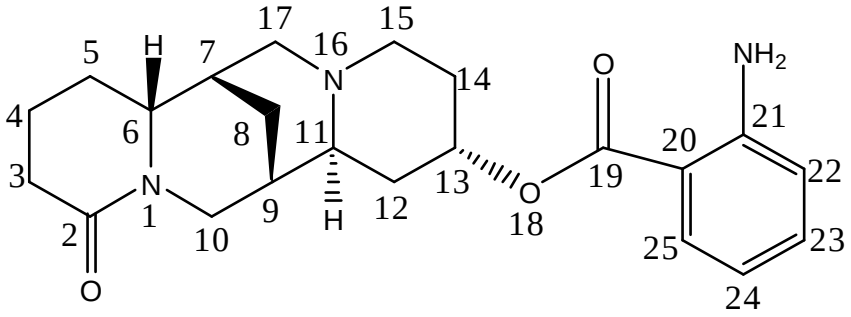
Figura 23. Estrutura Química do Alcalóide Lanatina A.

A lanatina A foi purificada das subfrações, 51 – 58 da coluna sílica gel (230-400 Mesh), da fração diclorometano básica, do extrato bruto das folhas por CCDP, conforme o item 4.8.2.3 (pag. 36). Após a purificação, obteve-se 27 mg de uma substância cristalina e sua pureza foi determinada em CCD e confirmada por RMN.

O estudo de RMN de ^{1}H e ^{13}C tornou possível a identificação do núcleo básico como sendo uma lupanina. Os resultados de estudos de RMN bidimensionais, DEPT, COSY, NOESY, HMQC e HMBC, da Espectrometria de Massas e cristalografia por difração de Raios-X foram de suma importância na elucidação da estrutura química e estereoquímica absoluta deste composto isolado.

Este composto foi cristalizado em CH_2Cl_2 e posteriormente medido seu ponto de fusão (PFº=291-296℃). Foi realizado um estudo de luz plano polarizada e a substância, Lanatina A, apresentou um desvio de $[\alpha]_D^{25}$ = + 52° (c = 0,1, CH_2Cl_2). A espectrometria de massa por CG/EM apontou um pico de íon molecular em ESI/MS m/z 382 $[M+H]^+$ e um pico base em ESI/MS m/z 246 [100%] fornecendo uma fórmula molecular $C_{22}H_{27}N_3O_3$.

5.6.3.1 Alcalóide (+)Lanatina A ou (+)13-α-antraniloxilupanina, RMN de ^{1}H



(38)

O espectro de RMN de ^{1}H de (+)Lanatina A (Fig. 24), mostra uma região de sobreposição de sinais em campo alto que é característico do núcleo das lupaninas. Estes picos representam os prótons dos CH_2 presentes no núcleo básico lupânico. Em campo baixo do espectro, observa-se um duplo dubleto, na região de aromáticos, em δ 7,87 ppm com um J = 6,8 Hz, grande, cuja a integração aponta 1H, e um dubleto de J = 1,2 Hz, pequeno, representando um dos hidrogênios aromáticos, H-25, que faz uma correlação a curta distância com H-24 e uma correlação a longa distância com H-23. Os outros hidrogênios aromáticos estão representados por um multipleto na região de δ 7,24 a δ 7,31 ppm e em δ 6,65 a δ 6,70 ppm. O hidrogênio ligado a C-13 é representado por um singleto na região de δ 5,67 ppm.

Figura 24. Espectro de RMN ^{1}H do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

As expansões do espectro de RMN de ^{1}H de Lanatina A apresentam as multiplicidades de forma mais clara como pode ser observado nas Figuras 25 e 26.

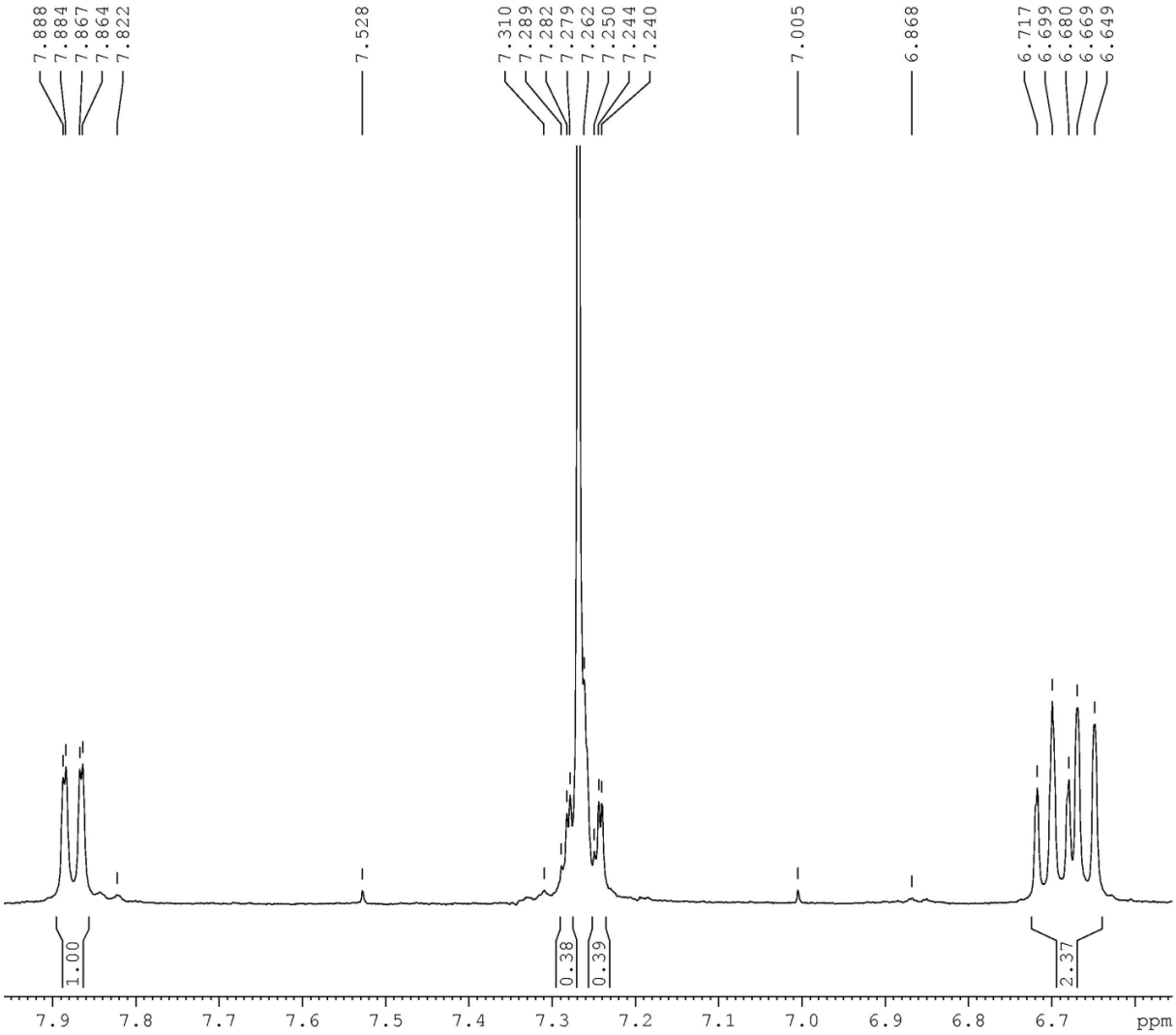


Figura 25. Espectro de RMN de ^{1}H de (+)Lanatina A expandido (região de δ 6,60 a δ 7,90 ppm) $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

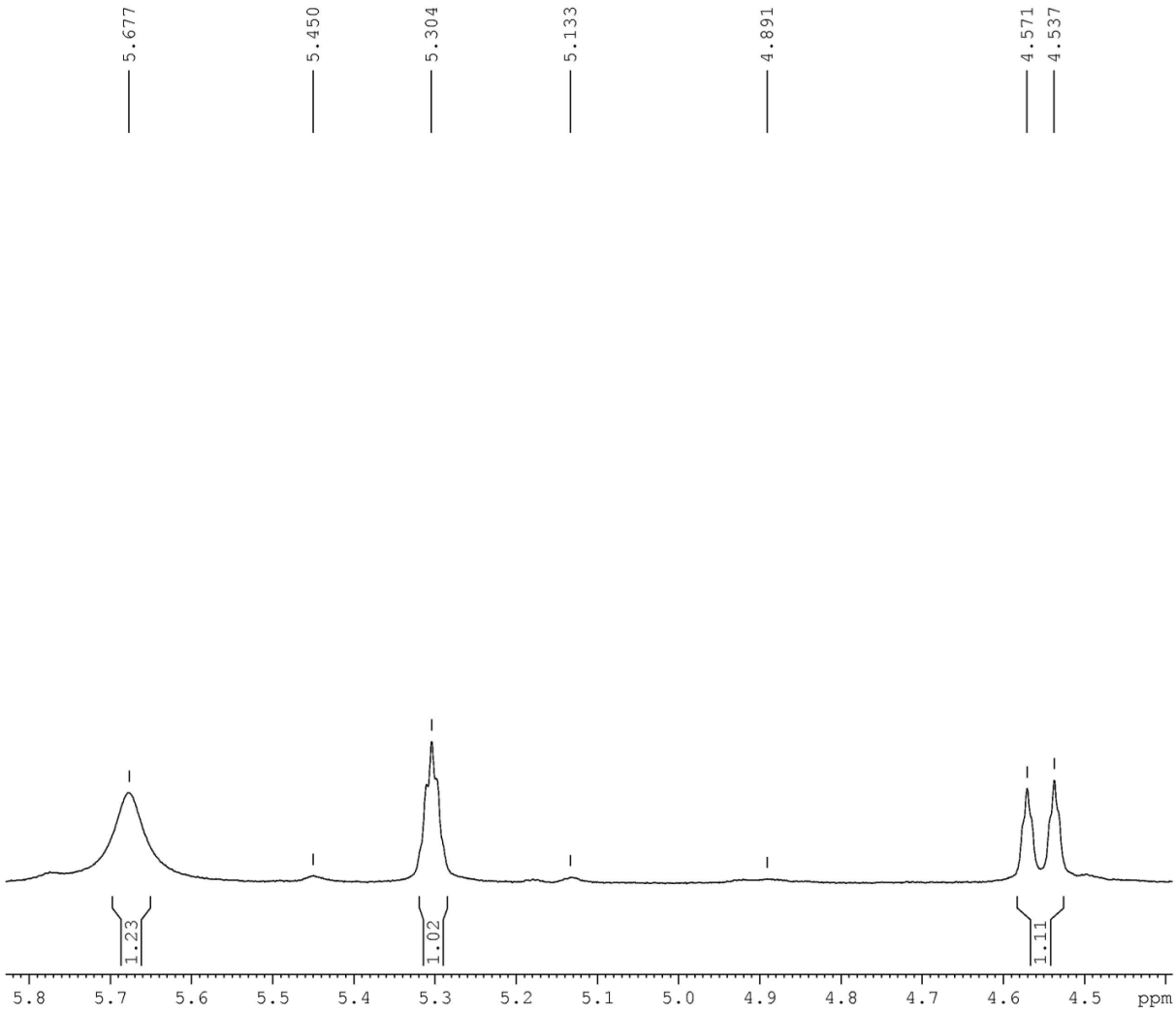
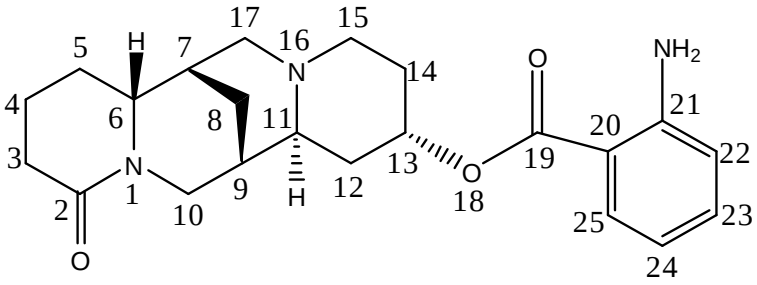


Figura 26. Espectro de RMN de ^{1}H de (+)Lanatina A, expandido (região de δ 4,50 a δ 5,80 ppm) $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

5.6.3.2 Alcalóide (+)Lanatina A ou (+)13-α-antraniloxilupanina, RMN de ^{13}C



(38)

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 27) mostrou a presença de 24 sinais. Novamente os resultados foram comparados aos obtidos para o núcleo de (+)lupanina da literatura[11] e o mesmo foi confirmado. A campo alto do espectro, estão os picos que correspondem aos CH_2 e CH-N e vão de δ 18,4 a δ 60,5 ppm.

O sinal que caracteriza a presença de uma carbonila de lactama, ocorre em δ 171,2 ppm, a qual, é comum no núcleo lupânico e caracteriza o mesmo. Outro sinal importante é um pico em δ 67,6 ppm indicando a presença de um carbono ligado a um oxigênio de éster na molécula.

Confirmando a suspeita, observou-se um sinal de carbono carbonílico na região de δ 167,3 ppm. Foram observados também, seis picos na região de aromáticos (δ 111,0, δ 116,6, δ 116,7, δ 131,5, δ 134,1 e δ 150,4 ppm), os quais, representam um benzeno orto-substituído.

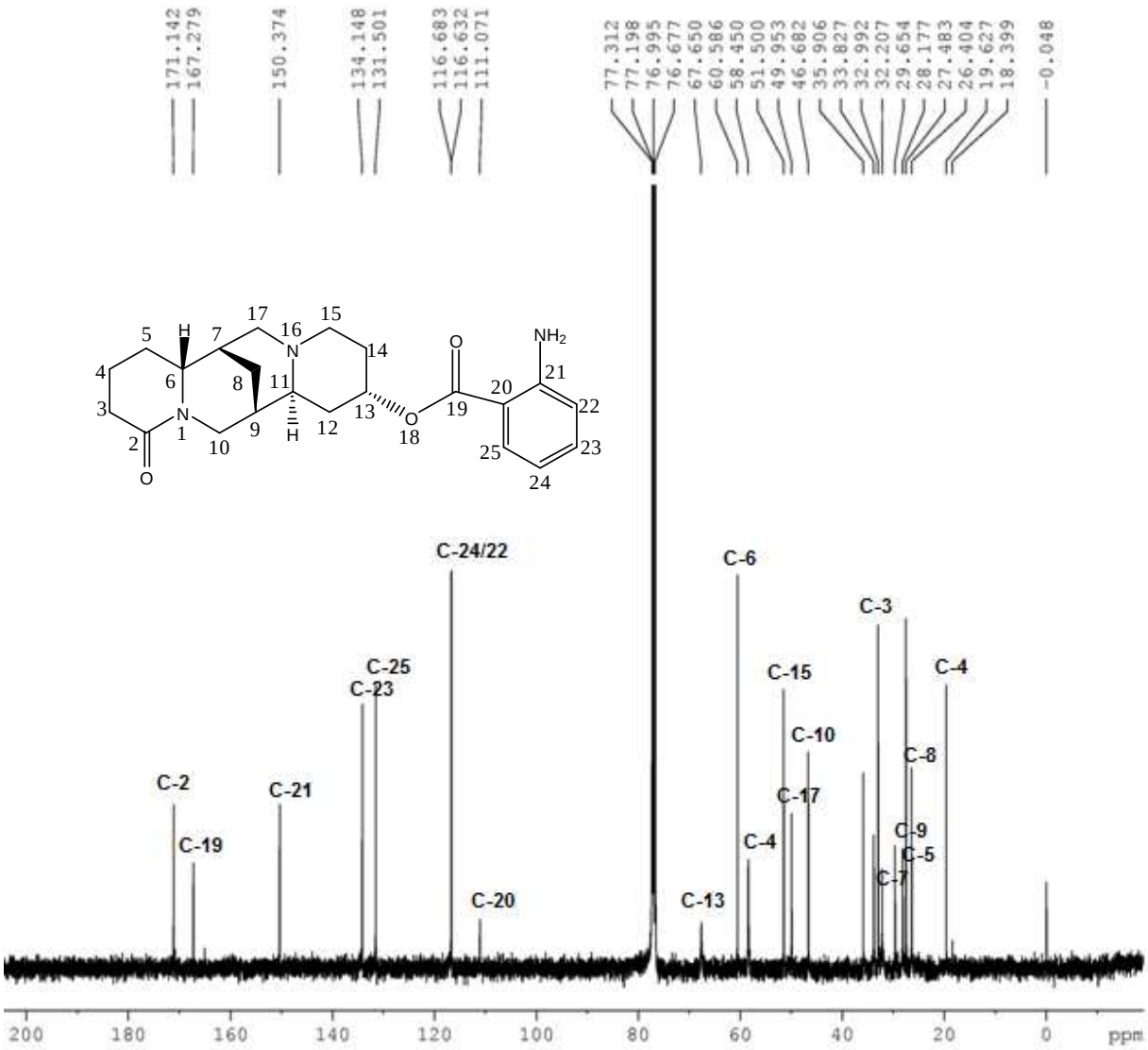


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C de (+)Lanatina A em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.

A Figura 28 apresenta a expansão da região de campo baixo do espectro de RMN de ^{13}C mostrando com mais detalhes os sinais em δ 116,6 e δ 116,7 ppm, correspondentes aos C-24 e C-22 respectivamente.

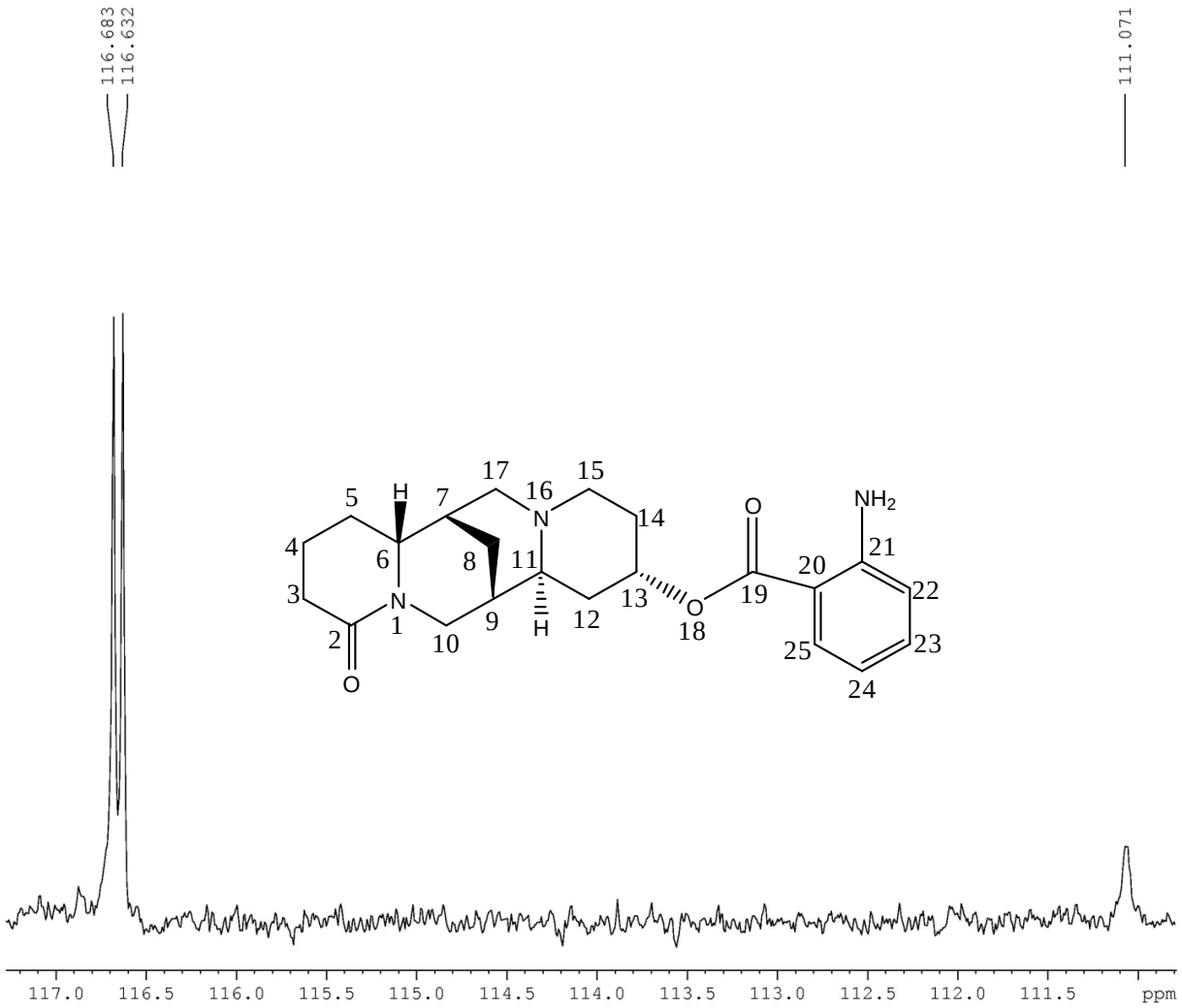


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C de (+)Lanatina A expandido (região de δ 111,0 a δ 117,0 ppm) $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.

5.6.3.3 Alcalóide (+)Lanatina A, RMN de correlação ^{1}H–^{1}H COSY

No espectro de RMN bidimensional COSY ^{1}H – ^{1}H (Fig. 29) de Lanatina A, pode-se verificar a correlação entre os hidrogênios que fazem parte do sistema aromático presentes na molécula, bem como, dos prótons presentes no núcleo básico quinolizidínico da mesma. Este espectro mostra as correlações entre os hidrogênios aromáticos H-25 e H-24, H-24 e H-23 e a correlação entre H-6 e H-7 pertencentes ao núcleo lupânico.

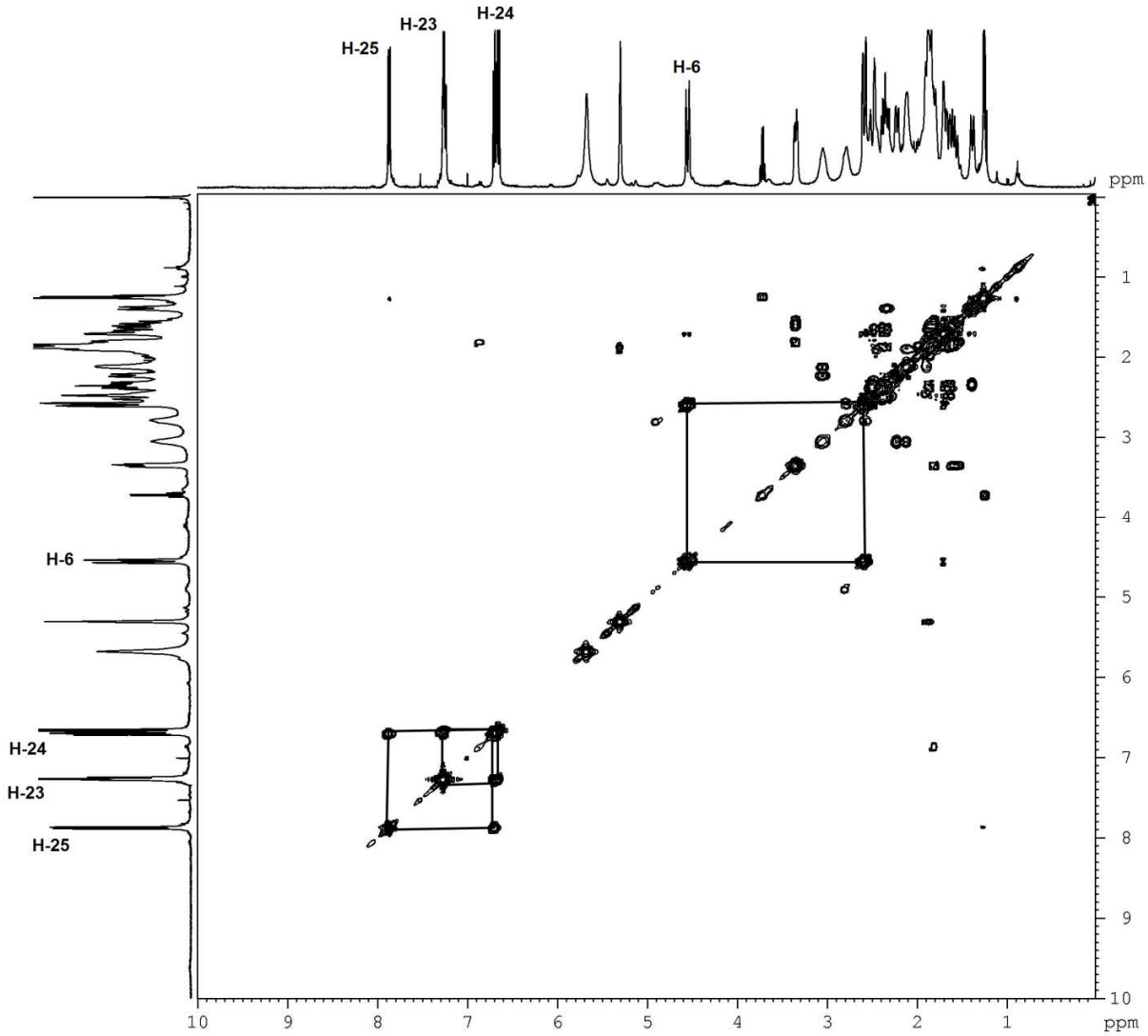


Figura 29. Espectro de RMN 2D COSY ^{1}H – ^{1}H de (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

A expansão do espectro de RMN bidimensional COSY ^{1}H – ^{1}H (Fig. 30) de Lanatina A, região dos aromáticos, mostra com mais clareza as correlações entre esses prótons confirmando assim a presença de um benzeno *orto* substituído.

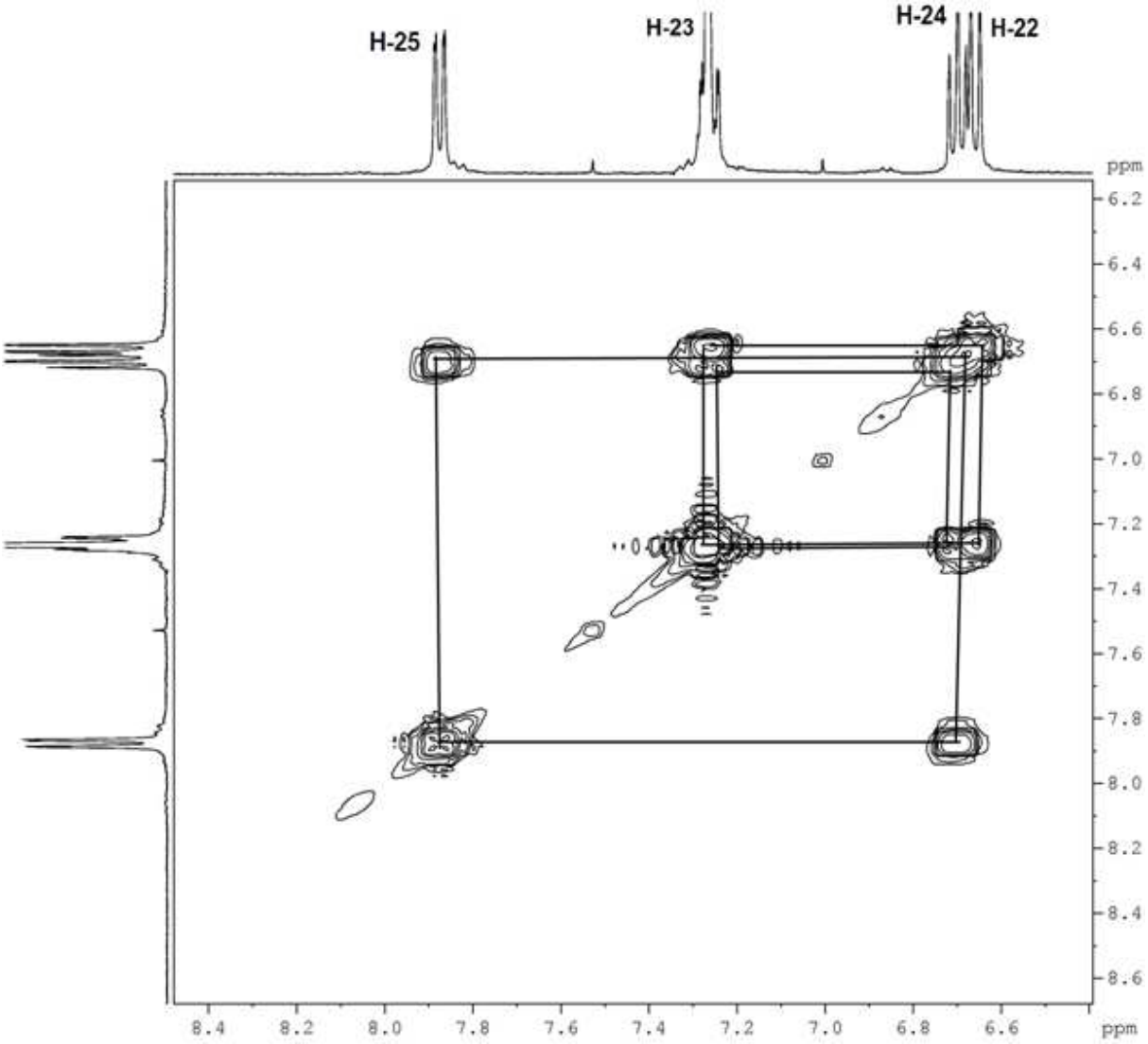
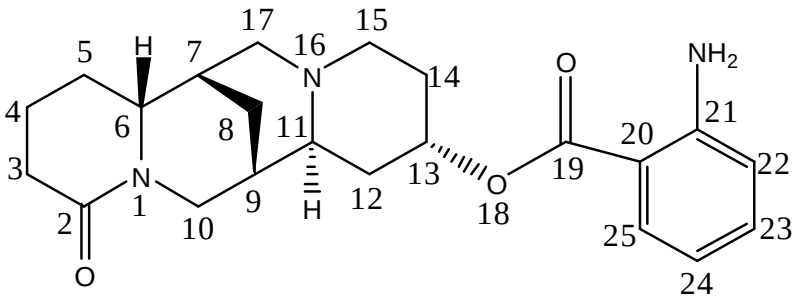


Figura 30. Espectro de RMN 2D COSY ^{1}H – ^{1}H de (+)Lanatina A expandido (δ 6,60 a δ 8,40 ppm) em $CDCl_3$.

5.6.3.4 Alcalóide (+)Lanatina A, RMN de correlação ^{13}C – ^{1}H HETCOR



(38)

Através da análise do espectro de RMN bidimensional HETCOR (Fig. 31) de (+)Lanatina A foi possível determinar com precisão o grupamento que está ligado ao núcleo quinolizidínico de (+)lupanina.

O espectro analisado mostra a presença de quatro carbonos hidrogenados e dois quaternários, no sistema aromático da estrutura em questão. Dos carbonos protonados, foi possível atribuir os hidrogênios aromático H-22, H-23, H-24 e H-25 e seus respectivos carbonos.

O sinal de carbono aromático em δ 111,0 ppm, indica que o mesmo está associado a um carbono carbonílico, devido sua maior blindagem, enquanto o carbono quaternário do sistema aromático, que apresentou um deslocamento de δ 150,0 ppm, deve estar ligado a um átomo como nitrogênio, pelo efeito de desblindagem observado para este.

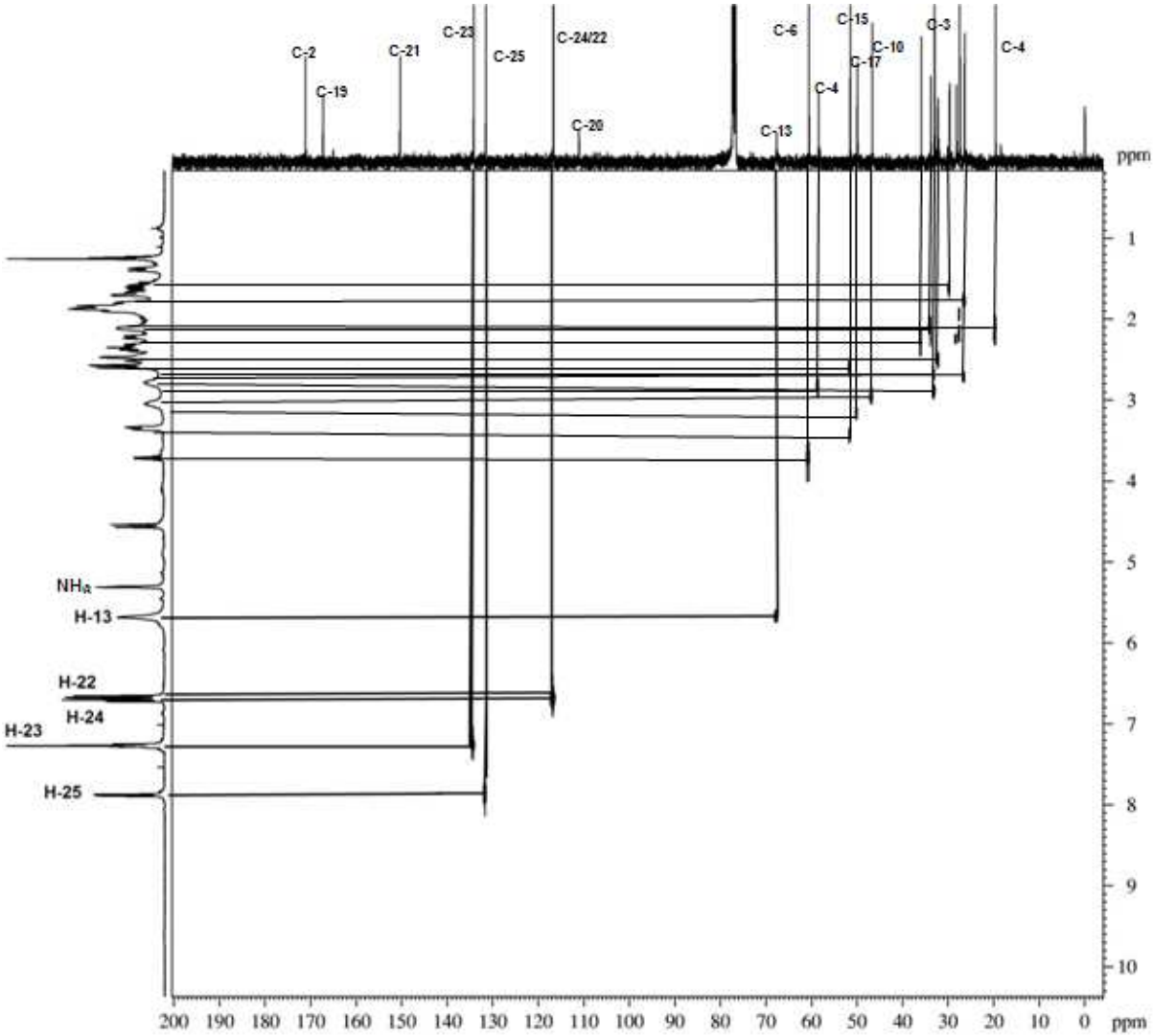


Figura 31. Espectro de RMN 2D ^{13}C - ^{1}H HETCOR de (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

Os Anexos 6-27 (Pag. 111-132) apresentam os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, uni e bidimensionais, não mostrados nesta sessão.

5.6.3.5 Alcalóide (+)Lanatina A, Espectrometria de Massas

A espectrometria de massa por CG/EM (Fig. 32) apontou um pico de íon molecular em ESI/MS m/z 382 $[M+H]^+$ e um pico base em ESI/MS m/z 246 [100%] fornecendo uma fórmula molecular para o composto de $C_{22}H_{27}N_3O_3$. Como referido anteriormente, a espectrometria de massas confirmou a presença de um nitrogênio fazendo parte do sistema aromático.

Depois de analisar os dados de RMN de ^1H e ^{13}C, uni e bidimensionais, juntamente com CG/EM, foi possível determinar que o grupamento que está associado ao núcleo básico do alcalóide quinolizidínico (+)lupanina, como um resíduo de ácido antranílico.

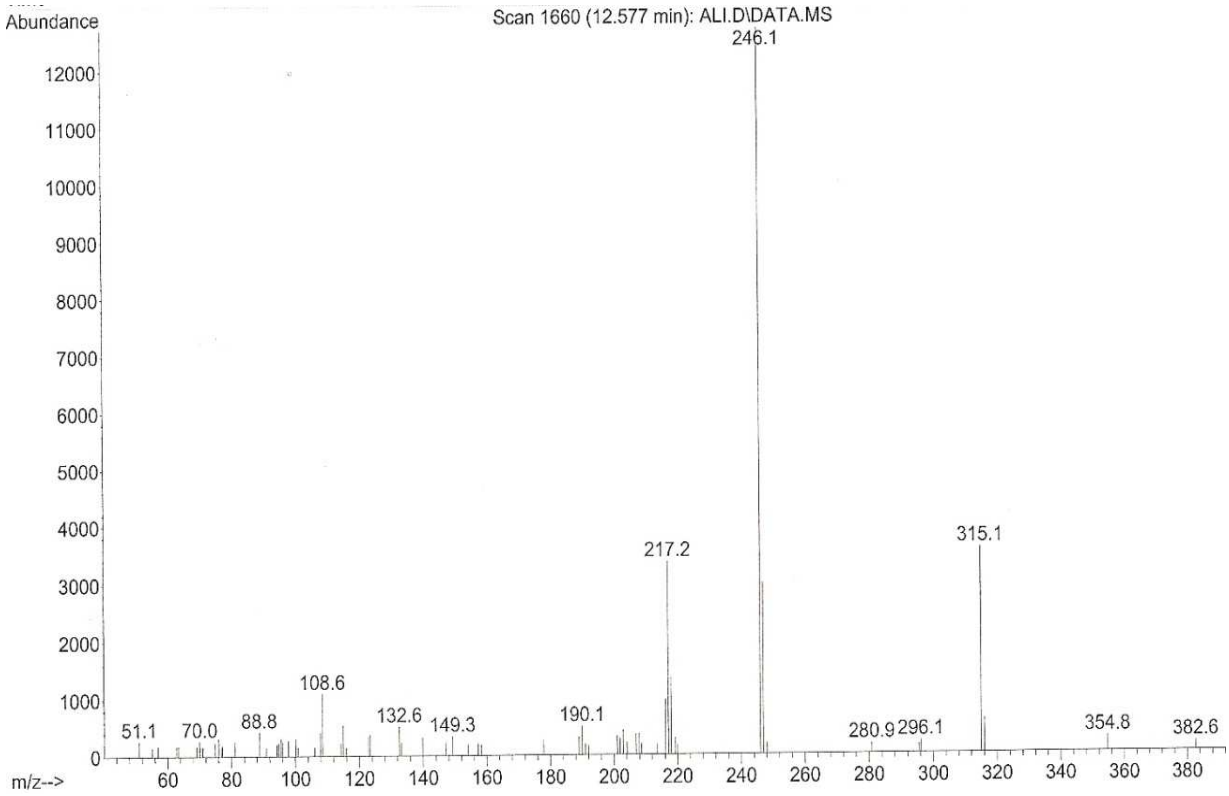


Figura 32. Espectro de massas ESIMS/CG/EM de (+)Lanatina A

5.6.3.6 Alcalóide (+)Lanatina A, Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de Infravermelho (Fig.33) apresenta uma absorção de C=O na freqüência de 1600 cm^{-1}. Na região de 3500 cm^{-1}, o mesmo mostra um sinal desdobrado referente ao nitrogênio primário ligado ao sistema aromático.

Também é possível observar harmônicos ou freqüência de combinação, 1667-2000 cm^{-1}, indicando a presença de um aromático orto-substituído. Este aromático é comprovado quando se observa no espectro, uma absorção em 700-750 cm^{-1}. A presença de dupla ligação C=C pode ser visualizada no desdobramento apontado, no espectro de Infravermelho, entre 1500 e 1600 cm^{-1}.

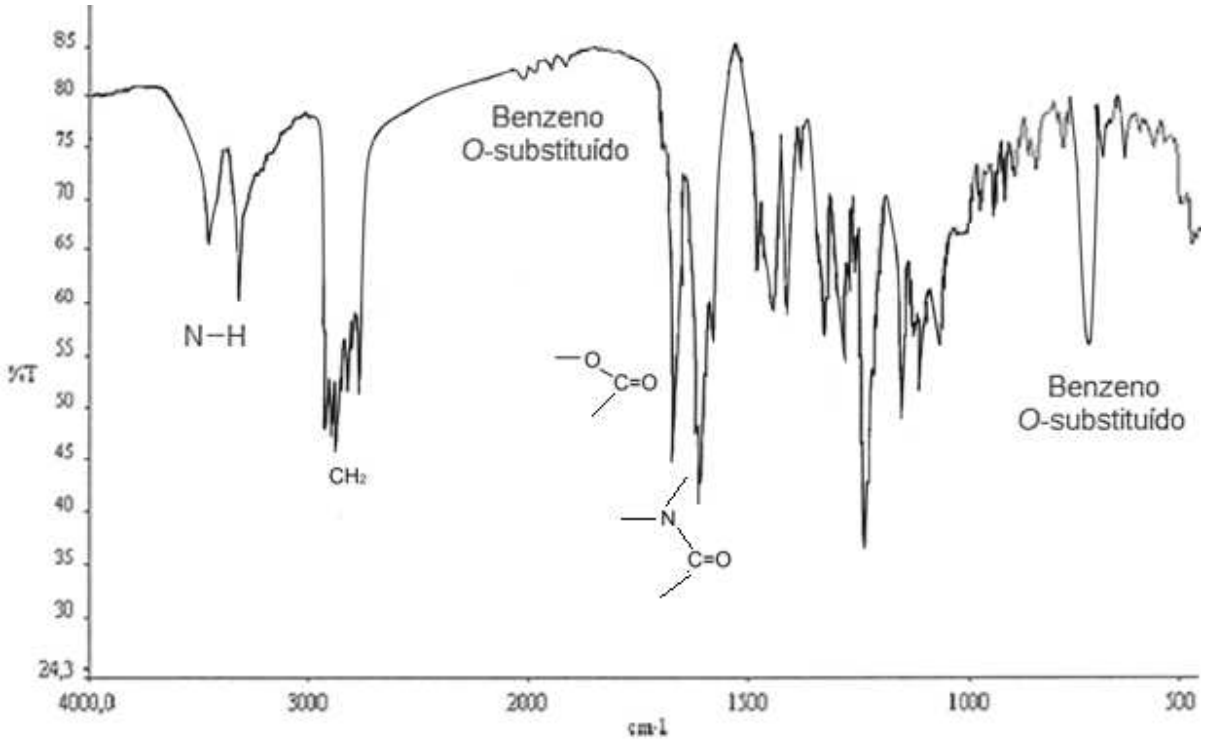


Figura 33. Espectro de Infravermelho de (+)Lanatina A em KBr.

5.6.3.7 Alcalóide (+)Lanatina A ou (+)13-α-antraniloxilupanina, Difração de Raios-X

A difratometria de Raios-X auxiliou na confirmação dos dados de RMN, bem como, na elucidação da estereoquímica absoluta da estrutura de Lanatina A. A Figura 34 esboça os resultados obtidos após os estudos de difração de Raios-X.

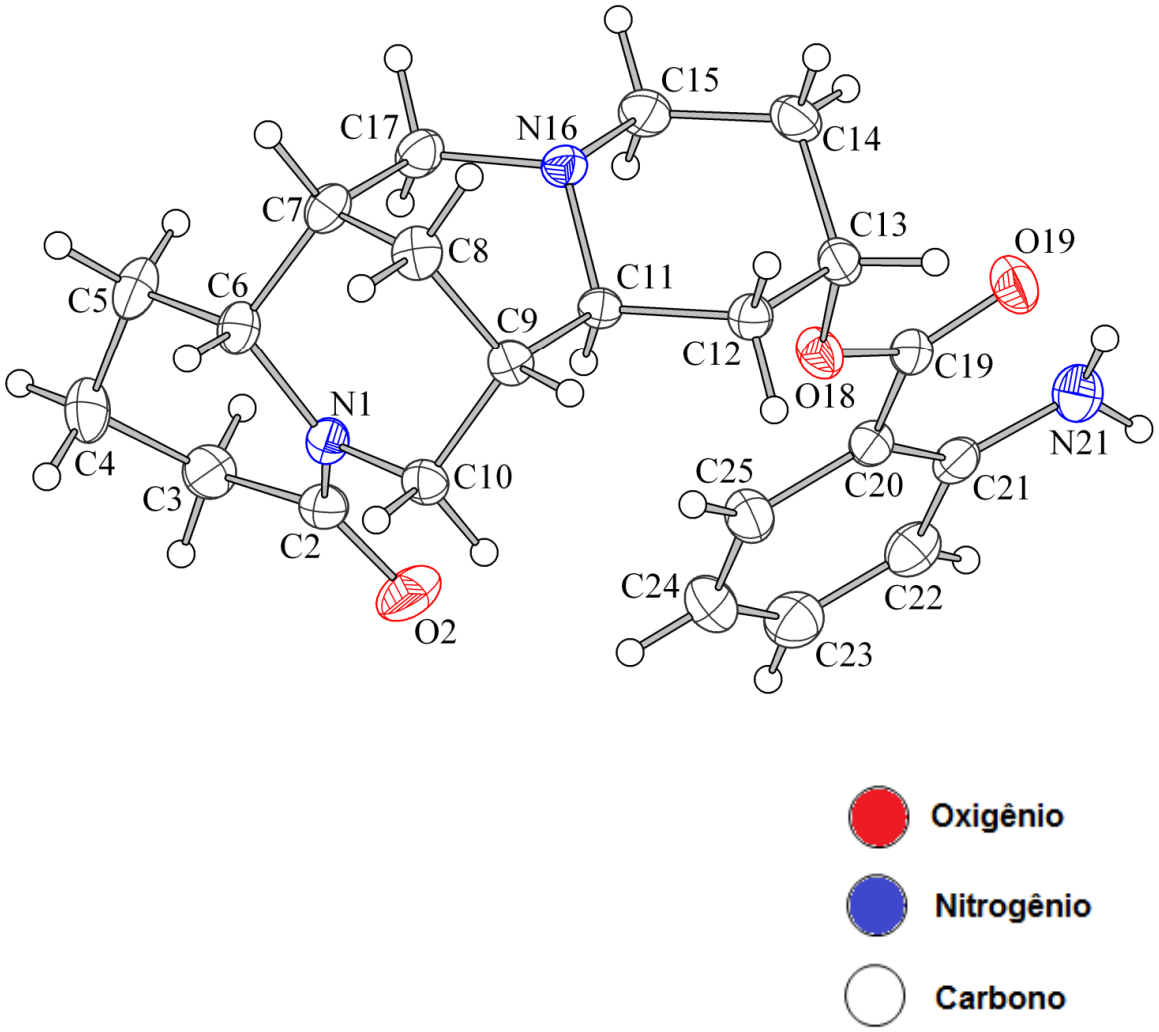


Figura 34. Estrutura Química de (+)Lanatina A Obtida por Difração de Raios-X.

As Tabelas 18 e 19 listam os dados de cristalografia por Raios-X de (+)Lanatina A.

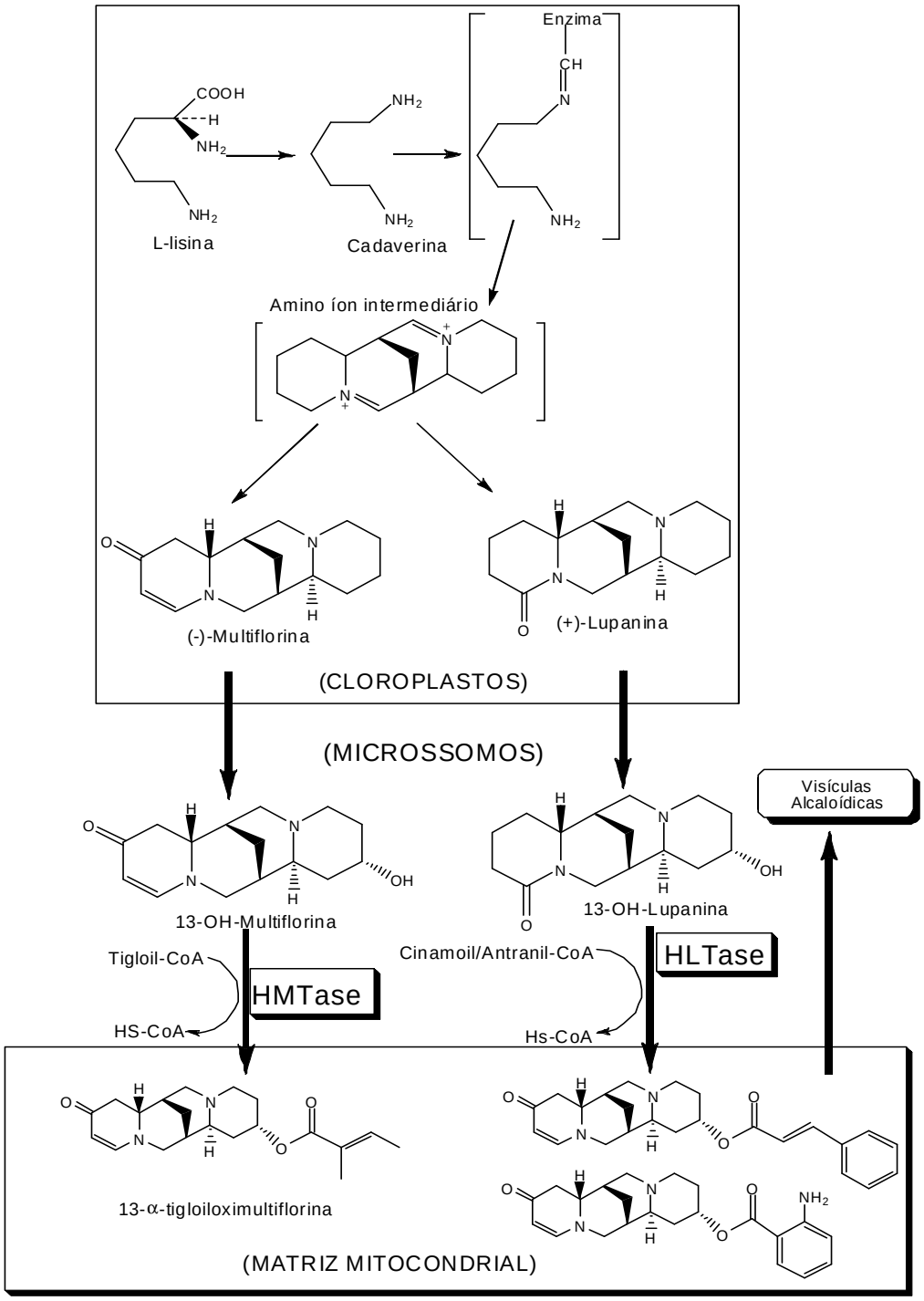
TABELA 18. Dados Cristalográficos de (+)Lanatina A.

Código de identificação	RB_AM_ATN_ALupinus	
Fórmula molecular	$C_{22}H_{29}N_3O_3$	
Massa molecular	383.48	
Temperatura	296(2) K	
Comprimento de onda	0.71073 Å	
Dimensões do cristal	0.22 x 0.28 x 0.50 mm	
Sistema cristalino	Orthorhombic	
Grupo espacial	P 21 21 21	
Dimensões das cel. unitárias	a = 8.48980(10) Å	α = 90°
	b = 12.2016(2) Å	β = 90°
	c = 18.8917(3) Å	γ = 90°
Volume	1956.98(5) $Å^3$	
Z	4	
Densidade (calculada)	1.302 Mg/cm^3	
Coeficiente de absorção	0.087 mm^{-1}	
F(000)	824	

TABELA 19. Dados Cristalográficos Referentes a Estereoquímica do Alcalóide (+)Lanatina A.

Intervalo para coleta de dados	3.34 to 30.52°	
Índices	-12<=h<=12, -17<=k<=17, -26<=l<=26	
Reflexões coletadas	57942 [R(sigma) = 0.0153]	
Reflexões independentes	5973 [R(int) = 0.0285]	
Cobertura de reflexões independentes	99.7%	
Correção de absorção	multi-scan	
Transmissão máx. e mín.	0.9807 and 0.9572	
Técnica para determinação estrutural	direct methods	
Técnica para determinação estrutural	SHELXS-97 (Sheldrick, 2008)	
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F^2	
Programa de refinemento	SHELXL-97 (Sheldrick, 2008)	
Funções minimizadas	$\Sigma\ w(F_o^2 - F_c^2)^2$	
Dados/ controle/ parâmetros	5973 / 0 / 261	
Goodness-of-fit on F^2	1.034	
Índice R final	5313 data; I>2σ(I)	R1 = 0.0372, wR2 = 0.0957
	Todos os dados	R1 = 0.0442, wR2 = 0.1017
Esquema de cálculo	$w=1/[\sigma^2(F_o^2)+(0.0604P)^2+0.1399P]$ where $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$	
Parâmetro p/ estrut. absoluta	0.1(8)	
Dimensão dif. pico e cavidade	0.200 and -0.157 $eÅ^{-3}$	
Desvio médio para R.M.S.	0.037 $eÅ^{-3}$	

Baseado no Esquema 1, segundo a OKADA, T. et. al. (2005)[52], o esquema 2 ilustra a proposta biossintética para os alcalóides quinolizidínicos isolados de *Lupinus lanatus*.



Esquema 2. Proposta para a Rota Biossintética dos Alcalóides Quinolizidínicos de *Lupinus lanatus*.

6. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos, através do estudo químico e farmacológico da espécie de leguminosa *Lupinus lanatus*, pode-se concluir que:

- Da espécie analisada, *Lupinus lanatus,* foram isolados e identificados cinco alcalóides da classe dos quinolizidínicos, (-)multiflorina, (-)13-α-*cis*-tigloiloximultiflorina, (+)13-α-hidroxilupanina, (+)13-α-*trans*-cinamoiloxilupanina e Lanatina A, sendo este último, inédito na literatura.

- Quando avaliado o potencial da espécie *Lupinus lanatus* frente a microorganismos, atividade antimicrobiana, a mesma mostrou-se limitada. Os resultados obtidos para esses ensaios, foram pouco satisfatórios quando utilizados extratos e frações das partes analisadas, sementes e folhas. Porém, quando as substâncias isoladas foram avaliadas, houve uma melhora significativa das atividades, exceto para um dos compostos, (+)13-α-hidroxilupanina, que demonstrou uma baixa atividade frente aos microorganismos testados.

- Os extratos e frações obtidos da planta em questão, também foram submetidos a avalição de seu potencial antioxidante, utilizando a técnica de DPPH. De forma geral, todas as amostras mostraram-se bastante eficientes nesta avaliação. Porém, a fração Acetato de etila neutra, obtida do extrato bruto das folhas, mostrou-se muito promissora, pois esta obteve resultados muito próximos aos do padrão utilizado, BHT, e manteve-se constante até a concentração de 3,10 μg/mL, última concentração testada.

- A utilização da técnica de difratometria por Raios-X possibilitou a elucidação da estereoquímica absoluta para a estrutura (+)Lanatina A.

- Dessa forma, os estudos realizados com a espécie *Lupinus lanatus* foram de grande importância, pois, além de se conhecer mais sobre essa planta, pode-se autenticar os dados colhidos da literatura, bem como, avaliar a planta em sua constituição secundária. Assim, esta espécie torna-se atraente para contínuas pesquisas e talvez futura aplicação na medicina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs**. *Toxicon*, v. 39**,** p. 603-613, 2001.

2. SIMÕES, M. C.; Shenkel, P. E.; Gosmam, G.; Melo, P. C. J.; Mentz, A. L. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 4 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2002.

3. HEYOOD, V. H. **Flowering Plants of the World. London**: *Batsford Ltd*. Ed., p. 335,1996.

4. GLADSTONE, J. S. **Distribuition, origin, taxonomy and importance.** In: GLADSTONE, J. S.; ATKINS, C. A.; HAMBLIN, J. eds. Lupins as Crop Plants: *Biology, Production and utilization.* Cambride: CAB International, p. 1-39, 1998.

5. MONTEIRO, R.; Monteiro, R. T. R. **Wotes na the economic aspects of *Lupinus L.* (Leguminoseae) – cale for studies with Brazilian species.** *Arquives Biology Tecnology,* v. 29, p. 685-694, 1986.

6. KINGHON, A. D.; Raouf, A. H.; Balandrin,M. F. **"Alkaloid distribution in seeds of Ormosia, Pericopsis and Haplormosia"**. *Phytochemistry*, v. 27 (2), p. 439-444, 1988.

7. BALANDRIN, M. F. **"Structure elucidation of some biologically active constituients of genus *Acosmium* (leguminoseae)".** Chicago-USA, College of Pharmacy, University of Illinois at the Medical Center, 1982, Thesis Doctor of Philosophy.

8. SAITO, K.; Suzuki, H.; Yamashita, Y.; Murakoshi, I. **"Isolation an enzimatic synthesis of an ester alkaloid, (-)-3β-hidroxi-13α-tigloyloxylupanine from *Cytisus scoparius".*** *Phytochemistry*, v. 36 (2), 309-311, 1994.

9. LÓPES, G. M. P.; Mora, G.; Wysocka, W.; Maiztegui, B.; Alzugaray, E. M.; Del Zotto, H.; Borelli, I. M. **Quinolizidine alkaloids isolated from Lupinus species enhance insulin secretion.** *European journal of Pharmacology*, v. 504, p. 139-142, 2004.

10. WINK, M.; Mohamed, G. I. A. **Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequencesof the rbcL gene.** *Biochemical Systematics and* Ecology, v. 31, p. 897–917, 2003.

11. SAGEN, A.; **"Phytochemical and biological investigation on Clathrotropis glaucopyila (Fabaceae), an ingredient of yanomami curare, emphasizing on quinoloizidinealkaloids".** A dissertation submitted to the Swiss Federal Institute of Technology Zurich for the degree of Doctor of Natural Sciences 2002- Zurich.

12. CORADIN, L. **"Grupo de estudiosos das leguminosas brasileiras"**. In Congresso Nacional de Botânica. Ribeirão Preto. Resumos, v. 46, p. 401-403, 1995.

13. CRONQUIST, A. **"An integrated system of classifications of flowering plants"** New York: Columbia University Press, p. 1262, 1981.

14. BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa,** p 15-100, 1991.

15. SPRENT, J. I. **Nodulation as a taxonomic tool. In: Herendeen, P. S.;Bruneau, A. eds. Advances in legume Systematics.** Kew: *Royal botanic gardens*, p. 21-44, 2000.

16. MACIEL, H. S.; Schifino-wittmann, M. T.; **First chromosome number determinations in south-eastern South American species of *lupines L.* (Leguminosae).** *Botanical Journal of the linnean Society*, v.152, p. 395-400, 2002.

17. BACKES, A.; Nardino, M. **Nomes Populares e Científicos de Plantas do Rio Grande do Sul,** São Leopoldo: Ed. *Unisino,* p. 164, 1999.

18. UNKOVICH, M. J.; Pate, J. S.; Armstrong, E. L.; Sanford, P. **Nitrogen economy of annual crop and pasture legumes in southwest Australia.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 27, p. 585-588, 1995.

19. PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultiváveis.** Rio de Janeiro: *Instituto Brasileiro de Desenvolvimento florestal*, v. 6, 1984.

20. WOLDEMICHAEL, G. M.; Wink, M. **Triterpene glycosides of *Lupinus angustifolium.*** *Phytochemistry*, v. 60, p. 323-327, 2002.

21. SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin** – a Text Book of Pharmacognosy Stockhalm: *Swedish Pharmaceutical*, p. 372, 1992.

22. SGARBIERI, C. V.; Galeazzi, M. M. A. **Some Physicochemical and Nutritional Properties of a Sweet Lupin (Lupinusalbus var. multolupa) Protein,** *Journal Agriculture Food Chem*istry, v. 26, p. 1438-1442, 1978.

23. WINK, M., Witte, L. **Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell cultures.** p 767–775, 1985.

24. ELMADFA. H. T.; Gross, R.; Wink, M.; Hartmann, T.; Witte, L. **Quinolizidine Alkaloids in Seeds of Lupin us mutabili,** *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 31, p. 934-930, 1983.

25. ALLEN, J. G. **Toxins and lupinosis**. In: GLADSTONE, J. S., Atkins, C. A., Hamblin, J. eds. Lupins a crop plants: *Biology, Production and Utilization.* Cambridge. CAB International, p. 411-435, 1998.

26. FILHO, S. C. A. P. **"Estudo Químico e Biológico em Lupinus lanatus Bentham (Leguminoseae-Faboideae)"**. Disssertação de mestrado submetida pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Mestre em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, outubro de 2004.

27. AINOUCHE, L.; Greinwald, R.; Witte, L.; Huon, A. **Seed Alkaloid Composition of Lupinus tassilicus Maire (Fabaceae: Genisteae) and Comparison with its Related Rough Seeded Lupin Species.** v. 24, No. 5, p. 405-414, 1996.

28. SANCHEZ, C. M.; Altares, P.; Pedrosa, M. M.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Goyoaga, C.; Muzquiz, M.; Martınez, J. C.; Ortiz, O. G. **Alkaloid variation during germination in different lupin species,** *Food Chemistry,* v. 90, p. 347‑355, 2005.

29. PINHEIRO, M.; Miotto, S. T. S. **Leguminoseae-Faboideae gênero *Lupinus L.*** Boletim do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, n 60, 2001.

30. SUZUKIi, H.; Murakoshi, I.; Saito, K. A **Novel 0-Tigloyltransferasef or Alkaloid Biosynthesis in Plants,** *The Journal of Biological Chemistry,* v. 269, No. 22, Issue of June 3, p. 15853-15860, 1994.

31. SUZUKI, H.; Koike, Y.; Murakishi, I.; Saito, K. **Subcelular Localization of Acyltranferases For Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis in *Lupinus***, *Phytochemistry,* v. 42, No. 6, p. 1557-1562, 1996.

32. MUZQUIZ, M.; Cuadrado, C.; Ayet, G.; Cuadra, C.; Burbano, C.; Osagiel, A. **Variation of Alkaloid Components of Lupin Seeds in 49 Genotypes of *Lupinus albus L.* from Different Countries and Locations,** *Journal of Agriculture Food Chemistry*. v. 42, p.1447-1450, 1994.

33. REINHARD, H.; Rupp, H.; Sager, F.; Streule, M.; Zoller, O. **Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food,** *Journal of Chromatography*, v. 1112 p. 353–360, 2002.

34. PORRES, M. J.; Aranda, P.; Pez-Jurado, L. M.; Urbano, G. **Nitrogen Fractions and Mineral Content in Different Lupin Species (*Lupinus albus, Lupinus angustifolius,* and *Lupinus luteus*). Changes Induced by the r-Galactoside Extraction Process,** *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 55, p. 7445-7452, 2007.

35. BROOKE, P.; Harris, J. D.; Longmore, B. R.; **Isolation of Minor Lupin Alkaloids. A Simple Procedure for the Isolation of Angustifoline from Lupinus angustifolius (Cv. Fest) Seeds, with Application to Other Lupin Alkaloids,** *Journal Agriculture Food Chemistry,* v. 44, p. 2129-2133, 1996.

36. **Reactivos de coloración para cromatografia em capa fina y papel.** E. Merck AG, Dermstadt, Alenamina, p. 17.

37. MOHAMED, H. M.; Saito, K.; Murakoshi, K.; Kadry, A. H.; Khalifa, A. T.; Ammar, H. A. **A New Lupine Alkaloid, (-)-Δ^5- Dehydromultiflorine, from the Seeds of *Lupinus termis***, *Journal of Natural Products*, v. 53, No. 6, p. 1578-1580, 1990.

38. BOROWIAK, T.; Kubicki M.; Wysocka, W.; Przybyt, A. **Regio-selective bromination of multiflorine and structures of 3-bromomultiflorine and its molecular complex with succinimide,** *Joumal of Molecular Structure,* v. 442, p. 103-113, 1998.

39. MOHAMED, H. M. and Hassanean, A. H. **Alakaloids from Seeds of *Lupinus varius* and *L. hartwegh,*** *Phytochemistry*, v. 46, p. 365-369, 1997.

40. WINK, M.; Meibner, C.; Witte, L. **Patterns of Quinolizidine Alkaloids in 56 Species of the Genus Lupinus,** *Phytochemistry*, v. 38, No. 1, p. 139-153, 1995.

41. TORRES, B. K.; Quintos, R. N.; Necha, B. L. L.; Wink, M. **Alkaloid Profile of Leaves and Seeds of *Lupinus hintoni* C. P. Smith, Z. Naturforsch,** v. 57c, 243-247, 2001.

42. BROOKE, P.; Harris, J. D.; Longmore, B. L. **Isolation of Minor Lupin Alkaloids. 1. A Simple Procedure for the Isolation of Angustifoline from *Lupinus angustifolius* (Cv. Fest) Seeds, with Application to Other Lupin Alkaloids,** *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 44, p.2129-2133, 1996.

43. HATZOLD, T.; Elmadfa, I.; Gross, R.; Wink, M.; Hartmann, T.; Witte, L. **Quinolizidine Alkaloids in Seeds of *Lupinus mutabilis,*** *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 31, p. 934-930, 1983.

44. WIEWIOROWSKI, M. D.; Wiewiorowska, M.; Reifer, I. **Lupine alkaloids. Structure of five new natural acyloxylupanines.** Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, *Series des Sciences Chimiques,* v. 11(11), p. 629-636, 1963.

45. WIEWIOROWSKI, M. D.; Bratek, M. D. **Studies on the structure of a new group of lupine alkaloids.** Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, *Serie des Sciences Biologiques*, v. 10, p. 349-55, 1962.

46. LEE, J. M.; Pate, S. J.; Harris, J. D.; Atkins, A. **C. Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus L. and L. angustifolius L.*** *Journal of Experimental Botany*, v. 58, No. 5, p. 935–946, 2007.

47. GANZERAA, M.; Krügera, A.; Wink, M.; **Determination of quinolizidine alkaloids in different Lupinus species by NACE using UV and MS detection.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, p. 1231–1235, v. 2010.

48. NCCL. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard**. CLSI document M27-A2. Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

49. NCCL. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically;** approved standard; 5th ed. CLSI document M7-A5, Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

50. HAMMER, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V.; **Antimicrobial activity of essential oils and plants extracts.** *Journal of applied of food Microbiology,* v. 94, p. 223-253, 2004.

51. MOLINEUX, P. **The use of the stable free radical difenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.** *Songklanakarin Journal of Science Technology,* v. 26:2, p. 211-219, 2003.

52. OKADA, T.; Hirai, Y. M.; Suzuki, H.; Yamazaki, M.; Saito, K. **Molecular Characterization of a Novel Quinolizidine Alkaloid O-Tigloyltransferase: cDNA Cloning, Catalytic Activity of Recombinant Protein and Expression Analysis in Lupinus Plants,** *Plant Cell Physiol*, v. 46(1), p. 233–244, 2005.

53. LÓPEZ, G. m. P.; Mora, G.; Wysocka, W.; Maiztegui, B.; Alzugaray, E. M.; Zotto, H.; Borelli, I. M. **Quinolizidine alkaloids isolated from Lupinus species enhance insulin secretion,** *European Journal of Pharmacology*, v. 504 p. 139– 142, 2004.

54. WINK, M.; Hartmann, T. **Cadaverine-Pyruvate Transamination: The Principal Step of Enzymatic Quinolizidine Alcaloid Biosyntesis in Lupia'us Pol Yphyll Us Cell Suspension Culture,** *FEBS LETTERS*, v. 101, p. 343-346, 1979.

ANEXOS

ANEXO 1

Espectro de RMN de ^{1}H do Alcalóide (-)multiflorina

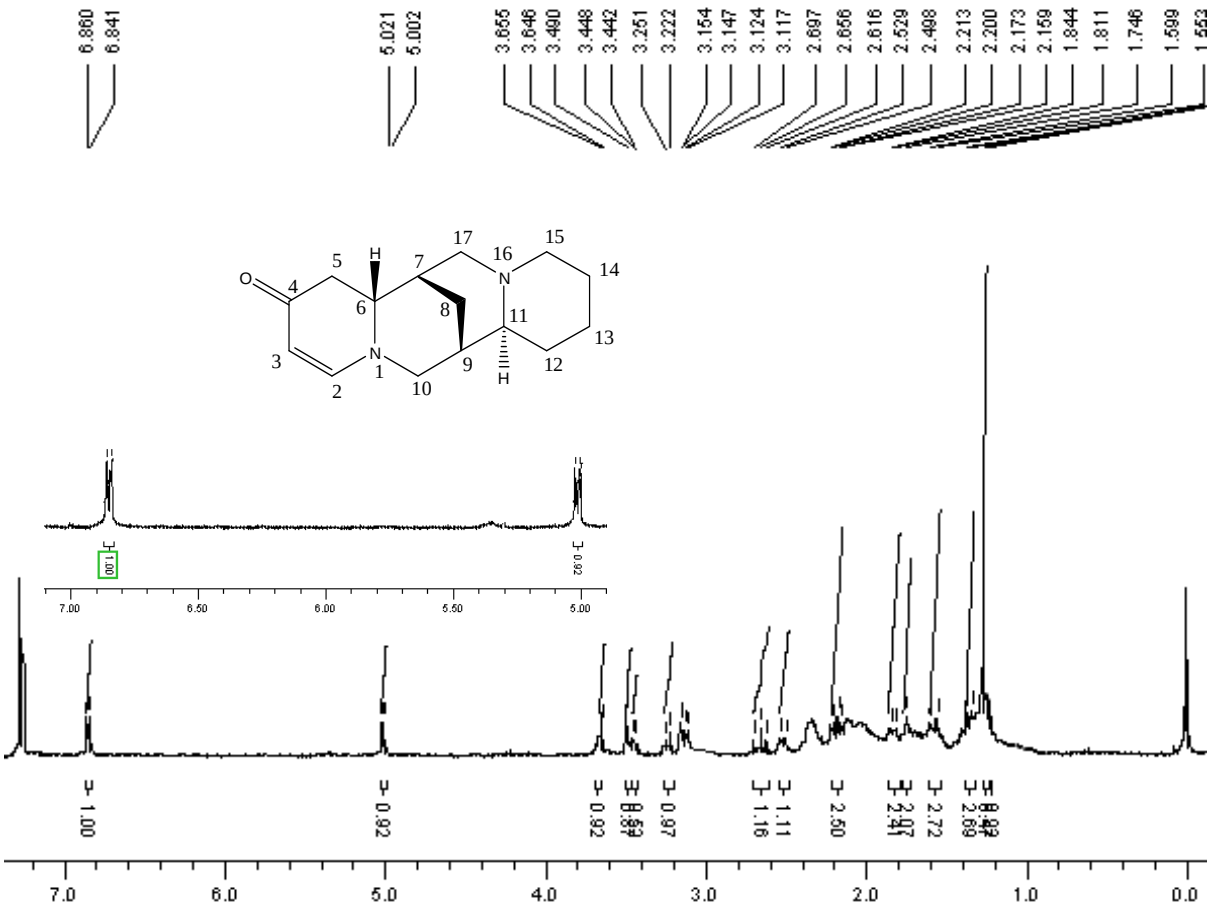


Figura 35. Espectro de RMN ^{1}H do composto (-)multiflorina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

ANEXO 2

Espectro de RMN de ^{13}C do Alcalóide (-)multiflorina

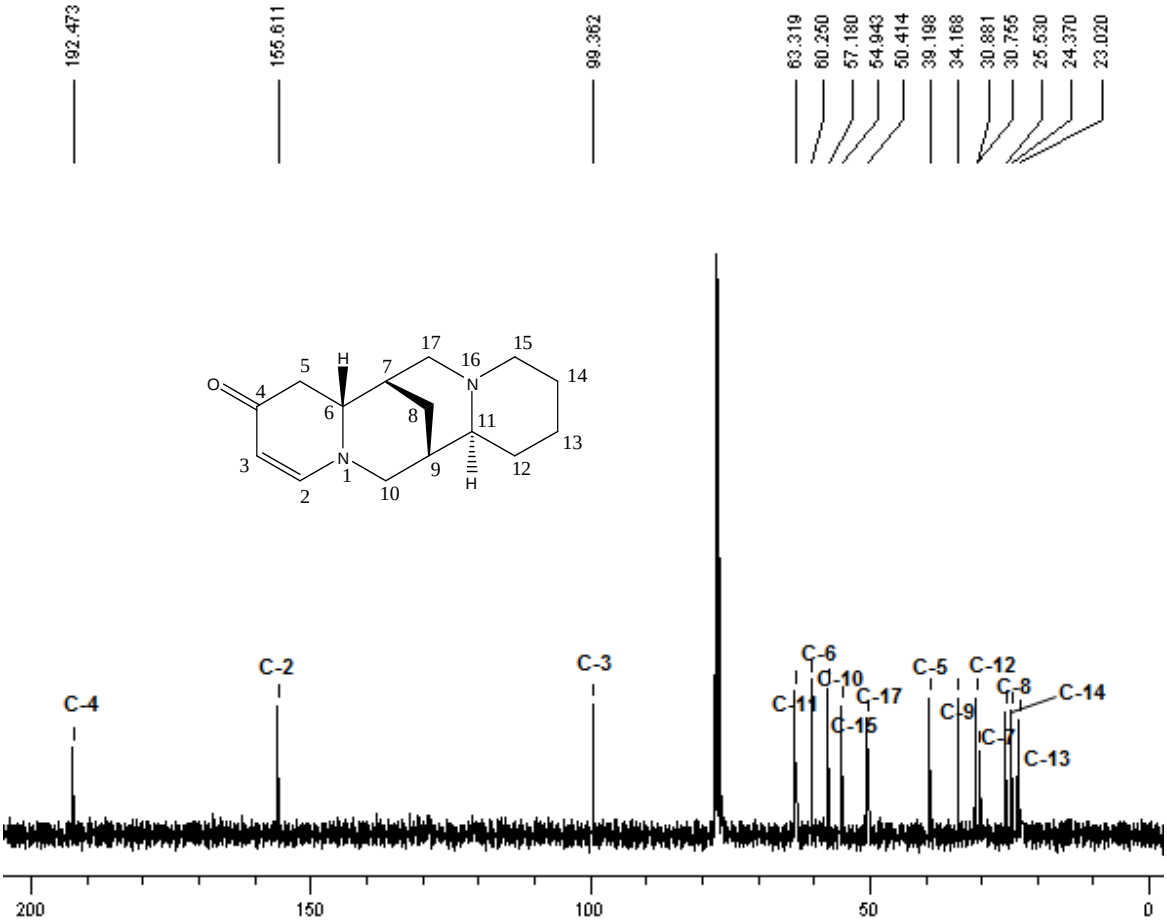


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C do composto (-)multiflorina em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.

ANEXO 3

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H Expandido do Alcalóide (-)13-α-tigloiloximultiflorina

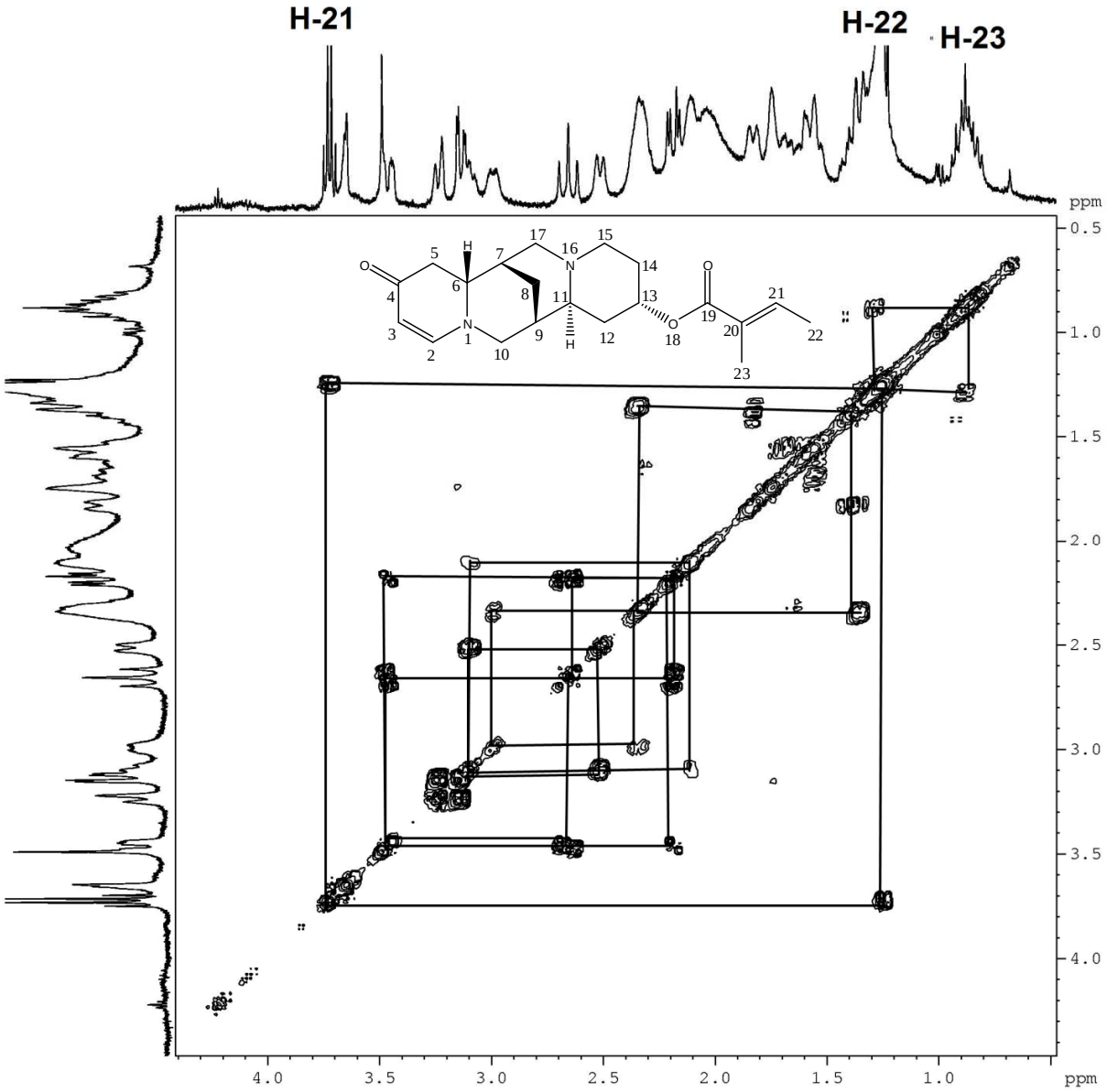


Figura 37. Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H Expandido (região δ 0,5 a δ 4,5 ppm) do composto (-)13-α-tigloiloximultiflorina em $CDCl_3$.

ANEXO 4

Espectro de RMN de ^{1}H do Alcalóide (+)13-α-Hidroxilupanina

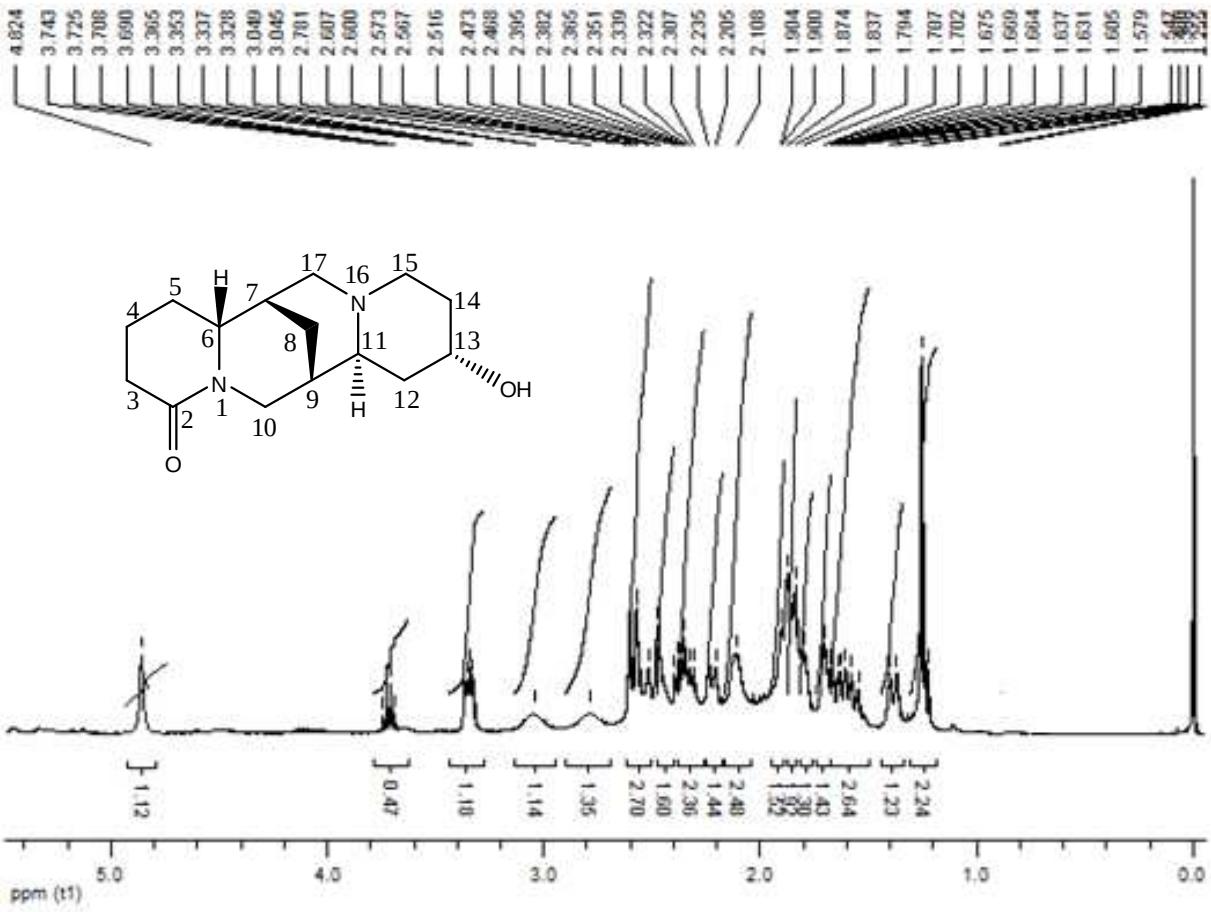


Figura 38. Espectro de RMN ^{1}H do composto (+)13-α-Hidroxilupanina em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

ANEXO 5

Espectro de RMN de ^{13}C do Alcalóide (+)13-α-Hidroxilupanina

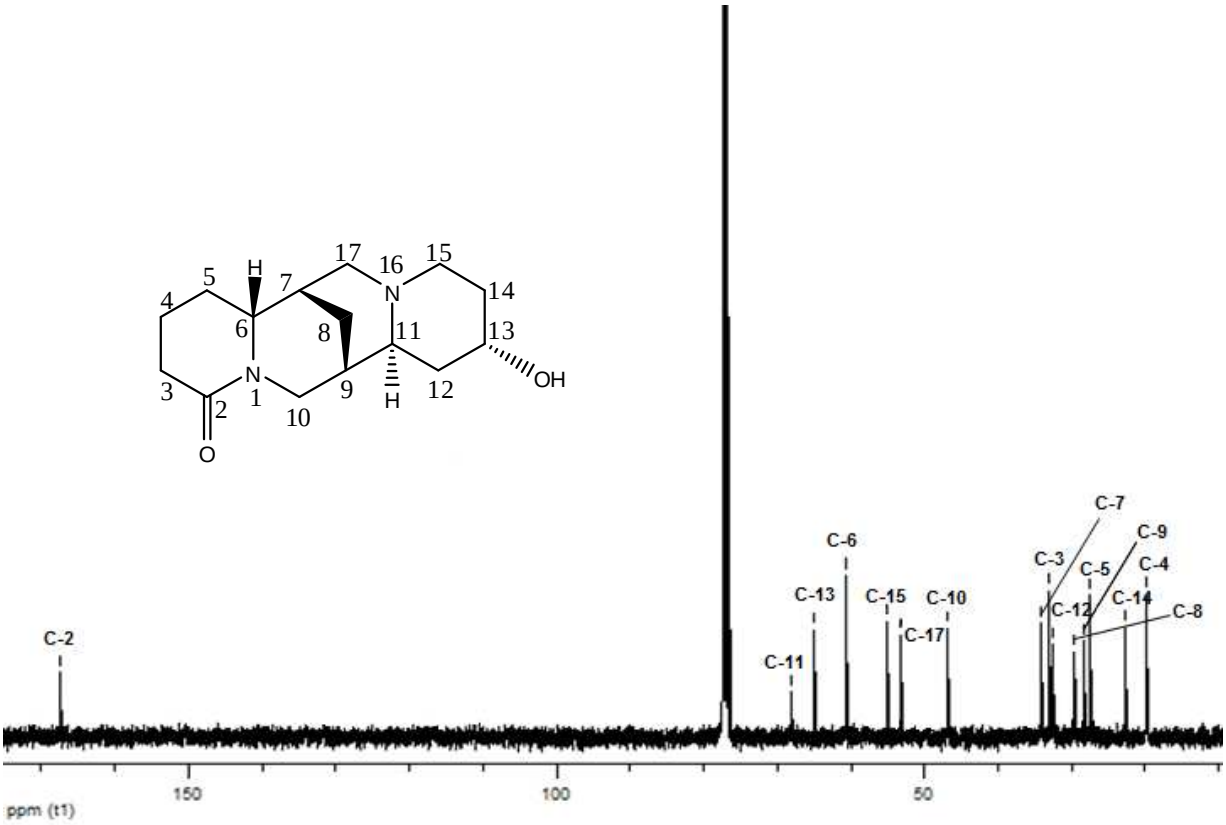


Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C do composto (+)13-α-Hidroxilupanina em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.

ANEXO 6

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

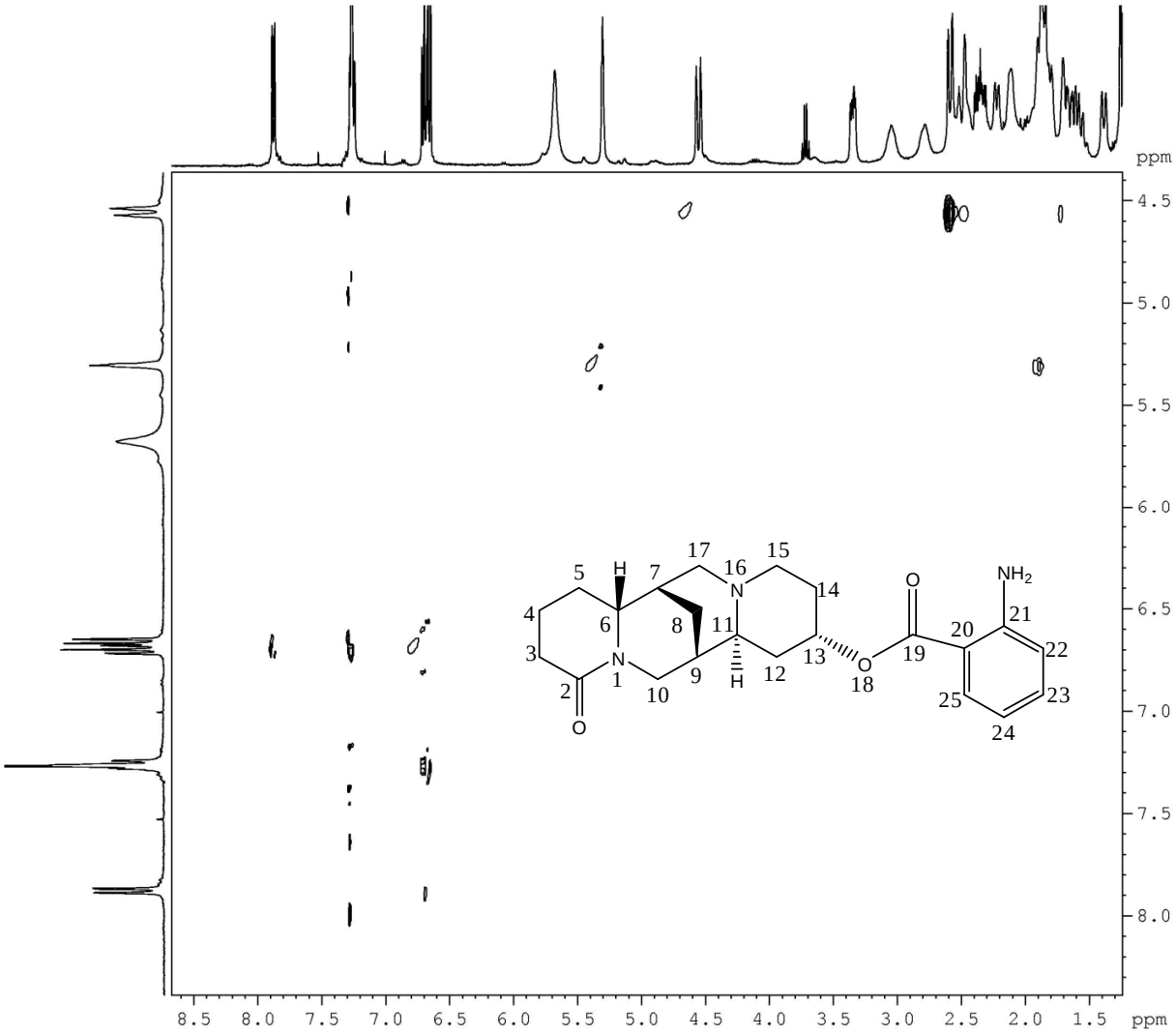


Figura 40. Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido (região δ 1,5 a δ 8,5 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 7

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

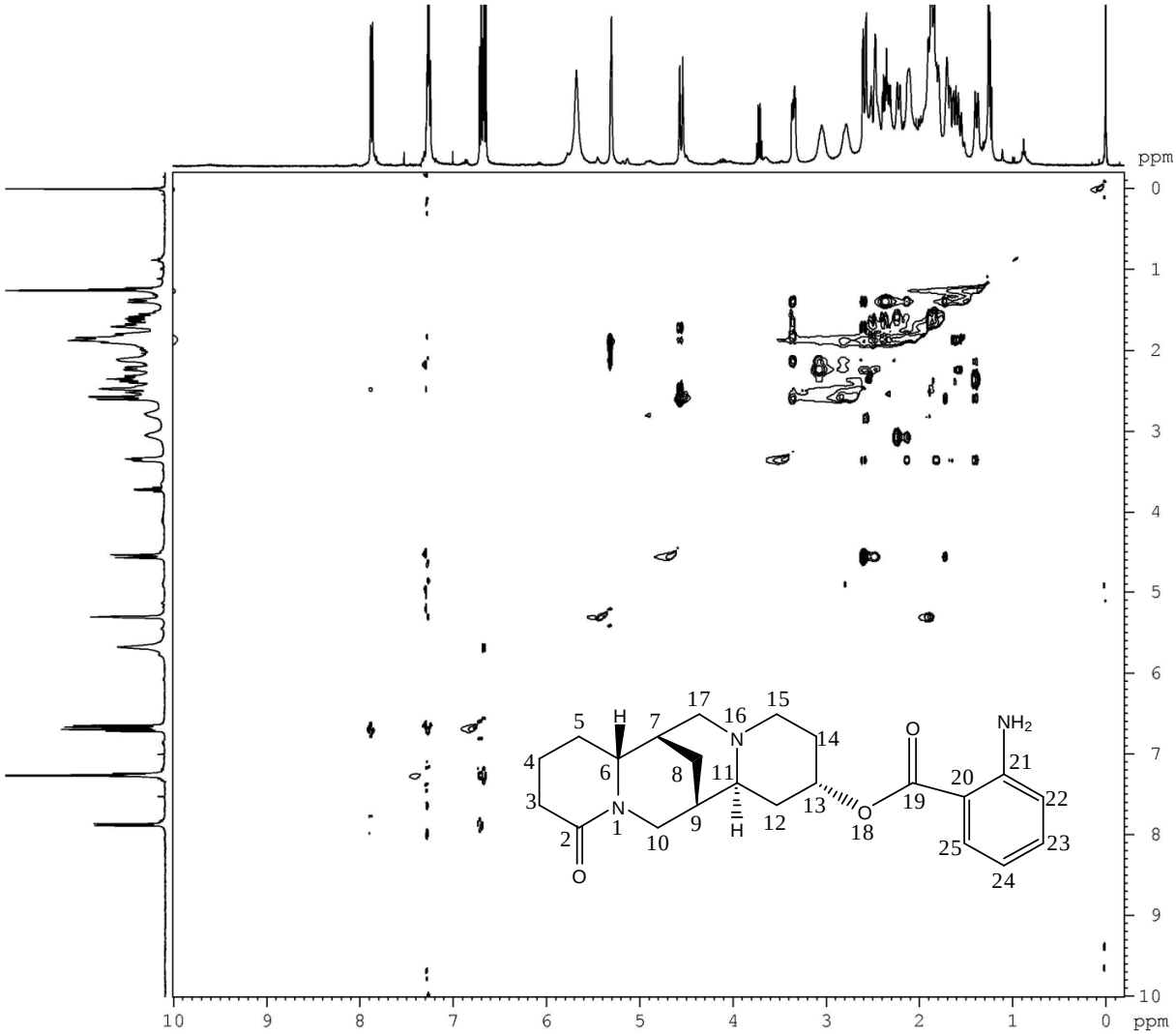


Figura 41. Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido (região δ 0,0 a δ 10,0 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 8

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

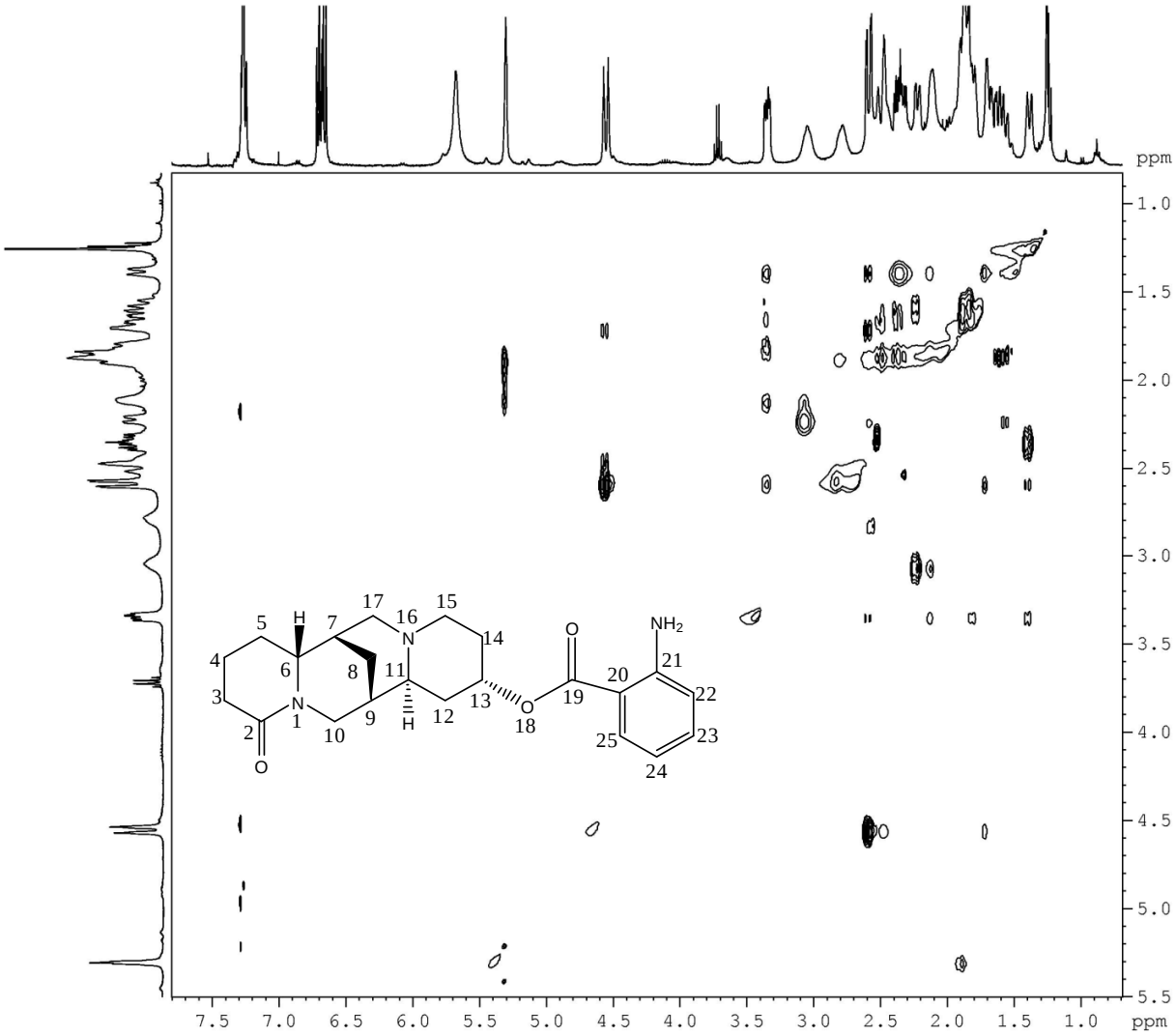


Figura 42. Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido (região δ 0,5 a δ 7,5 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 9

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

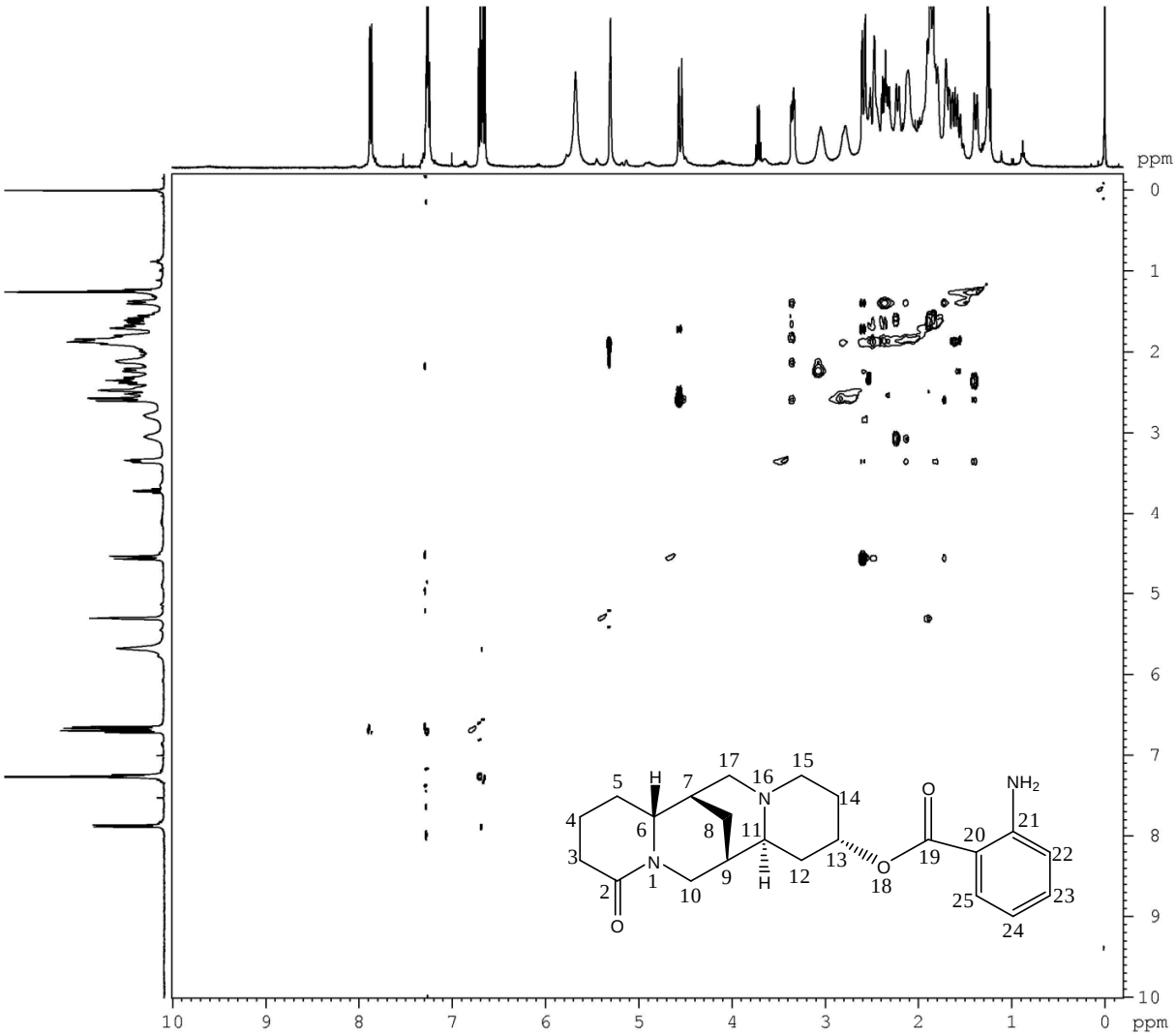


Figura 43. Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, NOESY, Expandido (região δ 0,0 a δ 10,0 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 10

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

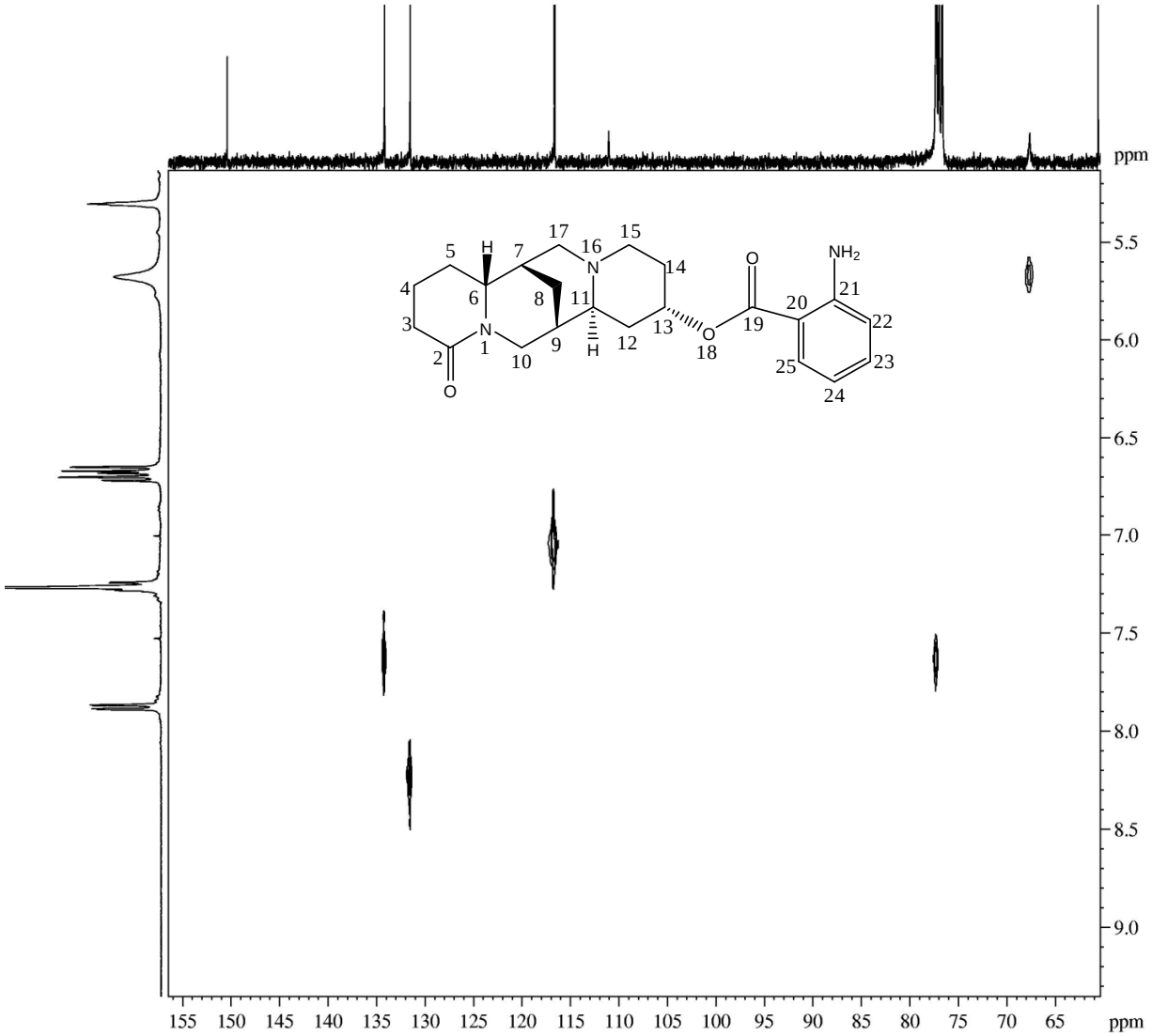


Figura 44. Espectro de RMN ^{1}H – ^{13}C, HETCOR, Expandido (região δ 60,0 a δ 155,2 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 11

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

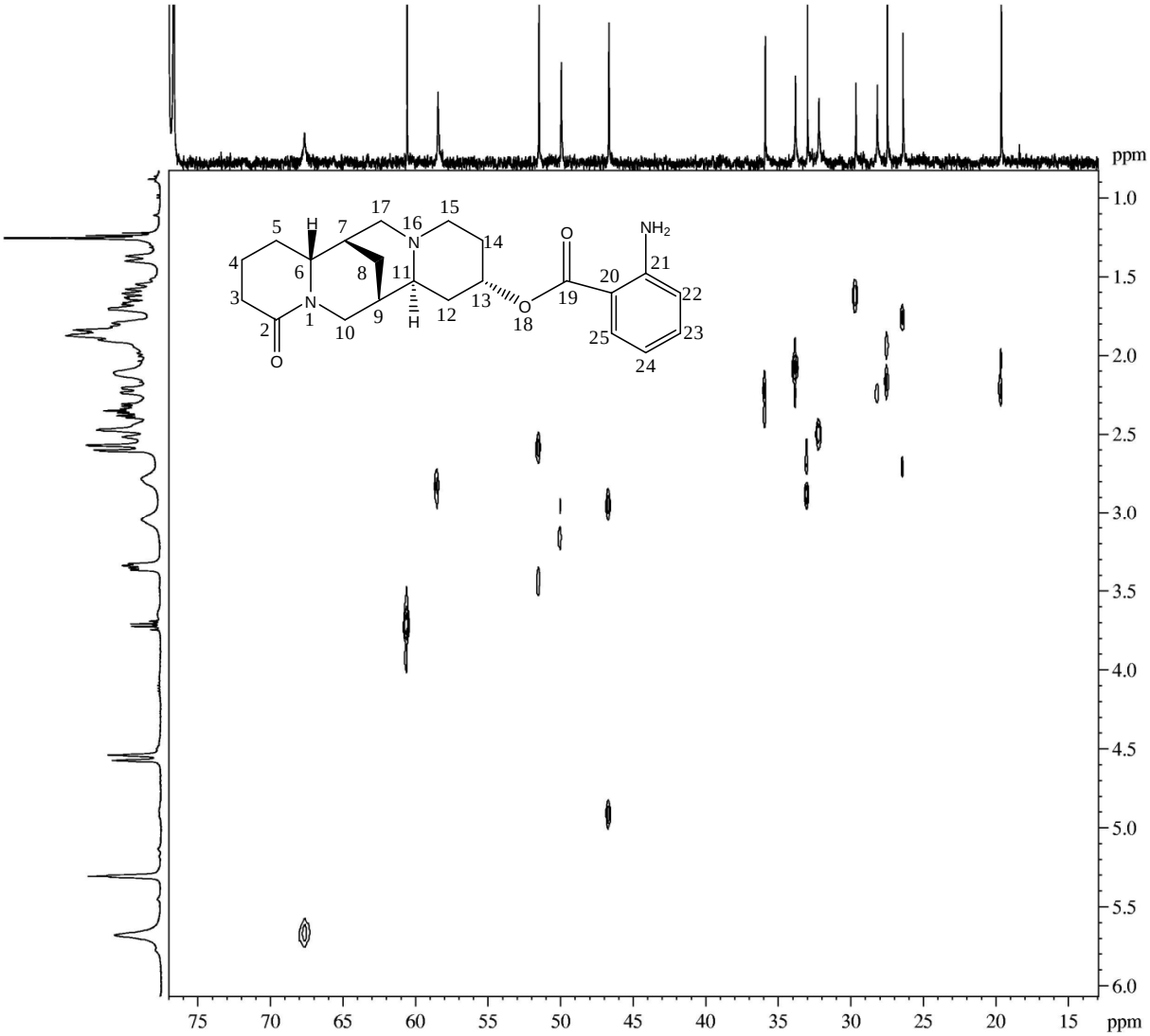


Figura 45. Espectro de RMN ^{1}H – ^{13}C, HETCOR, Expandido (região δ 15,0 a δ 77,0 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 12

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{13}C do Alcalóide (+)Lanatina A

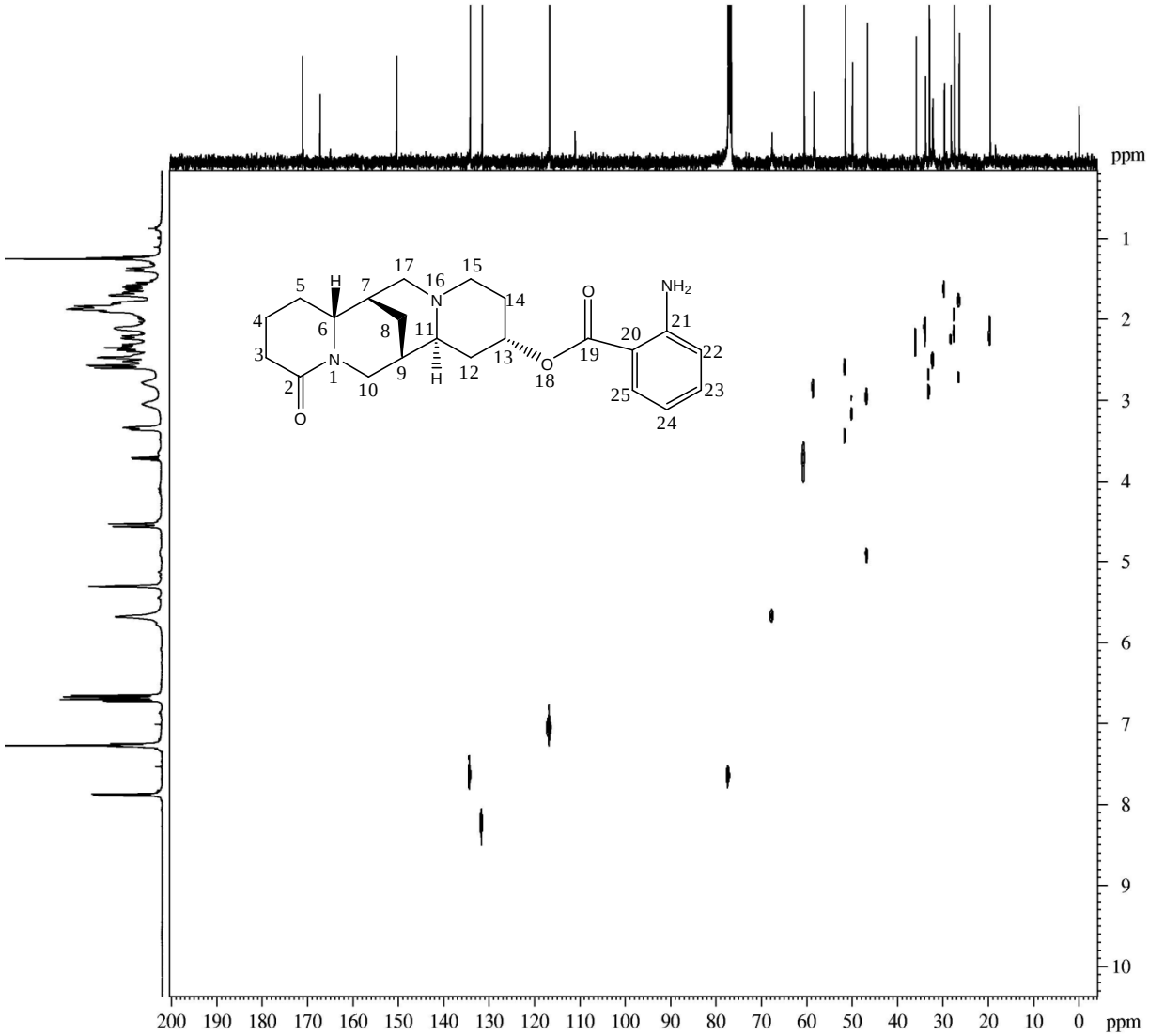


Figura 46. Espectro de RMN ^{1}H – ^{13}C, HETCOR, do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 13

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

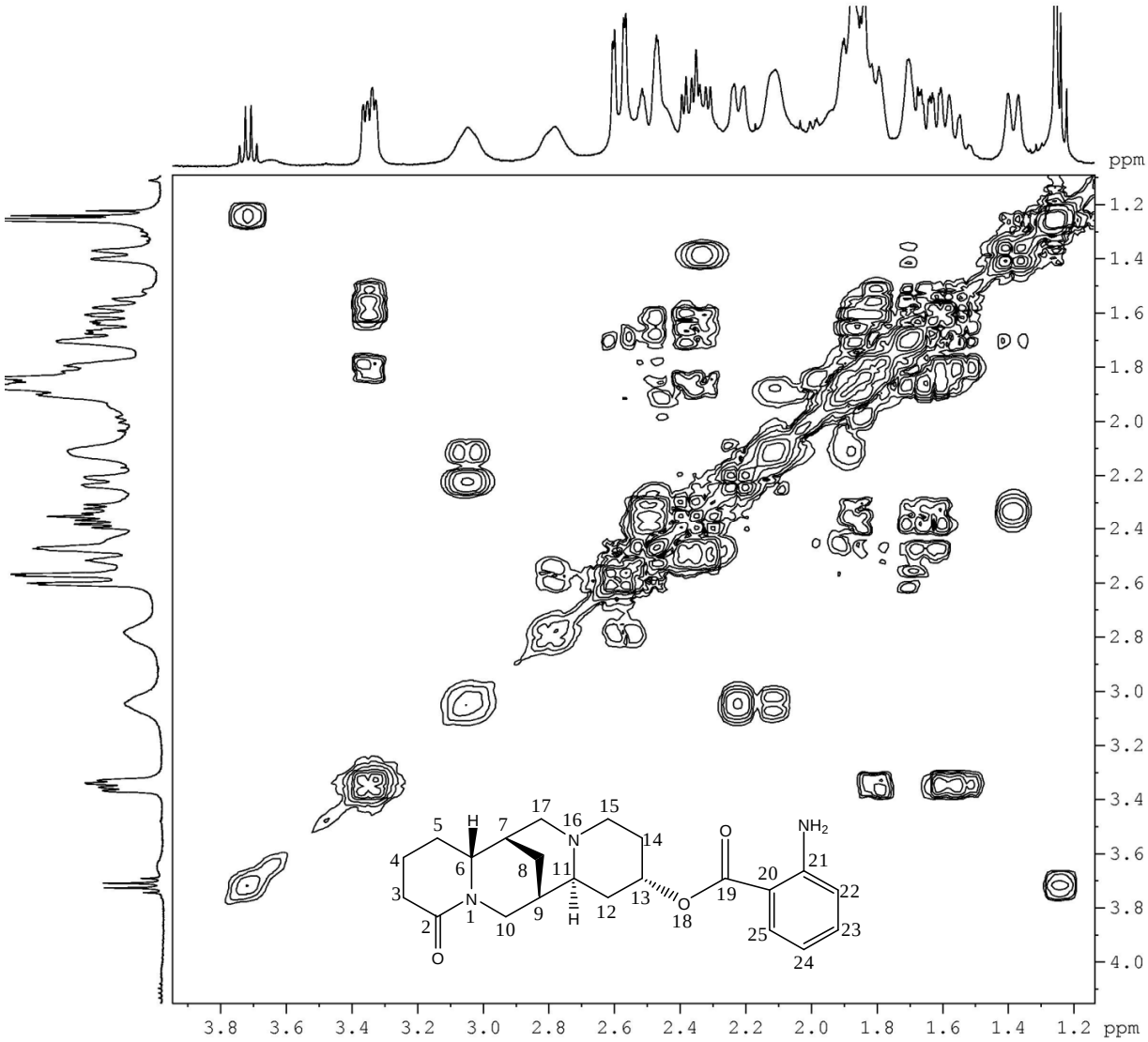


Figura 47. Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido (região δ 1,2 a δ 3,8 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 14

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

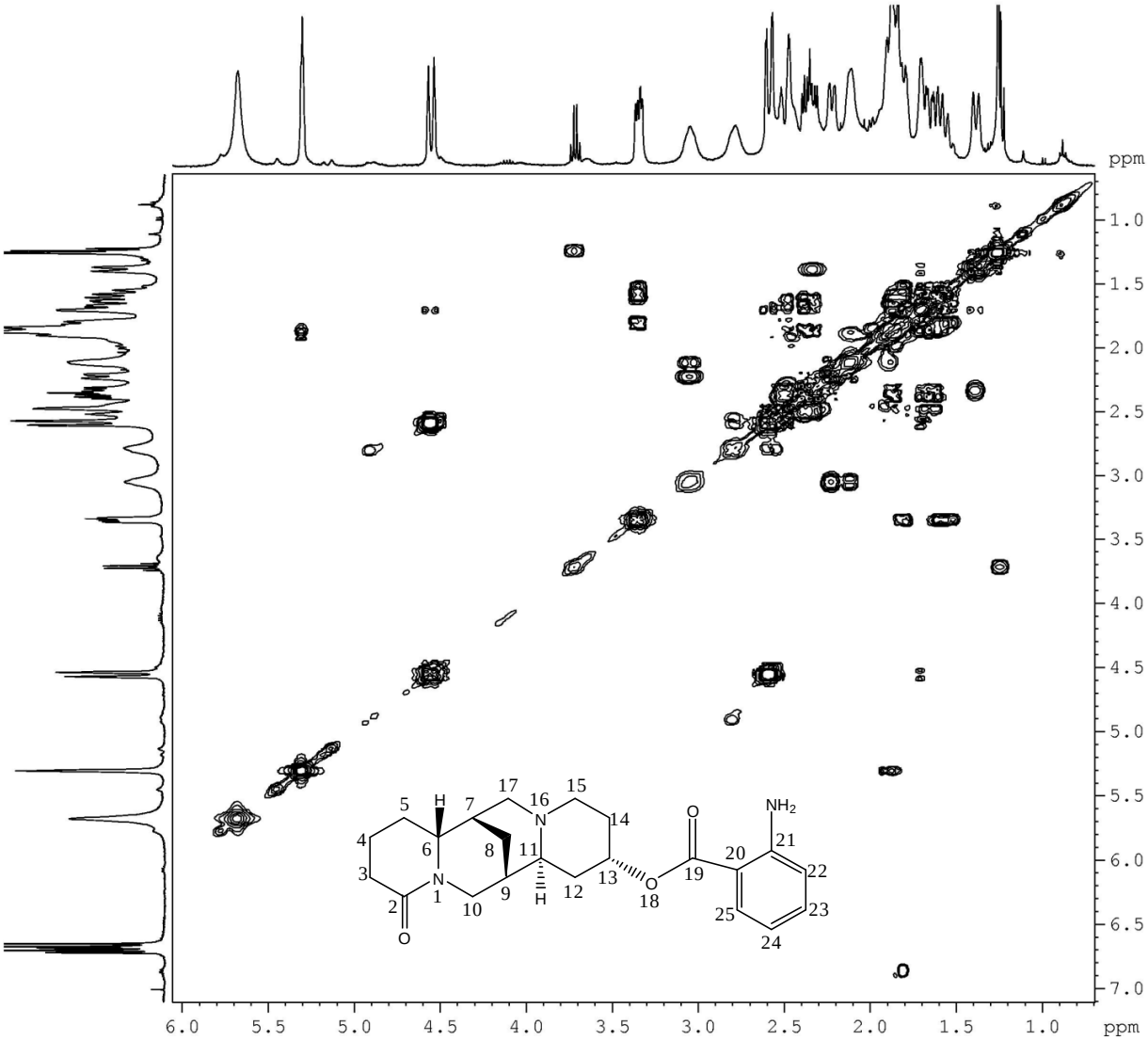


Figura 48. Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido (região δ 0,5 a δ 6,0 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 15

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

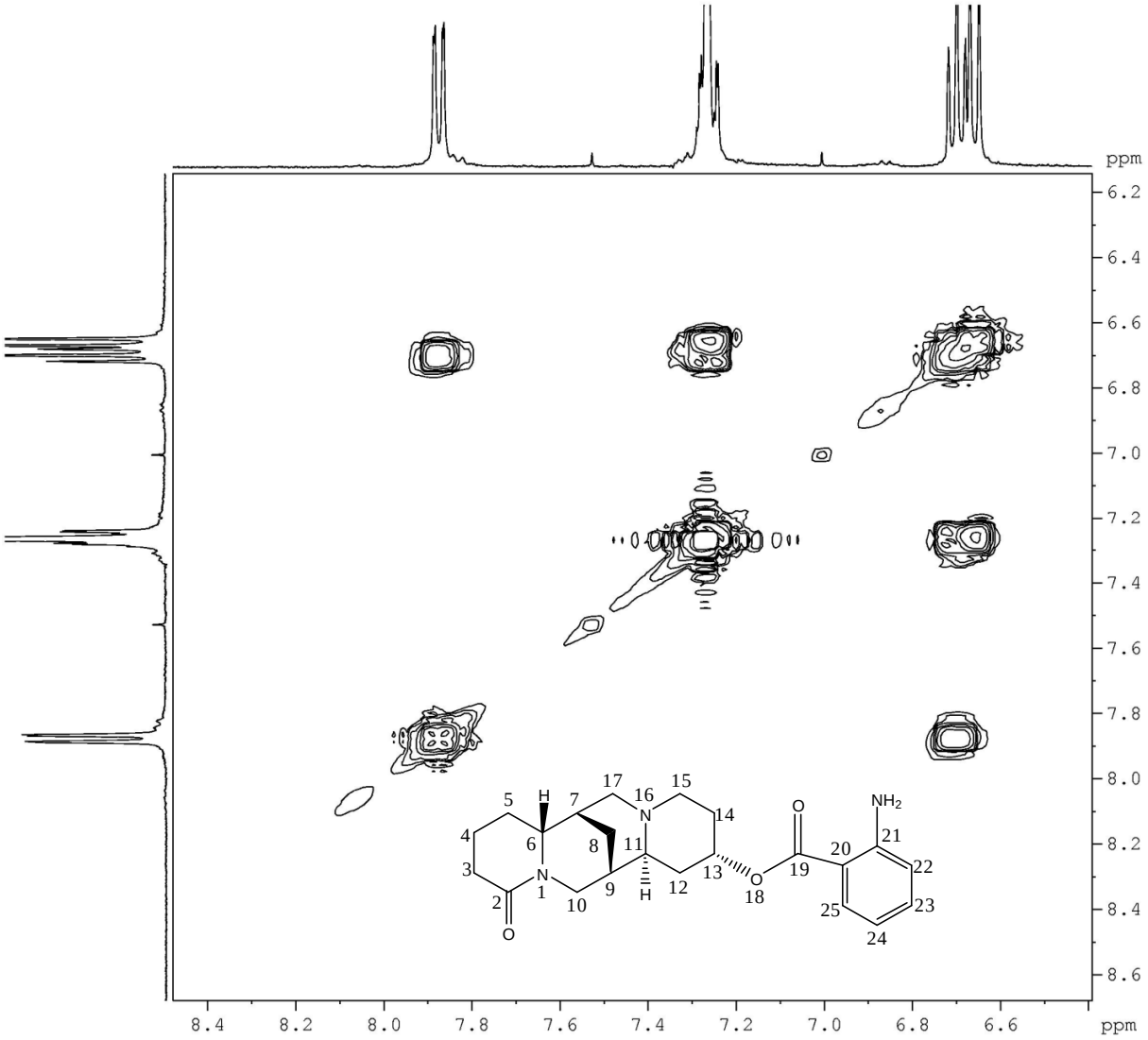


Figura 49. Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, COSY, Expandido (região δ 6,0 a δ 8,5 ppm) do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 16

Espectro de RMN de Correlação ^{1}H – ^{1}H, COSY, do Alcalóide (+)Lanatina A

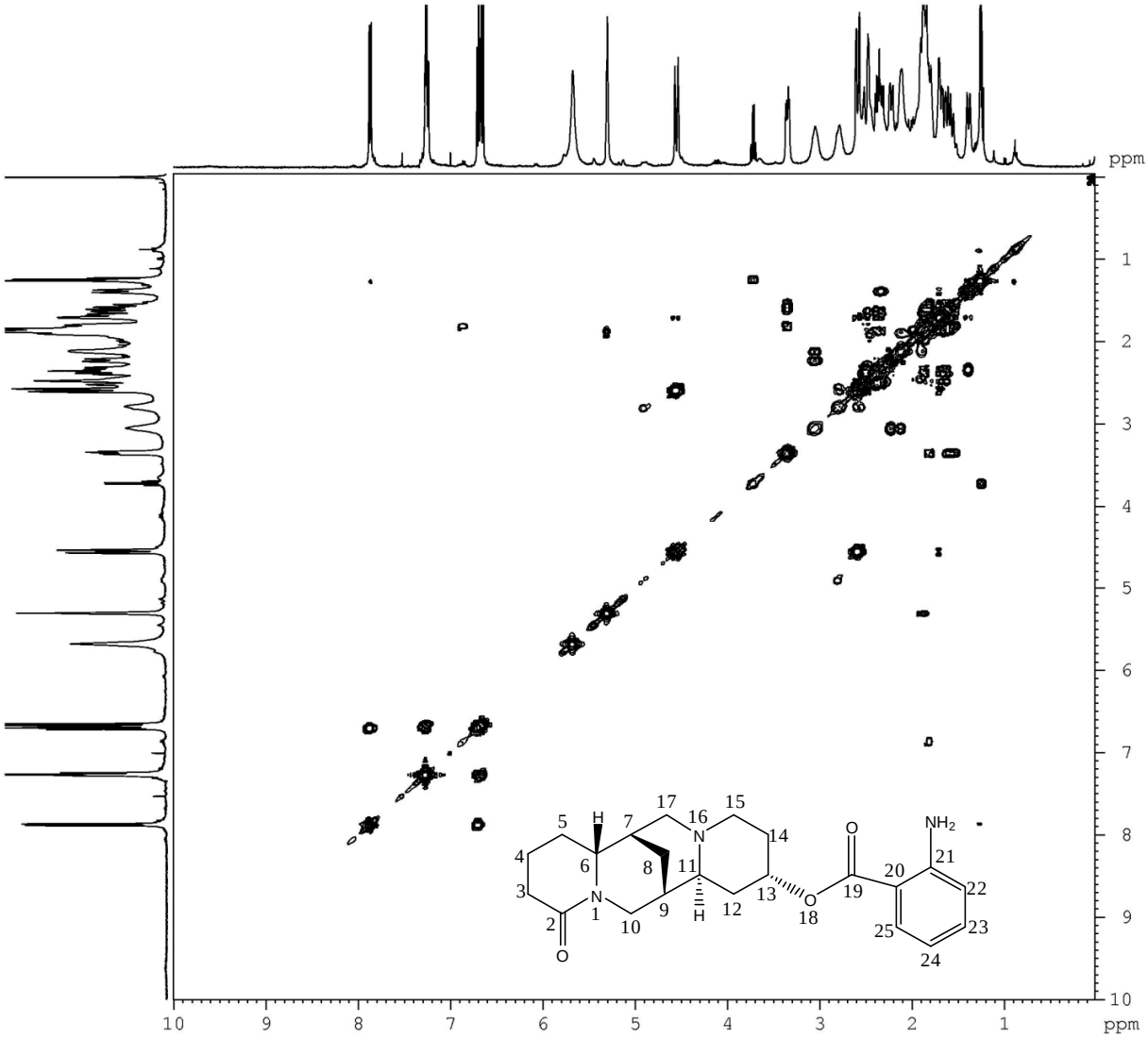


Figura 50. Espectro de RMN ^{1}H – ^{1}H, COSY, do composto (+)Lanatina A em $CDCl_3$.

ANEXO 17

Espectro de RMN de ^{1}H Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

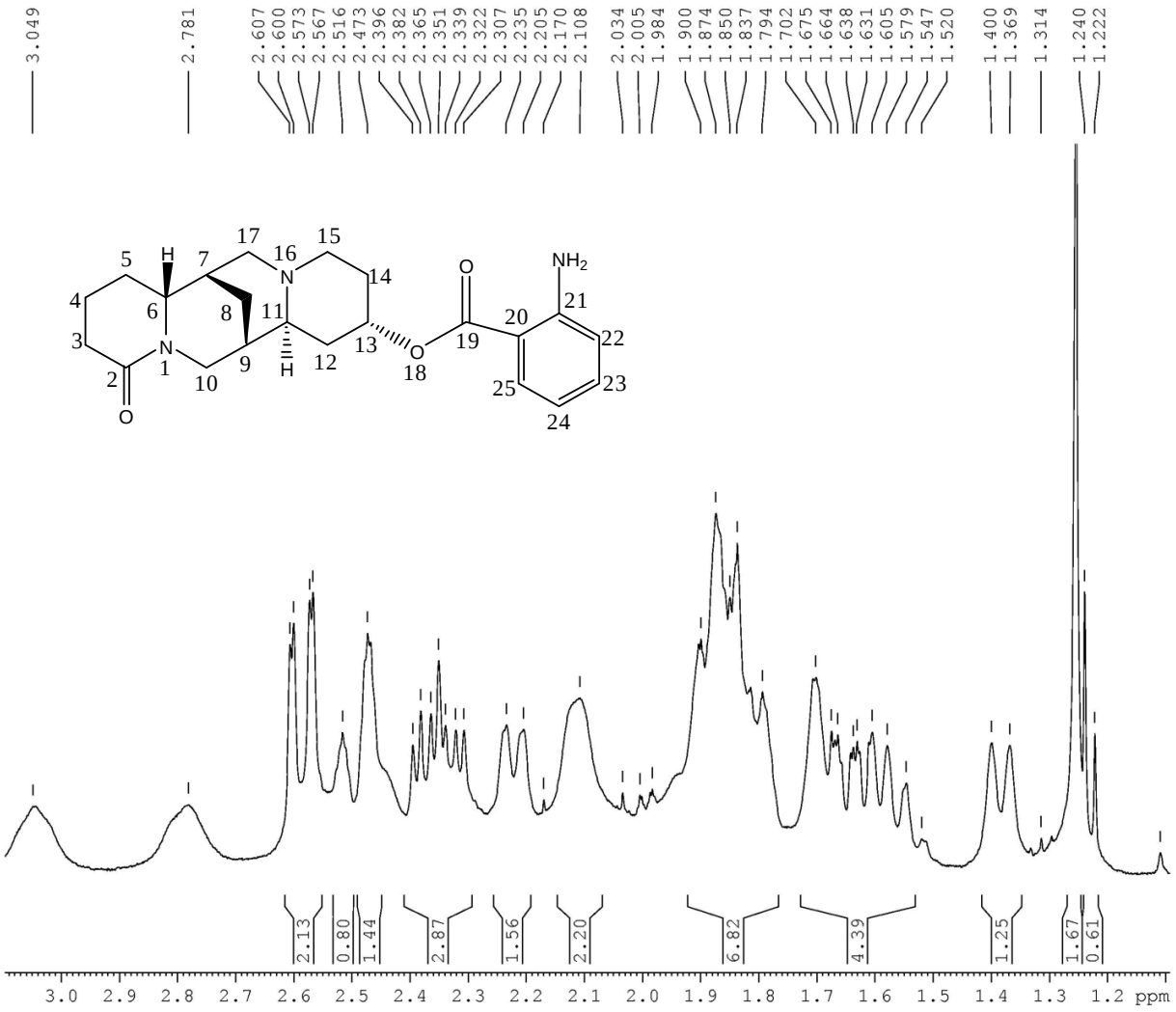


Figura 51. Espectro de RMN de ^{1}H Expandido (região δ 1,0 a δ 3,5 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

ANEXO 18

Espectro de RMN de ^{1}H Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

Figura 52. Espectro de RMN de ^{1}H Expandido (região δ 1,5 a δ 3,4 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

ANEXO 19

Espectro de RMN de ^{1}H Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

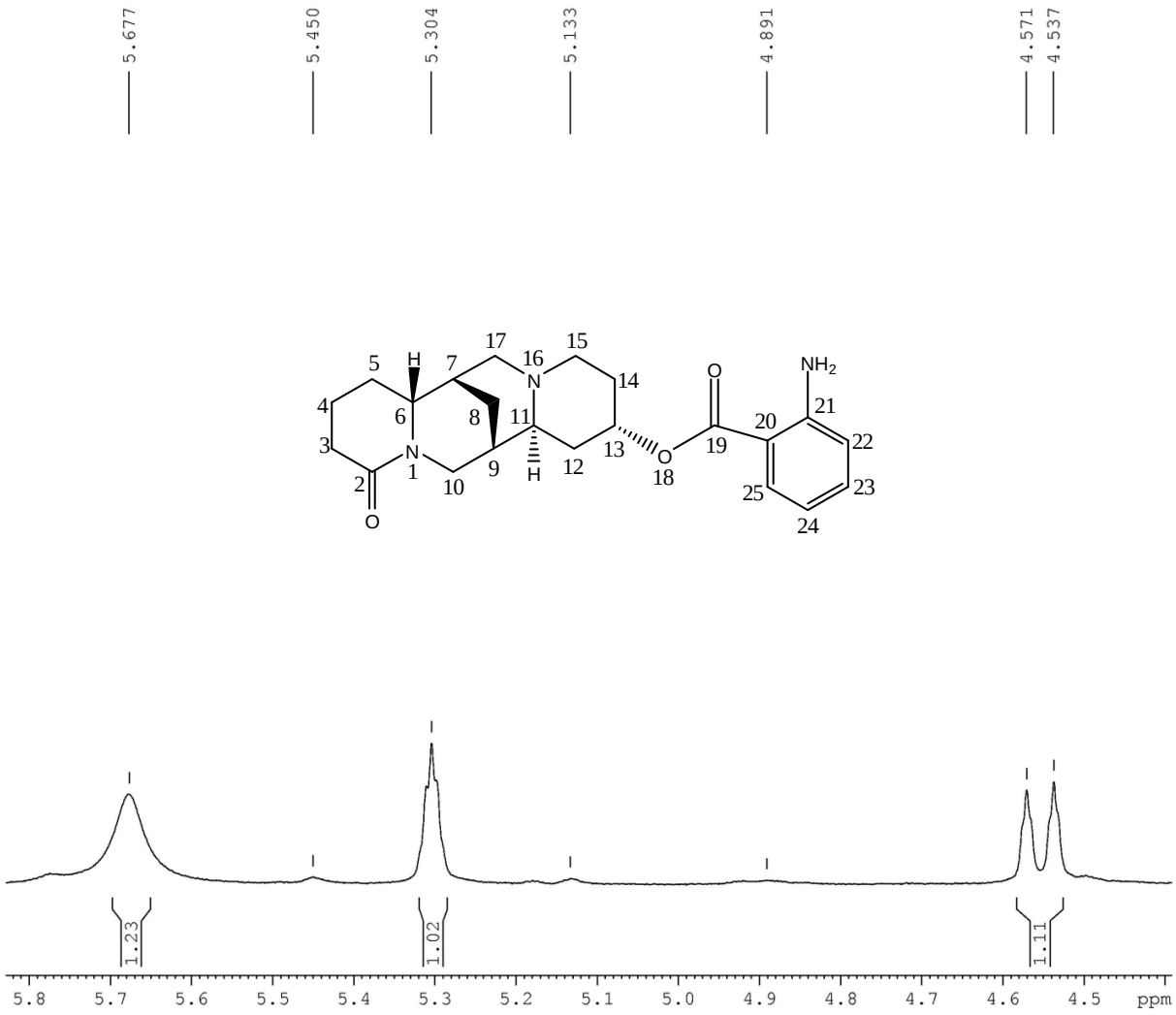


Figura 53. Espectro de RMN de ^{1}H Expandido (região δ 4,5 a δ 5,8 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

ANEXO 20

Espectro de RMN de ^{1}H Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

Figura 54. Espectro de RMN de ^{1}H Expandido (região δ 6,6 a δ 7,9 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 400,13 MHz e 25 ºC.

ANEXO 21

Espectro de RMN, DEPT 90, do Alcalóide (+)Lanatina A

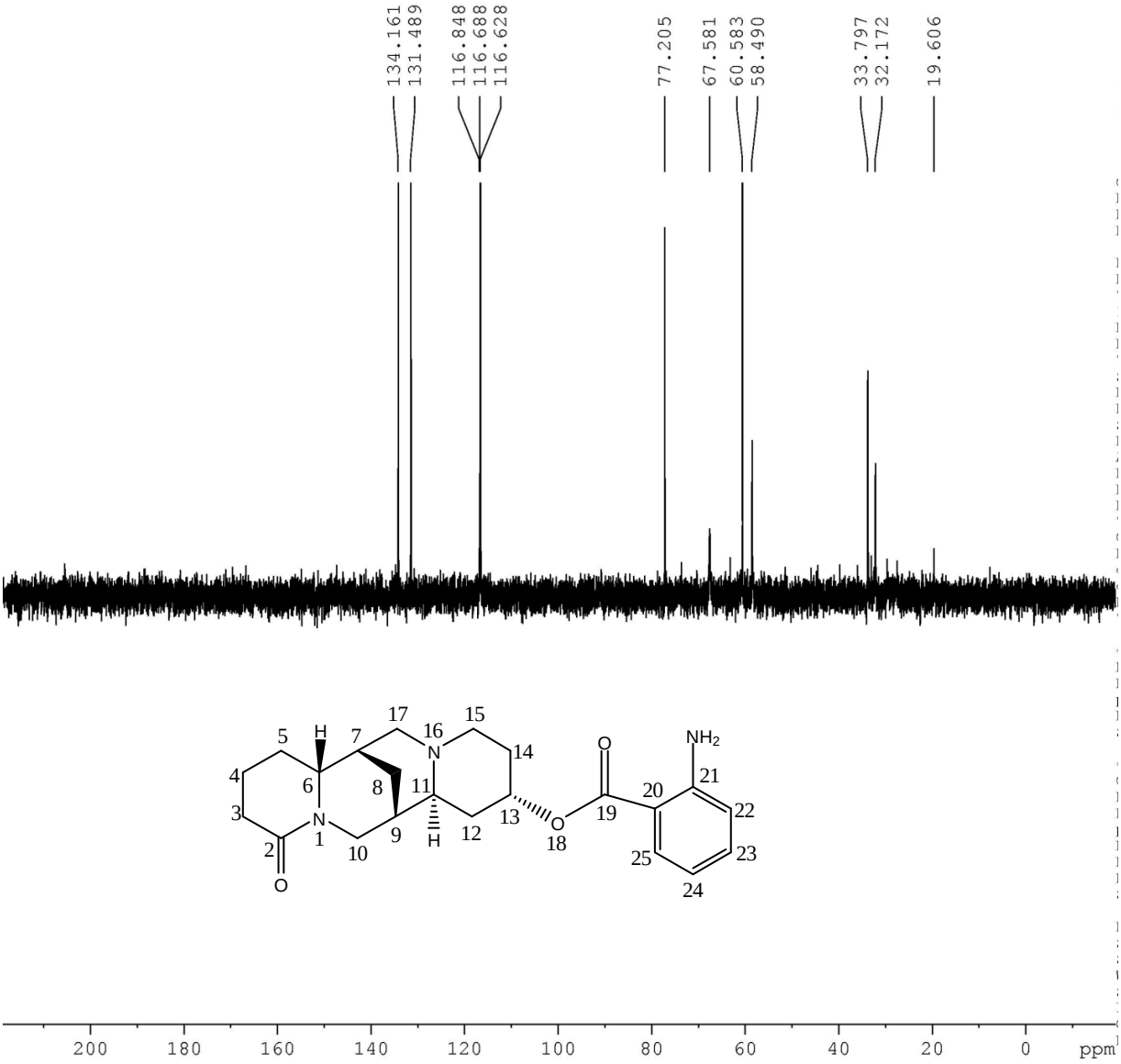


Figura 55. Espectro de RMN, DEPT 90, do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$.

ANEXO 22

Espectro de RMN, DEPT 90, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

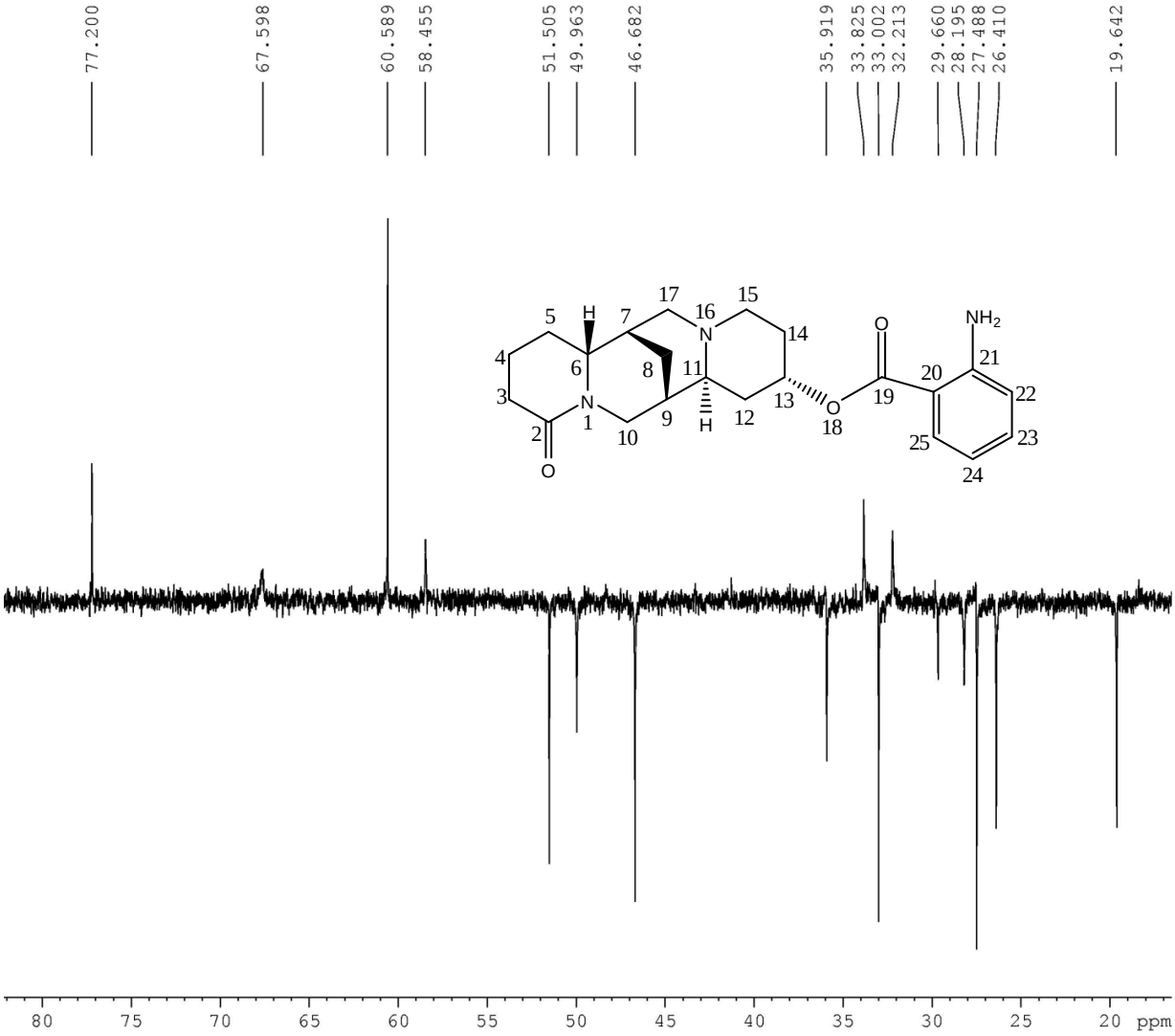


Figura 56. Espectro de RMN, DEPT 90, Expandido (região δ 20,0 a δ 80,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$.

ANEXO 23

Espectro de RMN, DEPT 90, Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

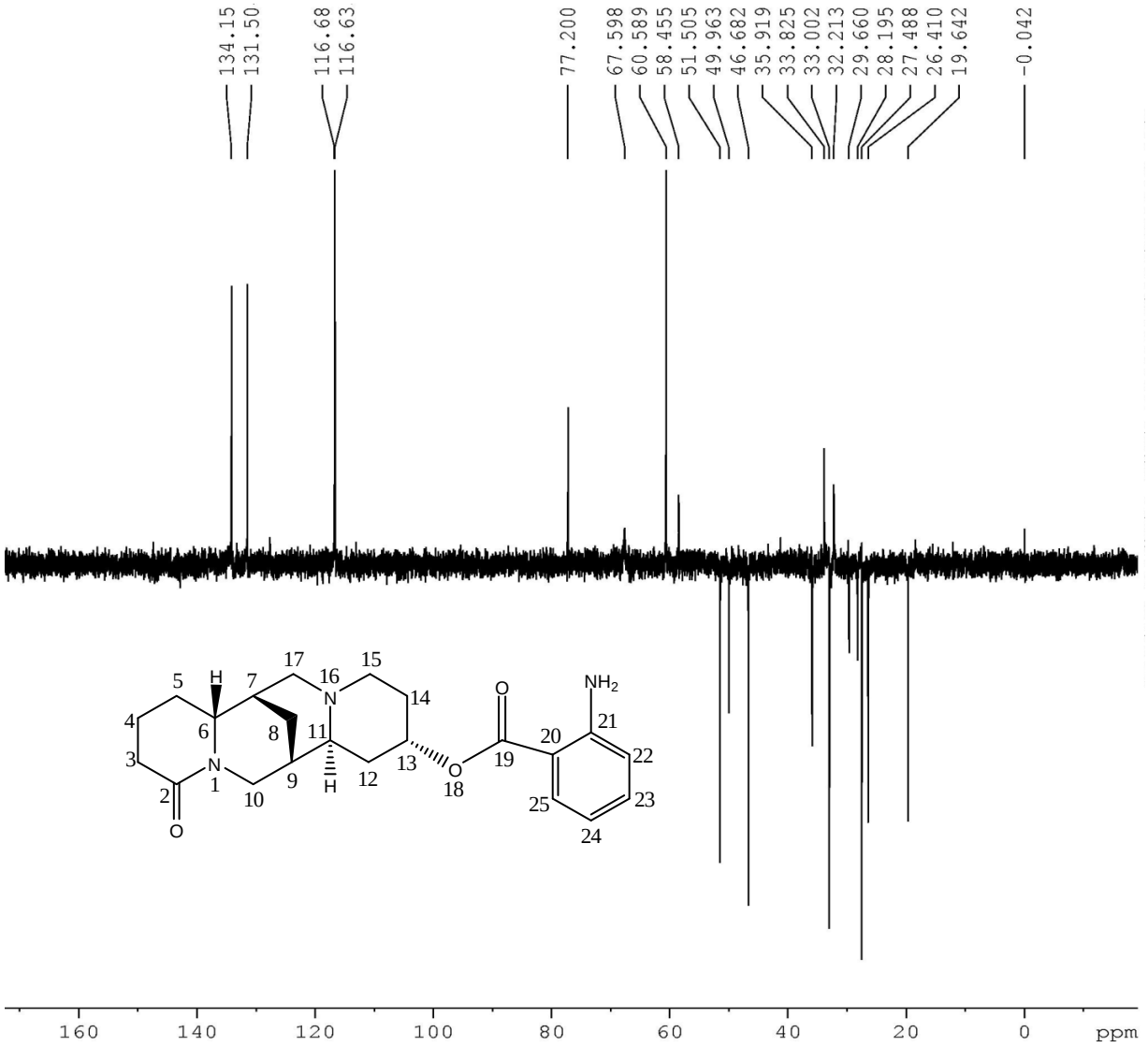


Figura 57. Espectro de RMN, DEPT 90, Expandido (região δ 0,0 a δ 160,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$.

ANEXO 24

Espectro de RMN de ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

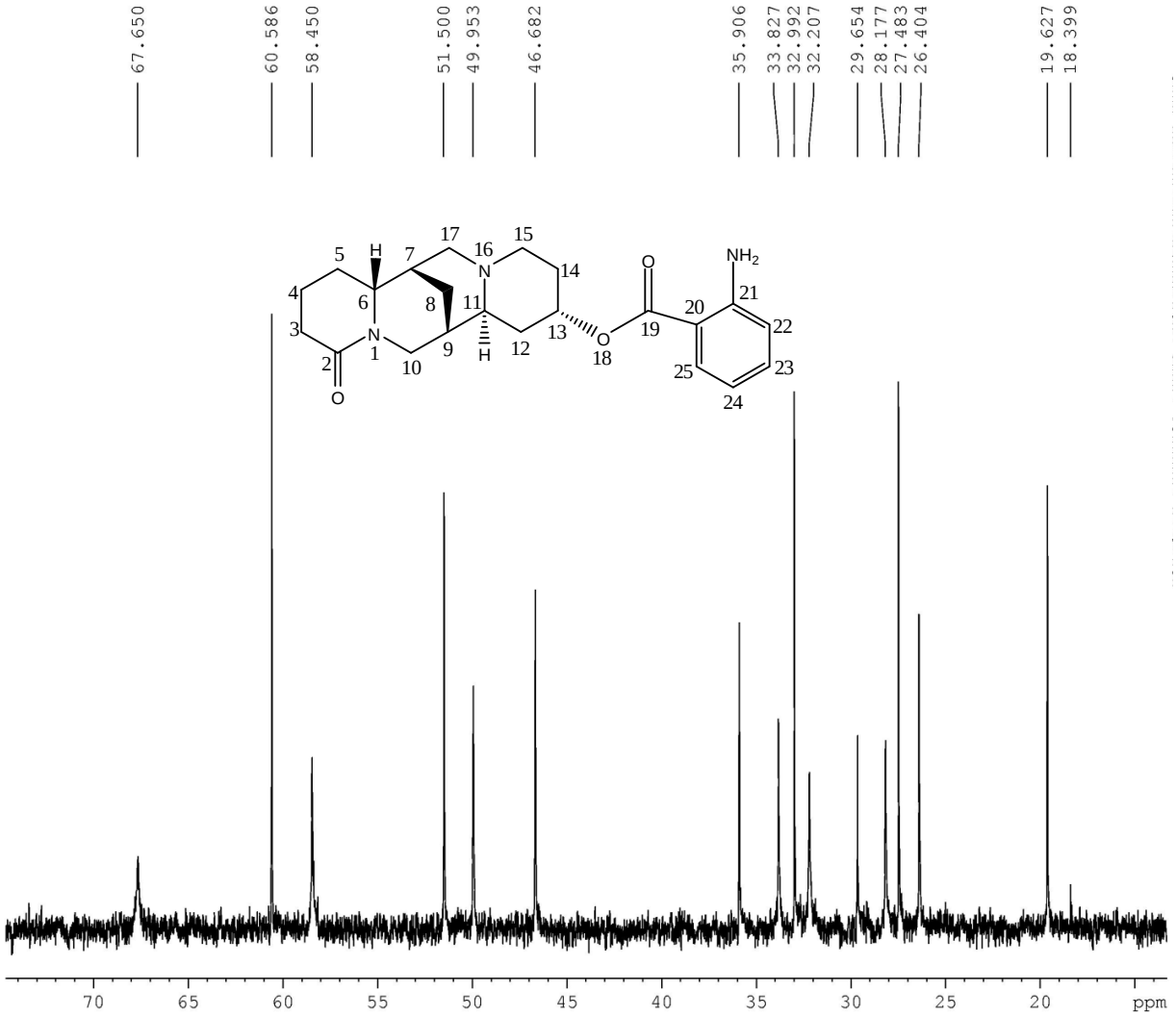


Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C Expandido (região δ 15,0 a δ 70,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.

ANEXO 25

Espectro de RMN de ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

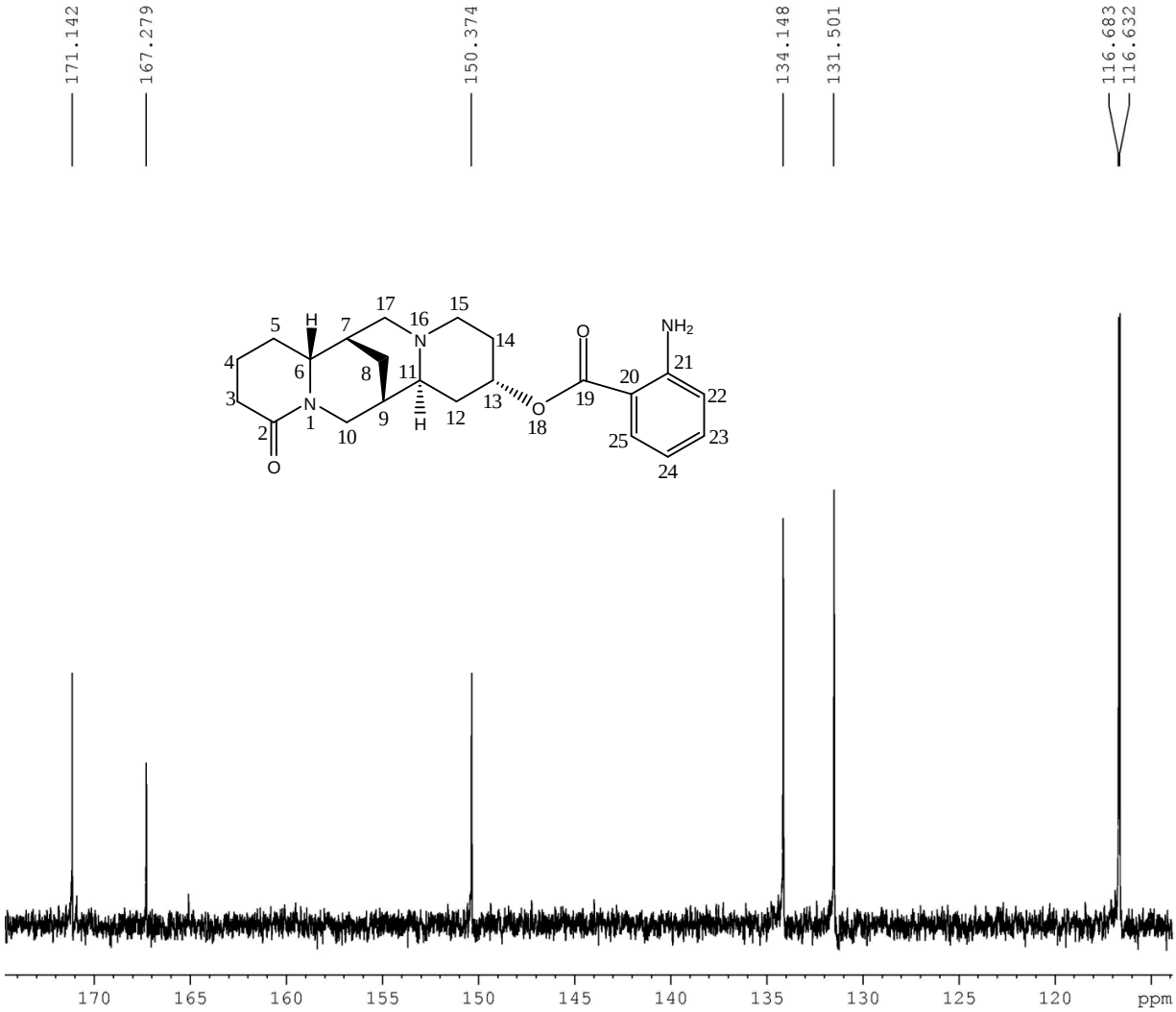


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C Expandido (região δ 115,0 a δ 175,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.

ANEXO 26

Espectro de RMN de ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

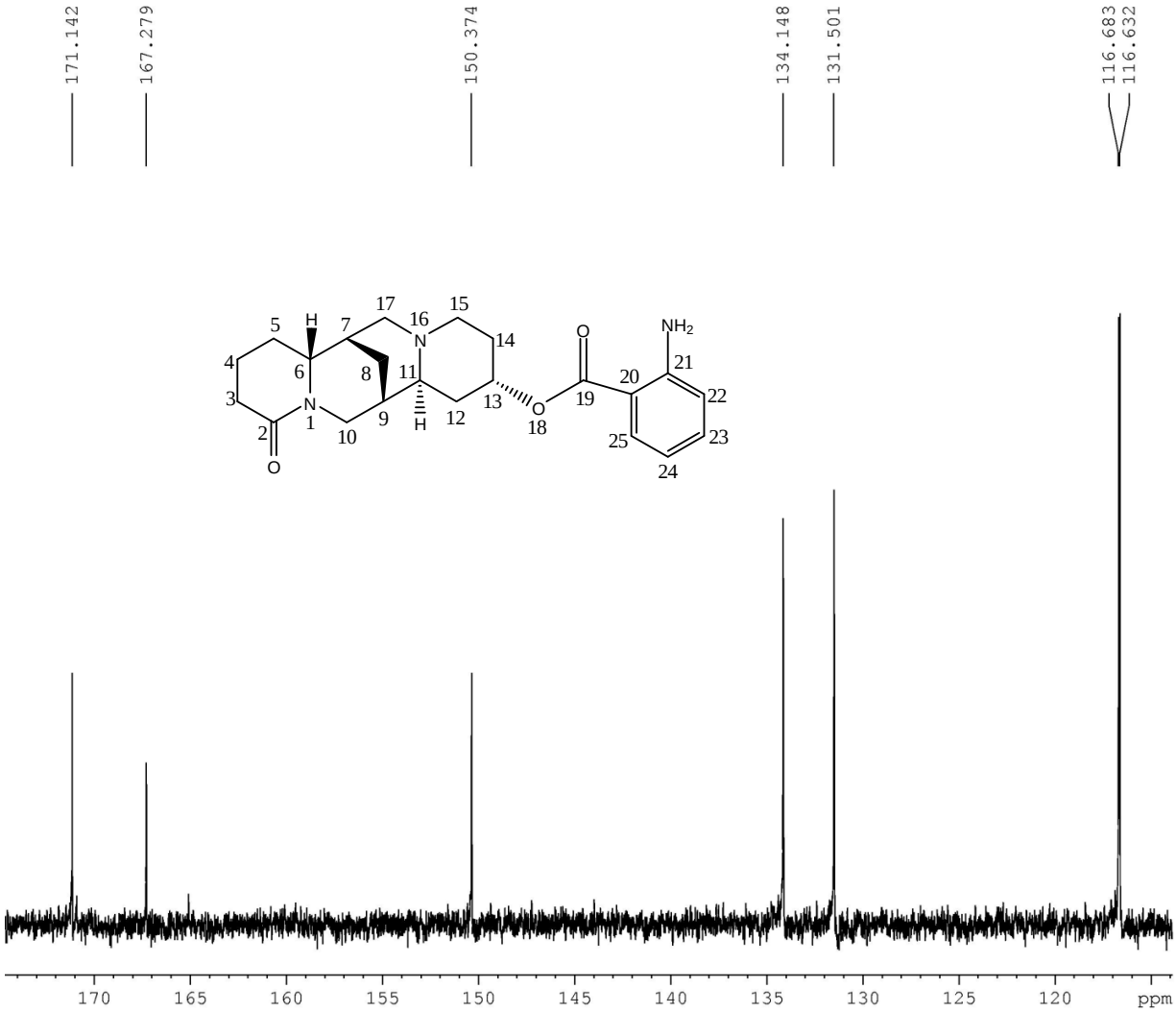


Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C Expandido (região δ 115,0 a δ 175,0 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.

ANEXO 27

Espectro de RMN de ^{13}C Expandido do Alcalóide (+)Lanatina A

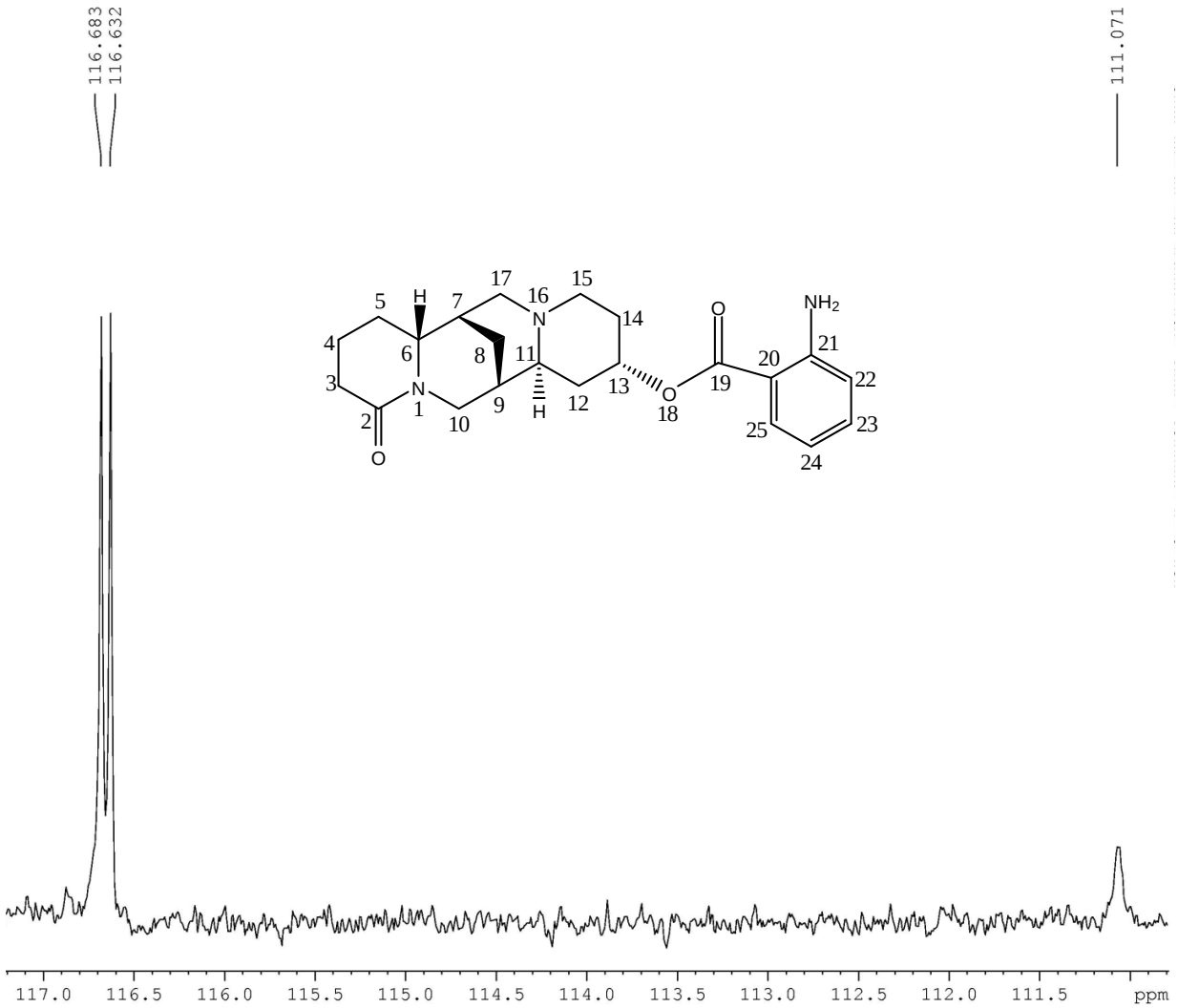


Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C Expandido (região δ 110,0 a δ 117,2 ppm) do composto (+)Lanatina A, em $CDCl_3$ a 100,62 MHz e 25 ºC.