



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

***Lupinus lanatus* Benth, *Lupinus guaraniticus* (Hassl.)
C. P. Sm., *Lupinus paranensis* C. P. Sm. (*Fabaceae*) e
Waltheria douradinha Saint Hilaire (*Sterculiaceae*):
Isolamento e Identificação de seus Metabólitos e
Atividade Biológica**

Alexandre Tiburski Neto

Santa Maria, RS, Brasil

31/07/2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tiburski Neto, Alexandre
Lupinus lanatus Benth, Lupinus guaraniticus (Hassl.)
C. P. Sm., Lupinus paranensis C. P. Sm. (Fabaceae) e
Waltheria douradinha Saint Hilaire (Sterculiaceae):
Isolamento e Identificação de seus Metabólitos e Atividade
Biológica / Alexandre Tiburski Neto.-2015.
254 p.; 30cm

Orientador: Ademir Farias Morel
Coorientador: Ionara Írion Dalcol
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2015

1. Produtos Naturais 2. Extração 3. Isolamento 4.
Elucidação Estrutural, Síntese Orgânica 5. Atividades
Biológicas I. Farias Morel, Ademir II. Írion Dalcol,
Ionara III. Título.

***Lupinus lanatus* Benth, *Lupinus guaraniticus* (Hassl.)
C. P. Sm., *Lupinus paranensis* C. P. Sm. (*Fabaceae*) e
Waltheria douradinha Saint Hilaire (*Sterculiaceae*):
Isolamento e Identificação de seus Metabólitos e
Atividade Biológica**

por

Alexandre Tiburski Neto

Tese apresentada ao Curso de 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

DOUTORADO EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

***Lupinus lanatus* Benth, *Lupinus guaraniticus* (Hassl.) C. P. Sm.,
Lupinus paranensis C. P. Sm. (*Fabaceae*) e *Waltheria douradinha*
Saint Hilaire (*Sterculiaceae*): Isolamento e Identificação de seus
Metabólitos e Atividade Biológica**

Elaborada por

Alexandre Tiburski Neto

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Doutorado em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:


Ademir Farias Morel, Dr. (UFSM)

(Presidente/Orientador)


Marco Aurelio Mostardeiro, Dr. (UFSM)


Luciano Dornelles, Dr. (UFSM)


Miriam Inês Marchi, Dr^a. (UNIVATES)


Eduardo Miranda Ethur, Dr. (UNIVATES)

Santa Maria, 31 de julho de 2015

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 possível, tanto no âmbito profissional, quanto pessoal, onde um complementou o outro. Além de fazer um agradecimento especial a quem se mostrou uma pessoa altamente profissional e científica, 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 por viabilizar o desenvolvimento deste tema e pela confiança depositada.

A Professora Ionara I. Dalcol, pelas importantes contribuições, apoio e disponibilidade durante a trajetória deste estudo; um 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. E também meu agradecimento a UNOESC, IES, que por esses quatro anos compreendeu o e apoiou essa caminhada, um apreço especial.

Aos amigos pessoais, Carlos E. Blanco Linares, Daniel Scapin, Sandro R. Giacomelli, Alexandre Shubert (*in memorian*), Clarice Mostardeiro (*in memorian*), Marco Auelio Mostardeiro, Mario José Juges, Vinicius Ilha, Marcelo Pedroso, Carolina Quattrin O., Tanise, Denise e Ubiratan, Janice, Everton Boff, Eveline, Mateus, Adriana, Adriano, Liziane, Ricardo Giovenardi e demais não citados, 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, sobrinha Giovanna, 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 proporcionaram a oportunidade de crescer plenamente como ser humano.

E, finalmente a Deus, por ter colocado todas estas pessoas maravilhosas no meu caminho e por me proporcionar saúde física e mental, coragem, paciência e perseverança.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Química

Universidade Federal de Santa Maria

***Lupinus lanatus* Benth, *Lupinus guaraniticus* (Hassl.) C. P. Sm., *Lupinus paranensis* C. P. Sm. (*Fabaceae*) e *Waltheria douradinha* Saint Hilaire (*Sterculiaceae*): Isolamento e Identificação de seus Metabólitos e Atividade Biológica**

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 três espécies do gênero *Lupinus*, (*Leguminosae*), e a casca das raízes da espécie *Waltheria douradinha* Sain Hilaire (*Sterculiaceae*), foram submetidas à investigação fitoquímica. Dessa investigação, foram isolados e identificados 14 compostos, os quais foram submetidos a diversas atividades biológicas. Dentre as atividades realizadas, os compostos foram avaliados frente a atividades antimicrobiana, antioxidante, enzimáticas (*POP* e *DPPIV*) e também atividade bacteriolítica. Dois dos compostos isolados, (+)Lanatina A (*L. paranensis*) e Antidesmona (*W. douradinha*), foram submetidos a atividade bacteriolítica. O teste demonstrou que esses compostos possuem atividade de lise, principalmente frente a Gram-negativos. A Antidesmona apresentou seu melhor potencial lítico na concentração de 12,5 µg/ml frente ao microrganismo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Para esta bactéria, o alcaloide Antidesmona produziu uma lise de parede celular de aproximadamente 30% entre 4 e 6 horas ($P < 0,0001$). Os extratos alcaloídicos de *W. douradinha*, coletada em quatro diferentes regiões do Rio Grande do Sul – Brasil, passaram por análise de sua composição química por HPLC. A análise da composição química dos extratos básicos foi comparada com análises do solo do local de coleta da

planta. Esses resultados revelaram diferenças significativas nas composições químicas dos extratos alcalóidicos de *W. douradinha*, e também foram importantes guias de novos locais de coleta dessa espécie.

Palavras-chave:

Lupinus, Quinolizidínicos, Lanatina A, *Leguminosae*, *Sterculiaceae*, *Antidesmona*, *Waltheria*

ABSTRACT

Doctor Tesis in Chemistry
Post-Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria

***Lupinus lanatus* Benth, *Lupinus guaraniticus* (Hassl.) C. P. Sm., *Lupinus paranensis* C. P. Sm. (*Fabaceae*) e *Waltheria douradinha* Saint Hilaire (*Sterculiaceae*): Isolation and Identification of Biological Activity and its Metabolites**

Author: Alexandre Neto Tiburski
Academic Advisor: Ademir Farias Morel

The part of our constant search for new bioactive secondary metabolites of plant origin, the aerial parts of three species of the genus *Lupinus* (*Leguminosae*), and the bark of the roots of the species *Waltheria douradinha* Sain Hilaire (*Sterculiaceae*), were submitted to phytochemical investigation. In this research, they were isolated and identified 14 compounds, which was exposid several biological activities. Among the activities performed, the compounds were evaluated against antimicrobial, antioxidant enzyme (*POP* and *DPPIV*) and also bacteriolityc activity. Two of the isolated compounds, (+)Lanatina A (*L. paranensis*) and Antidesmona (*W. douradinha*) shawed bacteriolityc activity. The test showed that these compounds have bacteriolityc activity, especially against Gram-negative. The Antidesmona presented better lytic potential in the concentration of 12.5 µg/mL against the microorganism *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. For this bacterium, Antidesmona alkaloid produced a cell wall lysis of approximately 30% between 4-6 hours ($P < 0.0001$). The alkaloid extracts *W. douradinha*, collected in four different regions of Rio Grande do Sul - Brazil, was analyzing its chemical composition by HPLC. Analysis of the chemical composition of the basic extracts was compared with soil analyzes the place collection of plant. These

results revealed significant differences in the chemical compositions of alkaloid extracts of *Waltheria douradinha* Sain Hilaire and were important guides of new collection sites these species.

Keywords: *Lupinus*, Quinolizidine, Lanatine A, *Leguminoseae*, *Sterculiaceae*, *Waltheria*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	7
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1	FAMÍLIA <i>Fabaceae</i> ou <i>Leguminosae</i>	9
3.1.1	Gênero <i>Lupinus</i>	10
3.1.2	Uso Popular do Gênero <i>Lupinus</i>	11
3.1.3	Alcaloides Quinolizidínicos Presentes em Espécies do Gênero <i>Lupinus</i>	11
3.1.4	Biossíntese dos Alcaloides Quinolizidínicos.....	13
3.1.5	Flavonoides Presentes em Espécies do Gênero <i>Lupinus</i>	17
3.2	FAMÍLIA <i>Sterculiaceae</i>	21
3.2.1	Alcaloides Quinolônicos.....	21
3.2.1.1	Mecanismo de ação dos Alcaloides Quinolônicos.....	22
3.2.1.2	Farmacologia das Quinolonas.....	22
3.2.1.3	Ocorrência de 4-(1H)-quinolonas na Natureza.....	23
3.2.2	Alcaloides Ciclopeptídicos.....	25
3.2.2.1	Estrutura Química.....	25
3.2.2.2	Atividades Biológicas.....	26
3.2.2.3	Ocorrência de Alcaloides Ciclopeptídicos em Espécies da Família <i>Sterculaceae</i>	26
3.2.2.4	Isolamento.....	27
3.2.2.5	Elucidação Estrutural e Estereoquímica.....	27
3.2.2.6	Espectrometria de Massas (EM).....	28
3.2.2.7	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	INSTRUMENTOS UTILIZADOS.....	31
4.1.1	Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	31
4.1.2	Espectrômetro de Difração de Raios-X.....	32
4.1.3	Aparelho de Ponto de Fusão.....	32

4.1.4 Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro.....	32
4.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS.....	33
4.2.1 Cromatografia em Coluna (CC).....	33
4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Preparativa (CCDP).....	33
4.2.3 Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG/EM).....	34
4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	34
4.2.5 Medições da Densidade Óptica (DO).....	34
4.3 REAGENTES E MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADOS.....	35
4.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Lupinus</i> , <i>Leguminoseae/Fabaceae</i> E DA ESPÉCIE <i>W.</i> <i>douradinha</i> , <i>Sterculiaceae</i>	38
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i>	39
4.5.1 Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Micro-diluição em Caldo....	39
4.5.1.1 Método de Determinação da Atividade da CIM.....	39
4.5.1.2 Método de Concentração Letal Mínima (CLM).....	41
4.5.2 Meios de Cultura Empregados.....	41
4.6 ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA.....	43
4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	46
4.7.1 Método de Determinação da Atividade do Radical Livre DPPH.....	47
4.7.2 Método Qualitativo, <i>screening</i>	47
4.7.3 Método Quantitativo.....	48
4.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA ENZIMÁTICA.....	49
4.8.1 <i>Prolil Oligopeptidase</i> (POP).....	49
4.8.2 <i>Dipeptidil Peptidase IV</i> (DPP IV).....	50
4.9 ANÁLISES DE SOLOS.....	51
4.10 SECAGEM, EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS DE PLANTAS DAS FAMÍLIAS <i>Leguminoseae/Fabaceae</i> e <i>Sterculiaceae</i>	52
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	52

5.1 PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS DE <i>L. lanatus</i> , FOLHAS E SEMENTES DE <i>L. guaraniticus</i> e FOLHAS DE <i>L. paranensis</i>	53
5.1.1 Análise dos Rendimentos dos Extratos e Substâncias Puras Obtidos de <i>L. lanatus</i>	55
5.1.1.1 Análise das Frações e Subfrações Ácidas Obtidas.....	56
5.1.2 Protocolo de Extrações e Análise dos Rendimentos dos Extratos e Substâncias Puras Obtidos da Espécie <i>L. guaraniticus</i>	58
5.1.2.1 Metabólitos Obtidos da Fração Diclorometano Básica das Folhas da Espécie <i>L. guaraniticus</i>	61
5.1.2.2 Obtidos da Fração Diclorometano Básica das Sementes de <i>L. guaraniticus</i>	63
5.1.3 Análise dos Rendimentos dos Extratos e Substâncias Puras Obtidos da Espécie <i>L. paranensis</i>	66
5.1.3.2 Síntese de Derivados Estruturais Obtidos a Partir do Composto Isolado e Identificado como (+) Lanatina A (25).....	69
5.2 PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ALCALOÍDICOS DA CASCA DAS RAÍZES DA ESPÉCIE <i>W. douradinha</i> COLATADA EM DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.....	72
5.2.1 Obtenção dos Extratos Alcaloídicos de <i>W. douradinha</i> , <i>Sterculiaceae</i>	72
5.3 DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C UNI E BIDIMENSIONAIS DAS SUSTÂNCIAS ISOLADAS DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Lupinus</i> , <i>L. lanatus</i> , <i>L. guaraniticus</i> e <i>L. paranensis</i>	75
5.3.1 Obtenção do Flavonoide Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (52).....	75
5.3.1.1 Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (52).....	76
5.3.1.2 Análise dos Dados de RMN de ¹ H Unidimensional de Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (52), F11.....	76
5.3.1.3 Análise dos dados de RMN de ¹³ C unidimensionais de Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (52), F11.....	80
5.3.1.3 Dados de RMN de ¹³ C bidimensional, DEPT 135°, de Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (52), F11.....	85
5.3.2 Obtenção do alcaloide (+) Lupanina (1).....	86
5.3.2.1 Análise dos dados de RMN de ¹³ C unidimensional do alcaloide (+)Lupanina (1).....	87
5.3.3 Obtenção do alcaloide (+)13-α-hidroxilupanina (14).....	89

5.3.3.1	Análise dos dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide (+)13- α -hidroxilupanina (14).....	90
5.3.3.2	Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide (+)13- α -hidroxilupanina (14).....	92
5.3.3.3	Dados de RMN de ^{13}C bidimensional DEPT 135 $^\circ$ do alcaloide (+)13- α -hidroxilupanina (14).....	94
5.3.4	Obtenção do alcaloide (+)Lanatina A (25).....	96
5.3.4.1	Dados de RMN de ^1H (+)Lanatina A (25).....	97
5.3.4.2	Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide (+)Lanatina A (25).....	99
5.3.4.3	Alcaloide (+)Lanatina A (25), Espectrometria de Massas.....	101
5.3.5	Obtenção do alcaloide (+)13- α - <i>cis</i> -tigloiloxilupanina (19).....	102
5.3.5.1	Análise dos dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide (+)13- α - <i>cis</i> -tigloiloxilupanina (19).....	102
5.3.5	Obtenção do alcaloide 5,6-dehidrolupanina (54).....	107
5.3.5.1	Dados de RMN de ^1H do alcaloide 5,6-dehidrolupanina (54).....	107
5.3.5.2	Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide 5,6-dehidrolupanina (54).....	109
5.3.5.3	Dados de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135 $^\circ$, do alcaloide 5,6-dehidrolupanina (54).....	111
5.3.6	Obtenção dos alcaloides Anagirina (17) e 13- α -Hidroxianagirina (53).....	112
5.3.6.1	Dados de RMN de ^1H unidimensional dos alcaloides Anagirina (17) e 13- α -Hidroxianagirina (53).....	112
5.3.6.2	Dados de RMN - ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Anagirina (17).....	114
5.3.6.3	Dados de RMN de ^{13}C unidimensional dos alcaloides Anagirina (17) e 13- α -Hidroxianagirina (53).....	115
5.3.6.4	Dados de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135 $^\circ$, dos alcaloides Anagirina (17) e 13- α -Hidroxianagirina (53).....	117
5.3.7	Obtenção dos alcaloides 13- α -hidroxilupanina (14) e 13- α -hidroxisparteína (55) sintética a partir do composto (+)Lanatina A.....	120
5.3.7.1	Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide (+)Lanatina A (25).....	122
5.3.7.2	Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide (+)Lanatina A (25).....	123

5.3.7.3 Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide 13- α -hidroxilupanina sintética (14).....	124
5.3.7.4 Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide 13- α -hidroxilupanina sintética (14).....	125
5.3.7.5 Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135 $^\circ$, do alcaloide 13- α -hidroxilupanina sintética (14).....	126
5.3.8 Dados de RMN de ^1H ^{13}C Unidimensional e Bidimensional do Derivado 13-A-Hidroxisparteína Sintética (55), Obtida por Redução com LiAlH_4 a Partir do Composto 13- α -hidroxilupanina (14), sintética.....	127
5.3.8.1 Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide 13- α -hidroxisparteína sintética (55).....	129
5.3.8.2 Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide 13- α -hidroxisparteína sintética (55).....	130
5.3.9 Análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais dos Alcaloides Isolados e Identificados da espécie de <i>W. douradina</i> Sit. Hil.....	132
5.3.9.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do Alcaloide Waltheriona-A (43).....	132
5.3.9.2 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do Alcaloide Waltheriona-A (43).....	134
5.3.9.2.1 Dados de RMN de ^1H - ^1H bidimensional, COSY, do Alcaloide Waltheriona-A (43), expansão da região de deslocamento químico entre δ 6,20 a 7,80.....	135
5.3.9.3 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do Alcaloide Waltheriona-A (43).....	136
5.3.10 Dados de RMN de ^1H unidimensional do Alcaloide Waltheriona-B (44).....	139
5.3.10.1 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do Alcaloide Waltheriona-B (44).....	140
5.3.10.1.1 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do Alcaloide Waltheriona-B (44), expansão da região de deslocamento químico entre δ 2,0 a 8,5 ppm.....	142
5.3.10.2 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do Alcaloide Waltheriona-B (44).....	143
5.3.11 Obtenção e dados de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensional do alcaloide Antidesmona (56).....	145
5.3.11.1 Dados de RMN de ^1H e unidimensional do alcaloide Antidesmona (56).....	145
5.3.11.2 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do Alcaloide Antidesmona (56).....	146
5.3.12 Obtenção e dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57).....	148

5.3.12.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57).....	148
5.3.12.1.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57), expansão da região de deslocamento químico entre δ 6,10 a 7,60 ppm.....	150
5.3.12.1.2 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57), expansão da região de deslocamento químico entre δ 0,24 a 4,80 ppm.....	151
5.3.12.2 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide AdoutinaY' (57).....	152
5.3.12.2.1 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide AdoutinaY' (57), expansão entre 0,3 e 2,55 ppm.....	153
5.3.12.2.2 Dados de RMN de bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide AdoutinaY' (57), expansão entre 3,50 e 7,70 ppm.....	154
5.3.12.3 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57).....	155
5.3.13 Obtenção e dados de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensional e bidimensionais do alcaloide Waltherina-A (58).....	157
5.3.13.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (58).....	157
5.3.13.1.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (58), expansão da região de deslocamento químico entre δ 6,10 a 7,80 ppm.....	160
5.3.13.1.2 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (58), expansão da região de deslocamento químico entre δ 0,50 a 5,0 ppm.....	161
5.3.13.2 Dados de RMN de bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-A (58).....	162
5.3.13.3 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide Waltherina-A (58).....	163
5.3.14 Obtenção e dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais do alcaloide Waltherina-C (59).....	165
5.3.14.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-C (59).....	165
5.3.14.2 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-C (59).....	167
5.3.14.2.1 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-C (59), expansão – região entre δ 0,7 e 4,8 ppm.....	169
5.3.14.2.2 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-C (59), expansão – região entre δ 3,6 e 7,5 ppm.....	170
5.3.14.3 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide Waltherina-C (59).....	171

5.4 COMPARAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DE <i>W. Douradinha</i> Sit. Hil. COLETADA NAS CIDADES DE SÃO PEDRO DO SUL, CRUZ ALTA, PALMEIRA DAS MISSÕES E PASSO FUNDO OBTIDO EM HPLC.....	173
5.5. ANÁLISES DOS SOLOS COLETADOS NO LOCAL DE OBTENÇÃO DAS PLANTAS DA ESPÉCIE <i>W. douradinha</i>	180
5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES OBTIDOS DAS FOLHAS DA ESPÉCIE <i>L. lanatus</i>	181
5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Lupinus</i>	182
5.7.1 Atividade Antimicrobiana de Extratos e Frações Obtidas das Espécies do Gênero <i>Lupinus</i>	182
5.7.2 Atividades Antimicrobianas dos Extratos e Compostos Isolados de <i>W. douradinha</i>	194
5.8 ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS COMO (+)Lanatina A (25) E Antidesmona (56).....	199
5.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE A POP E DPP IV.....	207
5.10 ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE A Acetil-Colinesterase.....	208
6. CONCLUSÕES.....	207
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	211

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	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	Correlated Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
°C	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
PF ⁰	Ponto de fusão
s	Singleto
d	Dubleto
t	Tripleto
m	Multiplete
m/z	Relação massa/carga

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Núcleos dos alcaloides comumente encontrados no Gênero *Lupinus*: lupanina **(1)**, presente em todos os lupinos; multiflorina **(2)**, lupinos do velho mundo, e da América do Sul e lupinina **(3)**, espécies de lupinos do velho mundo e da América do norte.....2
- Figura 2.** Algumas flavanonas e isoflavonas preniladas já isolados de espécies de lupinos presentes no velho mundo.....3
- Figura 3.** Imagens das espécies de lupinos utilizadas na referida pesquisa, *Lupinus lanatus* Benth **(a)**⁹ *Lupinus guaraniticus* (Hassl.) C. P. Sm. **(b)**; *Lupinus paranensis* C. P. Sm. **(c)**.....4
- Figura 4.** Imagem da espécie *Waltheria douradinha* Saint Hilair¹⁴.....6
- Figura 5.** Estrutura química de alcaloides quinolizidínicos biologicamente ativos..... 13
- Figura 6.** Estruturas químicas de alcaloides quinolizidínicos isolados de espécies de *Lupinus*.....16
- Figura 7.** Esquema de prenilação de uma isoflavona comum **(D)** e de uma isoflavona substituída em C-3' **(E)** por um grupamento metila.....19
- Figura 8.** Estruturas químicas de alcaloides quinolizidínicos já isolados e identificados da espécie *L. lanatus*.....20
- Figura 9.** Método de Micro-diluição em Caldo para teste de CIM.....40
- Figura 10.** Mecanismo de ação de β -lactâmicos em razão da semelhança estrutural dos antimicrobianos, penicilinas e cefalosporinas, com o grupo terminal D-alanil-D-alanina do peptídeoglicano da parede celular bacteriana.....44
- Figura 11.** Mecanismo de inibição irreversível da *transpeptidase* pelas penicilinas e cefalosporinas: **(a)** ação enzimática da *transpeptidase*, catalisando a formação do polímero cruzado da parede bacteriana; **(b)** ataque nucleofílico do grupamento tiólico da

enzima ao carbono carbonílico do anel β -lactâmico das ampicilinas e cefalosporinas.....	45
Figura 12. Esquema de redução do DPPH via radical livre.....	48
Figura 13. Estrutura tridimensional da <i>Prolil Oligopeptidase</i> (POP) de origem suína....	50
Figura 14. Estrutura tridimensional da Dipeptidil Peptidase IV (DPP IV) à esquerda Prolil Oligopeptidase (POP) à direita.....	51
Figura 15. Esquema de fracionamento das folhas secas da espécie <i>L. lanatus</i>	54
Figura 16. Estrutura química proposta para Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (52).....	56
Figura 17. Esquema de fracionamento das folhas secas da espécie <i>L. guaraniticus</i> ...59	
Figura 18. Esquema de fracionamento das sementes secas da espécie <i>L. guaraniticus</i>	59
Figura 19. Estrutura química dos alcaloides, Anagirina (17), 13- α -hidroxianagirina (53) e 5,6-dehidrolupanina (54) isolados das folhas de <i>L. guaraniticus</i>	62
Figura 20. Estrutura química dos alcaloides (+)13- α -hidroxilupanina (14), Anagirina (17) Anagirina e 13- α -hidroxianagirina (53), e isolados das sementes de <i>L. guaraniticus</i>	64
Figura 21. Esquema de fracionamento das folhas secas da espécie <i>L. paranensis</i>	67
Figura 22. Estrutura química dos alcaloides (+)Lupanina (1), (+)13- α -hidroxilupanina (14), 13- α - <i>cis</i> -tigloiloxilupanina (19) e (+)Lanatina A (25), de <i>L. paranensis</i>	68
Figura 23. Esquemas de derivatização de (+)Lanatina A para obtenção composto 13- α -hidroxilupanina sintética (14) e 13- α -hidroxisparteína sintética (55).....	70
Figura 24. Esquema da distribuição das estruturas químicas dos compostos isolados e identificados em espécies do gênero <i>Lupinus</i>	71

- Figura 25.** Esquema de fracionamento das cascas das raízes secas da espécie *W. douradinha*.....74
- Figura 26.** Cromatografia em Camada Delgada do extrato alcaloídico da espécie *W. douradinha* – coleta São Pedro do Sul, sistema eluente (CHCl₃/MeOH, 98:2 v/v + 3 gotas de NH₄OH conc. para cada 10 ml da mistura).....74
- Figura 27.** Estrutura química do composto isolado e identificado como Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (**52**), Fl1, das folhas de *L. lanatus*.....75
- Figura 28.** Espectro de RMN de ¹H do flavonoide Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO-d₆ à 400,13 MHz e 25 °C.....77
- Figura 29.** Espectro de RMN de ¹H expandido (região de δ 6,2 a δ 8,2 ppm) do flavonoide Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO-d₆ à 400,13 MHz e 25 °C..... 78
- Figura 30.** Espectro de RMN de ¹H expandido (região de δ 3,0 a δ 5,0 ppm) do flavonoide Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO-d₆ à 400,13 MHz e 25 °C..... 79
- Figura 31.** Espectro de RMN de ¹³C do flavonoide Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO-d₆ à 100,62 MHz e 25 °C.....82
- Figura 32.** Espectro de RMN de ¹³C expandido (região de δ 55,0 a δ 182,1 ppm) do flavonoide Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO-d₆ à 100,62 MHz e 25 °C.....83
- Figura 33.** Espectro de RMN de ¹³C expandido (região de δ 55,0 a δ 82,0 ppm) do flavonoide Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO-d₆ à 100,62 MHz e 25 °C.....84
- Figura 34.** Espectro de RMN de ¹³C Bidimensional DEPT 135° do flavonoide Flavona 8-β-C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO-d₆ à 100,62 MHz e 25 °C.....85

- Figura 35.** Espectro de RMN de ^{13}C do alcaloide identificado como (+) Lupanina, obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$88
- Figura 36.** Espectro de RMN de ^1H do alcaloide identificado como (+)13- α -hidroxilupanina, obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$91
- Figura 37.** Espectro de RMN de ^{13}C do alcaloide identificado como (+)13- α -hidroxilupanina (**14**) obtido em CDCl_3 a 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$93
- Figura 38.** Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional DEPT 135 $^\circ$ do alcaloide (+)13- α -hidroxilupanina (**14**), obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$94
- Figura 39.** Espectro de RMN de ^1H do alcaloide identificado como (+)Lanatina A (**25**) obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$98
- Figura 40.** Espectro de RMN de ^1H expandido (região de δ 6,5 a δ 8,0 ppm) do alcaloide (+)Lanatina A (**25**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$99
- Figura 41.** Espectro de RMN de ^{13}C do composto identificado como (+)Lanatina A (**25**), obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$100
- Figura 42.** Espectro de massas ESIMS/CG/EM de (+)Lanatina A (**25**).....101
- Figura 43.** Posição da carbonila que caracteriza a diferença entre dois núcleos quinilizidínicos, (+)13- α -*cis*-tigloiloxilupanina (**19**) e (-)13- α -*cis*-tigloiloximultiflorina (**29**).....103
- Figura 44.** Espectro de RMN de ^{13}C do composto identificado como (+)13- α -*cis*-tigloiloxilupanina (**19**) obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$104
- Figura 45.** Espectro de RMN de ^{13}C expandido (região de δ 11,0 a δ 78,0 ppm) do composto identificado como (+)13- α -*cis*-tigloiloxilupanina (**19**) obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$105
- Figura 46.** Espectro de RMN de ^1H do composto 5,6-dehidrolupanina (**54**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$108

- Figura 47.** Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5,6-dehidrolupanina (**54**), obtido em CDCl_3 à 100,16 MHz e 25 $^\circ\text{C}$110
- Figura 48.** Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135 $^\circ$, do composto 5,6-dehidrolupanina (**54**), obtido em CDCl_3111
- Figura 49.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do composto Anagirina (**17**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$113
- Figura 50.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do composto 13- α -Hidroxianagirina (**53**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$114
- Figura 51.** Espectro de RMN de correlação, COSY ^1H - ^1H , do composto Anagirina (**17**) obtido em CDCl_3115
- Figura 52.** Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do composto Anagirina (**17**), obtido em CDCl_3 à 100,16 MHz e 25 $^\circ\text{C}$116
- Figura 53.** Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do composto 13- α -hidroxianagirina (**53**), obtido em CDCl_3 à 100,16 MHz e 25 $^\circ\text{C}$117
- Figura 54.** Espectro de RMN de ^{13}C , bidimensional, DEPT 135 $^\circ$, do composto Anagirina (**17**), obtido em CDCl_3118
- Figura 55.** Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135 $^\circ$, do composto 13- α -hidroxianagirina (**53**), obtido em CDCl_3119
- Figura 56.** Esquema de derivatização (hidrólise básica) do alcaloide (+)Lanatina A (**25**) para obtenção do composto 13- α -hidroxilupanina sintética (**14**).....121
- Figura 57.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do composto (+)Lanatina A (**25**) antes da reação de hidrólise com $\text{CH}_3\text{O}^-/\text{Na}^+$, obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$122
- Figura 58.** Espectro de RMN de ^{13}C do composto (+)Lanatina A (**25**) antes da reação de hidrólise com $\text{CH}_3\text{O}^-/\text{Na}^+$, obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$123

- Figura 59.** Espectro de RMN de ^1H do composto 13- α -hidroxilupanina (**14**), sintética, após a reação de hidrólise em $\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$, de (+)Lanatina A obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$124
- Figura 60.** Espectro de RMN de ^{13}C do composto 13- α -hidroxilupanina sintética (**14**) após a reação de hidrólise de (+) Lanatina A em $\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$, obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$125
- Figura 61.** Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135 $^\circ$, do composto 13- α -hidroxilupanina sintética (**14**), obtido em CDCl_3126
- Figura 62.** Esquema de redução de (C=O) da amida do composto (**14**) com LiAlH_4 para obtenção do composto 13- α -hidroxisparteína sintética (**55**).....127
- Figura 63.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do composto 13- α -hidroxisparteína (**55**) após redução de 13- α -hidroxilupanina sintética (**14**), com LiAlH_4 obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$129
- Figura 64.** Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do composto 13- α -hidroxisparteína (**55**) após redução de 13- α -hidroxilupanina sintética (**14**), com LiAlH_4 obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$. Em (**A**) expansão do espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do composto 13- α -hidroxisparteína sintética (**55**), região de deslocamento químico entre (δ 22,0 ppm e δ 78,0 ppm).....130
- Figura 65.** Espectro de RMN de ^{13}C , bidimensional, DEPT 135 $^\circ$, do composto 13- α -hidroxisparteína sintética (**55**) obtido em CDCl_3131
- Figura 66.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional de Walteriona-A (**43**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 $^\circ\text{C}$. Em (**a**) - Espectro de RMN de ^1H de Walteriona-A, expansão da região entre δ 6,20 à 7,80 ppm.....133
- Figura 67.** Espectro de RMN de correlação, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de Walteriona-A (**43**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 $^\circ\text{C}$135

- Figura 68.** Espectro de RMN de correlação, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de Walteriona-A (**43**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C, expansão da região entre δ 6,20 a 7,80 ppm, sistema aromático.....136
- Figura 69.** Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional de Walteriona-A (**43**), obtido em CDCl_3 à 100,32 MHz, 25 °C.....138
- Figura 70.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional de Walteriona-B (**44**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C.....140
- Figura 71.** Espectro de RMN de correlação, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$, de Walteriona-B (**44**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C.....141
- Figura 72.** Espectro de RMN de correlação, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$, de Walteriona-B (**44**), obtido em CDCl_3 em 400,13 MHz, 25 °C, expansão da região entre δ 2,0 a 8,5 ppm.....142
- Figura 73.** Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional de Walteriona-B (**44**), obtido em CDCl_3 à 100,32 MHz, 25 °C.....144
- Figura 74.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Antidesmona (**56**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C.....146
- Figura 75.** Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide Antidesmona (**56**), obtido em CDCl_3 à 100,32 MHz, 25 °C.....147
- Figura 76.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C.....149
- Figura 77.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, expansão entre δ 6,10 e 7,60 ppm.....150
- Figura 78.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, expansão entre δ 0,24 e 4,80 ppm.....151

- Figura 79.** Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C.....152
- Figura 80.** Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, expansão entre 0,3 e 2,55 ppm.....153
- Figura 81.** Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C expansão entre 3,50 e 7,70 ppm.....154
- Figura 82.** Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 100,32 MHz, 25 °C.....156
- Figura 83.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (**58**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 °C.....159
- Figura 84.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (**58**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 °C, expansão entre 6,10 e 7,80 ppm.....160
- Figura 85.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (**58**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 °C, expansão entre 0,50 e 5,0 ppm.....161
- Figura 86.** Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, do alcaloide Waltherina-A (**58**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C.....162
- Figura 87.** Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide Waltherina-A (**58**), obtido em CDCl_3 à 100,32 MHz, 25 °C.....164
- Figura 88.** Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-C (**59**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, **A** – expansão da região de deslocamento químico entre δ 6,20 - 10,0 ppm, **B** – expansão da região entre δ 0,60 - 5,0 ppm.....166

- Figura 89.** Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, do alcaloide Waltherina-C (**59**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C.....169
- Figura 90.** Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, do alcaloide Waltherina-C (**59**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, expansão da região entre δ 0,7 e 4,8 ppm.....170
- Figura 91.** Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, do alcaloide Waltherina-C (**59**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, expansão da região entre δ 3,6 e 7,5 ppm.....170
- Figura 92.** Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide Waltherina-C (**59**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 100,32 MHz, 25 °C.....172
- Figura 93.** Cromatogramas obtidos por HPLC do extrato de *W. doradinha* Sit. Hil. coleta - São Pedro do Sul, em $\lambda=220$ nm (**a**), 240 nm (**b**) e 260 nm (**c**).....174
- Figura 94.** Cromatogramas obtidos por HPLC do extrato de *W. doradinha* Sit. Hil. coleta – Cruz alta, em $\lambda=260$ nm (**a**), 280 nm (**b**) e 300 nm (**c**).....175
- Figura 95.** Cromatogramas obtidos por HPLC do extrato de *W. doradinha* Sit. Hil. coleta – Palmeira das Missões, em $\lambda=280$ nm (**a**), 300 nm (**b**) e 320 nm (**c**).....176
- Figura 96.** Cromatogramas obtidos por HPLC do extrato de *W. doradinha* Sit. Hil. coleta – Passo Fundo, em $\lambda=260$ nm (**a**), 280 nm (**b**), 300 nm (**c**) e 320 nm (**d**).....177
- Figura 97.** Cromatogramas obtidos por HPLC dos compostos isolados e identificados da espécie *W. doradinha* Sit. Hil., coleta – São Pedro do Sul, em $\lambda=320$ nm, Walteriona A (**a**), 320 nm, Walteriona B (**b**), 320 nm, Antidesmona (**c**), e 280 nm, Walterina A (**d**) e 320 nm, AdoutinaY' (**e**).....178
- Figura 98.** Co-injeção em HPLC das Walterionas A e B nos diferentes comprimentos de onda, $\lambda = 220$ nm (**a**), 240 nm (**b**), e 260 nm (**c**).....179

- Figura 99.** Potencial Antioxidante pelo método quantitativo do extrato metanólico e Frações Ácidas obtidas das folhas de *L. lanatus*.....182
- Figura 100.** Atividade Bacteriolítica de (+)Lanatina A **(25)** em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-positivo *Enterococcus spp.* ATCC 6589.....202
- Figura 101.** Atividade Bacteriolítica do controle lítico Ampicilina em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-positivo *Enterococcus spp.* ATCC 6589.....202
- Figura 102.** Atividade Bacteriolítica do controle não lítico Levofloxacina, em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-positivo *Enterococcus spp.* ATCC 6589.....203
- Figura 103.** Atividade Bacteriolítica de (+)Lanatina A em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-negativo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.....203
- Figura 104.** Atividade Bacteriolítica do controle lítico, Ampicilina, em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-negativo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.....204
- Figura 105.** Atividade Bacteriolítica de Antidesmona **(56)**, em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-negativo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.....205
- Figura 106.** Atividade Bacteriolítica de Antidesmona **(56)**, em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-positivo *Enterococcus spp.* ATCC 6589.....206

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Exemplos de atividades biológicas de alcaloides quinolizidínicos.....	12
TABELA 2. Sistemas de reagentes e solventes mais utilizados nos ensaios cromatográficos para separação e purificação de flavonoides da espécie <i>L. lanatus</i>	35
TABELA 3. Sistemas de reagentes e solventes mais utilizados nos ensaios cromatográficos de separação e purificação de alcaloides – gênero <i>Lupinus</i>	36
TABELA 4. Sistemas de reagentes e solventes mais utilizados nos ensaios cromatográficos de separação e purificação de alcaloides da espécie <i>W. douradinha</i>	37
TABELA 5. Lista de microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e Leveduras utilizados nas determinações de CIM e CLM.....	42
TABELA 6. Rendimento das frações obtidas do extrato bruto das folhas de <i>L. lanatus</i>	55
TABELA 7. Frações reunidas após comparação por CCD da fração acetato ácida de <i>L. lanatus</i>	57
TABELA 8. Rendimento das frações obtidas do extrato bruto das folhas de <i>L. guaraniticus</i>	60
TABELA 9. Rendimento das frações obtidas do extrato bruto das sementes de <i>L. guaraniticus</i>	61
TABELA 10. Frações reunidas após comparação por CCD da fração diclorometano básica das folhas de <i>L. guaraniticus</i>	63
TABELA 11. Subfrações reunidas após comparação por CCD da fração diclorometano básica das sementes de <i>L. guaraniticus</i>	65

TABELA 12. Rendimento das frações obtidas do extrato bruto das folhas de <i>L. paranensis</i>	66
TABELA 13. Frações reunidas após comparação por CCD da fração diclorometano básica das folhas de <i>L. paranensis</i>	69
TABELA 14. Dados dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 obtidos experimentalmente para a substância identificada como Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (52) em comparação com a literatura.....	80
TABELA 15. Dados dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 obtidos experimentalmente para a substância identificada como Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (52) em comparação com a literatura.....	81
TABELA 16. Dados dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C em CD_3Cl obtidos experimentalmente para a substância identificada (+)Lupanina (1) em comparação com a literatura.....	82
TABELA 17. Dados dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C em CD_3Cl obtidos experimentalmente para as substâncias identificadas como (+)13- α -hidroxilupanina (14) e (+)Lupanina (1) em comparação com dados da literatura.....	95
TABELA 18. Comparação dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 obtidos experimentalmente para as substâncias identificadas como (+)13- α -hidroxilupanina (14), (-)13- α - <i>cis</i> -tigloiloximultiflorina (29) e (+)13- α - <i>cis</i> -tigloiloxilupanina (19).....	106
TABELA 19. Níveis de alguns componentes do solo (método Mehilic para P e K) para efeito da interpretação resultados de análise química do solo, para cultura do soja.....	180
Tabela 20. Relação entre os níveis de alguns componentes inorgânicos presentes nos solos dos locais de coleta das plantas da espécie <i>W. douradinha</i> para efeitos comparativos.....	180

TABELA 21. Atividade antimicrobiana de extratos e frações obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	185
TABELA 22. Atividade antimicrobiana de extratos e frações obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	186
TABELA 23. Atividade antimicrobiana de extratos e frações obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	187
TABELA 24. Atividade antimicrobiana de extratos e frações obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	188
TABELA 25. Atividade antimicrobiana de extratos e frações obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	189
TABELA 26. Atividade antimicrobiana das substâncias puras e derivados sintéticos obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	190
TABELA 27. Atividade antimicrobiana de substâncias puras e derivados sintéticos obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	191
TABELA 28. Atividade antimicrobiana de substâncias puras e derivados sintéticos obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	191
TABELA 29. Atividade antimicrobiana de substâncias puras e derivados sintéticos obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	192
TABELA 30. Atividade antimicrobiana de substâncias puras e derivados sintéticos obtidos de três espécies do gênero <i>Lupinus</i> em $\mu\text{g/ml}$	193
TABELA 31. Atividade antimicrobiana de extratos básicos e substâncias isoladas da espécie <i>W. douradinha</i> em $\mu\text{g/ml}$	195
TABELA 32. Atividade antimicrobiana de extratos básicos e substâncias isoladas da espécie <i>W. douradinha</i> em $\mu\text{g/ml}$	196

TABELA 33. Atividade antimicrobiana de extratos básicos e substâncias isoladas da espécie <i>W. douradinha</i> em µg/ml.....	197
TABELA 34. Atividade antimicrobiana de extratos básicos e substâncias isoladas da espécie <i>W. douradinha</i> em µg/ml.....	198
TABELA 35. Atividade antimicrobiana de extratos básicos substâncias isoladas da espécie <i>W. douradinha</i> em µg/ml.....	199
TABELA 36. Atividade enzimática de extratos, frações e substâncias puras de espécies do gênero <i>Lupinus</i>	207

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Proposta de biossíntese para os alcaloides quinolizidínicos.....15
- Esquema 2.** Proposta para rota biossintética de isoflavonoides complexos do gênero *Lupinus*. Em **A**, formação do núcleo pirano; **B**, formação do núcleo furano; e **C**, cadeia dimetilalila oxigenada; (**R = OH ou H**).....18
- Esquema 3 -** Fragmentação de alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros.....29

1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais com propriedades medicinais são utilizados desde o início da civilização humana, sendo os derivados de origem vegetal, animal e mineral, os principais constituintes de suas bases terapêuticas.¹ Dados atuais sugerem que os fármacos que utilizam substâncias oriundas de plantas representam aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos mundialmente.^{1,2} De todas as substâncias prescritas em países desenvolvidos, 80% são produtos naturais, 50% sintéticos, cujos protótipos têm origem nos princípios isolados de plantas medicinais, e dos 252 fármacos considerados como essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal.^{1,2}

Com a maior biodiversidade do mundo, o Brasil desponta como um país promissor no avanço e descoberta de novos fármacos de origem vegetal com utilidade clínica.^{1,2} Alguns números estimam entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas distribuídas pela extensão territorial do país. Desse total, apenas 55.000 espécies foram catalogadas e destas, somente 8% estudadas na busca de compostos bioativos.^{1,2} Destes 8%, aproximadamente 1.100 foram avaliadas em suas propriedades farmacológicas.^{1,2,3}

Estes dados tornam-se relevantes quando se demonstra a importância das plantas medicinais no tratamento e na prevenção dos mais variados tipos de doenças, e também serve de estímulo para os estudos com espécies, as quais, o conhecimento popular de seus benefícios para a saúde humana, incentivam novas pesquisas científicas.^{1,2,3} Em vista disso, o grupo de pesquisas coordenado pelo professor Ademir Farias Morel, desde 1985 estuda espécies brasileiras com propriedades farmacológicas, em especial, as nativas do Rio Grande do Sul. Dentre as famílias em estudo pelo grupo, destacam-se duas: a *Leguminosae* ou *Fabaceae* e a *Sterculiaceae*. Da primeira família, podemos ressaltar o gênero *Lupinus*, um grupo de plantas presentes no Rio Grande do Sul e pouco estudado em seus constituintes secundários. 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 lupinos são encontradas em solos pobres como os serrados e campos rupestres de cima da serra.⁵

Das treze espécies presentes no estado, três delas tornam-se importantes no estudo de seus constituintes secundários, *L. paranensis*, *L. guaraniticus* e *L. lanatus*, esta última já previamente estudada em sua constituição alcaloídica pelo grupo do professor Morel. Essas três espécies de lupinos são pertencentes à família *Leguminosae* ou *Fabaceae* e subfamília *Faboideae*.^{5,6,7} Dentro do gênero *Lupinus*, os alcaloides quinolizidínicos e os flavonoides da classe das flavanonas e isoflavanos com cadeias laterais preniladas, 3,3-dimetilalila, perfazem boa parte da constituição química secundária da planta, juntamente com terpenos e outros compostos.^{8,9} O interesse pelo isolamento e identificação dessas duas classes de metabólitos secundários presentes no gênero, se dá pelo grande significado quimiosistemático que eles desempenham para o mesmo. Também, as atividades farmacológicas potencialmente úteis e toxicológicas, por ingestão associadas aos lupinos justificam o estudo das espécies acima relatadas.^{8,9}

Os alcaloides deste gênero possuem o núcleo quinolizidínico, norlupinano derivado do aminoácido L-lisina. Dentre eles estão a lupanina **(1)**, a multiflorina **(2)** e a lupinina **(3)** como compostos majoritários, Figura 1.⁹ As principais atividades biológicas referentes a esses compostos são: Atividade Uterotônica, estimulante/depressora respiratória, anti-arrítmica, diurética, hipoglicemiante, depressora do SNC, teratogênica e alucinógena.^{9,10}

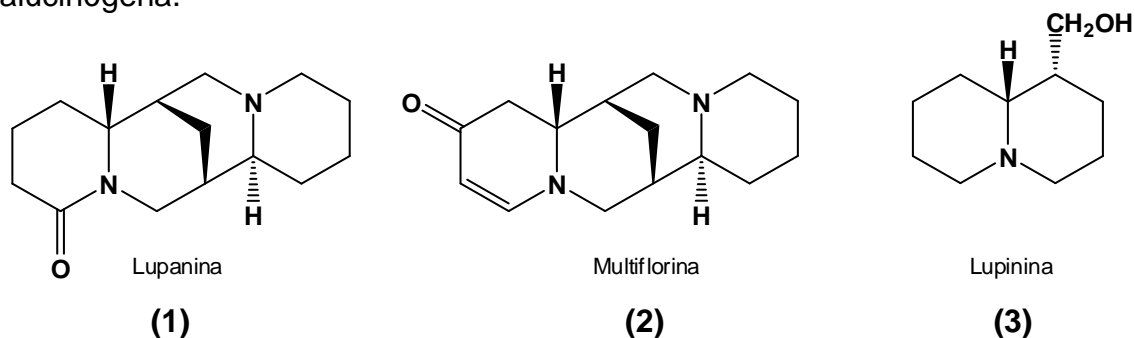
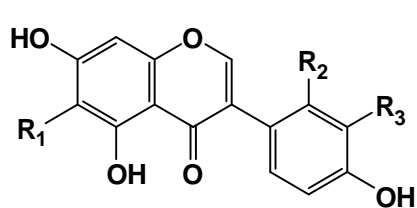


Figura 1. Núcleos dos alcaloides comumente encontrados no Gênero *Lupinus*: lupanina **(1)**, presente em todos os lupinos; multiflorina **(2)**, lupinos do velho mundo, e da

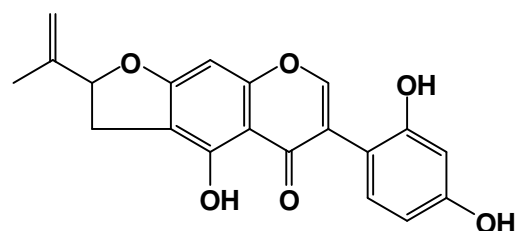
América do Sul e lupinina **(3)**, espécies de lupinos do velho mundo e da América do Norte. (Fonte: adaptado de FILHO, 2004)⁹

Os flavonoides presentes no gênero *Lupinus*, apresentam atividade antimicrobiana e estão relacionadas com o sistema de defesa desse vegetal. Os derivados desses compostos podem apresentar o grupo prenila ciclizado ou oxigenado em sua estrutura, Figura 2.^{9,10,11}

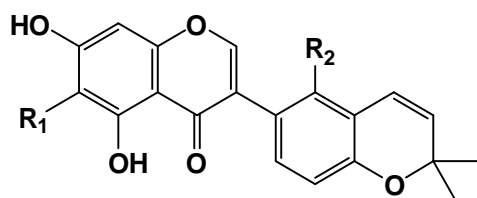


(4) $R_1 = \text{CH}_2\text{CHC}(\text{CH}_3)_2$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{H}$; Luteona

(5) $R_1 = R_3 = \text{CH}_2\text{CHC}(\text{CH}_3)_2$; $R_2 = \text{OH}$; 2'-hidroxilupalbigenina



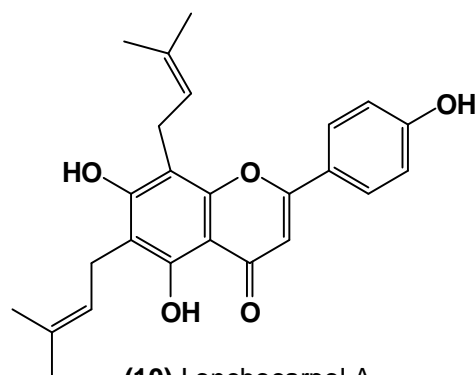
(6) Lupinisoflavona A



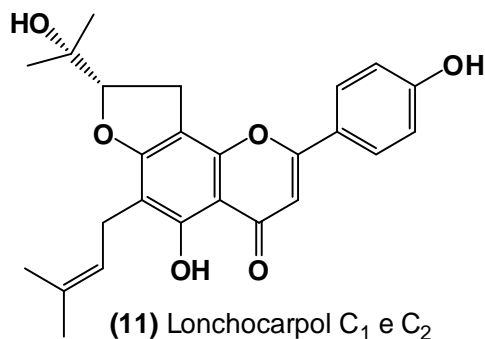
(7) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{H}$; Licoisoflavona B

(8) $R_1 = \text{CH}_2\text{CHC}(\text{CH}_3)_2$; $R_2 = \text{OH}$; Angustona B

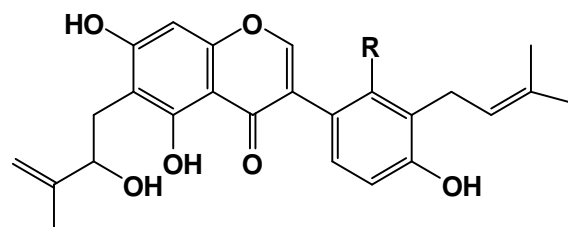
(9) $R_1 = R_2 = \text{H}$; Isoderrona



(10) Lonchocarpol A



(11) Lonchocarpol C₁ e C₂



(12) $R = \text{H}$; Lupinisol A

(13) $R = \text{OH}$; Lupinisol B

Figura 2. Algumas flavanonas e isoflavonas preniladas já isolados de espécies de lupinos presentes no velho mundo. (Fonte: adaptado de FILHO, 2004)⁹

A literatura apresenta pouco ou nenhum registros de pesquisas com as espécies do gênero *Lupinus* relacionadas na figura 3. Assim, tendo em vista o potencial dos compostos secundários isolados de plantas deste gênero, como agentes antidiabético, antitumoral e antimicrobiano, justifica-se o interesse em estudar as espécies *Lupinus lanatus* Benth, *Lupinus guaraniticus* (Hassl.) C. P. Sm. e *Lupinus paranensis* C. P. Sm. em sua constituição secundária para avaliar algumas atividades biológicas relacionadas, e por estas possuírem altas concentrações de metabólitos como flavonoides e alcaloides.^{9,10,11,12,13}

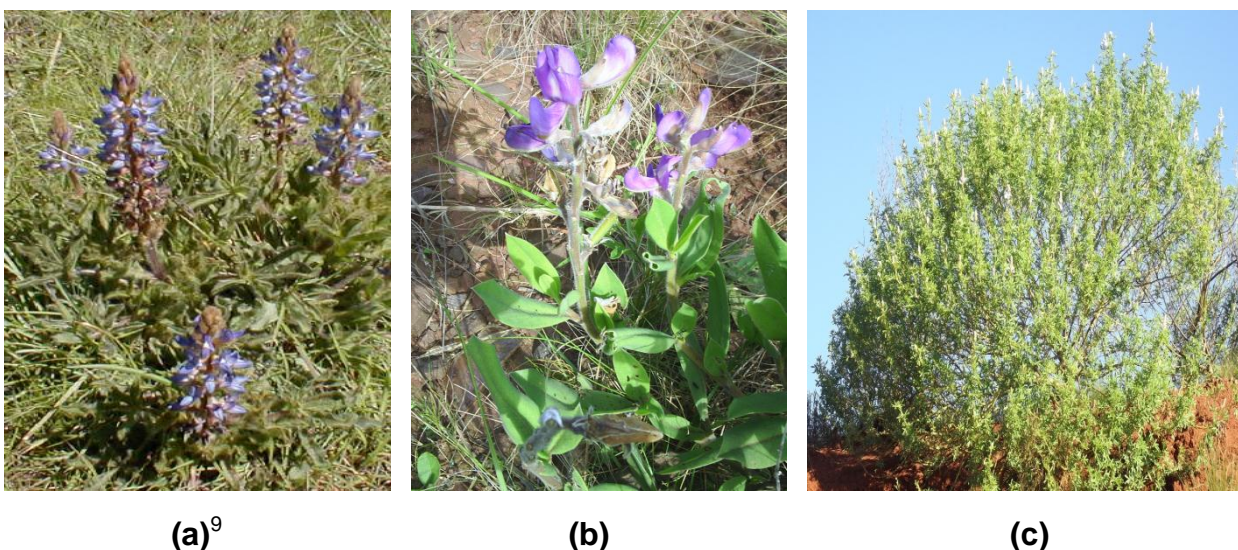


Figura 3. Imagens das espécies de lupinos utilizadas na referida pesquisa. *Lupinus lanatus* Benth **(a)**⁹ (Fonte: FILHO, 2004)⁹; *Lupinus guaraniticus* (Hassl.) C. P. Sm. **(b)**; *Lupinus paranensis* C. P. Sm. **(c)**.

Outra família de interesse para estudo neste trabalho é a *Sterculiaceae*. Esta família compreende aproximadamente 68 gêneros e 1100 espécies.^{14,15} No Brasil, há relatos da ocorrência de 11 gêneros e 115 espécies.^{14,15,16}

A espécie *Waltheria douradinha* Saint Hilaire, também conhecida como douradinha-do-campo, ou, simplesmente douradinha, ocorre em terrenos pedregosos e arenosos. Esta é nativa na Argentina, Paraguai e Brasil.^{14,15,16} No Brasil, a douradinha abrange uma ampla faixa territorial sendo encontrada de Minas Gerais até o Rio

Grande do Sul.^{16,17} Esta espécie apresenta-se como subarbusto perene de 20-50 cm de altura, sua raiz é bem desenvolvida, rugosa e estende-se profundamente no solo. Seus ramos são eretos ou decumbentes com folhas simples e com nervuras sulcadas em sua face superior. As inflorescências apresentam forma de glomérulos pubescentes e densos predominantemente terminais de cor amarelo ouro.^{14,15,16,17}

Existem outras espécies do gênero *Waltheria* distribuídos pelo mundo e também no Brasil. A espécie *Waltheria Inca* é encontrada principalmente nas Filipinas e é utilizada popularmente como febrífuga, emoliente, anti-rábica, anti-sifilítica e purgativa.¹⁸ Investigações fitoquímicas demonstraram a produção de alcaloides peptídicos, flavonoides glicosilados e ácido cafeeico. Aos flavonoides são atribuídas propriedades antifúngicas.^{18,19}

No Brasil também é encontrada outras espécies de *Waltheria* como a *W. communis* (Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais e Rio Grande do Sul) e a espécie *W. viscosíssima* (nordeste brasileiro).^{14,20} A primeira espécie apresenta atividades estimulante, antidesentérica, emética, diurética, a anti-inflamatória.²⁰ A segunda é indicada popularmente como expectorante, antitussígena e hipertensiva. Estudos fitoquímicos desta última demonstraram a presença de triterpenos esteróidais, compostos fenólicos e saponinas, e ausência de alcaloides.^{19,20}

A *Waltheria douradinha* é empregada na medicina popular principalmente como estimulante, emética, sulforítica e diurética, além de ser indicada contra: disenteria, catarro brônquico, afecções pulmonares e cistites. A tintura das cascas das raízes é utilizada como tônico cardíaco, as cascas dos ramos e folhas possuem atividades diuréticas e hipotensoras.^{14,19,20,21}

Na literatura há poucos registros de estudos com a espécie *Waltheria douradinha* St. Hil., Figura 4 (pág. 6).¹⁴ Sob essa perspectiva, o Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, da UFSM, na coordenação do professor Ademir Farias Morel, vem estudando essa espécie na busca de compostos bioativos.



Figura 4. Imagem da espécie *Waltheria douradinha* Saint Hilaire.

(Fonte: HOELZEL, 2001)¹⁴

A planta foi coletada em regiões diferentes do estado para avaliar se, diferentes tipos de solo e climas regionais afetam a composição secundária, mais especificamente, de alcaloides, compostos de interesse do estudo. As espécies do gênero *Lupinus* relacionadas anteriormente foram estudadas em sua composição alcaloídica e flavonoídica. Também foram avaliados os potenciais de atividades biológicas para as estruturas isoladas dessas duas famílias, *Fabaceae* e *Sterculiaceae*, bem como dos extratos e frações de interesse. O estudo foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Maria que proporcionou total apoio à pesquisa sob a orientação do professor Dr. Ademir Farias Morel e co-orientação da professora Dra. Ionara I. Dalcol.

2. OBJETIVOS

A investigação química e biológica de *Lupinus lanatus* Benth, *Lupinus guaraniticus* (Hassl.) C. P. Sm., *Lupinus paranensis* C. P. Sm. (*Fabaceae*) e *Waltheria douradinha* Saint Hilaire (*Sterculiaceae*), tem como principais objetivos:

- a) Isolar e identificar os metabólitos de características básicas presentes nas partes aéreas de *L. guaraniticus* e *L. paranensis*, tendo como foco principal os alcaloides quinolizidínicos, a partir das frações básicas obtidas dos extratos metanólicos das espécies.
- b) Isolar e identificar os compostos secundários pertencentes à classe dos flavonoides, também presentes em altas concentrações nas frações ácidas obtidas do extrato metanólico da espécie de *L. lanatus*.
- c) Isolar e identificar os alcaloides da fração básica do extrato bruto obtido da casca das raízes de *Waltheria douradinha* Saint Hilaire coletada em quatro regiões do estado do Rio Grande do Sul.
- d) Avaliar a composição química dos extratos básicos obtidos do extrato bruto das cascas das raízes de *Waltheria douradinha* Saint Hilaire por HPLC comparando com as características do solo das regiões em que as plantas foram coletadas.
- e) Elucidar estruturalmente os compostos isolados das espécies relacionadas utilizando métodos comparativos e a aplicação de técnicas de RMN, unidimensionais, ^1H , ^{13}C , e bidimensionais como DEPT 135⁰, NOESY, COSY, HMQC, HMBC, e Espectrometria de Massas.
- f) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos, frações e substâncias químicas isoladas e identificadas de sementes e folhas das espécies de lupinos e cascas das raízes de *W. douradinha* St. Hil. pela metodologia de Micro-diluição em Caldo (CIM/CLM).
- g) Determinar a presença de atividade bacteriolítica para os compostos que apresentarem resultados promissores para as atividades antimicrobianas.

- h) Avaliar a atividade antioxidante utilizando a técnica de DPPH e potencial inibitório das enzimas *POP*, *DPP IV* e *Acetil-colinesterase* dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas das partes aéreas, sementes e folhas dos lupinos e da casca das raízes de *W. douradinha* St. Hil..

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FAMÍLIA *Fabaceae* ou *Leguminosae*

A família *Leguminosae* 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.^{3,9,22} 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. Economicamente, também fica em segundo lugar perdendo somente para a *Gramineae*, e em tamanho ocupa o terceiro lugar atrás apenas de *Orquidaceae* e *Asteraceae*. Compreende 18.000 espécies e 650 gêneros de plantas distribuídas por todas as partes do mundo. Pode estar em grande número nas regiões tropicais e subtropicais, sendo o Brasil, portador de 196 gêneros distribuídos por todas as regiões.^{9,23}

A família *Fabaceae* apresenta-se dividida em três subfamílias bem distintas. *Caesalpinioideae*, contendo 152 gêneros e cerca de 2.800 espécies, distribuídas por regiões tropicais e subtropicais do globo, *Mimosoideae*, que compreende aproximadamente 60 gêneros e 2.800 espécies presentes em regiões tropicais, subtropicais e cálido-temperadas e, por fim, a subfamília *Papilionoideae* ou *Faboideae*, a maior de todas, possuindo em torno de 482 gêneros e mais de 12.000 espécies divididas em 32 tribos, estando representada pelas herbáceas, nas regiões temperadas e pelas espécies lenhosas em regiões tropicais do planeta terra.^{9,24}

Fazendo parte da subfamília *Caesalpinioideae*, oito gêneros 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*.^{9,24} A não formação de nódulos está relacionada a uma característica primitiva de todas as subfamílias da *Leguminosae*.^{3,9,24} A grande importância da 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 planeta. 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.^{3,9,24}

3.1.1 Gênero *Lupinus*

O gênero *Lupinus* pertence a família *Leguminosae* e subfamília *Faboideae*. As plantas desse gênero são ervas ou arbustos que podem ser anuais ou perenes. Elas estão presentes em grande número, principalmente no oeste da América do Norte, Alasca, México, Peru, Brasil, Uruguai e Argentina. Assim, o gênero *Lupinus* cobre uma ampla zona climática ao redor do globo, de regiões subárticas, como o Alasca, até regiões de clima tropical, subtropical e temperado, Brasil e Sul da Argentina respectivamente.^{4,5,9,25}

As espécies de lupinos encontradas no Brasil estão presentes em solos pobres como os serrados e campos rupestres.^{5,9,25} 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.^{9,25} Seu nome, *Lupinus*, vem do latim, *Lupus* (lobo), pela grande capacidade de adaptação em todos os tipos de ambientes sendo necessário, para isso, somente uma leve camada de solo.^{4,9,23,24,25,26} Os lupinos do velho mundo foram separados em dois grupos distintos baseando-se no tipo de revestimento de suas sementes, rugoso ou liso, denominando assim os grupos de *rough-seed* e *smooth-seed*, respectivamente.^{4,9,26} Essa divisão deu origem aos lupinos Americanos. Estes ainda podem ser divididos em outros dois grupos, os de folhas compostas ou multifoliados e os de folhas simples ou unifoliados.^{4,9,27}

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”.^{9,28,29,30}

3.1.2 Uso Popular do Gênero *Lupinus*

Os lupinos são utilizados mundialmente de diversas formas. No continente Americano, as sementes de *L. mutabilis* são largamente empregadas na alimentação da população andina e comumente denominadas de *Tarwi* ou *chocho* por esse povo.^{4,9,31} No Brasil as sementes de *L. angustifolius* foram utilizadas na falsificação do café. Já no continente Europeu, os *L. hirsutus* e *angustifolius* são aproveitados na medicina popular como agentes antidiabéticos, devido suas propriedades hipoglicemiantes.^{9,32} Por fim, estas plantas também são usadas 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 possuírem um alto valor protéico e conterem uma baixa concentração de alcaloides, que conferem um sabor amargo à planta.^{9,31,32,33,34}

3.1.3 Alcaloides Quinolizidínicos Presentes em Espécies do Gênero *Lupinus*

O gênero *Lupinus* possui em sua constituição secundária alcaloides do tipo quinolizidínicos com núcleo (norlupinano).^{9,35} Estes compostos nitrogenados são constituídos de dois anéis saturados de seis membros divididos por um átomo de nitrogênio, e são derivados do aminoácido L-lisina. São denominados de alcaloides lupínicos devido sua larga ocorrência em plantas deste gênero.^{9,35,36} Essa classe de substâncias secundárias representa, para os lupinos, um importante papel quimiotaxonômico, pois estão presentes em todas as 56 espécies do gênero já estudadas em sua constituição secundária.^{9,35,36,37,38} Este estudo também determinou a

presença de núcleos tetracíclicos em quase todas as espécies analisadas.^{9,35,36,37,38} 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 América do Sul. Os alcaloides 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 alcaloides do tipo biperidínicos como amonedrina e seus derivados, os quais, são encontrados em espécies da América do Norte.^{9,38,39,40,41,42}

A importância desses alcaloides, Figura 5 (pág. 13), também está relacionada com sua atividade tóxica para animais e humanos, além de algumas atividades biológicas potencialmente úteis descritas na Tabela 1.^{10,12,25,43}

TABELA 1. Exemplos de atividades biológicas de alcaloides quinolizidínicos.⁴³

ALCALOIDES	ATIVIDADES	REFERÊNCIAS
Esparteína	Ulcerotônica, Estimulante / Depressora Respiratória, Anti- arrítmica, Diurética e Hipoglicemiante	10, 12, 43
Lupanina	Anti-arrítmica, Hipotensora e Hipoglicemiante	10, 43
13-α-hidroxilupanina	Anti-arrítmica, Hipotensora	10, 43
Multiflorina	Depressora do SNC	10, 43
Anagirina	Teratogênica	10, 43
Cistisina	Teratogênica, Alucinógena e Estimulante Respiratório	10, 43

(Fonte: adaptado de FIGUEIREDO, 2009)⁴³

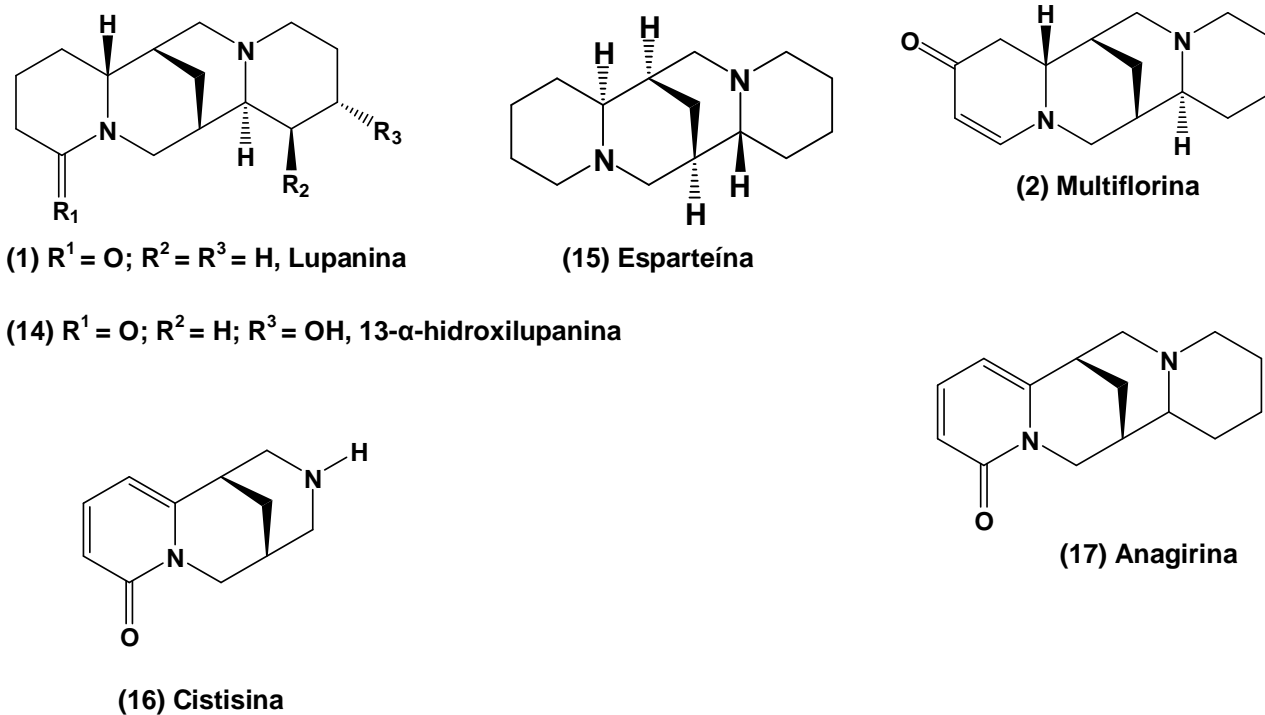


Figura 5. Estrutura química de alcaloides quinolizidínicos biologicamente ativos.

(Fonte: adaptado de FIGUEIREDO, 2009)⁴³

3.1.4 Biossíntese dos Alcaloides Quinolizidínicos

Os alcaloides quinolizidínicos são biossintetizados a partir da ciclização da cadaverina.⁴⁴ Esta, é oriunda da descarboxilação enzimática do aminoácido L-lisina, pela *cadaverina-lisina-descarboxilase* (LDC) no interior dos cloroplastos das células vegetais.^{44,45} Após alguns passos reacionais, cujo, mecanismo ainda não foi totalmente elucidado, a cadaverina é convertida em um intermediário amino-cátion tetracíclico, que originará os dois núcleos básicos precursores de muitos dos alcaloides 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 alcaloides quinolizidínicos.^{45,46,47}

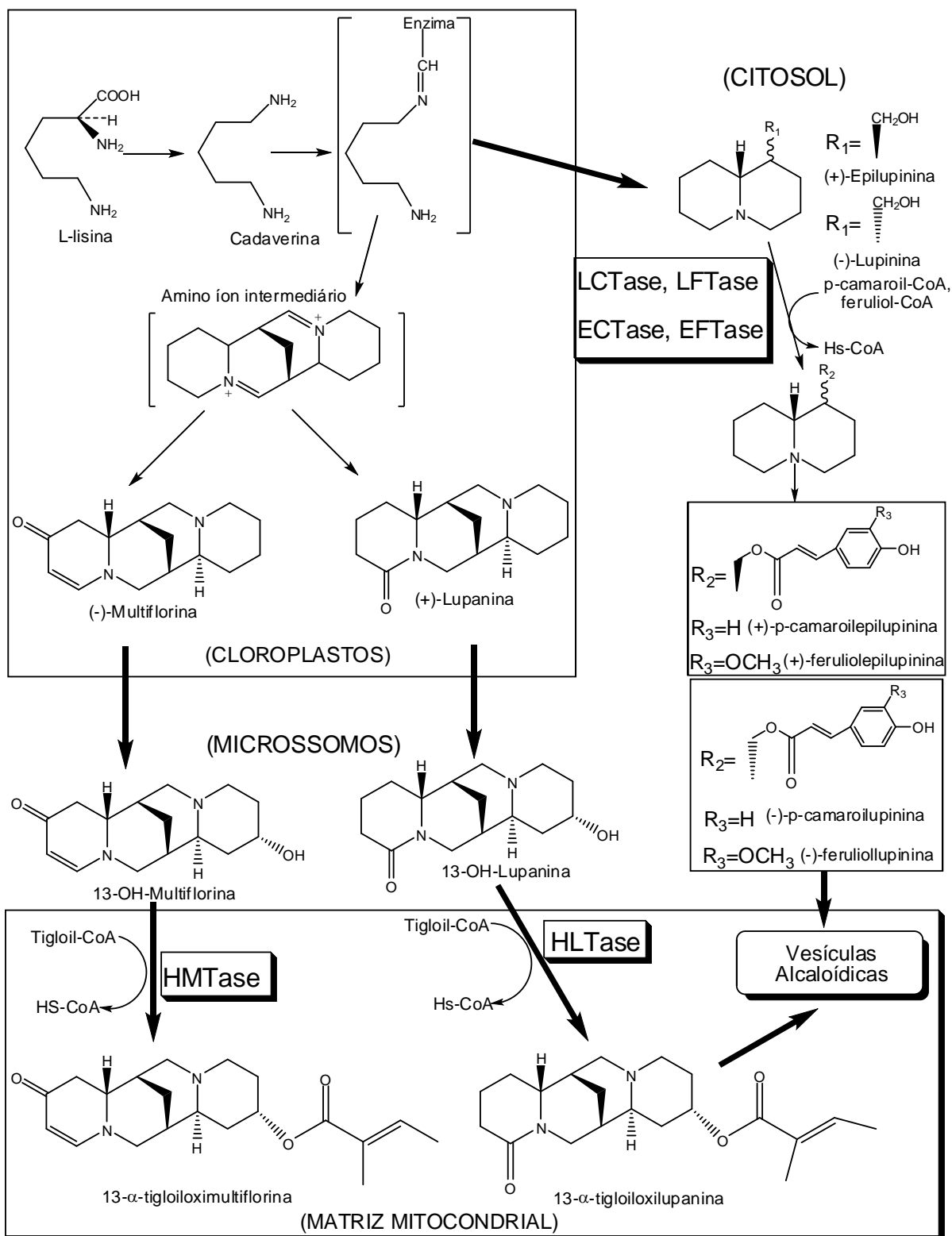
Os núcleos básicos (-)multiflorina e (+)lupanina são transportados até os microsossomos da célula vegetal onde sofrem uma reação de hidroxilação em C-13 catalisada por enzima, formando a (-)13- α -hidroximultiflorina e a (+)13- α -hidroxilupanina.^{46,47} Depois de formadas, essas estruturas são novamente carregadas, 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.^{44,45,46,47} Os grupamentos ligados a Acil-CoA podem variar de acordo com a espécie de lupinos.^{44, 45,46,47}

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 a reação é intermediada pela enzima HLTase/O-tigloil-CoA, originando a (+)13- α -tigloiloxilupanina em espécies de lupinos como *Lupinus albus*.^{45,46,47,48}

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*.⁴⁸

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 alcaloides, os quinolizidínicos.^{46,47,48,49}

Após a biossíntese, os alcaloides formados são transportados para as vesículas alcaloídicas e ficam armazenados até o momento em que a planta necessite de sua utilização.^{44,45,46,47,48,49} O Esquema 1, (pág. 15) apresenta a rota biossintética proposta para os alcaloides quinolizidínicos.



Esquema 1. Proposta de biossíntese para os alcaloides quinolizidínicos.^{44,45,46,47,48,49}

A Figura 6 lista algumas estruturas de alcaloides já isolados e identificados de espécies de lupinos.^{38,50,51,52,53,54,55,56,57,58}

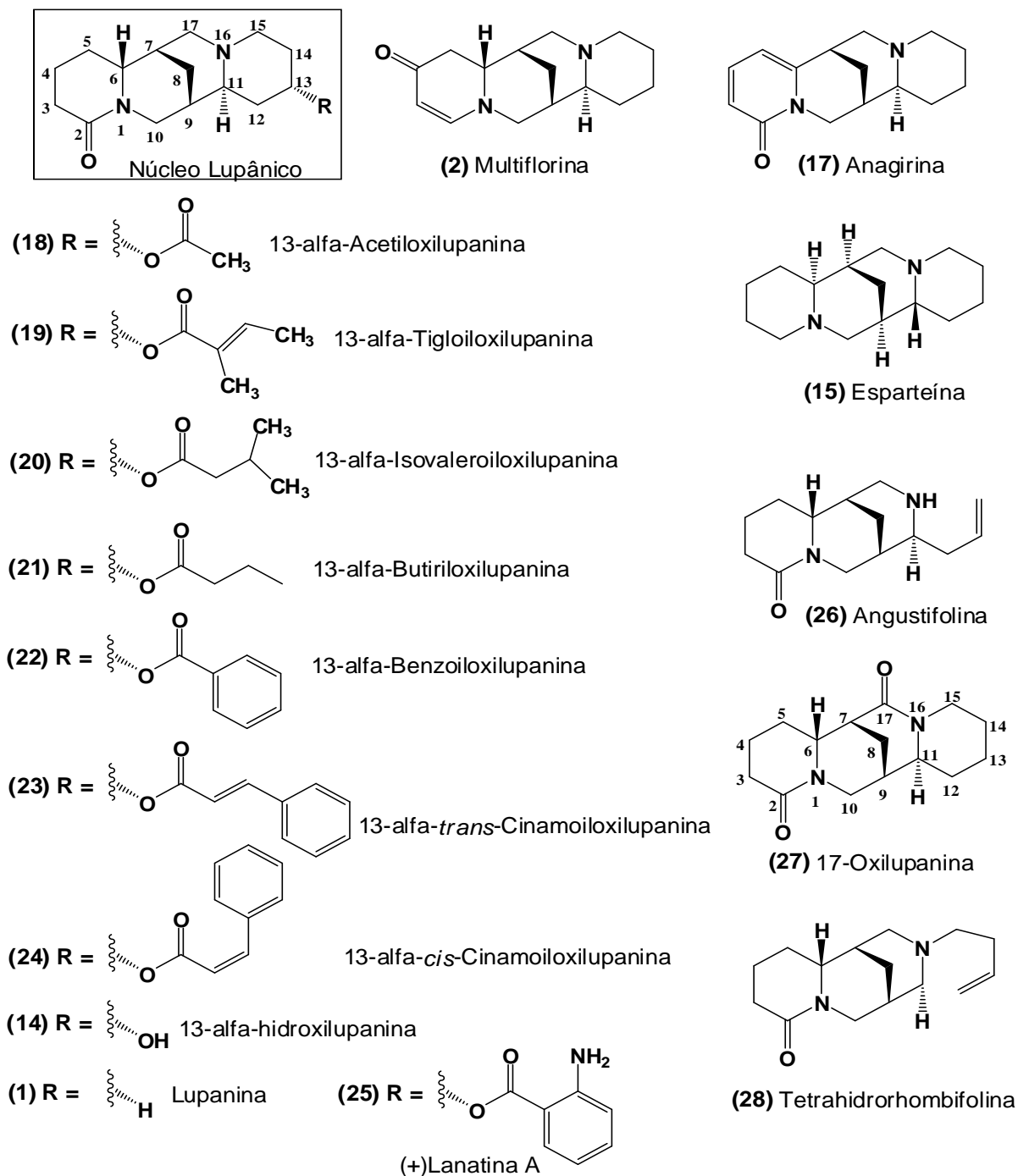


Figura 6. Estruturas químicas de alcaloides quinolizidínicos isolados de espécies de *Lupinus*.

3.1.5 Flavonoides Presentes em Espécies do Gênero *Lupinus*

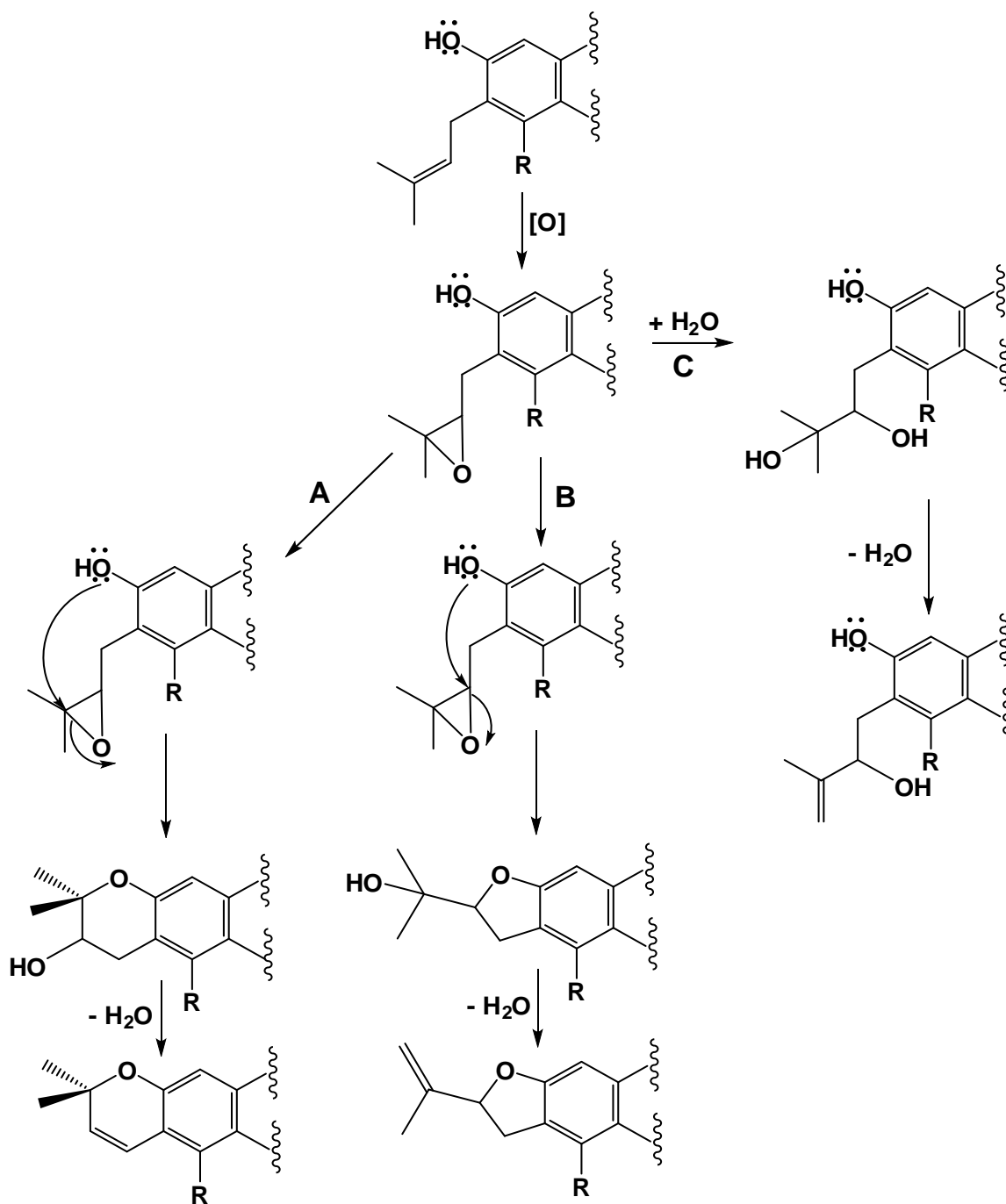
Outra classe de compostos secundários comumente encontrados no gênero *Lupinus*, são os flavonoides do tipo flavanonas e isoflavonas.^{8,9,59} Estas apresentam cadeias laterais preniladas do tipo, 3,3-dimetilalila, onde seus derivados prenilados podem ser cíclicos ou oxigenados, Figura 2 (pág. 3).^{8,9,59}

Isoflavonoides com cadeia lateral derivada de grupamentos prenila ou geranila são ditos flavonoides complexos. Isso ocorre porque as enzimas que os sintetizam, *isoflavona sintase*, *prenila* e *geranila transferases*, são de distribuição restrita. Sendo assim, apenas um pequeno número de plantas conseguem sintetizar esse tipo de isoflavonoides.^{8,9,59} O Esquema 2 (pág. 18), apresenta a provável rota biossintética desse tipo de cadeia lateral.^{9,60}

De todos os isoflavonoides complexos conhecidos, estes estão presentes em 56% das espécies pertencentes à família *Leguminosae* e 17% desses compostos estão em famílias de não-*Leguminosae*.^{9,59,60}

Estudos com *Lupinus albus* apontam que a prenilação seja possível somente após a estrutura do isoflavonoide estar parcialmente ou totalmente formada, e que, para cada posição, 6, 8 e 3', exista uma *preniltransferase* específica.^{9,60,61} A presença de grupamentos metila na posição 4' impedem a prenilação da posição 3' por impedimento estérico, devido o substituinte metila ser volumoso. Também há a proposta da *preniltransferase* ser mais específica para isoflavonas do que para isoflavonoides derivatizados, Figura 7 (pág. 19).^{9,59,60,61}

Da mesma forma que os alcaloides quinolizidínicos, os flavonoides podem ser utilizados com marcadores taxonômicos do gênero *Lupinus*.^{8,9,61} Nas espécies do velho mundo, três classes de flavonoides são detectados: flavonas, flavonóis e flavonas C-glicosídeo. Ocorrem também flavonas di-C-glicosiladas como apigenina 7-O- β -apiofuranosil-6, entre outras.^{8,9,59,60,61}



Esquema 2. Proposta para rota biossintética de isoflavonoides complexos do gênero *Lupinus*. Em **A**, formação do núcleo pirano; **B**, formação do núcleo furano; e **C**, cadeia dimetilalila oxigenada; ($R = OH$ ou H).

(Fonte: adaptado de FILHO, 2004)⁹

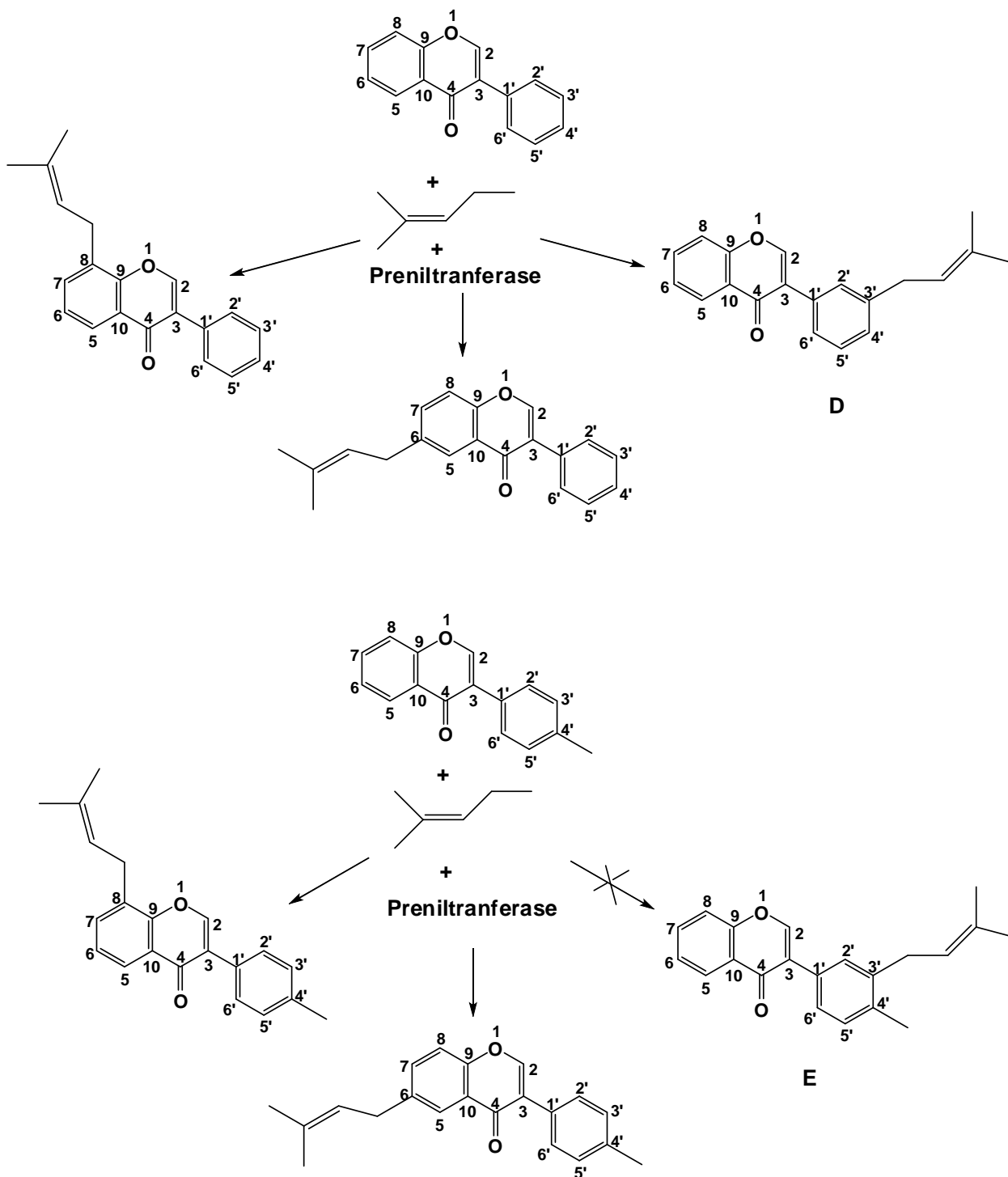


Figura 7. Esquema de prenilação de uma isoflavona comum (**D**) e de uma isoflavona substituída em C-3' (**E**) por um grupamento metila.

(Fonte: adaptado de FILHO, 2004)⁹

Após análise da literatura referente ao gênero *Lupinus*, família *Leguminosae*, surgiu o interesse de estudar as duas classes de metabólitos secundários anteriormente descritos, flavonoides e alcaloides, as quais estão presentes, em altas concentrações, nas partes aéreas das espécies de lupinos sugeridas para o estudo. Assim, a pesquisa foi realizada com *L. lanatus*, *L. guaraniticus* e *L. paranensis*, três representantes das treze espécies de lupinos presentes no estado do Rio Grande do Sul. De acordo com o levantamento bibliográfico, não há estudos fitoquímicos concretos com as duas últimas espécies relacionadas em suas constituições alcaloídicas.

A primeira espécie citada, *L. lanatus*, já foi previamente estudada em sua constituição de alcaloides, da qual, foram isolados cinco estruturas da classe dos quinolizidínicos, Figura 8. Dessas cinco moléculas, uma delas, a (+)Lanatina A, até o momento ainda não havia sido identificada, sendo inédita na literatura.⁵⁶

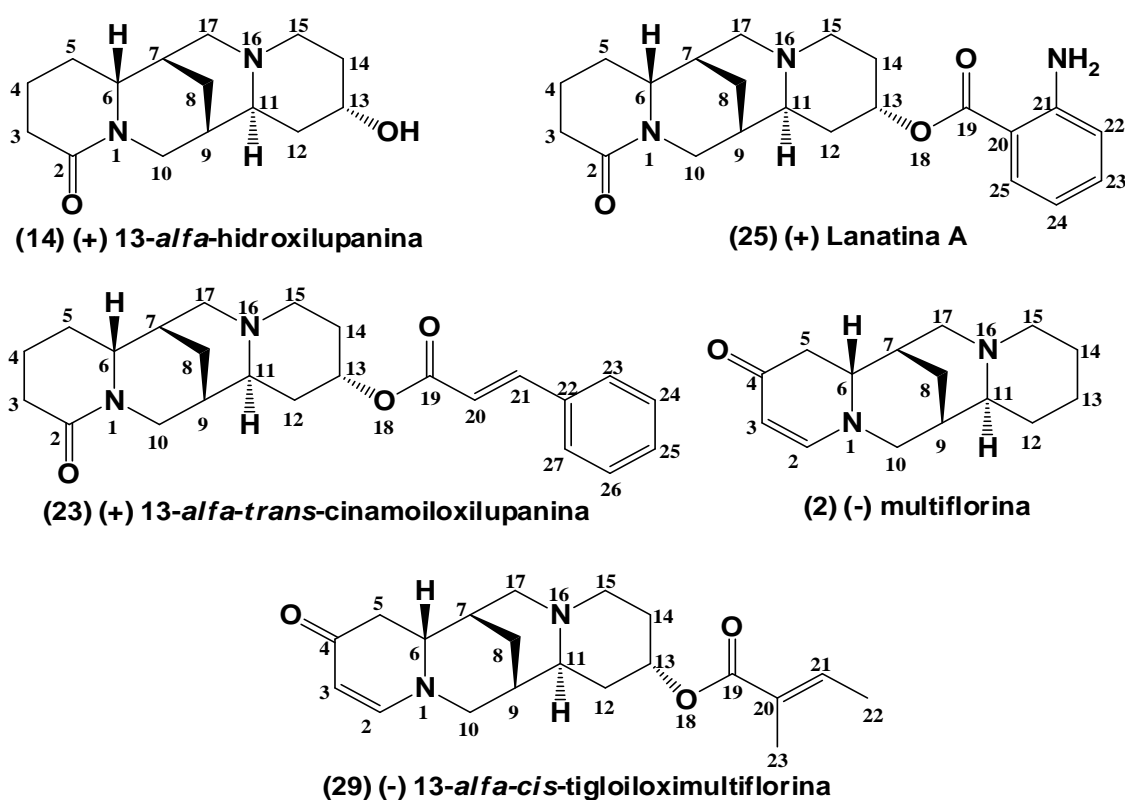


Figura 8. Estruturas químicas de alcaloides quinolizidínicos já isolados e identificados da espécie *L. lanatus*.⁵⁶

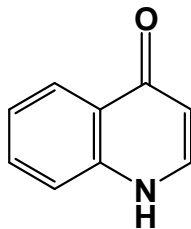
3.2 FAMÍLIA *Sterculiaceae*

A família *Sterculiaceae* é pertencente à divisão das Angiospermas, classe das dicotiledôneas. As espécies dessas famílias fazem parte da família *Malvaceae*, porém, de acordo com uma classificação tradicional, a *Sterculiaceae* é uma família independente.⁶²

Seus metabólitos secundários são principalmente representados por flavonoides, triterpênos, compostos polifenólicos, saponinas e alcaloides do tipo quinilonas e ciclopeptídicos.^{62,63}

3.2.1 Alcaloides Quinolônicos

Os alcaloides quinolônicos são caracterizados de acordo com sua estrutura básica, onde a 4(1H)-quinilona (**30**), é uma das representantes dessa classe. O ácido nalixídico foi a primeira estrutura dessa classe com atividade antimicrobiana e foi descoberta em 1962 por Lesher e colaboradores.⁶² A mesma foi obtida como impureza no processo de produção de um lote de um agente antimalárico. Esta substância apresentou atividade bactericida frente a microrganismos Gram-negativos e passou a ser comercializada posteriormente.⁶²⁻⁶⁴



(30)

Segundo Zufiaurre-Gutiérrez e colaboradores⁶⁴, existem mais de 10.000 estruturas já descritas pertencentes a essa classe de compostos. Sua estrutura química é caracterizada por um nitrogênio como heteroátomo de um heterociclo aromático e um grupo cetona na posição 4 da molécula.^{62,65}

3.2.1.1 Mecanismo de ação dos Alcaloides Quinolônicos

De forma geral, as quinolonas exercem sua atividade antimicrobiana das seguintes formas:

- 1- Penetração da droga no citoplasma celular por difusão ou transporte ativo.⁶⁶
- 2- Inibição da enzima DNA-*girase*, também chamada de *Topoisomerase II*. Atua na regulação do enrolamento e reagrupamento do DNA celular, levando a morte da bactéria.⁶⁶
- 3- Inibição da síntese e replicação de DNA. Esta produz uma reação de resposta na bactéria que leva a uma síntese no DNA e inibição da divisão celular. O tempo de exposição ao agente tóxico ao DNA é quem vai determinar a recuperação ou destruição da célula bacteriana.⁶⁶
- 4- Indução de uma reação de alarme e efeitos deletérios sobre a estrutura celular e bioquímica da bactéria.⁶⁶

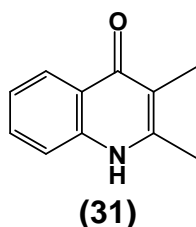
3.2.1.2 Farmacologia das Quinolonas

As quinolonas apresentam um amplo espectro bacteriano (enterobactérias e bacilos Gram-negativos), boa absorção no Trato Gastrointestinal, excelente distribuição sistêmica e baixa incidência de reações adversas. Seu uso é recomendado principalmente em infecções urinárias, bacteremias sexualmente transmissíveis, infecções do trato respiratório, trato gastrointestinal, infecções cutâneas, entre outras.^{62,67}

3.2.1.3 Ocorrência de 4-(1H)-quinolonas na Natureza

Os alcaloides quinolônicos estão presentes principalmente nas famílias *Rutaceae* e *Sterculaceae*.

Werni e colaboradores⁶⁸, em 1963, isolaram o alcaloide 2,3-dimetil4(1H)-quinolona **(31)** da espécie *Platydesma campanulata* Mann, uma *Rutaceae*.



(Fonte: HOELZEL, 2001)⁶²

Da espécie *Ruta graveolens* foram isolados várias estruturas da classe das quinolonas. Dentre elas pode-se citar: 2-undecil-4(1H)-quinolona **(32)**; 2-n-dodecil-4(1H)-quinolona **(33)**; 2-n-tricanil-4(1H)-quinolona **(34)**; 2-tetradecanil-4(1H)-quinolona **(35)**; 2-2-heptil-4(1H)-quinolona **(36)**; 2-octil-4(1H)-quinolona **(37)**; 2-nonil-4(1H)-quinolona **(38)**; e n-decil-4(1H)-quinolona **(39)**.^{62,69} De *R. montana* foi isolada a 2-(nonan-8-ona)-(1H)-4-quinolona **(40)**.^{62,70}

(32) R = (CH₂)₁₀CH₃

(33) R = (CH₂)₁₁CH₃

(34) R = (CH₂)₁₂CH₃

(35) R = (CH₂)₁₃CH₃

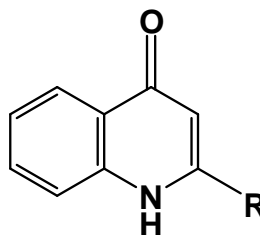
(36) R = (CH₂)₆CH₃

(37) R = (CH₂)₇CH₃

(38) R = (CH₂)₈CH₃

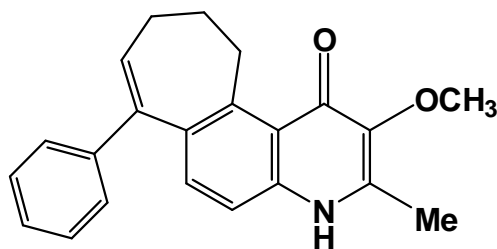
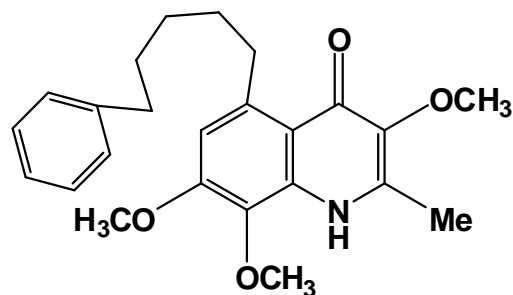
(39) R = (CH₂)₉CH₃

(40) R = (CH₂)₇CH(O)CH₃



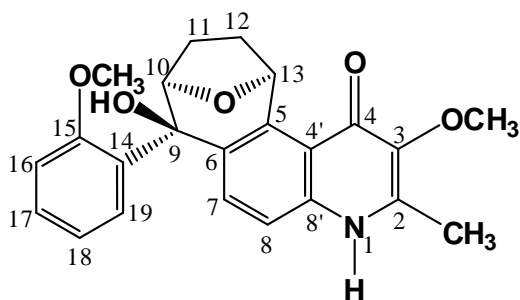
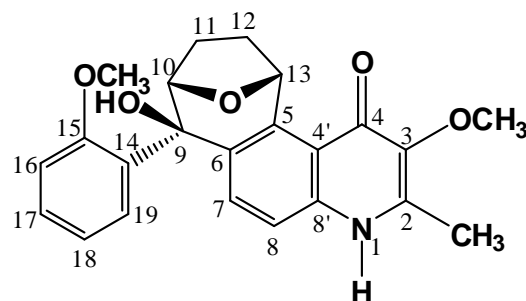
(Fonte: Adaptado de HOELZEL, 2001)⁶²

Essa classe de compostos também ocorre com muita frequência na família *Sterculiaceae*. As estruturas **(41)** e **(42)**, Meloquinona e Melovinona, respectivamente, foram isoladas por Kapadia e colaboradores^{62,71,72} em 1978 da espécie *Melochia tomentosa* L..

**(41)****(42)**

(Fonte: HOELZEL, 2001)⁶²

Do gênero *Waltheria* tem-se registros de dois alcaloides quinolônicos da classe dos 4(1H)-quinolona. Ambos isolados por pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NPPN), da universidade Federal de Santa Maria, UFSM. O grupo está sobre orientação do professor Ademir Farias Morel. Da espécie *Waltheria douradinha* St. Hil., foram isolados os alcaloides Waltheriona A **(43)** e B **(44)**, ambos estereoisômeros.^{62,73}

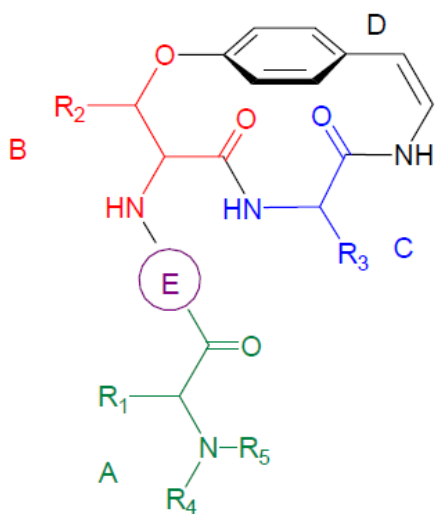
**(43)****(44)**

(Fonte: HOELZEL, 2001)⁶²

3.2.2 Alcaloides Ciclopeptídicos

3.2.2.1 Estrutura Química

Essa classe de compostos está presente em um grande número de espécies vegetais das mais variadas famílias. Dentre elas, podemos citar as seguintes: *Rhamnaceae*, *Asteraceae*, *Rubiaceae*, *Urticaceae*, *Sterculiaceae*, entre outras espécies vegetais. Os alcaloides representados pela estrutura **(45)** são substâncias básicas, cujas estruturas apresentam um sistema do tipo ansa em que estão ligados 10-12 aminoácidos diferentes, por ligações peptídicas do tipo (-CONH-). Estes aminoácidos podem estar ligados às posições 1,3 ou 1,4 do anel benzênico.^{62,74,75}



(45)

A = aminoácido terminal
 B = β-hidroxi aminoácido
 C = aminoácido ligado ao anel
 D = unidade hidroxi estililamina
 E = algumas vezes, entre as unidades A e B está presente um aminoácido adicional (intermediário)

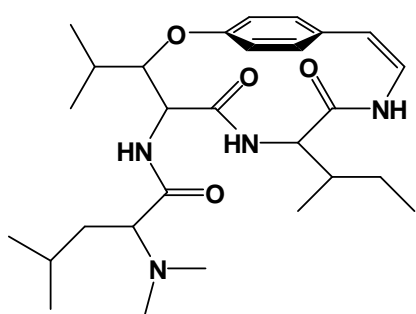
(Fonte: HOELZEL, 2001)⁶²

3.2.2.2 Atividades Biológicas

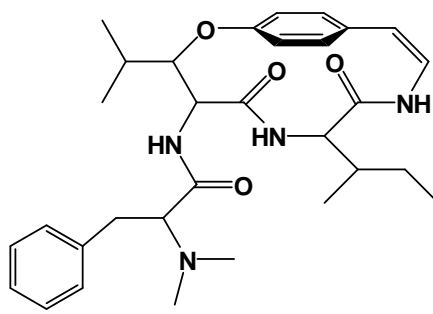
Os alcaloides ciclopeptídicos apresentam atividade hipotensora, antidiarréica, antidesintérica, antifúngicas, antibacterianas (com um espectro de ação mais voltado para bactérias Gram-positivas) além de possuírem um grande potencial imunestimulante.^{62,76}

3.2.2.3 Ocorrência de Alcaloides Ciclopeptídicos em Espécies da Família *Sterculaceae*

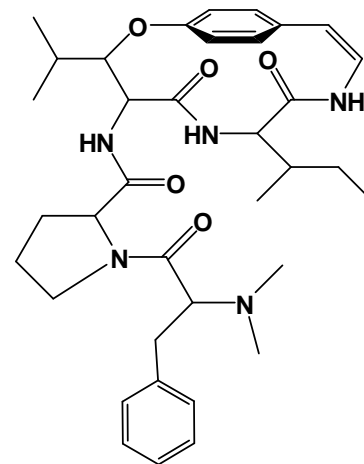
Em 1963, País, Mainil e Goutarel descreveram o isolamento dos alcaloides Adoutina -X (**46**), -Y (**47**) e -Z (**48**). Essas estruturas foram isoladas da *W. americana*, sendo que as Adoutinas -X e -Y também foram isoladas das espécies *Melochia corchorifolia* e *Melochia pyramidata*.^{62,77}



(46)



(47)



(48)

3.2.2.4 Isolamento

O isolamento dessa classe de compostos, em geral, é realizado através de uma extração ácido-base do extrato metanólico seco. O extrato metanólico é ressuspenso em água e a este é adicionado solução de ácido diluído até $\text{pH} = 1,5 - 2,0$. Posteriormente, é adicionado éter etílico na proporção (1:1) e realizado sucessivas extrações até que haja a completa extração dos metabólitos de características ácidas.^{62,74,75,76,77}

Num segundo momento, a fase aquosa é alcalinizada com NH_4OH diluído até $\text{pH} = 9,0 - 10,0$. Novamente, extrações sucessivas são realizadas com éter etílico a fim de obter os metabólitos dessa classe de substâncias. Seu rendimento, partindo da planta seca, é de aproximadamente $0,01 - 0,09\%$. A mistura de alcaloides é separada e purificada através de métodos cromatográficos.^{62,74,75,76,77}

3.2.2.5 Elucidação Estrutural e Estereoquímica

Os métodos mais utilizados para a determinação das suas estruturas químicas, ocorre principalmente por meio de análises espectroscópicas como (RMN e espectrometria de massas EM) e reações de hidrólise de seus aminoácidos. A aplicação de difração de Raios $-X$ também é um método bastante importante no auxílio da elucidação estrutural e estereoquímica. Outros tipos de análises também são muito úteis, espectroscopia na região do Infra-vermelho e do Ultra-violeta e Dicroísmo Circular.^{62,77,78}

A cromatografia gasosa também tem sido muito útil na determinação da estereoquímica absoluta das unidades dos aminoácidos, principalmente das estruturas dos alcaloides ciclopeptídicos.^{62,78}

3.2.2.6 Espectrometria de Massas (EM)

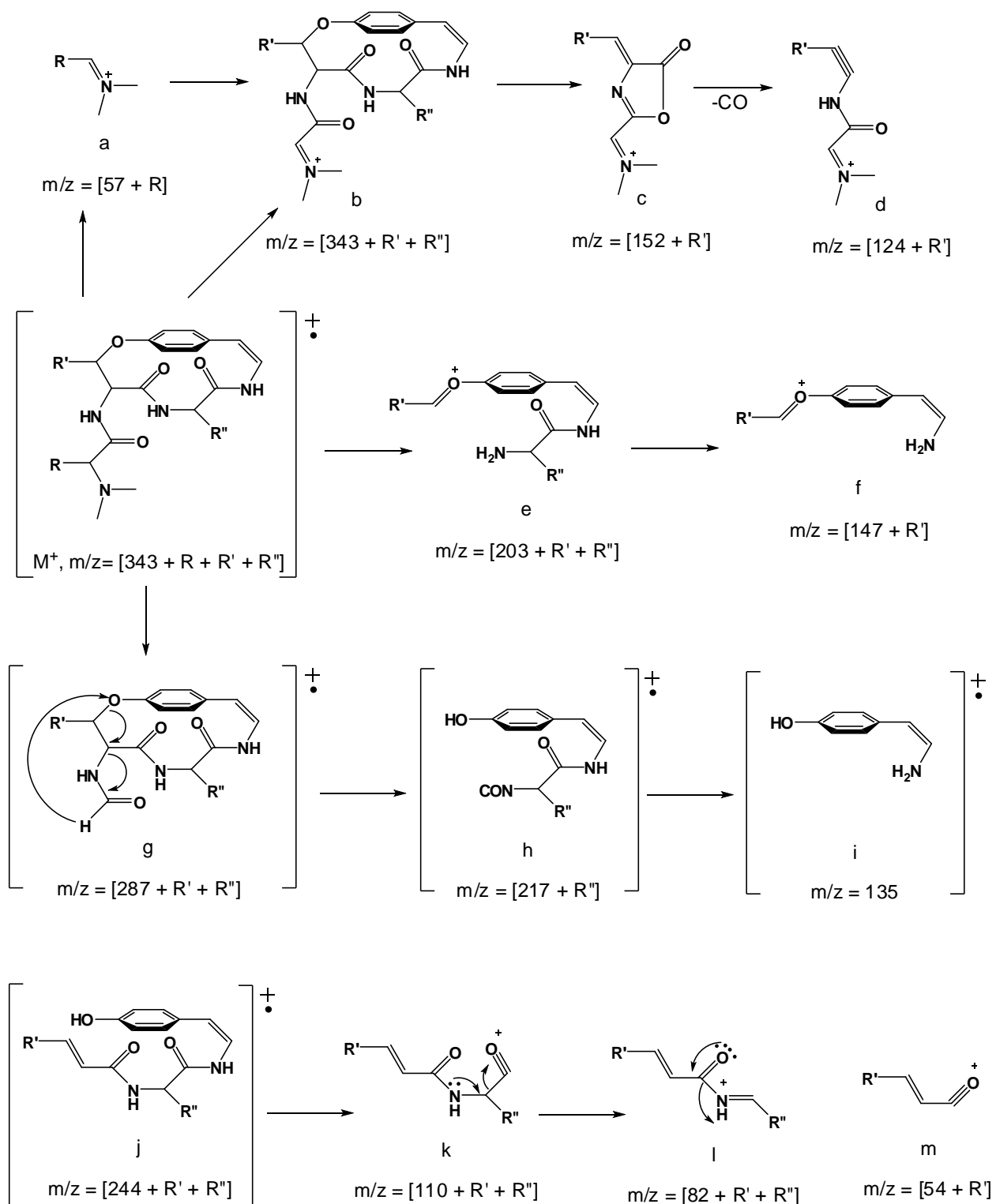
Devido ao padrão de fragmentação dos β -hidroxiaminoácidos desses alcaloides ciclopeptídicos, com a espectrometria de massas de alta resolução é possível identificar vários grupos desses compostos.

O espectro de massas FAB⁺ revela um íon “quase molecular” [M + H] ou [M – H] que permite identificar a massa molécula da estrutura de um alcaloide.^{62,78,79}

As estruturas com ciclos de quatorze membros, podem apresentar variações estruturais somente na cadeia lateral dos aminoácidos constituintes apresentando um padrão de fragmentação típico^{62,78,79}, Esquema 3 (pág. 29).

O íon molecular, nesses compostos apresenta baixa intensidade. O pico base é representado pelo fragmento iônico **a**, constituindo-se em 40 – 60% da produção total de íons e indicando a composição do aminoácido terminal. O fragmento **b** decompõe-se em **c** e **d**, representando o β -hidroxiaminoácido do anel. Os íons **f** e **h** apontam a estirilamina ligada, respectivamente, ao do β -hidroxiaminoácido a ao aminoácido participante do macrociclo. Esses resíduos são confirmados pelos fragmentos iônicos **e**, **k** e **L**. O íon **i** comprova a presença da unidade do β -hidroxiestirilamina como parte do macrociclo de quatorze membros.^{62,78,79}

Essa sequência de fragmentação apresenta dificuldades quanto a distinção entre a leucina e isoleucina, quando essas fazem parte do alcaloide como unidade básica N,N-dimetilada, ou como aminoácido participante do anel.^{62,78,79}



Esquema 3 - Fragmentação de alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros.^{62,78,79}

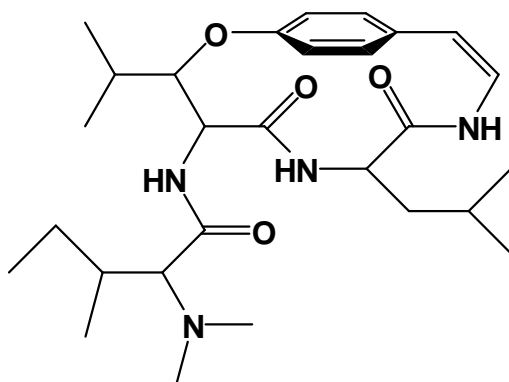
(Fonte: Adaptado de HOELZEL, 2001)⁶²

3.2.2.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os estudos de RMN de ^1H e ^{13}C da classe dos ciclopeptídicos oferece tanto informações sobre os aspectos estruturais, bem como configuracionais, conformacionais e estereoquímicos, principalmente da unidade β -hidroxiaminoácido.^{62,80}

Os aspectos conformacionais sob efeito da mudança de solventes também foram investigados. Deslocamentos químicos de hidrogênios indólicos e aromáticos de resíduos triptofânicos, em bases contendo esse aminoácido, sugeriram uma mínima troca conformacional, sob diferentes solventes e temperatura.^{62,80}

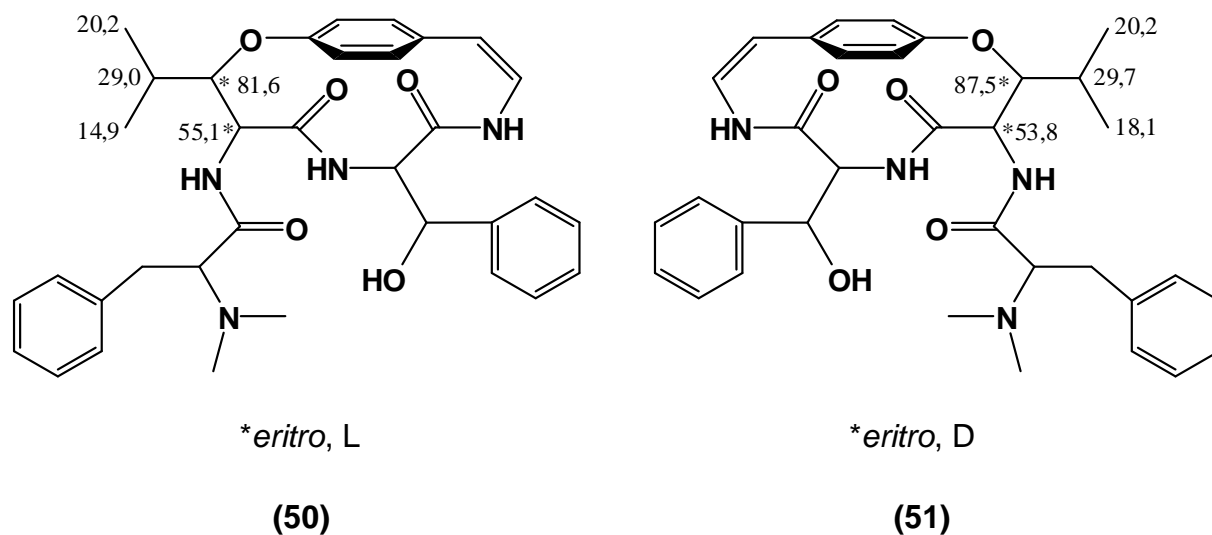
Alcaloides do tipo frangulanina (**49**), onde o resíduo β -hidroxileucina participa do sistema macrocíclico, tem seus hidrogênios metínicos 3- α e 4- β acoplado entre si com um $J = 8$ Hz, isso reflete um ângulo diedro H- α /H- β entre 0° e 20° ou 150° - 180° . Fato este relacionado com a geometria rígida do macrocíclico, pois para o mesmo só é permitida a geometria *anti*, indicando a configuração *eritro* para esta unidade. Por técnicas de NOESY de ^1H e RMN de ^{13}C foi comprovado que as ligações amídicas (-CONH-) presentes no macrocíclico de 14 membros, apresentam configuração (S)-*trans*.^{62,80,81}



(49)

(Fonte: HOELZEL, 2001)⁶²

A técnica de ^{13}C tem se tornado uma ferramenta indispensável na confirmação das estruturas dos ciclopeptídicos principalmente através da análise dos deslocamentos químicos dos carbonos 3- α , 4- β do fragmento β -hidroxiaminoácido. Esta traz informações relevantes sobre a conformação e configuração desta unidade de aminoácido como no caso dos diastereoisômeros do alcaloide Scutianina-D (**50**) e (**51**).^{62,80,81}



(Fonte: HOELZEL, 2001)⁶²

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2 INSTRUMENTOS UTILIZADOS

4.2.1 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a obtenção dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , foi utilizado um Espectrômetro da marca Bruker DPX 400, que opera nas faixas de freqüências de 400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C . Os espectros obtidos com a utilização

deste espectrômetro foram os espectros 1D, ^1H , ^{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) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Como padrão interno foi utilizado o TMS, Tetrametilsilano.

4.1.2 Espectrômetro de Difração de Raios-X

As medidas Cristalográficas foram obtidas utilizando um aparelho Bruker X8 Kappa-Apex II CCD empregando radiação $\text{Mo K}\alpha$ 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.

4.1.3 Aparelho de Ponto de Fusão

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

4.1.4 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 Almmmer, 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 (R_f) 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 cromato-folhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (MERCK e Sorbent Technologies). Também se utilizaram placas preparadas em laboratório com sílica gel PF₂₅₄ (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 PF₂₅₄ (MERCK) com espessura de 0,75 mm.

4.2.3 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 °C – (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 °C; seringa de 10 µL, com injeção de 1 µL; temperatura inicial do forno de 70 °C por 1 min. e rampa de aquecimento de 12 °C/min. até 280 °C. A fragmentação dos compostos foi processada por impacto de elétrons de 70 eV no Espectrômetro de Massas.

4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC)

Todas as análises de *CLAE/HPLC* foram realizadas em equipamento Cromatógrafo Agilent Technologies Modelo 1200, equipado com detector DAD e coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm x 250 mm, 5µm), sendo as leituras realizadas nas faixas de comprimento de onda entre $\lambda = 220$ nm e 380 nm e na temperatura de forno entre 25 e 30 °C. As amostras foram diluídas em metanol e filtradas antes de serem injetadas no HPLC. O volume injetado foi de 5 µL.

4.2.6 Medições da Densidade Óptica (DO)

As placas de 96 micropoços foram analisadas em espectrofotômetro Spectra Max M2 (Molecular Devices Corp) programado para obter medições na temperatura de 25 °C no comprimento de onda de 620 nm.

4.3 REAGENTES E MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADOS

Para realização dos ensaios de cromatografia em coluna das espécies de *Lupinus* relacionadas e da espécie *W. douradinha*, foram utilizados solventes e reagentes de grau analítico Merck e Vetec. As Tabelas 2-4 (pág. 35-37) apresentam os principais sistemas de solventes utilizados nas técnicas cromatográficas de separação de flavonoides e alcaloides, respectivamente.

TABELA 2. Sistemas de reagentes e solventes mais utilizados nos ensaios cromatográficos para separação e purificação de flavonoides da espécie *L. lanatus*.

Sistema de Solvente	Gradiente de Polaridade
Hexano	100%
Diclorometano	100%
Acetato de Etila	100%
Metanol	100%
Acetato de Etila /Metanol	(99 : 1 v/v)
Acetato de Etila /Metanol	(98 : 2 v/v)
Acetato de Etila /Metanol	(95 : 5 v/v)
Acetato de Etila /Metanol	(90 : 10 v/v)
Acetato de Etila /Metanol	(85 : 15 v/v)
Acetato de Etila /Metanol	(75 : 25 v/v)
Acetato de Etila/Metanol	(65 : 35 v/v)
Acetato de Etila /Metanol	(55 : 45 v/v)
Acetato de Etila /Metanol	(50 : 50 v/v)

TABELA 3. Sistemas de reagentes e solventes mais utilizados nos ensaios cromatográficos de separação e purificação de alcaloides – gênero *Lupinus*.

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	(99 : 1 v/v)
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)

TABELA 4. Sistemas de reagentes e solventes mais utilizados nos ensaios cromatográficos de separação e purificação de alcaloides da espécie *W. douradinha*.

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
Clorofórmio/Metanol	(99 : 1 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(98 : 2 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(95 : 5 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(90 : 10 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(85 : 15 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(80 : 20 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(75 : 25 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(70 : 30 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(65 : 35 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(60 : 40 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(55 : 45 v/v)
Clorofórmio/Metanol	(50 : 50 v/v)

As placas de CCD e CCDP, foram observadas câmara escura com lâmpada de irradiação Ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda $\lambda = 254 \text{ nm}$ e $\lambda = 365 \text{ nm}$ (Biothec). Para determinar a presença de nitrogênio básico nas cromatoplasas, borrifou-se reativo de Dragendorff modificado segundo Munier e Macheboenf⁵⁴, determinando assim, a presença de alcaloides. Os outros compostos presentes foram revelados com

uma solução de ácido sulfúrico e etanol (95:5 v/v) seguido de aquecimento em chapa quente. Para a indicação de presença de flavonoides, as cromatoplasmas foram reveladas com solução de Cloreto Férrico (FeCl_3) 0,2 M, reagente utilizados para determinar a presença de compostos fenólicos na mistura extrativa.

Métodos mais específicos de identificação como Espectrometria de Massas (EM), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais como DEPT, COSY, NOESY, HMBC, HMQC, foram de fundamental importância na identificação e caracterização estrutural dos metabólitos secundários isolados.

4.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Lupinus*, *Leguminosae/Fabaceae* E DA ESPÉCIE *W. douradinha*, *Sterculiaceae*

As espécies de *L. lanatus*, *L. guaraniticus* e *L. paranensis* foram coletadas no município de Frederico Westphalen – RS no mês de outubro de 2011. A identificação botânica das espécies foi realizada pelo departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, e uma exsicata de cada espécie foi depositada no herbário da mesma instituição com os respectivos números SMDB nº 12.953; SMDB nº 12.954. A espécie *Wlatheria douradinha* Saint Hilaire foi coletada em quatro regiões do estado do Rio Grande do Sul. As coletas foram realizadas em São Pedro do Sul, Cruz Alta, Palmeira das Missões e Passo Fundo. Uma exsicata da planta coletada na cidade de São Pedro do Sul está depositada no departamento de Biologia da UFSM sob o número SMDB nº 8073.

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*

4.5.1 Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Micro-diluição em Caldo

A Concentração Inibitória Mínima (CIM), é a menor concentração de um composto testado capaz de inibir o crescimento de microrganismos, podendo ser bacteriostático ou fungistático 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 Colection) constituídas por microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos estão descritos na Tabela 5, (pág. 42), (NCCL, 2002).^{82,83}

Como padrão de antibiótico de referência foram utilizados, nos ensaios, Levofloxacina para bactérias e Nistatina para as leveduras. Estes padrões foram preparados conforme FDA⁸⁴, nas mesmas concentrações que as droga testadas.

4.5.1.1 Método de Determinação da Atividade da CIM

Para a determinação da CIM pelo método de Micro-diluição em Caldo, foi realizado a técnica descrita pela NCCLS^{82,83} modificada.⁸⁴ 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 microrganismos na concentração de 1×10^6 células viáveis em caldo Caseína de Soja para bactérias e Caldo Saboraund para fungos. Após a inoculação dos microrganismos, as amostras foram adicionadas no primeiro micro-poço e posteriormente, realizadas diluições em série das mesmas, começando em 100 µg/ml indo até 0,77 µg/ml. As placas ficaram incubadas por 24 horas a 35-37 °C para bactérias e 48 horas a 25 °C para Leveduras. Após a incubação, o crescimento microbiano foi determinado através de DO utilizando leitor de placas em

comprimento de onda de 620 nm para determinação da CIM. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados comparados com os padrões. Também, para garantia de reprodutibilidade do ensaio, efetuou-se um controle positivo e um negativo para cada amostra testada. O controle positivo consiste na inoculação da bactéria ou levedura, em meio de cultura adequado, e sem a presença da droga. Já, o controle negativo, é constituído somente pela presença do meio de cultura, sem droga e ausência microrganismo. A Figura 9 ilustra o método de Micro-diluição em Caldo para teste de CIM (NCCL, 2002).^{82,83}

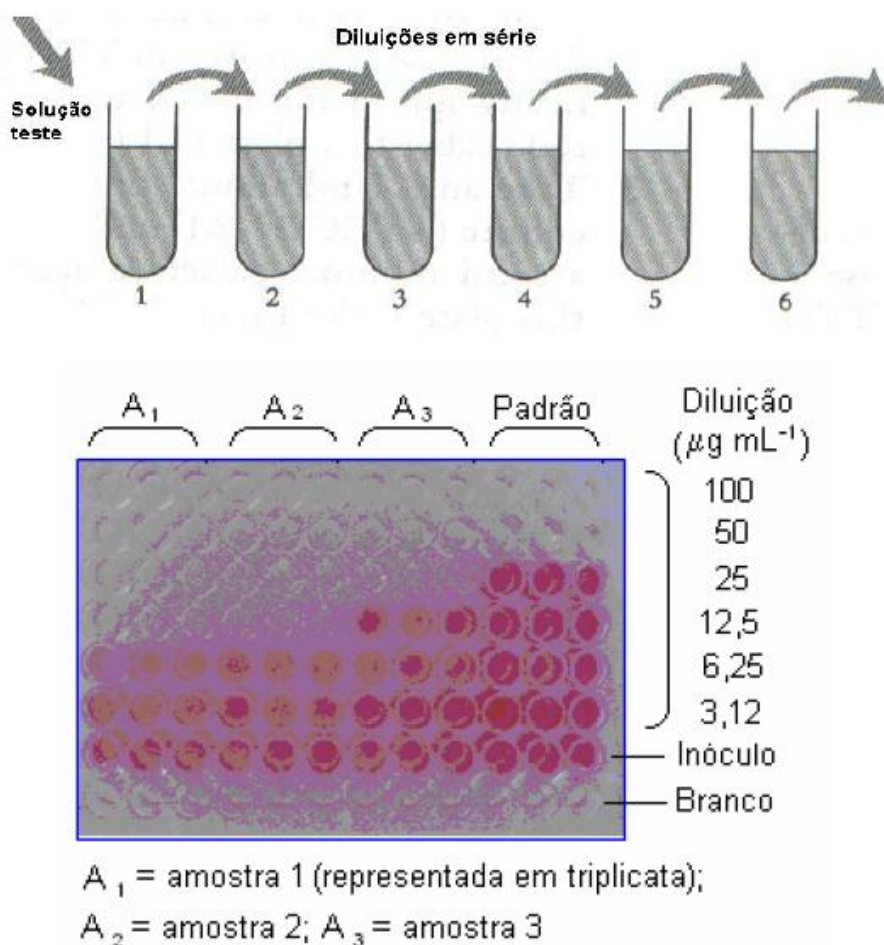


Figura 9. Método de Micro-diluição em Caldo para teste de CIM.

(Fonte: HOELZEL, 2001)⁶²

4.5.1.2 Método de Concentração Letal Mínima (CLM)

A Concentração Letal Mínima (CLM), segundo Hammer⁸⁴, 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 microbianas, que no teste de CIM não apresentaram crescimento, foram inoculadas em placas de Petry contendo meio ágar específico para cada classe de microrganismo, ágar Saboraund para leveduras e ágar Muller Hinton para bactérias.

Após a incubação, também respeitando o tempo para o crescimento de cada microrganismo, (24h, 35-37 °C, bactérias e 48h, 25-27 °C, fungos) foi determinada 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 Petry em que não houve crescimento microbiano.

4.5.2 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 carne (5,0 g), peptona de caseína (5,0 g), água destilada (1000,0 ml).

A Tabela 5, (pág. 42) lista os microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e Leveduras utilizados no ensaio, juntamente com seus ATCC.

TABELA 5. Lista de microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e Leveduras utilizados nas determinações de CIM e CLM.

Características	Microorganismos	ATCC
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 33019
	<i>Enterococcus spp.</i>	ATCC 6589
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 1304
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
	<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 17759
	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
	<i>Morganella morganii</i>	ATCC 25829
Fungos	<i>Cândida albicans</i>	ATCC 10231
	<i>Cândida tropicalis</i>	ATCC 18803
	<i>Cândida krusei</i>	ATCC 6258
	<i>Cândida parapslosis</i>	ATCC 22018
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 28952
	<i>Cryptococcus gatti</i>	ATCC 2601
	<i>Sacharomyces cerivisae</i>	ATCC 2601

4.6 ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA

A atividade antimicrobiana envolve um variado leque de mecanismos de ação das substâncias testadas, frente aos microrganismos envolvidos no ensaio.⁸⁵ De acordo com o mecanismo de ação, os antibióticos são divididos em quatro classes:

- 1- Antibióticos que interferem na síntese da parede celular;
- 2- Antibióticos que interferem na função da membrana citoplasmática;
- 3- Antibióticos que interferem na síntese de ácidos nucleicos;
- 4- Antibióticos que inibem a síntese de proteínas.^{85,86}

Dentre as classes de antibióticos que interferem na síntese da parede celular, pode-se citar a classe dos beta-lactâmicos, representados pelas penicilinas e seus derivados. Estes compostos, juntamente com as cefalosporinas, possuem semelhanças estruturais em um de seus seguimentos com certas frações do ácido-*N*-acetilmurâmico, mais especificamente, os seguimentos D-alanil-D-alanina e L-alanil-ácido D-glutâmico, presentes na parede celular de bactérias. Este fato explica grande parte de seu mecanismo de ação.^{85,86}

O último passo da síntese da parede celular bacteriana envolve uma reação cruzada entre duas unidades glicopeptídicas nascentes, catalisadas pela enzima *transpeptidase*. Assim, a semelhança estrutural entre cefalosporinas e penicilinas com o grupo terminal, seguimentos D-alanil-D-alanina e L-alanil-ácido D-glutâmico, da porção pentapeptídica destes glicopeptídios nascentes, faz com que a enzima se ligue aos antibióticos citados, por ligação covalente, impedindo, dessa forma, a síntese da parede celular bacteriana, Figura 10 (pág. 44).⁸⁶

A ligação covamente mencionada acima, trata-se de um ataque nucleofílico de um grupo tiólico da enzima ao carbono carbonílico do anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas. A inserção dessas moléculas à parede bacteriana provoca uma alteração eletrônica da mesma promovendo uma modificação no fluxo de íons levando a célula a ficar hipotônica.^{85,86} Como consequência, a alta pressão interna das bactérias

(cerca de 20 atm – Gram-positivas e 5 atm – Gram-negativas) leva a ruptura da parede celular com conseqüente extravasamento do material citoplasmático causando a morte do microrganismo, Figura 11 (pág. 45).⁸⁶

Nesse sentido, esses antimicrobianos só agem em bactérias em crescimento não afetando formas latentes ou de resistências do microrganismo.⁸⁶

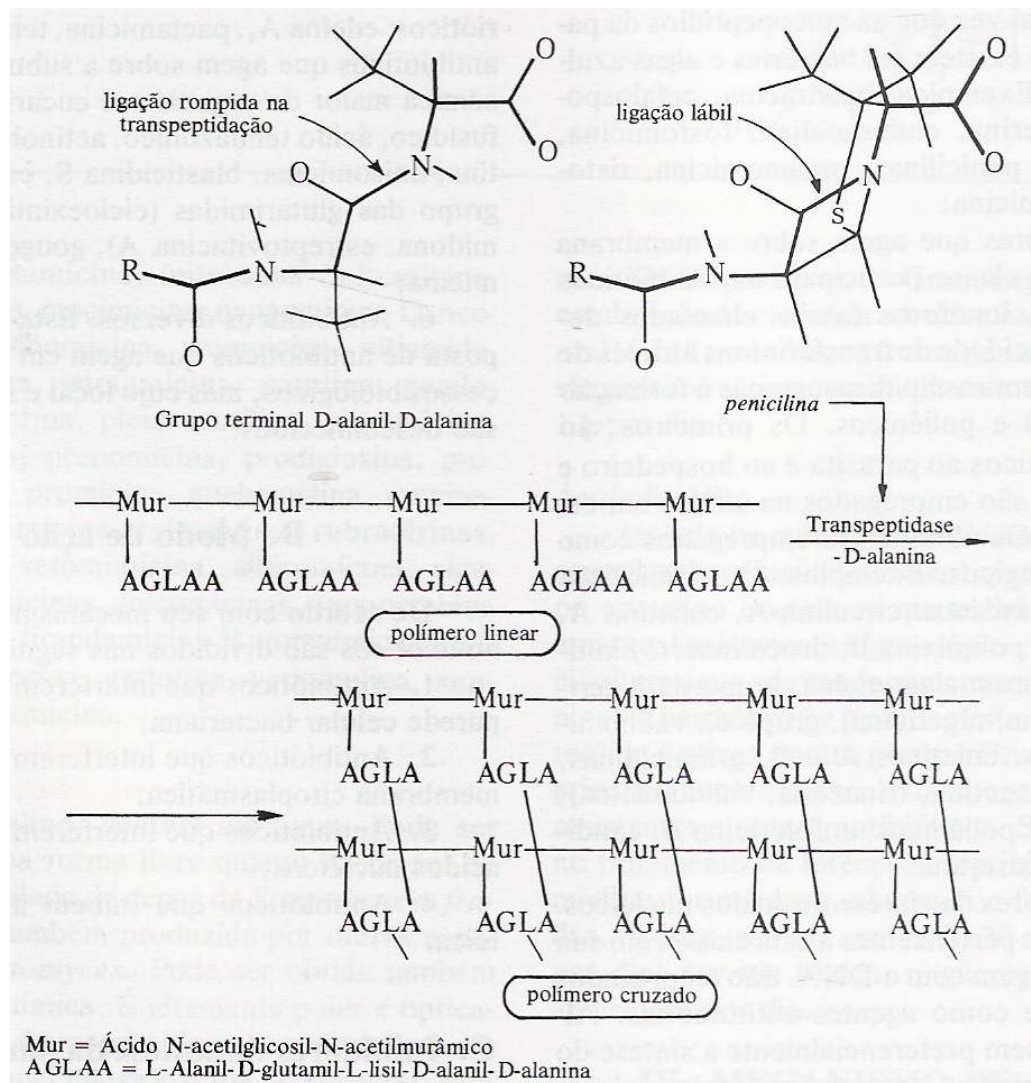


Figura 10. Mecanismo de ação de β -lactâmicos em razão da semelhança estrutural dos antimicrobianos, penicilinas e cefalosporinas, com o grupo terminal D-alanil-D-alanina do peptídeoglicano da parede celular bacteriana. (Fonte: KOROLKOVAS, 1982)⁸⁶

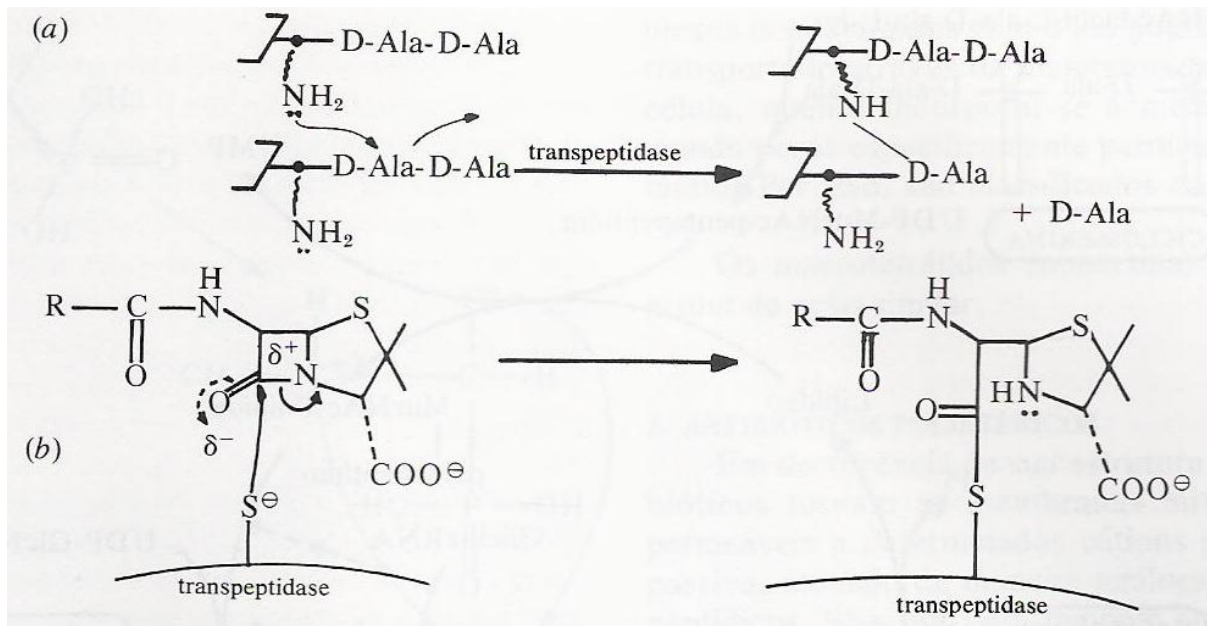


Figura 11. Mecanismo de inibição irreversível da *transpeptidase* pelas penicilinas e cefalosporinas: **(a)** ação enzimática da *transpeptidase*, catalisando a formação do polímero cruzado da parede bacteriana; **(b)** ataque nucleofílico do grupamento tiólico da enzima ao carbono carbonílico do anel β-lactâmico das ampicilinas e cefalosporinas. (Fonte: KOROLKOVAS, 1982)⁸⁶

Para realização da atividade bacteriolítica, as células bacterianas foram cultivadas em caldo de caseína de soja a 27 °C. Após 24 horas de crescimento em estufa bacteriológica em condições controladas, as culturas de células bacterianas foram recolhidas por centrifugação (10 min, 3000 rpm) e ressuspensas em caldo caseína de soja fresco. Posteriormente, foi ajustado o crescimento bacteriano em cerca de 5×10^7 células/ml com (DO ~ 0,2 $\lambda = 620\text{nm}$ com um espectrofotômetro SP-22, Biospectro, Brasil). A cultura bacteriana em caldo juntamente com as soluções de antibióticos padrões e as amostras teste, foram incubados nos poços de placa de 96 poços para medições de densidade óptica em análise cinética.^{87,88}

- **Medições da Densidade Óptica (DO):** 180 µl da cultura bacteriana ajustada em escala Mac Farland 5×10^7 foram adicionados numa placa de 96 micropoços. A placa foi colocada num espectrofotômetro (Spectra Max M2 - Molecular Devices Corp)

programado para obter medições a 25 °C. Essa temperatura foi padronizada para que houvesse o mínimo de evaporação possível do meio de cultura durante todo o processo. As densidades ópticas das culturas celulares foram obtidas usando um feixe de emissão de comprimento de onda de 620 nm a cada 15 minutos com homogeneização de 30 segundos entre as leituras.^{87,88}

As células bacterianas foram ainda cultivadas até à fase logarítmica. Após as leituras das absorbâncias chegarem à DO ~ 0,4-0,5 em $\lambda = 620\text{nm}$, foram adicionas 20 μl das soluções de cada amostra teste e também dos padrões de antibióticos em diferentes concentrações. Todas as amostras foram repetidas em quadruplicata para garantia de que os dados obtidos estariam corretos estatisticamente. Após a adição das amostras, a microplaca era novamente levada para o Spectra Max M2 e novas medidas de DO das culturas de células foram realizadas por um período de 10-12 horas.^{87,88}

A análise dos dados foi realizada utilizando o software estatístico SPSS v. 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Os efeitos das diferentes concentrações de Antidesmona e (+)Lanatina A e o controle, Ampicilina, bem como o controle positivo de proliferação das bactérias foram determinado utilizando análise de variância pelo método one-way (ANOVA) e as medidas repetidas pelo teste post hoc de Bonferroni ($P < 0,05$) foi considerado para que os dados fossem significativos.

4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

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 trazendo 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. Nesse sentido, há um grande interesse na descoberta de novos compostos capazes de

remover estes radicais livres, a fim de prevenir o envelhecimento precoce das células e os efeitos indesejados provocados por essa classe de substâncias ao organismo. Assim, é de extrema importância a busca por estruturas de origem natural com essa característica, pois estas estão o tempo todo sofrendo com as interperes do ambiente, e encontram mecanismos fantásticos de defesa contra esses radicais gerados.⁸⁹

4.7.1 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.⁸⁹

4.7.2 Método Qualitativo, *screening*

Para a realização da atividade com DPPH, quantidades conhecidas das amostras foram aplicadas em cromatoplasas de sílica gel juntamente com um antioxidante padrão conhecido, a Quercetina na concentração de 2 mg/ml.⁸⁹

Posteriormente, foi borrifado uma solução de DPPH (2 mg/ml em metanol), de coloração violeta $\lambda_{\text{max}} = 517$ 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.^{89,90}

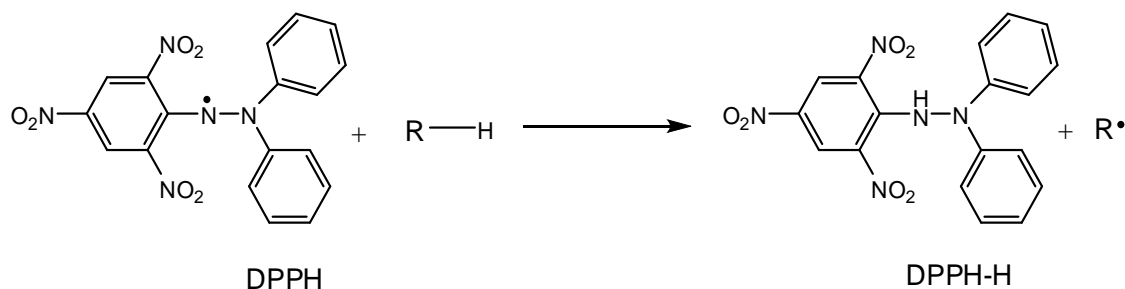
4.7.3 Método Quantitativo

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 absorvância 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%.^{89,90,91}

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

$$\% \text{ de inibição} = [(absorbância \text{ do controle} - absorbância \text{ da amostra}) / absorbância \text{ do controle}] \times 100$$

A determinação da IC₅₀, 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 12.^{89,90,91}



4.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA ENZIMÁTICA

4.8.1 *Prolil Oligopeptidase (POP)*

A *POP*, Figura 13 (pág. 50), é uma *endopeptidase citosólica* pertencente à família das *serina-peptidase*. Ao contrário das outras enzimas dessa família, esta possui a característica de hidrolisar somente substratos peptídicos pequenos, com no máximo 30 resíduos de aminoácidos. Uma propriedade específica dessa enzima é a de clivagem de sequências de peptídeos pelo carbono da carboxila terminal de resíduos de prolina, ligação do tipo *Pro-Xaa*, sendo conhecida como “Post-Proline Cleaving Enzyme”.^{92,93}

A demanda atual da indústria farmacêutica por enzimas da família da *POP*, dá-se devido a essas enzimas degradarem muitos neuropeptídios envolvidos principalmente em funções neurológicas relacionados com a memória a aprendizagem.⁹³

Pesquisas recentes indicam que a *POP* do cérebro humano está envolvida em uma série de patologias no sistema nervoso central, SNC, tais como amnésia, diferentes estágios da depressão e transtorno bipolar.^{93,94}

Estudos apontam que pacientes afetados por essas patologias e transtornos, apresentam níveis séricos mais elevados desta enzima, *POP*, no soro do que pacientes não afetados.^{93,94}

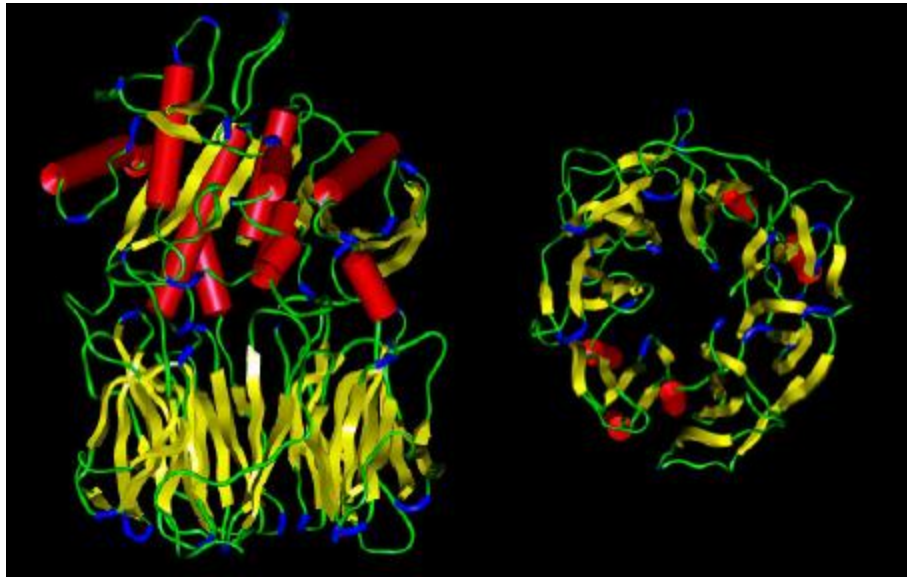


Figura 13. Estrutura tridimensional da *Prolin Oligopeptidase (POP)* de origem suína.

(Fonte: Prof. Ernest Giralt – Barcelona, 2008)

4.8.2 *Dipeptidil Peptidase IV (DPP IV)*

A *DPP IV*, também denominada de CD 26, é uma enzima presente em membranas celulares. Essa enzima pertence à classe das *prolin-oligopeptidase* e possui preferência por peptídeos que apresentam como penúltimo aminoácido prolina (*Pro*) ou alanina (*Ala*).⁹⁵

Vários estudos demonstraram que inibidores de *DPP IV*, Figura 14 (pág. 51), auxiliam de modo muito significativo na terapia do *diabetes mellitus*.^{96,97} A *DPP IV* possui diversos substratos, mas um deles em especial, e que está associado ao *diabetes mellitus*, por estimular a secreção de insulina, é o peptídeo 1 tipo *glucagon* (GLP-1). A degradação desse peptídeo pela *DPP IV* impede a estimulação da liberação de insulina prejudicando o aporte de glicose nas células e gerando prejuízos significativos para o paciente. Em indivíduos com *diabetes mellitus* tipo II, o (GLP-1)

encontra-se bastante diminuído pelos efeitos de sua degradação pela *DPP IV*. Assim, substâncias capazes de inibir os efeitos dessa enzima, serão muito importantes para o restabelecimento dos níveis séricos de GLP-1 melhorando a qualidade de vida de pacientes acometidos por diabetes mellitus.^{96,97,98,99}

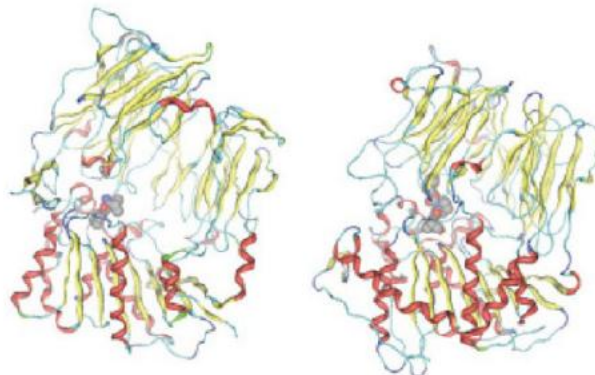


Figura 14. Estrutura tridimensional da *Dipeptidil Peptidase IV (DPP IV)* à esquerda e *Prolil Oligopeptidase (POP)* à direita.⁹⁸

4.9 ANÁLISES DE SOLOS

A análise dos solos foi realizada no laboratório de solos do Polo Tecnológico da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI – *campus* de Frederico Westphalen. As amostras foram coletadas conforme orientações colhidas no Site da Embrapa, cuja amostragem deve contemplar a camada externa e mais interna do solo, atingindo aproximadamente os primeiros 20 cm de profundidade. Todas as amostras foram obtidas no dia da coleta das plantas. As coletas de solo foram realizadas nos locais de retirada da espécie *Waltheria douradinha* Sit. Hil., nas cidades de Cruz Alta, São Pedro do Sul, Palmeira das Missões e Passo Fundo.

4.10 SECAGEM, EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS DE PLANTAS DAS FAMÍLIAS *Leguminosae/Fabaceae* e *Sterculiaceae*

O material vegetal coletado do gênero *Lupinus* foi seco em estufa de circulação de ar a temperatura de 45 °C durante cinco dias. Posteriormente, foram separados das vagens, as sementes, as folhas, as flores, os caules e as raízes das plantas. Deste material, foram selecionados, de cada planta, folhas de *L. paranensis*, folhas da espécie *L. lanatus* e sementes e folhas de *L. guaraniticus*. Das três espécies, todas as partes analisadas apresentaram altas concentrações de alcaloides e compostos fenólicos, flavonoides.

Do material vegetal coletado de *W. douradinha*, primeiramente, foi separado a casca das raízes. As mesmas foram lavadas com água corrente para retirar o solo remanescente e o material levado para secagem em estufa de circulação de ar e por 5 dias à temperatura de 45 °C. Da casca das raízes de *W. douradinha* foi obtido o extrato metanólico, o qual foi particionado em uma extração ácido/base. A fração básica foi analisada por CCD em sistema eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (97:3) com adição de NH_4OH e revelada com reativo de Dragendorff, indicando a presença de alcaloides em altas concentrações.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Dando continuidade ao estudo realizado com plantas pertencentes às famílias *Leguminosae/Fabaceae* e *Sterculiaceae*, no ítem cinco, são apresentados os resultados obtidos da investigação química e biológica dos extratos, frações e compostos secundários isolados e identificados para as três espécies representantes do gênero *Lupinus* (*L. lanatus*, *L. guaraniticus* e *L. paranensis*) e também da espécie *W. douradinha*.

5.1 PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS DE *L. lanatus*, FOLHAS E SEMENTES DE *L. guaraniticus* e FOLHAS DE *L. paranensis*

As folhas secas de *L. lanatus* foram trituradas em moinho de facas e pesadas para originar uma massa de 0,970 Kg. Posteriormente, o material passou por sucessivas extrações metanólicas, à quente, até extração completa de seus compostos secundários. O extrato metanólico foi então concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida e obteve-se 320 g de uma massa extrativa de coloração verde escura (extrato bruto metanólico).

Em seguida, o extrato metanólico foi submetido a um fracionamento ácido-base. Para isso, o mesmo foi ressuspenso em 350 ml de água e acidificado com HCl 2N até pH~2. Na sequência, foram efetuadas sucessivas extrações com éter etílico dos compostos neutros e ácidos. O solvente foi removido e a fração ácida das folhas de *L. lanatus* liofilizada. Após pesado, o material revelou 66 g da fração etérea ácida da espécie em estudo. Essa fração foi redissolvida em uma mistura de Metanol/diclorometano 2:1 e misturado com sílica gel 230-400 mesh formando uma pastilha de sílica. Os solventes foram removidos por evaporação ambiente e após a secagem completa do material, o mesmo foi empacotado em coluna cromatográfica e fracionado com solventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Como resultado desse fracionamento, foram obtidas as seguintes subfrações ácidas: Hexano ácida, 14,5 g; Diclorometano ácida, 8,4 g; Acetato de Etila ácida, 11,5 g e Metanol ácida, 9,4 g de *L. lanatus*, Figura 15 (pág. 54).

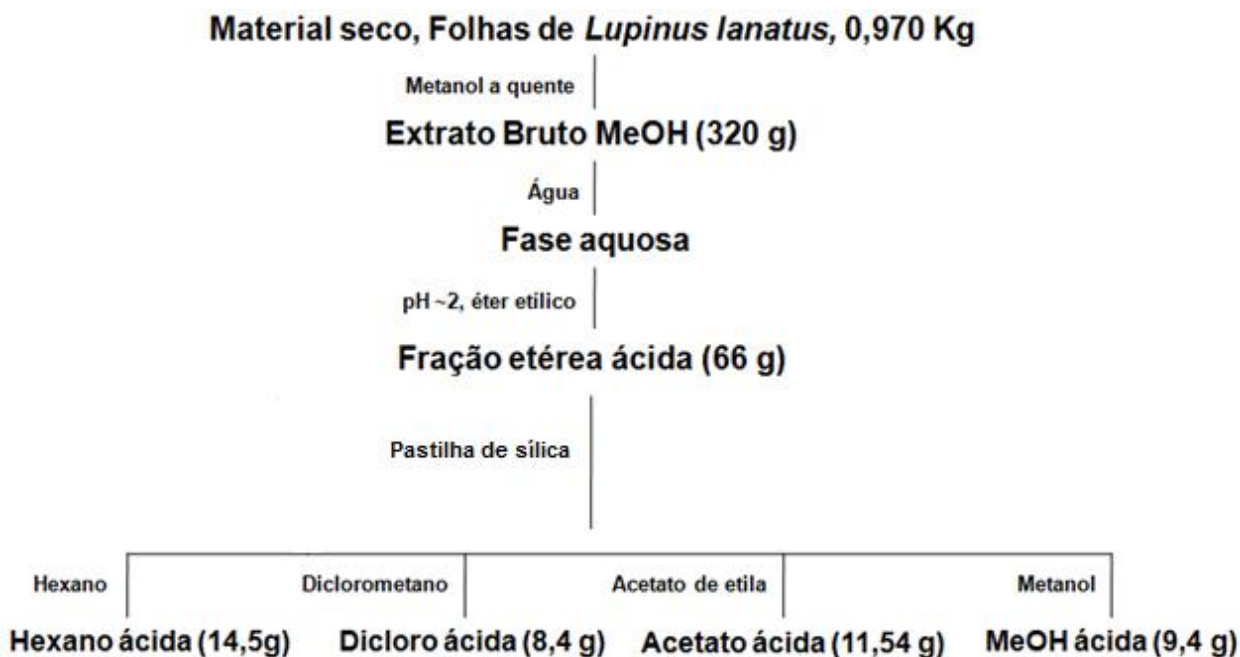


Figura 15. Esquema de fracionamento das folhas secas da espécie *L. lanatus*.

5.1.1 Análise dos Rendimentos dos Extratos e Substâncias Puras Obtidos de *L. lanatus*

Os resultados apresentados a seguir correspondem aos rendimentos de extrações, fracionamentos e isolamento dos constituintes bioativos do extrato bruto metanólico das folhas de *L. lanatus*. Após a obtenção, as amostras foram devidamente secas e pesadas. A Tabela 6 (pág. 55) apresenta os rendimentos de cada fração e substância obtida em relação ao material seco e extrato bruto provenientes das folhas de *L. lanatus*.

TABELA 6. Rendimento das frações obtidas do extrato bruto das folhas de *L. lanatus*.

Frações	Massa obtida em (g)	Rendimento em relação às folhas secas (%)	Rendimento em relação ao extrato bruto (%)
Folhas secas	970,0	-	-
Extrato Bruto	320,0	32,98	-
Etérea ácida	66,0	6,8	20,6
Hexânica ácida	14,51	1,49	4,53
Diclorometano ácida	8,4	0,87	2,62
Acetato ácida	11,54	1,18	3,6
Metanólica ácida	9,36	0,96	2,92
Diclorometano básica	24,35	2,51	7,61
^a FI1; Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo	0,045	0,0046	0,014
^b FI2	0,021	0,0022	0,0066

^a Em relação a fração etérea ácida e a acetato ácida, de onde foi obtido, o flavonoide FI1, Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo, obteve o respectivo rendimento: 0,068% e 0,39%.

^b O flavonoide FI2 obteve o respectivo rendimento em relação a fração etérea ácida e a acetato ácida: 0,032% e 0,18%.

5.1.1.1 Análise das Frações e Subfrações Ácidas Obtidas

As subfrações ácidas foram obtidas por extrações sucessivas da fração etérea ácida com solventes de gradiente crescente de polaridade. Os solventes utilizados foram Hexano, Diclorometano, Acetato de etila e Metanol. 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 específico (Acetato de Etila/Metanol, 95:5), as amostras foram eluídas. A placa de 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, e não foi detectada a presença de compostos com nitrogênio básico (alcaloides). Após, foi eluída uma nova placa de CCD com as mesmas amostras em igual sistema de solventes. Essa nova placa CCD foi revelada com Cloreto férrico (FeCl_3), sendo que este detectou a presença, em altas concentrações, de compostos fenólicos, em especial, na subfração acetato de etila ácida, sendo esta, a fração que despertou o maior interesse. Dessa forma, como um dos objetivos do trabalho é a obtenção dos flavonoides, a fração acetato de etila ácida das folhas de *L. lanatus* foi a mais interessante das três, sendo trabalhada a fim de isolar e identificar a estrutura química de seus metabólitos, bem como realizar ensaios biológicos com os mesmos.

Dessa fração, foram isoladas duas substâncias denominadas previamente de FI1 e FI2. Desses dois compostos isolados, FI1 foi identificada como Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**), Figura 16, e sua estrutura química elucidada por técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e por comparações desses dados com a literatura^{9,33,59,60,61,100,101}. A Tabela 7 (pág. 57) apresenta as subfrações que foram reunidas, os solventes utilizados e as substâncias presentes na mistura. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de FI2 sugerem a ausência da metoxila 4', sendo esta, uma ligação fenólica. Porém, os dados são inconclusivos e precisam ser analisados com maiores detalhes, por isso não foram colocados no trabalho.

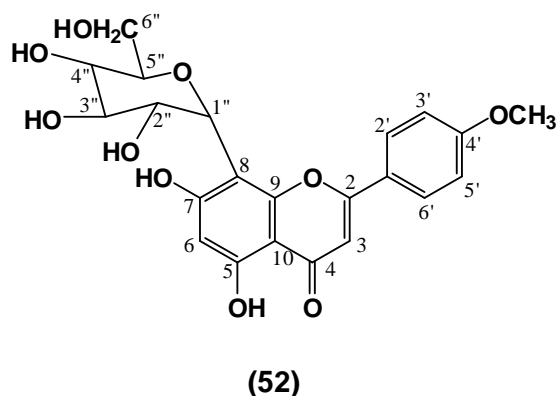


Figura 16. Estrutura química proposta para Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**).

TABELA 7. Frações reunidas após comparação por CCD da fração acetato ácida de *L. lanatus*.

Frações	Solventes (%)	Substâncias
I – 1 a 11	Acetato de etila (100)	Mistura de Substâncias
II – 12 e 20	Acetato de etila : MeOH (99:1)	Mistura de Substâncias
III – 21 a 28	Acetato de etila: MeOH (98:2)	Mistura de Substâncias
IV – 29 a 35	Acetato de etila : MeOH (97:3)	Mistura de Substâncias
V – 35 a 43	Acetato de etila : MeOH (96:4)	FI1 + mistura
VI – 44 a 58	Acetato de etila : MeOH (95:5)	FI1
VII – 58 a 65	Acetato de etila : MeOH (90:10)	Mistura de Substâncias
VIII – 66 e 75	Acetato de etila : MeOH (88:12)	FI2 + mistura
IX – 76 a 82	Acetato de etila : MeOH (85:15)	FI2
X – 83 a 90	Acetato de etila : MeOH (80:20)	FI2 + Mistura
XI – 91 a 99	Acetato de etila : MeOH (70:30)	Mistura de Substâncias
XII – 100 a 111	Acetato de etila : MeOH (70:30)	Mistura de Substâncias
XIII – 112 a 120	Acetato de etila : MeOH (60:40)	Mistura de Substâncias
XIV – 121 a 133	Acetato de etila : MeOH (50:50)	Mistura de Substâncias
XV – 134 a 150	MeOH (100)	Mistura de Substâncias

5.1.2 Protocolo de Extrações e Análise dos Rendimentos dos Extratos e Substâncias Puras Obtidos da Espécie *L. guaraniticus*

As folhas e sementes secas da espécie *L. guaraniticus* também foram trituradas e pesadas. A massa obtida para as folhas foi de 1,200 Kg e das sementes foi de 0,800 Kg. O pó seco das folhas foi diretamente extraído com álcool metílico, enquanto o material das sementes necessitou passar, primeiramente, por uma extração com Hexano, à quente, para remoção de seu óleo fixo (1,70 g). Em sequência as sementes também foram submetidas a várias extrações metanólicas, à quente, até a completa extração de seus compostos. Assim, foi obtido o extrato metanólico das folhas e sementes de *L. guaraniticus*. Após a evaporação do solvente, os extratos brutos foram pesados originando as seguintes massas: extrato metanólico das folhas (486 g); extrato metanólico sementes (280 g).

Depois da realização do procedimento acima mencionado, os extratos brutos passaram por um fracionamento Ácido-Base, igualmente ao descrito para a espécie *L. lanatus*. O resultado deste fracionamento foi: fração etérea ácida das folhas de *L. guaraniticus* (120 g), a qual foi refractionada com solventes de gradiente crescente de polaridade, originando as subfrações: Hexano ácida (11,70 g), Dicloro ácida (9,64 g), Acetato ácida (18,67 g) e Metanol ácida (12,05 g). Das folhas, foram obtidos 31,6 g da fração diclorometano básica, que apresentou uma alta concentração de alcaloides. Das sementes originaram-se a fração etérea ácida (25 g) e a fração diclorometano básica (12,4 g). Os dados referidos estão apresentados nos esquemas das Figuras 17 e 18 (pág. 59).

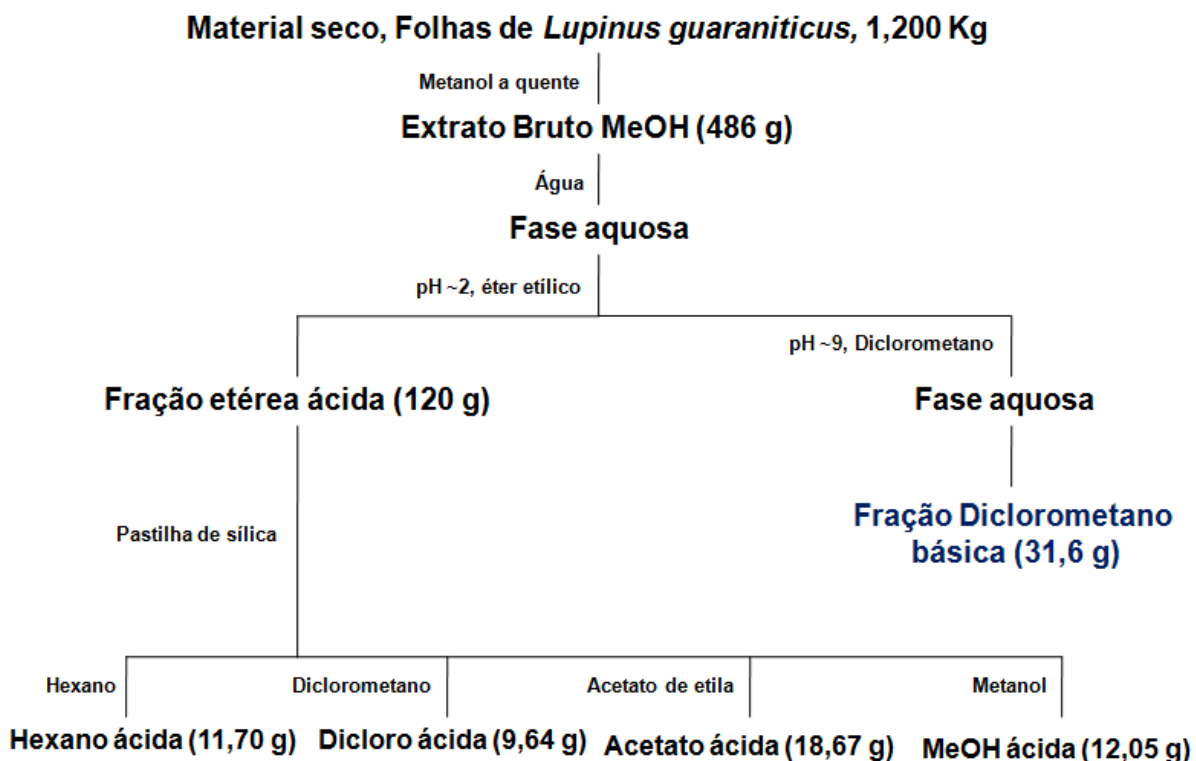


Figura 17. Esquema de fracionamento das folhas secas da espécie *L. guaraniticus*.

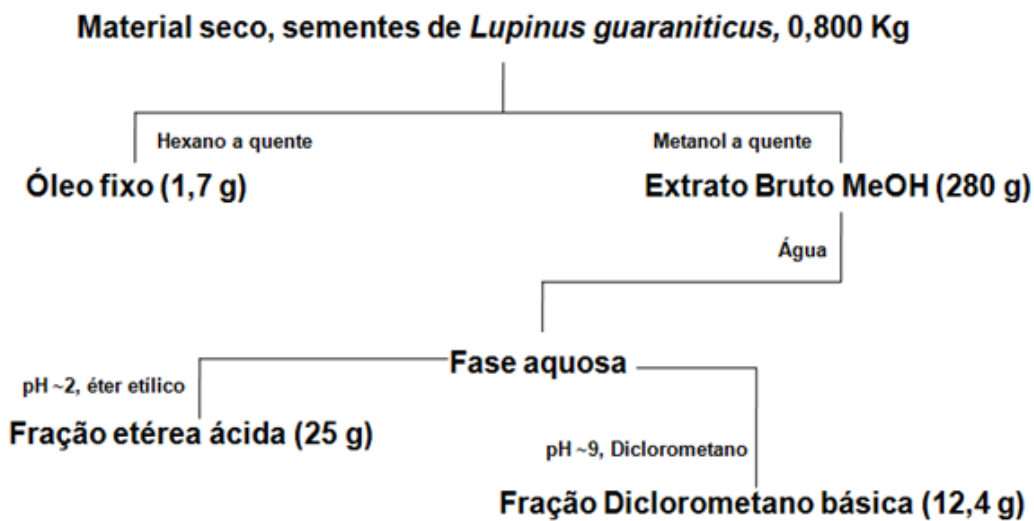


Figura 18. Esquema de fracionamento das sementes secas da espécie *L. guaraniticus*.

Os resultados apontados nas Tabelas 8 e 9 (pág. 61) representam os rendimentos das extrações, fracionamentos e isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto metanólico e frações da espécie *L. guaraniticus*. Depois de as amostras serem secas e devidamente pesadas, foram obtidos os rendimentos abaixo descritos em relação ao peso das folhas e sementes e extratos metanólicos secos.

TABELA 8. Rendimento das frações obtidas do extrato bruto das folhas de *L. guaraniticus*.

Frações	Massa obtida em (g)	Rendimento em relação às folhas secas (%)	Rendimento em relação ao extrato bruto (%)
Folhas secas	1.200	-	-
Extrato Bruto	486	40,5	-
Etérea ácida	120,3	10,1	24,7
Hexânica ácida	11,70	0,98	2,41
Diclorometano ácida	9,64	0,81	1,98
Acetato ácida	18,67	1,56	3,84
Metanólica ácida	12,05	1,0	2,48
Diclorometano básica	31,6	27,2	67,0
^a 5,6-didehidrolupanina	0,029	0,0024	0,006
^b Anagirina	0,041	0,0034	0,0084
^c 13- α -hidroxianagirina	0,055	0,0046	0,011

^a Rendimento de 5,6-didehidrolupanina em relação a fração diclorometano básica: 0,09%.

^b Rendimento de Anagirina em relação a fração diclorometano básica: 0,13%.

^c Rendimento de 13- α -hidroxianagirina em relação a fração diclorometano básica: 0,17%.

TABELA 9. Rendimento das frações obtidas do extrato bruto das sementes de *L. guaraniticus*

Frações	Massa obtida em (g)	Rendimento em relação às sementes secas (%)	Rendimento em relação ao extrato bruto (%)
Sementes secas	800	-	-
Extrato Bruto	280,0	35,0	-
Hexânica neutra	22,0	2,75	7,85
Etérea ácida	63,0	7,9	22,5
Óleo fixo	1,70	0,2	0,6
Diclorometano básica	12,4	1,55	4,43
^a Anagirina	0,033	0,0041	0,012
^b 13- α -hidroxianagirina	0,065	0,008	0,023
^c 13- α -hidroxilupanina	0,027	0,003	0,0096

^a Rendimento de Anagirina em relação a fração diclorometano básica: 0,23%.

^b Rendimento de 13- α -hidroxianagirina em relação a fração diclorometano básica: 0,52%.

^c Rendimento de 13- α -hidroxilupanina em relação a fração diclorometano básica: 0,21%.

5.1.2.1 Metabólitos Obtidos da Fração Diclorometano Básica das Folhas da Espécie *L. guaraniticus*

A fração diclorometano básica das folhas de *L. guaraniticus* (31,6 g) foi analisada por CCD em câmara escura sob lâmpada UV (254 e 365 nm) e reativo de Dragendorff. A análise preliminar detectou a presença em alta concentração de alcaloides. Assim, essa fração foi cromatografada em coluna com suporte sólido de sílica gel (230-400 Mesh) na proporção de (1:80) e diclorometano e metanol como solventes. Mistura destes solventes, com gradiente crescente de polaridade também foram utilizadas com a finalidade de isolar os metabólitos presentes nessa fração. Essa coluna gerou 137 subfrações que foram reunidas após serem monitoradas por CCD

durante o processo. Como compostos isolados nessa coluna, foram identificados três alcaloides quinolizidínicos, Anagirina **(17)**, 13- α -hidroxianagirina **(53)** e 5,6-dehidrolupanina **(54)**, Figura 19.

A Tabela 10 (pág. 63) apresenta as subfrações reunidas, os solventes utilizados e as substâncias presentes nas determinadas subfrações.

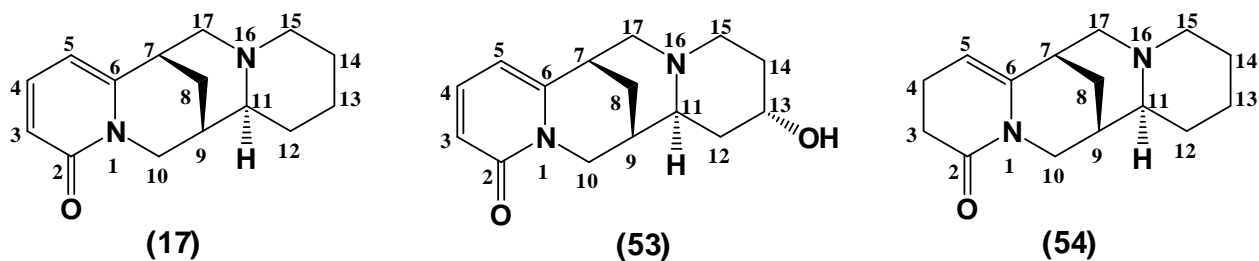


Figura 19. Estrutura química dos alcaloides, Anagirina **(17)**, 13- α -hidroxianagirina **(53)** e 5,6-dehidrolupanina **(54)** isolados das folhas de *L. guaraniticus*.

TABELA 10. Frações reunidas após comparação por CCD da fração diclorometano básica das folhas de *L. guaraniticus*.

Frações	Solventes (%)	Substâncias
I – 1 a 5	CH ₂ Cl ₂ (100)	Mistura de Substâncias
II – 6 a 11	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (99:1)	5,6-dehidrolupanina
III – 12 e 20	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (98:2)	Anagirina + mistura
IV – 21 a 29	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (97:3)	Anagirina
V – 30 e 33	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (95:5)	Mistura de Substâncias
VI – 34 a 35	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (93:7)	13- α -hidroxianagirina + mistura
VII – 36 a 40	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (92:8)	13- α -hidroxianagirina
VIII – 41 a 44	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (90:10)	Mistura de Substâncias
IX – 45 a 49	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (89:11)	Mistura de Substâncias
X – 50 a 57	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (85:15)	Mistura de Substâncias
XI – 58 e 59	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80:20)	Mistura de Substâncias
XII – 60 a 78	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80:20)	Mistura de Substâncias
XIII – 79 a 89	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (70:30)	Mistura de Substâncias
XIV – 90 a 95	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (60:40)	Mistura de Substâncias
XV – 96 a 103	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (50:50)	Mistura de Substâncias
XVI – 104 a 137	MeOH (100)	Mistura de Substâncias

5.1.2.3 Metabólitos Obtidos da Fração Diclorometano Básica das Sementes de *L. guaraniticus*

A fração diclorometano básica das sementes de *L. guaraniticus* (12,40 g) foi analisada por CCD, em câmara escura sob lâmpada UV (254 e 365 nm) e reativo de Dragendorff. Essa análise preliminar permitiu observar a presença de uma alta concentração de alcaloides, também pertencentes a classe dos quinolizidínicos. Essa fração foi cromatografada em coluna, utilizando como suporte sólido, sílica gel (230-400

Mesh) na proporção (1:90). Os solventes foram: diclorometano e metanol, e mistura destes com gradiente crescente de polaridade. Dessa coluna, foram recolhidas 121 subfrações, constantemente monitoradas por CCD. Por este acompanhamento, foi possível determinar grupos de bandas, que apresentavam o mesmo Fator de Retenção (Rf). Essas subfrações foram reunidas e submetidas a novos processos de separação por CCDP. Esse procedimento permitiu o isolamento de três alcaloides, (+)13- α -hidroxilupanina (**14**), Anagirina (**17**) e 13- α -hidroxianagirina (**53**), Figura 20. Vale ressaltar, que mesmo esses compostos não sendo inéditos, os mesmos foram isolados pela primeira vez da espécie em questão, *L. guaraniticus*, nesse trabalho. Um levantamento bibliográfico confirmou que ainda não foram realizados estudos com alcaloides da espécie mencionada. A Tabela 11 (pág. 65) apresenta as subfrações que foram reunidas, os solventes utilizados e as substâncias isoladas.

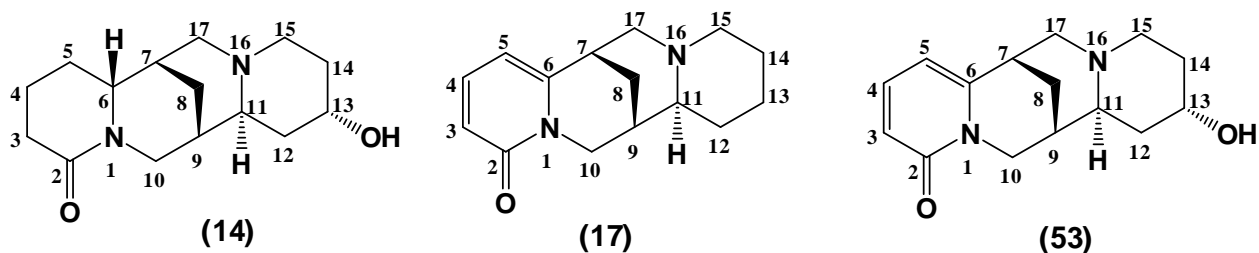


Figura 20. Estrutura química dos alcaloides (+)13- α -hidroxilupanina (**14**), Anagirina (**17**) Anagirina e 13- α -hidroxianagirina (**53**), e isolados das sementes de *L. guaraniticus*.

TABELA 11. Subfrações reunidas após comparação por CCD da fração diclorometano básica das sementes de *L. guaraniticus*.

Frações	Solventes (%)	Substâncias
I – 1 a 8	CH ₂ Cl ₂ (100)	Mistura de Substâncias
II – 8 a 17	CH ₂ Cl ₂ (100)	Mistura de Substâncias
III – 18 e 25	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (98:2)	Anagirina + mistura
IV – 26 a 28	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (97:3)	Anagirina
V – 29 e 33	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (95:5)	Mistura de Substâncias
VI – 34 a 37	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (93:7)	13- α -hidroxianagirina + mistura
VII – 38 a 41	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (92:8)	13- α -hidroxianagirina
VIII – 42 a 44	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (90:10)	(+)13- α -hidroxilupanina + mistura
IX – 45 a 47	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (89:11)	(+)13- α -hidroxilupanina
X – 48 a 55	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (85:15)	Mistura de Substâncias
XI – 56 a 59	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80:20)	Mistura de Substâncias
XII – 60 a 72	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80:20)	Mistura de Substâncias
XIII – 73 a 79	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (70:30)	Mistura de Substâncias
XIV – 80 a 85	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (60:40)	Mistura de Substâncias
XV – 86 a 92	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (50:50)	Mistura de Substâncias
XVI – 93 a 121	MeOH (100)	Mistura de Substâncias

5.1.3 Análise dos Rendimentos dos Extratos e Substâncias Puras Obtidos da Espécie *L. paranensis*

A Tabela 12 apresenta dos dados de rendimentos de frações, subfrações e substâncias isoladas em relação ao extrato bruto metanólicos das folhas de *L. paranensis*.

TABELA 12. Rendimento das frações obtidas do extrato bruto das folhas de *L. paranensis*.

Frações	Massa obtida em (g)	Rendimento em relação às folhas secas (%)	Rendimento em relação ao extrato bruto (%)
Folhas secas	1.450	-	-
Extrato Bruto	554,0	38,21	-
Etérea ácida	143,6	9,0	25,9
Hexânica ácida	15,70	1,1	2,83
Diclorometano ácida	10,4	0,71	1,88
Acetato ácida	24,7	1,70	4,46
Metanólica ácida	13,5	0,93	2,44
Diclorometano básica	46,6	3,21	8,41
^a Lupanina	0,039	0,0027	0,007
^b Lanatina A	0,102	0,0070	0,0087
^c 13- α -hidroxilupanina	0,044	0,003	0,0079
^d 13- α -tigloiloxilupanina	0,025	0,0017	0,0064

^a Rendimento de Lupanina em relação a fração diclorometano básica: 0,083%.

^b Rendimento de Lanatina A em relação a fração diclorometano básica: 0,26%.

^c Rendimento de 13- α -hidroxilupanina em relação a fração diclorometano básica: 0,09%.

^d Rendimento de 13- α -tigloiloxilupanina em relação a fração diclorometano básica: 0,1%.

As folhas secas da espécie *L. paranensis* passaram pelo mesmo esquema geral de extração e fracionamento já descritos para as folhas das espécies *L. guaraniticus* e *L. lanatus*. Primeiramente, uma extração metanólica à quente e posteriormente uma extração ácido-base. A Figura 21 mostra o esquema de extração e fracionamento, bem como as quantidades de produtos obtidos no fim de cada processo para as folhas da espécie *L. paranensis*. As flores da espécie relacionada também foram estudadas em sua constituição secundária. Porém, nessa parte da planta foi observado os mesmos alcaloides obtidos nas folhas da espécie. Nesse contexto, os dados das flores não foram apresentados no trabalho.

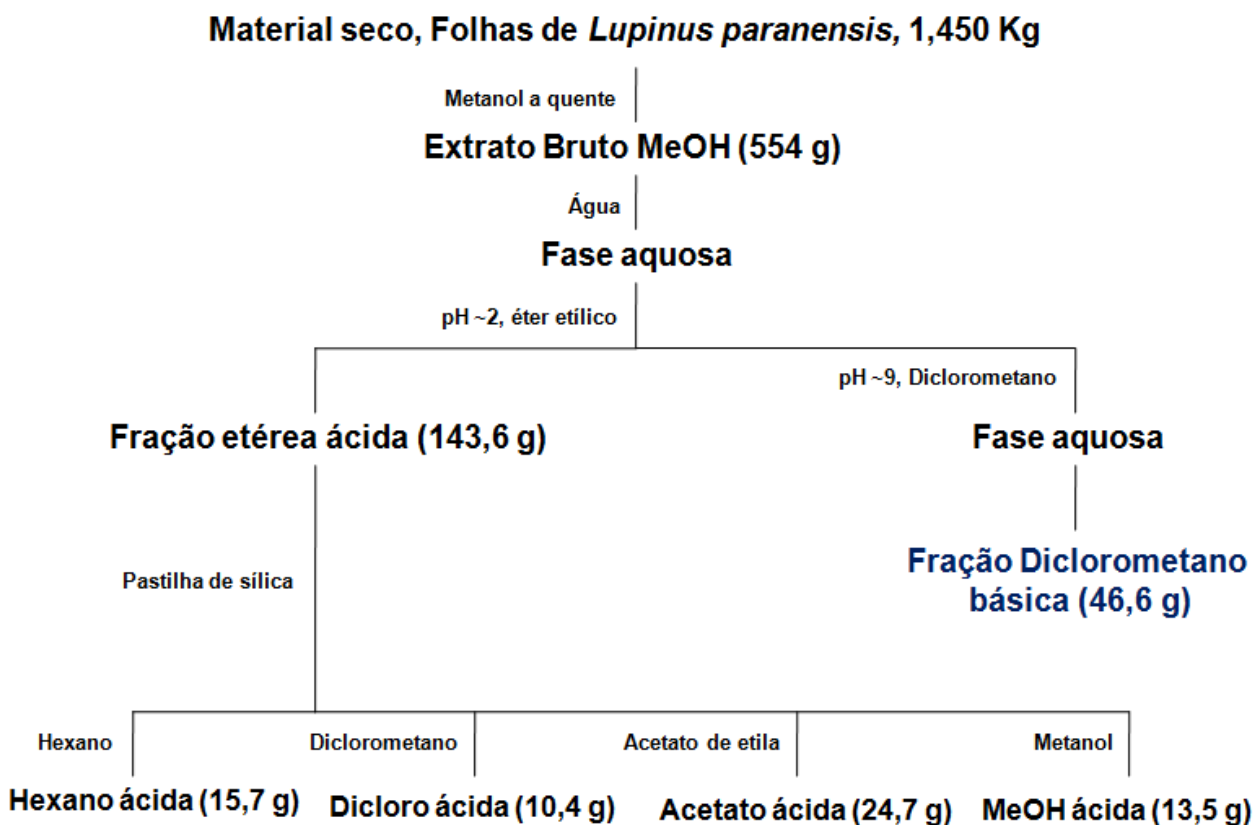


Figura 21. Esquema de fracionamento das folhas secas da espécie *L. paranensis*.

5.1.3.1 Análise da Fração Diclorometano Básica das Folhas de *L. paranensis*

A fração diclorometano básica das folhas de *L. paranensis* (46,6 g) apresentou positividade para alcaloides frente ao reativo de Dragendorff. Após análise prévia, a referida fração foi colunada em suporte sólido de sílica gel (230-400 Mesh) na proporção (1:90) com diclorometano e metanol como solventes, e mistura destes com gradiente crescente de polaridade. Ao final do procedimento, foram recolhidas 142 subfrações, as quais eram monitoradas CCD durante todo o tempo.

Dessa coluna foram isolados e identificados quatro alcaloides quinolizidínicos, (+)Lupanina **(1)**, (+)13- α -hidroxilupanina **(14)**, 13- α -*cis*-tigloiloxilupanina **(19)** e (+)Lanatina A **(25)**, Figura 22.

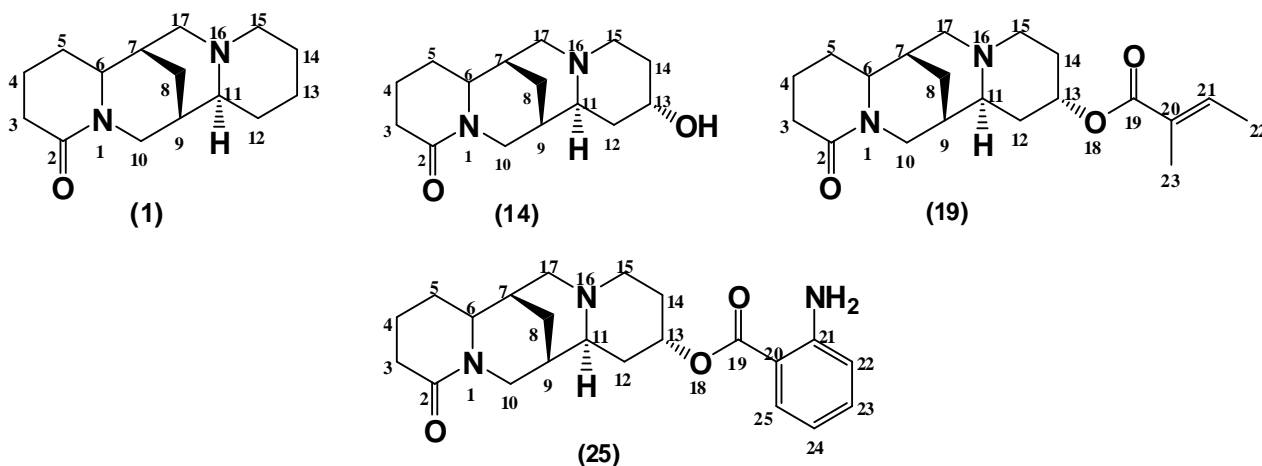


Figura 22. Estrutura química dos alcaloides (+)Lupanina **(1)**, (+)13- α -hidroxilupanina **(14)**, 13- α -*cis*-tigloiloxilupanina **(19)** e (+)Lanatina A **(25)**, de *L. paranensis*.

A Tabela 13 (pág 69) apresenta as subfrações reunidas, os solventes utilizados e as substâncias presentes nas determinadas subfrações.

TABELA 13. Frações reunidas após comparação por CCD da fração diclorometano básica das folhas de *L. paranensis*.

Frações	Solventes (%)	Substâncias
I – 1 a 10	CH ₂ Cl ₂ (100)	Mistura de Substâncias
II – 11 a 21	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (99:1)	Mistura de Substâncias
III – 22 e 30	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (98:2)	13- α -tigloiloxilupanina
IV – 31 a 39	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (95:3)	Mistura de Substâncias
V – 40 e 47	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (95:5)	Lupanina + mistura
VI – 48 a 50	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (94:6)	Lupanina
VII – 51 a 60	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (92:8)	Mistura de Substâncias
VIII – 61 a 64	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (90:10)	Lanatina A + mistura
IX – 65 a 69	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (89:11)	Lanatina A + mistura
X – 70 a 73	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (88:12)	Lanatina A
XI – 74 e 79	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (85:15)	Mistura de Substâncias
XII – 80 a 88	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80:20)	13- α -hidroxilupanina
XIII – 89 a 93	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (70:30)	Mistura de Substâncias
XIV – 94 a 98	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (60:40)	Mistura de Substâncias
XV – 99 a 112	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (50:50)	Mistura de Substâncias
XVI – 113 a 142	MeOH (100)	Mistura de Substâncias

5.1.3.2 Síntese de Derivados Estruturais Obtidos a Partir do Composto Isolado e Identificado como (+) Lanatina A (25)

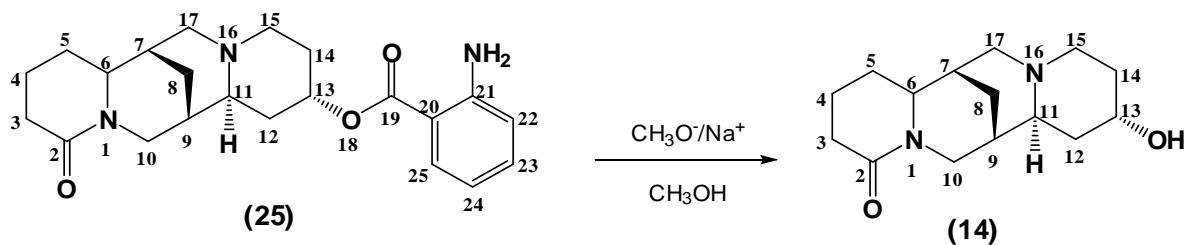
A (+)Lanatina A (**25**) foi um metabólito isolado pela primeira vez da espécie *L. lanatus* em um trabalho anterior realizado no grupo do professor Ademir Farias Morel. Dessa planta foram obtidos aproximadamente 37 mg de substância. Novos estudos com a espécie *L. paranensis*, permitiram o isolamento de uma alta quantidade desse metabólito, 102 mg. Essa maior quantidade do composto, inicialmente, permitiu a proposta de dois derivados sintéticos, pois, de acordo com a literatura^{88,89}, alguns

alcaloides quinolizidínicos possuem uma elevada atividade antidiabética e antitumoral. Nesse sentido, foram propostas duas reações de derivatização de grupos funcionais para **(25)**.

Com a pretensão de testar o efeito hipoglicemiante desses compostos, bem como seu comportamento frente a microrganismos patogênicos, foi dado o passo inicial na busca de bioativos com potenciais propriedades farmacológicas de derivados sintéticos de alcaloides quinolizidínicos. Assim, o composto **(25)** foi derivatizado por duas reações simples para avaliar a importância da presença do grupo carbonila da lactama e do grupamento derivado éster aromático *O*-substituído por ($-NH_2$) frente a microrganismos patogênicos e na atividade, *in vitro*, com a enzima DPP-IV. Conforme os esquemas racionais da Figura 23 foram obtidos os seguintes compostos: (+)13- α -hidroxilupanina sintética **(14)** e 13- α -hidroxisparteína sintética **(55)**.

Primeiramente, **(25)** foi hidrolisado com solução de metóxido de sódio (CH_3O^-/Na^+) formando **(14)**. Posteriormente, o derivado **(14)** teve a ($C=O$) da amida reduzida a (CH_2) com $LiAlH_4$, em meio anidro e refluxo por 6 horas originando o produto **(55)**.

Esquema 1



Esquema 2

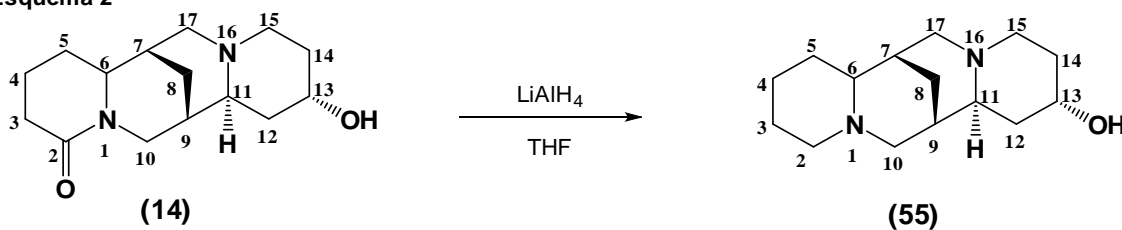
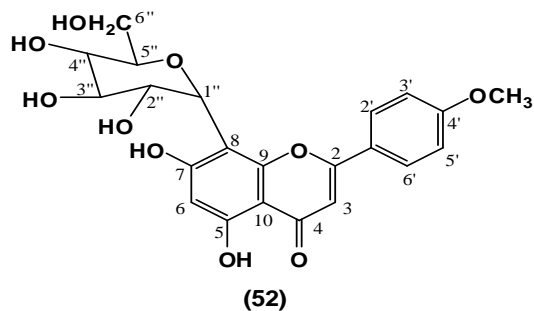


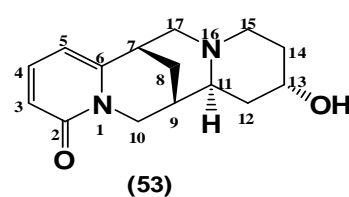
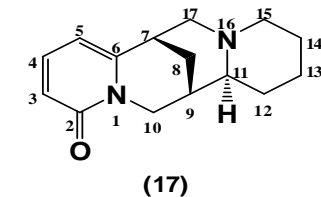
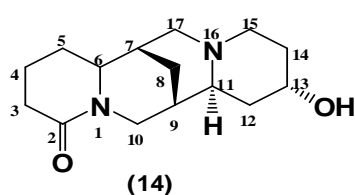
Figura 23. Esquemas de derivatização de (+)Lanatina A para obtenção do composto 13- α -hidroxilupanina sintética **(14)** e 13- α -hidroxisparteína sintética **(55)**.

O esquema da Figura 24 apresenta a distribuição das estruturas químicas das substâncias identificadas nas três espécies do gênero *Lupinus* em estudo.

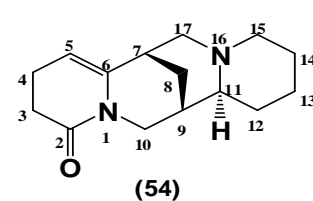
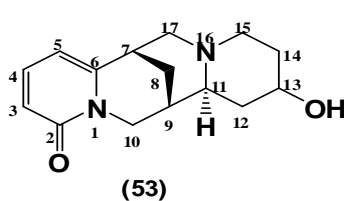
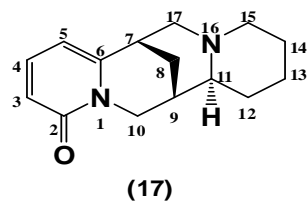
Espécie *Lupinus lanatus*- Folhas



Espécie *Lupinus guaraniticus* - Sementes



Espécie *Lupinus guaraniticus* - Folhas



Espécie *Lupinus paranensis* - Folhas

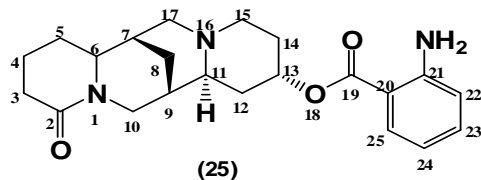
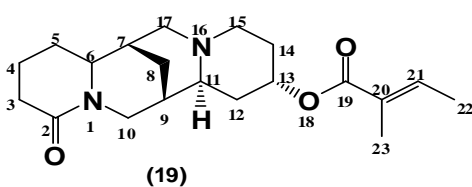
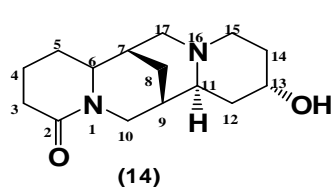
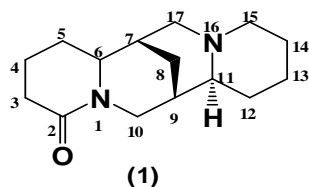


Figura 24. Esquema da distribuição das estruturas químicas dos compostos isolados e identificados em espécies do gênero *Lupinus*.

5.2 PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ALCALOÍDICOS DA CASCA DAS RAÍZES DA ESPÉCIE *W. douradinha* COLATADA EM DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

As plantas têm seu metabolismo dividido em duas vias, o metabolismo primário, responsável pela manutenção fisiológica da mesma e o metabolismo secundário, ao qual está associado a síntese de substâncias que a planta utiliza para conseguir suportar as interperes do ambiente.² Vários estudos demonstram que essa composição secundária é bastante variada, mesmo para plantas da mesma espécie que encontram-se em locais distintos. Assim, o metabolismo secundário de um vegetal depende: da espécie, da altitude, pressão atmosférica, temperatura, incidência de luz, umidade do ar, composição química de micro e macronutrientes do solo, predação por herbivoria, entre outros fatores.² Nesse sentido, o trabalho com a espécie *W. douradinha*, *Sterculiaceae*, teve como principal objetivo observar a composição química do solo em diferentes locais do estado do Rio Grande do Sul e determinar uma correlação desta com a composição alcaloídica das plantas. Assim, a referida espécie foi coletada nas marginais das cidades de São Pedro do Sul, Palmeira das Missões, Cruz Alta e Passo Fundo, a fim de determinar como um dos fatores ambientais descritos, o solo, pode influenciar sua produção de alcaloides.

5.2.1 Obtenção dos Extratos Alcaloídicos de *W. douradinha*, *Sterculiaceae*

O material seco (casca das raízes) foi moído e pesado originando as seguintes massas: Coleta São Pedro do Sul (0,480 Kg); Palmeira das Missões (0,320 Kg); Cruz Alta (1,150 Kg) e Passo Fundo (0,600 Kg).

O pó da casca das raízes foi submetido a sucessivas extrações metanólicas, à quente, seguido da evaporação do solvente com rotaevaporador sob pressão reduzida. Depois de os extratos serem completamente secos e liofilizados, estes foram pesados e

obteve-se as massas: Coleta São Pedro do Sul (0,102 Kg); Palmeira das Missões (0,093 Kg); Cruz Alta (0,225 Kg) e Passo Fundo (0,110 Kg).

Os extratos secos foram ressuspensos em água e acidificados até pH ~ 2,0 com solução de HCl 0,20 M, posteriormente, foram realizadas extrações sucessivas com éter etílico até este tornar-se incolor. O solvente foi evaporado levando a fração etérea ácida. A fração aquosa remanescente foi alcalinizada com solução 0,2 M de NH₄OH até pH ~ 9 e sucessivas extrações com éter etílico foram realizadas até que todo o conteúdo alcaloídico fosse obtido, conforme esquema apresentado na Figura 25 (pág. 74).

Ao fim das extrações, uma pequena quantidade de cada fração etérea básica foi solubilizada, em solventes apropriados e aplicada em placa de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Sob um sistema eluente apropriado, (CHCl₃/MeOH, 98:2 v/v + 3 gotas de NH₄OH conc. para cada 10 ml da mistura), Figura 26 (pág. 74), as amostras foram eluídas. A placa CCD foi analisada em câmara escura de UV (254 e 365 nm), verificando-se várias bandas com separação adequada para todas as amostras. Após, foi borrifado o reativo de Dragendorff, que detectou a presença de nitrogênio básico nas mesmas, sendo positivo para alcaloides.

O extrato de alcaloides da espécie *W. douradinha*, coletada na cidade de São Pedro do Sul, não necessitou passar por coluna cromatográfica devido a boa separação de seus metabólitos com o sistema de solvente utilizado na CCD. Assim, baseado nesse sistema eluente, a mistura de alcaloides foi diretamente submetida a uma separação por CCDP. Na CCDP, o sistema de solventes proposto foi o seguinte: CHCl₃/MeOH, 92:8 v/v + 25 gotas de NH₄OH conc. para cada 100 ml da mistura. Durante a aplicação da amostra nas placas de CCDP, também teve-se o cuidado de fazê-lo na forma de pontos de aplicação com distância de 0,5 cm entre um ponto e outro, isso para favorecer a separação das bandas. Após eluídas seis placas de CCDP, foi obtida massa suficiente para a identificação e elucidação estrutural de seis metabólitos, sendo três alcaloides quinolônicos e três ciclopeptídicos. Os compostos obtidos estão listados e identificados como: Walteriona-A (**43**), Walteriona-B (**44**), Antidesmona (**56**), AdoutinaY' (**57**), Waltherina-A (**58**) e Waltherina-C (**59**).

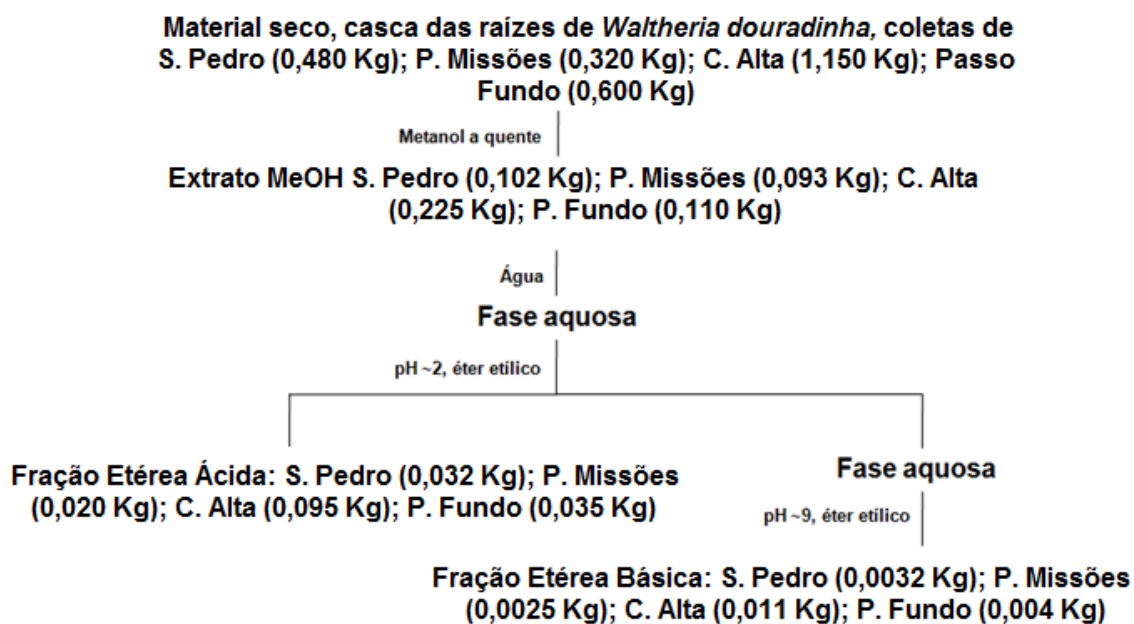


Figura 25. Esquema de fracionamento das cascas das raízes secas da espécie *W. douradinha*.

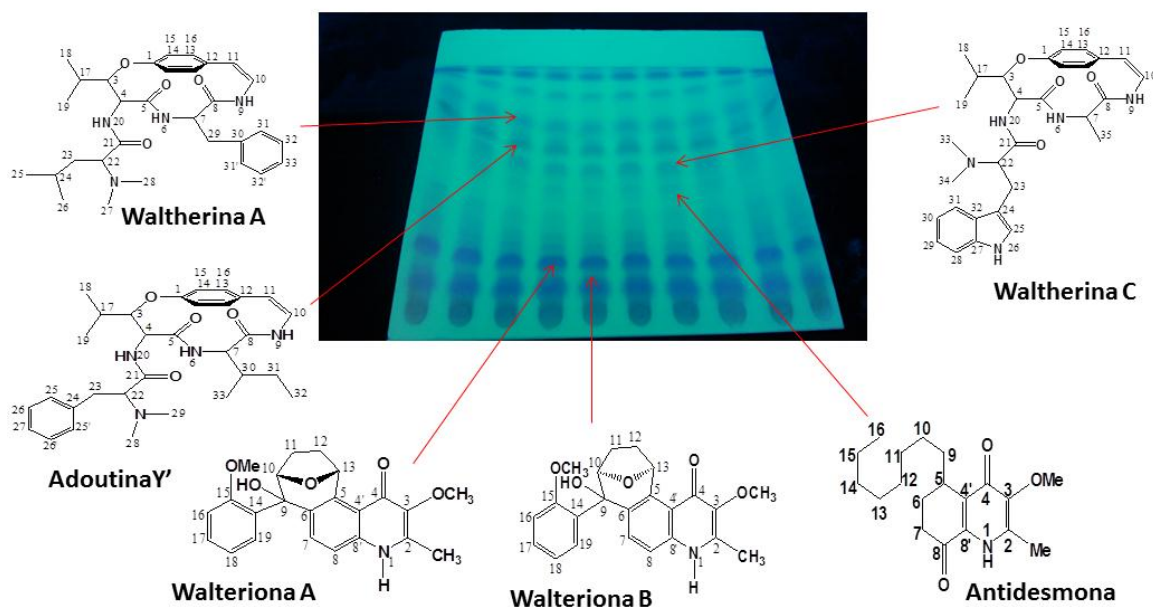


Figura 26. Cromatografia em Camada Delgada do extrato alcaloídico da espécie *W. douradinha* – coleta São Pedro do Sul, sistema eluente ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 98:2 v/v + 3 gotas de NH_4OH conc. para cada 10 ml da mistura).

5.3 DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C UNI E BIDIMENSIONAIS DAS SUSTÂNCIAS ISOLADAS DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *Lupinus*, *L. lanatus*, *L. guaraniticus* e *L. paranensis*

5.3.1 Obtenção do Flavonoide Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**)

O composto (**52**) foi isolado da subfração acetato de etila ácida por partição da fração étera ácida obtida do extrato metanólico das folhas de *L. lanatus*. A mesma foi purificada em coluna cromatográfica (CC) utilizando como suporte sílica gel 230-400 mesh, conforme descrito na Tabela 7 (pág. 57). O sistema eluente utilizado para sua purificação foi Acetato de Etila:Metanol na razão (95:5 v/v).

A substância (**52**) apresenta-se como um sólido verde claro pouco solúvel em CHCl_3 e CH_3OH e solúvel em DMSO. Nos ensaios de CCD, a Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**) apresentou um R_f : 0,47 no sistema eluente Acetato de etila:Metanol (94:6 v/v), positivo para Cloreto Férrico (FeCl_3), o que sugere a presença hidroxilas fenólicas, Figura 27.

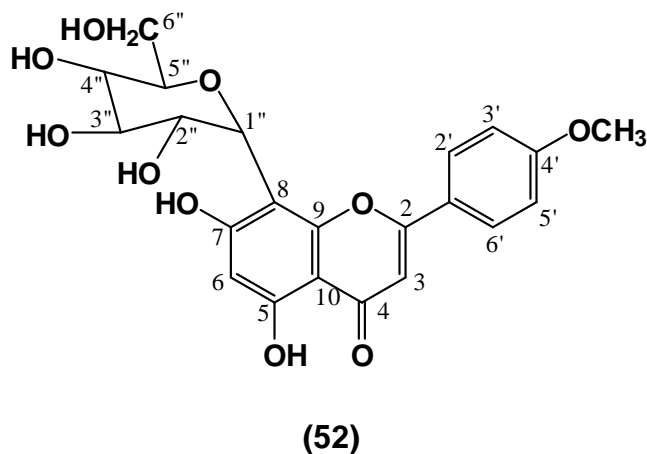


Figura 27. Estrutura química do composto isolado e identificado como Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**), F11, das folhas de *L. lanatus*.

5.3.1.1 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**)

Os dados de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C de (**52**) foram obtidos em um Espectrômetro da marca Bruker DPX 400, que opera nas faixas de frequências de 400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C . Os espectros obtidos proporcionaram excelentes parâmetros para a elucidação da estrutura química da substância isolada.

Os tubos de ressonância utilizados foram de 5 mm de diâmetro e o solvente para solubilizar a amostra foi dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Como padrão interno foi utilizado o TMS, Tetrametilsilano.

5.3.1.2 Análise dos Dados de RMN de ^1H Unidimensional de Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**), F11

No espectro de RMN de ^1H de (**52**), Figura 28 (pág. 77) obtido em (DMSO-d_6), são observados os seguintes sinais: multiplete entre δ 3,3-3,9 ppm sugerindo a presença de uma porção glicosídica. Um singleto em δ 3,86 ppm com integração de 3H indica a presença de uma metoxila ($-\text{OCH}_3$).

No deslocamento químico de δ 6,3 ppm (1H, s, H6) e δ 6,8 ppm (1H, s, H3) são mostrados os hidrogênios, H6 e H3 isolados no anel (A). Os picos em δ 7,0 ppm (2H, *d*, $J = 8$ Hz, H3' e H5'); δ 8,1 ppm (2H, *d*, $J = 12$ Hz, H2' e H6') e δ 13,0 ppm (1H, *d*, $J = 1,6$ Hz, 5-OH), sugerem que o anel (B) de (**52**) é *p*-substituído por uma metoxila. Esta porção é melhor visualizada na expansão do espectro RMN ^1H entre δ 6,2 e 8,2 ppm, Figura 29 (pág.78).

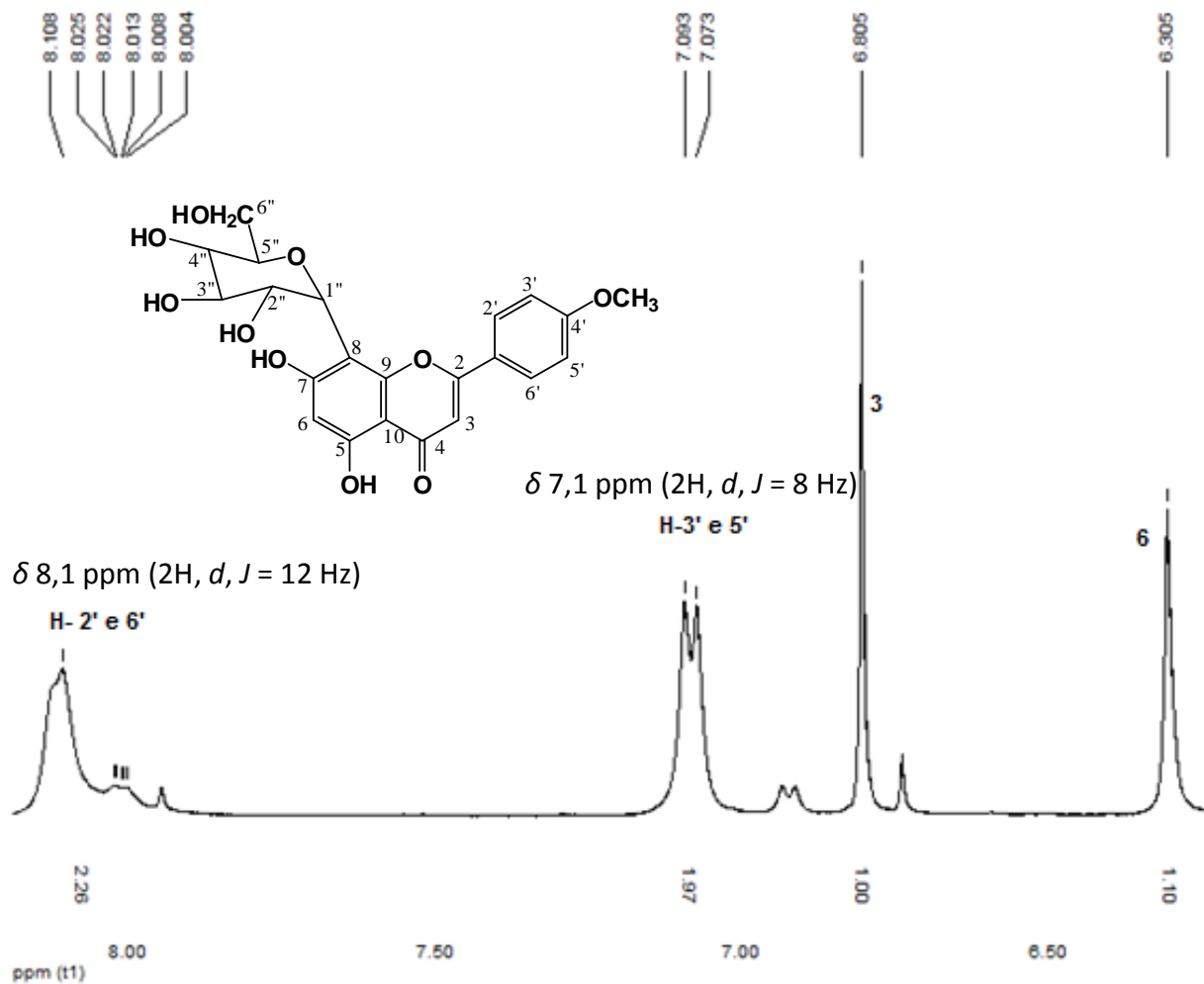


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H expandido (região de δ 6,2 a δ 8,2 ppm) do flavonoide Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO- d_6 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

O hidrogênio (H1'') é mostrado em δ 4,7 ppm (1H, d , $J = 7,2$ Hz, H1'') na expansão do espectro de RMN ^1H - região entre δ 3,0 e 5,0 ppm, Figura 30 (pág.79).

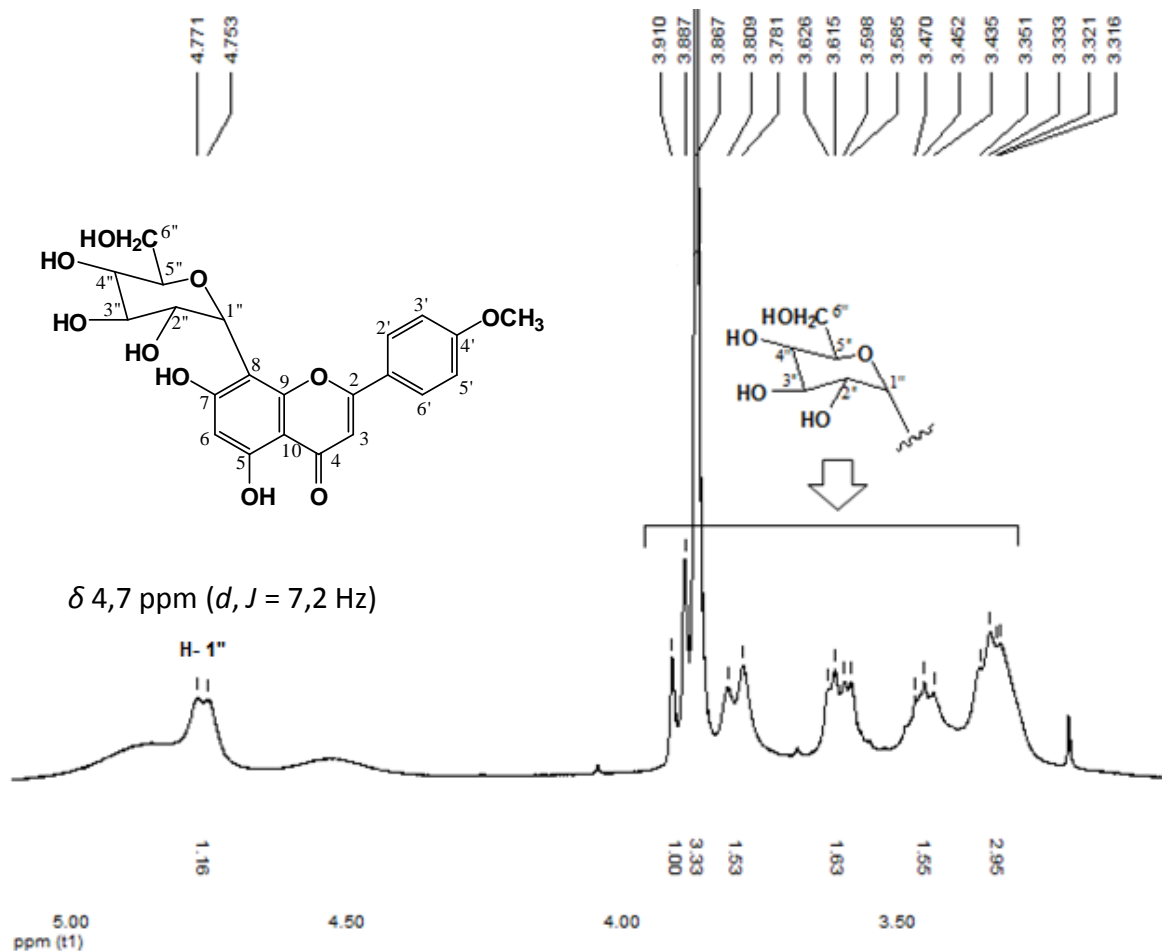


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H expandido (região de δ 3,0 a δ 5,0 ppm) do flavonoide Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO-d_6 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

Os dados de RMN ^1H obtidos foram comparados aos dados da literatura^{9,33,59,60,61,100,101}, proporcionando a elucidação da estrutura química deste composto. A Tabela 14 (pág. 80) apresenta a comparação dos dados de RMN de ^1H obtidos para (**52**) com os dados presentes na literatura^{9,100}.

TABELA 14. Dados dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^1H em DMSO-d_6 obtidos experimentalmente para a substância identificada como Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**) em comparação com a literatura.^{9,100}

Hidrogênios atribuídos	Experimental (52)	Literatura ^{9,100}
5-OH	13,0 ppm; 1H, <i>d</i> , $J = 1,6$ Hz	-
H2' e H6'	8,1 ppm; 2H, <i>d</i> , $J = 12$ Hz	7,9 ppm; <i>d</i> , $J = 9$ Hz
H3' e H5'	7,0 ppm; 2H, <i>d</i> , $J = 8$ Hz	7,0 ppm; <i>d</i> , $J = 9$ Hz
H3	6,8 ppm; 1H, <i>s</i>	6,67 ppm
H6	6,3 ppm; 1H, <i>s</i>	6,44 ppm
OCH₃	3,86 ppm; 3H, <i>s</i>	3,8
H1''	4,7 ppm; 1H, <i>d</i> , $J = 7,2$ Hz	5,2 ppm; <i>d</i> , $J = 7$ Hz
Açúcar	3,3 – 3,9 ppm; <i>m</i>	-

5.3.1.3 Análise dos dados de RMN de ^{13}C unidimensionais de Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**), FI1

O experimento de RMN de ^{13}C do composto (**52**), Figura 31 (pág.82), foi obtido em DMSO-d_6 . Os sinais apresentados por este espectro, também foram comparados com a literatura^{9,100}, corroborando para a correta identificação da estrutura como sendo a Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo. A presença de seis picos na região de deslocamento químico entre δ 61,3 – 81,8 ppm, reforça a presença do resíduo de açúcar. Em δ 55,5 ppm aparece um sinal indicativo de metoxila. A carbonila do anel (C) é mostrada como um singleto de alta intensidade em δ 182,0 ppm.

A Tabela 15 mostra a atribuição mais detalhada para os carbonos dessa estrutura, bem como a comparação dos mesmos com a literatura.^{9,100}

TABELA 15. Dados dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 obtidos experimentalmente para a substância identificada como Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**) em comparação com a literatura.^{9,100}

^{13}C atribuídos	Experimental (52)	Literatura ⁹	Literatura ^{9,100}
OCH3	55,5 ppm	55,56 ppm	
C6''	61,3 ppm	61,27 ppm	61,5 ppm
C4''	70,5 ppm	70,51 ppm	70,4 ppm
C2''	70,9 ppm	70,9 ppm	71,4 ppm
C1''	73,4 ppm	73,4 ppm	73,9 ppm
C3''	78,7 ppm	78,68 ppm	78,8 ppm
C5''	81,8 ppm	81,85 ppm	81,4 ppm
C6	98,2 ppm	98,23 ppm	
C3	103,1 ppm	103,14 ppm	
C10	104,06 ppm	104,11 ppm	
C8	104,6 ppm	104,65 ppm	
C3' e C5'	114,41 ppm	114,42/115,82 ppm	
C1'	123,2 ppm	123,23 ppm	
C2' e C6'	128,8 ppm	128,8/128,94 ppm	
C9	156,0 ppm	156,04 ppm	
C5	160,4 ppm	160,41 ppm	
C4'	162,3 ppm	162,32 ppm	
C7	162,8 ppm	162,69 ppm	
C2	163,5 ppm	163,52 ppm	
C4	182,1 ppm	182,1 ppm	

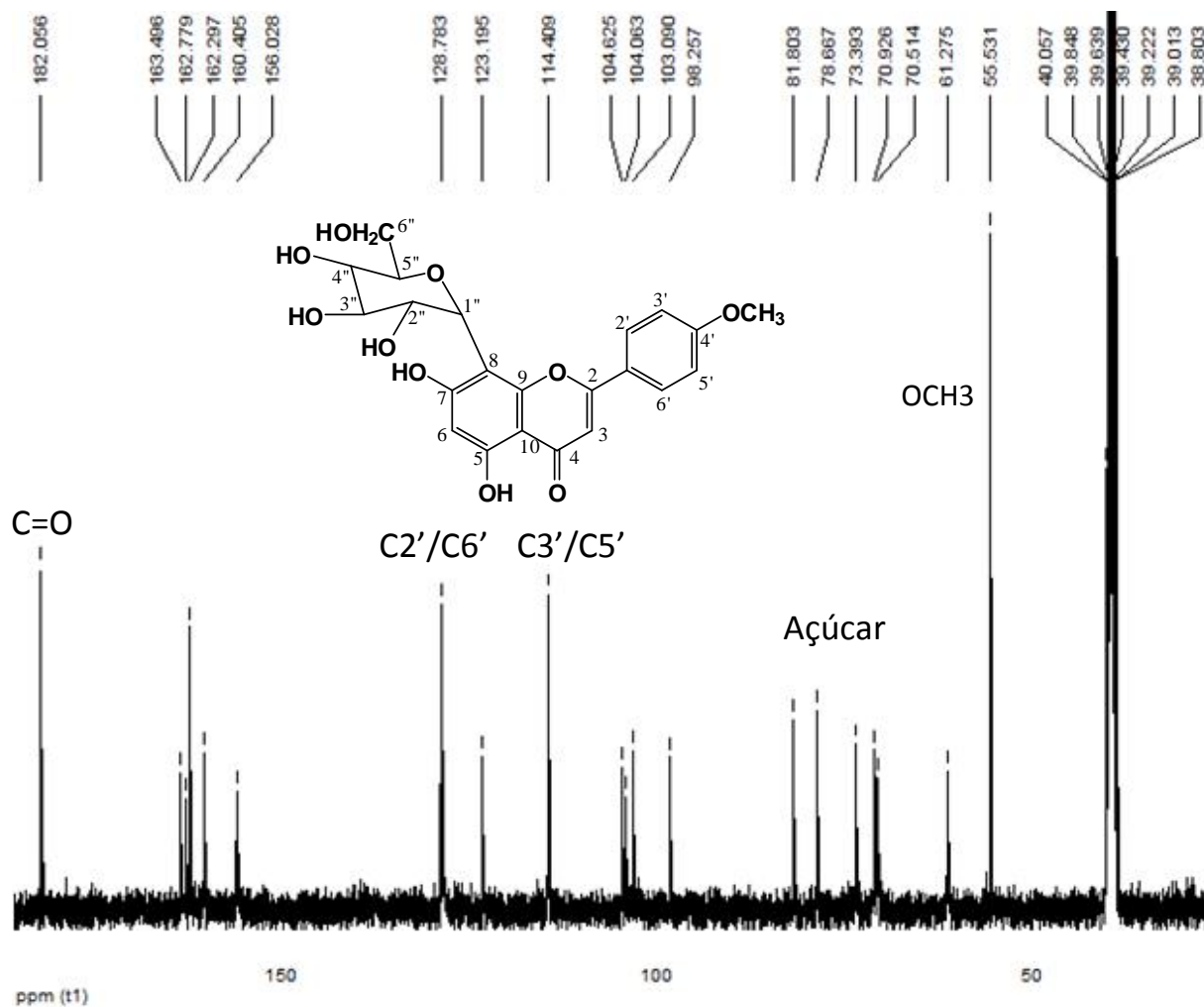


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C do flavonoide Flavona 8- β -C-glicosilada-citososídeo (52) obtido em DMSO-d_6 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

As expansões do espectro de RMN de ^{13}C do flavonoide Flavona 8- β -C-glicosilada-citososídeo mostrados nas Figuras 32 e 33 (pág. 83, região entre de δ 55,0 a 182,1 ppm e 84, região entre de δ 55,0 a 82,0 ppm), mostram com maiores detalhes os sinais de ^{13}C obtidos para o composto em estudo.

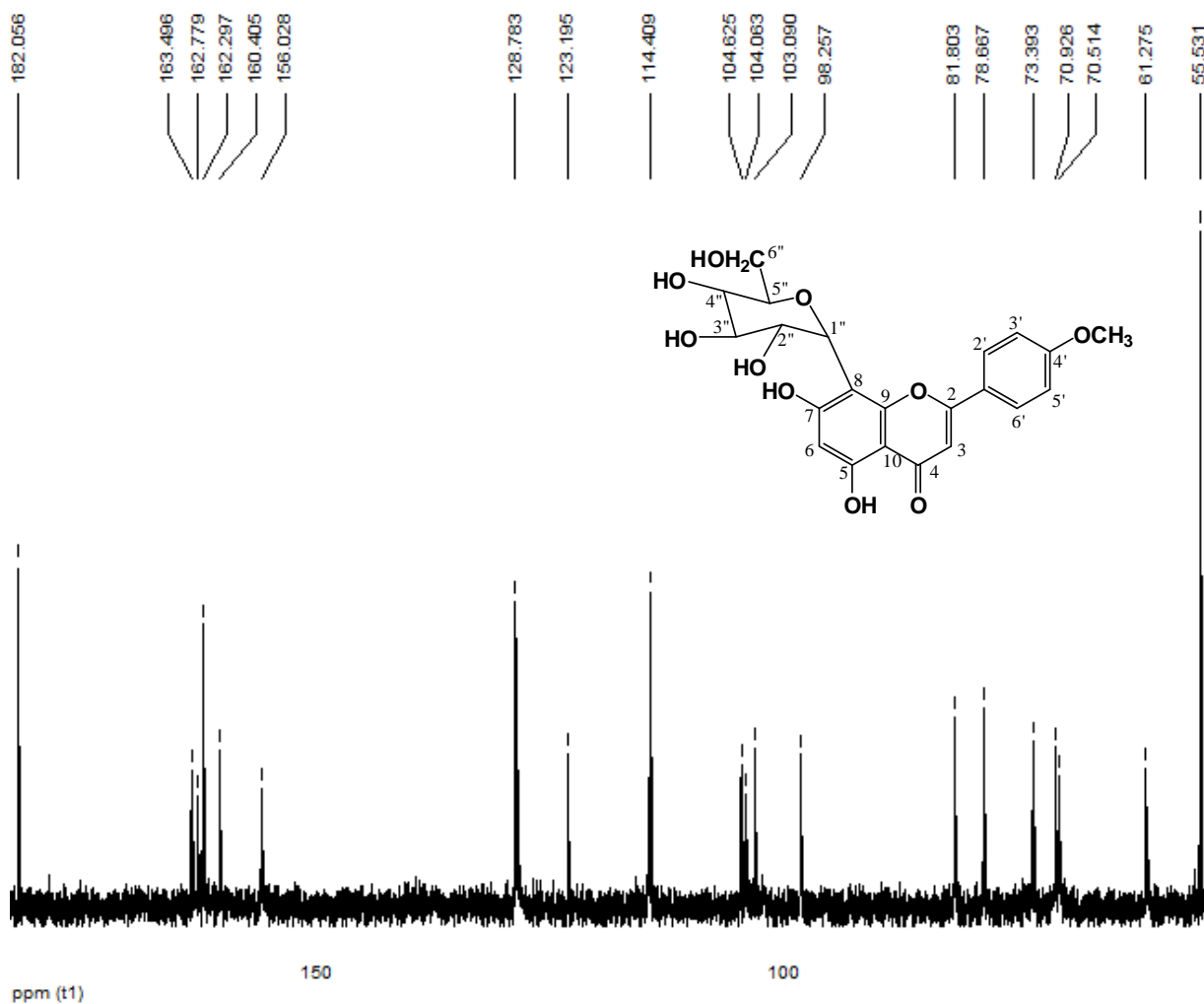


Figura 32. Espectro de RMN de ¹³C expandido (região de δ 55,0 a δ 182,1 ppm) do flavonoide Flavona 8- β -C-glicosilada-citosisídeo (**52**) obtido em DMSO-d₆ à 100,62 MHz e 25 °C.

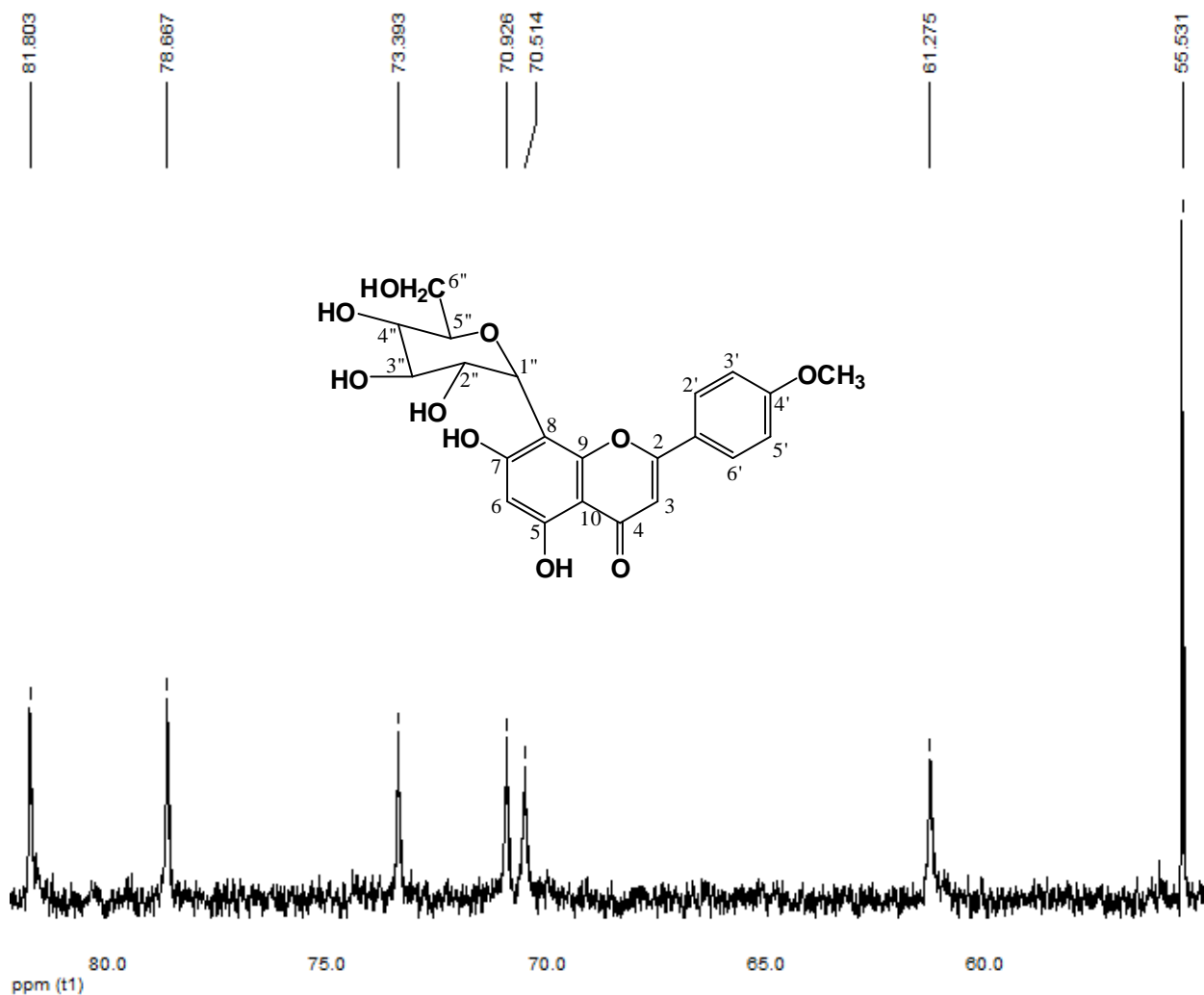


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C expandido (região de δ 55,0 a δ 82,0 ppm) do flavonoide Flavona 8- β -C-glicosilada-citrososídeo (**52**) obtido em DMSO- d_6 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

Na página 85 é apresentado o espectro de RMN de ^{13}C bidimensional DEPT 135 $^\circ$ de **(52)**, Figura 34. Nesse experimento, os carbonos quaternários não são mostrados, enquanto os carbonos metilênicos (CH_2), aparecem na fase negativa e os carbonos metílicos e metínicos, respectivamente, CH_3 e CH , são mostrados na fase positiva do espectro.

5.3.1.3 Dados de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135° , de Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**), F11

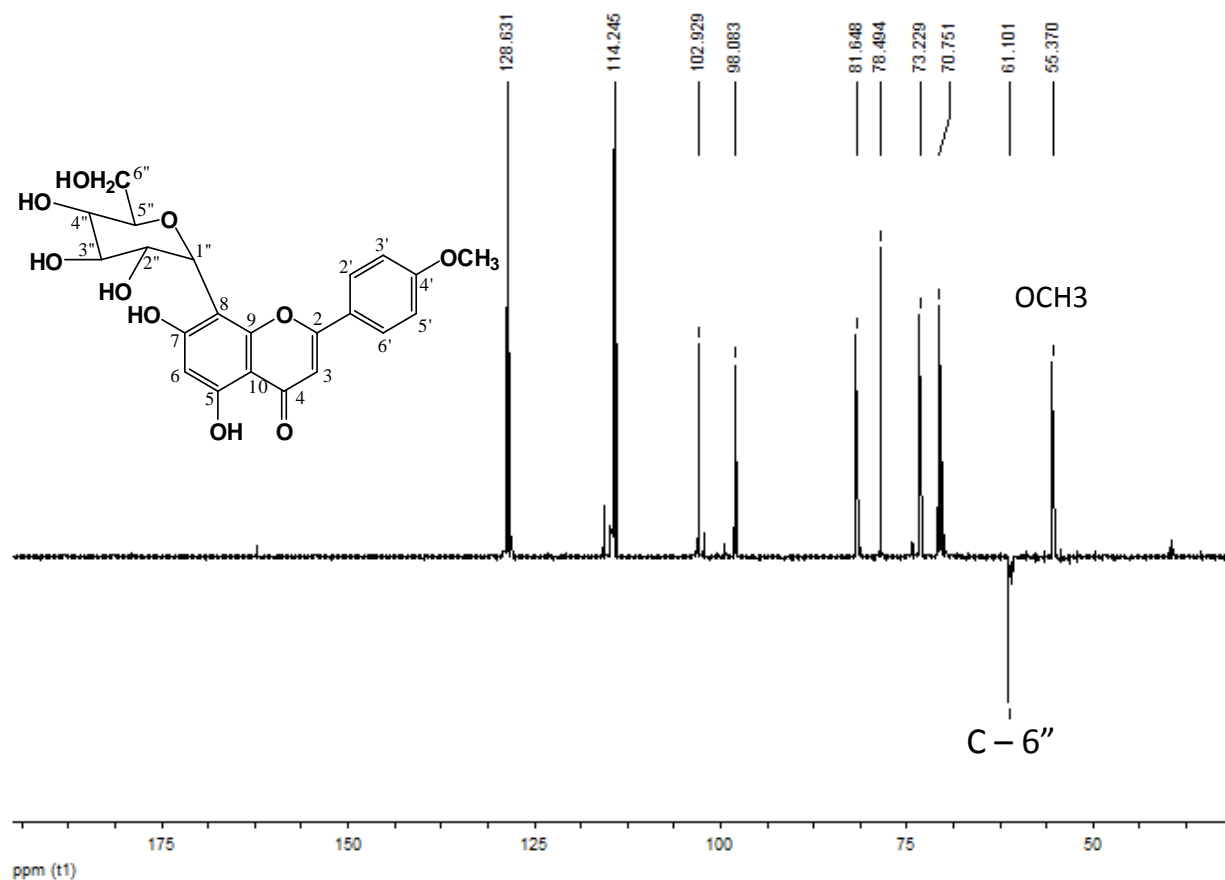
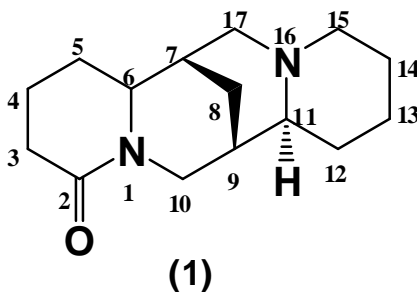


Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C Bidimensional DEPT 135° do flavonoide Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**) obtido em DMSO- d_6 à 100,62 MHz e 25°C .

No espectro representado pela figura 34, pode-se ver claramente o desaparecimento dos sinais dos carbonos (C -4', C-1', C-2, C-4, C-5, C-7 e C-8), todos quaternários. Em contra-partida, o carbono C-6'' é mostrado como um pico na fase negativa do espectro em δ 61,2 ppm. O DEPT 135° de (**52**) ainda apresenta nove sinais correspondentes aos (CH) aromáticos e do açúcar. Os sinais da porção osídica, na região de deslocamento químicos de δ 70,0 – δ 71,0 ppm, ficaram sobrepostos dando a impressão de um singlete. Esses dois sinais são melhor visualizados na Figura 33 (pág.

84). A metoxila (-OCH₃) é mostrada em δ 55,5 ppm na fase positiva do espectro da mesma forma que os carbonos metínicos (CH) presentes na molécula.

5.3.2 Obtenção do alcaloide (+) Lupanina (1)



A substância **(1)** foi obtida da fração diclorometano básica das folhas de *L. paranensis*.

O composto **(1)** foi purificado em coluna cromatográfica (CC) utilizando como suporte sílica gel 230-400 mesh e sistema eluente com polaridade crescente, conforme descrito na Tabela 13, pág. 69.

A substância **(1)** foi obtido como um composto de característica oleosa de coloração amarelo claro com $[\alpha]_D^{25} = +64^\circ$; (c 0.1, CHCl₃). Apresenta baixa solubilidade em CH₃OH, mas é altamente solúvel em CHCl₃ e misturas desses solventes, desde que o segundo esteja sempre em maior quantidade.

Nos ensaios de CCD, (+)Lupanina apresentou um Rf=0,53 no sistema CH₂Cl₂:Metanol (94:6 v/v), sendo positivo para o reativo de Dragendorff sugerindo a presença nitrogênio básico em sua estrutura química.

5.3.2.1 Análise dos dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide (+)Lupanina (1)

O espectro de RMN de ^{13}C de (1), Figura 35 (pág. 88), apresenta características particulares do esqueleto lupânico. O espectro da referida substância possui um sinal de (C=O) de lactama na região de δ 171,08 ppm. O pico de (C-13) ocorre na região de deslocamento químico δ 22,9 ppm, caracterizando uma ligação de CH_2 metilênico. (C-11) é observado como um singlete de alta intensidade em δ 66,2 ppm, em quanto (C-6) aparece na região de δ 60,5 ppm. A análise dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H e comparação desses com a literatura¹⁰²⁻¹⁰⁵, bem como seus dados físicos descritos na página 86, foram conclusivos na identificação da estrutura química como sendo o composto (+) Lupanina. A Tabela 16 (pág. 89) apresenta os dados de RMN de ^{13}C de (1) comparados com a literatura.^{102,103,104,105}

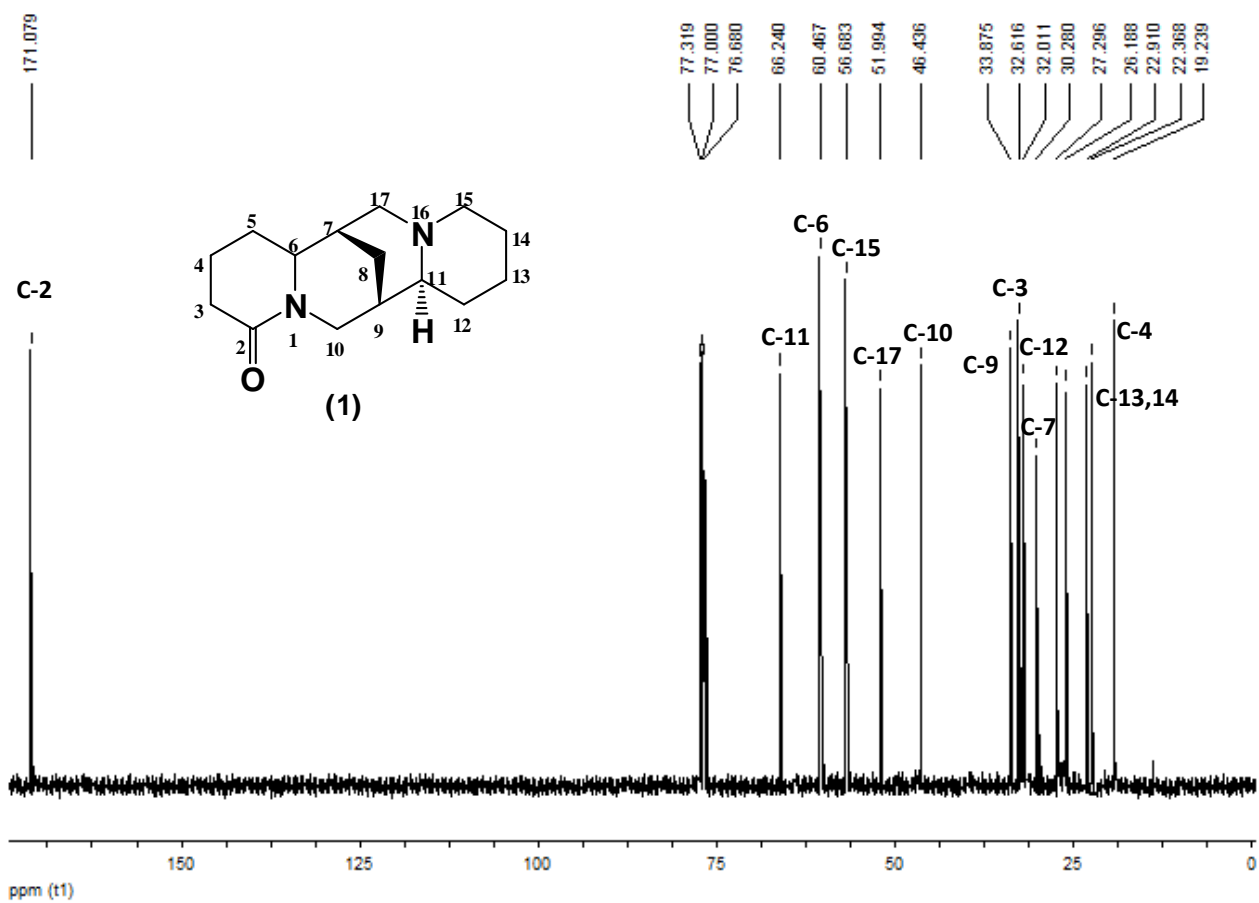
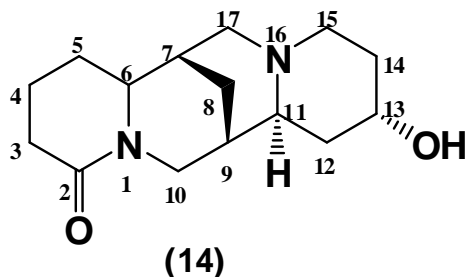


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C do alcaloide identificado como (+) Lupanina, obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

TABELA 16. Dados dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C em CD_3Cl obtidos experimentalmente para a substância identificada (+)Lupanina (**1**) em comparação com a literatura¹⁰²⁻¹⁰⁵.

^{13}C atribuídos	(+) Lupanina	Literatura ¹⁰²⁻¹⁰⁵ (+) Lupanina
2	171,1 (C=O)	172,0 (C=O)
3	32,6 (CH ₂)	32,9 (CH ₂)
4	19,2 (CH ₂)	19,1 (CH ₂)
5	27,3 (CH ₂)	27,4 (CH ₂)
6	60,4 (CH-N)	60,5 (CH-N)
7	30,2 (CH)	30,7 (CH)
8	26,2 (CH ₂)	25,9 (CH ₂)
9	33,9 (CH)	33,3 (CH)
10	46,4 (CH ₂ -N)	46,1 (CH ₂ -N)
11	66,2 (CH-N)	65,4 (CH-N)
12	32,0 (CH ₂)	31,1 (CH ₂)
13	22,9 (CH ₂)	22,7 (CH ₂)
14	22,4 (CH ₂)	22,5 (CH ₂)
15	56,7 (CH ₂ -N)	55,8 (CH ₂ -N)
17	51,9 (CH ₂ -N)	51,3 (CH ₂ -N)

5.3.3 Obtenção do alcaloide (+)13- α -hidroxilupanina (**14**)



O composto **(14)**, página 89, foi isolado de duas espécies do gênero *Lupinus* em estudo, *L. guaraniticus* e *L. paranensis*. Este composto estava presente nas frações diclorometano básica das folhas e sementes de, *L. guaraniticus* e folhas e flores de *L. paranensis*. O metabólito (+)13- α -hidroxilupanina **(14)**, é um derivado biossintético hidroxilado de (+) Lupanina **(1)**, em (C-13). Dessa forma, os deslocamentos químicos de seus carbonos, com exceção do C-13, possuem diferenças bastante sutis. Isso ocorre porque as duas estruturas possuem o mesmo esqueleto lupânico. O perfil cromatográfico de ambas também é modificado pela presença do (-OH) em C-13, deixando a estrutura **(14)** com uma característica mais polar em relação a estrutura **(1)**.

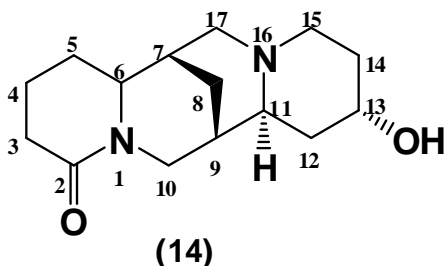
As frações diclorometano básicas das partes aéreas das duas espécies de lupinos, mencionadas no começo desta sessão, foram obtidas da partição ácido-base do extrato metanólico dessas partes, folhas e sementes (*L. guaraniticus*) e folhas e flores (*L. paranensis*). O metabólito **(14)** foi purificado em coluna cromatográfica (CC) utilizando como suporte, sílica gel 230-400 mesh e sistemas eluentes com polaridade crescente, conforme descrito nas Tabelas 11 e 13 (pág. 65 e 69), respectivamente.

A substância (+)13- α -hidroxilupanina apresenta-se como um óleo amarelo claro com $[\alpha]_D^{25} = + 45^\circ$; (c 0.1, MeOH), solúvel em CHCl_3 e pouco solúvel em CH_3OH puro, porém solubiliza em misturas desses dois solventes em qualquer proporção. Os ensaios de (CCD) para (+)13- α -hidroxilupanina apresentou um $R_f=0,41$ no sistema CH_2Cl_2 :Metanol (87:13 v/v). A amostra mostrou-se positiva para o reativo de Dragendorff.

5.3.3.1 Análise dos dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide (+)13- α -hidroxilupanina **(14)**

As análises de RMN de ^1H do alcaloide **(14)** foram realizadas em CDCl_3 . É importante ressaltar que essa estrutura aparece mais de uma vez em plantas diferentes. Devido a isso, as amostras foram comparadas, preliminarmente, por (CCD)

5.3.3.2 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide (+)13- α -hidroxilupanina (14)



O espectro de RMN de ^{13}C deste alcaloide quinolizidínico apresenta particularidades do esqueleto lupânico, do qual é derivado por hidroxilação em C-13. Os sinais mais característicos apresentados por esse composto são: um pico de (C=O) de lactama na região de δ 171,5 ppm, um sinal em δ 63,9 ppm, que caracteriza uma ligação CH-OH de C-13. Comparando os espectros de RMN de ^{13}C de (1) e (14), podemos observar uma mudança bastante significativa no deslocamento químico de C-13 passou de δ 22,9 ppm, em (1), para δ 63,9 ppm na estrutura (14). As Figuras 37 e 38 (pág. 93 e 94), respectivamente, apresentam os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° do composto (14).

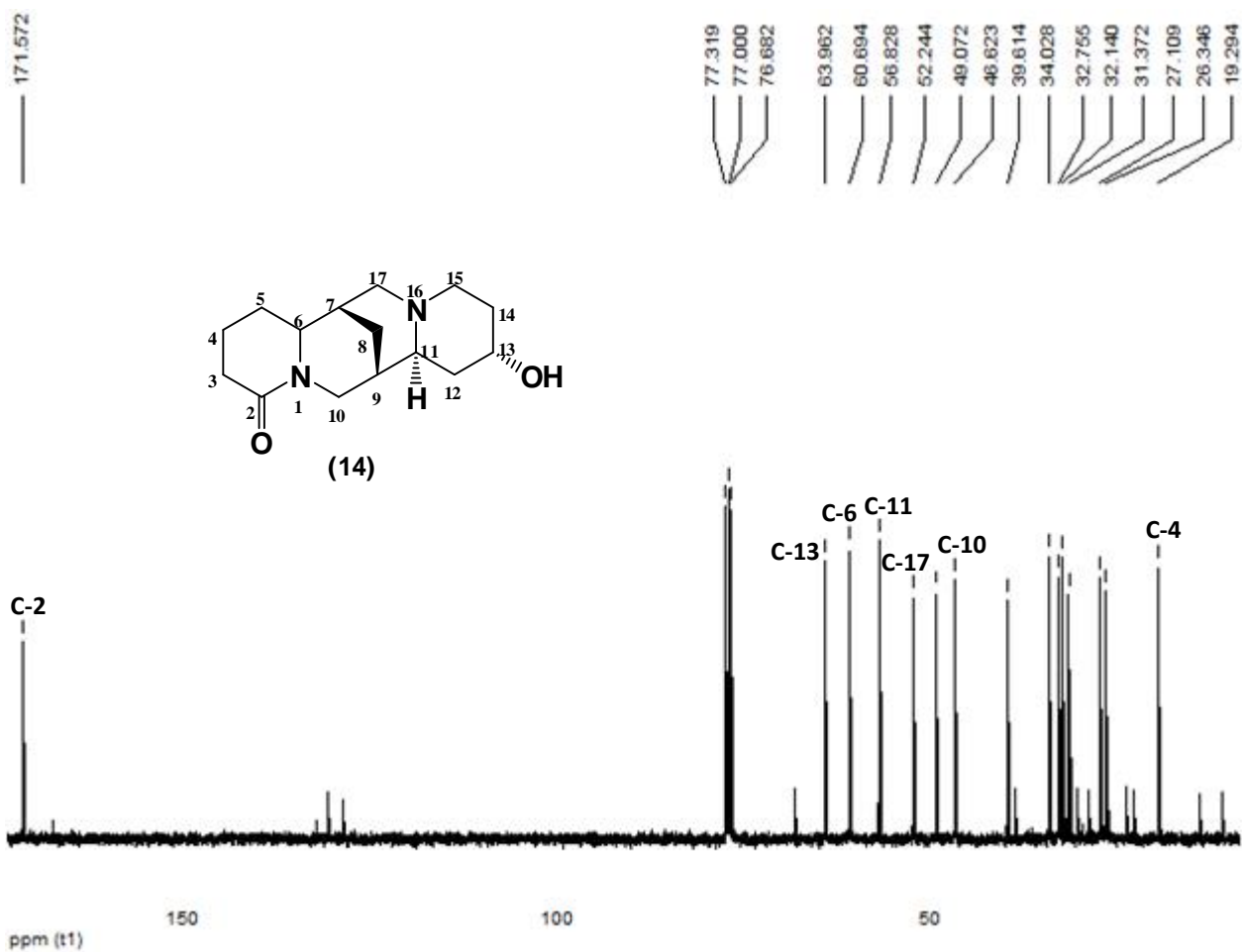


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C do alcaloide identificado como (+)13- α -hidroxilupanine (**14**) obtido em CDCl_3 a 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

5.3.3.3 Dados de RMN de ^{13}C bidimensional DEPT 135° do alcaloide (+)13- α -hidroxilupanina (**14**)

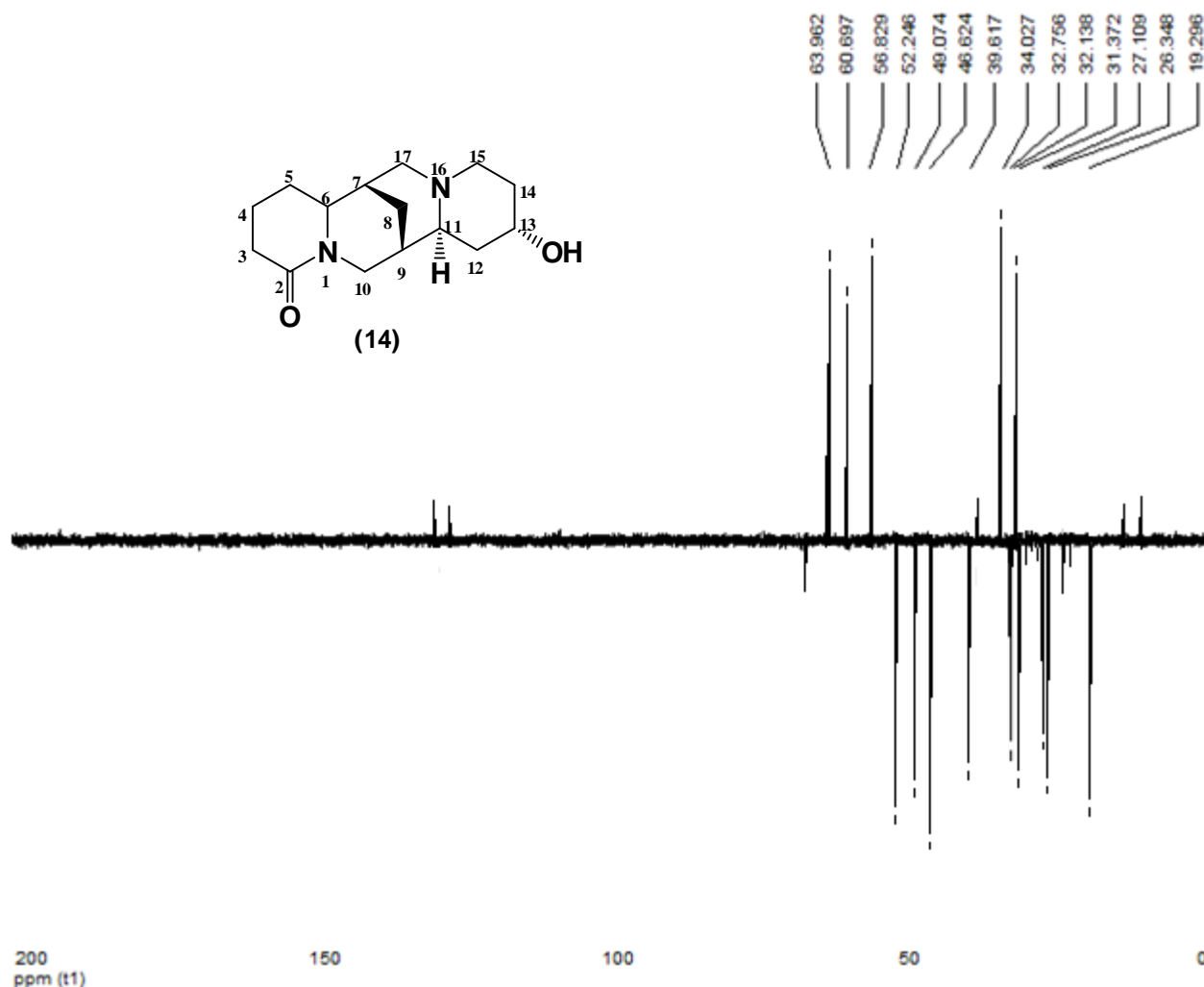


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional DEPT 135° do alcaloide (+)13- α -hidroxilupanina (**14**), obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25°C .

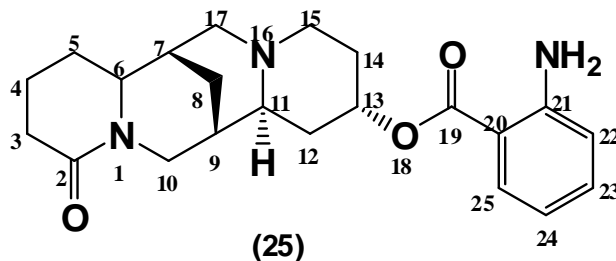
O DEPT 135° de (**14**) apresenta nove sinais (CH_2) em fase negativa do espectro e cinco sinais de (CH) na fase positiva. Esses dados são condizentes com as características estruturais do núcleo lupânico hidroxilado, enzimaticamente, em (C-13).

A Tabela 17 apresenta os dados de deslocamentos químicos das estruturas **(1)** e **(14)** comparados com dados obtidos da literatura.¹⁰²⁻¹⁰⁶

TABELA 17. Dados dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C em CD_3Cl obtidos experimentalmente para as substâncias identificadas como (+)13- α -hidroxilupanina **(14)** e (+)Lupanina **(1)** em comparação com dados da literatura.¹⁰²⁻¹⁰⁶

^{13}C atribuídos	(+)13- α -hidroxilupanina	(+) Lupanina	Literatura ¹⁰²⁻¹⁰⁶ (+) Lupanina
2	171,6 (C=O)	171,1 (C=O)	172,0 (C=O)
3	32,7 (CH ₂)	32,6 (CH ₂)	32,9 (CH ₂)
4	19,2 (CH ₂)	19,2 (CH ₂)	19,1 (CH ₂)
5	27,1 (CH ₂)	27,3 (CH ₂)	27,4 (CH ₂)
6	60,7 (CH-N)	60,4 (CH-N)	60,5 (CH-N)
7	34,02 (CH)	30,2 (CH)	30,7 (CH)
8	26,3 (CH ₂)	26,2 (CH ₂)	25,9 (CH ₂)
9	32,1 (CH)	33,9 (CH)	33,3 (CH)
10	46,7 (CH ₂ -N)	46,4 (CH ₂ -N)	46,1 (CH ₂ -N)
11	56,8 (CH-N)	66,2 (CH-N)	65,4 (CH-N)
12	39,6 (CH ₂)	32,0 (CH ₂)	31,1 (CH ₂)
13	63,9 (CH-O)	22,9 (CH ₂)	22,7 (CH ₂)
14	26,3 (CH ₂)	22,4 (CH ₂)	22,5 (CH ₂)
15	49,1 (CH ₂ -N)	56,7 (CH ₂ -N)	55,8 (CH ₂ -N)
17	52,2 (CH ₂ -N)	51,9 (CH ₂ -N)	51,3 (CH ₂ -N)

5.3.4 Obtenção do alcaloide (+)Lanatina A (25)



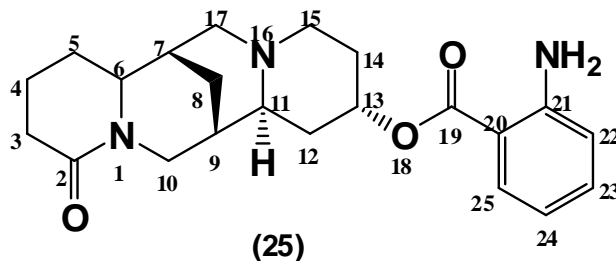
O alcaloide (+) Lanatina A foi isolado da fração diclorometano básica, a qual obtida por partição ácido-base do extrato metanólico das folhas de *L. paranensis*. **(25)** apresentava-se em altas concentrações nas folhas da espécie citada.

O composto (+)Lanatina A, foi isolado em CC utilizando o sistema eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (88:12v/v) como fase móvel. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 230-400 mesh. Misturas de solventes com gradiente crescente de polaridade, conforme descrito na Tabela 13 (pág. 69), foram utilizados proporcionando bons Rfs de separação para os compostos da espécie relacionada.

A substância **(25)** foi obtida como um sólido cristalino incolor com $\text{PF}^\circ=291\text{-}296^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = + 52^\circ$ (c 0.1, CH_2Cl_2) parcialmente solúvel em CHCl_3 e pouco solúvel em CH_3OH .

Os ensaios de (CCD) para **(25)** revelaram seu respectivo Rf: 0,65 no sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Metanol}$ (85:15 v/v). A amostra apresentou positividade frente ao reativo de Dragendorff sugerindo a presença de nitrogênio básico em sua estrutura.

5.3.4.1 Dados de RMN de ^1H (+)Lanatina A (25)



O espectro de RMN de ^1H de (+)Lanatina A, Figura 39 (pág. 98), mostra uma região de sobreposição de sinais em campo alto que é característico do núcleo básico das lupaninas. Estes sinais representam os prótons de CH e CH_2 presentes no núcleo básico lupânico. Em campo baixo do espectro, observa-se um duplo dubleto, região de aromáticos, em deslocamento químico 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 multiplete 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 singlete na região de δ 5,67 ppm.

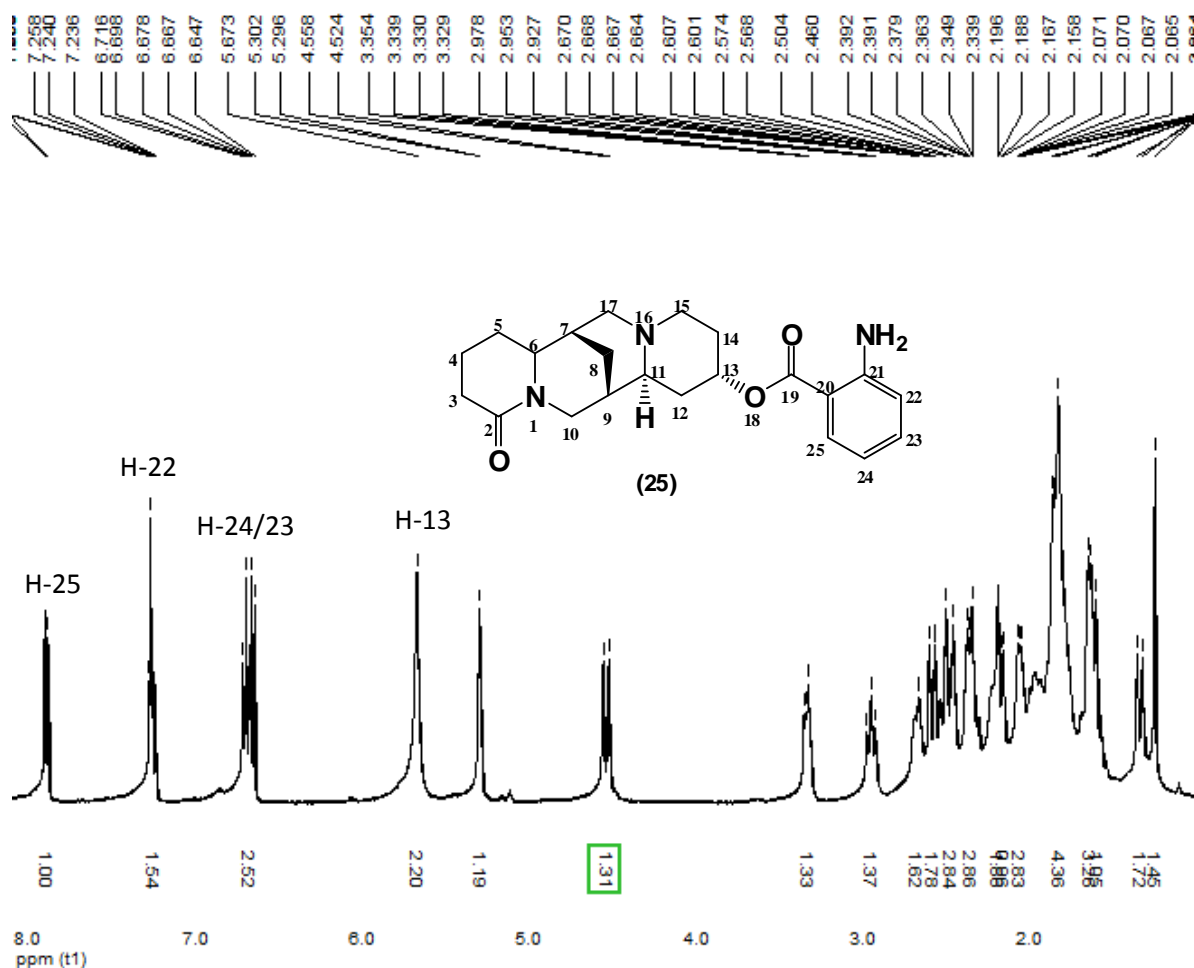


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H do alcaloide identificado como (+)Lanatina A (**25**) obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

Uma expansão da região de deslocamento químico entre δ 6,5 e 8,0 ppm (região dos sinais do anel aromático *O*-substituído), Figura 40 (pág. 99), torna mais visível a porção relacionada ao substituinte aromático *O*-substituído.

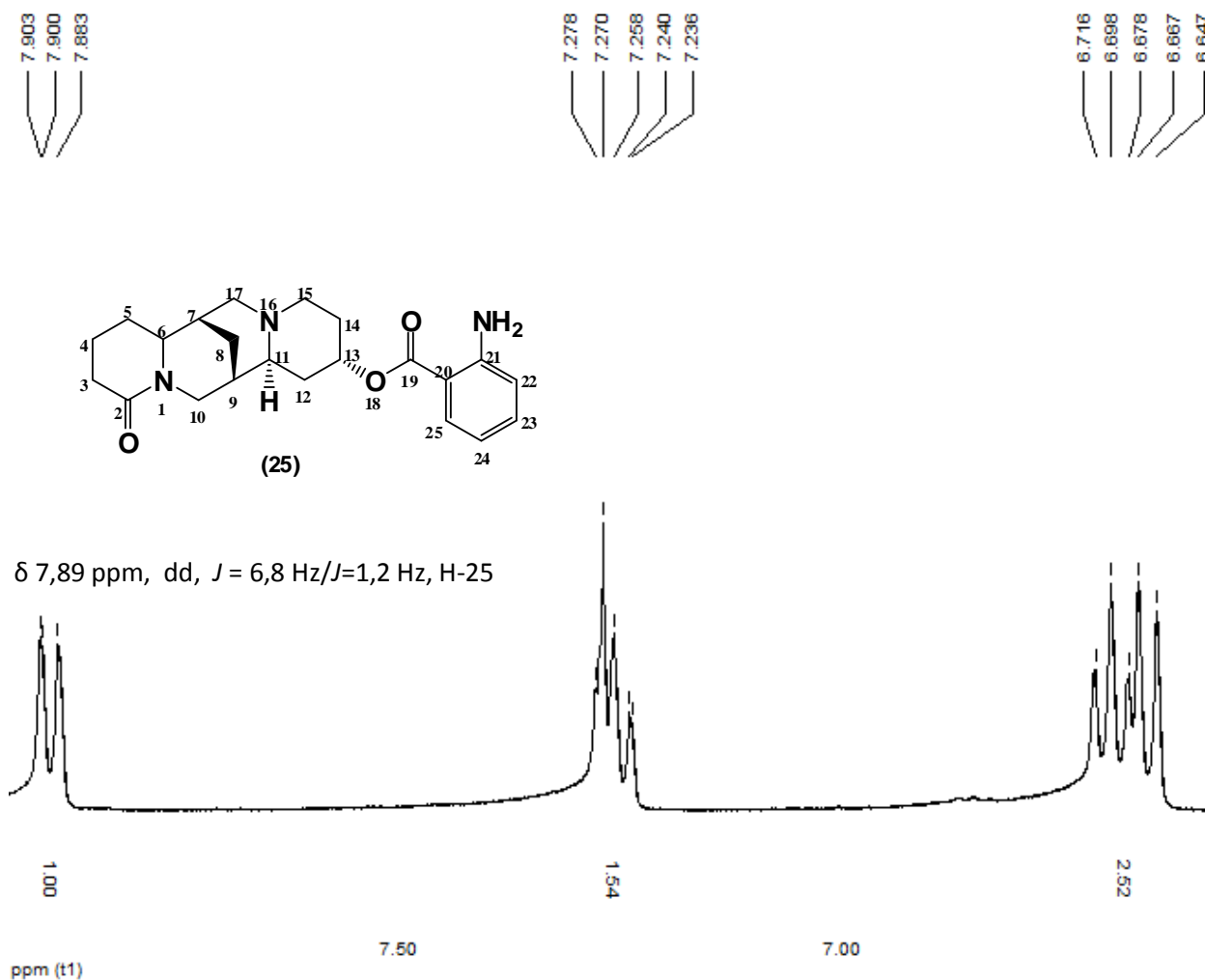


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H expandido (região de δ 6,5 a δ 8,0 ppm) do alcaloide (+)Lanatina A (**25**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

5.3.4.2 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide (+)Lanatina A (**25**)

O RMN de ^{13}C unidimensional de (**25**) (Fig. 41, pág. 100), mostra a presença de 24 sinais. Esses dados foram comparados aos da literatura⁵⁶ proporcionando a identificação do composto (**25**) como sendo (+) Lanatina A.

A campo alto do espectro, estão os sinais que correspondem aos carbonos de CH_2 e CH-N com um deslocamento químico entre δ 19,7 a δ 60,6 ppm. O sinal que

caracteriza a presença de uma carbonila de lactama ocorre em δ 171,0 ppm, o qual é comum no núcleo lupânico e caracteriza o mesmo. Outro sinal importante é um singlete de alta intensidade em δ 68,0 ppm indicando a presença de um carbono ligado ao oxigênio do éster substituinte.

A confirmação da presença de um substituinte éster se deu por um sinal de carbono carbonílico na região de δ 167,3 ppm. Foram observados ainda, seis picos na região de aromáticos (δ 111,2, δ 116,62, δ 116,67, δ 131,5, δ 134,0 e δ 150,3 ppm), os quais, representam um benzeno O-substituído por um (-NH₂). Os outros sinais presentes no espectro, correspondem ao esqueleto lupânico.

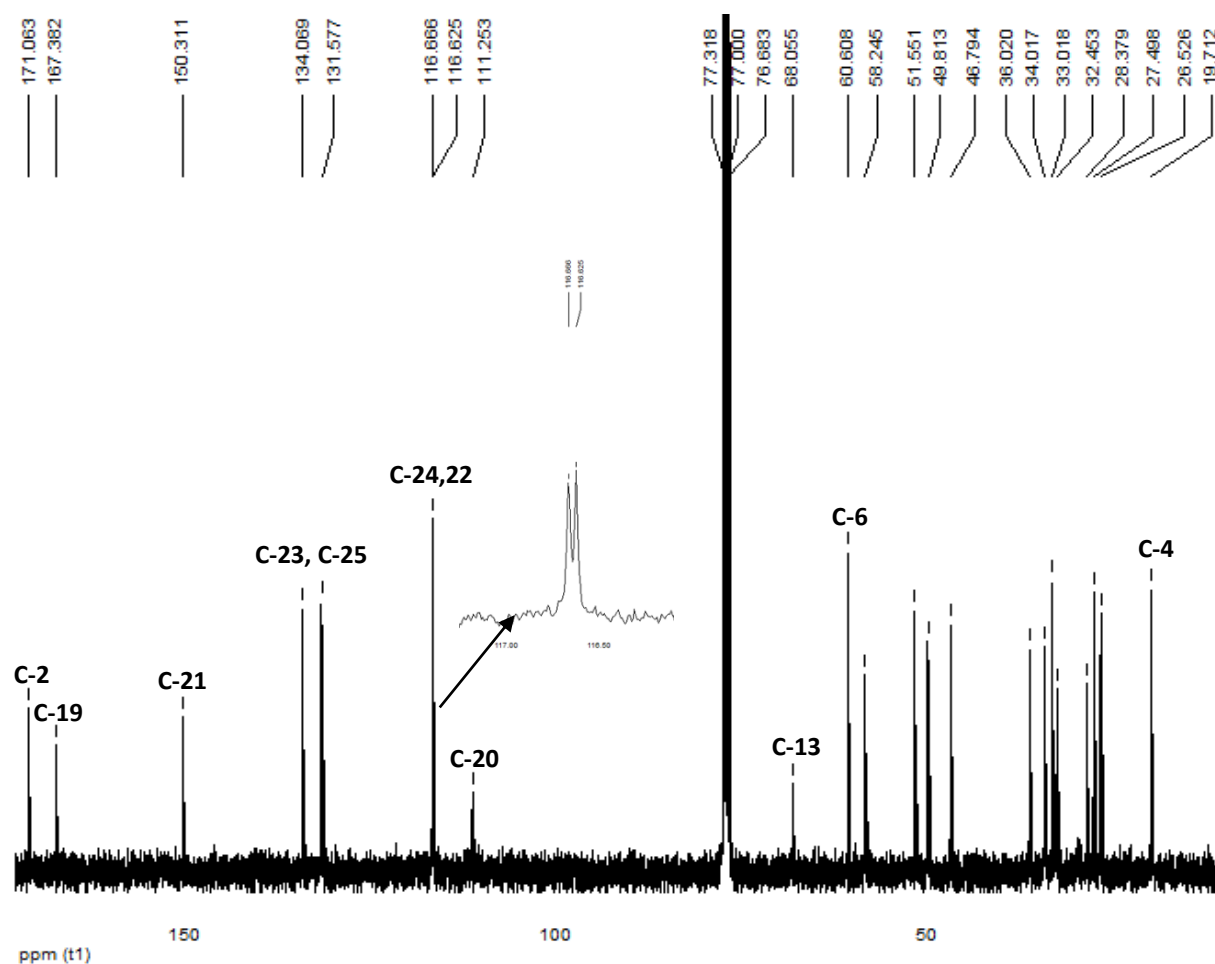


Figura 41. Espectro de RMN de ¹³C do composto identificado como (+)Lanatina A (**25**), obtido em CDCl₃ à 100,62 MHz e 25 °C.

5.3.4.3 Alcaloide (+)Lanatina A (25), Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas para o composto **(25)**, 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%], característico do esqueleto químico lupânico. Esses dados forneceram base para determinação da fórmula molecular de **(25)** como sendo $C_{22}H_{27}N_3O_3$. Nesse ponto a espectrometria de massas auxiliou na confirmação da presença de um nitrogênio como substituinte no anel aromático, Figura 42.

Scan 658 from c:\varianws\data\2013\ademir\alexandre\02.sms

Spectrum from c:\varianws\data\2013\ademir\alexandre\02.sms
Scan No: 658, Time: 10.314 minutes
7 points averaged. Background corrected.
Comment: 10.314 min. Scans: 655-661 40:400 Ion: 2232 us RIC: 402916
Pair Count: 90 MW: 0 Formula: None
CAS No: None Acquired Range: 40 - 401 m/z

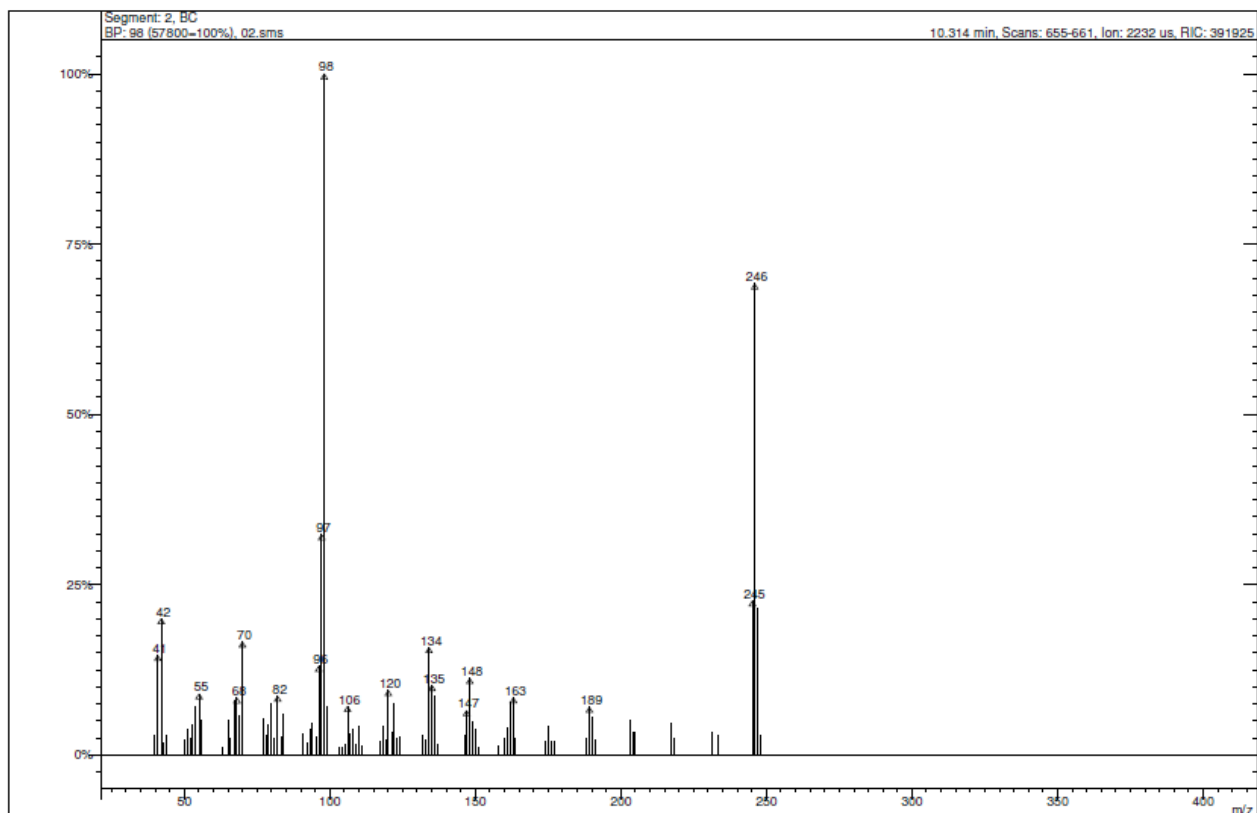
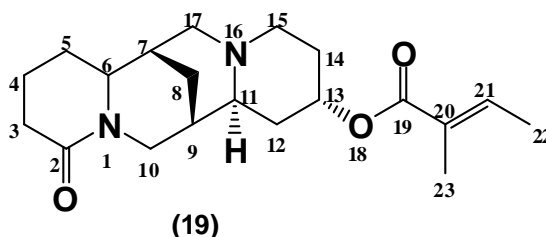


Figura 42. Espectro de massas ESIMS/CG/EM de (+)Lanatina A (25).

5.3.5 Obtenção do alcaloide (+)13- α -*cis*-tigloiloxilupanina (19)



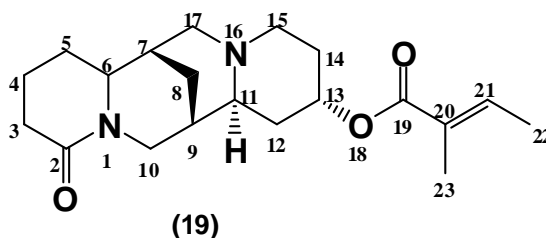
O composto **(19)** foi isolado da fração dicloro básica das folhas de *L. paranensis*, conforme está descrito na Tabela 13 (pág. 69). A estrutura **(19)** estava presente em concentração moderada nesta fração.

O sistema de solventes utilizado para o isolamento em CC de **(19)** foi: CH₂Cl₂:MeOH (98:2v/v).

A substância **(19)** apresenta-se como sólido amorfo de cor branca com PF^o = 250-258°C; $[\alpha]_D^{25} = +80^\circ$ (c 0.1, CHCl₃); solúvel em CHCl₃ e pouco solúvel em CH₃OH puro.

Os ensaios de (CCD) para **(19)** revelaram um R_f = 0,61 no sistema CH₂Cl₂:Metanol (95:5 v/v). Este composto também foi positivo para o reativo de Dragendorff.

5.3.5.1 Análise dos dados de RMN de ¹³C unidimensional do alcaloide (+)13- α -*cis*-tigloiloxilupanina (19)



O composto **(19)** teve sua estrutura química elucidada através da comparação de seus deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C com duas substâncias já conhecidas, (+)13- α -hidroxilupanina **(14)** e (-)13- α -*cis*-tigloiloximultiflorina **(29)**⁵⁶. Essa comparação foi realizada porque o composto **(14)** possui as características espectroscópicas do núcleo lupânico. Os sinais característicos relacionados são: (C=O) da amida δ 171,6 ppm; (C-13) do éster, cuja o deslocamento químico ocorre na faixa de δ 63,9 ppm. O substituinte *O*-tigloil pôde ser comparado com os deslocamentos de outra estrutura também já elucidada, a (-) 13- α -*cis*-tigloiloximultiflorina. A diferença entre essa substância e a (+) 13- α -*cis*-tigloiloxilupanina é a posição da carbonila no esqueleto lupânico. O núcleo fundamental da multiflorida possui uma carbonila, em C4, α - β -insaturada ao invés da carbonila da lactama e (C-1), Figura 43. Os sinais característicos de RMN de ^1H do resíduo *cis*-tigloil são: (δ 10,9 – 12,5 ppm, CH_3 terminal); (δ 12,5 – 14,5 ppm CH_3). Para RMN de ^{13}C , os valores ficam próximos de δ 138 ppm (CH_2 terminal). O outro carbono da ligação dupla possui valores próximos a (δ 128 ppm).

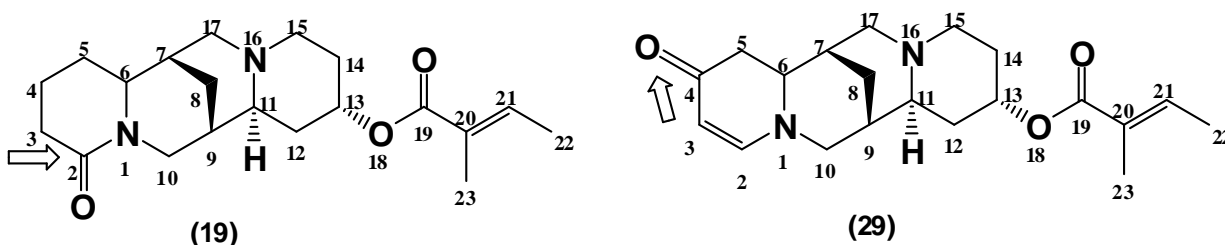


Figura 43. Posição da carbonila que caracteriza a diferença entre dois núcleos quinilizidínicos, (+)13- α -*cis*-tigloiloxilupanina **(19)** e (-)13- α -*cis*-tigloiloximultiflorina **(29)**.

A Figura 44 (pág. 104) apresenta o espectro de RMN de ^{13}C da estrutura química identificada como de **(19)**. Na página 105, (fig. 45) está representada uma expansão de campo alto desse mesmo espectro na região de deslocamento químico entre δ 11,0 e 78,0 ppm.

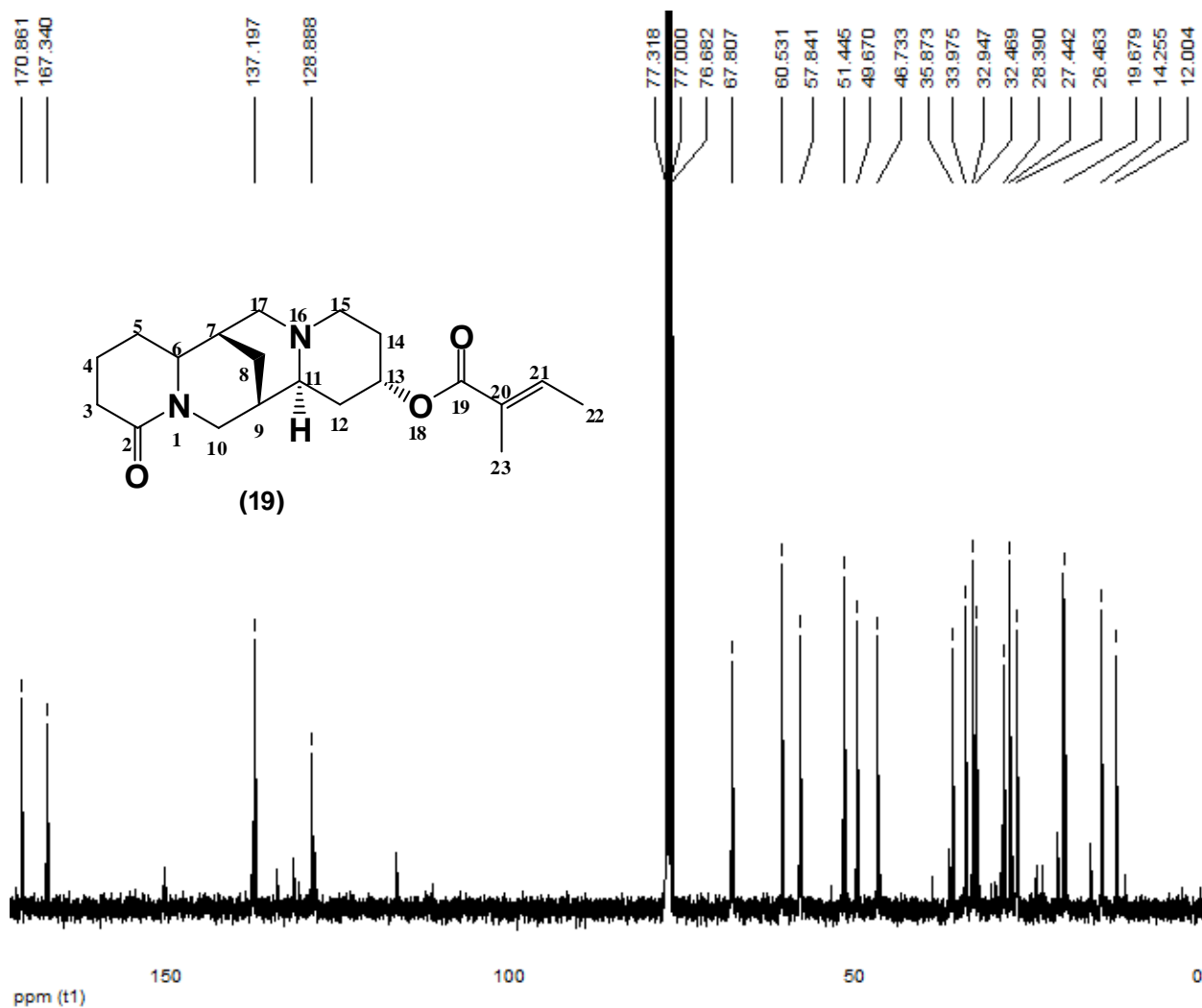


Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C do composto identificado como (+)-13- α -*cis*-tigloiloxilupanina (**19**) obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

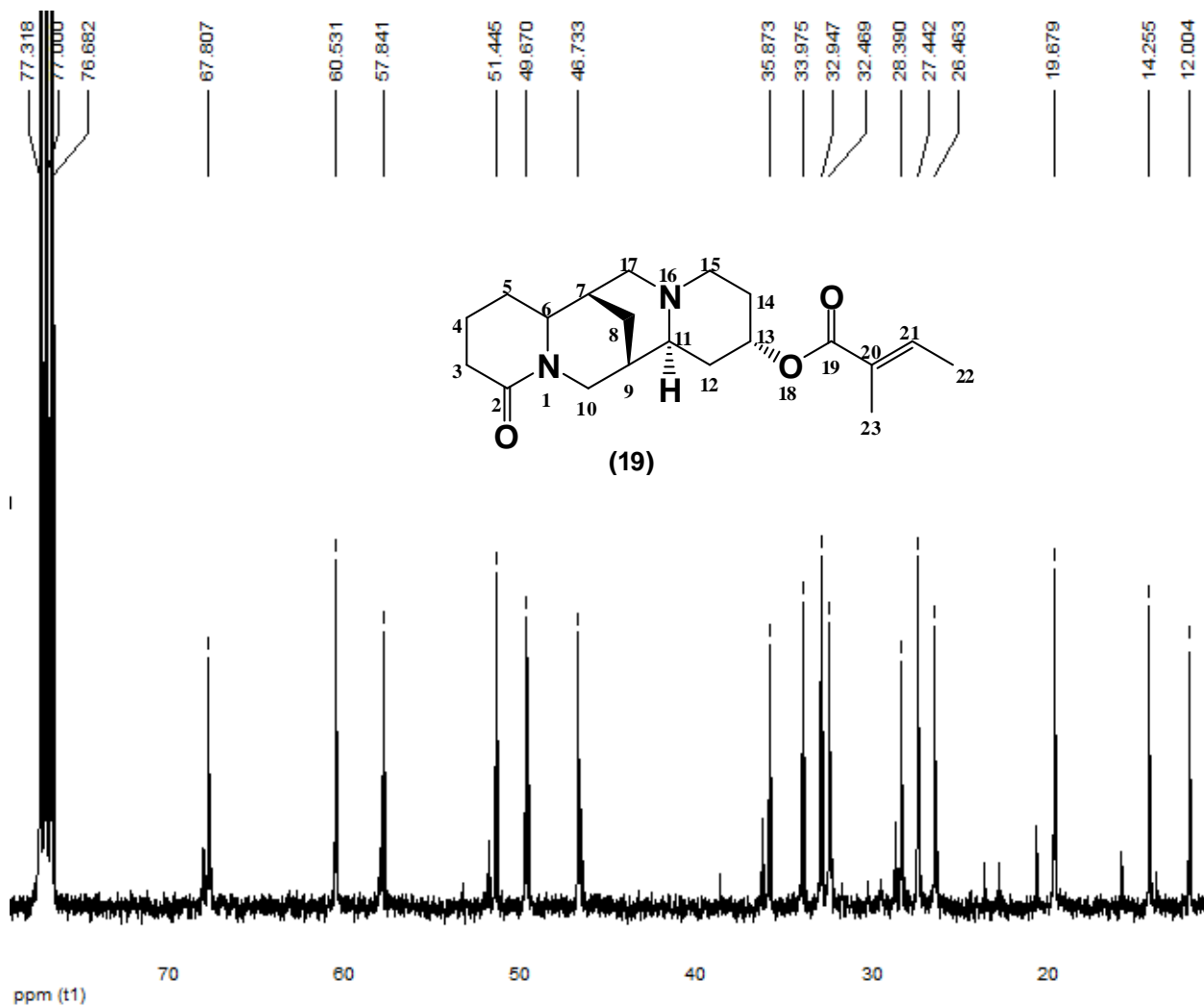


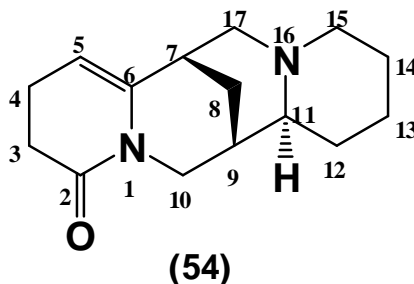
Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C expandido (região de δ 11,0 a δ 78,0 ppm) do composto identificado como (+)-13- α -*cis*-tigloiloxilupanina (**19**) obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

A Tabela 18 (pág. 106) compara os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C do obtido para o composto (**14**) e do resíduo de *cis*-tigloil de (+)-13- α -*cis*-tigloiloximultiflorina (**29**) com os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C obtidos para (+)-13- α -*cis*-tigloiloxilupanina (**19**).^{56,107,108,109}

TABELA 18. Comparação dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 obtidos experimentalmente para as substâncias identificadas como (+)13- α -hidroxilupanina (**14**), (-)13- α -*cis*-tigloiloximultiflorina (**29**)^{56,107,108,109} e (+)13- α -*cis*-tigloiloxilupanina (**19**).

^{13}C atribuídos	(-)13- α - <i>cis</i> -tigloiloximultiflorina ^{56,107,108,109}	(+)13- α -hidroxilupanina	(+)13- α - <i>cis</i> -tigloiloxilupanina
2	155,6 CH	171,6 (C=O)	170,8, C=O
3	99,3, CH	32,7 (CH ₂)	32,4, CH ₂
4	192,4, C=O	19,2 (CH ₂)	19,7, CH ₂
5	39,1, CH ₂	27,1 (CH ₂)	28,4, CH ₂
6	60,2, CH-N	60,7 (CH-N)	57,8, CH-N
7	30,7, CH	34,02 (CH)	32,9, CH
8	25,5, CH ₂	26,3 (CH ₂)	27,4, CH ₂
9	34,2, CH	32,1 (CH)	33,9 CH
10	57,2, CH ₂ -N	46,7 (CH ₂ -N)	46,9, CH ₂ -N
11	63,3, CH-N	56,8 (CH-N)	60,5, CH-N
12	30,9, CH ₂	39,6 (CH ₂)	35,8 CH ₂
13	68,0, CH-O	63,9 (CH-O)	67,8, CH-O
14	23,1, CH ₂	26,3 (CH ₂)	26,9, CH ₂
15	54,9, CH ₂ -N	49,1 (CH ₂ -N)	49,7, CH ₂ -N
17	50,5, CH ₂ -N	52,2 (CH ₂ -N)	51,5, CH ₂ -N
19	167,8, C=O	-	167,3, C=O
20	128,8, C=C	-	128,8, C=C
21	138,7, C=C	-	137,2, C=C
22	10,8, CH ₃	-	12,0, CH ₃
23	13,9, CH ₃	-	14,2, CH ₃

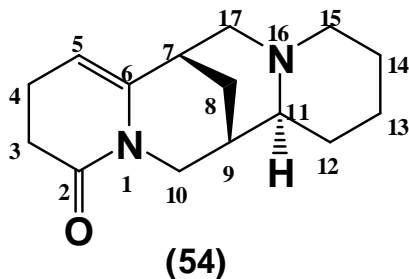
5.3.5 Obtenção do alcaloide 5,6-dehidrolupanina (54)



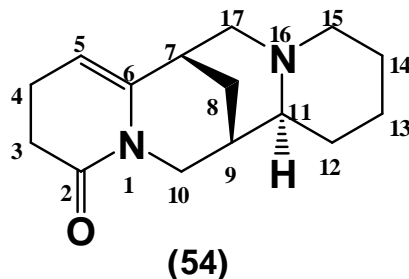
O alcaloide **(54)** foi isolado da espécie *L. guaraniticus* da fração diclorometano básica obtida do extrato bruto das folhas, conforme descrito na Tabela 10 (pág. 63). Este metabólito foi purificado em coluna cromatográfica (CC) com suporte de sílica gel 230-400 mesh e sistema eluente com gradiente crescente de polaridade, mais especificamente, CH₂Cl₂:MeOH (99:1, v/v).

No ensaio de (CCD), **(54)** apresentou R_f: 0,58 no sistema CH₂Cl₂:Metanol (97:3, v/v). A amostra em questão apresenta-se como um óleo amarelo e reação positiva para o reativo de Dragendorff. Os dados de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais foram comparados com a literatura.^{104,105,106,107,108,109}

5.3.5.1 Dados de RMN de ¹H do alcaloide 5,6-dehidrolupanina (54)



5.3.5.2 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide 5,6-dehidrolupanina (54)



O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado apresenta dois sinais em campo baixo, um na região de δ 142,4 ppm, (C-6) e outro em δ 102,6 ppm (C-5). O terceiro sinal importante na determinação da estrutura corresponde a carbonila da lactama em δ 171,0 ppm, Figura 47 (pág. 110). O espectro de DEPT 135 $^\circ$ auxiliou na determinação da estrutura sendo possível verificar o desaparecimento do sinal em δ 142,4 ppm (C-6), e um sinal de C_q referente a dupla ligação em δ 102,6 ppm, (C-5), Figura 48 (pág. 111).

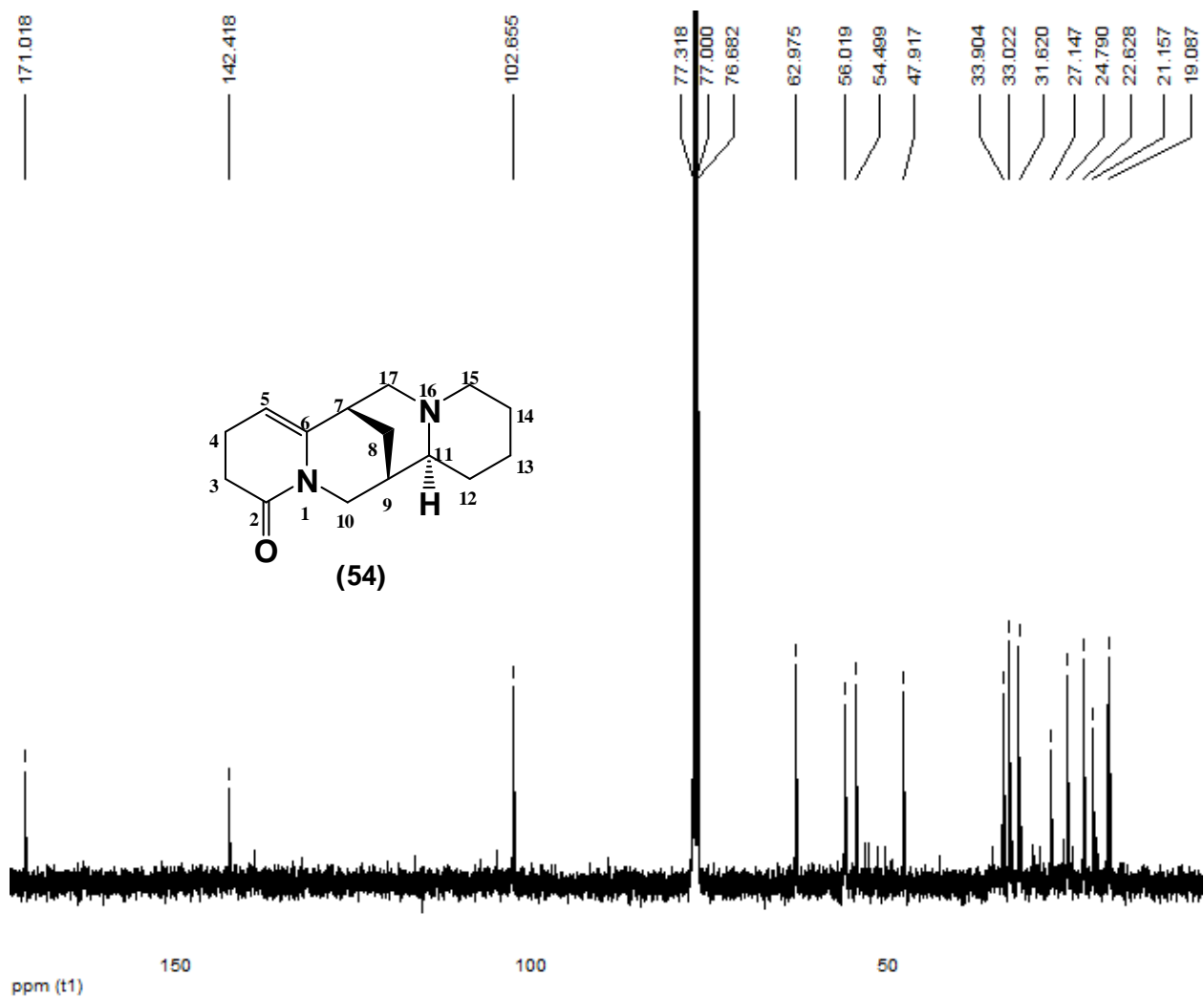


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5,6-dehidrolupanina (**54**), obtido em CDCl_3 à 100,16 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

5.3.5.3 Dados de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135°, do alcaloide 5,6-dehidrolupanina (54)

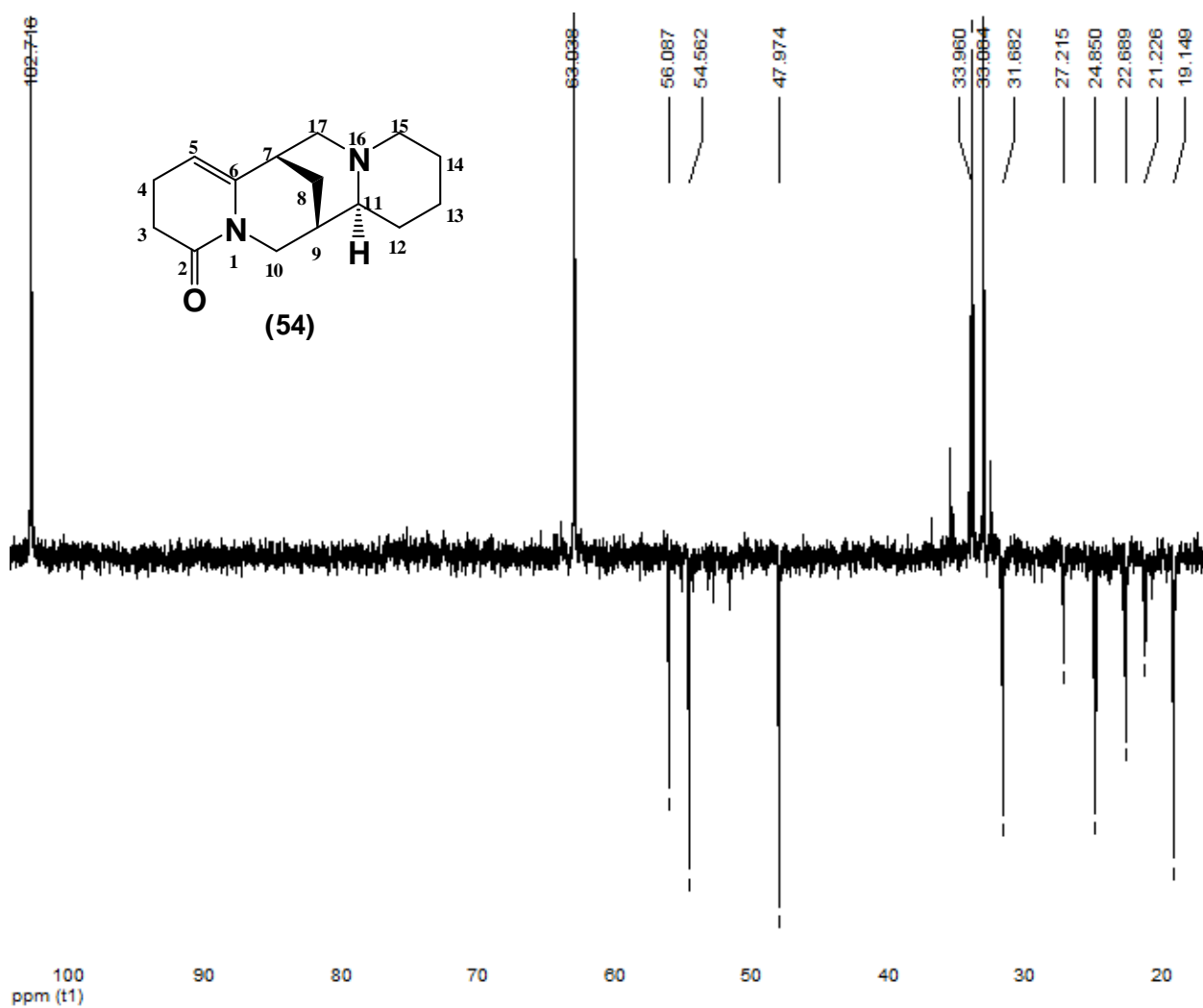


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135°, do composto 5,6-dehidrolupanina (54), obtido em CDCl_3 .

na região de campo mais baixo do espectro, entre δ 5,5 e 7,3 ppm, são referentes aos (CH) das duplas ligações em (C-3) e (C-5). Para o RMN de ^1H em **(17)**, foram atribuídos os seguintes picos: δ 5,9 ppm (1H, *d*, $J = 6$ Hz, H5), δ 6,4 ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H3) e δ 7,3 ppm (1H, *dd*, H4). Para o composto **(53)** foram atribuídos: δ 5,9 ppm (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H5), δ 6,3 ppm (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz, H3), δ 7,2 ppm (1H, *dd*, H4) e δ 5,26 ppm (1H, *s*, -OH), conforme ilustrado nas Figuras 49 para **(17)** e 50 para **(53)** (pág. 113 e 114, respectivamente).

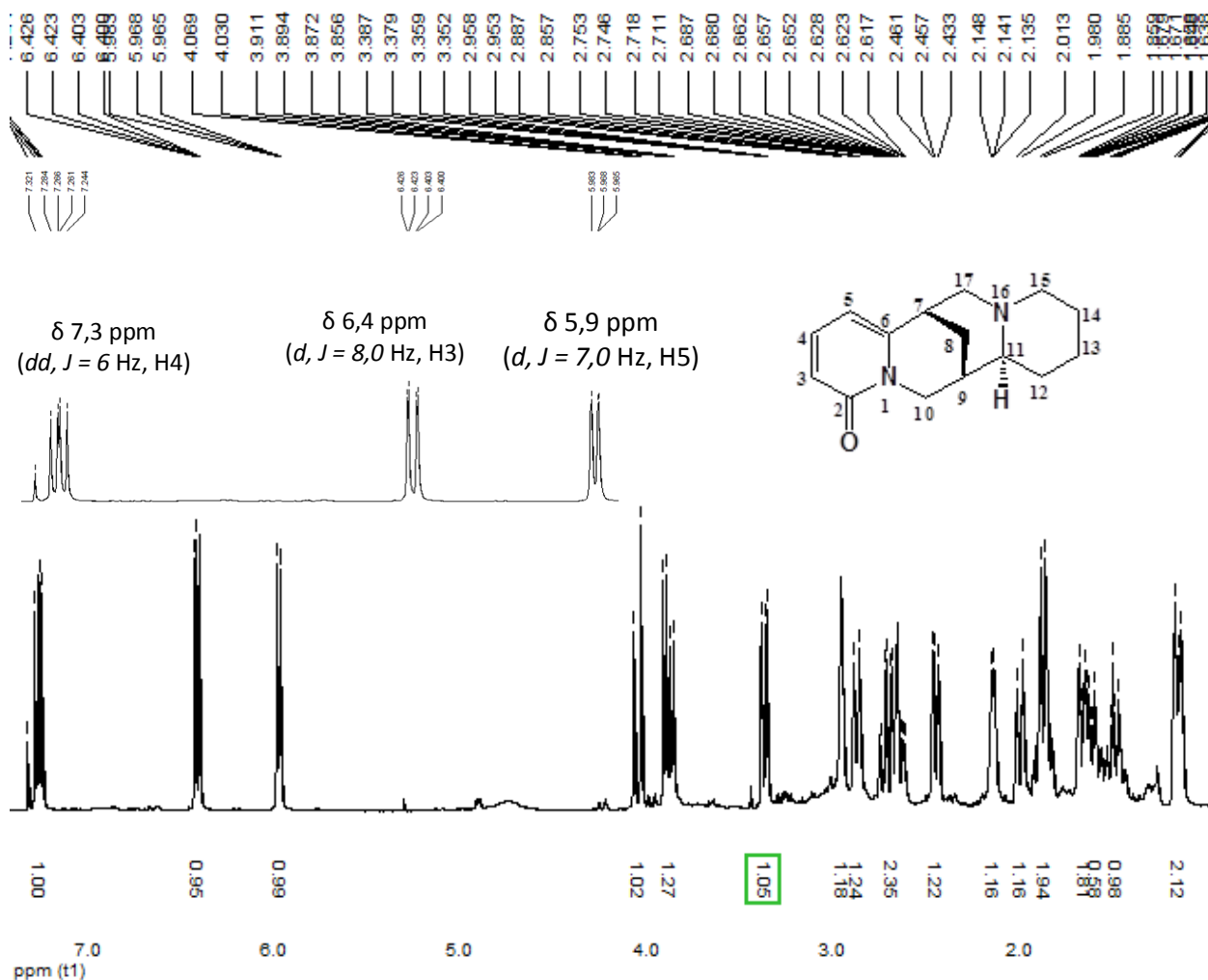


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do composto Anagrina **(17)**, obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

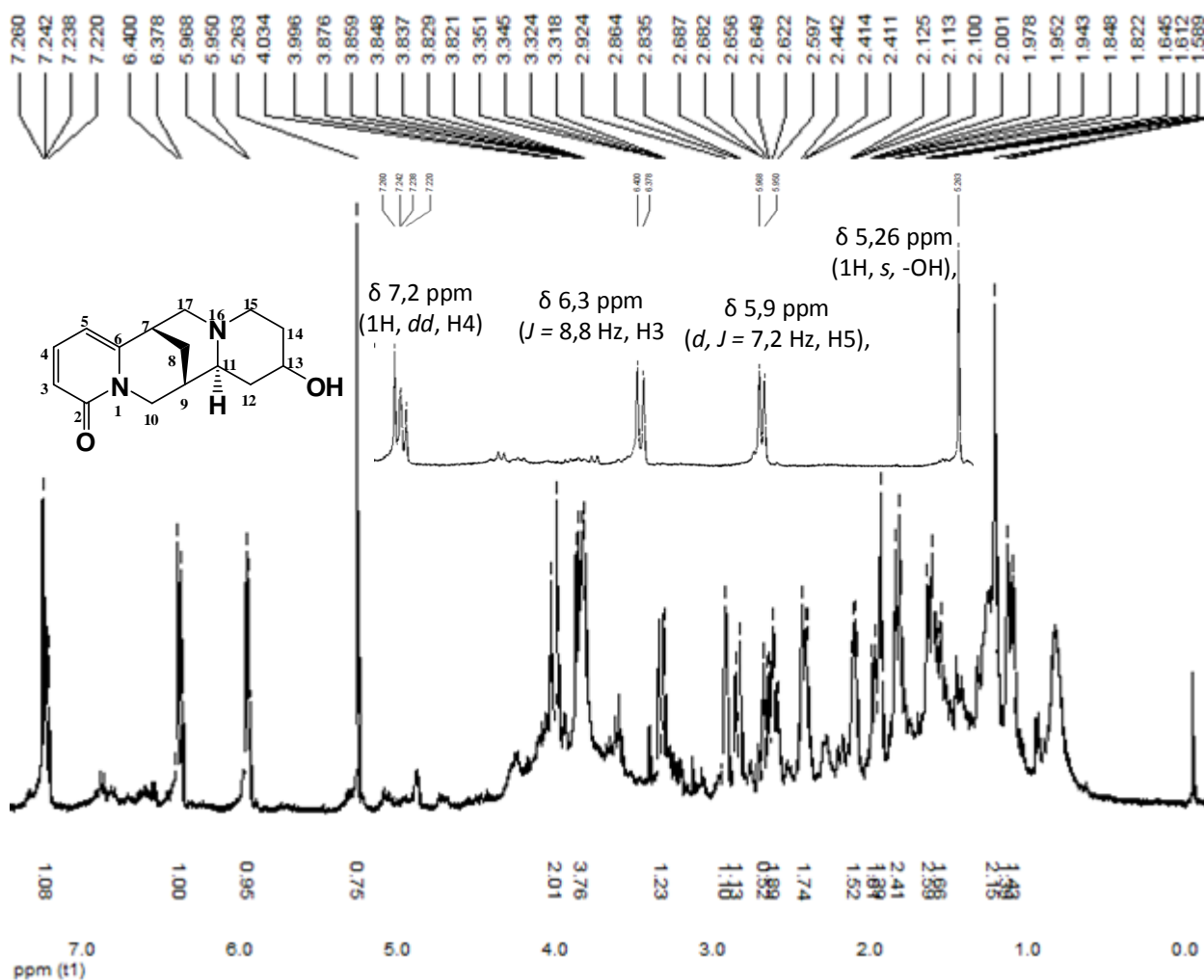


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do composto 13- α -Hidroxi-anagrina (53), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

5.3.6.2 Dados de RMN - ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Anagrina (17)

O espectro de RMN de correlação ^1H - ^1H do composto Anagrina também contribuiu para a determinação correta da posição das duplas ligações. Nesse ensaio, pôde-se observar claramente as correlações, bem como as multiplicidades entre os hidrogênios (H3, H4 e H5) Figura 51 (pág 115).

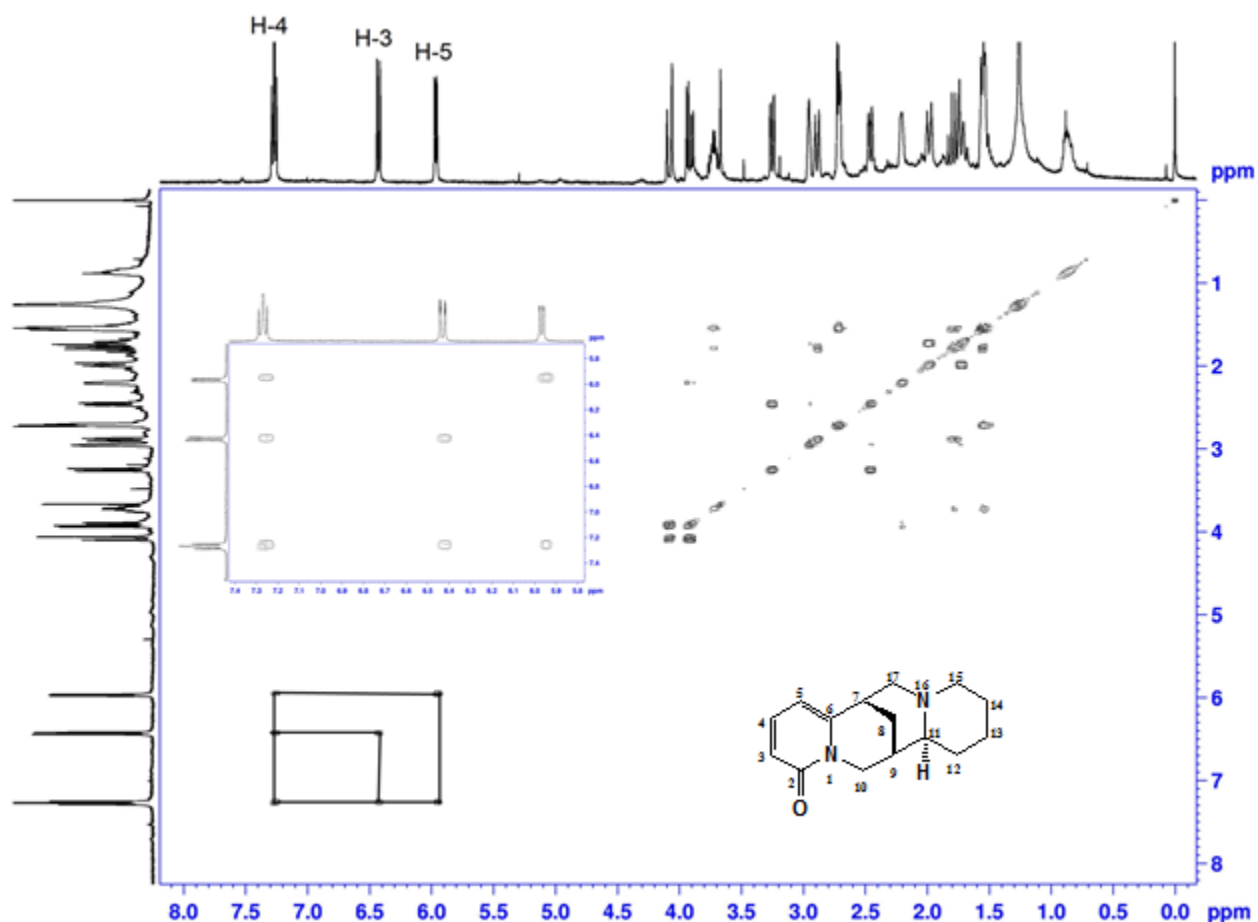


Figura 51. Espectro de RMN de correlação, COSY ^1H - ^1H , do composto Anagirina (**17**) obtido em CDCl_3 .

5.3.6.3 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional dos alcaloides Anagirina (**17**) e 13- α -Hidroxianagirina (**53**)

Os espectros de RMN de ^{13}C , para ambas as substâncias, mostraram cinco sinais em campo baixo, sendo: um sinal de carbonila amídica, e quatro picos na região de duplas ligações. O espectro de RMN de ^{13}C obtido para (**17**) mostra os seguintes deslocamentos químicos na região de campo baixo: δ 163,4 ppm (C=O, C2); δ 151,9 ppm (C=C, C6); δ 138,6 ppm (C=C, C4); δ 116,3 ppm (C=C, C3) e δ 104,5 ppm (C=C,

C5), Figura 52. O composto (**53**) apresenta os seguintes deslocamentos característicos: δ 163,5 ppm (C=O, C2); δ 151,6 ppm (C=C, C6); δ 138,4 ppm (C=C, C4); δ 116,7 ppm (C=C, C3); δ 104,5 ppm (C=C, C5) e δ 69,7 ppm (C-OH, C13), Figura 53 (pág. 117).

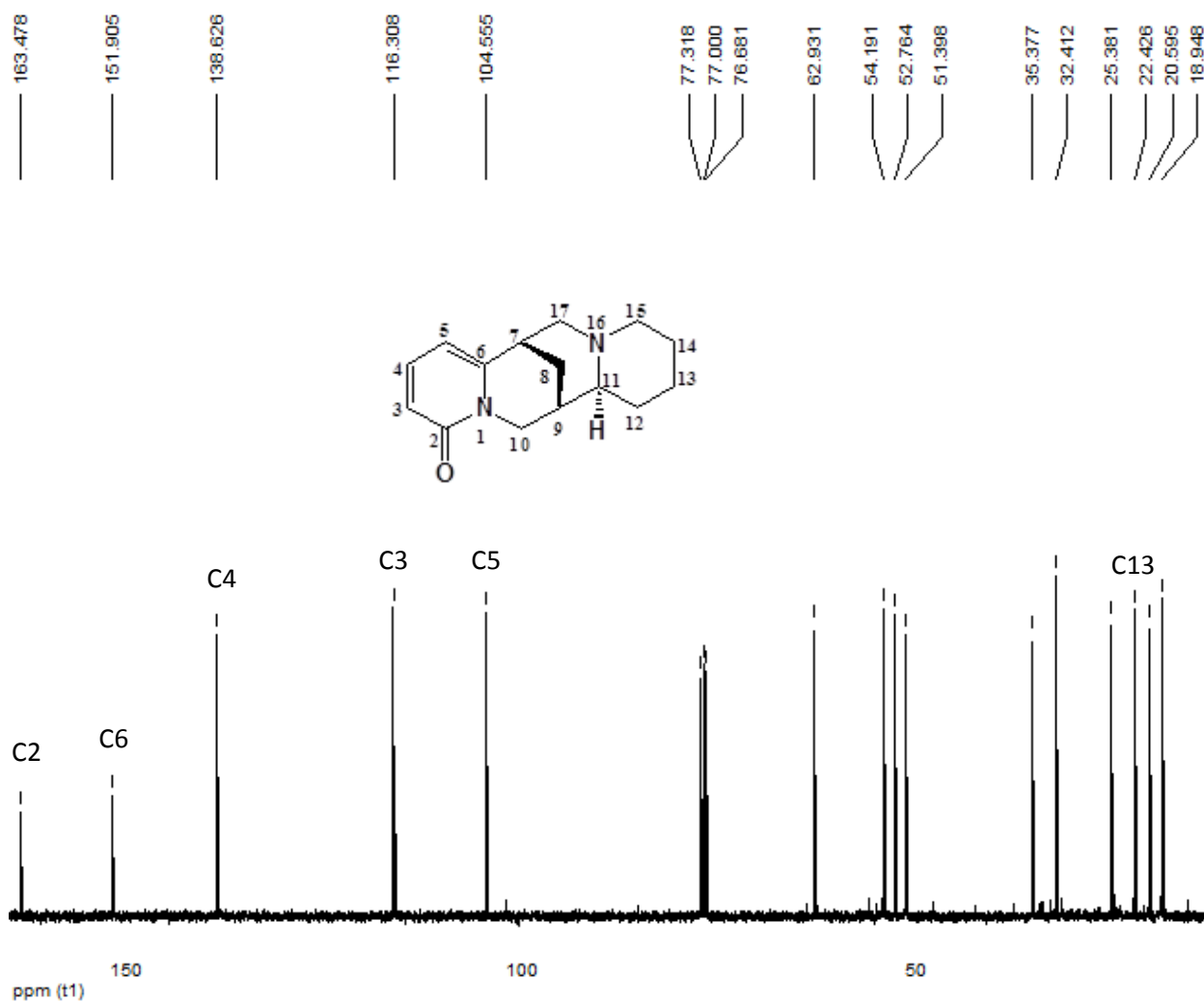


Figura 52. Espectro de RMN de ¹³C unidimensional do composto Anagrina (**17**), obtido em CDCl₃ à 100,16 MHz e 25 °C.

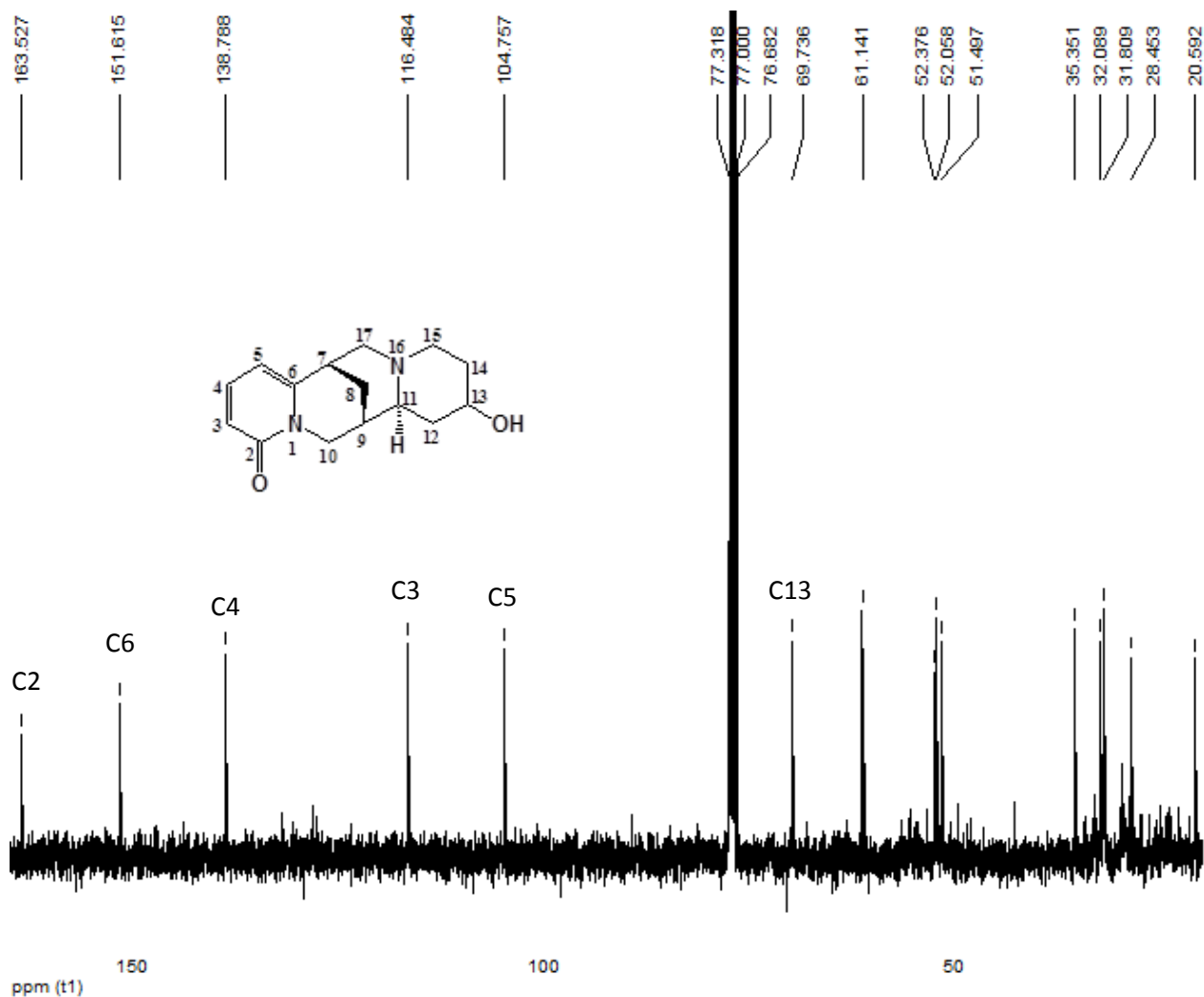


Figura 53. Espectro de RMN de ¹³C unidimensional do composto 13-α-hidroxi-anagirina (**53**), obtido em CDCl₃ à 100,16 MHz e 25 °C.

5.3.6.4 Dados de RMN de ¹³C bidimensional, DEPT 135°, dos alcaloides Anagirina (**17**) e 13-α-Hidroxi-anagirina (**53**)

O experimento de DEPT 135° proporcionou, para ambos os compostos, a confirmação das estruturas tornando os dados de RMN de ¹H e ¹³C unidimensionais consistentes com a proposta da estrutura. Observam-se, em ambos os espectros de DEPT 135°, tanto para (**17**), Figura 54 (pág. 118), como para (**53**), três sinais em campo

baixo correspondentes aos (CH) de dupla ligação na fase positiva dos mesmos. No espectro de DEPT135° do composto **(53)**, Figura 55 (pág. 119), é atribuído, ainda o sinal referente ao carbono do álcool em (C-13). Os dados obtidos foram comparados aos da literatura^{105,106,107,108,109,110,111}, possibilitando a elucidação estrutural das substâncias obtidas.

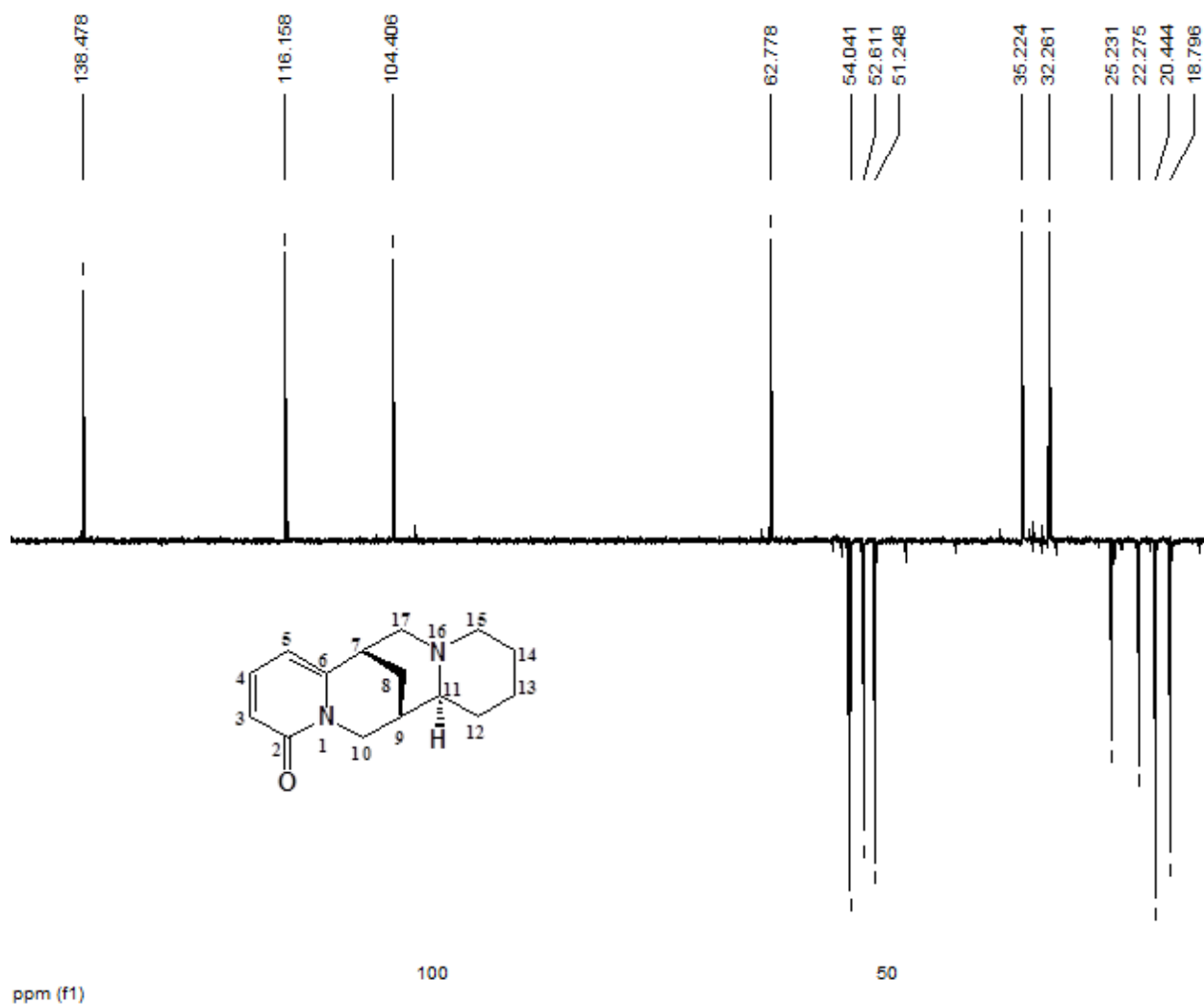


Figura 54. Espectro de RMN de ^{13}C , bidimensional, DEPT 135°, do composto Anagrina **(17)**, obtido em CDCl_3 .

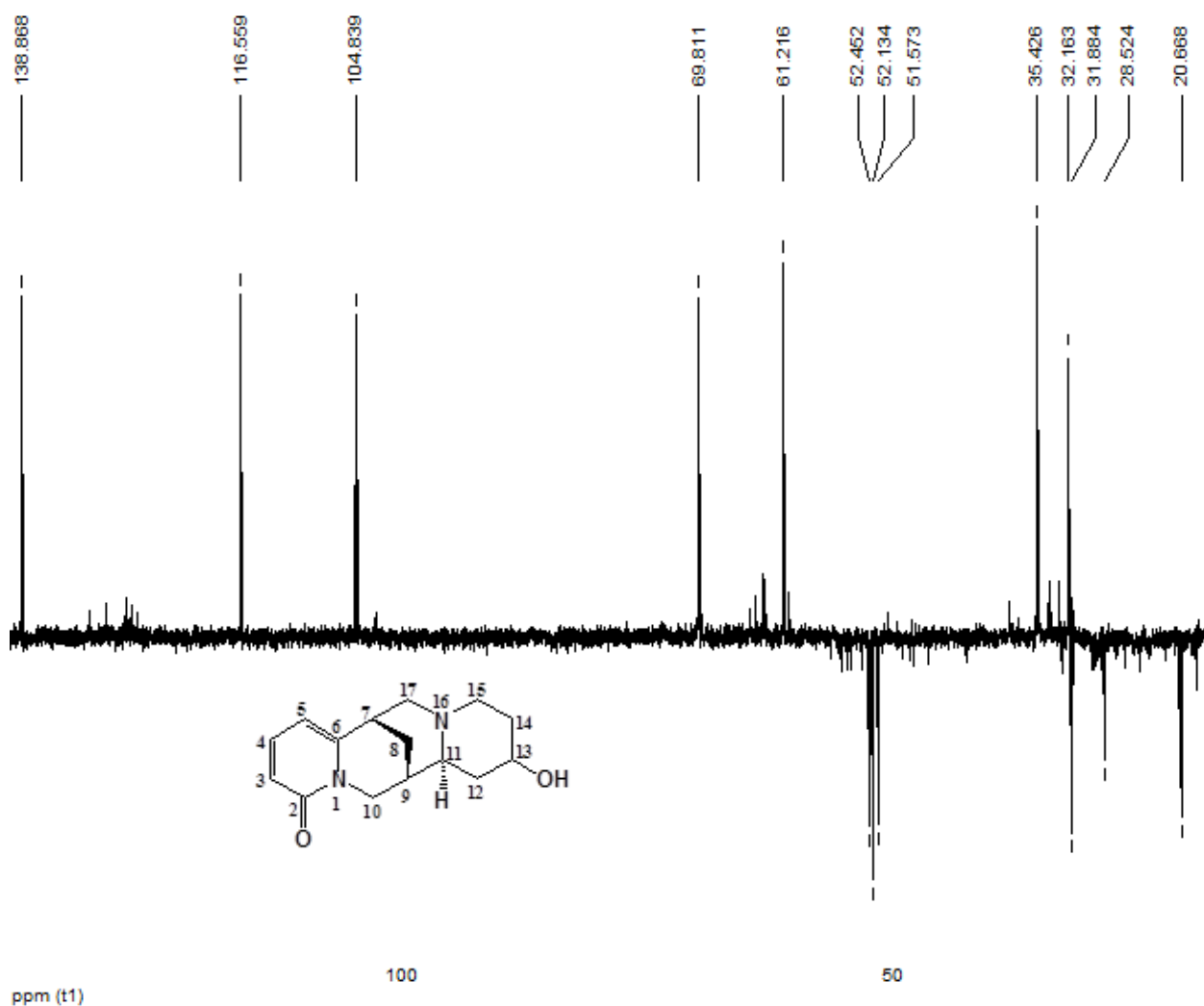
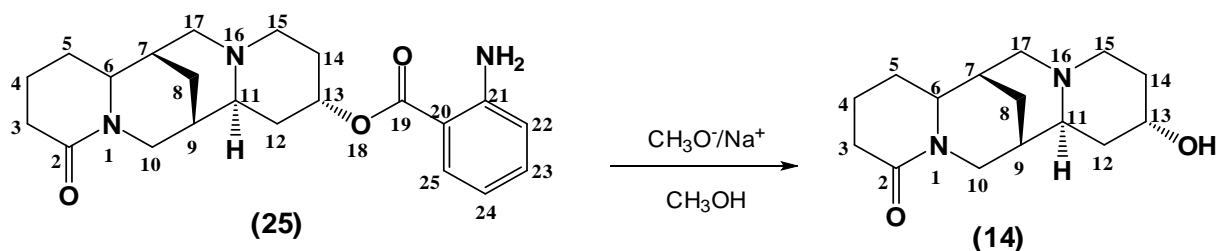


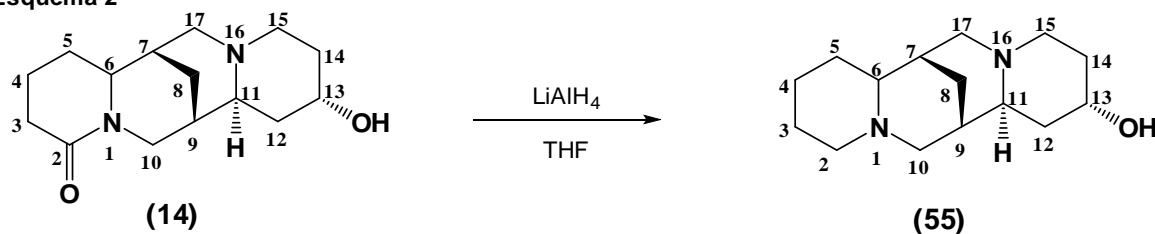
Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135°, do composto 13- α -hidroxianagirina (**53**), obtido em CDCl_3 .

5.3.7 Obtenção dos alcaloides 13- α -hidroxilupanina (14) e 13- α -hidroxilusparteína (55) sintética a partir do composto (+)Lanatina A

Esquema 1



Esquema 2



Como mencionado anteriormente, dois derivados sintéticos foram sintetizados a partir do alcaloide (+)Lanatina A (25). O composto (25) foi primeiramente isolado da espécie *L. lanatus*. Dessa planta, foram obtidos aproximadamente 37 mg da substância. Novos estudos com outra espécie de lupinos, *L. paranensis*, permitiu o isolamento de uma grande quantidade de (+)Lanatina A, 102 mg. Essa quantidade de composto permitiu a proposta de dois derivados sintéticos com a finalidade de testar o potencial biológico dessas estruturas. De acordo com a literatura^{111,112}, alguns alcaloides quinolizidínicos possuem uma elevada atividade antidiabética, antitumoral, neurotóxica e antifúngica. Dessa forma, as reações de derivatização de grupos funcionais com (+) Lanatina A foram realizadas com a finalidade de verificar se as alterações da estrutura influenciam de maneira positiva ou negativa em seu potencial biológico. Os procedimentos reacionais seguiram os seguintes passos: Primeiramente, 50 mg do composto (25) foi submetido a uma hidrólise básica com metóxido de sódio (CH_3O^-

/Na⁺), em atmosfera anidra durante 6 horas. A reação apresentou um rendimento de aproximadamente 50% formando composto **(14)** conforme esquema reacional da Figura 56.

Esquema 1

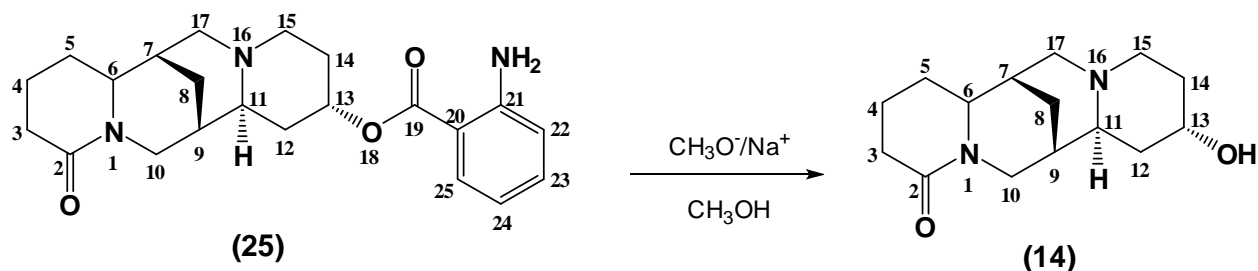


Figura 56. Esquema de derivatização (hidrólise básica) do alcaloide (+)Lanatina A (**25**) para obtenção do composto 13- α -hidroxilupanine sintética (**14**).

A reação foi acompanhada por (CCD) durante todo o processo. Ao final, a solução foi neutralizada e o solvente rotaevaporado em rotaevaporador rotatório sob pressão reduzida. O produto final foi ressuspensão em 150 ml de água e extraído com uma partição do tipo ácido-base. Não houve necessidade de colunar o produto devido os resíduos reacionais serem removidos na fração etérea ácida. Como o produto obtido possui características básicas, no momento em que este foi acidificado, com HCl 2N, o mesmo formou um sal solúvel na solução aquosa. A solução aquosa ácida foi submetida a sucessivas extrações com éter etílico para retirada dos resíduos ácidos e neutros. Posteriormente, a solução aquosa foi alcalinizada com NH₄OH 1M e o produto da reação, **(14)**, foi extraído com diclorometano. Após a evaporação do solvente e secagem da amostra sob vácuo, a mesma foi pesada e obteve-se 23 mg de um óleo amarelo claro com as mesmas características cromatográficas do alcaloide **(14)** isolado naturalmente. Além da comparação por (CCD), a amostra foi submetida a espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C para verificar a pureza e se o produto obtido realmente era a o composto 13- α -hidroxilupanine sintética.^{102,103,104,105,106,107,108,109}

Observando os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C pode-se observar a hidrólise do éster substituintes de (+)Lanatina A pelo desaparecimento dos sinais na região de aromáticos do espectro, sugerindo que a reação ocorreu sem maiores problemas. As Figuras 57-61 apresentam os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de (+)Lanatina A antes e após a reação para comprovação que a mesma ocorreu.

5.3.7.1 Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide (+)Lanatina A (25)

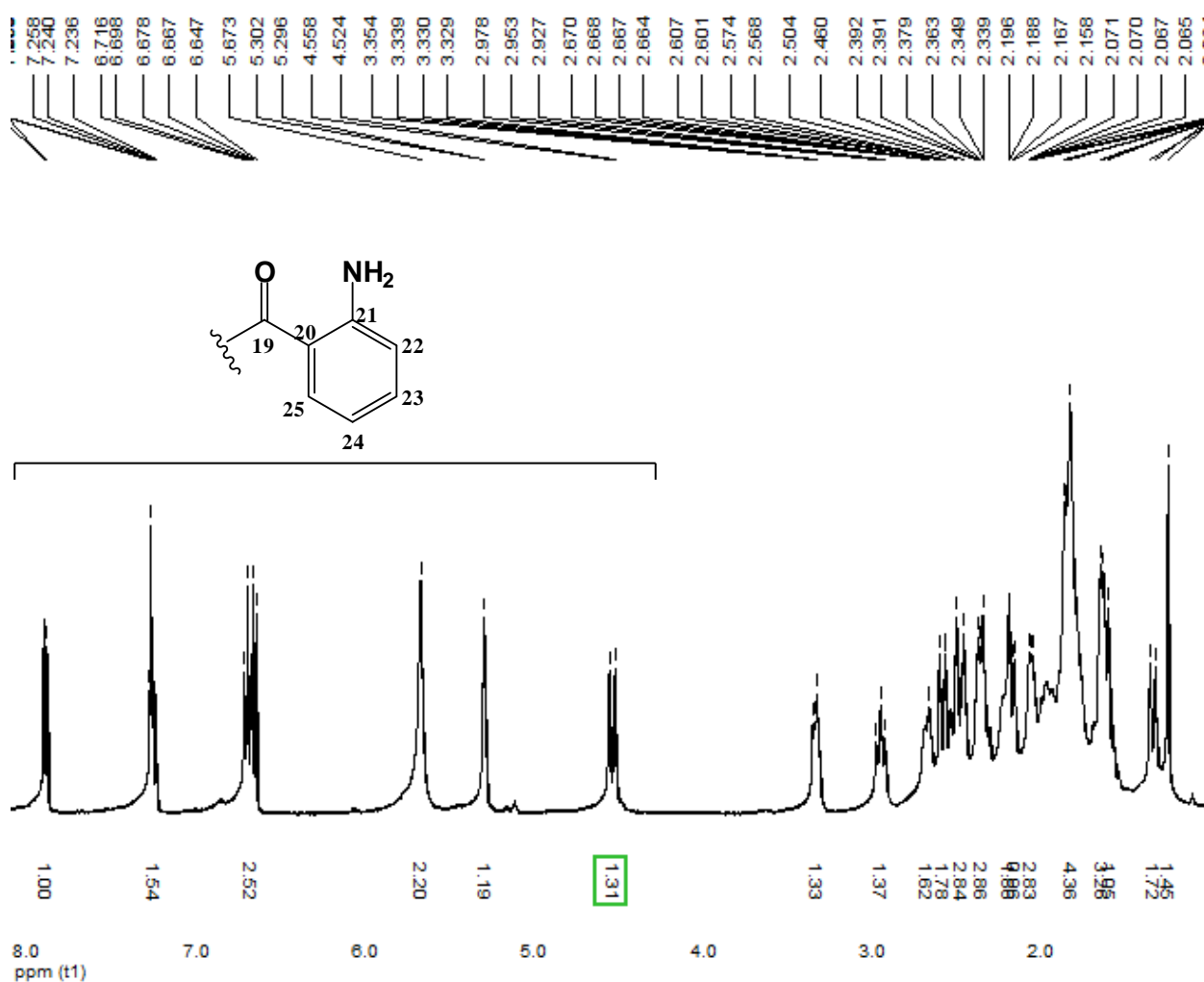


Figura 57. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do composto (+)Lanatina A (25) antes da reação de hidrólise com $\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$, obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

5.3.7.2 Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide (+)Lanatina A (25)

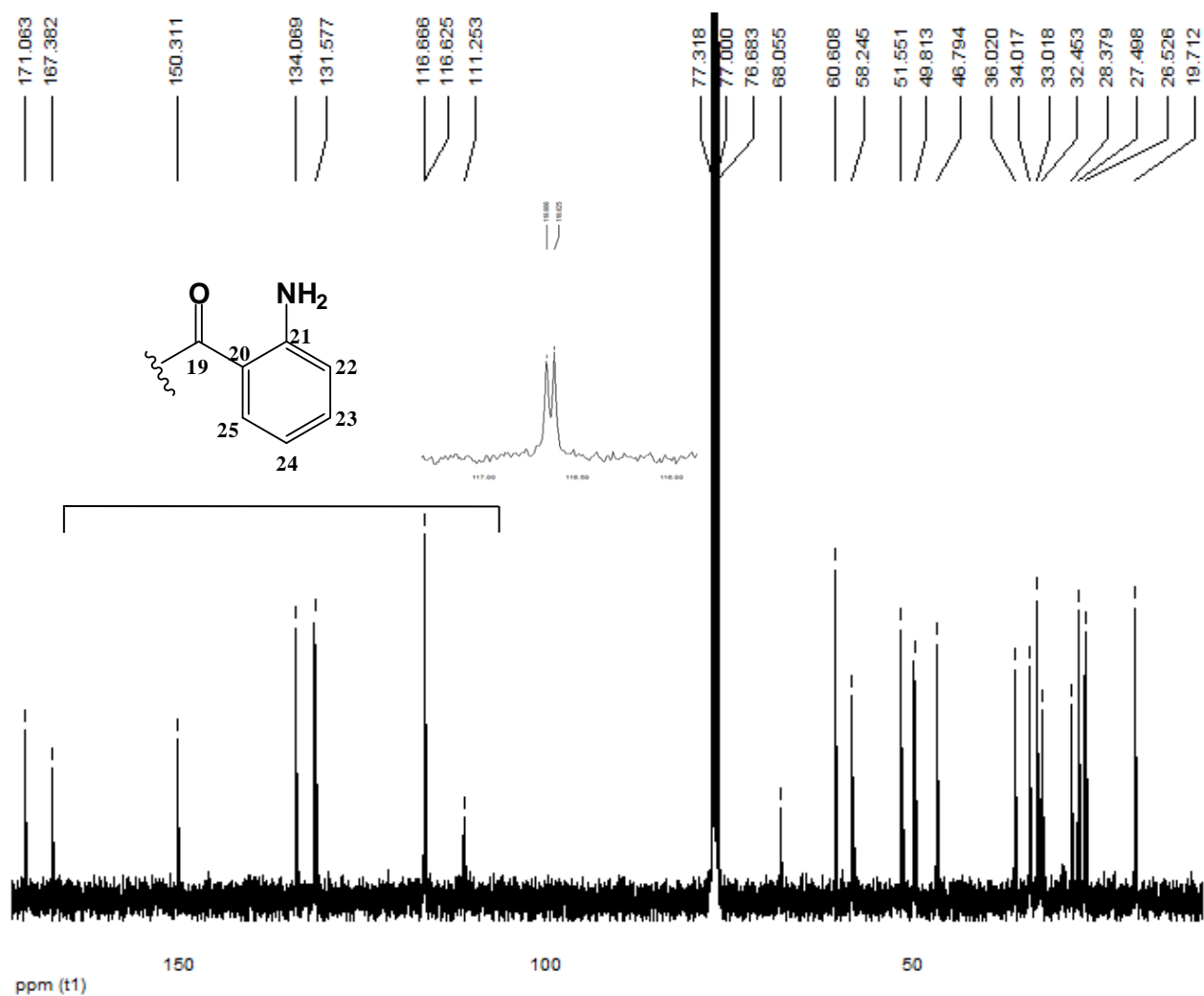


Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C do composto (+)Lanatina A (25) antes da reação de hidrólise com $\text{CH}_3\text{O}^-/\text{Na}^+$, obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 °C.

5.3.7.3 Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide 13- α -hidroxilupanina sintética (14)

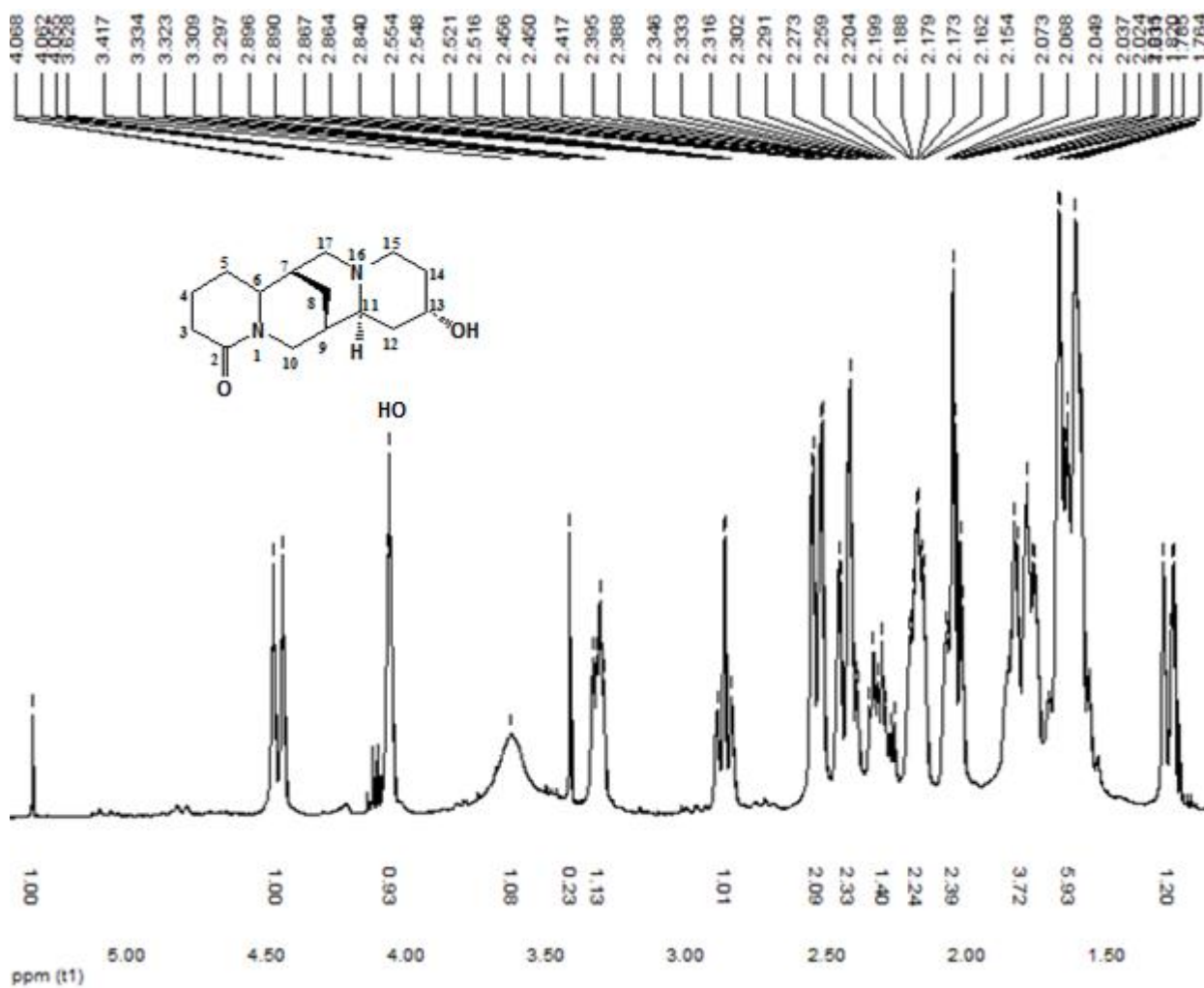


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H do composto 13- α -hidroxilupanine (**14**), sintética, após a reação de hidrólise em $\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$, de (+)Lanatina A obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

5.3.7.4 Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide 13- α -hidroxilupanina sintética (14)

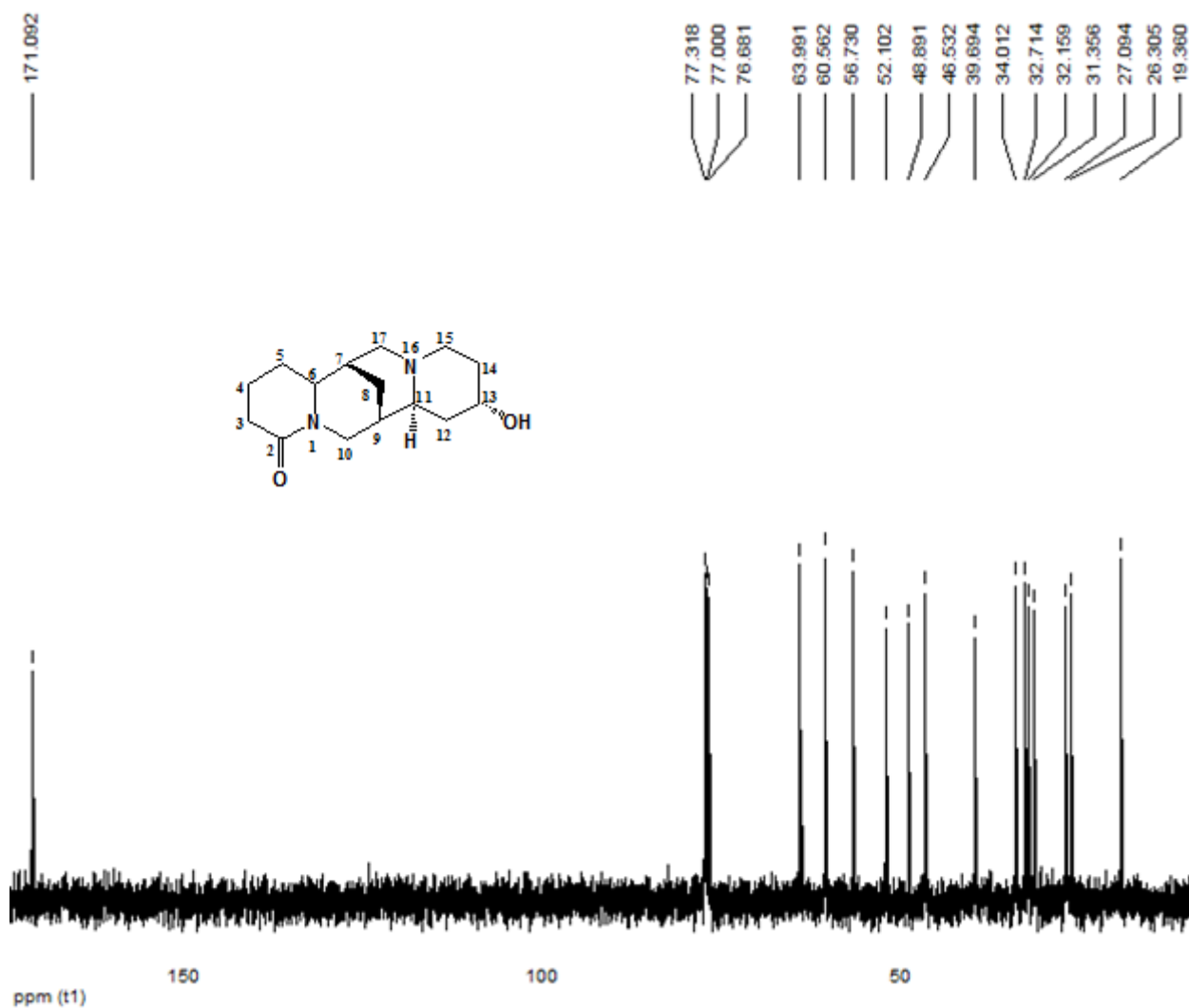


Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 13- α -hidroxilupanina sintética (14) após a reação de hidrólise de (+) Lanatina A em $\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$, obtido em CDCl_3 à 100,62 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

5.3.7.5 Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135° , do alcaloide 13- α -hidroxilupanina sintética (14)

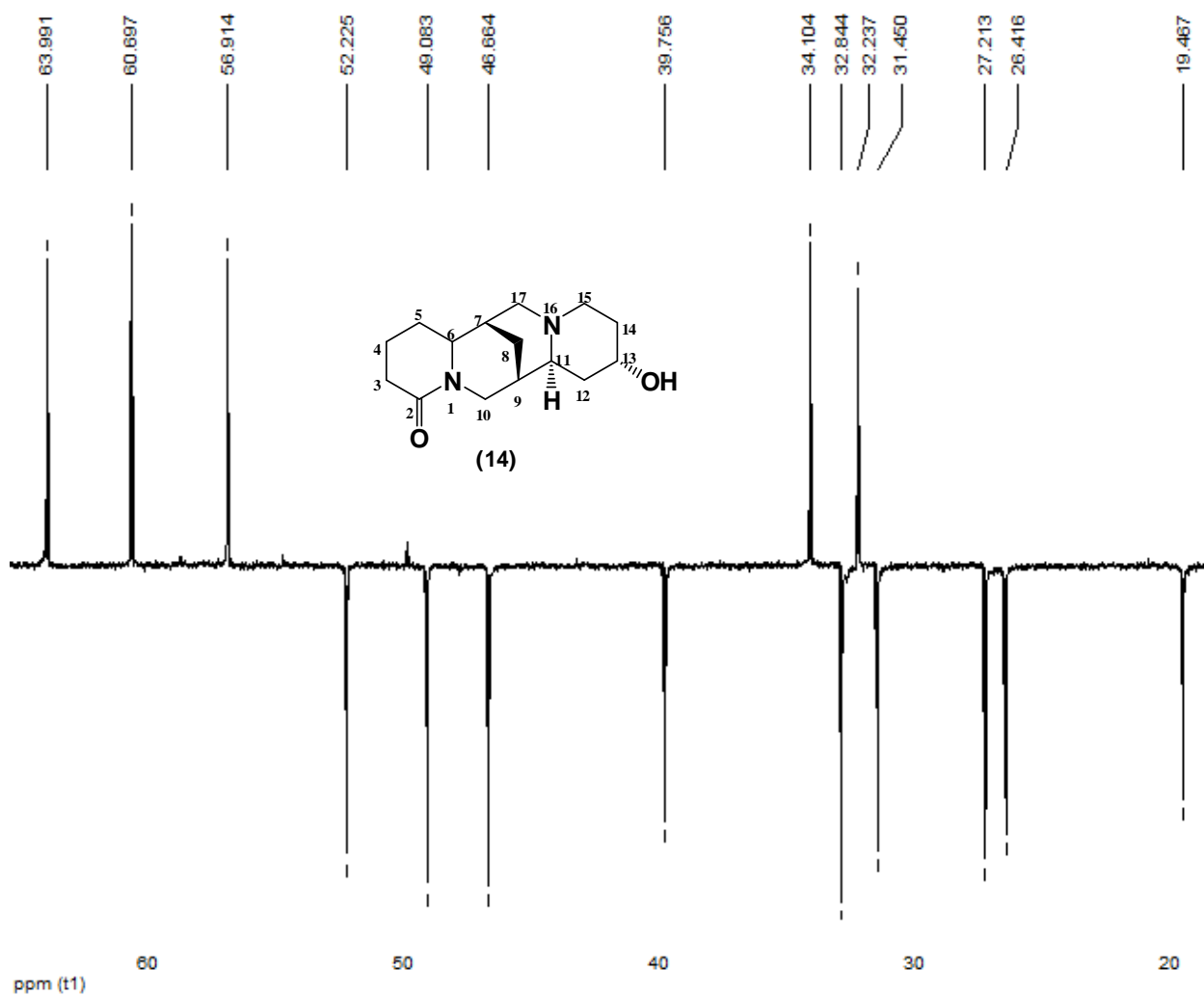


Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C bidimensional, DEPT 135° , do composto 13- α -hidroxilupanina sintética (14), obtido em CDCl_3 .

5.3.8 Dados de RMN de ^1H ^{13}C Unidimensional e Bidimensional do Derivado 13- α -Hidroxisparteína Sintética (55), Obtida por Redução com LiAlH_4 a Partir do Composto 13- α -hidroxilupanina (14), sintética.

O alcaloide (14) teve a $\text{C}=\text{O}$ da amida reduzida a CH_2 com LiAlH_4 sob refluxo por 17 horas em meio anidro. Como produto da reação, foi obtido o composto (55) conforme o esquema da Figura 62.

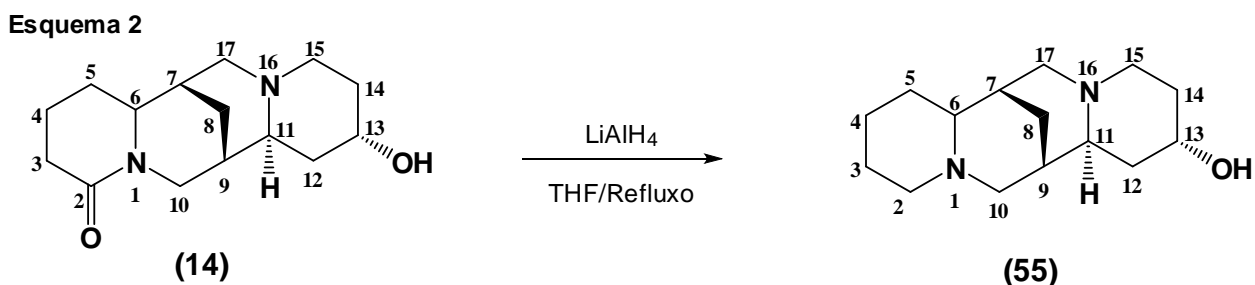


Figura 62. Esquema de redução de ($\text{C}=\text{O}$) da amida do composto (14) com LiAlH_4 para obtenção do composto 13- α -hidroxisparteína sintética (55).

Nesta reação, o composto (14) foi submetido a uma redução da carbonila da amida a CH_2 utilizando LiAlH_4 em tetrahydrofurano (THF), como solvente, em meio anidro e refluxo durante 17 horas.^{56,104,105,106,107,108,109,110,111,112}

Nesse esquema reacional, primeiramente, o sistema foi flambado sob fluxo de Argônio para eliminação completa da umidade. Posteriormente, com auxílio de um funil de adição de líquidos, foi adicionado 50 ml de THF. Após, o sistema foi resfriado para adição de quantidade catalítica de LiAlH_4 correspondente às 23 mg de 13- α -hidroxilupanina sintética. Depois da adição de LiAlH_4 , o composto a ser reduzido foi dissolvido em certa quantidade de THF, seco sob refluxo, e adicionado ao balão da reação. Por fim, cuidadosamente, o banho de gelo foi retirado e a reação prosseguiu por 17 horas em refluxo sendo monitorada de duas em duas horas por (CCD). Ao final

do processo reacional, o refluxo foi desligado e o sistema da reação resfriou naturalmente.

Depois de resfriar, foi realizada uma filtração simples para separação do resíduo de hidreto que foi neutralizado com etanol. O solvente da reação foi rotaevaporado e o produto ressuspense em 125 ml de água. Novamente foi realizada somente uma extração do tipo ácido-base, devido as características químicas do produto esperado para a reação. Ao termino do processo, obteve-se 18 mg de um sólido cristalino que foi submetido a um teste de pureza por (CCD) e apresentou um Rf: 0,65 em (CH₂Cl₂/MeOH 93:7, v/v). Posteriormente a espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C, uni e bidimensionais, comprovou a formação do produto desejado. Dois dados importantes no experimento de RMN de ¹H e ¹³C desacoplado para essa estrutura foram: o desaparecimento do sinal da carbonila em δ 171,0 ppm no espectro de ¹³C e o aparecimento de um sinal na região de δ 24,0 ppm. Também o espectro de RMN de ¹³C apontou o deslocamento do sinal de (C-13) que passou de δ 63,9 para δ 66,4 ppm. O espectro de RMN de ¹³C bidimensional, DEPT 135°, apresentou um novo sinal de CH₂ na região de deslocamento δ 24,0 ppm. As Figuras 63-65 (pág. 129-131) apresentam os espectros de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais obtidos para o composto **(55)**.

5.3.8.1 Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide 13- α -hidroxisparteína sintética (55)

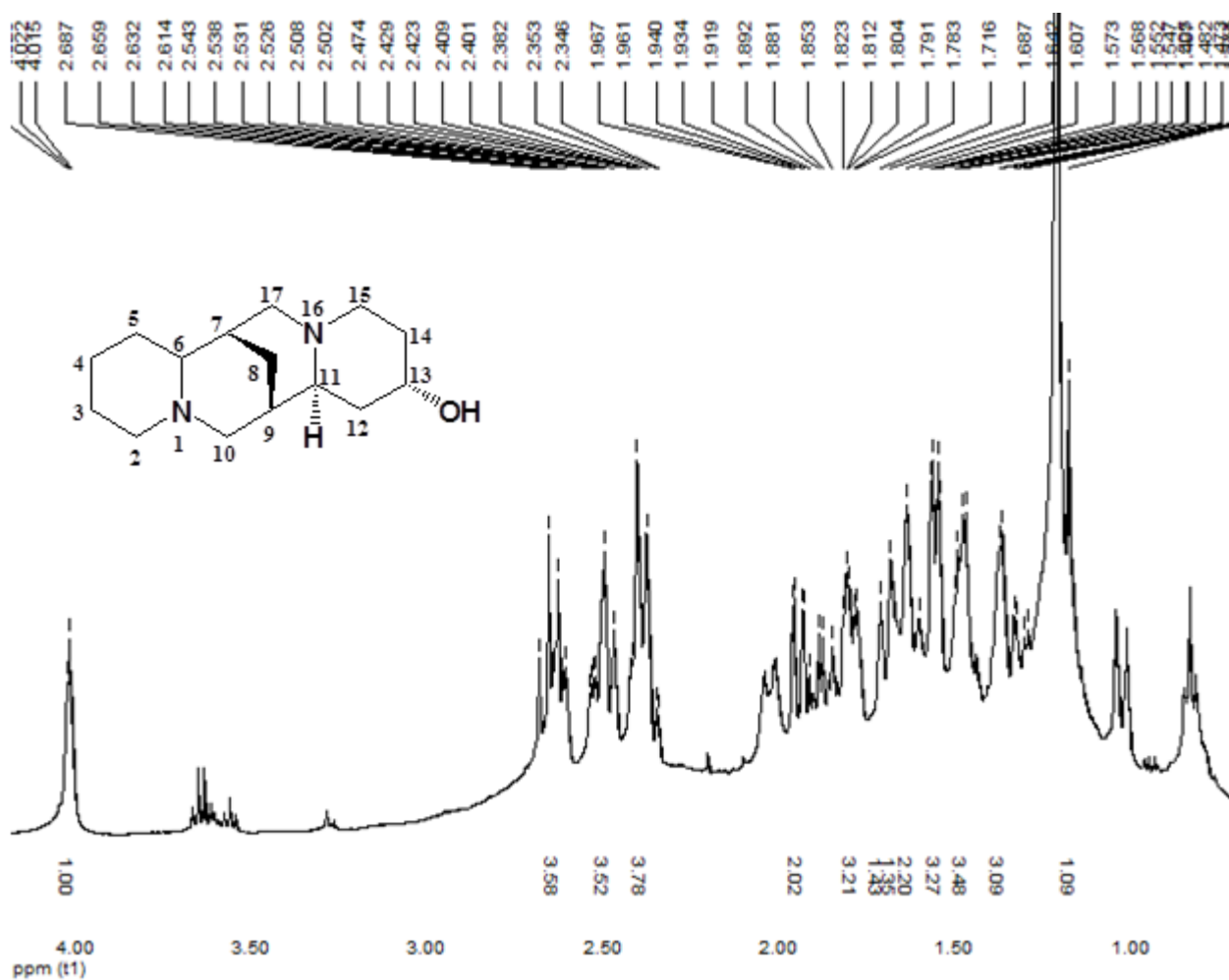


Figura 63. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do composto 13- α -hidroxisparteína (55) após redução de 13- α -hidroxilupanina sintética (14), com LiAlH_4 obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$.

5.3.8.2 Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide 13- α -hidroxisparteína sintética (55)

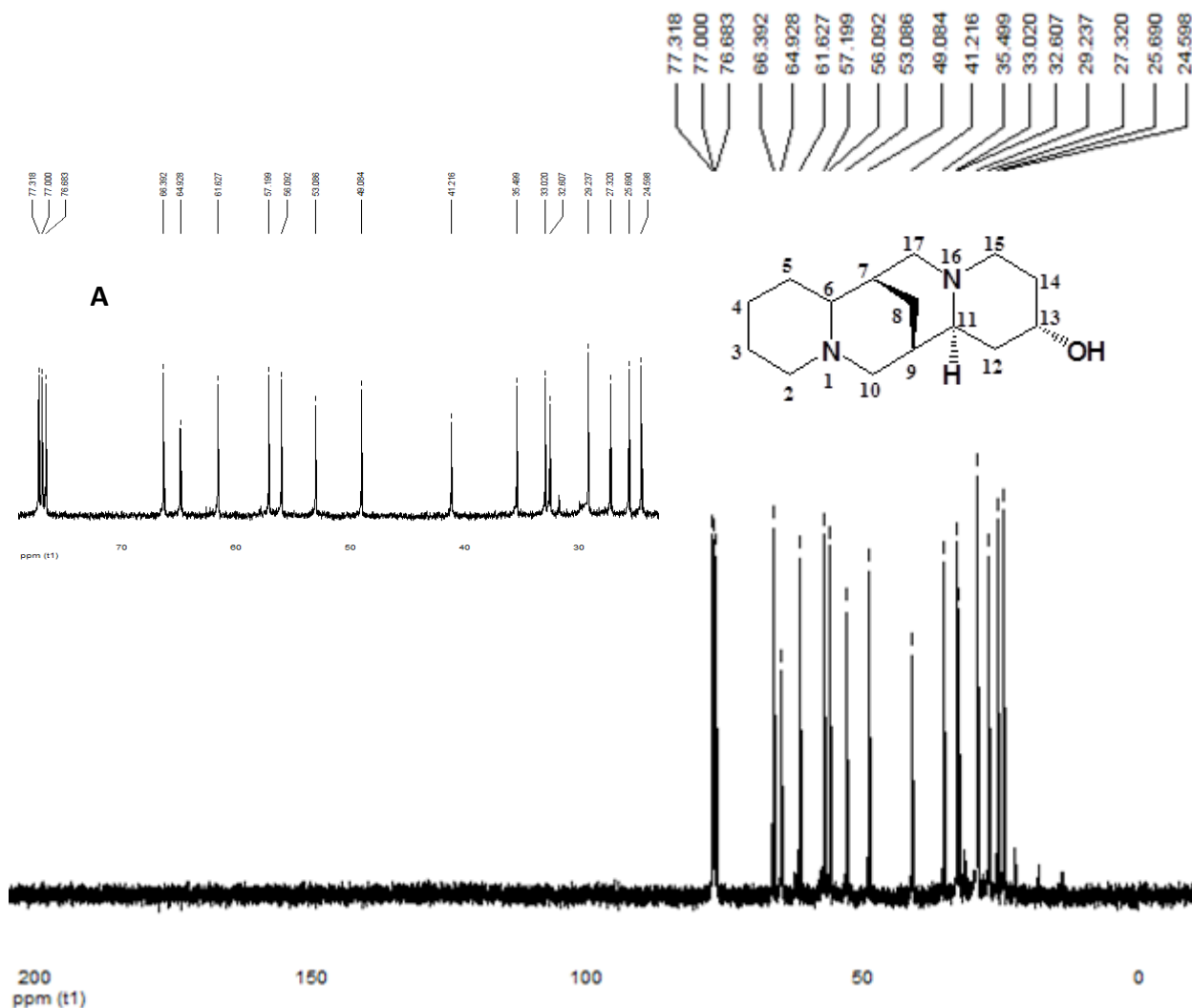


Figura 64. Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do composto 13- α -hidroxisparteína (55) após redução de 13- α -hidroxilupanina sintética (14), com LiAlH_4 obtido em CDCl_3 a 400,13 MHz e 25 $^\circ\text{C}$. Em (A) expansão do espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do composto 13- α -hidroxisparteína sintética (55), região de deslocamento químico entre (δ 22,0 ppm e δ 78,0 ppm).

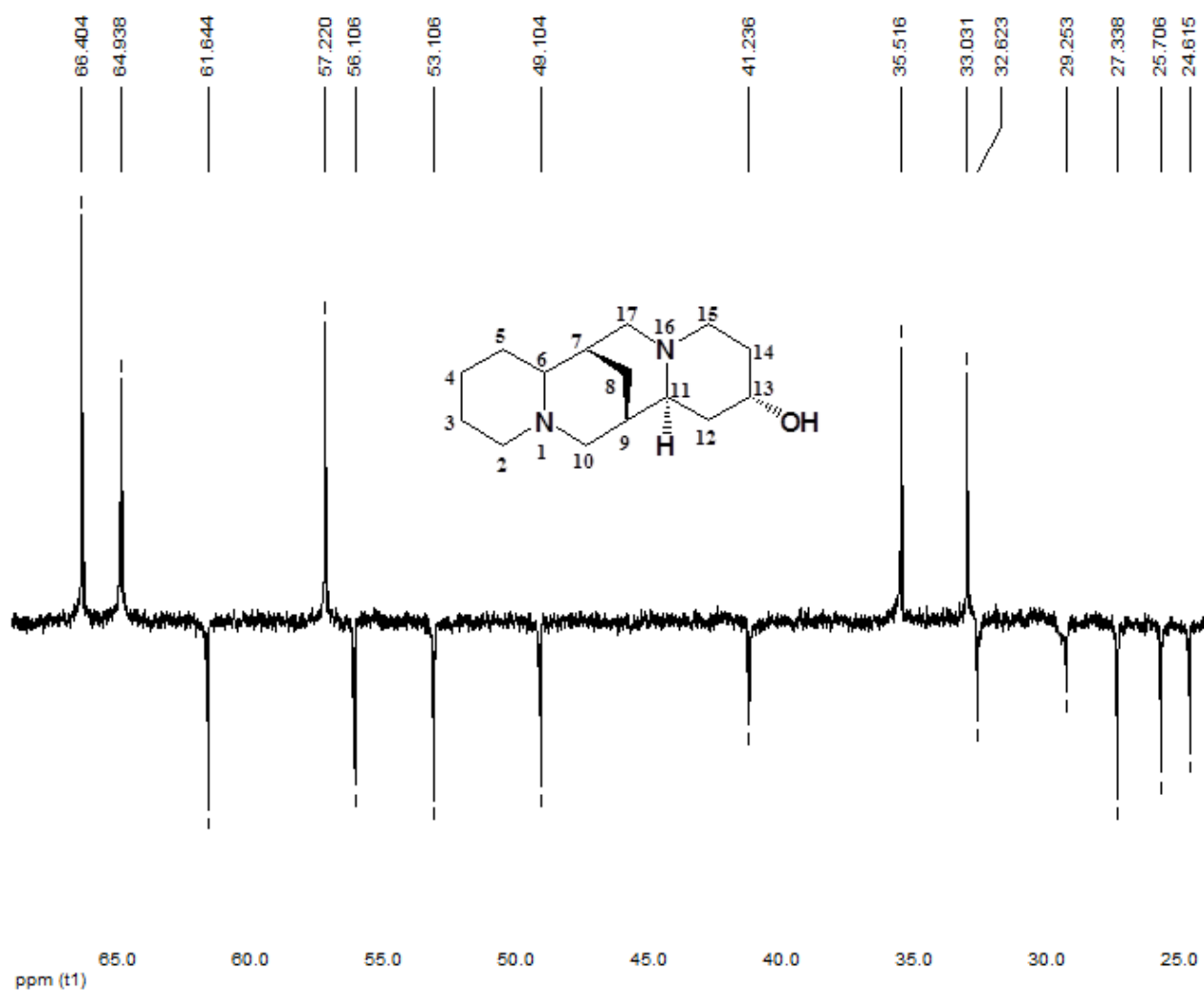
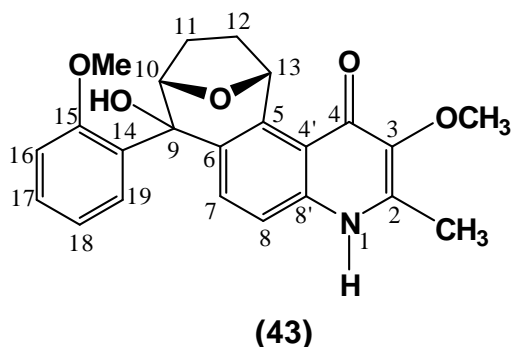


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C , bidimensional, DEPT 135 $^{\circ}$, do composto 13- α -hidroxisparteína sintética (**55**) obtido em CDCl_3 .

5.3.9 Análise dos Dados de RMN de ^1H e ^{13}C Uni e Bidimensionais dos Alcaloides Isolados e Identificados da Espécie de *W. douradina* Sit. Hil.

5.3.9.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do Alcaloide Waltheriona-A (43)



O composto Walteriona A foi obtido da fração etérea básica da casca das raízes da espécie *W. douradinha* Sit. Hil. diretamente por CCDP, em sistema de solvente que proporcionou uma excelente separação das substâncias, (CHCl_3 :MeOH, 92:8). Para melhorar o Rf nos pontos de aplicação das amostras, foi utilizado 25 gotas de NH_4OH para cada 100 ml do sistema.

(43) apresenta-se como um sólido amorfo branco com Rf = 0,55 (CHCl_3 :MeOH (97:3 v/v) + 3 gotas de NH_4OH para cada 10 ml de eluente), e Pf = 204,4 - 205,6 °C. (literatura^{14,73,74,75} 206,9 - 207,2 °C).

O espectro de RMN de ^1H do alcaloide **(43)** identificado como Walteriona-A, apresenta uma região de hidrogênios aromáticos e metilênicos entre δ 6,31 e 7,83 ppm, exceto pela presença de um hidrogênio metínico em δ 6,5 ppm (1H, *d*, $J = 6,0$ Hz, H13). A outra região corresponde aos hidrogênios metílicos e fica entre δ 1,5 e 2,8 ppm. Nesta, é possível verificar, no deslocamento químico de δ 2,6 ppm (3H, *s*, H20), a metila ligada em C-2. Os hidrogênios metilênicos H-11 e H-12 foram atribuídos no

espectro e aparecem como 4 multipletos de difícil observação por serem diastereotópicos. No centro do espectro, ainda é possível verificar dois singletos de alta intensidade, com deslocamentos químicos de δ 3,85 e 4,0 ppm, que representam os hidrogênios das metoxilas. No sinal δ 4,7 ppm, observa-se (1H, *d*, $J = 6,0$ Hz, H10). Não foi possível observar o hidrogênio da hidroxila, porém, o espectro mostrou um sinal alargado de baixa intensidade em δ 10,42 ppm correspondendo ao (N–H), Figura 66.

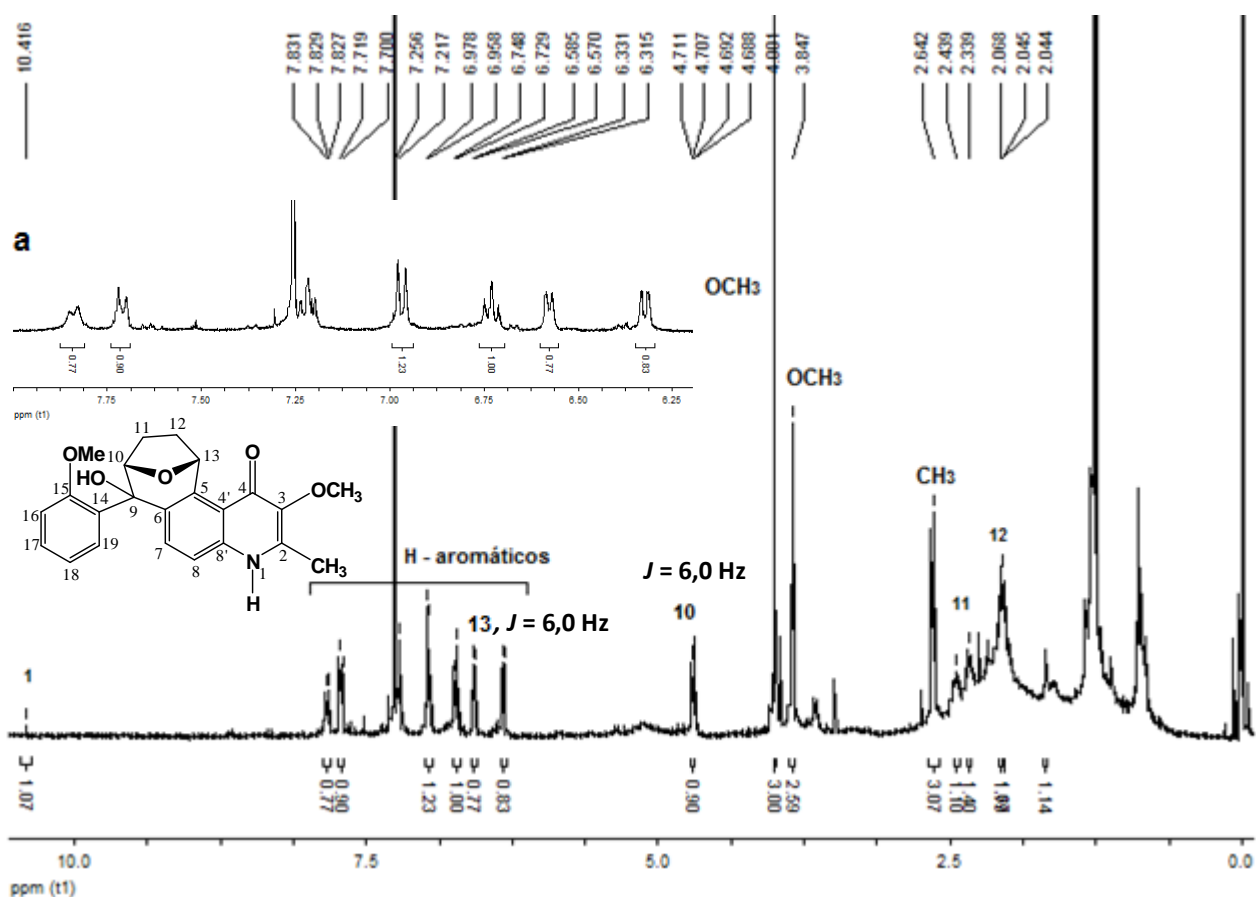


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H unidimensional de Walteriona-A (43), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C. Em (a) - Espectro de RMN de ^1H de Walteriona-A, expansão da região entre δ 6,20 à 7,80 ppm.

5.3.9.2 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do Alcaloide Waltheriona-A (43)

O objetivo do espectro de RMN COSY ^1H - ^1H para o composto **(43)** foi determinar a conectividade correta entre os hidrogênios da molécula. O experimento foi obtido em CDCl_3 e possibilitou a identificação de três sistemas de spins mostrando, principalmente, as correlações entre os quatro hidrogênios aromáticos, que absorvem em: δ 7,23 (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz, H16); δ 6,9 (1H, *dd*, H17); δ 6,7 (1H, *dd*, H19) e δ 6,32 (1H, *d*, $J = 6,4$ Hz, H19). Observando o sistema de spins e os valores de J -resolvido, nota-se que esses hidrogênios estão em posições vicinais, comprovando que esse anel é *O*-substituído, representando a fenila lateral. O segundo sistema de spins é isolado e mostra a correlação entre os outros dois hidrogênios aromáticos, em posição orto. Esse sistema corresponde ao grupamento benzênico da quinolona e os deslocamentos apontados para esses hidrogênios são os seguintes: δ 7,7 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H8) e δ 7,8 (1H, *d*, $J = 1,2$ Hz, H7). O terceiro sistema pertence aos hidrogênios alifáticos e consegue-se verificar os acoplamentos entre H-13 e H-12 e também entre H-10 e H-11, os quais também estão indicados no espectro de correlação ^1H - ^1H COSY, Figura 67 (pág. 135).

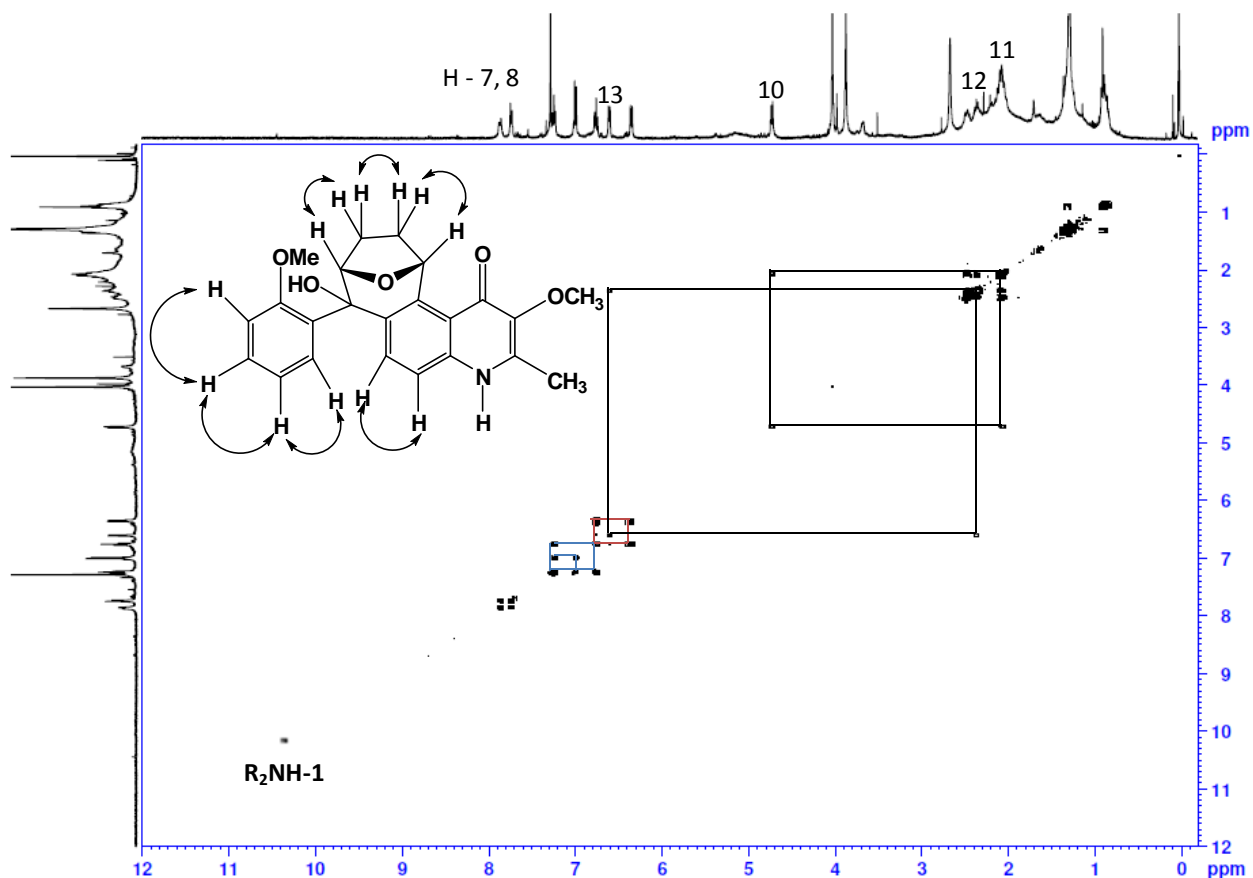


Figura 67. Espectro de RMN de correlação, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de Waltheriona-A (**43**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C.

5.3.9.2.1 Dados de RMN de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ bidimensional, COSY, do Alcaloide Waltheriona-A (**43**), expansão da região de deslocamento químico entre δ 6,20 a 7,80

A expansão da região entre δ 6,20 a 7,80 ppm do espectro de RMN 2D, $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY, de Waltheriona-A em CDCl_3 , mostra mais claramente a correlação entre os hidrogênios dos dois sistema de spins aromáticos referidos, Figura 68 (pág. 136)

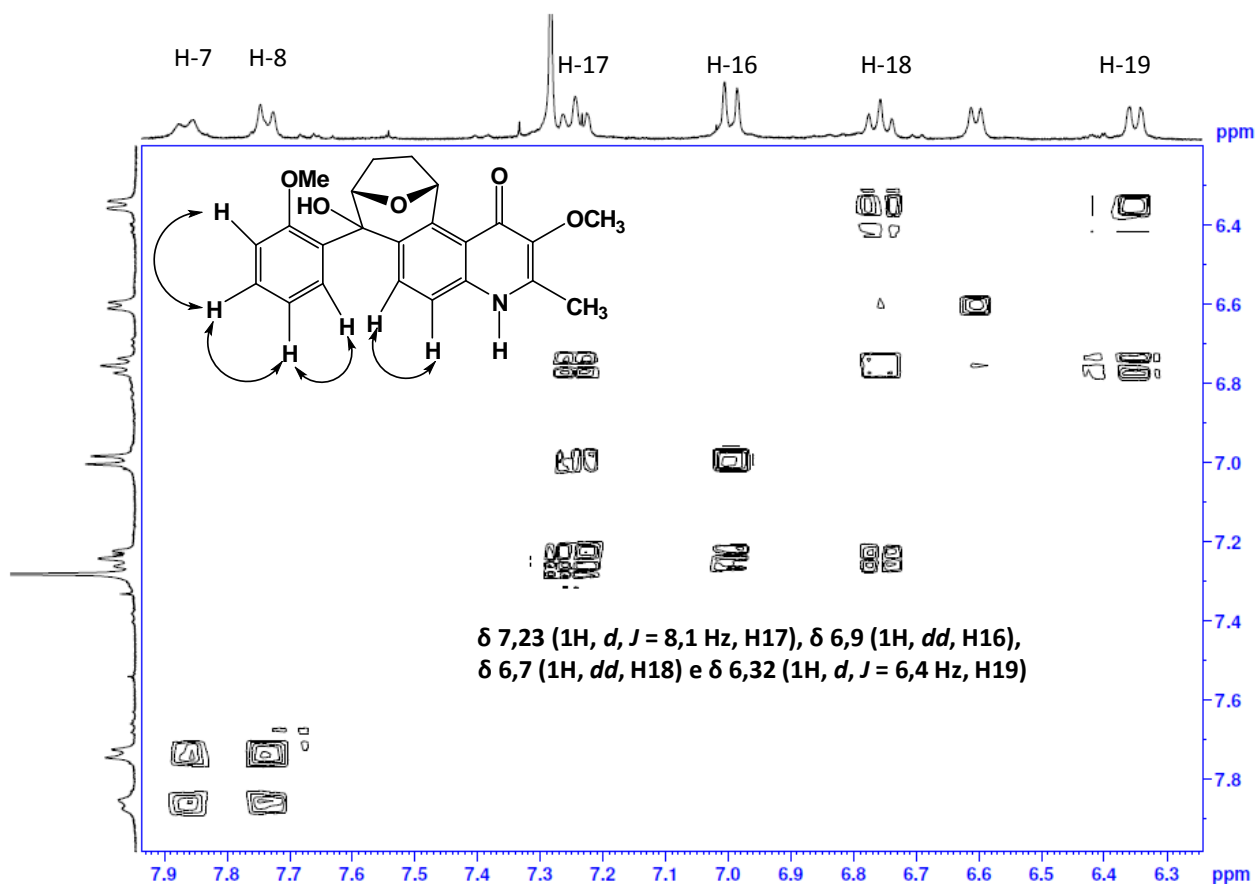


Figura 68. Espectro de RMN de correlação, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de Waltheriona-A (**43**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C, expansão da região entre δ 6,20 a 7,80 ppm, sistema aromático.

5.3.9.3 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do Alcaloide Waltheriona-A (**43**)

Com auxílio de dados da Literatura^{14,73,74,75} foi possível atribuir os sinais de RMN ^{13}C para a estrutura (**43**). Para o espectro de carbono desse composto foram observados vinte e dois sinais na região que compreende os deslocamentos químicos entre δ 14,041 - 174,88 ppm.

Através da estrutura já proposta para o composto em questão, observa-se que este é constituído por: 10 carbonos não hidrogenados, 8 carbonos metínicos, 2

carbonos metilênicos e 3 metílicos. Os carbonos metínicos C-13, C-9 e C-10, ambos ligados a oxigênio, aparecem, respectivamente, nas regiões de deslocamento químico δ 76,68, 78,12 e 80,33 ppm. Essa região é característica de ligação do tipo (C–O).

Outros dados que corroboram na elucidação da estrutura, é a presença de um sinal de baixa intensidade em δ 174,89 ppm correspondente a um carbono de carbonila. Também, os sinais dos dois carbonos metilênicos são observados em δ 141,7 ppm (C-2) e em δ 139,302 ppm (C-3). A presença das duas metoxilas na molécula (**43**) é comprovada por dois sinais nas posições δ 55,58 e 60,82 ppm. Os três carbonos metílicos são representados por dois picos de menor intensidade em δ 22,28 ppm (C-11); δ 34,14 ppm (C-12) e um sinal de intensidade maior na região de δ 14,04 ppm (C-20).

Outro ponto importante no espectro de RMN ^{13}C , para a elucidação estrutural de (**43**) são os sinais dos carbonos aromáticos. Um destes e bem característico, ocorre em δ 156,34 ppm correspondente a (C_{Ar} -15) indicando que esse carbono está ligado a um heteroátomo, oxigênio da metoxila. Os outros carbonos aromáticos também foram atribuídos no espectro de RMN ^{13}C e estão distribuídos na região entre δ 111,01 e 141,37 ppm, Figura 69 (pág. 138).

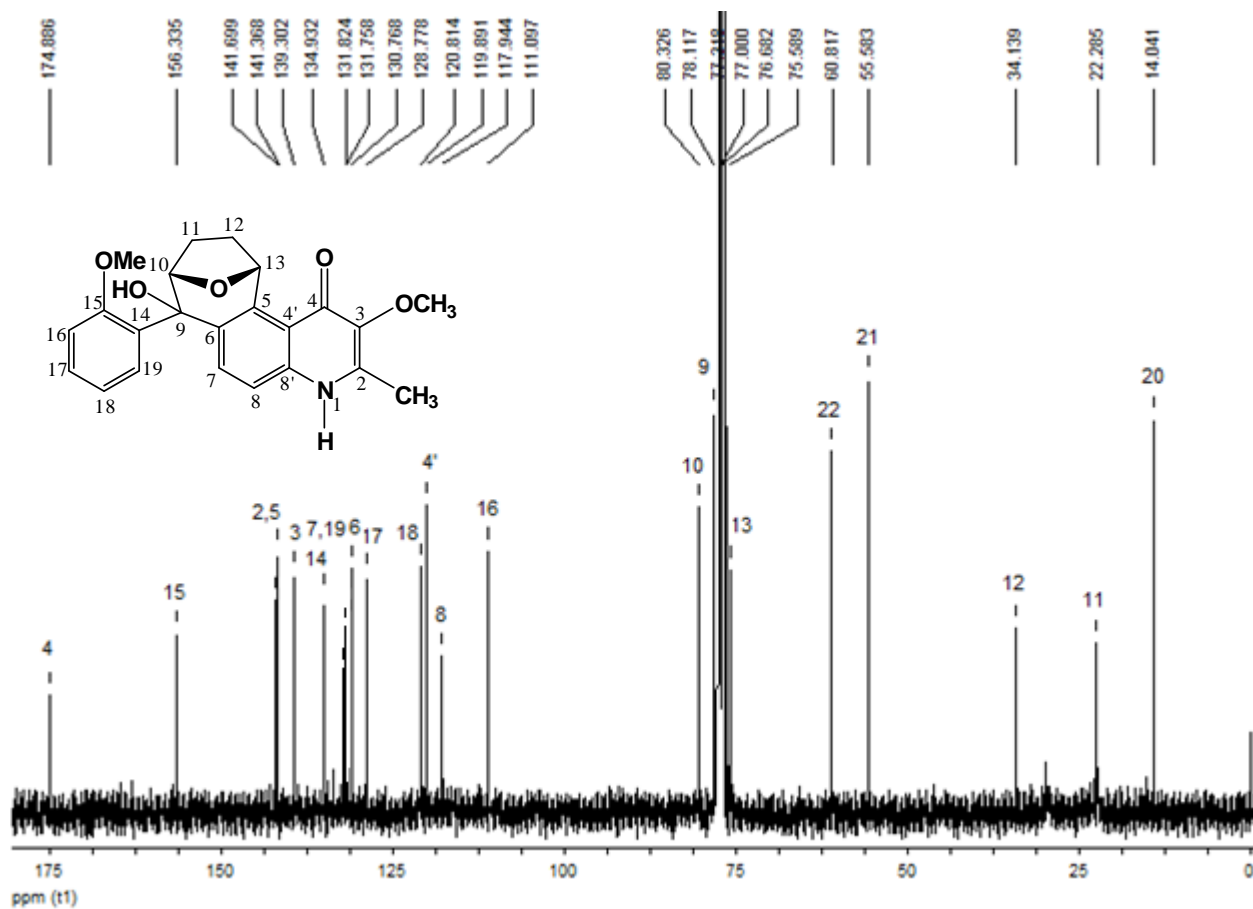
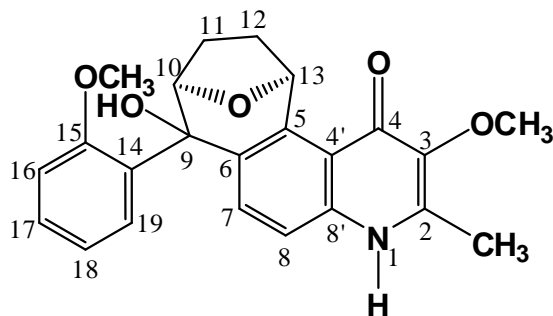


Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional de Walteriona-A (**43**), obtido em CDCl_3 à 100,32 MHz, 25 °C.

5.3.10 Dados de RMN de ^1H unidimensional do Alcaloide Waltheriona-B (44)



(44)

O composto Waltheriona B foi obtido da fração etérea básica da casca das raízes da espécie *W. douradinha* Sit. Hil. diretamente por CCDP, em sistema de solvente e condições idênticas aos do composto (43), descrito anteriormente.

(44) apresenta-se como um sólido amorfo branco com $R_f = 0,65$ em ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (97:3 v/v) + 3 gotas de NH_4OH para cada 10ml de eluente), e $P_f = 206,1 - 207,7$ °C. (literatura^{14,73,74,75}, 207 °C).

No espectro de RMN de ^1H unidimensional de Waltheriona-B pode-se atribuir todos os hidrogênios da estrutura, com exceção do hidrogênio do álcool (CO-H) que não apareceu no espectro. Isso pode ter ocorrido devido a amostra (44) ter sido isolada em menor quantidade que (43), estando assim, mais diluída durante a análise, juntamente com o próprio efeito do solvente utilizado para o experimento, CDCl_3 . Neste espectro não houve o desdobramento do hidrogênio atribuído como H-10. Este aparece como um sinal alargado em δ 4,82 ppm. As metoxilas também são mostradas como dois singletos nas regiões δ 3,7 e δ 2,5 ppm. A metila apresenta-se como um singlete em δ 1,52 ppm cuja integração mostra a presença de 3 hidrogênios. Os prótons H-11 e H-12 são diastereotópicos e aparecem na região entre δ 2,34 e 1,75 ppm como um conjunto de multipletos. H-13 absorve em δ 6,6 ppm como: (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H13). Também observa-se um conjunto de sinais entre δ 6,83 e 7,5 ppm representando os

hidrogênios aromáticos. Por fim, H-1 é mostrado como um singlete alargado em δ 10,43 ppm, Figura 70.

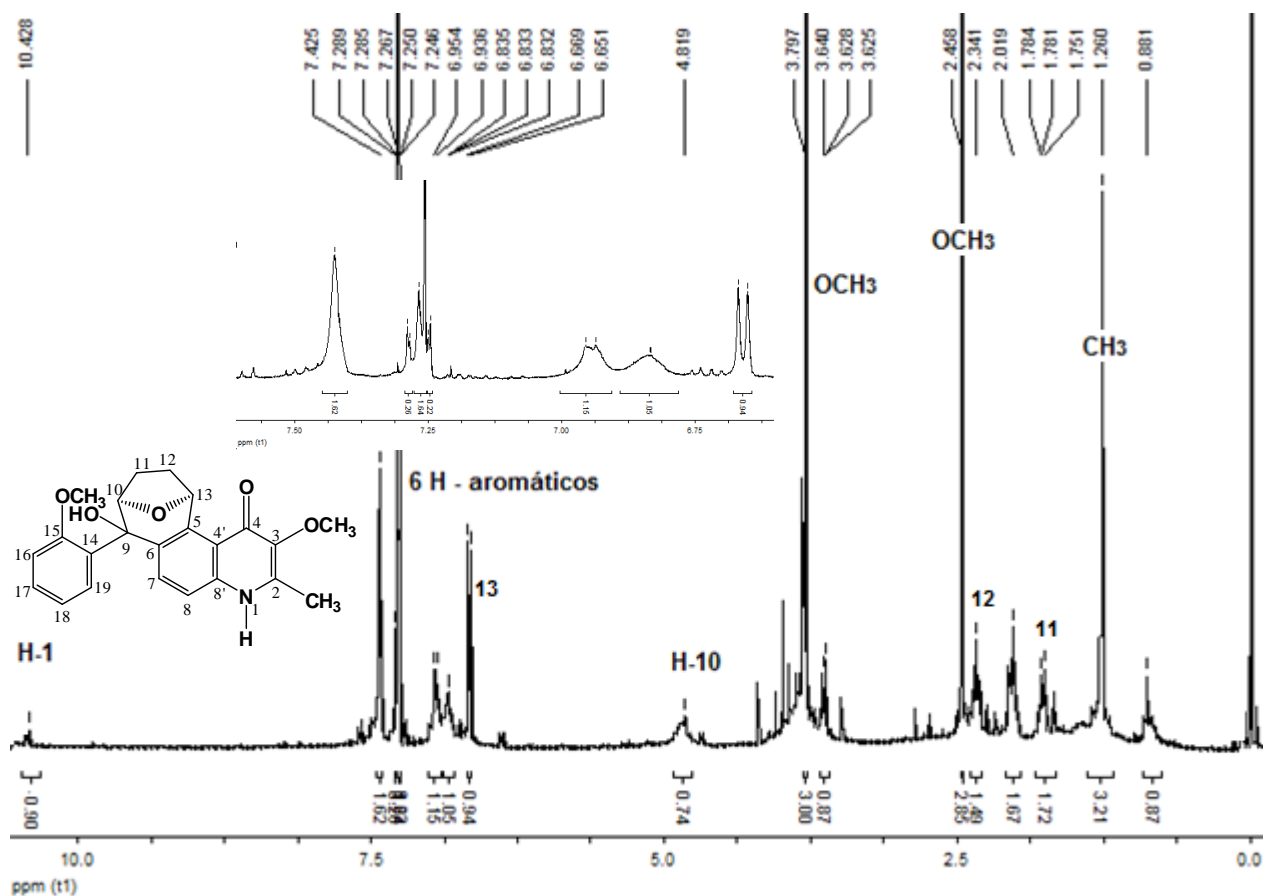


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H unidimensional de Waltheriona-B (**44**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C.

5.3.10.1 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do Alcaloide Waltheriona-B (**44**)

Com o espectro de RMN COSY ^1H - ^1H do composto (**44**) foi possível determinar a conectividade correta entre os hidrogênios da estrutura através da observação dos

acoplamentos dos mesmos. Da mesma forma que para o composto identificado como **(43)**, este experimento foi obtido em CDCl_3 e possibilitou a identificação de três sistemas de spins que demonstra as correlações entre os quatro hidrogênios aromáticos em posições vicinais da fenila lateral, cuja o anel é orto substituído. O segundo sistema de spins é isolado e mostra a correlação entre os outros dois hidrogênios aromáticos, também em posição orto. Esse sistema corresponde ao grupamento benzênico da quinolona e os deslocamentos apontados para esses hidrogênios são os seguintes: δ 7,6 (1H, *d*, $J = 7,1$ Hz, H8) e δ 7,7 (1H, *d*, $J = 1,4$ Hz, H7). O terceiro sistema de spins que representa os hidrogênios alifáticos da estrutura possibilita verificar os acoplamentos entre H-13 e H-12 e também entre H-10 e H-11, os quais também estão indicados no espectro de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY, Figura 71.

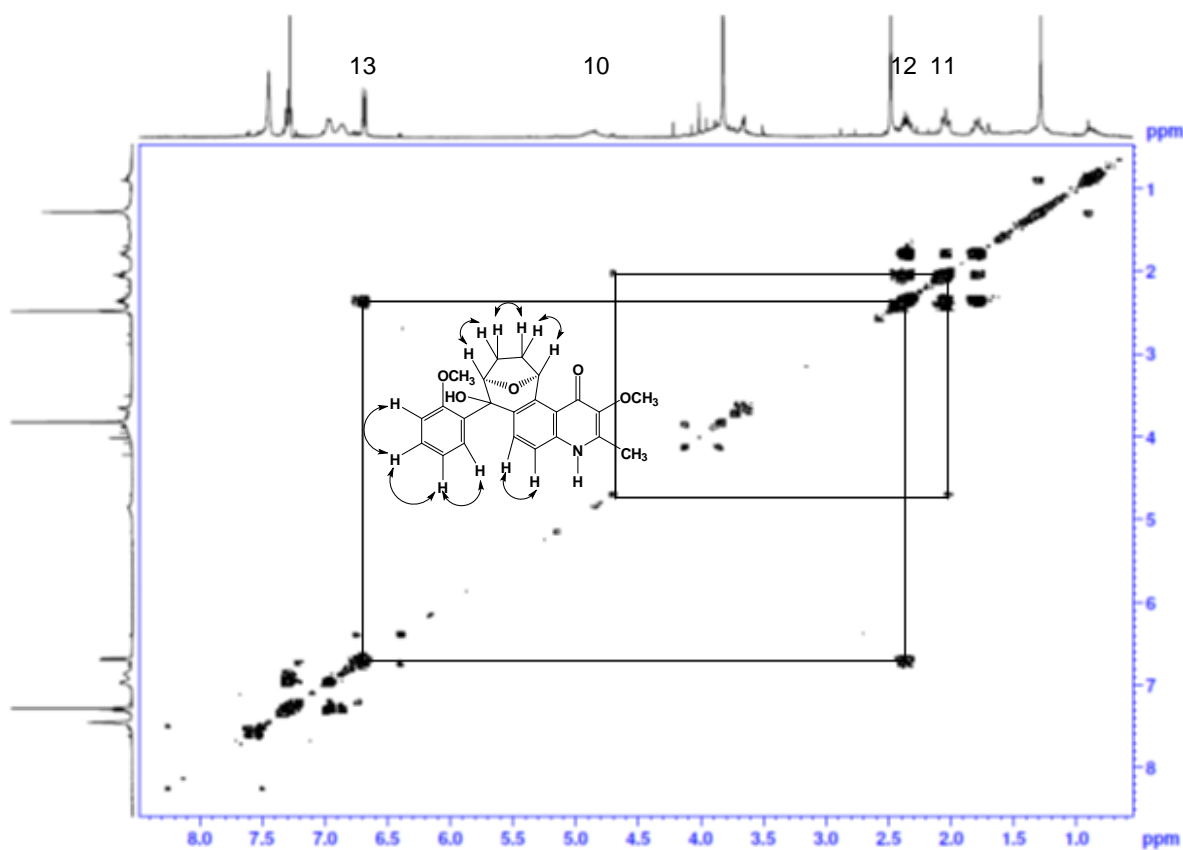


Figura 71. Espectro de RMN de correlação, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$, de Walteriona-B **(44)**, obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C.

5.3.10.1.1 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do Alcaloide Waltheriona-B (44), expansão da região de deslocamento químico entre δ 2,0 a 8,5 ppm

A expansão da região δ 2,0 a 8,5 ppm do espectro de RMN 2D, ^1H - ^1H COSY, de Waltheriona-B, em CDCl_3 , mostra mais claramente a correlação entre os hidrogênios dos dois sistema de spins aromáticos referido, Figura 72.

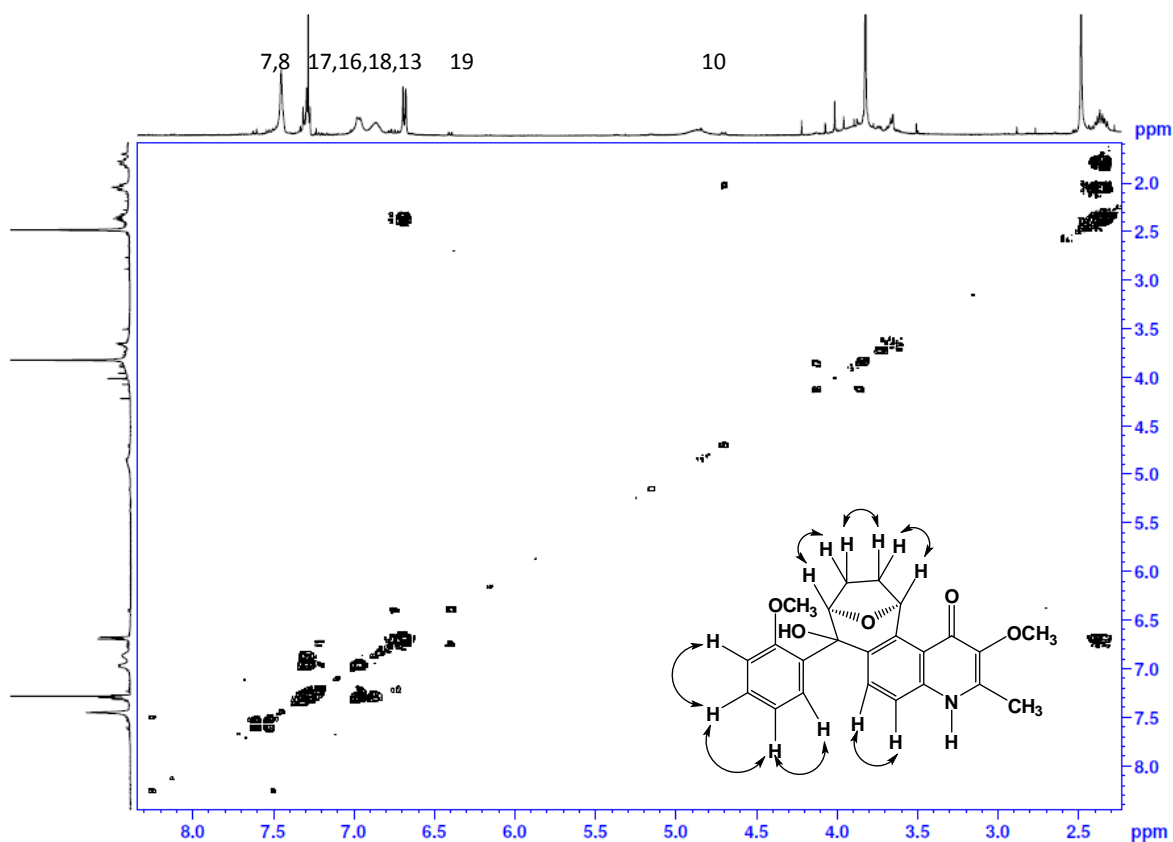


Figura 72. Espectro de RMN de correlação, COSY ^1H - ^1H , de Waltheriona-B (44), obtido em CDCl_3 em 400,13 MHz, 25 °C, expansão da região entre δ 2,0 a 8,5 ppm.

5.3.10.2 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do Alcaloide Waltheriona-B (44)

De acordo com a literatura^{14,73,74,75}, Waletriona-A (**43**) e Walteriona-B (**44**) são dois diastereoisômeros. As duas moléculas possuem apenas uma alteração da conformação da ponte etérea em C-10 e C-13. Como já observado em outros estudos realizados no grupo de pesquisa do professor Ademir Morel¹⁴, a solubilidade de (**44**) é levemente menor que (**43**) em CDCl_3 . Observando o espectro de RMN de ^{13}C no mesmo solvente (CDCl_3), nota-se uma grande semelhança entre os resultados obtidos para Walteriona-B e Walteriona-A, exceto por uma pequena mudança nos deslocamentos químicos dos carbonos de (**44**) quando comparados com (**43**). O estudo de RMN de ^{13}C e ^1H foi realizado com o mesmo solvente para ambos os compostos, permitindo assim essa comparação.^{14,73,74,75}

Começando pelo carbono não hidrogenado de baixa intensidade em δ 173,02 ppm, C=O de (**44**), observava-se um deslocamento um pouco menor que para o mesmo carbono em (**43**), δ 174,89 ppm. Uma segunda observação interessante de destacar é com relação aos deslocamentos químicos dos átomos de carbonos C-10 e C-13. Para (**44**) obteve-se os seguintes resultados: δ 73,56 (C-13), e δ 82,26 (C-10), enquanto que para (**43**) foi obtido: δ 76,68 (C-13), e δ 80,33 (C-10) ppm. Esses dados corroboram na confirmação de que há uma diferença de configuração entre as duas moléculas, principalmente quando se observa os dados de C-13 e C-10. Todos os resultados foram comparados com a literatura^{14,73,74,75}, o que auxilio muito na identificação e na diferenciação entre esses compostos. Comparações por CCD e HPLC também possibilitaram chegar a uma conclusão mais consistente sobre essas duas substâncias, Figura 73 (pág. 144).

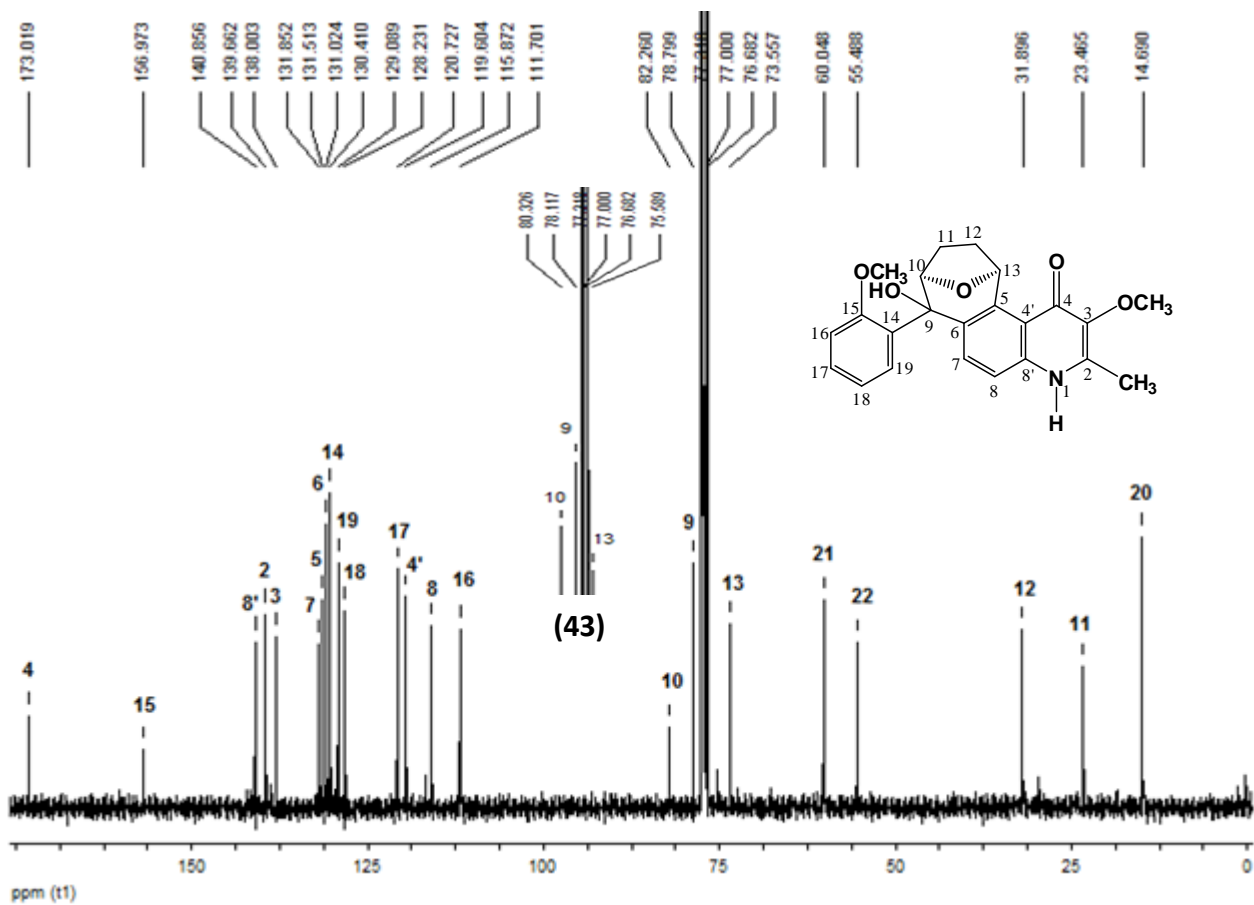
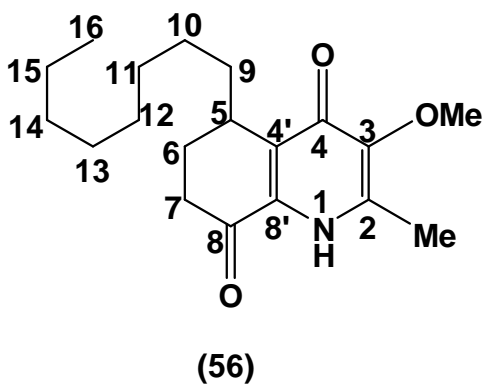


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional de Walteriona-B (**44**), obtido em CDCl_3 à 100,32 MHz, 25 °C.

5.3.11 Obtenção e dados de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensional do alcaloide Antidesmona (**56**)

5.3.11.1 Dados de RMN de ^1H e unidimensional do alcaloide Antidesmona (**56**)



O alcaloide Antidesmona foi obtido da fração etérea básica da casca das raízes da espécie *W. douradinha* Sit Hil diretamente por CCDP, nas mesmas condições que as subatâncias já descritas, (**43**) e (**44**). Esta apresenta-se como um óleo amarelo escuro $R_f = 0,35$ ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (98:2 v/v) + 3 gotas de NH_4OH para cada 10ml de eluente).

O espectro de RMN de ^1H do composto (**56**) mostra quatro sinais de alta intensidade sendo três singletos e um multipeto não desdobrado. Os singletos possuem integração para três hidrogênios cada. Através de seus deslocamentos químicos foi possível identificar o sinal das duas metilas, δ 2,54 ppm (CH_3 , H-17) e δ 0,87 ppm (CH_3 , H-16). A metoxila aparece em δ 3,92 ppm (OCH_3). Um multipeto não desdobrado na região entre δ 1,2 e 1,45 ppm é correspondente aos hidrogênios metílicos dos CH_2 da cadeia carbônica saturada ligada a C-5. H-5 aparece como um multipeto em δ 3,26 ppm. Todos os dados foram comparados aos da literatura^{14,73,74,75} possibilitando a correta identificação da estrutura (**56**) como sendo o alcaloide Antidesma, Figura 74 (pág. 146).

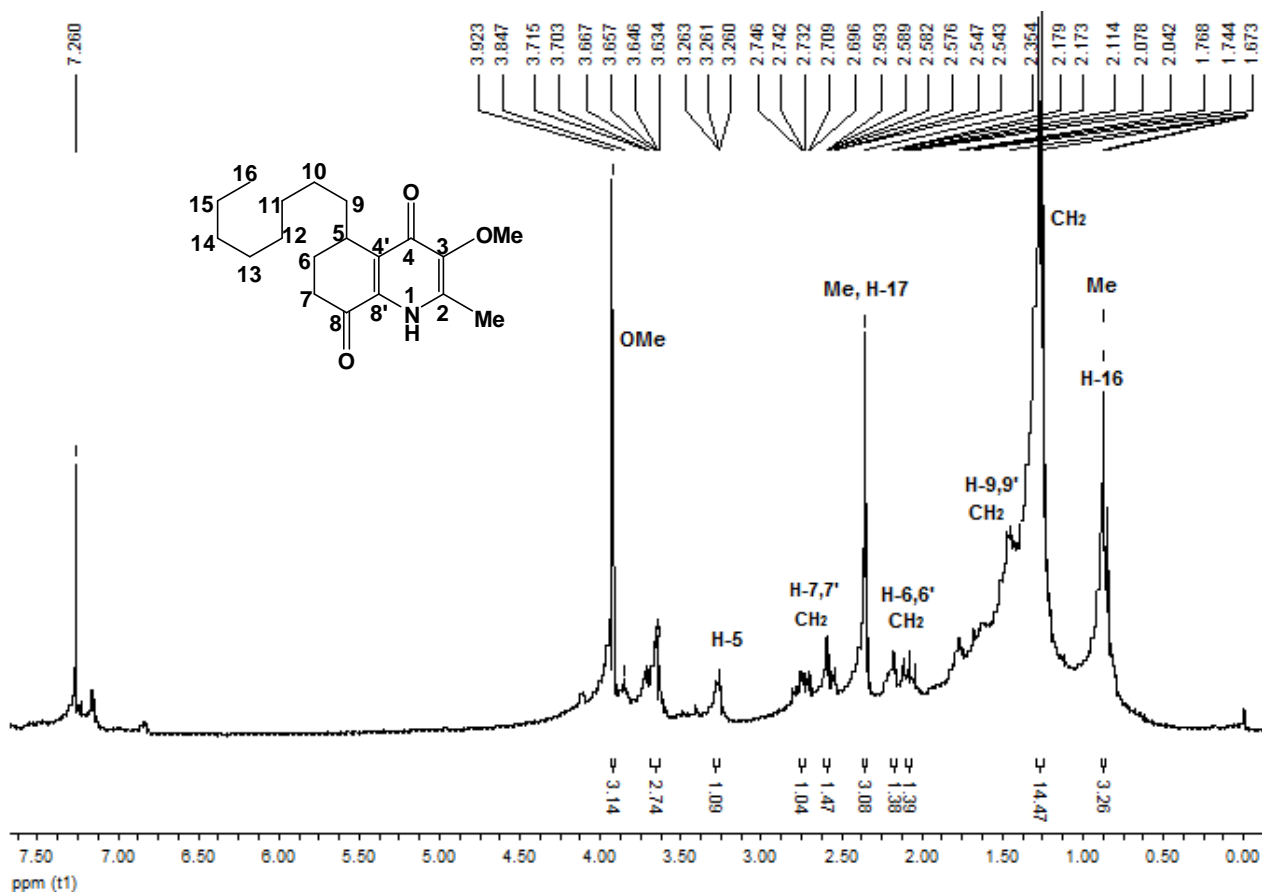


Figura 74. Espectro de RMN de ¹H unidimensional do alcaloide Antidesmona (**56**), obtido em CDCl₃ à 400,13 MHz, 25 °C.

5.3.11.2 Dados de RMN de ¹³C unidimensional do Alcaloide Antidesmona (**56**)

A análise dos resultados de RMN de ¹³C e comparação com a literatura^{14,73,74,75} possibilitou a elucidação estrutural do composto (**56**) e identificação do mesmo como sendo o alcaloide Antidesmona. O espectro de carbono dessa substância apresenta duas características bem distintas. A primeira corresponde a um grupo de sinais de maior intensidade entre δ 14,0 e 32,3 ppm. Desses sinais é possível a identificação da metila alquílica em C-16, com um deslocamento químico de δ 14,03 ppm e da metila ligada a C-2 metilênico, (CH₃ – 17) em δ 14,61 ppm.

Os outros picos dessa região representam os CH₂ metílicos C-6, C-7 e C-9 à C-15. Em δ 59,43 ppm observa-se o sinal da metoxila. A segunda região, em campo mais baixo, mostra sinais menos intensos e estes são pertencentes aos carbonos metilênicos e carbonílicos da estrutura.

Os picos com deslocamento δ 132,13 e 139,01 ppm correspondem a C-8' e C-4' respectivamente. Os sinais observados em δ 138,4 e 147,7 ppm são dos respectivos carbonos metilênicos C-2 e C-3. Por fim, C-4 e C-8 aparecem como sinais de menor intensidade no deslocamento químico δ 173,24 (C2) e 194,77 ppm (C3), Figura 75.

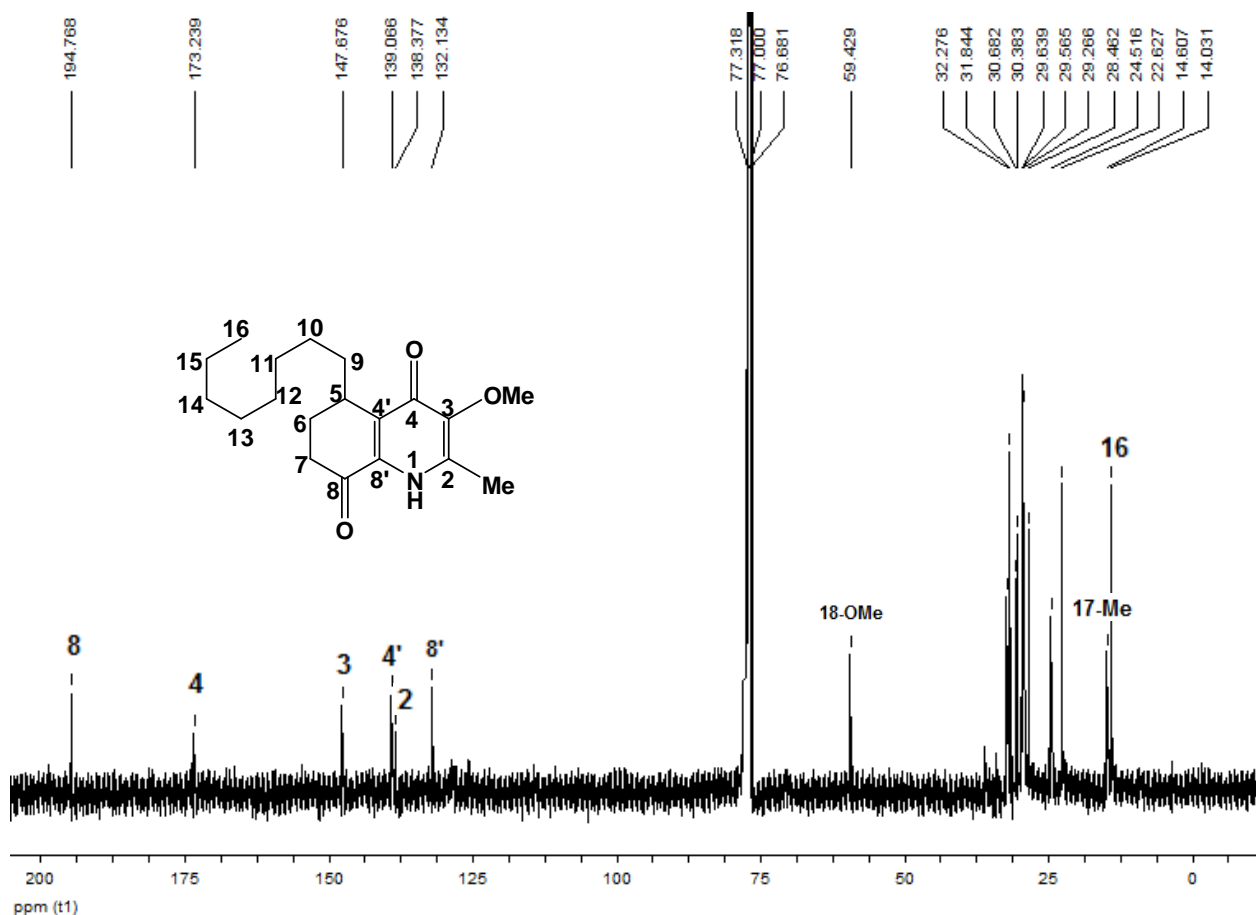
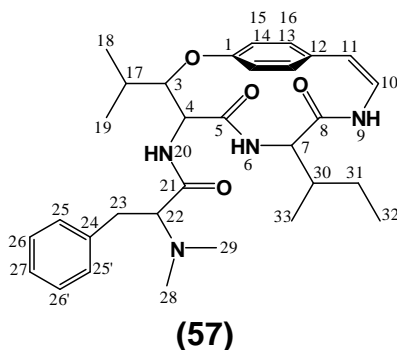


Figura 75. Espectro de RMN de ¹³C unidimensional do alcaloide Antidesmona (**56**), obtido em CDCl₃ à 100,32 MHz, 25 °C.

5.3.12 Obtenção e dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57)

5.3.12.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57)



AdoutinaY' apresenta-se como um sólido amorfo branco com $R_f = 0,52$ ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (97:3 v/v) + 3 gotas de NH_4OH para cada 10ml de eluente), e $P_f = 284,5 - 285,1$ °C. (literatura^{14,73,74,75} 289 - 290 °C).

O espectro de RMN ^1H de AdoutinaY' permitiu identificar o aminoácido isoleucina como pertencente ao anel ciclopeptídico desse composto. Essa unidade foi confirmada observando o deslocamento químico em δ 0,48 ppm que ocorre como (3H, *d*, $J = 6,8$ Hz, H-33). Esse grupamento metila aparece como um dubleto indicando o acoplamento com o hidrogênio metínico H-30, expansão entre δ 0,24 e 4,80 ppm, Figura 78 (pag. 151). Um tripleto em δ 0,61 ppm com $J = 7,2$ Hz, indica a metila 32 que acopla com os prótons diastereotópicos H-31a e H-31b. Também é possível observar os sinais das metilas de β -hidroxiaminoácidos que aparecem como dois dubletos nos deslocamentos químicos δ 0,83 ppm (3H, *d*, $J = 6,8$ Hz, H-19) e δ 1,12 ppm (3H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-18). Os picos correspondentes aos hidrogênios aromáticos da unidade *p*-estirilamina e do aminoácido terminal apresentam deslocamentos químicos entre δ 6,90 e 7,50 ppm, melhor observado na expansão entre δ 6,10 e 7,60 ppm, Figura 77 (pág. 150). O próton H-7 (δ 3,75 ppm) aparece como um duplo dubleto porque acopla com H-

30 metínico com um $J = 5,6$ Hz e H-6 (N-H) amídico a longa distância com $J = 7,0$ Hz, fator que comprova a posição da isoleucina. Esses acoplamentos podem ser observados no espectro de RMN 2D, COSY ^1H - ^1H , Figura 79 (pag. 152). O acoplamento com H-9 amídico é melhor visualizado na expansão entre δ 3,50 e 7,70 ppm, Figura 80 (pag. 153). As expansões entre δ 0,3 e 2,55 ppm e entre δ 3,50 e 7,70 ppm das pág. 153 e 154, respectivamente, permitem uma observação bastante detalhada e precisa dessas correlações, bem como das relações dos hidrogênios aromáticos. Os sinais dos hidrogênios metínicos H-10 e H-11 da unidade estililamina, aparecem nas regiões δ 6,37 ppm (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-11) e 6,47 ppm (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-10). O hidrogênio amídico NH-20 em δ 7,49 ppm apresenta-se como: 1H, *d*, $J = 8,0$ Hz. O fato deste aparecer como um dubleto permite observar sua correlação com H-4. A Figura 76 apresenta o espectro de RMN de ^1H do composto AdoutinaY'.

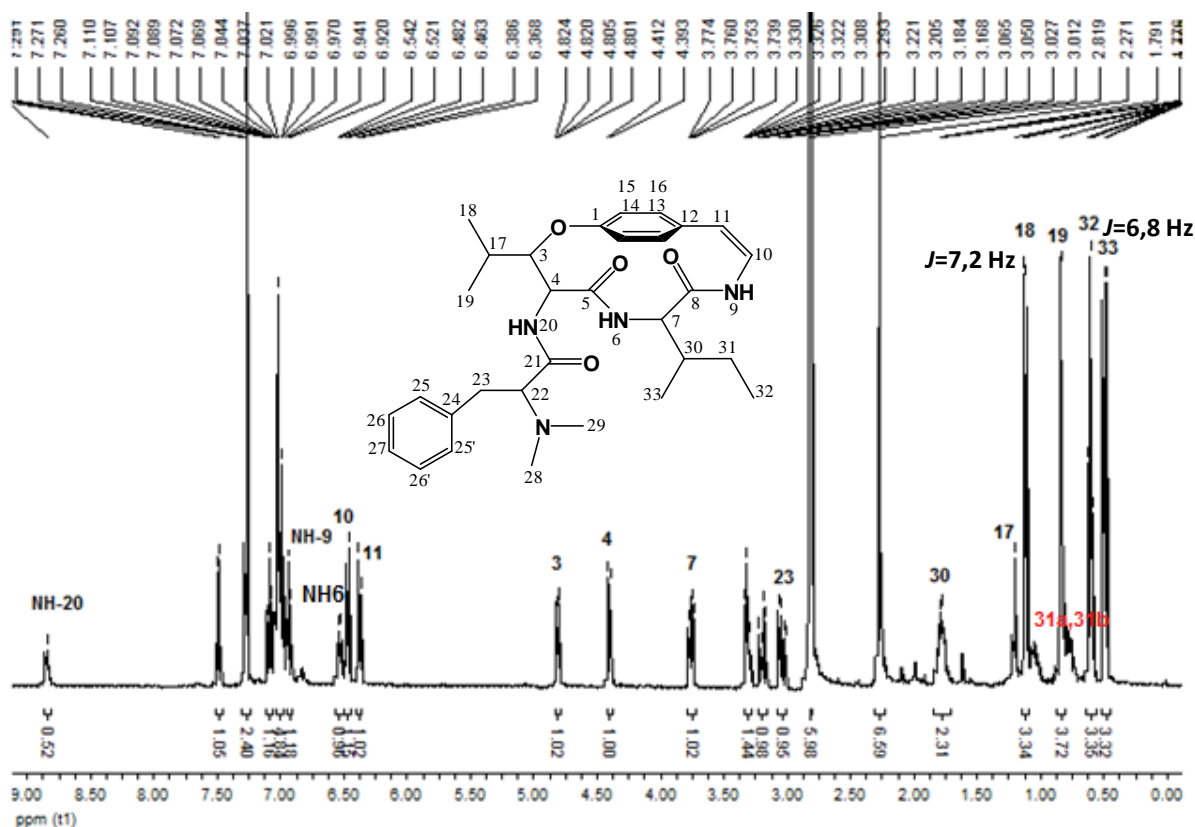


Figura 76. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C.

5.3.12.1.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (**57**), expansão da região de deslocamento químico entre δ 6,10 a 7,60 ppm

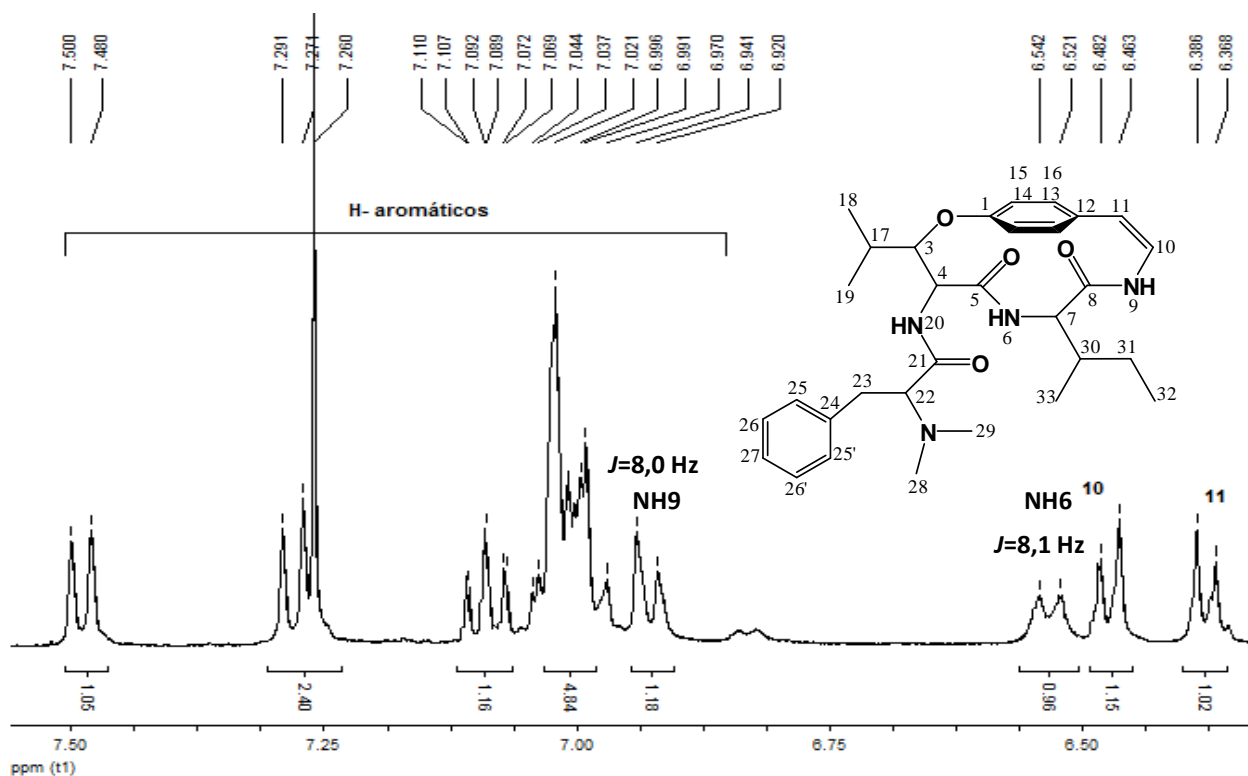


Figura 77. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, expansão entre δ 6,10 e 7,60 ppm.

5.3.12.1.2 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57), expansão da região de deslocamento químico entre δ 0,24 a 4,80 ppm

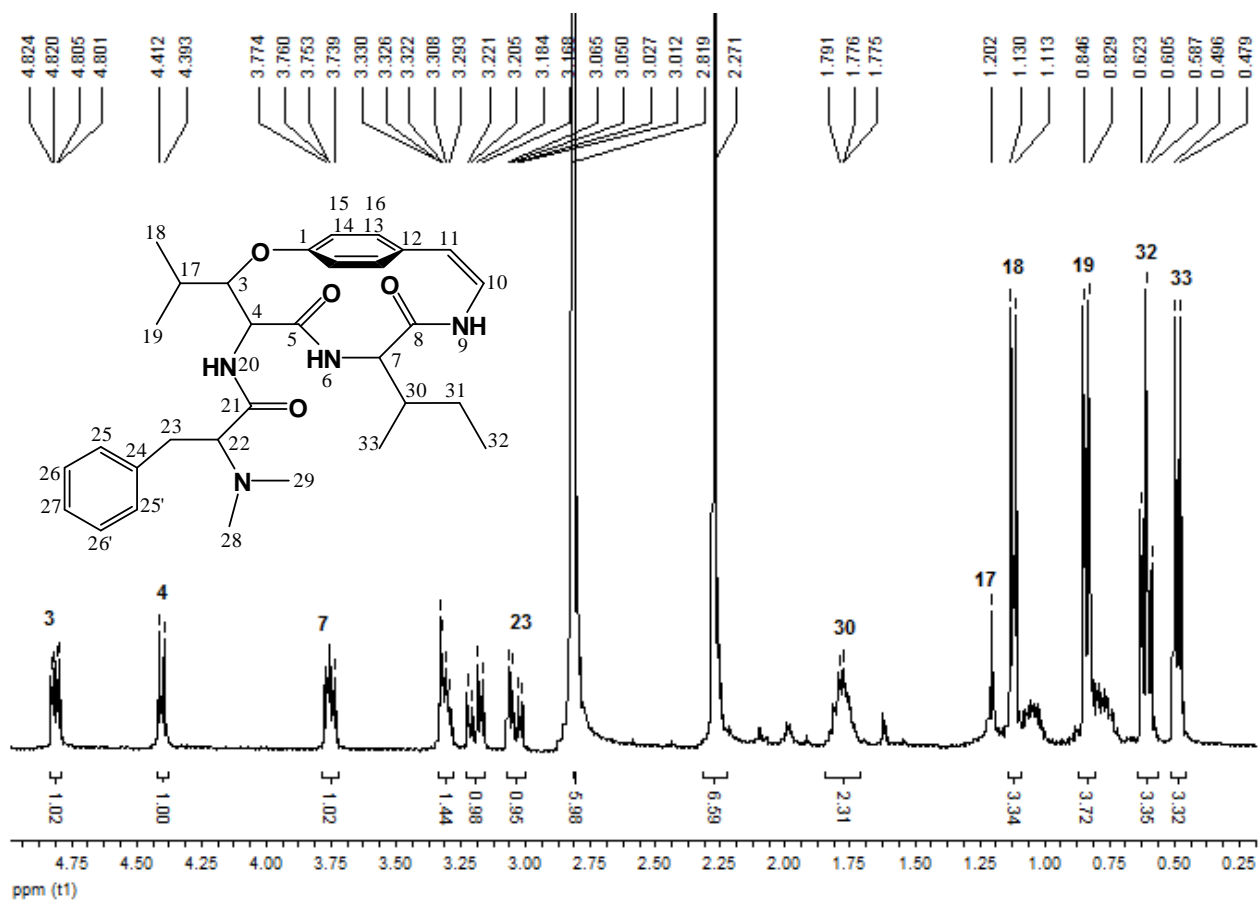


Figura 78. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, expansão entre δ 0,24 e 4,80 ppm.

5.3.12.2 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide AdoutinaY' (57)

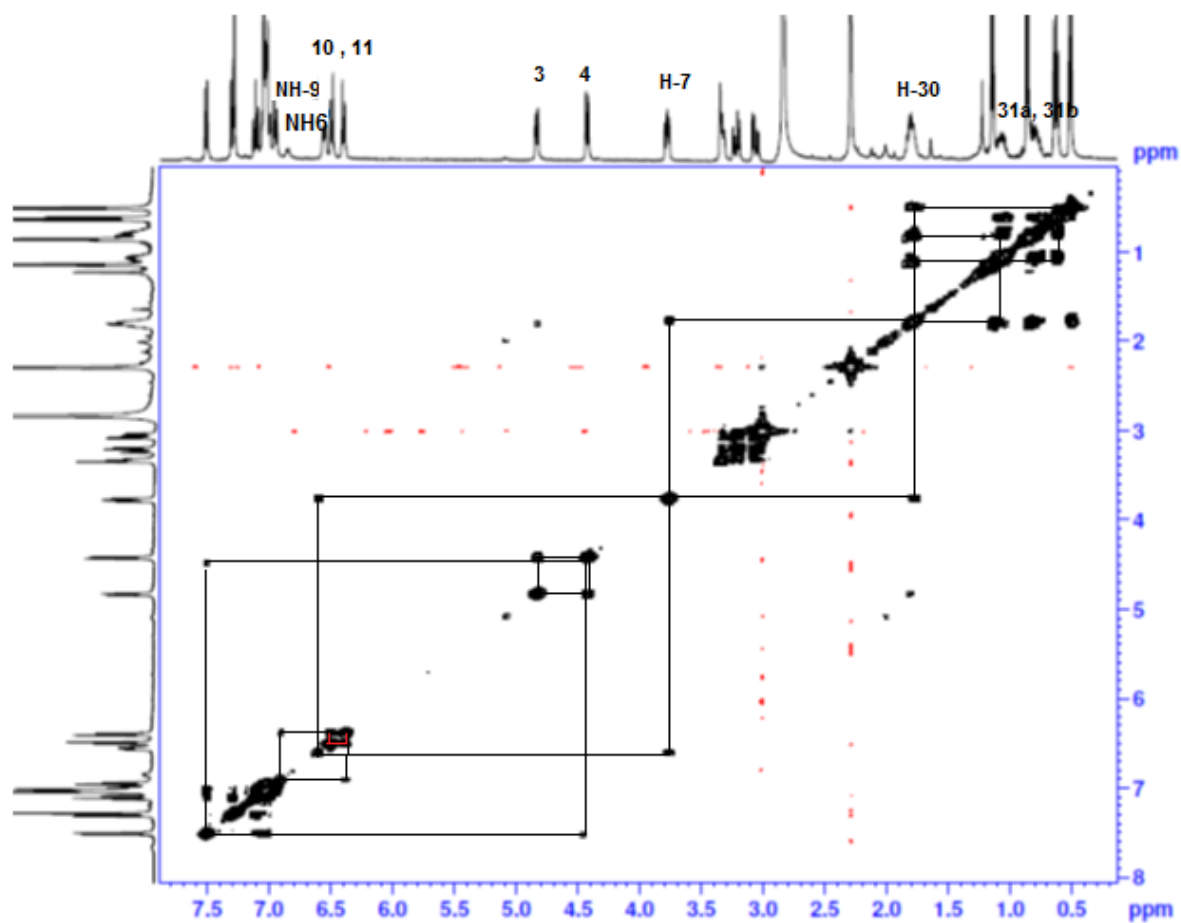
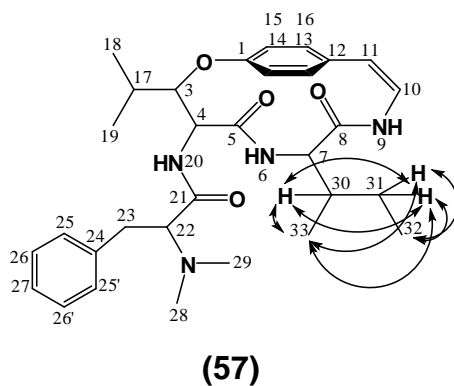


Figura 79. Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide AdoutinaY' (57), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C.

5.3.12.2.1 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide AdoutinaY' (**57**), expansão entre 0,3 e 2,55 ppm

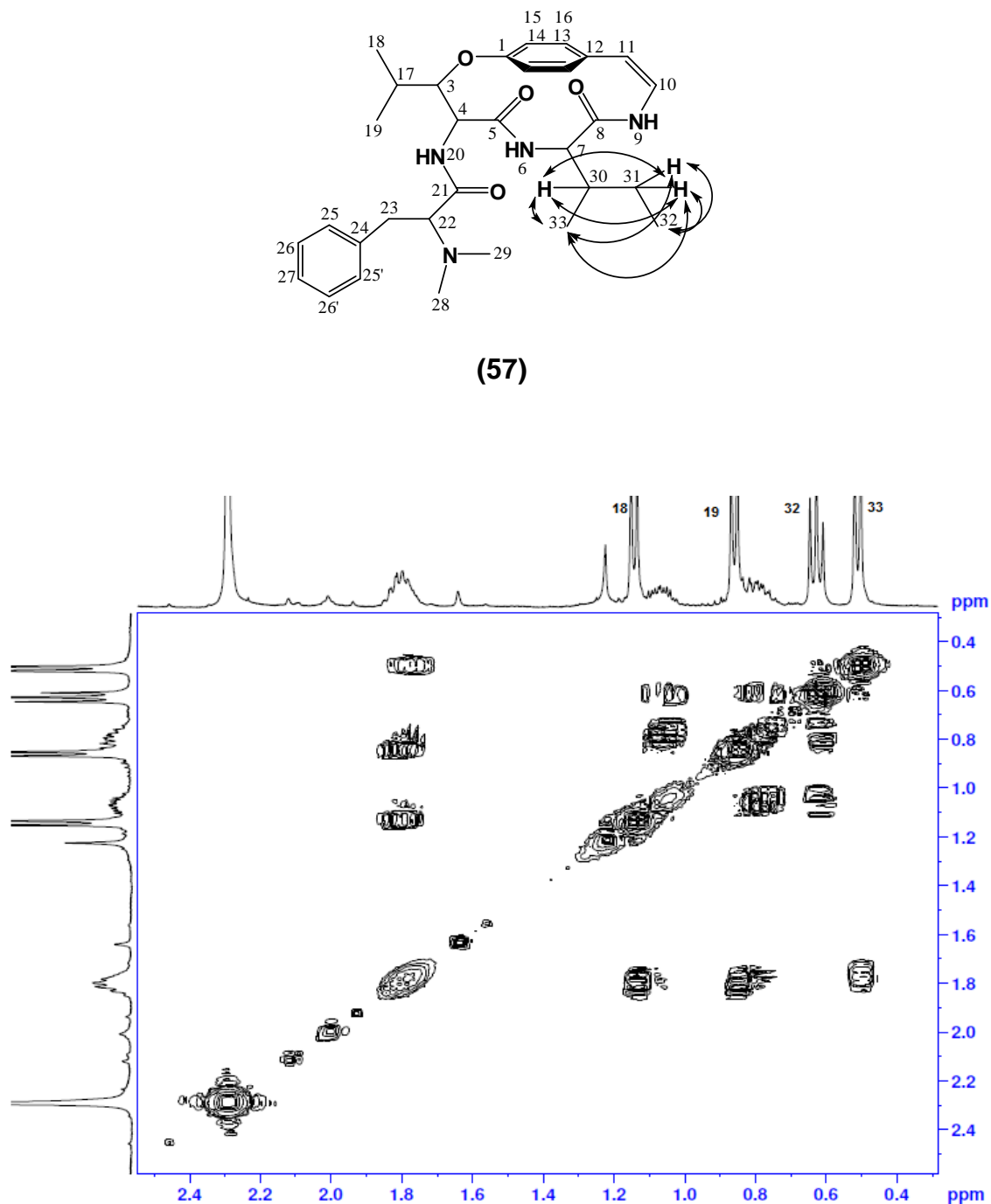


Figura 80. Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, expansão entre 0,3 e 2,55 ppm.

5.3.12.2.2 Dados de RMN de bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide AdoutinaY' (57), expansão entre 3,50 e 7,70 ppm

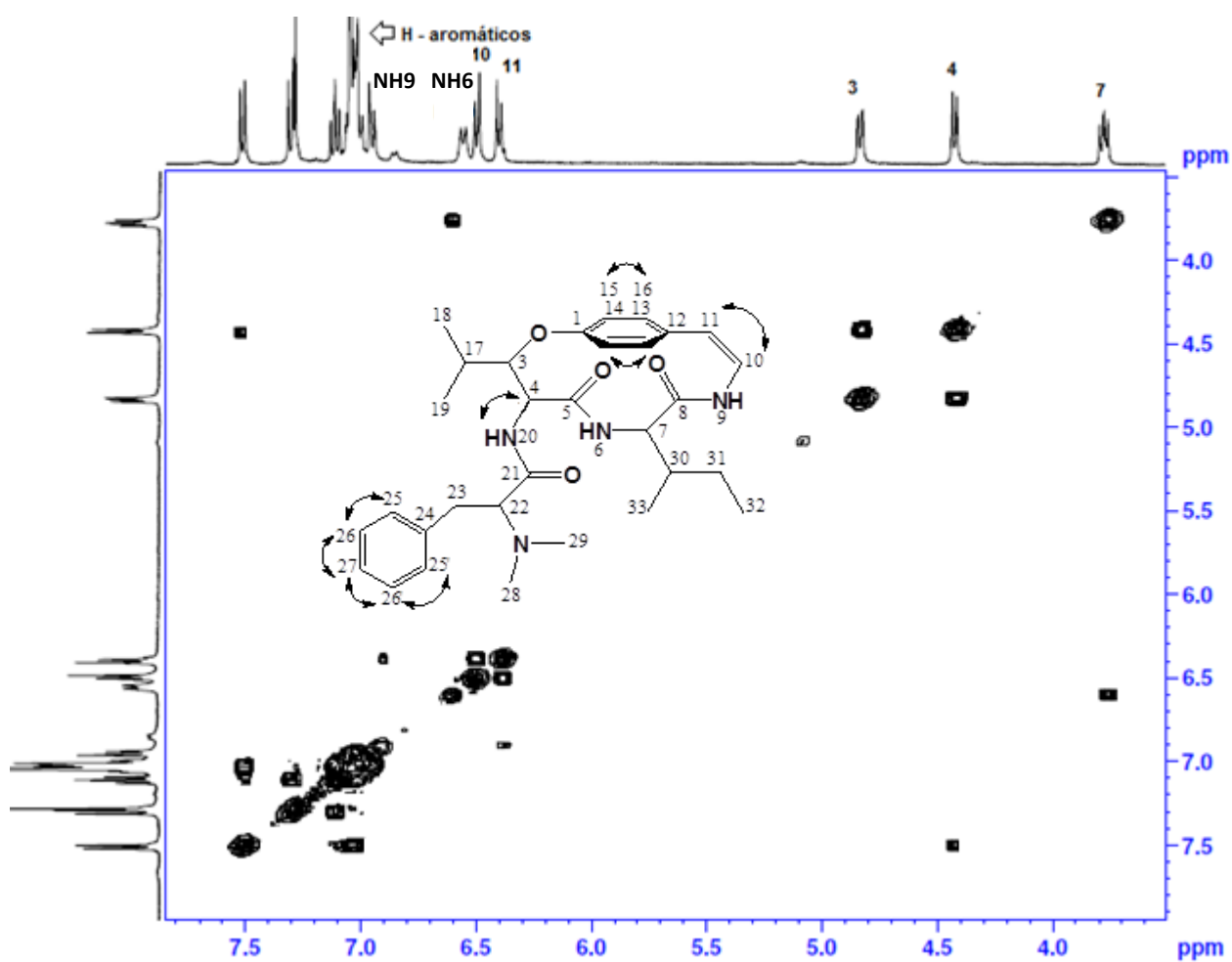
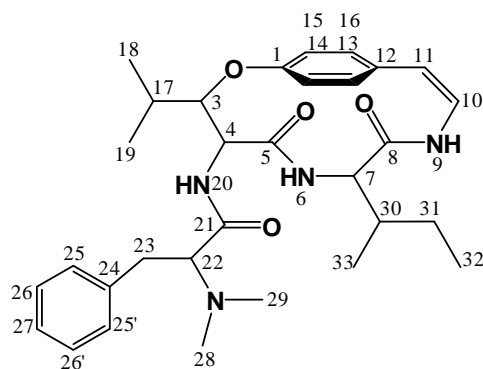


Figura 81. Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide AdoutinaY' (57), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C expansão entre 3,50 e 7,70 ppm.

5.3.12.3 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (57)



(57)

Os espectros de RMN ^{13}C e ^1H da estrutura (57), Adoutina-Y', foram obtidos em mistura (4:1 v/v) de CDCl_3 e DMSO-d_6 . Houve a necessidade da mistura desses dois solventes devido o composto apresentar uma baixa solubilidade em CDCl_3 e ser obtido em pequena quantidade. Para o espectro de carbono desse composto foram observados trinta e dois sinais na região que compreende os deslocamentos químicos entre δ 11,03 e 172,70 ppm. Através da estrutura já proposta e comparação com a literatura^{14,73,74,75}, pode-se atribuir a maioria dos carbonos para da molécula em estudo. Começando a atribuição dos sinais, são observados três picos característicos de carbonila de amida. Respectivamente, estes indicam em: δ 172,70 ppm (C-21), δ 172,10 ppm (C-5) e δ 168,23 ppm (C-8). Outros dados que corroboram na elucidação da estrutura, é a presença de um sinal de baixa intensidade em δ 136,18 ppm correspondente ao $\text{C}_{\text{Ar}}-24$. $\text{C}_{\text{Ar}}-1$ aparece como um sinal de maior intensidade em δ 155,94 ppm. Este deslocamento é bem característico de carbono aromático ligado a heteroátomo, neste caso, oxigênio. Sinais nessa região são também observados em fenilas laterais orto-substituídas por metoxila nos alcaloides quinolônicos. Os carbonos C-10 e C-11, metilênicos, também merecem destaque, pois os mesmos absorvem em δ 111,16 ppm (C-11) e δ 118,01 ppm (C-10). C-3, no deslocamento químico de δ 81,22 ppm também é outra característica no núcleo ciclopeptídico desses alcaloides. Os

carbonos C-4 e C-7, ambos ligados a heteroátomo, nitrogênio de amida do tipo (R-C(O)-NH-R), têm seus sinais absorvendo em δ 58,82 ppm para (C-4) e δ 55,27 ppm para (C-7). As metilas 28 e 29 aparecem como um único sinal em δ 41,89 ppm. Esse deslocamento em campo mais baixo é um forte indicativo que as mesmas estão ligadas a átomos diferentes de carbono, mais especificamente, para este caso, nitrogênio. As outras quatro metilas C-18, C-19, C-32 e C-33, todas ligadas a carbonos metínicos aparecem em campo mais alto com as seguintes regiões de absorção: δ 20,07 ppm, C-18; δ 14,52 ppm, C-19; δ 11,03 ppm, C-32 e δ 15,15 ppm, C-33.

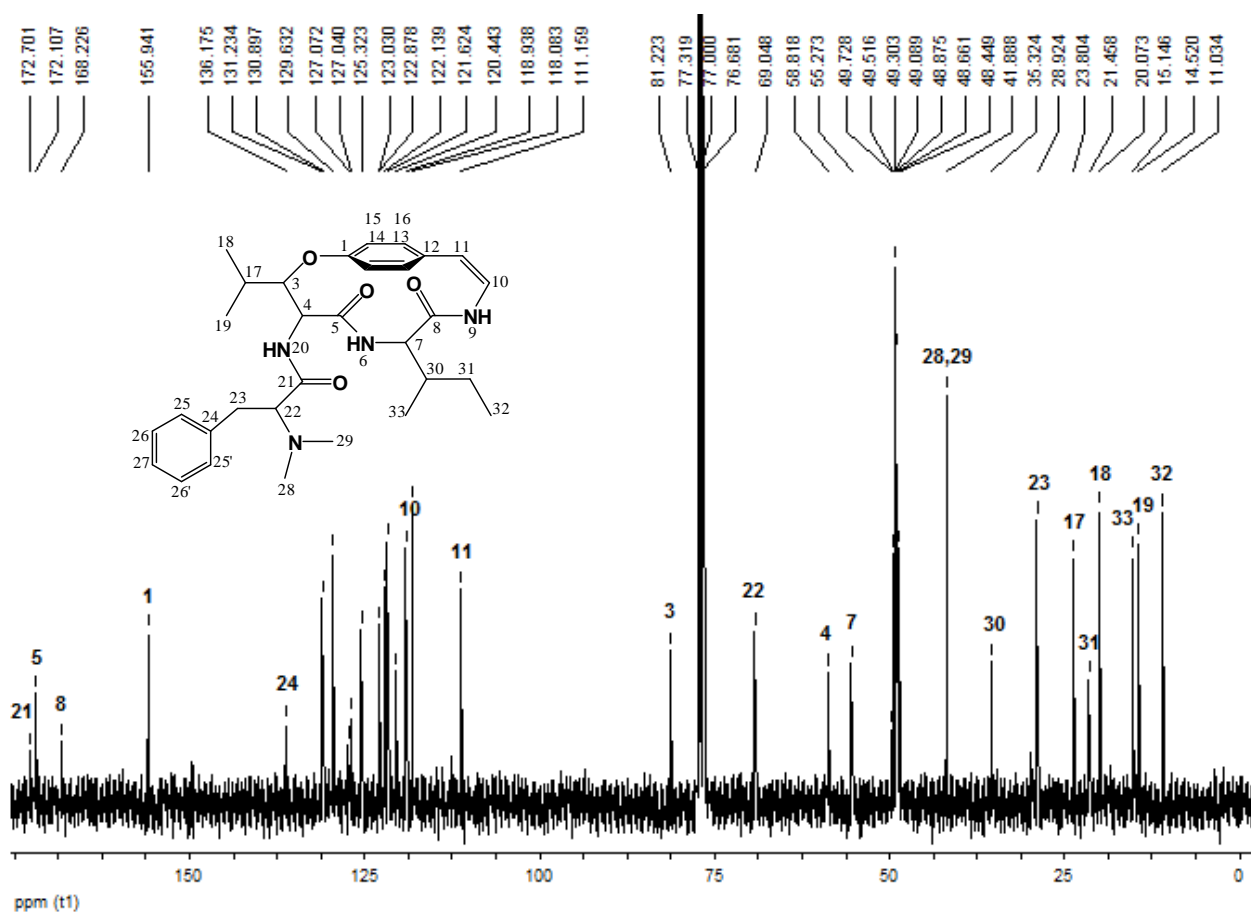
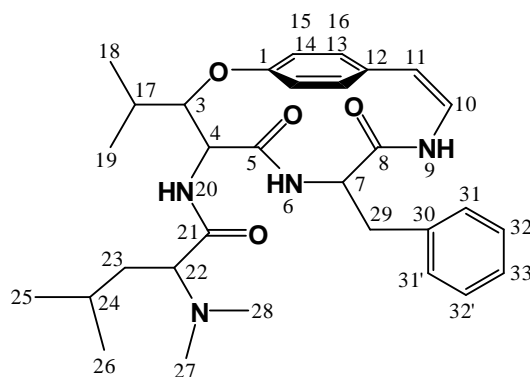


Figura 82. Espectro de RMN de ¹³C unidimensional do alcaloide AdoutinaY' (**57**), obtido em mistura de CDCl₃ e DMSO-d₆ (4:1 v/v) à 100,32 MHz, 25 °C.

5.3.13 Obtenção e dados de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensional e bidimensionais do alcaloide Waltherina-A (58)

5.3.13.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (58)



(58)

(58) foi isolado como um sólido amorfo branco com $R_f = 0,55$ ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 93:7 v/v), e $P_f = 235,1$ °C (literatura^{14,73,74,75} 234,3 - 234,6 °C).

A análise do espectro de RMN ^1H unidimensional, Figura 83 (pág. 159), de Waltherina-A permitiu identificar a unidade β -hidroxileucina. Esta unidade foi confirmada pelos deslocamentos químicos das metilas 18 e 19 do grupo isopropila em δ 1,23 ppm que ocorre como: 3H, *d*, $J = 6,8$ Hz, H-18/19. Essas metilas aparecem como dubletos pelo acoplamento com o hidrogênio metínico H-17.

Também foi possível identificar o aminoácido básico terminal em que está presente o H-22 com deslocamento químico de δ 2,65 ppm como 1H, *d*, $J = 6,8$ Hz, H-22. O próton (H-22) faz correlação com os hidrogênios diastereotópicos H-23 (δ 1,51 ppm) e H-23' (δ 1,34 ppm). Os H-23 e H-23' também acoplam com H-24 que faz relação com H-25 (δ 0,93 ppm) e H-26 (δ 0,89 ppm).

Os prótons metilênicos H-29 (δ 3,0 ppm) e H-29' (δ 2,9 ppm) pertencentes a unidade β -fenilalanina possuem acoplamento com o hidrogênio H-7 (δ 4,47 ppm) α -carbonílico que possui correlação com H-6 amídico, δ 6,1 ppm, que apresenta-se como (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz). Esses acoplamentos podem ser observados no espectro de RMN de ^1H , 2D, COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$, Figura 86 (pág. 162).

Os sinais dos hidrogênios metínicos H-10 e H-11, aparecem nas regiões δ 6,4 ppm como (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-10) e 6,2 ppm como (1H, *d*, $J = 10$ Hz, H-11).

O hidrogênio amídico NH-20 apresenta deslocamento de δ 7,7 ppm. O fato deste aparecer como um dubleto não desdobrado, neste experimento, permite observar sua correlação com H-4 em δ 4,39 ppm.

As expansões das Figuras 84 e 85 (pág. 160 e 161, respectivamente) permitem observar com maior clareza as multiplicidades obtidas pela análise de RMN ^1H do composto identificado como Waltherina-A.

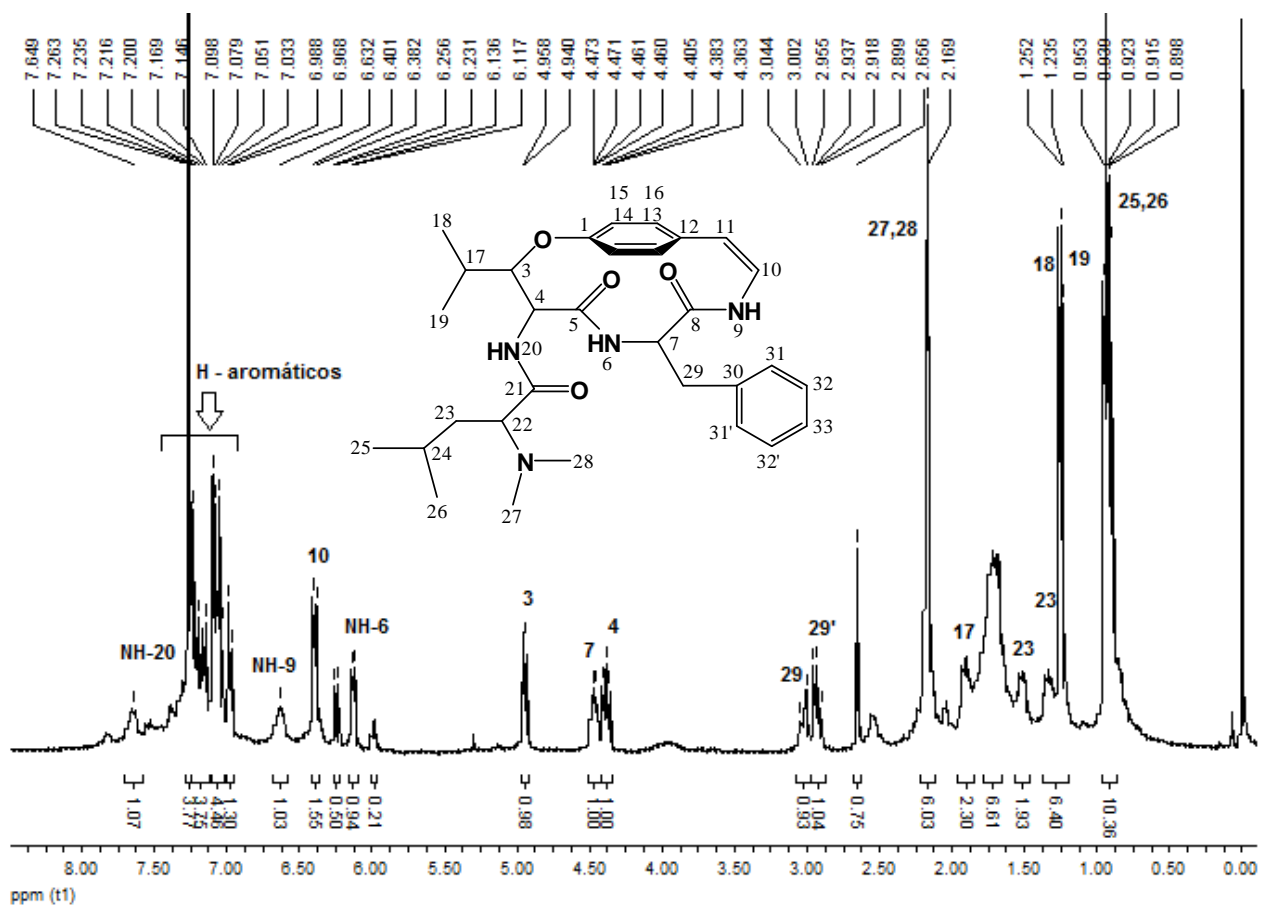


Figura 83. Espectro de RMN de ¹H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (**58**), obtido em CDCl₃ à 400,13 MHz e 25 °C.

5.3.13.1.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (58), expansão da região de deslocamento químico entre δ 6,10 a 7,80 ppm

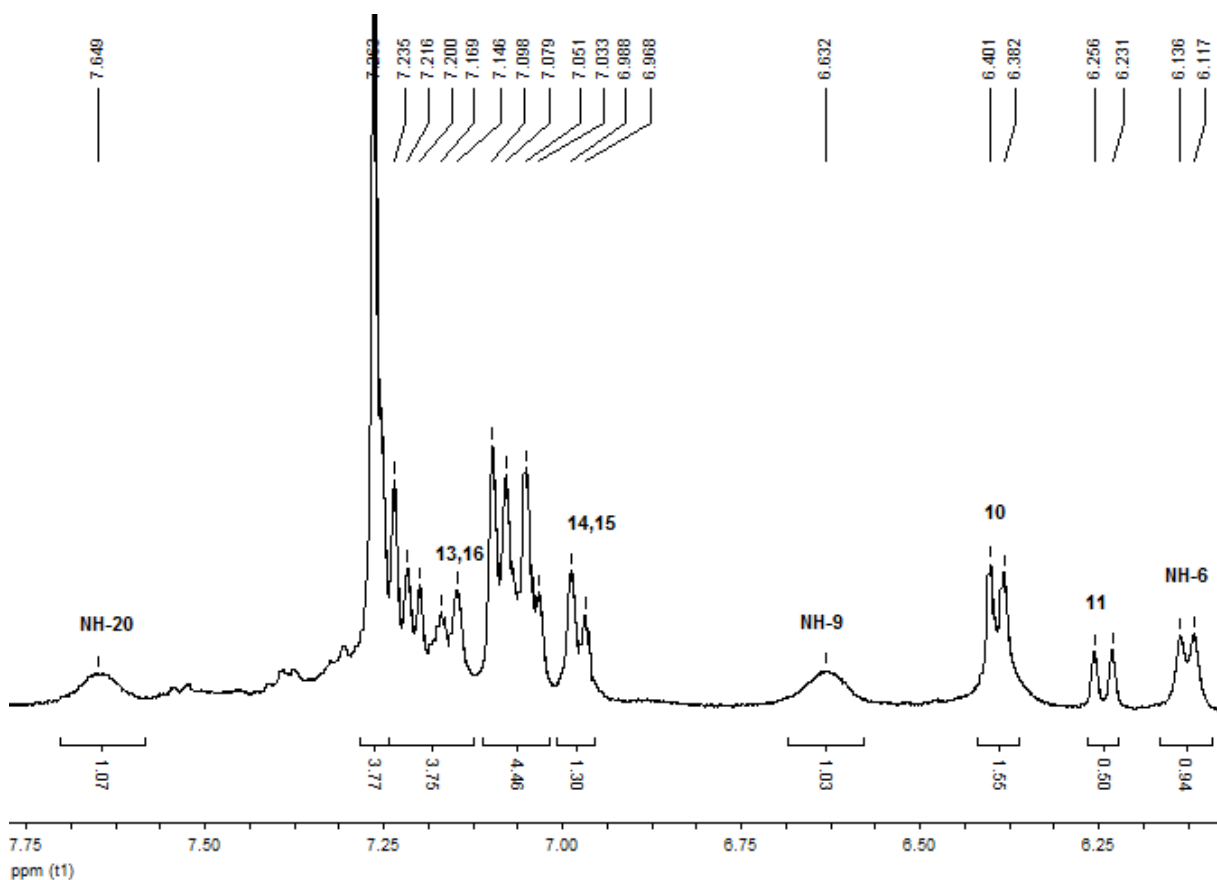
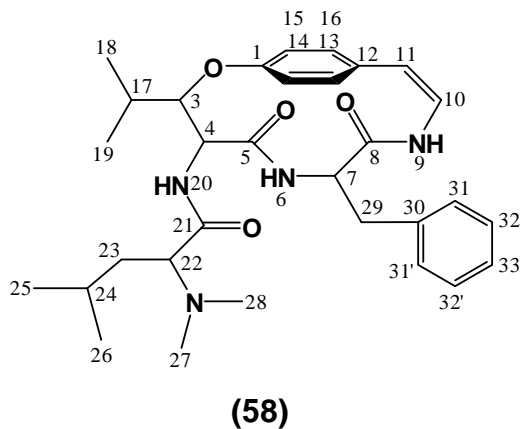


Figura 84. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (58), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 °C, expansão entre 6,10 e 7,80 ppm.

5.3.13.1.2 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (**58**), expansão da região de deslocamento químico entre δ 0,50 a 5,0 ppm

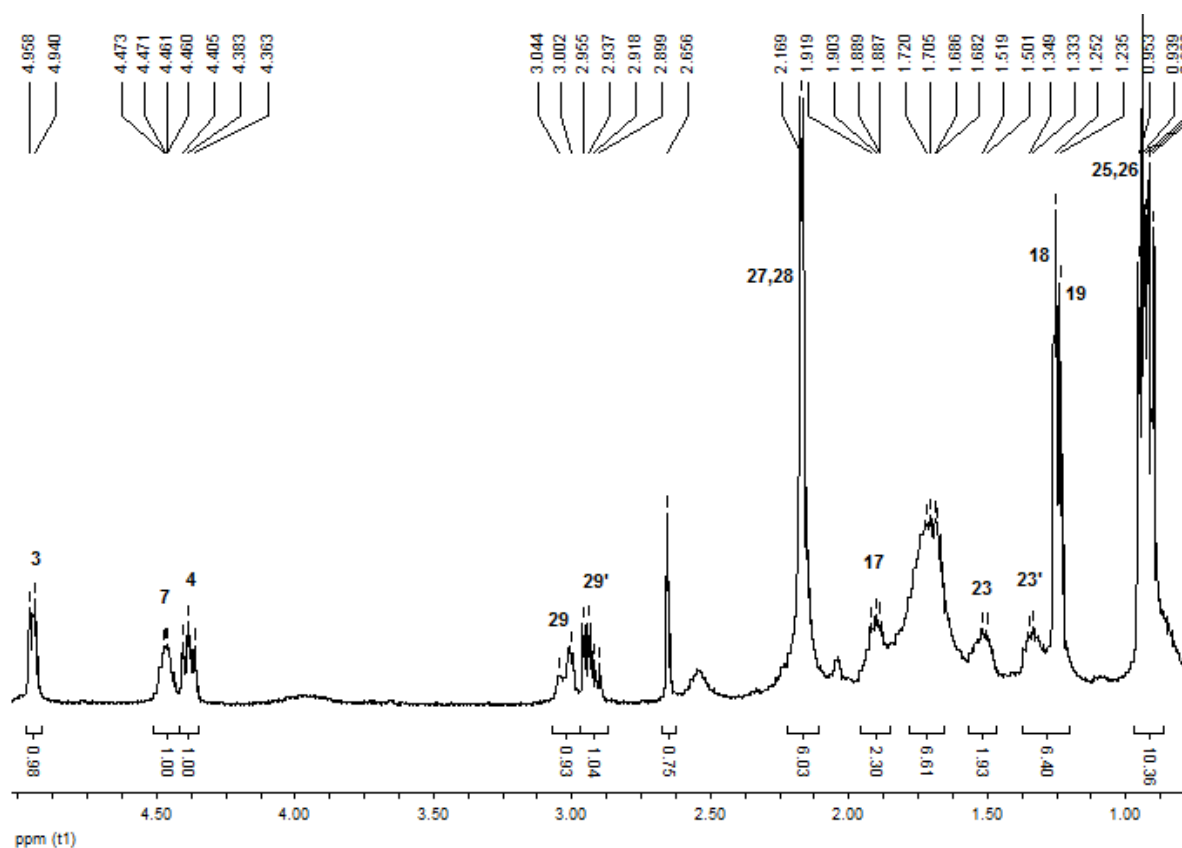
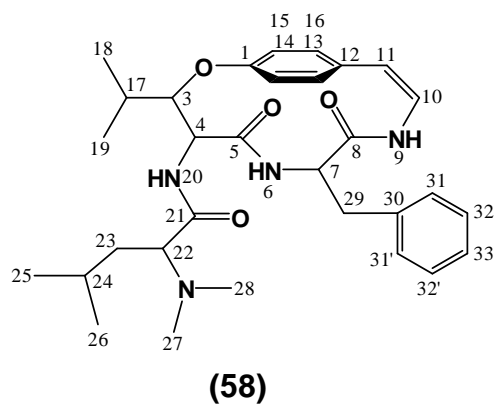


Figura 85. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-A (**58**), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz e 25 °C, expansão entre 0,50 e 5,0 ppm.

5.3.13.2 Dados de RMN de bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-A (58)

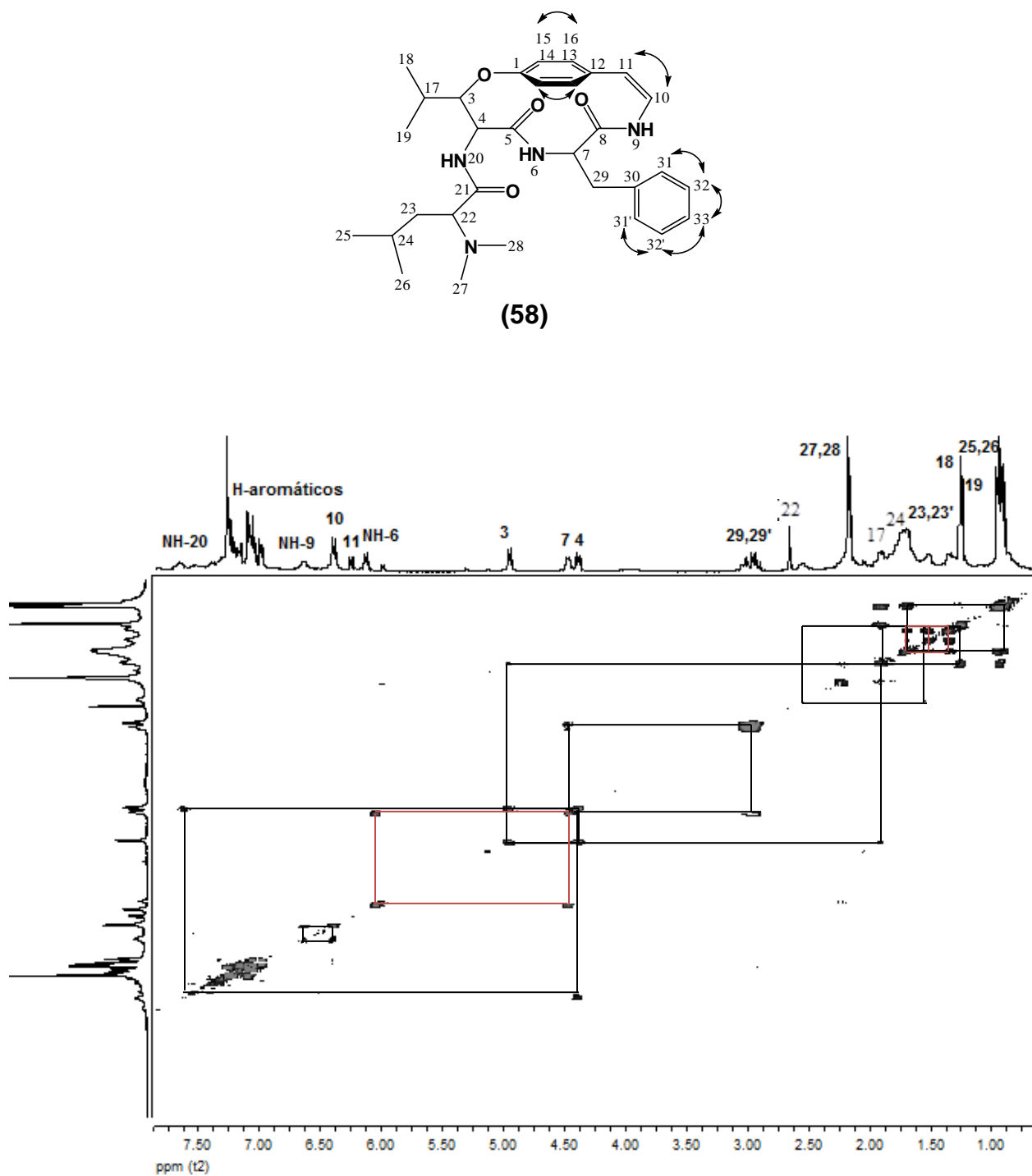
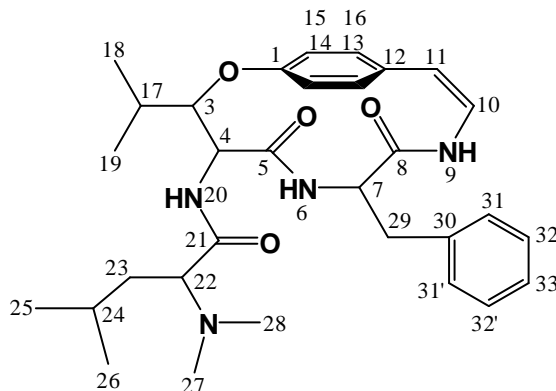


Figura 86. Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-A (58), obtido em CDCl_3 à 400,13 MHz, 25 °C.

5.3.13.3 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide Waltherina-A (58)



(58)

Da mesma forma que para o alcaloide identificado como Adoutina-Y', os espectros de RMN ^{13}C e ^1H foram de fundamental importância na elucidação da estrutura e identificação do composto (58) como sendo Waltherina-A. Os espectros desta substância foram obtidos em CDCl_3 .

A análise do espectro de RMN ^{13}C unidimensional, Figura 87 (pág. 164) de Waltherina-A possibilitou a observação de vinte e sete sinais na região que compreende os deslocamentos químicos entre δ 15,02 e 171,53 ppm. Através da estrutura já proposta e comparação com a literatura^{14,73,74,75} pode-se atribuir a maior parte dos carbonos para o composto em relacionado. Começando a atribuição dos sinais, observamos três picos característicos de carbonila de amida, sendo dois deles muito próximos, dando uma falsa impressão de um singlete. Respectivamente, os sinais foram atribuídos com os seguintes deslocamentos: δ 171,53 ppm (C-21), δ 171,36 ppm (C-5), δ 167,80 ppm (C-8). Outros dados relevantes na elucidação da estrutura, é a presença de um sinal de baixa intensidade em δ 136,0 ppm de C_{Ar} -30. O C_{Ar} -1 aparece menor intensidade no deslocamento δ 156,02 ppm, deslocamento característico de carbono aromático ligado a heteroátomo, oxigênio. Os carbonos C-10 e C-11 metilênicos merecem destaque. Os mesmos absorvem na região de δ 130,1 ppm (C-11)

e δ 131,56 ppm (C-10). (C-3) é apresentado como um sinal de baixa intensidade em δ 81,76 ppm, outra particularidade do núcleo ciclopeptídico desses alcaloides. Os carbonos C-4 e C-7, ambos ligados a heteroátomo, nitrogênio amídico do tipo (R-C(O)-NH-R), têm seus sinais absorvidos em δ 54,91 ppm para (C-4) e δ 54,21 ppm para (C-7). As metilas 27 e 28 aparecem nas regiões de δ 41,9 ppm e δ 41,8 ppm, respectivamente. Esse sinal em campo mais baixo demonstra que ambas estão ligadas a átomos diferentes de carbono, mais especificamente, nitrogênio. As metilas C-18, C-19, C-25 e C-26, todas ligadas a carbonos metínicos absorvem em campo mais alto com os deslocamentos que variam do seguinte modo: δ 20,4 ppm, C-18; δ 15,02 ppm, C-19; δ 23,05 ppm, C-25 e δ 22,25 ppm, C-26. Os carbonos do sistema aromático aparecem entre δ 122,98 e 128,85 ppm.

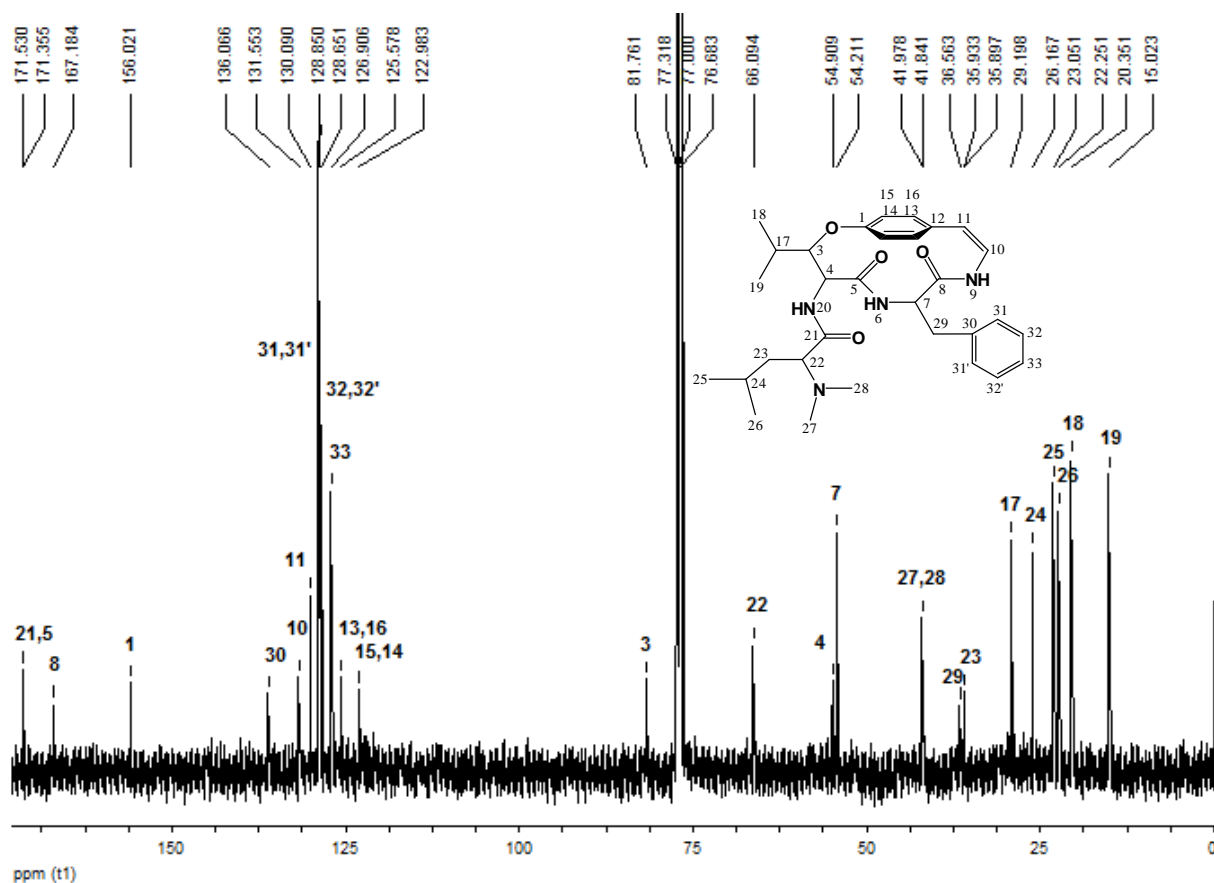
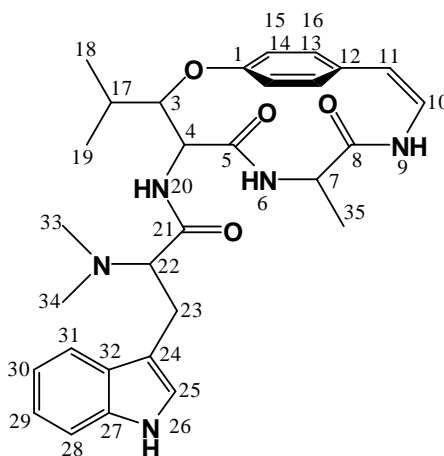


Figura 87. Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide Waltherina-A (**58**), obtido em CDCl_3 à 100,32 MHz, 25 °C.

5.3.14 Obtenção e dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais do alcaloide Waltherina-C (59)

5.3.14.1 Dados de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-C (59)



(59)

O alcaloide **(59)** foi isolado como um sólido amorfo branco com $R_f = 0,60$ em sistema eluente ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (93:7 v/v) + 3 gotas de NH_4OH para 10 ml de solvente), e $P_f =$ decomposição em $250\text{ }^\circ\text{C}$.

A análise do espectro de RMN ^1H unidimensional, Figura 88 (pág. 166), de Waltherina-C, permitiu confirmar a presença da unidade triptofânica como pertencente ao macrociclo de quatorze membros deste alcaloide ciclopeptídico. Esta unidade foi evidenciada através da observação de um sinal com deslocamento químico de δ 9,43 ppm, cuja integração indica um próton, possibilitando identificar este como o hidrogênio indólico, H-26.

O próton metínico H-3 da unidade β -hidroxileucina absorve como um duplo dubleto em δ 4,80 ppm. Esse desdobramento do sinal é devido ao acoplamento de H-3

com H-17 e H-4. Os respectivos valores de J resolvido para essa correlação é: $J_{3,17}=1,5$ Hz e $J_{3,4}=8,2$ Hz. O H-4 também aparece como um duplo dubleto pelo acoplamento com H-3 e NH-20. O deslocamento químico de H-4 é δ 4,4 ppm e seus valores para J resolvido são: $J_{4,3}=8,2$ Hz e $J_{4,20}=9,1$ Hz. O presente espectro ainda possibilitou a atribuição dos sinais de H-17 metínico e H-18 e H-19, metílicos, na região de absorção de alta frequência entre δ 0,88 e 1,26 ppm. Os picos compreendidos entre δ 6,9 e 7,4 ppm, são correspondentes aos prótons da unidade triptofano e do sistema aromático da unidade *p*-estirilamina.^{113,114,115}

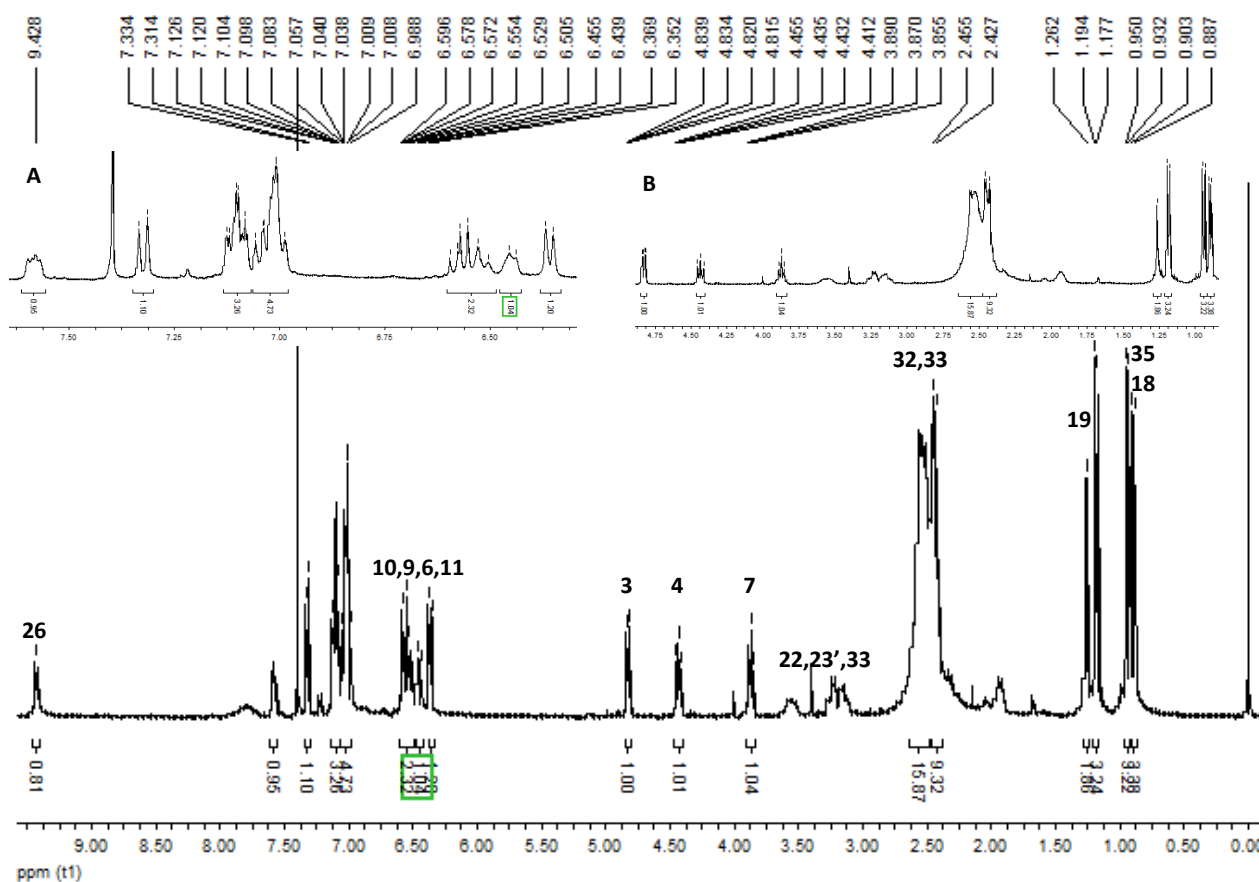
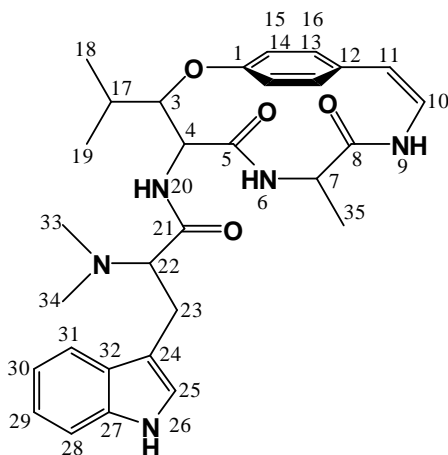


Figura 88. Espectro de RMN de ^1H unidimensional do alcaloide Waltherina-C (59), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 °C, **A** – expansão da região de deslocamento químico entre δ 6,20 - 10,0 ppm, **B** – expansão da região entre δ 0,60 - 5,0 ppm.

5.3.14.2 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-C (59)



(59)

Através da análise do espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , Figura 89 (pág. 168), de Waltherina-C, pôde-se visualizar com clareza as correlações mencionadas para o espectro de próton desse mesmo composto. As expansões deste espectro, são mostradas como Figuras 90 e 91, respectivamente nas páginas 169 e 170.

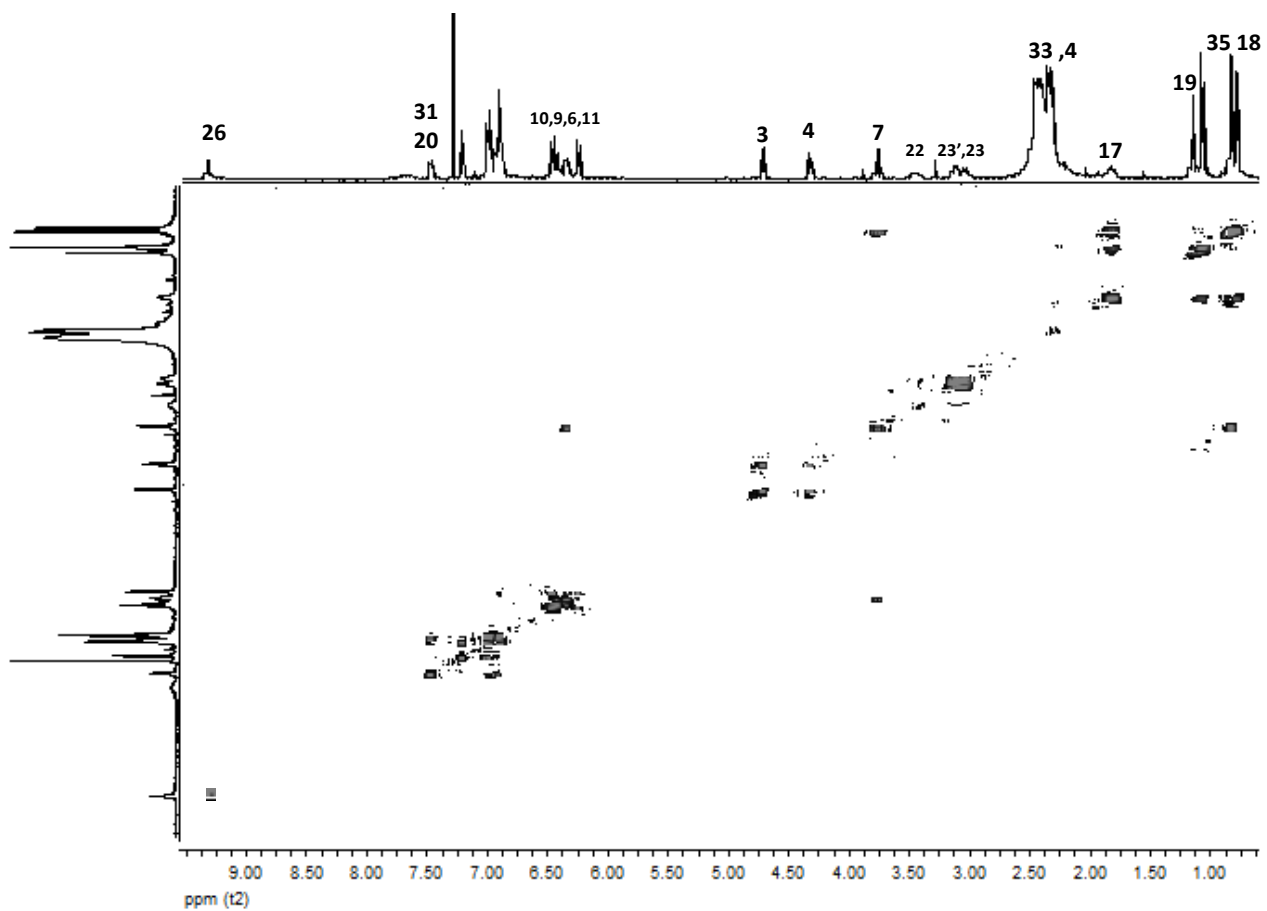


Figura 89. Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-C (**59**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 $^\circ\text{C}$.

5.3.14.2.1 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-C (59), expansão – região entre δ 0,7 e 4,8 ppm

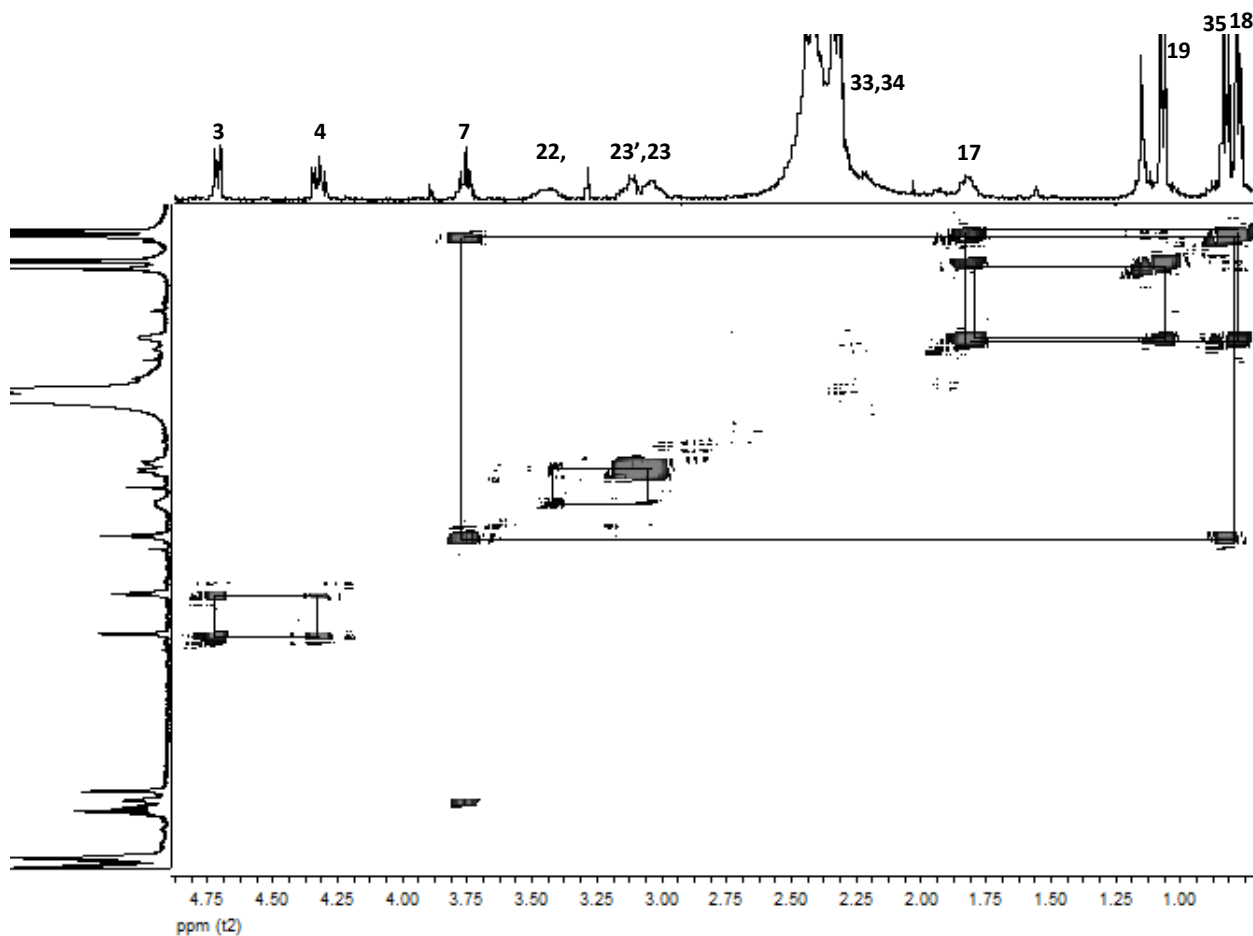


Figura 90. Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-C (59), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 $^\circ\text{C}$, expansão da região entre δ 0,7 e 4,8 ppm.

5.3.14.2.2 Dados de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-C (59), expansão – região entre δ 3,6 e 7,5 ppm

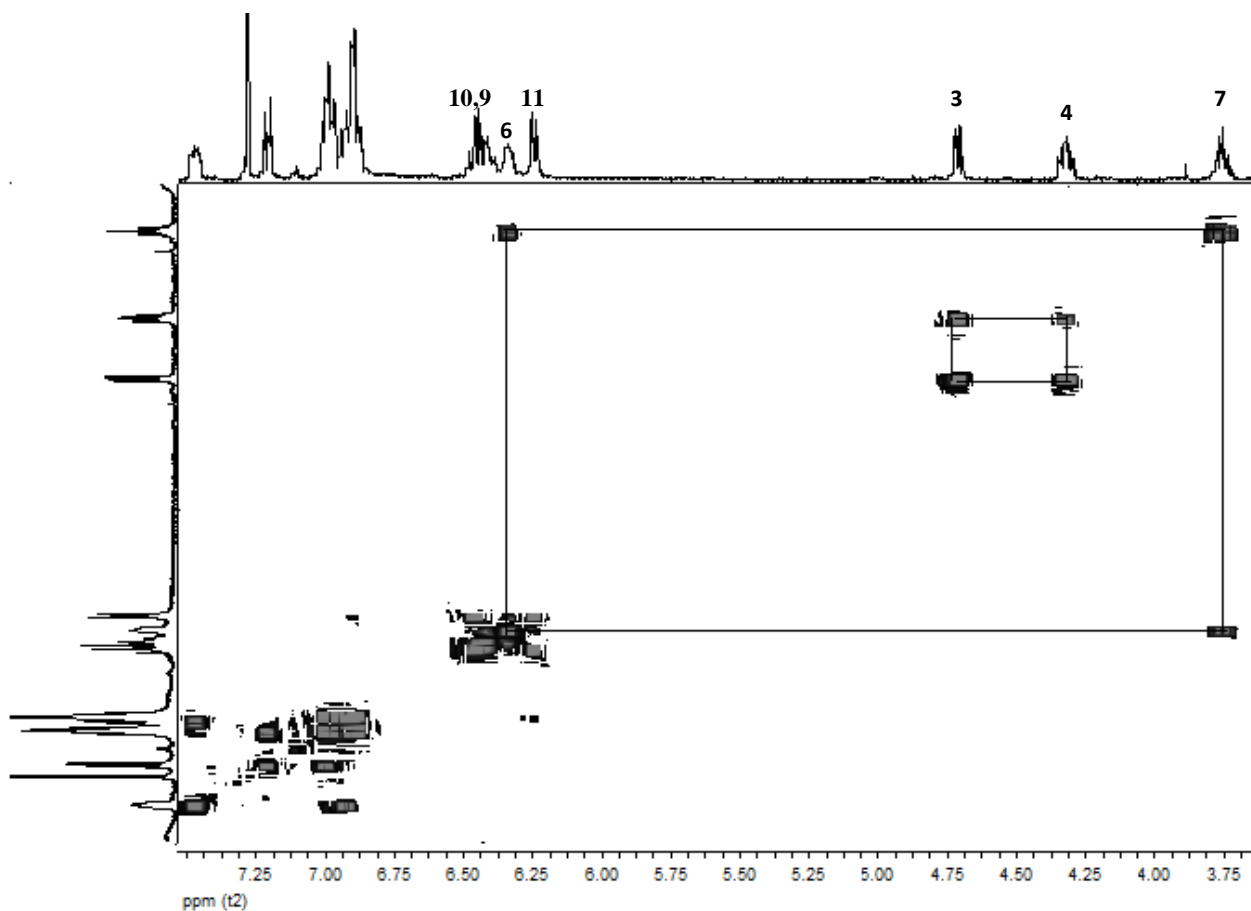
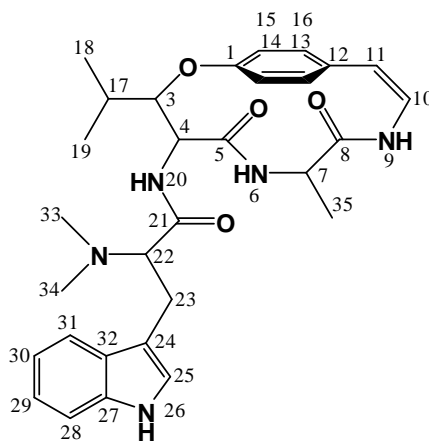


Figura 91. Espectro de RMN de ^1H bidimensional, COSY ^1H - ^1H , do alcaloide Waltherina-C (59), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 400,13 MHz, 25 $^\circ\text{C}$, expansão da região entre δ 3,6 e 7,5 ppm.

5.3.14.3 Dados de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide Waltherina-C (59)



(59)

A atribuição de sinais dos núcleos de carbono por RMN de ^{13}C , foi realizado através do experimento de RMN de carbono totalmente desacoplado. Assim, análise do espectro de RMN ^{13}C unidimensional de Waltherina-C, Figura 92 (pág. 172), permitiu identificar 29 sinais na região de absorção entre δ 14,5 - 171,6 ppm. Através da estrutura já proposta e comparação com a literatura^{113,114,115}, pôde-se atribuir a maior parte dos carbonos para o composto (59).

Começando a atribuição dos carbonos para (59), são observados três sinais característicos de carbonila de amida, sendo dois deles muito próximos. Respectivamente, os sinais foram atribuídos com os seguintes deslocamentos: δ 171,6 ppm, (C-21); δ 170,9 ppm, (C-5) e δ 167,87 ppm, (C-8). Em δ 155,9 ppm está atribuído (C-1). Os carbonos C-18 e C-19 metílicos absorvem, em δ 14,5 e 19,9 ppm, respectivamente. (C-3) apresenta um deslocamento químico igual a δ 81,6 ppm. Outra característica do núcleo ciclopeptídico, está relacionado aos carbonos C-4 e C-7, ambos ligados a heteroátomo, nitrogênio amídico do tipo (R-C(O)-NH-R). Esses têm seus picos observados em δ 54,91 ppm, (C-4) e δ 54,21 ppm, (C-7). Os sinais de ^{13}C correspondentes ao sistema aromático da unidade *p*-etilamina e à unidade triptofano,

juntamente com os carbonos metínicos, H-10 e H-11, estão distribuídos na região de deslocamentos químicos entre δ 111,0 e 136,1 ppm.

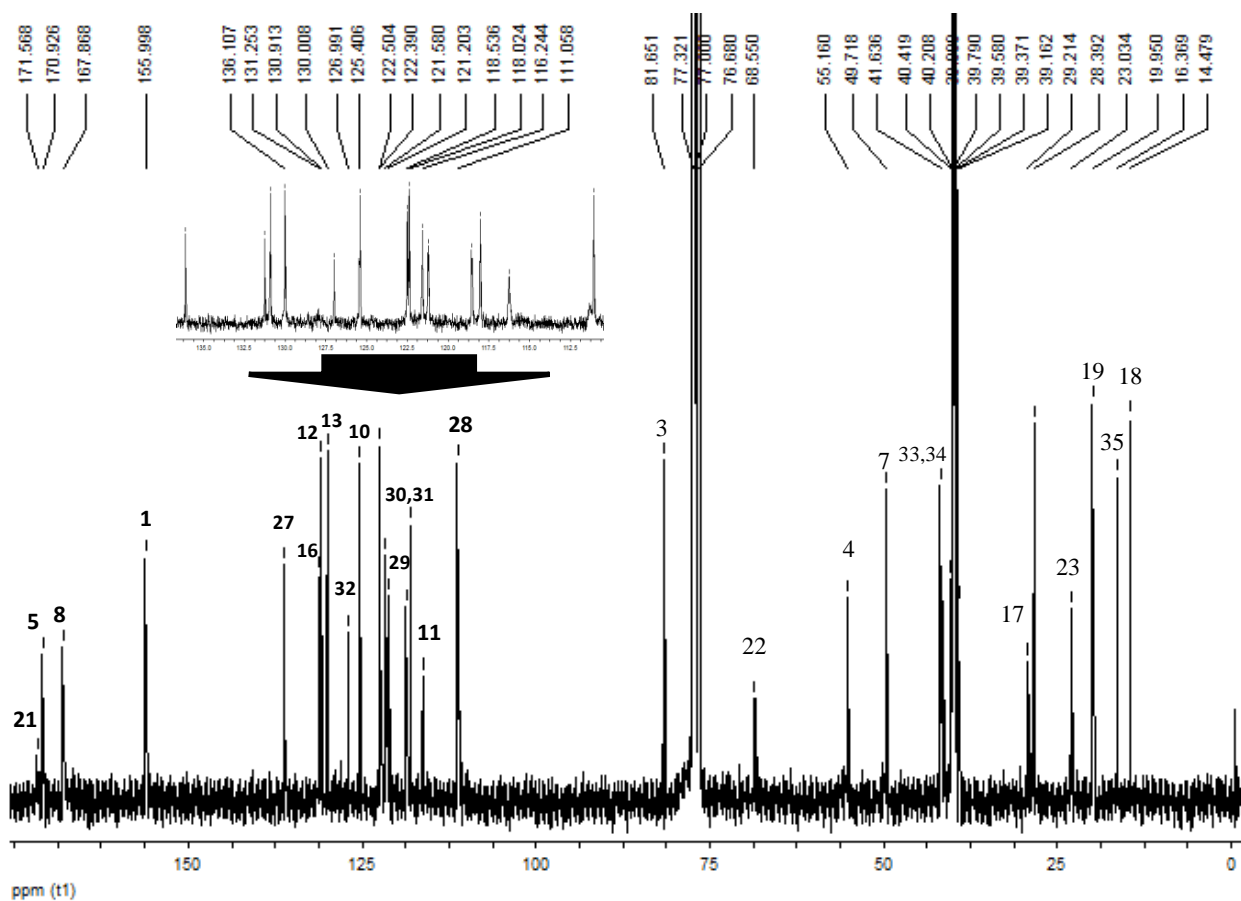


Figura 92. Espectro de RMN de ^{13}C unidimensional do alcaloide Waltherina-C (**59**), obtido em mistura de CDCl_3 e DMSO-d_6 (4:1 v/v) à 100,32 MHz, 25 °C.

5.4 COMPARAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DE *W. Douradinha* Sit. Hil. COLETADA NAS CIDADES DE SÃO PEDRO DO SUL, CRUZ ALTA, PALMEIRA DAS MISSÕES E PASSO FUNDO OBTIDO EM HPLC

A Figura 93 (pág. 174) apresenta os cromatogramas do extrato de *W. douradinha*, coletada na cidade São Pedro do Sul, obtidos nos comprimentos de onda de $\lambda=220$ nm **(a)**; 240 nm **(b)** e 260 nm **(c)**.

Observa-se, para este extrato alcaloídico, um pequeno número de estruturas químicas em alta concentração. Alguns dos compostos isolados dessa planta estão identificados no cromatograma da página 174. Dos metabólitos isolados e identificados, as substâncias Walteriona A e Walteriona B, diastereoisômeros, apresentaram tempos de retenção muito próximos. Quando os dois compostos são eluídos separadamente, observa-se uma pequena diferença entre os mesmos, fato esse, que possibilita diferenciá-los em HPLC. O composto Walteriona A mostra-se sutilmente menos polar que Walteriona B.

O comprimento de onda em que as substâncias são melhores visualizadas é representado pelo cromatograma **(c)** da figura 93 em $\lambda=260$ nm.

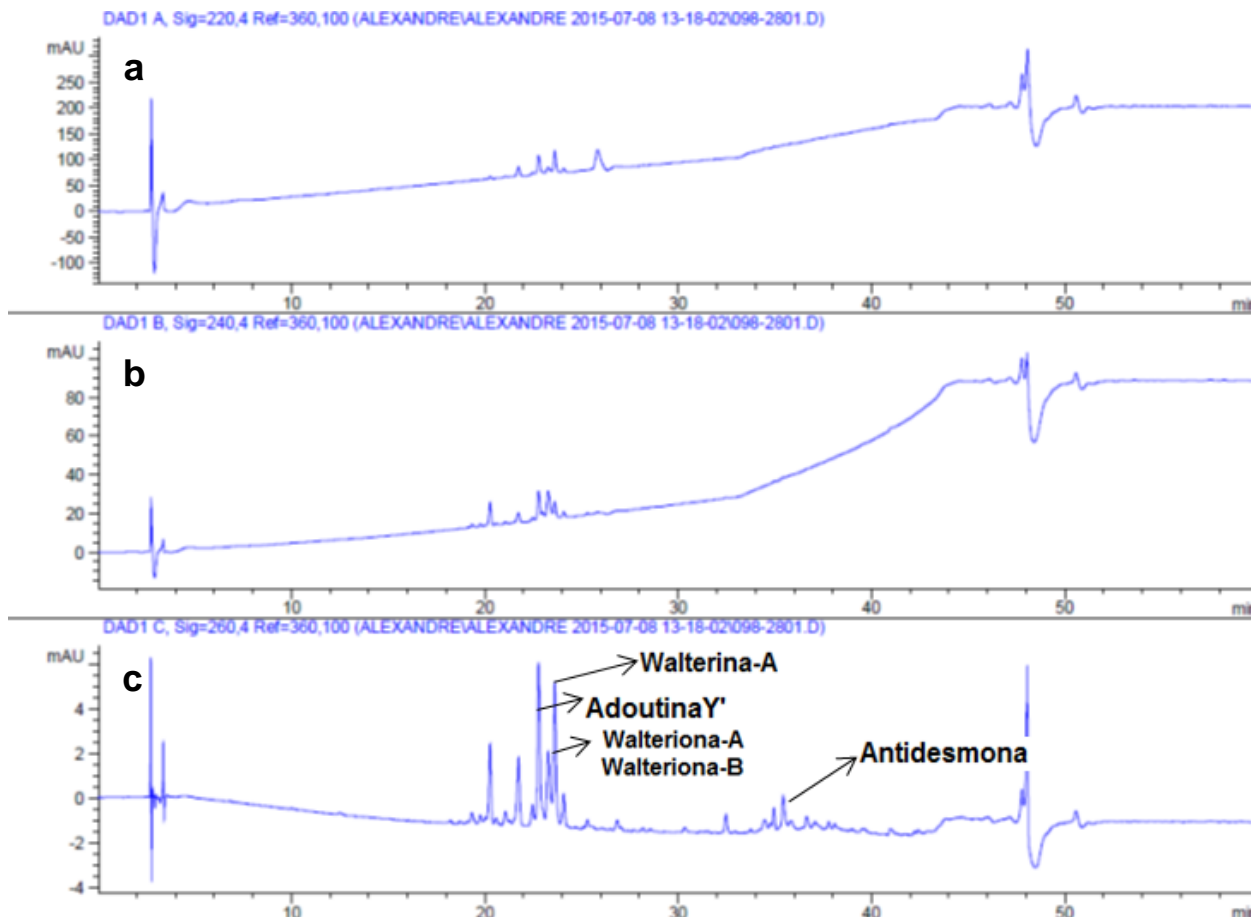


Figura 93. Cromatogramas obtidos por HPLC do extrato de *W. doradinha* Sit. Hil. coleta - São Pedro do Sul, em $\lambda=220$ nm **(a)**, 240 nm **(b)** e 260 nm **(c)**.

O extrato básico da coleta realizada na cidade de Cruz Alta, Figura 94 (pág. 175), também foi analisado por HPLC e, dos quatro extratos avaliados, é o que contém a maior variabilidade de estruturas, principalmente compostos menos polares, possivelmente derivados quinolônicos semelhantes à antidesmona. Esses compostos também encontram-se em altas concentrações, diferentemente do que acontece no extrato de alcaloides de *W. doradinha* coleta de São Pedro do Sul. Os melhores comprimentos de onda para observar os metabólitos dessa coleta são: $\lambda=260$ nm **(a)**; 280 nm **(b)** e 300 nm **(c)**. O comprimento de onda da figura **(c)** mostra o melhor resultado para avaliar os compostos mais apolares. Em quanto, o conjunto inteiro de substâncias são melhores observadas no cromatograma **(a)**.

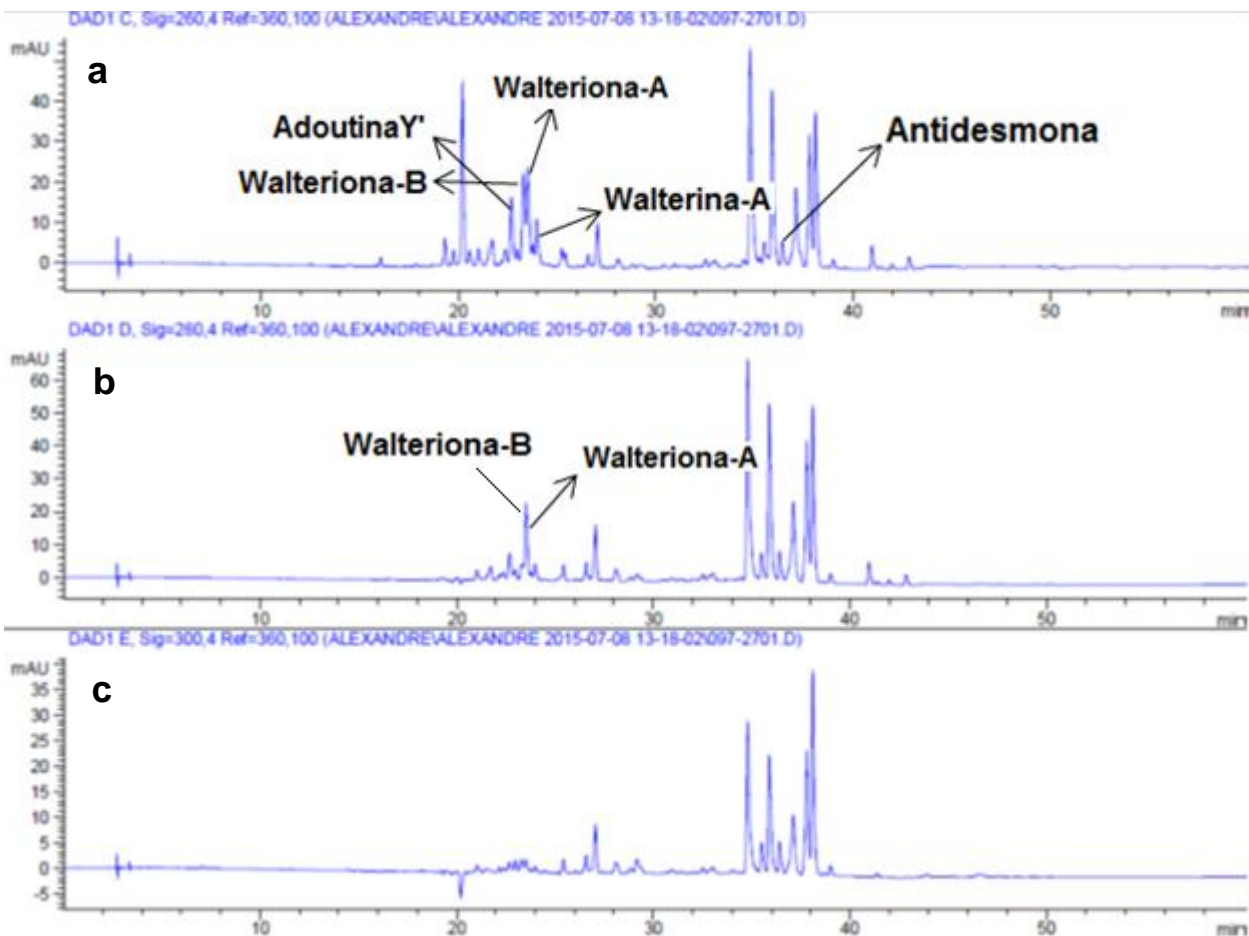


Figura 94. Cromatogramas obtidos por HPLC do extrato de *W. doradinha* Sit. Hil. coleta – Cruz alta, em $\lambda=260$ nm **(a)**, 280 nm **(b)** e 300 nm **(c)**.

A análise, por HPLC, do extrato de alcaloides obtido da coleta de Palmeira das Missões, Figura 95 (pág. 176), mostra a maior quantidade de compostos, porém, a maioria destes em baixas concentrações e com tempos de retenção muito próximos, fator que dificulta o isolamento de suas substâncias. Nesse extrato, foi possível identificar os alcaloides Walterionas A e B, AdoutinaY' e Antidesmona. O melhor comprimento de onda para visualizar as substâncias é $\lambda=280$ nm, cromatograma **(a)**.

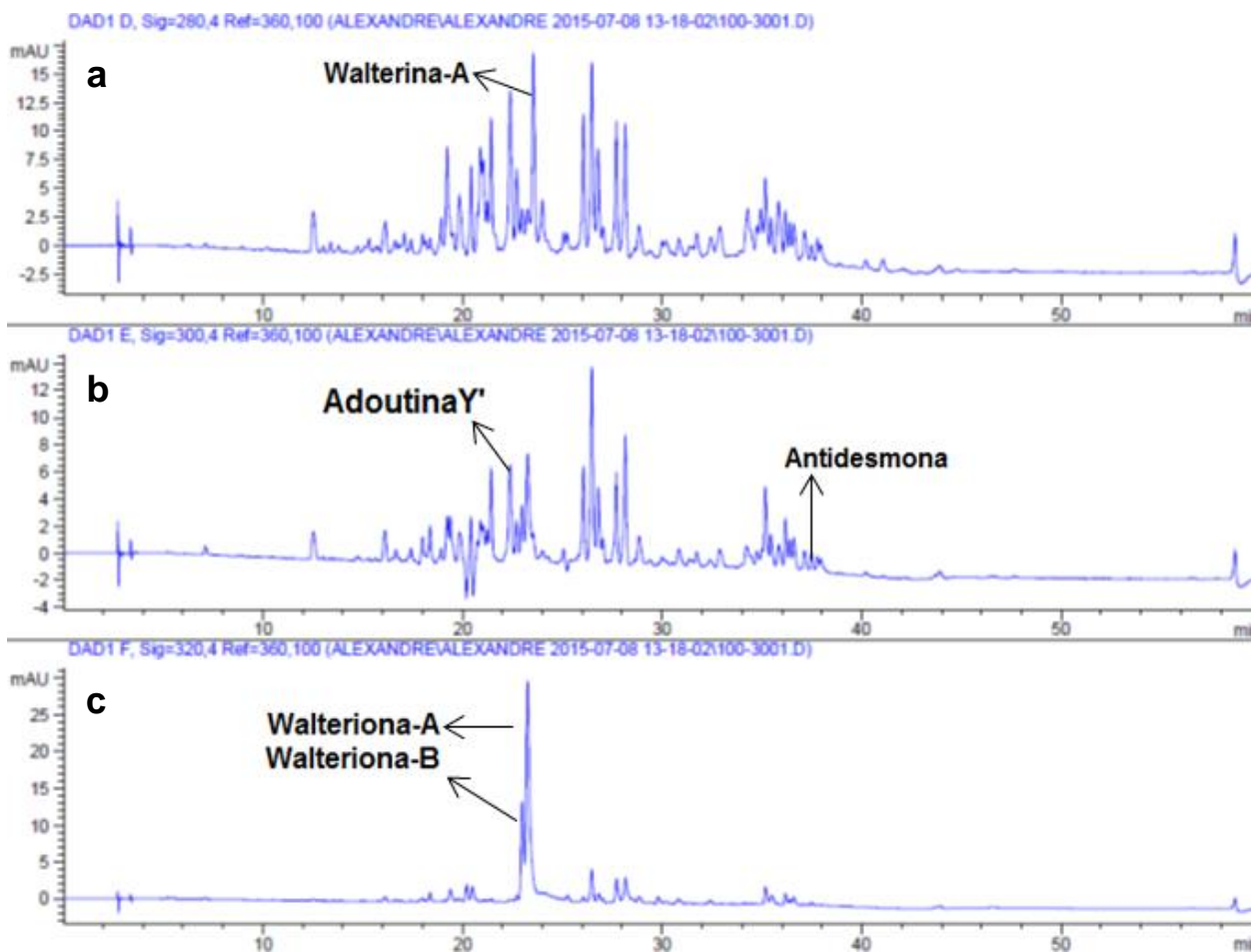


Figura 95. Cromatogramas obtidos por HPLC do extrato de *W. doradinha* Sit. Hil. coleta – Palmeira das Missões, em $\lambda=280$ nm **(a)**, 300 nm **(b)** e 320 nm **(c)**.

O extrato da coleta realizada na cidade Passo Fundo, Figura 96 (pág. 177) possui um grande número de substâncias, mas poucas delas em altas concentrações e com Tempos de Retenção (Rt) que não permitem isolá-las facilmente. Neste extrato, não foram identificados os compostos Walterina-A e AdoutinaY'. Walterionas A e B estão presentes, mas Walteriona A em maior concentração que Walteriona B. O cromatograma **(a)** mostra a melhor representação da composição química nesse extrato de alcaloides.

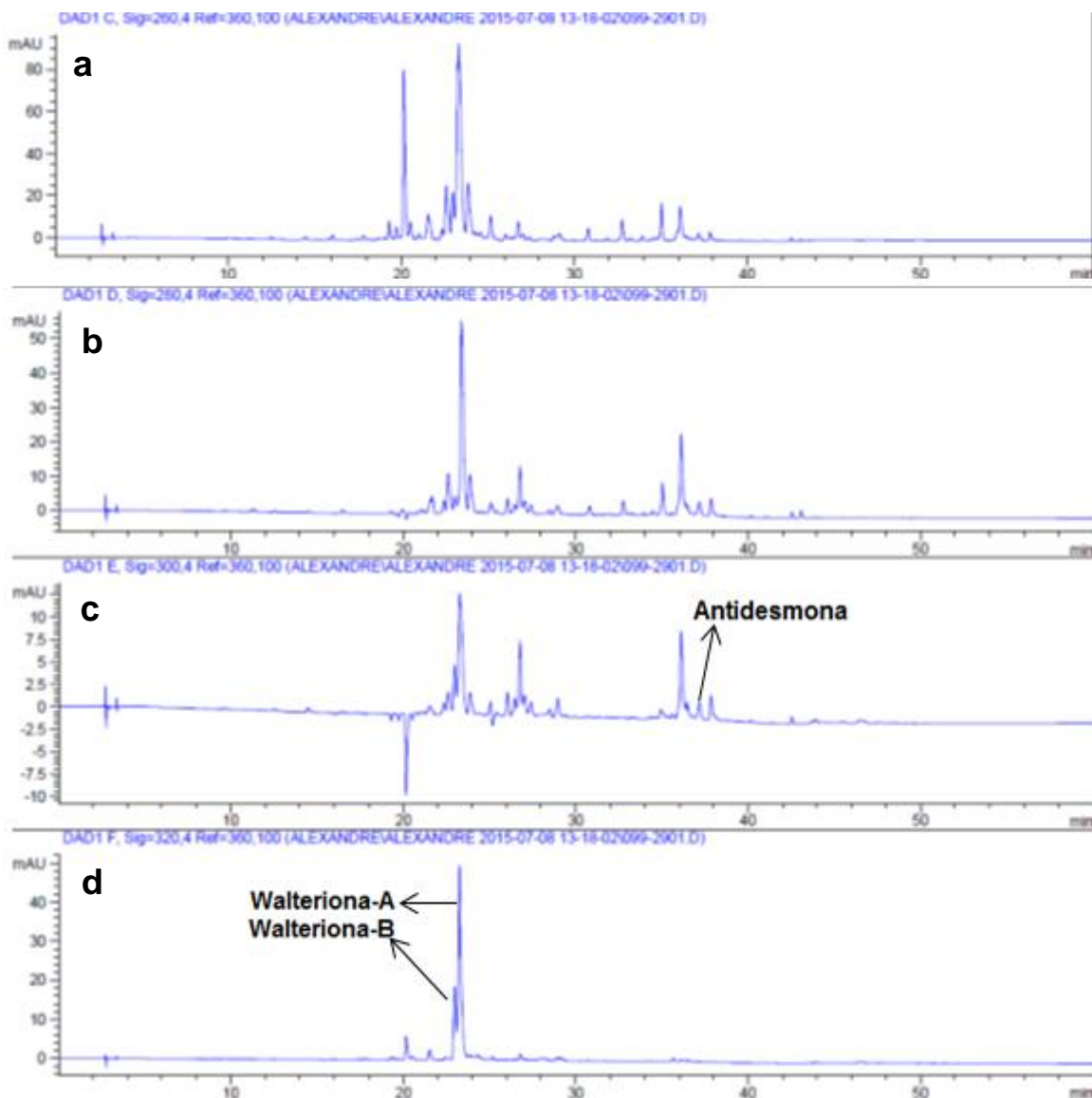


Figura 96. Cromatogramas obtidos por HPLC do extrato de *W. doradinha* Sit. Hil. coleta – Passo Fundo, em $\lambda=260$ nm **(a)**, 280 nm **(b)**, 300 nm **(c)** e 320 nm **(d)**.

A Figura 97 (pág. 178) mostra os cromatogramas **(a-e)** das substâncias isoladas e seus tempos de retenção.

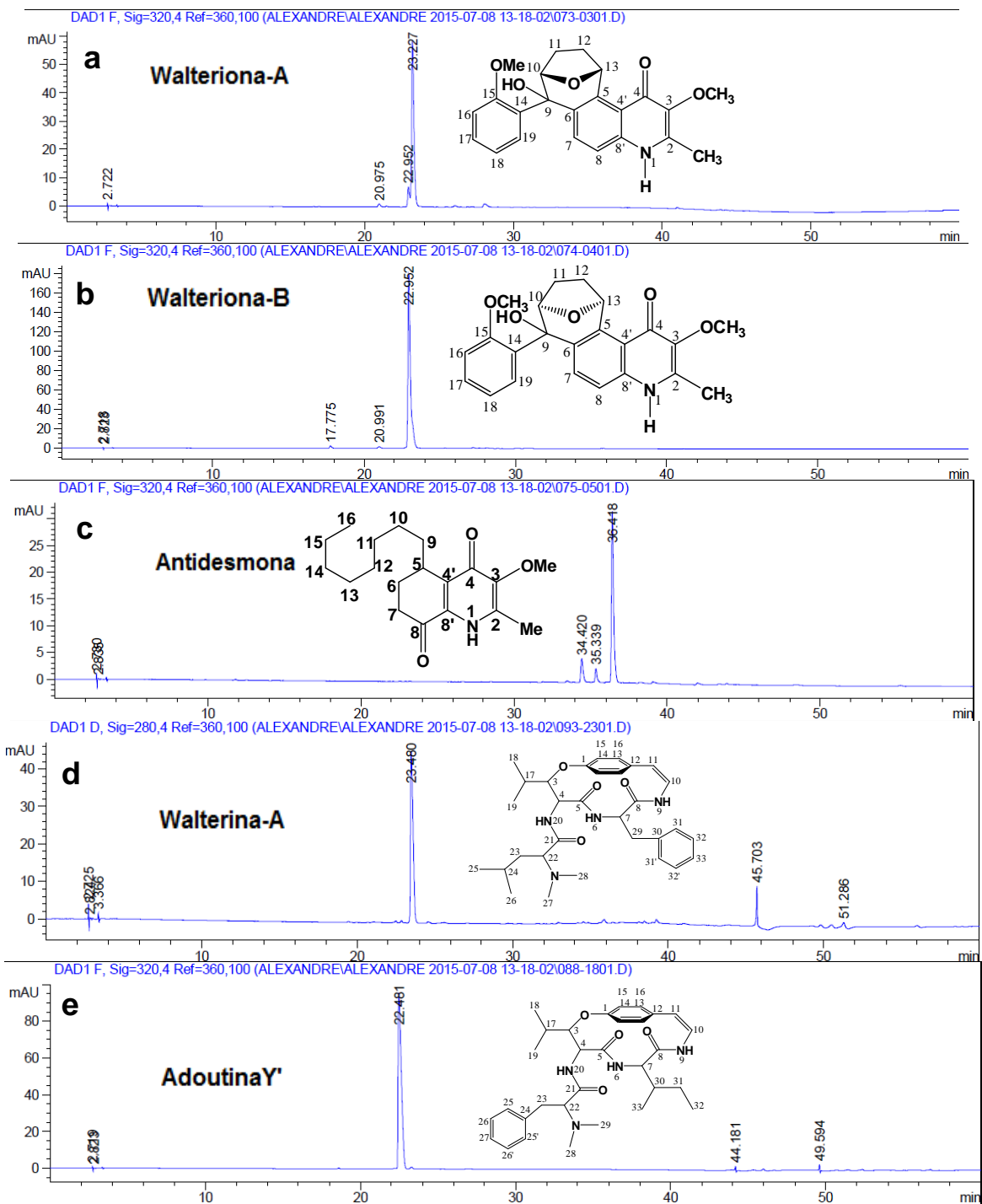


Figura 97. Cromatogramas obtidos por HPLC dos compostos isolados e identificados da espécie *W. doradinha* Sit. Hil., coleta – São Pedro do Sul, em $\lambda=320$ nm, Walteriona A **(a)**, 320 nm, Walteriona B **(b)**, 320 nm, Antidesmona **(c)**, e 280 nm, Walterina A **(d)** e 320 nm, AdoutinaY' **(e)**.

A Figura 98 apresenta os cromatogramas das Co-injeção dos alcaloides Walteriona A e Walteriona B.

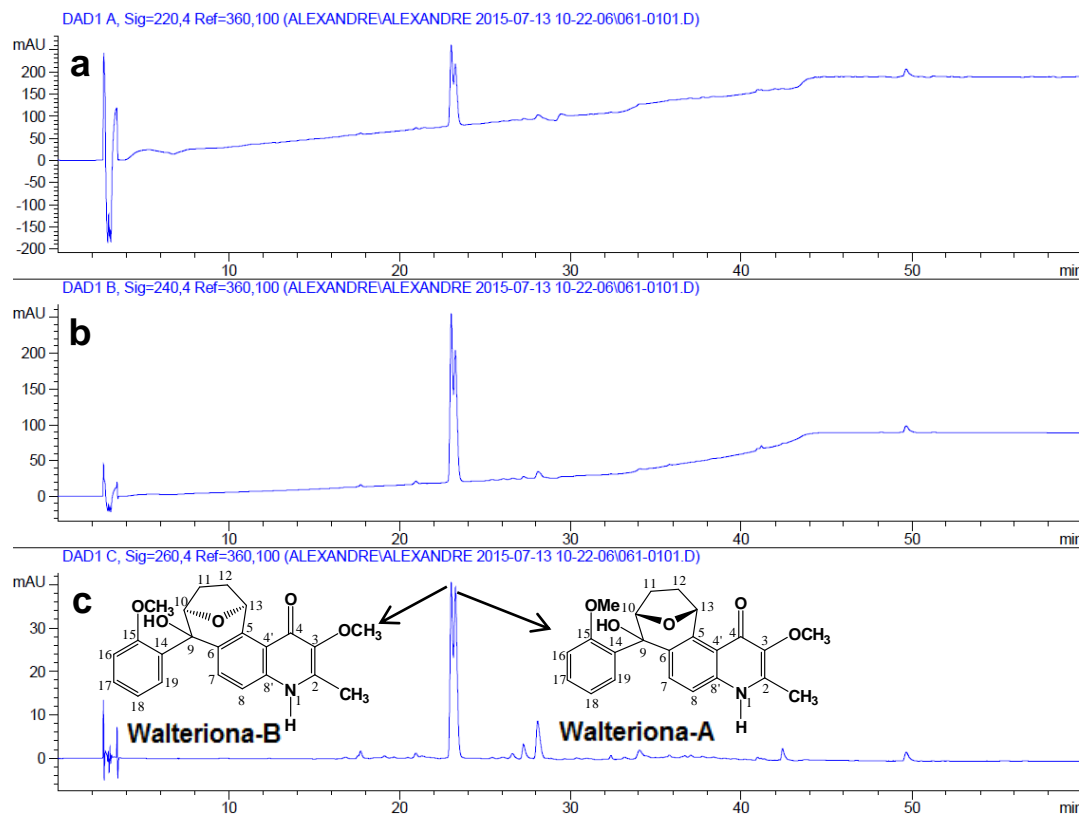


Figura 98. Co-injeção em HPLC das Walterionas A e B nos diferentes comprimentos de onda, $\lambda = 220$ nm (a), 240 nm (b), e 260 nm (c).

5.5. ANÁLISES DOS SOLOS COLETADOS NO LOCAL DE OBTENÇÃO DAS PLANTAS DA ESPÉCIE *W. douradinha*

A tabela 19 foi retirada do site da embrapa e aponta os índices ideais para um solo cultivável.

TABELA 19. Níveis de alguns componentes do solo (método Mehlich para P e K) para efeito da interpretação de resultados de análise química do solo, para a cultura da soja.

Níveis	cmok dm ⁻³ de solo			g kg ⁻¹		Saturação na CTC (%) ²					Relações ²		
	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	C	M.O.	H+Al	V	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
Baixo	0,0 ²	<2	<0,4	8	<15	>40 ²	<60	<35	<13	<3	<1,5	<8	<3
Médio	0,0-1,5	2-4	0,4-0,8	8-14	15-25	40-30	60-70	35-50	13-20	3-5	1,5-3,5	8-16	3-6
Alto	>1,5	>4	>0,8	>14	>25	<30	>70	>50	>20	>5	>3,5	>16	>6

Fonte: Site Embrapa

A tabela 20 apresenta os dados obtidos após a análise das amostras de solo realizadas pelo Laboratório de solos do polo de modernização tecnológica da URI – campus de Frederico Westphalen.

Tabela 20. Relação entre os níveis de alguns componentes inorgânicos presentes nos solos dos locais de coleta das plantas das espécie *W. douradinha* para efeitos comparativos.

Coleta	cmo k.dm ⁻³ de solo			g.Kg ⁻¹		Saturação na CTC (%)			Relações		
	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	N	M O	H+Al	pH	Al ⁺³	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
S. Pedro	4,0	10,3	7,7	0,005	0,1	9,6	4,6	18,0	1,3	54,4	40,7
C. Alta	1,7	1,3	1,0	0,07	1,4	5,6	5,0	41,9	1,3	21,6	16,6
P. Missões	1,0	1,0	0,7	0,02	0,4	4,7	5,3	36,4	1,4	21,7	15,2
P. Fundo	5,3	0,9	0,3	0,04	0,8	12,6	4,2	81,0	3,0	20,1	6,9

Na análise dos solos coletados, pôde-se verificar uma grande versatilidade da espécie *W. douradinha* em reproduzir-se nos locais, cuja a condição nutricional é inadequada para uma cultura tradicional e mais exigente. Também, foi observado que o solo com os índices de nutrientes mais próximos dos considerados ideais, Tabela 19 (pág. 180), foi da coleta realizada na cidade de Cruz Alta. Essa característica pode ser atribuída como um dos fatores que explica o maior número de estruturas e em maior concentração deste extrato. Dois dados são relevantes ao comparar os resultados obtidos das análises de solo com os dados de HPLC do material coletado. O índice de matéria orgânica (MO) e de nitrogênio (N) do material de Cruz Alta são os maiores quando comparado com as outras três coletas. Esse fato também pode explicar, parcialmente, a maior diversidade de estruturas desse extrato básico, bem como as concentrações mais elevadas das substâncias. É importante salientar que a análise química e física do solo é apenas um dos fatores que determinam a composição de metabólitos secundários de uma planta. Outros fatores extrínsecos e intrínsecos como temperatura, umidade do ar, pressão atmosférica, luminosidade, horário de coleta, predação, herbivorismo, entre outros, também estão associados à produção de metabólitos secundários da planta.

5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES OBTIDOS DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *L. lanatus*

Na avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH qualitativo, as amostras foram testadas na concentração de 50 µg/ml. Nesta concentração, todas as amostras apresentaram resultado positivo para este método.

A análise quantitativa da atividade antioxidante do extrato metanólico e frações obtidas das folhas da espécie *L. lanatus*, demonstrou-se muito promissora para as amostras avaliadas, podendo-se destacar a Fração Acetato de Etila Ácida. Esta fração apresentou uma capacidade inibitória de radicais livres, muito semelhante a do padrão utilizado, o BHT. A fração em questão foi ativa até a concentração de 3,10 µg/ml, última

concentração testada. O gráfico da Figura 99 mostra os potenciais antioxidantes das amostras avaliadas para essa atividade pelo método quantitativo.

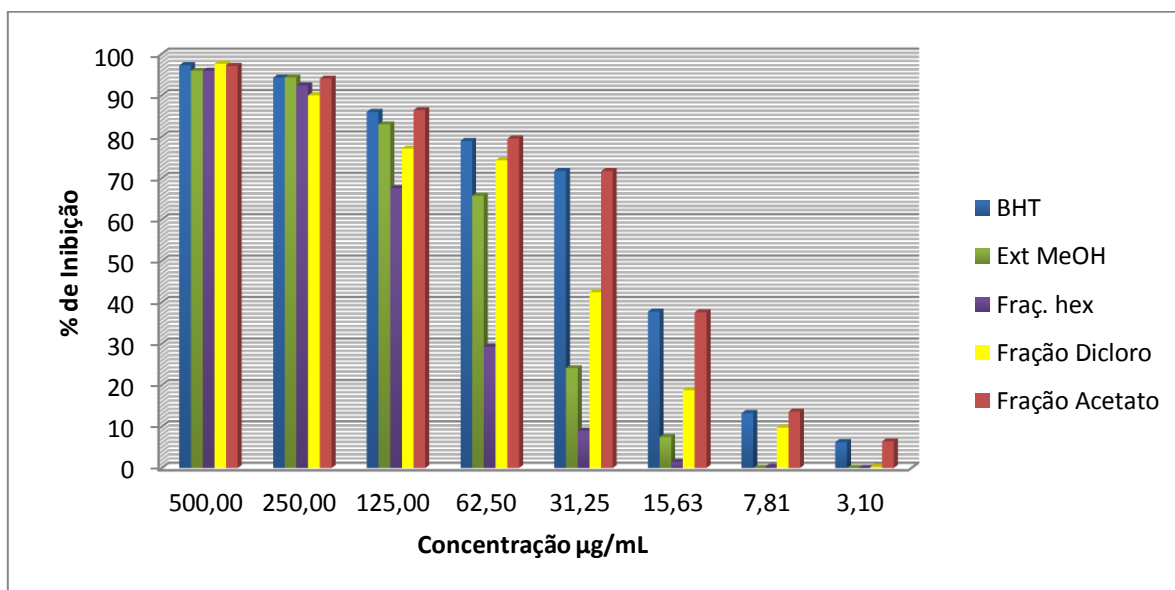


Figura 99. Potencial Antioxidante pelo método quantitativo do extrato metanólico e Frações Ácidas obtidas das folhas de *L. lanatus*.

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Lupinus*

5.7.1 Atividade Antimicrobiana de Extratos e Frações Obtidas das Espécies do Gênero *Lupinus*

As amostras avaliadas em seu potencial antimicrobiano estão listadas a seguir em ordem numérica. As abreviaturas das tabelas correspondem aos nomes e números das listagem abaixo descrita. Os valores apontados nas tabelas foram calculados em µg/ml.

- 1- *L. lanatus*, fração acetato de etila ácida - folhas (LL-F.Act.ác.F);
- 2- *L. guraniticus*, fração etérea ácida - folhas (LG-F.E.A.F);
- 3- *L. guraniticus*, fração hexânica ácida - folhas (LG-F.H.A.F);
- 4- *L. guraniticus*, fração diclorometano ácida - folhas (LG-F.D.A.F);
- 5- *L. guraniticus*, fração acetato ácida - folhas (LG-F.Act.A.F);
- 6- *L. guraniticus*, fração diclorometano básica – folhas (LG-F.D.B.F);
- 7- *L. paranensis*, fração etérea ácida - folhas (LP-F.E.A.F);
- 8- *L. paranensis*, fração hexânica ácida - folhas (LP-F.H.A.F);
- 9- *L. paranensis*, fração diclorometano ácida - folhas (LP-F.D.A.F);
- 10- *L. paranensis*, fração acetato ácida - folhas (LP-F.Ac.A.F);
- 11- *L. paranensis*, fração diclorometano básica – folhas (LP-F.D.B.F);

Os microrganismos relacionados para a avaliação antimicrobiana são listados a seguir juntamente com suas abreviaturas:

Leveduras: **(C.a.)** *Cândida albicans* ATCC 1023; **(C.t.)** *Cândida tropicalis* ATCC 18803; **(C.k.)** *Cândida krusei* ATCC 6258; **(C.p.)** *Cândida parapsilosis* ATCC 22018; **(Cr.n.)** *Cryptococcus neoformans* ATCC 28952; **(Cr.gt.)** *Cryptococcus gatti* ATCC 2601; **(S.c.)** *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601.

Bactérias Gram-negativos: **(E.c.)** *Escherichia coli* ATCC 25922; **(E.b.)** *Enterobacter cloacae* ATCC 1304; **(P.a.)** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; **(Bk.)** *Burkholderia cepacia* ATCC 17759; **(S.s.)** *Shigella sonnei* ATCC 2593; **(S.ty.)** *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; **(M.m.)** *Morganella morganii* ATCC 25829.

Bactérias Gram-positivos: **(S.a.)** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; **(B.s.)** *Bacillus subtilis* ATCC 6633; **(B.c.)** *Bacillus cereus* ATCC 33019; **(Ecc.)** *Enterococcus spp.* ATCC 6589; **(Eb.a.)** *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

As Tabelas 21 (pág. 185) apresentam os resultados das atividades antifúngicas referentes às amostras acima listadas.

A Tabela 21 mostra os resultados das atividades antimicrobianas de extratos e frações obtidas de três espécies do gênero *Lupinus*. De todas as amostras testadas, pode-se observar o potencial antimicrobiano muito interessante para amostra LL-F.Act.ác.F. Esta apresentou um CIM de 31,2 µg/ml e um CLM de 62,5 µg/ml para o microrganismo *Candida albicans*. Para a mesma amostra, ainda foi observado, um CIM de 31,2 µg/ml e um CLM de 31,2 µg/ml frente à *Cândida krusei* e um CIM = 62,5 µg/ml e um CLM = 125 µg/ml quando testado ante ao microrganismo *Cândida parapslosis*. Vale destacar que essa amostra é composta pelos flavonoides **(52)** e Fl2. Uma das explicações para esses bons resultados, é considerar que uma das principais funções dos flavonoides no vegetal, é proteção contra microrganismos patogênicos. A fração de alcaloides LG-F.D.B.F também mostrou-se promissora com um CIM = 31,2 e CLM = 125 µg/ml para *Cândida tropicalis* e CIM = 62,5 e CLM = 250 µg/ml para *Cândida krusei*.

A amostra LP-F.D.B.F apresentou-se bastante ativo quando testada para as leveduras *Cândida parapslosis* e *Cândida albicans*. Para a primeira levedura, obteve-se CIM = 62,5 e CLM = 125 µg/ml e para o segundo fungo, foram obtidos um CIM = 125 e CLM = 125 µg/ml. A atividade com a fração LP-F.Ac.A.F também proporcionou um resultado promissor contra *Cândida albicans* com um CIM = 31,2 e CLM = 125 µg/ml.

TABELA 21. Atividade antimicrobiana de extratos e frações obtidos de três espécies do gênero *Lupinus* em $\mu\text{g/ml}$.

Amostras	Leveduras							
	C.a.		C.t.		C.k.		C.p.	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
1-LL-F.Act.ác.F	31,2	62,5	250	>250	31,2	31,2	62,5	125
2-LG-F.E.A.F	125	250	250	250	250	>250	125	>250
3-LG-F.H.A.F	125	>250	250	>250	250	250	250	>250
4-LG-F.D.A.F	125	>250	250	>250	250	250	250	>250
5-LG-F.Act.A.F	62,5	125	250	>250	125	>250	125	250
6-LG-F.D.B.F	250	>250	31,2	125	62,5	250	125	250
7-LP-F.E.A.F	250	>250	>250	-	250	>250	250	>250
8-LP-F.H.A.F	250	>250	>250	-	250	>250	>250	-
9-LP-F.D.A.F	250	>250	250	>250	250	>250	>250	-
10-LP-F.Ac.A.F	31,2	250	250	>250	125	250	125	125
11-LP-F.D.B.F	125	125	250	>250	62,5	125	>250	-
Padrão- Nistatina	0,77	3,12	1,52	3,12	0,77	0,77	0,77	1,52

Na tabela 22 (pág. 186), é possível visualizar os bons resultados obtidos pelas amostras LL-F.Act.ác.F frente a *Cryptococcus neoformans* com CIM = 12,5 $\mu\text{g/ml}$ e CLM = 62,5 $\mu\text{g/ml}$ e *Cryptococcus gatti* CIM e CLM = 62,5 $\mu\text{g/ml}$. A fração LG-F.D.B.F, apresenta bons CIM = 31,2 $\mu\text{g/ml}$ e CLM = 125 $\mu\text{g/ml}$ e CIM = 62,5 $\mu\text{g/ml}$ e CLM = 250 $\mu\text{g/ml}$ quando testada, respectivamente para as mesmas leveduras. Também devem ser observados na tabela 22 os resultados da amostra LP-F.D.B.F.

TABELA 22. Atividade antimicrobiana de extratos e frações obtidos de três espécies do gênero *Lupinus* em $\mu\text{g/ml}$.

Amostras	Leveduras					
	<i>Cr.n.</i>		<i>Cr.gt.</i>		<i>S.c.</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
1-LL-F.Act.ác.F	12,5	62,5	62,5	62,5	125	>250
2-LG-F.E.A.F	125	125	125	250	>250	-
3-LG-F.H.A.F	>250	-	250	>250	>250	-
4-LG-F.D.A.F	250	>250	250	250	>250	-
5-LG-F.Act.A.F	125	125	250	>250	250	>250
6-LG-F.D.B.F	31,2	125	62,5	250	250	250
7-LP-F.E.A.F	250	>250	250	250	250	250
8-LP-F.H.A.F	250	>250	250	250	250	>250
9-LP-F.D.A.F	125	>250	250	>250	250	>250
10-LP-F.Ac.A.F	125	>250	250	250	250	250
11-LP-F.D.B.F	62,5	250	62,5	125	62,5	250
Padrão – Nistatina	1,52	3,12	3,12	3,12	1,52	3,12

As Tabelas 23-25 (pág. 187 - 189) apresentam os resultados de CIM e CLM do ensaio antimicrobiano com bactérias gram-negativas e gram-positivas. Os resultados de maior interesse estão grifados em negrito. De todos esses, os melhores e mais consistentes foram obtidos com a amostra LL-F.Act.ác.F frente a vários microrganismos gram-positivos e gram-negativos.

Salvo ressaltar que, dessa fração foram obtidos dois compostos fenólicos, FI1 e FI2 em altas concentrações. O primeiro composto já teve sua estrutura química elucidada e é conhecido como Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**). Pode-se sugerir, neste caso, que (**52**) tem como característica um bom potencial antimicrobiano.

TABELA 25. Atividade antimicrobiana de extratos e frações obtidos de três espécies do gênero *Lupinus* em µg/ml.

Amostras	Gram-positivos							
	(B.s.)		(B.c.)		(Ecc.)		(Eb.a.)	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
1-LL-F.Act.ác.F	31,2	125	250	>250	31,2	62,1	125	>250
2-LG-F.E.A.F	125	250	250	>250	250	>250	>250	-
3-LG-F.H.A.F	125	>250	250	>250	125	250	>250	-
4-LG-F.D.A.F	250	>250	250	250	250	>250	>250	-
5-LG-F.Act.A.F	250	>250	250	250	125	250	250	>250
6-LG-F.D.B.F	125	250	250	>250	125	>250	>250	-
7-LP-F.E.A.F	250	250	250	>250	125	250	125	>250
8-LP-F.H.A.F	250	250	250	250	250	250	125	>250
9-LP-F.D.A.F	250	250	250	>250	250	>250	250	>250
10-LP-F.Ac.A.F	31,2	250	250	>250	125	125	250	>250
11-LP-F.D.B.F	125	250	250	>250	62,5	125	125	>250
Padrão – Levofloxacina	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77

As substâncias puras testadas em seu potencial antimicrobiano frente a leveduras estão listadas a seguir e numeradas ordem crescente. As abreviaturas das Tabelas 26-30 (pág. 190-193) correspondem aos nomes e números das substâncias abaixo relacionadas. Essas tabelas ilustram os resultados das atividades antibacterianas das amostras abaixo apontadas frente a microrganismos gram-negativos e gram-positivos.

- 1- Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (F11);
- 2- Anagirina (LG1);
- 3- 13- α -hidroxianagirina (LG2);
- 4- 13- α -hidroxilupanina (OH-Lupan.);

- 5- 5,6-dehidrolupanina (LG-3);
 6- 13- α -tigloiloxilupanina (tigloil-Lupan.);
 7- Lanatina A;
 8- Lupanina;
 9- 13- α -hidroxisparteina (Deriv. 02).

TABELA 26. Atividade antimicrobiana das substâncias puras e derivados sintéticos obtidos de três espécies do gênero *Lupinus* em $\mu\text{g/ml}$.

Amostras	Leveduras							
	C.a.		C.t.		C.k.		C.p.	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
1-FI1	25	50	50	100	12,5	25	50	100
2-LG1	25	>100	100	100	50	>100	50	>100
3-LG2	25	100	100	>100	50	>100	50	>100
4-OH-lupanina	100	>100	100	100	100	>100	100	>100
5-LG3	50	100	50	100	50	>100	25	>100
6-tigloil-lupan.	100	100	100	>100	100	100	50	>100
7-Lanatina A	12,5	50	50	100	25	50	25	100
8-Lupanina	>100	-	>100	-	>100	-	100	>100
9-Deriv. 02	50	100	100	>100	100	-	100	>100
Padrão – Nistatina	0,77	3,12	1,52	3,12	0,77	0,77	0,77	1,52

TABELA 30. Atividade antimicrobiana de substâncias puras e derivados sintéticos obtidos de três espécies do gênero *Lupinus* em µg/ml.

Amostras	Gram-positivos							
	(B.s.)		(B.c.)		(Ecc.)		(Eb.a.)	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
1-FI1	50	50	50	>100	12,5	100	100	>100
2-LG1	100	>100	100	>100	50	>100	100	>100
3-LG2	100	>100	100	>100	50	>100	100	>100
4-OH-lupanina	100	100	>100	-	50	100	>100	-
5-LG3	100	>100	>100	-	50	>100	>100	-
6-tigloil-lupan.	50	100	>100	-	50	>100	100	100
7-Lanatina A	50	100	50	>100	50	100	100	>100
8-Lupanina	100	>100	100	>100	100	>100	>100	-
9-Deriv. 02	>100	-	>100	-	100	100	>100	-
Padrão – Levofloxacina	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77

Pôde-se observar, após a análise das Tabelas 26-30, de atividade antimicrobianas, que o composto identificado como **(55)**, apresentou resultados de MIC e CLM altos frente as leveduras e bactérias testadas. Porém, esses resultados servem de base para a determinação da relação estrutura/atividade dos compostos testados. Nesse ponto, sugere-se que a presença da carbonila da lacatma é de fundamental importância para que estes metabólitos sejam ativos em menores concentrações. Outro fator muito positivo da análise, é a presença de grupos substituintes na molécula. Na determinação das atividades, a presença dos ligantes proporcionam uma atividade mais regular para a mesma. Isso é nítido quando observamos os resultados alcançados com os compostos (+)Lanatina A e 13- α -tigloiloxilupanina.

5.7.2 Atividades Antimicrobianas dos Extratos e Compostos Isolados de *W. douradinha*

As amostras avaliadas em seu potencial antimicrobiano estão listadas a seguir em ordem numérica. As abreviaturas nas tabelas correspondem aos nomes e números da listagem abaixo descrita. Os valores apontados nas tabelas foram calculados em $\mu\text{g/ml}$.

- 1- Extrato básico – coleta São Pedro do Sul – (EBSPS);
- 2- Extrato básico – coleta Cruz Alta – (EBCA)
- 3- Extrato básico – coleta Palmeira das Missões – (EBPM)
- 4- Extrato básico – coleta Passo Fundo – (EBPF)
- 5- Walteiona A **(43)**
- 6- Walteiona B **(44)**
- 7- Antidesmona **(56)**
- 8- AdoutinaY' **(57)**
- 9- Walterina-A **(58)**

Os resultados apontados nas Tabelas 31 e 32 (pág. 195 e 196) são correspondentes às atividades antifúngicas das amostras acima listadas.

Os resultados das atividades frente a leveduras dos extratos e compostos puros de *W. douradinha*, mostraram-se promissores frente aos microrganismos testados. Vale destacar o extrato básico de Cruz Alta com um CIM = 62,5 $\mu\text{g/ml}$ e um CLM = 125 $\mu\text{g/ml}$ frente a *Cândida krusei*. A substância Antidesmona e o extrato alcaloídico da coleta em Cruz Alta na análise frente ao microrganismo *Cryptococcus neoformans*, também mostraram-se bastante ativos. A amostra de Cruz Alta apresentou um CIM = 62,5 $\mu\text{g/ml}$ e um CLM = 125 $\mu\text{g/ml}$, em quanto o composto **(56)** obteve um CIM = 25 $\mu\text{g/ml}$ e um CLM = 25 $\mu\text{g/ml}$, demonstrando um bom potencial antifúngico.

TABELA 31. Atividade antimicrobiana de extratos básicos e substâncias isoladas da espécie *W. douradinha* em µg/ml.

Amostras	Leveduras							
	C.a.		C.t.		C.k.		C.p.	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
1-EBSPS	125	>250	125	>250	125	250	250	>250
2-EBCA	125	125	125	250	62,5	125	250	>250
3-EBPM	125	250	125	250	125	250	125	>250
4-EBPF	125	250	250	250	125	125	250	250
5- (43)	50	>100	100	100	50	50	50	>100
6- (44)	50	>100	100	>100	50	50	50	>100
7- (56)	50	>100	50	>100	25	50	50	>100
8- (57)	50	100	100	100	50	50	100	>100
9- (58)	50	>100	100	>100	50	50	50	>100
Padrão- Nistatina	0,77	3,12	1,52	3,12	0,77	0,77	0,77	1,52

TABELA 32. Atividade antimicrobiana de extratos básicos e substâncias isoladas da espécie *W. douradinha* em $\mu\text{g/ml}$.

Amostras	Leveduras					
	<i>Cr.n.</i>		<i>Cr.gt.</i>		<i>S.c.</i>	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
1-EBSPS	125	125	125	250	125	250
2-EBCA	62,5	125	125	125	125	250
3-EBPM	125	125	125	250	125	250
4-EBPF	125	125	125	250	125	250
5- (43)	25	25	25	50	50	100
6- (44)	50	50	25	100	50	100
7- (56)	25	25	25	50	50	100
8- (57)	50	100	50	>100	50	100
9- (58)	50	50	50	100	50	100
Padrão – Nistatina	1,52	3,12	3,12	3,12	1,52	3,12

Os dados tabulados nas Tabelas 33-35 (pág. 197-199), mostram os resultados das atividades antibacterianas de extratos e substâncias puras frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Das amostras testadas, o composto **(56)** apresentou os melhores CIM e CLM. Para essa substância, os resultados mais promissores estão listados a seguir: CIM e CLM = 50 $\mu\text{g/ml}$ para as bactérias *Enterococcus spp.* e *Bacillus subtilis* e CIM = 12,5 $\mu\text{g/ml}$ e CLM = 50 $\mu\text{g/ml}$ para *Salmonella typhimurium*. Outro composto, **(43)**, apresentou bastante eficiência frente as cepas analisadas com um CIM e CLM = 50 $\mu\text{g/ml}$ frente a *Burkholderia cepacia*, CIM = 12,5 $\mu\text{g/ml}$ e CLM = 50 $\mu\text{g/ml}$ para *Salmonella typhimurium*.

TABELA 35. Atividade antimicrobiana de extratos básicos substâncias isoladas da espécie *W. douradinha* em µg/ml.

Amostras	Gram-positivos							
	(B.s.)		(B.c.)		(Ecc.)		(Eb.a.)	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
1-EBSPS	>250	-	250	>250	>250	-	250	>250
2-EBCA	125	250	250	>250	125	125	250	250
3-EBPM	250	>250	250	>250	250	>250	250	>250
4-EBPF	>250	-	250	>250	250	>250	>250	-
5- (43)	50	>100	50	>100	50	100	50	>100
6- (44)	100	>100	100	>100	100	>100	100	>100
7- (56)	50	50	50	>100	50	50	50	>100
8- (57)	100	>100	100	>100	100	>100	100	>100
9- (58)	100	>100	100	>100	100	>100	100	>100
Padrão – Levofloxacina	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77

5.8 ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS COMO (+)Lanatina A (25) E Antidesmona (56)

Investigações mais profundas das propriedades antimicrobianas de uma substância, seja isolada ou sintetizada, corroboram para determinar, com maior clareza seu mecanismo de ação. Antibióticos podem agir através de uma grande variedade de mecanismos, e o conhecimento do modo de ação de um novo agente antimicrobiano é fundamental para compreender os eventos que ocorrem durante a inibição do crescimento ou morte celular bacteriana.^{86,87,88,116}

Esta questão é muito relevante para o desenvolvimento de qualquer composto anti-bacteriano de uso terapêutico. Portanto, para obter algumas informações complementares sobre o modo de ação de nossos compostos, as atividades do grupo

começaram a ser observadas sobre um outro viés que não somente a capacidade de uma substância poder inibir ou matar microrganismos em determinadas concentrações.

Nesse sentido, por quase dois anos adaptamos e padronizamos uma técnica, baseada em uma metodologia já existente,^{87,88} que permite avaliar as respostas comportamentais de nossas moléculas a partir da determinação das densidades ópticas (DO), pela medição medida da turbidez do meio de cultura, durante o crescimento microbiano na presença da droga.^{87,88} O estudo permite, após conversões dos valores de absorção, em percentual de morte celular e cálculos estatísticos, avaliar a capacidade que um potencial agente antimicrobiano possui de causar efeitos de lise da parede celular bacteriana.

A lise bacteriana se dá através da perturbação da síntese da parede celular, ou por atividade direta na membrana citoplasmática do microrganismo quando a droga possui um esqueleto químico capaz de ligar-se a certas porções ou enzimas da parede celular, impedindo sua síntese.^{87,88,116} Para isso, a atividade tem que ser realizada com a célula ainda em crescimento.^{86,87,88,116} Assim, a determinação da ação bacteriolítica de um determinado composto é uma informação muito valiosa, pois orienta-nos sobre o comportamento de um composto químico frente a um microrganismo patogênico.¹¹⁶ Para essa técnica, compara-se o composto de interesse com um padrão cuja o mecanismo lítico já seja conhecido, antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, nesse caso, a ampicilina, e um antibiótico que hája por outro mecanismo, como no caso dos antibióticos quinolônicos, a exemplo da levofloxaina. Esta última exerce um mecanismo não lítico que envolve o bloqueio de fatores metabólicos ou inibição de etapas biossintéticas chave no desenvolvimento da célula bacteriana.^{86,116,117}

Nesse contexto, o alcaloide quinolizidínico (+)Lanatina A foi escolhido para essa atividade frente a um microrganismo gram-positivo (*Enterococcus spp.* ATCC 6589) e um gram-negativo (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028). O que motivou a escolha desse composto, é o fato do mesmo ainda ser pouco conhecida em suas propriedades biológicas, uma vez que **(25)** foi isolada e identificada pela primeira vez a pouco tempo. Outros dois fatores determinantes são: sua alta concentração na espécie *L. paranensis*,

o que facilita sua obtenção e também o fato da mesma ter apresentado bons MIC e CLM para a maioria dos microrganismos testados.

Os gráficos das Figuras 100-104 (pág. 202-204) revelam o mecanismo de ação de **(25)** frente a esses dois microrganismos testados. A cepa *Enterococcus spp.* ATCC 6589 foi submetida a ação de dois controles, a Ampicilina - Lítico e Levofloxacina - não lítico, e do composto **(25)**. Para o microrganismo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 não foi possível a comparação com o controle Levofloxacina, não-lítico, devido esse não estar disponível no dia do teste.

No primeiro gráfico, Figura 100 (pág. 202), observamos que para *Enterococcus spp.*, Gram-positivo, **(25)** possui uma lise de membrana de aproximadamente 10% no tempo de 2-3 horas em concentração de 100 µg/ml, ($P < 0,0001$), após a adição da droga na placa de crescimento. As demais concentrações não atuaram de maneira lítica. Na mesma concentração, o controle Ampicilina - lítico, Figura 101 (pág. 202), atinge sua lise máxima, de aproximadamente 25%, entre 4-6 horas com ($P < 0,0001$). Uma análise relevante, nesse caso, segue que o controle demora mais tempo para fazer efeito que o composto testado. Quando se observa o decaimento da curva, espera-se que o mesmo ocorra no menor tempo possível. Assim, pode-se sugerir que (+) Lanatina A é um composto bastante promissor mesmo produzindo um efeito lítico em menor porcentagem. O controle Levofloxacina - não lítico é observado na Figura 102 (pág. 203). Olhando para esse gráfico, comprovamos a eficiência da técnica. Esse controle atua sobre outro mecanismo, e ao analisar seus valores para CIM e CLM, ambos iguais a 0,77 µg/ml, determinamos de forma consistente que **(25)** atua sobre a parede celular desse microrganismo Gram-positivo.

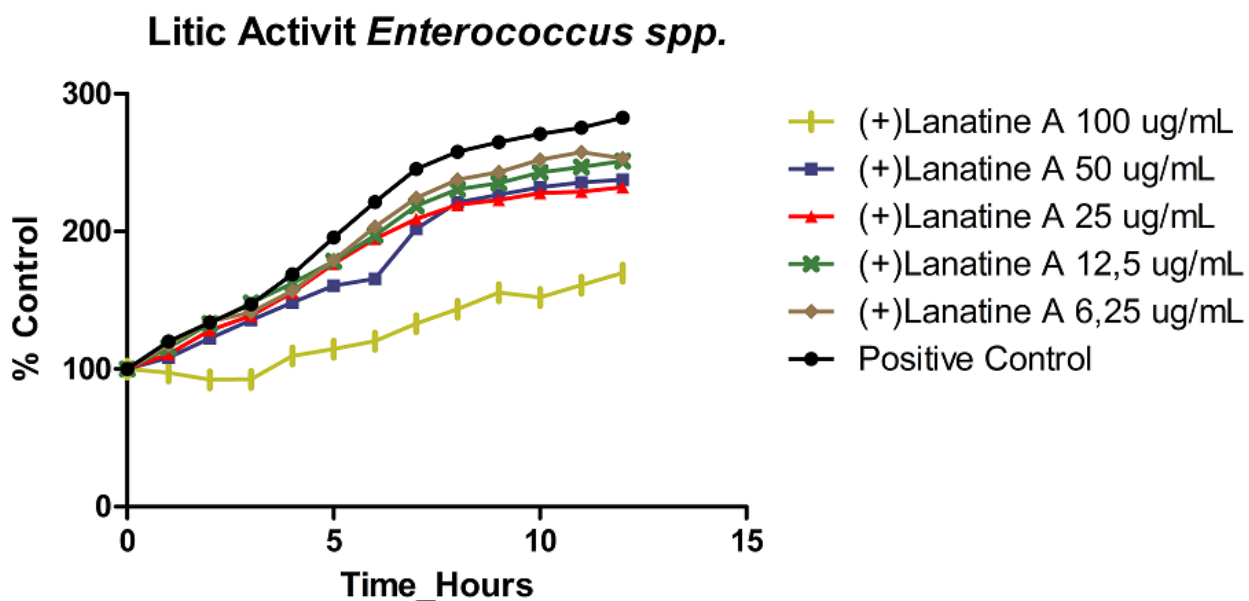


Figura 100. Atividade Bacteriolítica de (+)Lanatina A (25) em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-positivo *Enterococcus spp.* ATCC 6589.

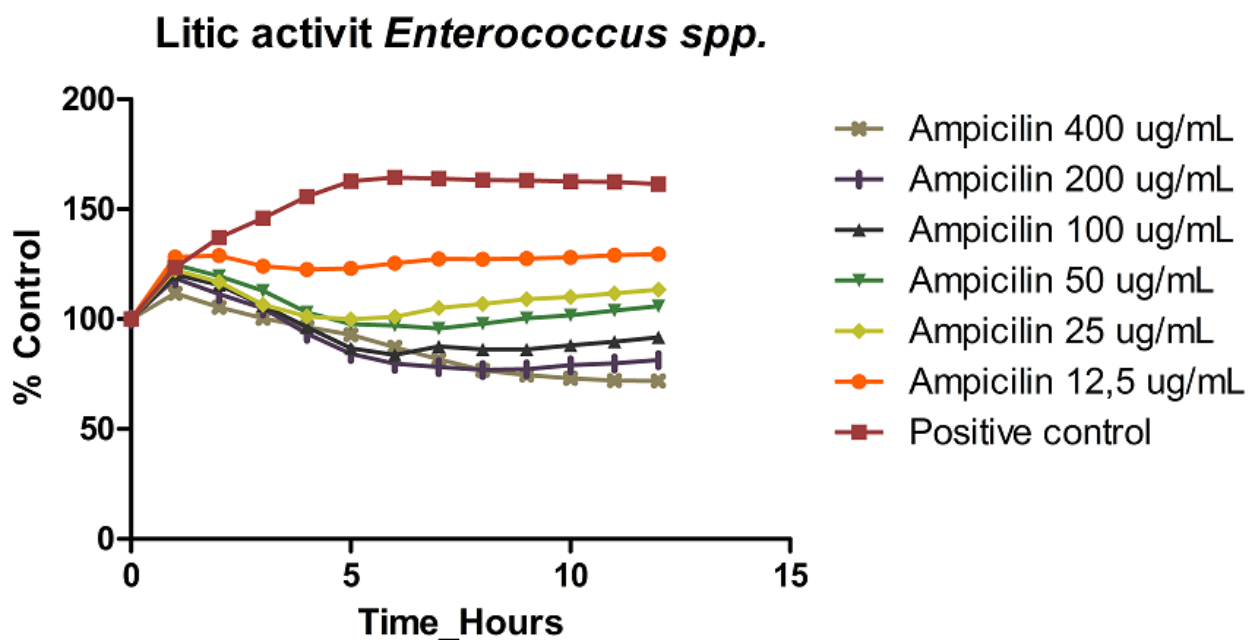


Figura 101. Atividade Bacteriolítica do controle lítico Ampicilina em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-positivo *Enterococcus spp.* ATCC 6589.

Litic activit *Enterococcus spp.*

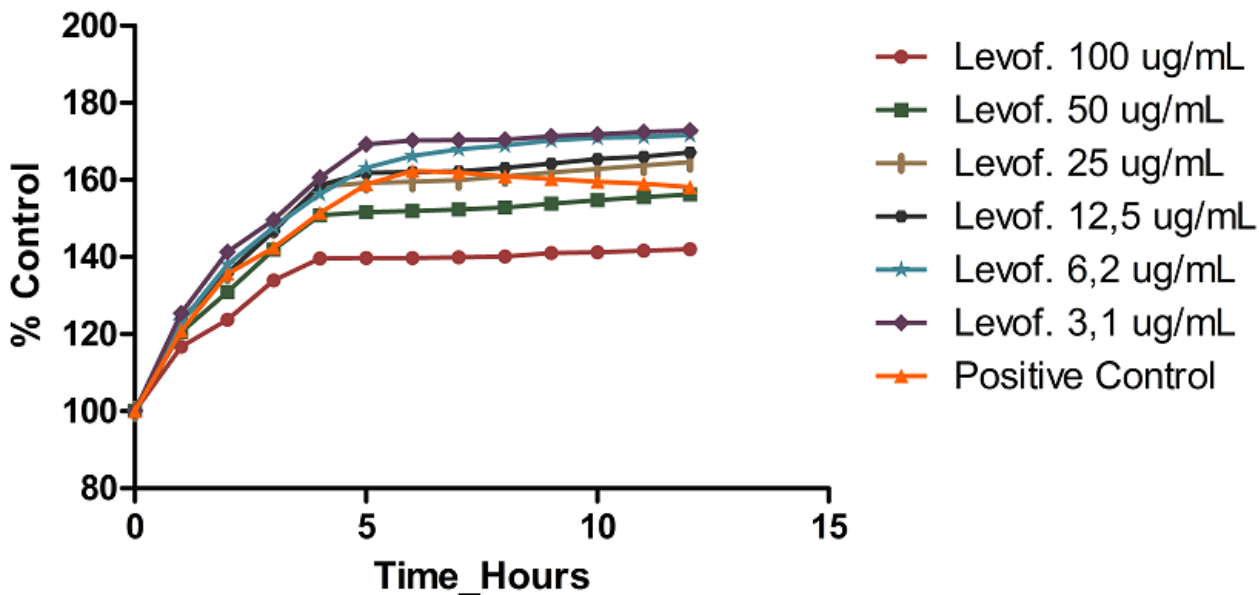


Figura 102. Atividade Bacteriolítica do controle não lítico Levofloxacina, em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-positivo *Enterococcus spp.* ATCC 6589.

Litic Activit *Salmonella typhimurium*

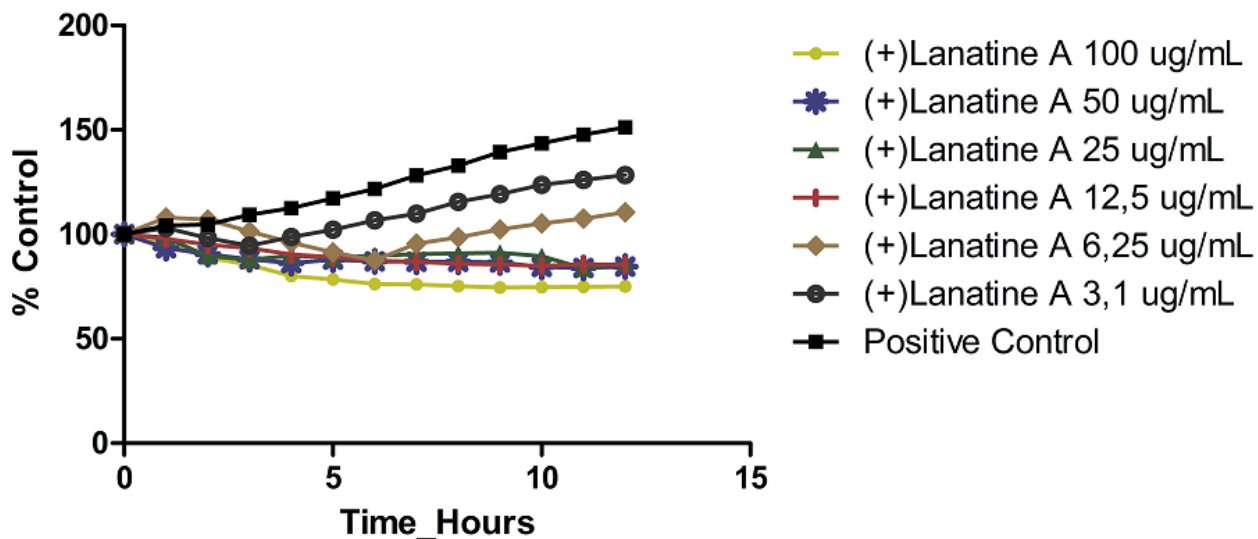


Figura 103. Atividade Bacteriolítica de (+)Lanatina A em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-negativo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

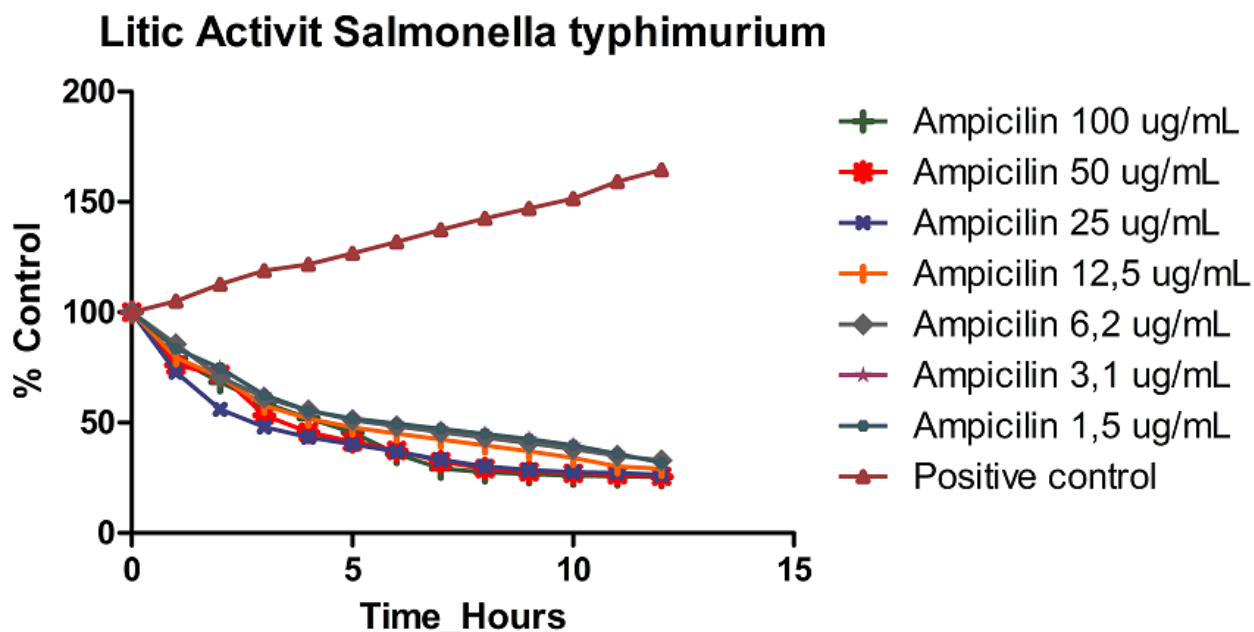


Figura 104. Atividade Bacteriolítica do controle lítico, Ampicilina, em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-negativo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Frente ao Gram-negativo *Salmonella typhimurium*, **(25)** apresentou uma lise de aproximadamente 15% entre 4-10 horas na concentração de 12,5 µg/ml, ($P < 0,0001$), mostrando-se também muito promissor como agente bacteriolítico. Para esse microrganismo o controle lítico é consideravelmente mais ativo como pode ser observado na Figura 103 (pág. 203).

Investigações do mecanismo de ação com quinolônicos e seus derivados são muito interessantes devido sua potenciais atividades antimicrobianas, relacionadas ao esqueleto químico das quinolonas. Em um trabalho de investigação de novos derivados quinolônicos realizados por Matias e colaboradore¹¹⁷, pode-se observar que dois de seus compostos mais promissores possuíam o mesmo esqueleto químico das quinolonas, porém, uma das moléculas apresentava um substituinte alquila no nitrogênio do núcleo quinolônico. Esse fator foi determinante no desenvolvimento de sua ação frente aos microrganismos testados. No que se refere ao mecanismo de ação, o composto substituído não apresentava característica bacteriolítica, em quanto o

composto sem substituinte era bacteriolítico.¹¹⁷ Nesse sentido, o composto **(56)**, por tratar-se de um metabólito dessa classe e apresentar resultados de MIC e CLM interessantes, quando comparado com os outros compostos testados, foi selecionado para a realização da atividade bacteriolítica frente a dois microrganismos, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (Gram-negativo) e *Enterococcus spp.* ATCC 6589 (Gram-positivo). Os controles utilizados foram os mesmos das análises anteriormente citadas para (+)Lanatina A. Levofloxacina e Ampicilina. Para o microrganismo *Salmonella typhimurium* não foi possível a comparação com o controle Levofloxacina, controle não-lítico, devido esse não estar disponível no dia do teste. As Figuras 105 e 106 (pág. 206), mostram os resultados das atividades bacteriolíticas do metabólito **(56)**.

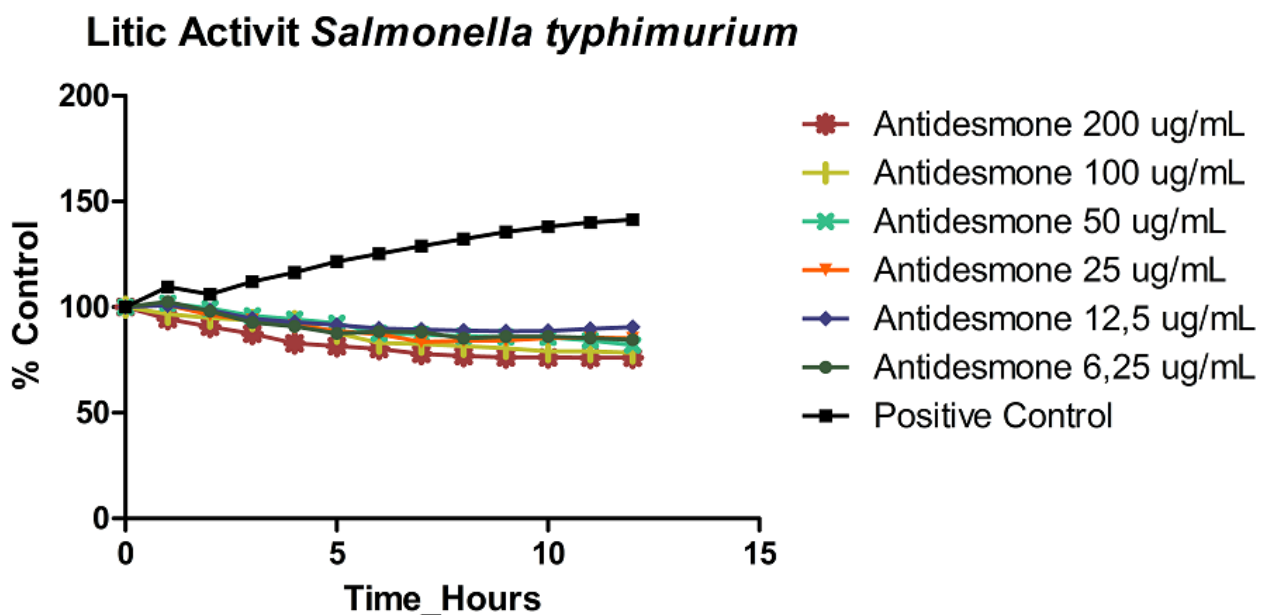


Figura 105. Atividade Bacteriolítica de Antidesmone **(56)**, em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-negativo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

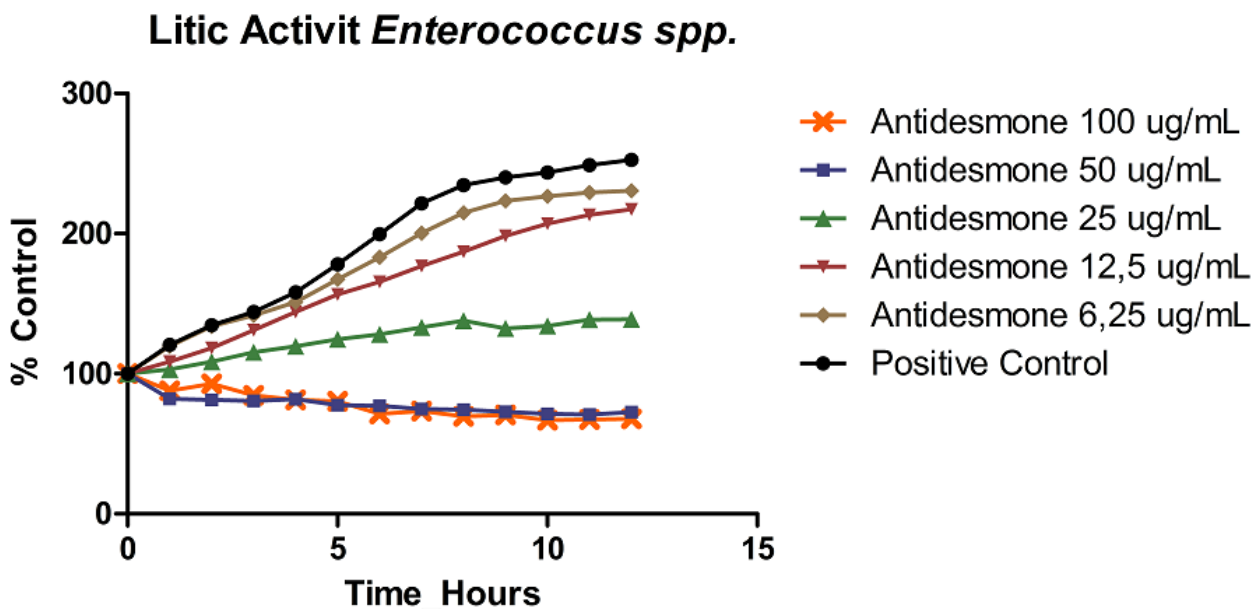


Figura 106. Atividade Bacteriolítica de Antidesmona (**56**), em diferentes concentrações frente ao microrganismo Gram-positivo *Enterococcus spp.* ATCC 6589.

No gráfico da página 205 (fig. 105), para a cepa Gram-negativa, o composto Antidesmona apresenta uma lise consistente de aproximadamente 30% com ($P < 0,0001$), sendo o maior potencial bacteriolítico no tempo de 4-6 horas até a concentração de 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Na Figura 106, é visível um rápido decaimento da curva na primeira hora do ensaio, denotando um bom potencial bacteriolítico para (**56**) nas duas concentrações iniciais, 100 e 50 $\mu\text{g/ml}$. A lise bacteriana, nesse caso, é de aproximadamente 25%, ($P < 0,001$) frente a bactéria gram-positiva *Enterococcus spp.* ATCC 6589.

5.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE A POP E DPP IV

As porcentagens de inibição observadas para as substâncias analisadas, Tabela 36, são bastante elevadas considerando a alta seletividade dessas enzimas por seus substratos. A **F. Acet. Ác. L. lanatus** apresentou um grande potencial inibidor tanto da POP quanto da enzima DPPIV. Essa fração é a mesma que demonstrou um bom potencial antimicrobiano, e dela foram isolados dois flavonoides em altas concentrações, **(52)** e F12. Olhando para a atividade de **(52)**, pode-se sugerir que o mesmo é um dos grandes responsáveis pelo bom desempenho desta fração.

Estudos já realizados com alcaloides quinolizidínicos e flavonoides da classe das flavonas, obtidos de outras espécies de Lupinos, mostram que essas substâncias são potentes hipoglicemiantes. Os resultados com a enzima POP reforçam os dados da literatura¹¹¹, principalmente quando olhamos para os compostos **(25)**, **(19)** e **(14)**.

TABELA 36. Atividade enzimática de extratos, frações e substâncias puras de espécies do gênero *Lupinus*.

Amostras	% inibição	Conc. Final		
		POP	DPPIV	
F. Acet. Ác. L. lanatus	86,67	200 µg/mL	78,65	200 µ/mL
(52)	56,79	24,6 µM	-	-
(25)	66,13	65,0 µM	-	-
(19)	56,03	72,67 µM	-	-
(14)	36,95	150 µM	-	-
Padrão Ác. Clorogênico	61,63	150 µM	-	-

5.10 ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE A *Acetil-Colinesterase*

Como frente a enzima acetil-colinesterase é considerada somente atividade inibitória acima de 30%, o único composto testado a alcançar essa concentração foi novamente o Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**). Este inibiu 49,42% da enzima no tempo de 60 minutos na concentração de 150 μ M. O resultado torna-se interessante quando comparado com o padrão, que na mesma concentração inibiu 82,73% da enzima no tempo de 60 minutos.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados do estudo químico e biológico de três espécies de *Leguminosae*, *L. lanatus*, *L. guaraniticus* e *L. paranensis* e da Família *Sterculiaceae* com a espécie *W. douradinha*, pode-se concluir que:

- Das quatro espécies avaliadas em suas constituições químicas, foram isoladas e elucidadas quatorze estruturas através da análise por técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação desses dados com a literatura. Os compostos foram identificados como: Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo, Anagirina, Hidroxianagirina, (+)13- α -hidroxilupanina, 5,6-dehidrolupanina, 13- α -tigloiloxilupanina, (+)Lanatina A e (+)Lupanina (espécies do gênero *Lupinus*); Walteriona A, Walteriona B, Antidesmona, AdoutinaY' e Waltherina-A e Waltherina-C (espécie *W. douradinha*).

- Quando avaliado o potencial da antimicrobiano de extratos básicos, e substâncias puras das quatro espécies trabalhadas, a fração acetato de etila ácida da espécie *L. lanatus* apresentou os melhores e mais constantes resultados, juntamente com um dos flavonoides isolados da mesma fração, a Flavona 8- β -C-glicosilada-citiosídeo (**52**). Essa fração ainda apresentou resultados bastante significativos frente às enzimas *POP* e *DPPIV*, sugerindo um bom potencial para transtornos neurológicos e atividade antidiabética. O metabólito (**52**), isoladamente, apresentou resultados muito promissores frente a microrganismos patogênicos e também para a enzima *POP*.

- Dados muito importantes no sentido de direcionar novas coletas para a espécie *W. douradinha* Sit. Hil., em estudos futuros, foram obtidos após analisar o perfil cromatográfico, desta por HPLC, dos extratos básicos da planta coletada em quatro regiões do estado do Rio Grande do Sul. Esta foi coletada nas cidades de São Pedro do Sul, Cruz Alta, Palmeira das Missões e Passo Fundo.

- De forma geral, o extrato bruto e frações ácidas de *L. lanatus* avaliados em seu potencial antioxidante, utilizando a técnica de DPPH, método quantitativo, mostrou-

se bastante eficiente, obtendo resultados muito constantes e próximos aos do padrão utilizado, BHT na concentração de 3,10 µg/ml, última concentração testada.

- Todas essas constatações denotam a importância de pesquisas em produtos naturais na busca por novas substâncias com potencial farmacológico. Também, análises prévias de coletas da planta em diferentes locais, tornam-se muito colaborativas na obtenção desses compostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RATES, S. M. K. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.
2. SIMÕES, M. C.; *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2002.
3. HEYWOOD, V. H. Flowering Plants of the World. London: *Batsford Ltd.* Ed., p. 335,1996.
4. GLADSTONE, J. S. Distribution, origin, taxonomy and importance. In: GLADSTONE, J. S.; ATKINS, C. A.; HAMBLIN, J. eds. Lupins as Crop Plants: *Biology, Production and utilization*. Cambridge: CAB International, p. 1-39, 1998.
5. MONTEIRO, R.; MONTEIRO, R. T. R. *Arquives Biology Tecnology*, v. 29, p. 685-694, 1986.
6. KINGHON, A. D.; RAOUF, A. H.; BALANDRIN, M. F. *Phytochemistry*, v. 27 (2), p. 439-444, 1988.
7. LEE, J. M.; *et al.* *Journal of Experimental Botany*, V. 58, (5), p. 935–946, 2007.
8. TAHARA, S.; *et al.* *Phytochemistry*, v. 36, p. 1261-1271, 1994.
9. FILHO, S. C. A. P. “Estudo Químico e Biológico em *Lupinus lanatus* Bentham (*Leguminosae-Faboideae*)”. Dissertação de mestrado submetida pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Mestre em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, outubro de 2004.
10. BALANDRIN, M. F. “Structure elucidation of some biologically active constituents of genus *Acosmium* (*Leguminosae*)”. Chicago-USA, College of Pharmacy, University of Illinois at the Medical Center, 1982, Thesis Doctor of Philosophy.

11. WILLIAMS, C. A.; DEMISSIE, A.; HARBORNE, J. B. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 11, p. 221-231, 1983.
12. SAITO, K.; *et al.* *Phytochemistry*, v. 36 (2), 309-311, 1994.
13. LÓPES, G. M. P.; *et al.* *European journal of Pharmacology*, v. 504, p. 139-142, 2004.
14. HOELZEL, S. C. da S. M. Estudo fitoquímico, morfo-hitoquímico e atividade antimicrobiana da casca da raiz de *Waltheria douradinha Saint Hilaire*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.
15. BARROSO, G. M.; *et al.* Sistemática de angiospermas do Brasil. Livros Técnicos e Científicos, Ed. USP, v. 1, p. 155, 1978.
16. CORREA, M. P. Dicionário da Plantas Úteis do Brasil e da Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, v. 2, p. 541, 1931.
17. SIMÕES, M. C.; *et al.* Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Ed. UFRGS, p. 56-57, 1986.
18. PETRUS, A. J. A. *Phytochemical Communication-fitoterapia*. v. 61:4, p. 371, 1990.
19. RAGASA, C. Y.; *et al.* *Philippine Journal of Science*, v. 126:3, p. 243-250, 1997.
20. VASQUES, C. A. R.; *et al.* *Phytoterapy Research*. v. 13, p. 312-317, 1999.
21. PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultiváveis. Rio de Janeiro: *Instituto Brasileiro de Desenvolvimento florestal*, v. 6, 1984.
22. WINK, M.; MOHAMED, G. I. A. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 897-917, 2003.
23. BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 15-100, 1991.

24. SPRENT, J. I. Kew: *Royal botanic gardens*, p. 21-44, 2000.
25. SAGEN, A. "Phytochemical and biological investigation on *Clathrotropis glaucopylla* (*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.
26. CORADIN, L. "Grupo de estudiosos das leguminosas brasileiras". In Congresso Nacional de Botânica. Ribeirão Preto. Resumos, v. 46, p. 401-403, 1995.
27. CRONQUIST, A. "An integrated system of classifications of flowering plants" New York: *Columbia University Press*, p. 1262, 1981.
28. MACIEL, H. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.152, p. 395-400, 2002.
29. BACKES, A.; NARDINO, M. Nomes Populares e Científicos de Plantas do Rio Grande do Sul, São Leopoldo: Ed. *Unisino*, p. 164, 1999.
30. PINHEIRO, M.; MIOTTO, S. T. S. Boletim do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, n 60, 2001.
31. UNKOVICH, M. J.; *et al.* *Soil Biology and Biochemistry*, v. 27, p. 585-588, 1995.
32. PIO CORRÊA, M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultiváveis. Rio de Janeiro: Instituto Baileiro de Desenvolvimento Florestal, v.6, 1984.
33. SOULELES, C. *Journal of Natural Products*, v.53, p. 1340-1341, 1990.
34. WOLDEMICHAEL, G. M.; WINK, M. *Phytochemistry*, v. 60, p. 323-327, 2002.
35. SAMUELSSON, G. *Drugs of Natural Origin – a Text Book of Pharmacognosy* Stockholm: *Swedish Pharmaceutical*, p. 372, 1992.

36. 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.
37. SGARBIERI, C. V.; GALEAZZI, M. M. A. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 26, p. 1438-1442, 1978.
38. WINK, M.; MEIBNER, C.; WITTE, L. *Phytochemistry*, v. 38, No. 1, p. 139-153, 1995.
39. WINK, M., WITTE, L. Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell cultures. p. 767-775, 1985.
40. ELMADFA. H. T.; *et al.* *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 31, p. 934-930, 1983.
41. AINOUCHE, L.; *et al.* v. 24, No. 5, p. 405-414, 1996.
42. SANCHEZ, C. M.; *et al.* *Food Chemistry*, v. 90, p. 347-355, 2005.
43. FIGUEIREDO, S. U. "Acosmium dasycarpum: Identificação de Alcalóides Quinolizidínicos por CG-EM". Tese de doutorado submetida pela Universidade Federal de São Carlos. Doutor em Ciências, área de concentração: Química Orgânica, São Carlos, SP, julho de 2009.
44. WINK, M.; HARTMANN, T. *Febs Letters*, v. 101, p. 343-346, 1979.
45. OKADA, T.; *et al.* *Plant Cell Physiol*, v. 46(1), p. 233-244, 2005.
46. SUZUKI, H.; MURAKOSHI, I.; SAITO, K. A *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, No. 22, Issue of June 3, p. 15853-15860, 1994.
47. WINK, M.; SCHOOF, G.; HARTMANN, T. *Febs Letters*, v. 115, N^o 1, p. 35-38, 1980.
48. SUZUKI, H.; *et al.* *Phytochemistry*, v. 42, N^o 6, p. 1557-1562, 1996.

49. OKADA, T.; *et al. Plant Cell Physiol*, v. 46, N^o, p. 233–244, 2005.
50. MUZQUIZ, M.; *et al. Journal of Agriculture Food Chemistry*. v. 42, p.1447-1450, 1994.
51. REINHARD, H.; *et al. Journal of Chromatography*, v. 1112 p. 353–360, 2002.
52. PORRES, M. J.; *et al. Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 55, p. 7445-7452, 2007.
53. BROOKE, P.; HARRIS, J. D.; LONGMORE, B. R. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 44, p. 2129-2133, 1996.
54. Reactivos de coloración para cromatografía em capa fina y papel. E. Merck AG, Darmstadt, Alenamina, p. 17.
55. MOHAMED, H. M.; *et al. Journal of Natural Products*, v. 53, No. 6, p. 1578-1580, 1990.
56. NETO, T. A.; *et al. Journal of Molecular Structure*, v. 1004, p. 174-177, 2011.
57. BOROWIAK, T.; *et al. Journal of Molecular Structure*, v. 442, p. 103-113, 1998.
58. MOHAMED, H. M. and HASSANEAN, A. H. *Phytochemistry*, v. 46, p. 365-369, 1997.
59. NICHOLLS, K. W.; BOHM, B. A. *Phytochemistry*, v. 18, p.1078, 1979.
60. TAHARA, S.; *et al. Phytochemistry*, v. 28, p. 901-911, 1989.
61. TAHARA, S.; IBRAHIM, R. K. *Phytochemistry*, v. 38, p. 1073-1094, 1995.
62. HOELZEL, S. C. da S. M. Estudo fitoquímico, morfo-hitoquímico e atividade antimicrobiana da casca da raiz de *Waltheria douradinha Saint Hilaire*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

63. MOREL, A. F.; *et al. Phytochemistry*, v. 66, p. 1163-1167, 2005.
64. ZUFIAURRE-GUTIÉRREZ, N. *Rev. Esp. Quimioterap.* v. 16:3, p. 232-243, 2004.
65. HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A.; *et al. Journal of Chromatography A. Review*, v. 945, p. 1-24, 2002.
66. MITSCHER, L. A. *J. Med. Pharm. Chem.* v. 5, p. 559-592, 1962.
67. JACKSON, L. C.; REYES, L. A. M.; CORDIÉS, M. L. H. *Acta Medica.* v. 8:1, p. 58-65, 1998.
68. WERNY, F.; SCHEUER, P. J. *Tetrahedron.* v. 19, p. 1293-1305, 1963.
69. KOSTOVA, I.; *et al. Monatshefte für Chemie Chemical Monthly.* v. 130, p. 703-707, 1999.
70. TOUATI, D.; ATTA-UR-RAHAMAN; ULUBELEN, A. *Phytochemistry*, v.53:2, p. 277-279, 2000.
71. KAPADIA, G. J.; *et al. J. Am. Chem. Soc.* V. 97:23, p. 6814, 1975.
72. KAPADIA, G. J.; SHUKLA, Y. N.; BASK, S. P. *Tetrahedron.* V. 36, p. 2441-2447, 1980.
73. MOREL, A. F.; *et al. Phytochemistry*, v. 47:1, p. 125, 1998.
74. MOREL, A. F.; *et al. Phytochemistry*, v. 51, p. 473-477, 1999.
75. MOREL, A. F.; *et al. Tetrahedron Letters*, v. 40, p. 9205-9209, 1999.
76. BHAKUNI, R. S.; SHUKLA, Y. N.; THAKUR, R. S. *Phytochemistry*, v. 26:1, p. 324-325, 1987.

77. GOURNÉLIS, D. C.; LASKARIA, G. G.; VERPOORT, R. *Nat. Prod. Rep.* v. 14:1, 75-82, 1997.
78. TSCHESCHE, R.; KAUSSMAN, E. U.; ECKHARDT, G. *Tetrahedron Lett.* v. 28, p. 2577, 1973.
79. SIERRA, M. G.; *et al.* *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* p. 915, 1972.
80. MASCARETTI, O. A.; *et al.* *Phytochemistry*, v. 11, p. 1133, 1972.
81. MOREL, A. F.; *et al.* *Phytochemistry*, v. 18, p. 473, 1979.
82. 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.
83. 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.
84. HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *Journal of applied of food Microbiology*, v. 94, p. 223-253, 2004.
85. MUÑOZ, E.; *et al.*, Elsevier, Amsterdam, 1972.
86. KOROLKOVAS, A.; BURCKAHALTER, H. J.; "Química Farmacêutica" p. 607-609, 1982.
87. LEHTINEN, J.; *et al.* *J. Microbiol Methods.* v. 66, p. 381-389, 2006.
88. CALVO, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 27 p. 44-52, 2009.
89. MOLYNEUX, P. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, v. 26:2, p. 211-219, 2003.

90. ÇAKIR, A.; *et al. Turkey J. Chem.*, v. 30:1, 2006.
91. ABDALLA, D. S. L.; Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Ateneu, p. 574, 2003.
92. MAES, M.; BONACCORSO, S. *Acta Psychiatr. Scand.*, v. 109, p.126, 2004.
93. MECCA, T.; *et al. Bioorg. Med. Chem.* v. 12, p.5057, 2004.
94. VENÄLÄINEN, J.; *et al. Biochem. J*, v. 382, p. 1003, 2004.
95. SENTANDREU, M. A.; TOLDRÁ, F. *Food Chem.*, v. 75, p. 159, 2001.
96. IDRIS, I.; DONNELLY, R. *Diabetes, Obes. Metab.*, v. 9, p. 153, 2007.
97. WEBER, A. E. *J. Med. Chem.*, v. 47, p. 4135, 2004.
98. ROSENBLUM, J. S.; KOZARICH, J. W.; *Curr. Op. Chem. Biol.*, v. 7, p. 496, 2003.
99. TARRAGÓ, T.; *et al. Chem. Bio. Chem.*, v. 7, p. 827, 2006.
100. SHARAF, M.; *et al. Phytochemistry*, v. 44, p.533-536, 1997.
101. TAHARA, S.; *et al. Phytochemistry*, v. 23, p. 1889-1900, 1984.
102. 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.
103. BROOKE, P.; HARRIS, J. D.; LONGMORE, B. L. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 44, p.2129-2133, 1996.

104. BRUKWICK, T.; WŁODARCZAK, J.; WYSOCKA, W. *Journal of Molecular Structure*, v. 928, p. 189–194, 2009.
105. WYSOCKA, W., BRUKWICKI, T. *Journal of Molecular Structure*, v. 385, p. 23-33, 1996.
106. HATZOLD, T.; *et al.* *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 31, p. 934-930, 1983.
107. WIEWIOROWSKI, M. D.; WIEWIOROWSKA, M.; REIFER, I. Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, *Series des Sciences Chimiques*, v. 11(11), p. 629-636, 1963.
108. WIEWIOROWSKI, M. D.; BRATEK, M. D. de l'Academie Polonaise des Sciences, *Serie des Sciences Biologiques*, v. 10, p. 349-55, 1962.
109. MOHAMED, H. M.; *et al.* *Jormral of Ndural Products*, V.53, n. 6, p. 1578-1580, 1990.
110. GANZERAA, M.; KRÜGERA, A.; WINK, M.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, p. 1231–1235, v. 2010.
111. LÓPEZ, G. m. P.; *et al.* *European Journal of Pharmacology*, v. 504 p. 139– 142, 2004.
112. PRZYBY, K. A.; KUBICKI, M. *Tetrahedron*, v. 65, p. 3454–3458, 2009.
113. MICHAEL P. J. Previous review: *Nat. Prod. Rep.*, v. 20, p. 458, 2003.
114. GEHRKE, S. T. I. Alcaloides Ciclopeptídicos Isolados de *Waltheria Douradinha* (*Sterculiaceae*). Dissertação de Mastrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1998.
115. SANTOS, R. I. C-glicosilflavonas em espécies de *Cucurbitaceae* conhecidas popularmente como taiuiá. Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1989. Dissertação de Mestrado.

116. TENOVER, F. C. *Am. J. Med.* v.119, p.3-10, 2006.
117. MATIAS, D. Ferretti A.; *et al. European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 81, p. 253-266, 2014.