

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO EM *LUPINUS LANATUS* BENTHAM
(LEGUMINOSAE – FABOIDEAE)**

Porto Alegre, Outubro de 2004.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO EM *LUPINUS LANATUS* BENTHAM
(LEGUMINOSAE – FABOIDEAE)**

Dissertação apresentada por **Paulo Artur Coelho de Souza Filho** visando a obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo S. Zuanazzi

Porto Alegre, Outubro de 2004.



***LUPINUS LANATUS* BENTH. EM SEU HABITAT NATURAL .**

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação do prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi no Laboratório de Fitoquímica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e colaboração da MSc. Mardiore Pinheiro dos Santos. Os experimentos biológicos foram realizados com a colaboração dos professores Dr. Enilson Saccol de Sá no Laboratório de Ciências do Solo Faculdade de Agronomia (UFRGS) e Dr. José Carlos Germani, laboratório Tecnologia Bioquímica, Faculdade de Farmácia (UFRGS).

*“Café para louco não
precisa de muito açúcar”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe pelo carinho, apoio e conforto em todos os momentos difíceis da minha vida e principalmente, pela sua dedicação e incentivo.

As minhas queridas irmãs e sobrinhos, pela paciência e compreensão.

A Fundação de Amparo a Pesquisa Agropecuária (Fepagro) que por intermédio da pesquisadora Eliane Banguel, gentilmente cedeu as cepas de *Bradyrhizobium*.

A botânica MSc. Mardiore Pinheiro pela colaboração e identificação do vegetal.

Ao pessoal do Instituto de Química da UFRGS, Pablo e Everton pelos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Ademir Morel da UFSM e sua mestranda Graciela pela obtenção e auxílio nos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Enílson Saccol de Sá da Faculdade de Agronomia da UFRGS e seus orientados Carlos e Jonatan e o funcionário Márcio, pelo auxílio e orientação no desenvolvimento dos testes microbiológicos.

Ao Prof. Dr. José Carlos Germani pelo apoio e ensinamentos, e que gentilmente cedeu seu laboratório para o desenvolvimento de parte do trabalho.

Agradeço aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas desta Universidade.

Ao pessoal de Cachoeira, Luciano, Mário, Tiago, Lisandro, Pedro e J. Patrício, pela profunda amizade e companheirismo de longa data.

Aos “vizinhos” Alexandre Ferraz, Ana Paula, Carolina, Daniela Albring e Ana Cristina, pelas “xícaras de açúcar” e descontraídas conversas.

Ao “cumpadre” Rodigo Dall’Agnol, pelas dicas e cafezinhos nas horas de intervalo.

Ao grande amigo MSc. Arno Hofmann, em parte culpado por isto tudo...

Ao Vinícius “Galo” Dorneles, que não era um bolsista, e sim um grande pesquisador me auxiliando.

Aos grandes colegas do laboratório Nael, Rogério, Tati, Camila, Marina, Jean, Dudu, Rafaela, Carol, Guilherme, Ana Arigony, Melissa e Ana Aboy, que em muitas vezes, discutíamos em conjunto o trabalho. A todos um grande abraço.

As colegas, que como eu, são jurássicos da farmacognosia: Fabi e Claudinha, muito obrigado pela amizade.

A Miriam e ao Roger, pela paciência, esclarecimentos e auxílio nos testes microbiológicos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi, que desde a graduação vem acompanhando e auxiliando o desenvolvimento acadêmico. Obrigado pelas dicas, auxílios, discussões e claro pelas coletas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ : Deslocamento químico

BuOH: Butanol

CC: Cromatografia em Coluna

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CDCl_3 : Clorofórmio deuterado

CH_2Cl_2 : Diclorometano

CHCl_3 : Clorofórmio

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLV: Cromatografia Líquida à Vácuo

DEPT: Realce não distorcido por transferência de polarização

DMSO: Dimetil sulfóxido

DMSO- d_6 : Dimetil sulfóxido deuterado

DPPH: 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio

HPTLC: Cromatografia em camada delgada de alta eficiência

J : Constante de acoplamento

MeOH: Metanol

MIC: Concentração Inibitória Mínima

Rf: Fator de retenção em cromatografia

RMN ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13

RMN ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TFA: Ácido trifluoroacético

tr:

Tempo

de

retenção

Dissertação apresentada por Paulo Artur Coelho de Souza Filho no dia 29 de outubro de 2004 na Faculdade de Farmácia – UFRGS - para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sendo a banca examinadora constituída por

Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber
Departamento de Farmácia – UFPR

Prof. Dr. Miguel Dall’Agnol
Faculdade de Agronomia – UFRGS

Prof^a. Dr^a. Gilsane Von Poser
Faculdade de Farmácia – UFRGS

S729e Souza Filho, Paulo Artur Coelho de
Estudo químico e biológico em *Lupinus lanatus* Bentham
(Leguminosae-Faboideae)/ Paulo Artur Coelho de Souza Filho – Porto
Alegre: UFRGS, 2004. – vi, 100p.; il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Leguminosae. 2. *Lupinus lanatus*. 3. Flavonóides. 4. Atividade
antimicrobiana. 5. Atividade antioxidante. I. Zuanazzi, José Ângelo
Silveira. II. Título.

CDU: 547.972.2:582.736

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro F. Ferreira – CRB 10/480

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Flavonóides	5
2.2 Família Leguminosae	8
2.3 O gênero <i>Lupinus</i> L.....	9
2.3.1 Utilização do gênero <i>Lupinus</i>	11
2.3.2 Metabólitos secundários de ocorrência no gênero <i>Lupinus</i>	11
2.3.3 Flavonóides de ocorrência no gênero <i>Lupinus</i>	13
2.4 <i>Lupinus lanatus</i> Benth.....	15
2.5 Simbiose Leguminosae- <i>Rhizobium</i>	16
2.5.1 Flavonóides na simbiose Leguminosae- <i>Rhizobium</i>	18
2.6 O sistema de defesa do vegetal	19
2.6.1 Flavonóides e o sistema de defesa do vegetal.....	23
2.7 Considerações finais da revisão bibliográfica.....	23
3 Objetivos	25
4 Materiais e métodos	27
4.1 Solventes e Reagentes	28
4.2 Equipamentos	29
4.2.1 Espectroscopia no Ultravioleta	29
4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	29
4.2.3 Espectrometria de Massas	29
4.2.4 Espectroscopia de RMN ¹ H e RMN ¹³ C.....	30
4.3 Coleta do vegetal	30
4.4 Extração dos compostos fenólicos	30
4.5 Análise por cromatografia em camada delgada das frações diclorometano e folha lavada.....	32
4.6 Isolamento dos compostos fenólicos.....	32
4.6.1 Flores extrato butanólico	32
4.6.2 Folha lavada.....	32
4.6.3 Raízes extrato diclorometano	33
4.6.4 Nódulos extrato diclorometano.....	33
4.6.5 Folhas extrato butanólico	33
4.6.6 Precipitado LLFBP	34
4.6.7 Folha extrato diclorometano	34
4.7 Determinação dos açúcares por cromatografia em camada delgada.....	35
4.8 Cromatografia em camada delgada de LL1, LL10 e extratos butanólicos.....	35
4.9 Cromatografia em camada delgada de LL11 e extratos diclorometano.....	35
4.10 Determinação da atividade antimicrobiana.....	35
4.10.1 Atividade antibacteriana	36
4.10.2 Atividade antifúngica	37
4.11 Determinação da atividade antioxidante.....	37
5 Resultados	38

5.1	Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos diclorometano e folha lavada.....	40
5.2	Identificação da substância LL1	40
5.2.1	Espectroscopia na Região do Ultravioleta da substância LL1	40
5.2.2	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹ H da substância LL1	41
5.2.3	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C da substância LL1.....	41
5.2.4	Análise por Espectrometria de Massas da substância LL1	42
5.3	Identificação da substância LL7	43
5.3.1	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹ H da substância LL7	44
5.3.2	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C da substância LL7.....	44
5.4	Identificação da substância LL8	45
5.4.1	Espectroscopia na Região do Ultravioleta da substância LL8.....	46
5.4.2	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹ H da substância LL8	46
5.4.3	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C da substância LL8.....	46
5.5	Identificação da substância LL9	47
5.6	Identificação da substância LL10	48
5.6.1	Espectroscopia na Região do Ultravioleta da substância LL10.....	48
5.6.2	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹ H da substância LL10	49
5.6.3	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C da substância LL10	49
5.6.4	Análise por Espectrometria de Massas da substância LL10	49
5.7	Identificação da substância LL11	50
5.7.1	Espectroscopia na Região do Ultravioleta da substância LL11	50
5.7.2	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹ H da substância LL11	51
5.7.3	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C da substância LL11	52
5.7.4	Análise por Espectrometria de Massas da substância LL11	52
5.8	Determinação dos açúcares por cromatografia em camada delgada	53
5.9	Cromatografia em camada delgada de LL1, LL10 e extratos butanólicos	53
5.10	Cromatografia em camada delgada de LL11 e extratos diclorometano.....	54
5.11	Avaliação da atividade antimicrobiana de LL1, LL10 e LL11.....	54
5.12	Avaliação da atividade antioxidante de LL1, LL10, LL11 e fração diclorometano nódulos	54
6	Discussão.....	56
7	Conclusão	63
8	Referências Bibliográficas	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração	5
Figura 2: Núcleo fundamental das chalconas e sua numeração	6
Figura 3: Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides	7
Figura 4: Representação esquemática da biossíntese dos isoflavonóides	8
Figura 5: Núcleos de alcalóides de <i>Lupinus</i>	12
Figura 6: Flavanonas e isoflavonas preniladas de ocorrência em <i>Lupinus</i>	13
Figura 7: Representação esquemática da provável biossíntese dos flavonóides complexos em <i>Lupinus</i>	14
Figura 8: Esquema de prenilação em isoflavona	15
Figura 9: Estrutura de fitoalexinas e fitoanticipinas provenientes do metabolismo secundário	21
Figura 10: Estrutura do octacicloenxofre	22
Figura 11: Isoflavonóides da sub-Família Faboideae	23
Figura 12: Esquema de obtenção dos extratos	31
Figura 13: Deslocamentos na região do UV para LL1	41
Figura 14: Estrutura proposta para LL1	43
Figura 15: Parte da estrutura proposta para LL7	45
Figura 16: Estrutura proposta para LL8	47
Figura 17: Deslocamentos na região do UV para LL10	48
Figura 18: Estrutura proposta para LL10	50
Figura 19: Deslocamentos na região do UV para LL11	51
Figura 20: Estrutura proposta para LL11	53
Figura 21: Cromatoplaça da atividade antioxidante dos isolados e extrato diclorometano nódulos pelo método DPPH	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Flavonóides indutores dos genes <i>nod</i> (hospedeiro x simbiote)	18
Tabela 2: Distribuição de flavonóides e alcalóides em <i>Lupinus</i>	24
Tabela 3: Gradiente utilizado em CLAE	29
Tabela 4: Denominação dada aos extratos obtidos	31
Tabela 5: Massa das partes do vegetal.....	39
Tabela 6: Massa obtida de isolados	39
Tabela 7: Deslocamentos químicos no espectro de RMN ¹ H para LL1 comparados com a literatura.....	43
Tabela 8: Deslocamentos químicos no espectro de RMN ¹³ C para 8-β-C-glicose comparados com a literatura.....	43
Tabela 9: Deslocamentos químicos no espectro de RMN ¹ H para LL7 comparados com a literatura.....	44
Tabela 10: Deslocamentos químicos no espectro de RMN ¹³ C para LL7 comparados com a literatura.....	45
Tabela 11: Deslocamentos químicos no espectro de RMN ¹³ C para LL8 comparados com a literatura.....	47
Tabela 12: Perfil por CCD dos isolados LL1 e LL10 frente os extratos butanólicos e precipitados.....	53
Tabela 13: Atividade antimicrobiana dos isolados LL1, LL10 e LL11.....	54

RESUMO

Flavonóides são compostos fenólicos de ampla ocorrência na natureza exercendo diversas funções fisiológicas nos vegetais. Na família Leguminosae estes metabólitos secundários exercem o papel de antimicrobianos (fitoalexina e/ou fitoanticipinas) e como moléculas sinalizadoras, na simbiose com bactérias do solo no processo de fixação biológica do Nitrogênio. O gênero *Lupinus*, pertencente a esta família, é encontrado em todas as regiões fisiográficas do estado do Rio Grande do Sul. Entretanto, não existem relatos de estudos químicos ou microbiológicos. Neste trabalho, foi analisado o perfil químico de folhas, flores, raízes, nódulos e legumes da espécie *Lupinus lanatus*. Foram isolados oito compostos fenólicos, dois deles não foram identificados devido ao baixo rendimento, um derivado do ácido cafeico isolado a partir das raízes teve sua estrutura parcialmente identificada. Quatro flavonóides tiveram suas estruturas elucidadas por métodos espectroscópicos e espectrométricos; três flavonas-C-glicosiladas: citisosídeo a partir das flores e folhas, ramosil-O-vitexina e ramosil-O-citisosídeo, a partir das folhas; e a isoflavona angustona A, a partir dos nódulos. Foi analisada a atividade antimicrobiana das flavonas pelo método da bioautografia frente a *Bradyrhizobium* sp. e *Agrobacterium* sp., microrganismos simbiote e patógeno, respectivamente, sendo que nenhum metabólito obteve resultado positivo, entretanto quando analisados pelo mesmo método frente a *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* o resultado foi positivo para ramosil-O-vitexina. Foi avaliada a atividade antioxidante pelo método da DPPH para as flavonas, onde citisosídeo obteve resultado positivo.

Palavras-chave: Leguminosae, *Lupinus lanatus*, flavonóides, antimicrobiano, antioxidante.

ABSTRACT

Flavonoids are widespread natural phenolics responsible for several physiological functions in plants. In family Leguminosae such compounds are remarkable for their role as antimicrobians (phytoalexin and/or, phytoanticipin) and as signal molecules for symbiosis between plants and soil bacteria during nitrogen fixation process. The genus *Lupinus* belongs to this family, occurring in all phytogeographic regions of Rio Grande do Sul. However, there are no reports of chemical or microbiological studies on *Lupinus*. The present work shows the chemical profile of leaves, flowers, roots, nodules and pods of the species *Lupinus lanatus*. Eight phenolic compounds were isolated, two of them could not be identified due to their low yield and a caffeic acid derivative was partially elucidated. Four flavonoids were characterized by spectroscopic methods; three C-glycosilated flavones: citysosite from flowers and leaves, rhamnosyl-O-vitexin and rhamnosyl-O-citysosite from leaves, and isoflavone angustone A from nodules. Antimicrobial activity of flavones was analyzed by the bioautographic method against *Bradyrhizobium* sp. and *Agrobacterium* sp., symbiotic and pathogen microorganisms, respectively. None of the metabolites showed positive results. Nevertheless, antimicrobial activity was observed for ramosil-O-vitexin against *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* when tested by the same methodology. Antioxidant activity of flavones was evaluated by DPPH assay, showing a positive result for citysosite.

Key words: Leguminosae, *Lupinus lanatus*, flavonoids, antimicrobial, antioxidant.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Flavonóides são compostos fenólicos de ampla ocorrência entre os vegetais com diversas funções fisiológicas, podendo ser citadas proteção contra raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, atrator de animais com finalidade polinizadora, antioxidante, agente alelopático, controlador do crescimento e desenvolvimento do vegetal (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Em plantas da família Leguminosae (Fabaceae) estes metabólitos secundários atuam no sistema de defesa do vegetal contra fitopatógenos, podendo ocorrer de maneira constitutiva ou serem formados em resposta a uma situação de estresse (DIXON e FERREIRA, 2002).

De uma maneira contrastante, nesta mesma família, exercem o papel de moléculas sinalizadoras, agindo como quimioatraentes de bactérias do gênero *Rhizobium*. A bactéria infecta a raiz do vegetal, o que resulta na formação de um nódulo, órgão altamente especializado no qual ocorre a fixação biológica do nitrogênio (HUNGRIA, 1994). Esta simbiose é caracterizada pela especificidade, pois cada espécie de rizóbio é capaz de nodular em geral um número limitado de espécies desta família (ZAAT *et al.*, 1988).

As Leguminosae são, depois das Gramineae, a família de plantas mais úteis para o homem (LÉON, 1987). No Brasil as culturas de feijão, soja e amendoim respondem por 52,8 % da área plantada de grãos (safra 2002/2003) (CONAB, 2004). A fixação biológica do nitrogênio possibilita a redução de fertilizantes nitrogenados nas lavouras (HUNGRIA e CAMPOS, 2003). A descoberta de novas estruturas ativas e o conhecimento do sistema de defesa da planta podem conduzir a uma efetiva proteção contra patógenos (BAKER *et al.*, 1997).

Considerando o exposto e, tendo ainda a riqueza de estruturas (HEGNAUER e GRAYER-BARKMEIJER, 1993) e as funções fisiológicas contrastantes que esta classe de metabólito secundário desenvolve em plantas da família Leguminosae, considera-se relevante um estudo fitoquímico em *Lupinus lanatus* Benth., uma espécie de Leguminosae nativa do Estado do Rio Grande do Sul, ainda não analisada quimicamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi realizada nas seguintes bases de dados: CAB ABSTRACTS (1990/2003-7), www.sciencedirect.com (1945-2004), BIOLOGICAL ABSTRACTS (1998/01-2003/12), WEB OF SCIENCE, MEDLINE (1993-2004), AGRICOLA: AGRICULTURAL ON LINE ACCESS, <http://pubs.acs.org/> (1980-2004/06). Em nenhuma destas bases de dados foram encontrados estudos fitoquímicos referentes a *Lupinus lanatus*.

A presente revisão bibliográfica está baseada na biossíntese de flavonóides na família Leguminosae, bem como papel contrastante que estes metabólitos exercem na interação planta-microrganismos, tendo como finalidades dar prosseguimento aos estudos realizados por ZUANAZZI (1994), MACHADO (1999) e CASTILHOS (2002) e como base para futuros estudos pelo grupo dentro de espécies desta família.

2.1 Flavonóides

Flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam por apresentarem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituídos de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, com as unidades recebendo denominação e numeração conforme descrito na **Figura 1** (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). Os flavonóides diferem em seus substituintes (na maioria das vezes grupamentos hidroxila ou metoxila) e na natureza da posição do açúcar ligado a aglicona, podendo ocorrer na forma de O-glicosídeo ou C-glicosídeo (SAMUELSSON, 1992).

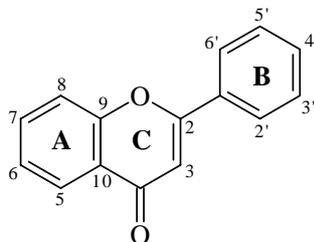


Figura 1: Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.

Estes metabólitos secundários são formados pela combinação de duas rotas biossintéticas, a do acetato, que origina o anel A com a do ácido chiquímico, que origina o anel B e os três carbonos que ligam os dois anéis originam-se do fosfoenol piruvato (SAMUELSSON, 1992).

A chalcona (**Figura 2**) é o metabólito precursor formado na rota de biossíntese de flavonóides e as enzimas pertencentes a elaboração das estruturas estão divididas em 3 importantes classes: as dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato; as hidroxilases do citocromo P450; e redutases dependentes de NADPH, **Figura 3** (DIXON e STEELE, 1999).

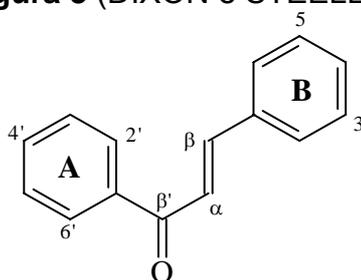


Figura 2: Núcleo fundamental das chalconas. Sua numeração é diferente dos demais flavonóides. Isto se deve ao fato que as primeiras chalconas identificadas foram classificadas inicialmente como acetofenonas (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003)

Em vegetais não pertencentes à família Leguminosae, a enzima CHI (chalcona isomerase) isomeriza somente 6'-hidroxichalcona a 5-hidroxi-flavanona (CHI com esta função é referida como do tipo I), entretanto em Leguminosae, CHI converte tanto 6'-desoxichalcona e 6'-hidroxichalcona em 5-desoxiflavanona e 5-hidroxi-flavanona, respectivamente (referida como tipo II) (SHIMADA *et al.*, 2003).

Os isoflavonóides são formados por uma ramificação da rota biossintética dos flavonóides, originários de uma flavanona intermediária central que é ubiquamente presente em plantas (**Figura 4**). Na biossíntese dos isoflavonóides primeiramente a flavanona perde o hidrogênio da posição C-3, seguido de uma migração do anel B de C-2 para C-3 e subsequente hidroxilação da posição C-2. Esta reação requer NADPH e oxigênio molecular

e é catalisada pela enzima isoflavona sintase que consiste de 2-hidroxisoflavanona sintase (2-HIS) e 2-hidroxisoflavanona desidratase (DIXON e STEELE, 1999; DIXON e FERREIRA, 2002).

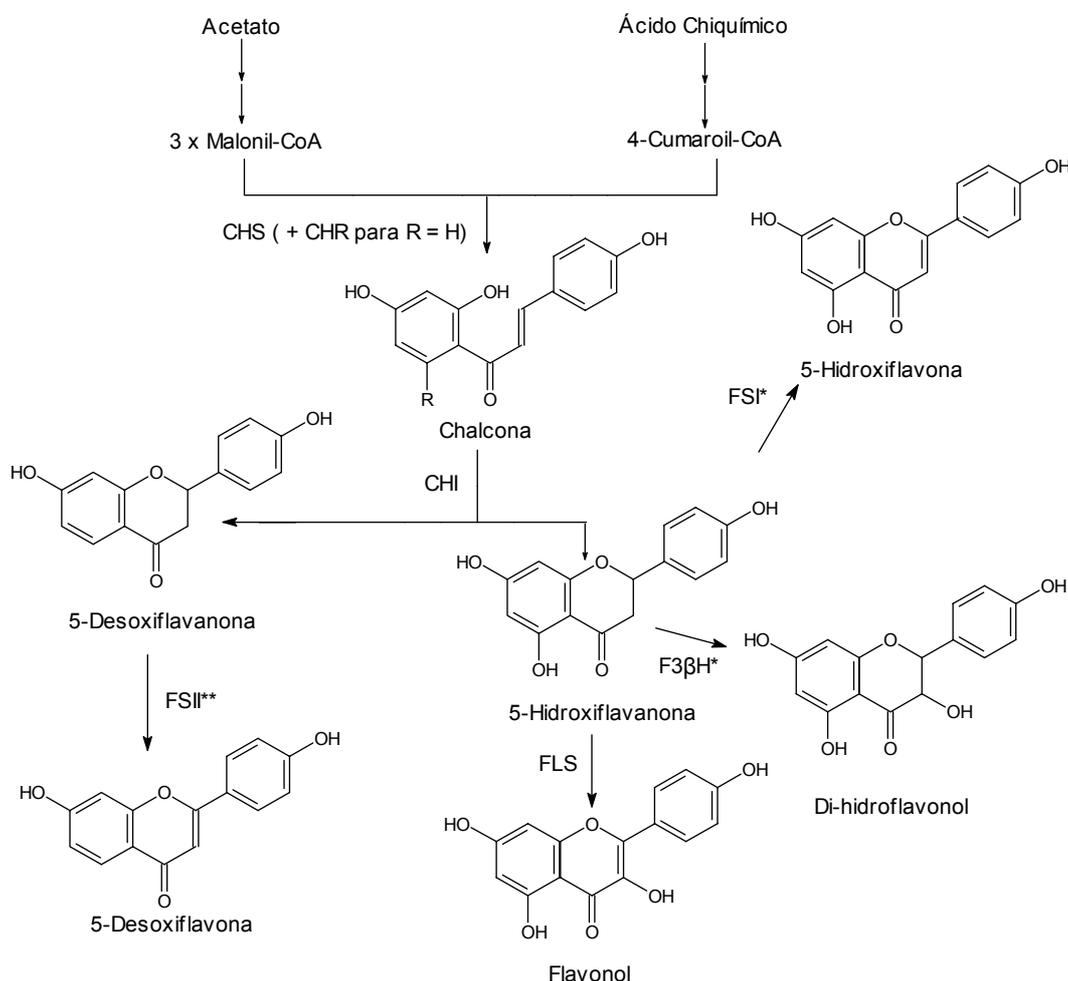


Figura 3: Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides. As enzimas são: FSI, flavona sintase I; F3βH, flavanona 3β hidroxilase; FLS, flavonol sintase; CHI, chalcona isomerase; FSI, flavona sintase II. *dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato, ** hidroxilases do citocromo P450.

Ao contrário dos flavonóides, os isoflavonóides têm distribuição taxonômica restrita. Salvo raríssimas exceções, são de ocorrência exclusiva em Leguminosae (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). Apenas 33 gêneros em 20 famílias de não-Leguminosae, são conhecidos por conter tais metabólitos (IBRAHIM e TAHARA, 1994). Todavia, formam uma grande e ampla subclasse

dentro da família dos flavonóides com grande variedade de estruturas encontradas na natureza (BOLAND e DONNELLY, 1998).

A 4'-O-metilação do anel B dos isoflavonóides ocorre em alfafa, ervilha e outras Leguminosae, porém está ausente em feijão e soja (DIXON e STEELE, 1999) e cerca de 60% das isoflavonas desta família são do tipo 5-desoxi (TAHARA e IBRAHIM, 1995).

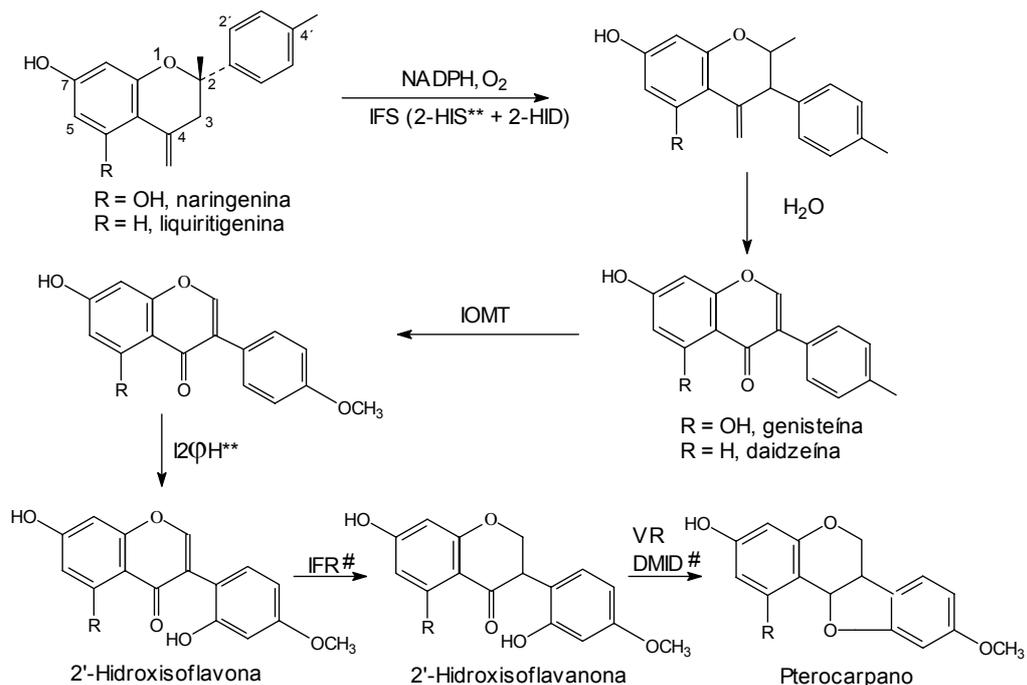


Figura 4: Representação esquemática da biossíntese dos isoflavonóides a partir de uma flavanona. Enzima IFS: isoflavona sintase (consiste em 2-HIS, 2-hidroxisoflavona sintase; 2-HID, 2-hidroxisoflavona desidratase); IOMT, isoflavona O-metiltransferase; I2(OH)**, isoflavona 2'φ hidroxilase; IFR#, isoflavona redutase; VR, vestitona redutase; DMID#, 7,2'-di-hidroxi-4'-metoxisoflavanol desidratase. ** hidroxilase do citocromo P450, # redutase dependente de NADPH.

2.2 Família Leguminosae

A família Leguminosae ou Fabaceae é uma ampla família de ervas, arbustos e árvores com uma grande variedade de habitats, incluindo aquáticas, xerófitas e trepadeiras (HEYWOOD, 1996). São depois das Gramineae, a família de plantas mais úteis para o homem, por ser fonte de

proteínas em suas sementes e folhas (LÉON, 1987). É representada por 18.000 espécies distribuídas em 650 gêneros (BARROSO, 1991).

Está dividida em três subfamílias, *Caesalpinioideae* contendo 152 gêneros sendo 4 cultivados e 2.800 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais; *Mimosoideae* contendo 50-60 gêneros sendo 2 gêneros cultivados, 2.800 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e cálido-temperadas; e *Faboideae* (ou *Papilionoideae*) contendo 482 gêneros sendo 19 cultivados e 12.000 espécies, sendo as herbáceas difundidas nas regiões temperadas, ao passo que as espécies lenhosas são mais representadas nas regiões tropicais. Essa subfamília abrange espécies com características consideradas mais avançadas dentro das Leguminosae (BARROSO, 1991).

Dentro das *Caesalpinioideae*, somente oito gêneros são conhecidos por formar nódulos, sendo todos representantes árvores. Entre as *Mimosoideae*, todas as tribos possuem representantes capazes de formar nódulos. Já a subfamília *Faboideae*, a única exceção é a tribo *Dipterygeae*, onde há ausência em todos os gêneros. O fato é que a não formação de nódulos é uma característica em todos os grupos primitivos de todas as subfamílias de Leguminosae (SPRENT, 2000).

A subfamília *Faboideae* é especialmente importante porque suas sementes e legumes de muitas espécies herbáceas são fontes de alimentos para homens e animais. Elas são de particular valor em áreas com deficiência de proteínas no globo. Entre as espécies mais utilizadas na alimentação humana estão a ervilha (*Pisum sativum*), grão-de-bico (*Cicer arietinum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), lentilha (*Lens culinaris*), soja (*Glycine max*) e amendoim (*Arachis hypogaea*) (HEYWOOD, 1996).

2.3 O gênero *Lupinus* L.

Lupinus Tourn., pertencente à família Leguminosae subfamília *Faboideae*, é um gênero de ervas ou arbustos anuais ou perenes.

O maior número de espécies ocorre na costa e regiões do oeste da América do Norte, do Alasca à fronteira do México; no México; no Peru e regiões vizinhas; no Brasil, Uruguai e Argentina. No Velho Mundo somente 12 espécies são conhecidas, estando situadas em torno do Mediterrâneo e leste da África. Sendo assim, o gênero cobre uma ampla zona climática: do clima subártico do Alasca e das Montanhas Rochosas, em torno do Mediterrâneo e climas semidesérticos, nas montanhas do leste da África, México e Andes e finalmente a planície subtropical do leste sul Americano e sudeste dos Estados Unidos (GLADSTONE, 1998).

No Brasil, as espécies de *Lupinus* são encontradas em solos pobres como os serrados e campos rupestres (MONTEIRO e MONTEIRO, 1986).

Uma característica universal dos lupinos é que são plantas de habitats abertos e ensolarados, intolerantes a muita proteção e em florestas crescem em clareiras, especialmente como planta pioneira em solos recentemente perturbados (GLADSTONE, 1998).

O nome *Lupinus* é derivado do latim *Lupus* (lobo), em alusão à capacidade de penetração da planta em todos os ambientes, bastando que haja leve camada de solo (BARROSO, 1991).

GLADSTONE (1998) dividiu os lupinos do velho mundo em dois grupos de acordo com a morfologia do revestimento da semente, o grupo *rough-seed* ou semente rugosa e *smooth-seed* ou semente lisa, de onde, segundo o autor, teriam se desenvolvido os lupinos Americanos.

Os lupinos Americanos podem ser divididos ainda em dois outros grupos, aqueles com folhas compostas ou multifoliados e aqueles com folhas simples ou unifoliados (MACIEL e SCHIFINO-WITTMANN, 2002).

No Rio Grande do sul, o gênero está representado por 13 espécies distribuídas em todas regiões do estado, sendo a maior concentração

na região dos Campos de Cima da Serra (PINHEIRO e MIOTTO, 2001). Neste estado a planta é conhecida popularmente como "tremoço" (BACKES, 1999).

2.3.1 Utilização do gênero *Lupinus*

As espécies de *Lupinus* de potencial significância ocorrem quase exclusivamente na África e no Mediterrâneo e incluem todas as espécies conhecidas daquela região. No continente Americano somente *L. mutabilis* tem suas sementes utilizadas na alimentação há séculos pela população Andina onde é comumente chamado de *tarwi* ou *chocho* (GLADSTONE, 1998).

No sudoeste Australiano, *Lupinus angustifolius* é utilizado em rotação de cultura com cereais, sendo o segundo mais importante grão cultivado após o trigo. A sua utilização se dá pela sua alta capacidade de fixar o nitrogênio (UNKOVICH *et al.*, 1995).

Como registro histórico, no Brasil *L. angustifolius* teve suas sementes utilizadas na falsificação do café (PIO CORRÊA, 1984).

De uma maneira geral as espécies de *Lupinus* têm sido utilizadas como forragem, adubo verde, ornamental e comestíveis (PIO CORRÊA, 1984), porém no continente Europeu, *L. hirsutus* e *L. angustifolius*, são utilizados popularmente como antidiabéticos (SOULELES, 1990; WOLDEMICHAEL e WINK, 2002).

2.3.2 Metabólitos secundários de ocorrência no gênero *Lupinus*

Os alcalóides deste gênero possuem o núcleo do tipo quinolizidínico (norlupinano), que consiste em dois anéis saturados de seis membros divididos por um átomo de nitrogênio e quinolizidínicos tetracíclicos. Derivados do aminoácido lisina, sendo freqüentemente chamados de alcalóides lupínicos devido a sua ampla ocorrência em espécies de *Lupinus* (SAMUELSSON, 1992).

Espécies contendo baixas concentrações de alcalóides, < 200 mg de alcalóides Kg⁻¹, são conhecidos como *sweet* - *L. albus*, *L. angustifolius*, *L.*

luteus e variedades de *L. mutabilis*. Estas espécies são utilizadas na alimentação a mais de 3000 anos. As espécies contendo 5-40 g de alcalóides Kg^{-1} são conhecidas como *bitter* (PETTERSON, 1998; ALLEN, 1998). Mesmo em espécies *sweet* são extraídos os alcalóides das sementes para eliminar o sabor amargo (TELLO *et al.*, 1980; PETTERSON, 1998).

Estes metabólitos desempenham um papel quimiotaxonômico interessante. Em um estudo com 56 espécies de *Lupinus* do Velho e Novo Mundo, ficou determinado que os alcalóides quinolizidínicos tetracíclicos podem ser detectados em quase todos; o bicíclico lupinina e derivados são abundantes em espécies do Velho e no Novo Mundo encontram-se em espécies da América do Norte; Multiflorina e derivados são de distribuição mais restrita e são encontrados no Velho Mundo e em *Lupinus* da América do Sul, sendo que os Norte-americanos não acumulam estes alcalóides em proporção substancial (**Figura 5**); alcalóides quinolizidínicos com esqueleto α -piridona, como anagirina e citisina, são típicos em vários gêneros de Papilionoideae e geralmente ausentes no gênero *Lupinus*. Entretanto, espécies do Novo Mundo e apenas uma do Velho Mundo (traços) acumulam estes alcalóides; a maior parte dos *Lupinus* produzem alcalóides bipiperidínicos como amodendrina e derivados que são encontrados em alguns representantes Norte-americanos (WINK *et al.*, 1995).

Em *Lupinus angustifolius* foram identificados 4 glicosídeos triterpênicos, sendo que 2 exibiram moderada atividade antifúngica contra *Candida albicans* (WOLDEMICHAEL e WINK, 2002).

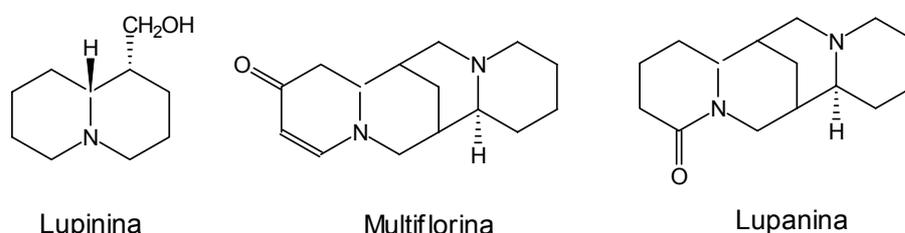


Figura 5: Núcleo de alcalóides de *Lupinus*; lupinina encontra-se em espécies do Velho Mundo e América do Norte; multiflorina Velho Mundo e América do Sul e lupanina presente em todos os *Lupinus*.

2.3.3 Flavonóides de ocorrência no gênero *Lupinus*

Uma característica marcante no gênero é a ocorrência de flavanonas e isoflavonas com cadeias laterais preniladas (3,3-dimetilalila) e derivados destes compostos em que o grupo prenila pode ser ciclizado ou oxigenado, resultando em grande perfil estrutural (**Figura 6**). Algumas dessas substâncias apresentam atividade antimicrobiana e estão relacionadas com o sistema de defesa do vegetal (TAHARA *et al.*, 1989; 1994).

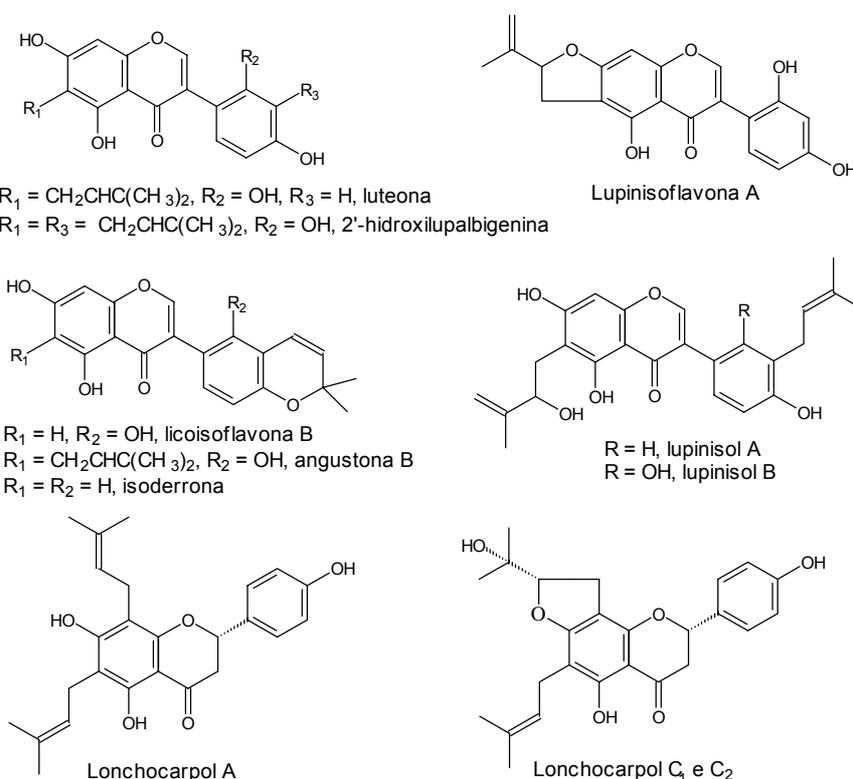


Figura 6: Algumas flavanonas e isoflavonas preniladas e derivados encontradas no gênero *Lupinus*.

Os isoflavonóides com cadeia lateral originada de um grupamento prenila ou geranila são denominados de flavonóides complexos. Como isoflavona sintase, prenila e geranila transferases são de distribuição restrita, o resultado é um pequeno número de plantas que expressam este tipo de isoflavonóides. Dos isoflavonóides conhecidos, 56% de Leguminosae e 17% de não-Leguminosae, são do tipo complexo (TAHARA e IBRAHIM, 1995). A **Figura 7** esquematiza a provável biossíntese deste tipo de cadeia lateral.

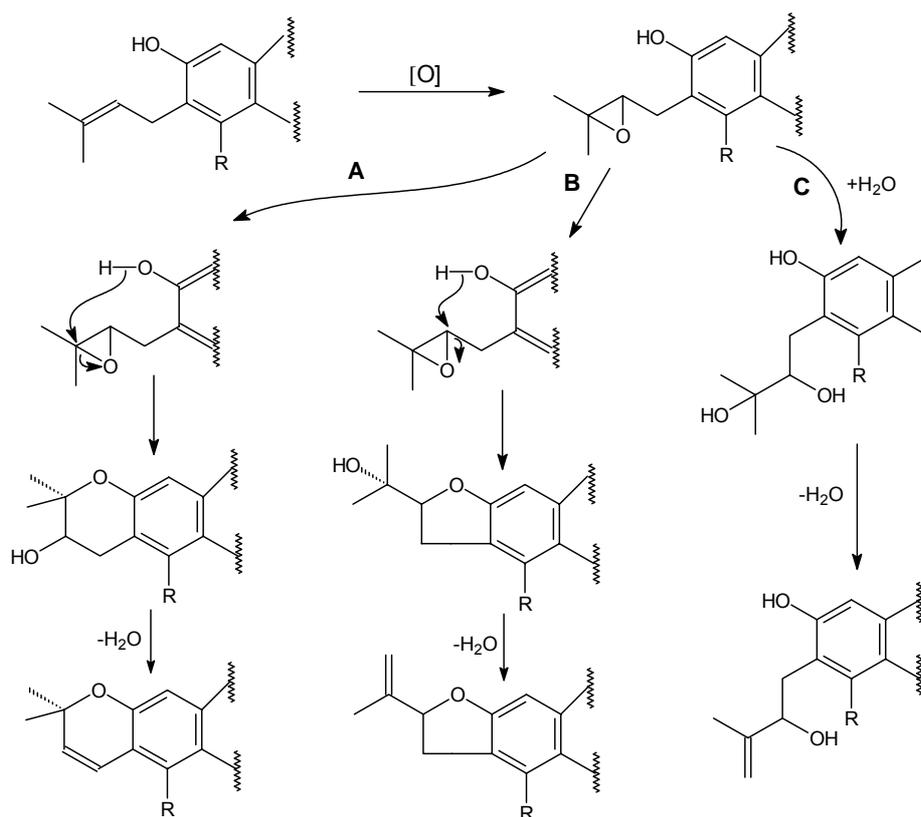


Figura 7: Esquema da provável biossíntese de isoflavonóides complexos em *Lupinus*. A prenilação pode ocorrer em C6 e ou C3. Em **A**, a formação de núcleos pirano; em **B** a formação de núcleos furano; e **C** a cadeia dimetilalila oxigenada. A posição da cadeia lateral dependerá do perfil de oxigenação do anel aromático (R = H ou OH) e da(s) enzima(s) envolvida(s).

Estudos utilizando cultura de tecido de raiz de *L. albus* indicam que a prenilação só ocorre após a estrutura do isoflavonóide ser parcialmente ou completamente sintetizada, e que para cada posição, 6, 8 e 3', existe uma preniltransferase específica, **Figura 8** (LAFLAMME *et al.*, 1993; TAHARA e IBRAHIM, 1995).

Substituintes 4'-metila impedem a adição do grupamento prenila na posição 3', provavelmente por serem volumosos, e a preniltransferase possui maior afinidade por isoflavona do que outra estrutura de (iso)flavonoide (LAFLAMME *et al.*, 1993).

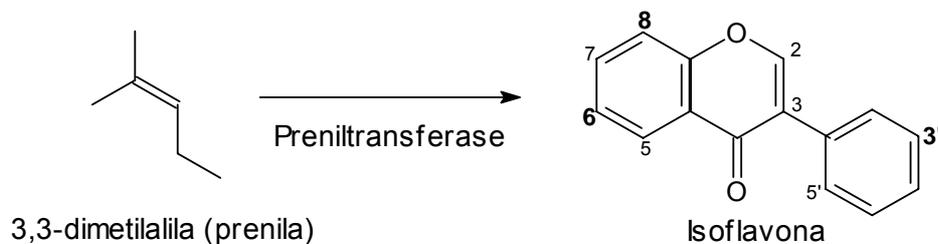


Figura 8: Esquema de prenilação de uma isoflavona. O doador do radical é dimetilalila pirofosfato (DMAPP), para cada posição 6, 8 e 3' existe uma preniltransferase distinta.

Os flavonóides podem ser utilizados como marcadores taxonômicos no gênero. Em espécies do Velho Mundo, três classes de flavonóides são detectados, flavonas em 82%, flavonóis em 36% e flavonas C-glicosídeo em 55%. O grupo de semente rugosa caracteriza-se por apresentar luteolina, 5, 7, 2',4'-tetrahidroxiflavona flavonas C-glicosídeo e ausência de flavonóis. Dentre o grupo de semente lisa há três perfis, (a) grupo que possui somente flavonóis, (b) flavonas e flavonóis e (c) somente flavonas. Já nos representantes Americanos, de 13 espécies estudadas, flavonas C-glicosiladas são os componentes mais característicos das folhas e flavonóis não foram detectados (WILLIAMS *et al.*, 1983).

Ocorrem também flavonas di-C-glicosiladas como apigenina 7-O- β -apiofuranosil-6, 8-di-C- β -glicopiranosídeo e apigenina-7-O- β -apiofuranosil-6-C- β -glicopiranosil-8-C-(6'''-O-feruloil)- β -glicopiranosídeo (KAMEL, 2003).

2.4 *Lupinus lanatus* Benth.

Caracteriza-se por erva perene, ereta, ramificada ao longo do caule, com 10-60 cm de altura, chegando a desenvolver touceiras com mais de 1 m de diâmetro. Caule densamente lanoso. Folhas da base unifoliadas e trifoliadas, visíveis somente nos indivíduos jovens. Flores azul-celeste, raramente brancas, estandarte com mancha central branca; cálice internamente glabro, externamente densamente lanoso. Ovário com 8 óvulos. Legumes 54-74 x 10-11,5 mm, densamente lanosos. Semente elípticas (PINHEIRO e MIOTTO, 2001).

2.5 Simbiose Leguminosae-*Rhizobium*

Uma característica das plantas pertencentes à família Leguminosae é sua aptidão em formar nódulos fixadores de nitrogênio em simbiose com bactérias do solo (SPRENT, 2000). Estes microorganismos estão classificados em seis gêneros: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (CHUEIRE *et al.*, 2003), sendo coletivamente chamados de rizóbios (SAHGAL e JOHRI, 2003).

Membros de 13 gêneros de outras famílias além das Leguminosae também são capazes de fixar o nitrogênio (GIBSON, 1980), entretanto, o gênero *Parasponia* Miq. da família Ulmaceae é a única não Leguminosae capaz de estabelecer simbiose com rizóbio (MICHIELS e VANDERLEYDEN, 1994; SPRENT, 2000).

A fixação ocorre em um órgão desenvolvido pela planta chamado de nódulo, que contém compostos novos que não são encontrados na bactéria nem na planta não infectada. Nele forma-se uma nova organela chamada de simbiossoma que consiste de bacterióides (rizóbio em sua fase simbiótica) envoltos por uma membrana peribacterióide onde carbono e outros nutrientes são passados para bactéria e o nitrogênio transferido para a planta hospedeira (DOYLE, 1998). Geralmente este novo órgão é desenvolvido nas raízes, porém nos gêneros *Aeschynomene* e *Sesbania*, que se desenvolvem em solos alagados, e na aquática *Neptunia*, o nódulo se desenvolve no caule (AUER e SILVA, 1992).

Para que ocorra a redução do nitrogênio atmosférico no interior do nódulo um complexo enzimático é necessário. O complexo nitrogenase, que realiza este processo, é constituído por duas enzimas, uma redutase que fornece elétrons e uma nitrogenase que usa estes elétrons para reduzir N_2 para NH_4^+ . O complexo enzimático é muito sensível à inativação pela presença de oxigênio, e desta forma as Leguminosae mantêm uma concentração muito baixa do gás livre por ligá-lo a uma proteína, a lego-hemoglobina, um pigmento vermelho encontrado no nódulo (STRYER, 1996). Contudo, muitos outros

compostos são conhecidos em Leguminosae por evitar o estresse oxidativo no nódulo, podendo ser citadas glicoproteínas e compostos fenólicos (STAFFORD, 1997)

Diversos eventos essenciais precedem a fixação do nitrogênio na simbiose *Rhizobium*-Leguminosae. Entre eles se incluem o reconhecimento mútuo entre hospedeiro e simbiote, a aderência específica do rizóbio aos pêlos da raiz, a deformação e infecção dos pêlos da raiz e a formação do nódulo (DAZZO, 1980).

O reconhecimento entre o hospedeiro e simbiote ocorre antes que qualquer mudança visual seja observada nas raízes (HUNGRIA, 1994). O processo inicia com uma troca de sinais moleculares. O vegetal elimina substâncias identificadas como flavonóides, os quais são reconhecidos por proteínas regulatórias do rizóbio, denominadas de NodD. Ambos iniciarão a transcrição dos genes *nod* (*nod* de *noduladores*). A maioria dos genes *nod* está envolvida na síntese de proteínas conhecidas por fatores Nod, que retornam ao vegetal ativando a organogênese do nódulo (PUEPPKE *et al.*, 1998; ZUANAZZI *et al.*, 1998; STOUGAARD, 2000).

Cada espécie elimina um grupo de flavonóides em torno de sua rizosfera, porém somente determinado grupo é reconhecido pela proteína NodD (LONG, 2001). Por exemplo, dadzeína e genisteína são produzidos pela soja (*Glycine max*), que são efetivos indutores dos genes *nod* de *Bradyrhizobium japonicum*, mas inibem a expressão dos genes *nod* de *Sinorhizobium meliloti*, que por sua vez, é induzido por luteolina (HIRSCH *et al.*, 2001). Todas bactérias do gênero rizóbio produzem fatores Nod com uma estrutura básica similar (lipoquitooligossacarídeos), porém com modificações em suas cadeias laterais. Experimentos demonstraram que estas modificações também fornecem certo grau de especificidade à planta hospedeira (LONG, 2001).

Esta comunicação molecular entre procarioto e eucarioto torna a simbiose, ao contrário da micorrização (interação entre vegetais e fungos para

absorção do fósforo), altamente específica (STOUGAARD, 2001) o que tem despertado interesse tanto econômico como ecológico nos últimos anos (LONG, 2001).

2.5.1 Flavonóides na simbiose Leguminosae-Rhizobium

A descoberta feita por Peters e colaboradores (1986) de que um flavonóide, a luteolina (5,7,3',4'-tetra-hidroxi-flavona), atua como indutor dos genes *nod* de *R. meliloti*, na simbiose *Medicago sativa*-*R. meliloti*, contrastava com o conhecimento da época, pois até então os flavonóides estavam relacionados com o sistema de defesa do vegetal.

Após este estudo pioneiro, numerosas estruturas de flavonóides têm sido identificadas como indutores, como chalconas, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonóides, conforme pode ser constatado na **Tabela 1**.

Outras funções atribuídas aos flavonóides na simbiose são de agirem como quimioatraentes (MALEK, 1989) e como estimuladores da taxa de crescimento da bactéria (HARTWIG e PHILLIPS, 1991).

Tabela 1: Flavonóides indutores dos genes *nod* obtidos de leguminosas

Hospedeiro - simbiote	Flavonóide	Nome comum	Referência
<i>Medicago sativa</i> - <i>R. meliloti</i>	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-flavona	Luteolina	Peters <i>et al.</i> , 1986 Hartwig <i>et al.</i> , 1990
	3'-metoxi-5,7,4'-tri-hidroxi-flavanona	Crisoeriol	Hartwig <i>et al.</i> , 1990
	7,4'-di-hidroxi-flavanona	Liquiritigenina	Maxwell <i>et al.</i> , 1989
	7,4'-di-hidroxi-flavona		
	4,4'-di-hidroxi-2'-metoxi-chalcona	Metoxichalcona	
<i>Pisum sativum</i> - <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	5,7,4'-tri-hidroxi-flavona-7-O-glucosídeo	Apigenina 7-O-glucosídeo	Firmin <i>et al.</i> , 1986
	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-flavanona	Eriodictiol	
<i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	3,5,7,3',4',5'-hexa-hidroxi-flavilium-3-O-glicosídeo	Delfinidina	Hungria <i>et al.</i> , 1991a
	3,5,7,4',5'-penta-hidroxi-flavilium-3-O-glicosídeo	Cianidina	
	3,5,7,4'-tetra-hidroxi-flavilium-3-O-glicosídeo	Malvidina	
	3,5,7,3',4',5' hexa-hidroxi-flavona-3-O-glicosídeo	Miricetina	Hungria <i>et al.</i> , 1991b

Tabela 1: Continuação.

Hospedeiro - simbiote	Flavonóide	Nome comum	Referência
<i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	3,5,7,3',4'-penta-hidroxi-flavona-3-O-glicosídeo	Quercetina	Hungria <i>et al.</i> , 1991b
	3,5,7,4'-tetra-hidroxi-flavona-3-O-glicosídeo	Canferol	
	5,4'-di-hidroxi-isoflavona-7-O-glicosídeo	Genisteína-7-O-glicosídeo	
	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-flavona	Eriodictiol	
	5,7,4'-tri-hidroxi-flavanona	Narigenina	
<i>Vicia sativa</i> - <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	3,5,7,3'-tetra-hidroxi-4'-metoxi-flavanona		Zaat <i>et al.</i> , 1988
	7,3'-di-hidroxi-4'-metoxi-flavanona		
<i>Trifolium repens</i> - <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	7,4'-di-hidroxi-isoflavona		Redmond <i>et al.</i> , 1986
	7,4'-di-hidroxi-3'-metoxi-flavona	Geraldona	
	4'-hidroxi-7-metoxi-flavona		
<i>Glicine max</i> - <i>B. japonicum</i> - <i>R. fredii</i> - <i>B. japonicum</i>	7,4'-di-hidroxi-isoflavona	Daidzeína	Kosslak <i>et al.</i> , 1987
	5,7,4'-tri-hidroxi-isoflavona	Genisteína	Kape <i>et al.</i> , 1992
	4,2',4'-tri-hidroxi-chalcona	Isoliquiritigenina	

A aderência do rizóbio ao pêlo da raiz do hospedeiro, que é um passo limitante, é aumentada quando estes metabólitos secundários são adicionados (WISNIEWSKI e DELMOTTE, 1996).

2.6 O sistema de defesa do vegetal

Durante seu desenvolvimento, os vegetais sofrem doenças causadas por diversos agentes como fungos, bactérias, vírus e nematódeos (INGHAM, 1981; BAKER *et al.*, 1997). Como um obstáculo primário, o vegetal possui um revestimento formado por cutina, suberina e cera, que são substâncias lipofílicas que formam uma barreira física com o meio ambiente impedindo a entrada de patógenos (TAIZ e ZEIGER, 1998).

Entretanto, caso ocorra sucesso na infecção, o patógeno desencadeará uma complexa série de respostas de defesa que tornarão o local desfavorável ao seu crescimento e reprodução (TAIZ e ZEIGER, 1998).

Dependendo da localização da célula em relação ao local do dano, ocorrerá um tipo de reação de defesa.

A resposta imediata ocorre na célula invadida. Dentre outras seqüências de passos importantes, ocorre à formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a resposta hipersensitiva que resulta na morte da célula. As espécies reativas de oxigênio podem ser benéficas para o vegetal (por serem tóxicas ao patógeno e desencadear o aumento da parede celular) contudo, estas moléculas reativas são altamente destrutivas para lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas, que pode afetar o crescimento e desenvolvimento e até mesmo a morte da planta (HAMMOND-KOSACK e JONES, 2000; BRAY *et al.*, 2000).

A resposta local ocorre nas células que circundam as células invadidas, os eventos que se destacam são a produção de moléculas sinalizadoras (ácido benzóico e ácido salicílico), produção de hormônios (etileno e ácido jasmônico) e ativação do metabolismo secundário (HAMMOND-KOSACK e JONES, 2000).

Resposta sistêmica ocorre em células distantes do local do dano, às vezes em tecidos distantes e até mesmo em plantas vizinhas (HAMMOND-KOSACK e JONES, 2000). Ocorre a formação de enzimas hidrolíticas, quitinases e glucanases, que atacam a parede celular do patógeno. Estas enzimas pertencem a um grupo de proteínas que está intimamente relacionada com a infecção e são conhecidas como proteínas PR (*pathogenesis-related*) (TAIZ e ZEIGER, 1998).

Dentro de seu arsenal de defesa, os vegetais sintetizam substâncias com atividade antimicrobiana pertencentes ao metabolismo secundário, compreendendo várias classes, como fenólicos, saponinas, glicosídeos cianogênicos, ácidos hidroxinâmicos, sesquiterpenos, isoflavonóides, indólicos contendo enxofre e muitos outros compostos, exemplificados na **Figura 9**.

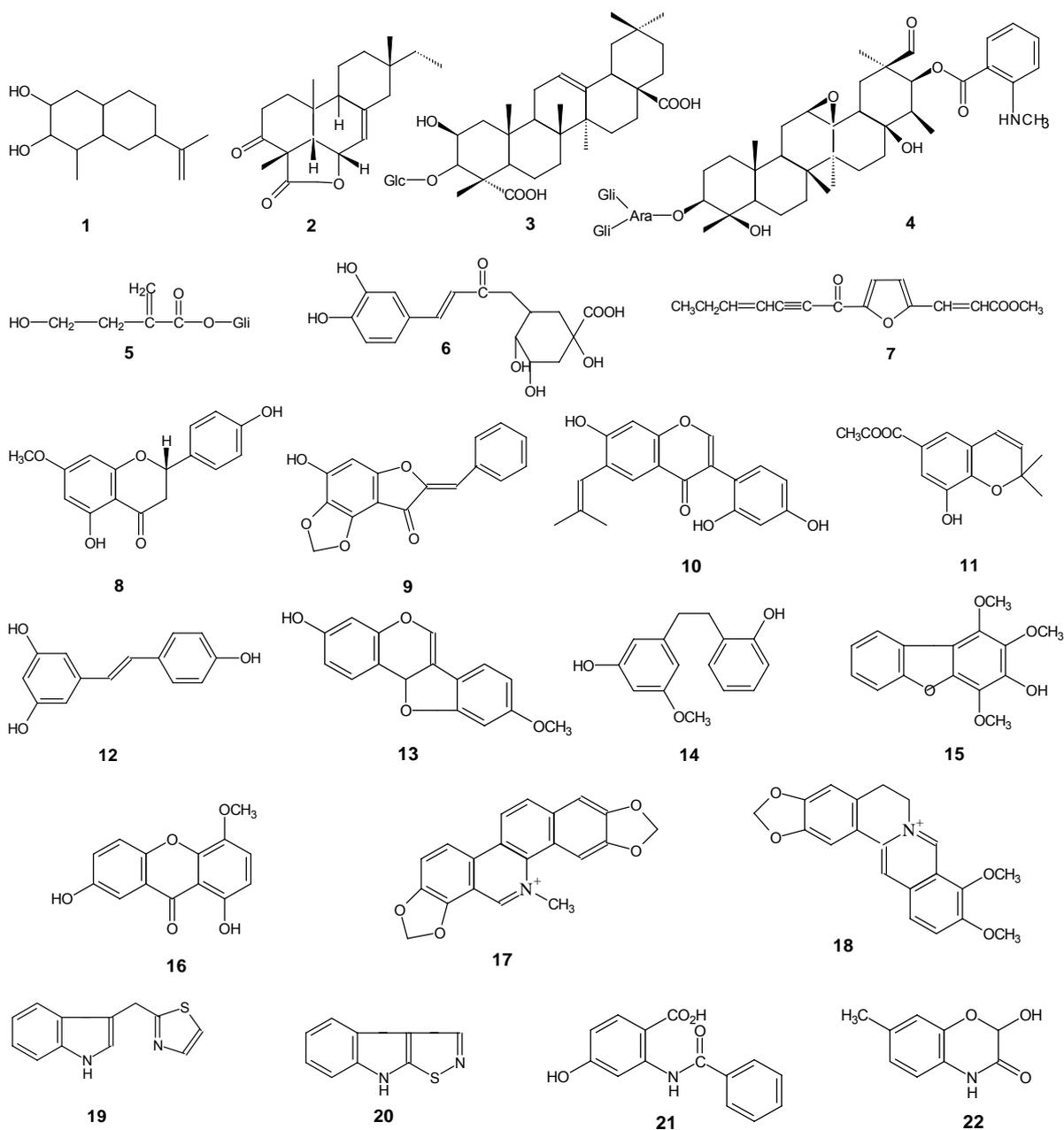


Figura 9: Diversidade de constituintes antimicrobianos provenientes do metabolismo secundário. Algumas substâncias são constitutivas, outras induzidas. 1 Risitina (*Nicotiana tabacum*); 2 Momilactona A (*Oryza sativa*); 3 Ácido mecagênico 3-O-glicosídeo (*Dolichos kilimandscharicus*); 4 Avenacina (*Avena sativa*); 5 Tuliposídeo A (*Tulipa* spp.); 6 Ácido clorogênico (*Nicotiana tabacum*); 7 Wyerona (*Vicia faba*); 8 Sakuranetina (*Oryza sativa*; *Ribes nigrum*); 9 Aurona (*Cephalocereus serilis*); 10 Luteona (*Lupinus albus*); 11 Cromena (*Piper anduncum*); 12 Resveratrol (*Vitis veniferis*); 13 Maackiaina (*Cicer arietinum*); 14 Batatasina IV (*Dioscorea batata*); 15 Benzofurano (*Cotoneaster* spp.); 16 Xantona (*Polygala nykensis*); 17 Sanguinarina (*Papaver bracteatum*); 18 Berberina (*Berberis* spp); 19 Camalexina (*Arabidopsis thaliana*); 20 Brassilexina (*Brassica* spp); 21 Antranilamida (*Dianthus caryophyllus*); 22 DIMBOA (*Zea mays*).

Tais substâncias podem ser pré-formadas, encontradas de uma maneira constitutiva, como foi demonstrado por HARBORNE e col. (1976) quando identificaram a isoflavona luteona em plântulas de *Lupinus albus*. Como estes compostos estão se antecipando ao ataque, formando uma barreira química, são denominados de fitoanticipinas (DAKORA e PHILLIPS, 1996; OSBOURN, 1999; DIXON e FERREIRA, 2002); ou sintetizadas após o tecido vegetal sofrer infecção microbiana, as fitoalexinas (VANETTEN *et al.*, 1994).

Para alguns compostos é difícil determinar se são fitoalexinas ou ocorrem de maneira constitutiva, por exemplo, o mesmo composto pode ser pré-formado em uma espécie e fitoalexina em outra, adicionalmente, o composto pode ser fitoalexina em um órgão e constitutivo em outro, em uma mesma espécie (GRAYEY e HARBORNE, 1994).

Entretanto a produção de antimicrobianos não está restrita a compostos do metabolismo secundário, o octacicloenxofre (**Figura 10**), uma substância inorgânica acumulada em células vegetais primeiramente encontrada no xilema de *Theobroma cacao-Veticillium dahliae* (COOPER *et al.*, 1996), foi também evidenciada em outras três famílias (Solanaceae, Malvaceae e Leguminosae), indicando que a formação do enxofre pode estar amplamente distribuído em vegetais como componente de resistência (WILLIAMS e COOPER, 2003).

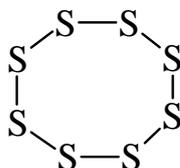


Figura 10: Octacicloenxofre, composto inorgânico com atividade fitoprotetora.

É importante salientar que a distinção entre fitoalexina e fitoanticipina, não está baseada em sua estrutura química, e sim em como ela é produzida (VANETTEN *et al.*, 1994).

2.6.1 Flavonóides e o sistema de defesa do vegetal

Uma característica de plantas pertencentes à família Leguminosae é a produção de isoflavonóides como fitoalexina ou fitoanticipina. Pterocarpanos como gliceolina, medicarpina em *Glycine* e *Medicago* (STAFFORD, 1997), pisatina em *Pisum* (INGHAM, 1981) (**Figura 11**) e as isoflavonas preniladas em *Lupinus* (já apresentadas no ítem 2.3.3) representam os seus principais metabólitos de defesa.

De acordo com as observações feitas por INGHAM (1981), a formação destes metabólitos secundários pode prover de considerável informação sobre sistemática dentro da sub-família Faboideae.

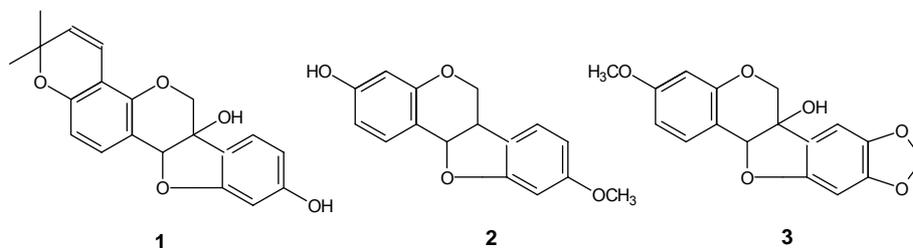


Figura 11: Pterocarpanos gliceolina (1) e medicarpina (2) e pisatina (3), principais metabólitos de defesa em soja, alfafa e ervilha, respectivamente.

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A maior parte dos estudos químicos recentes encontrados para o gênero referem-se a espécies originárias do continente Europeu, apesar da maior concentração de espécies estar localizada no continente Americano.

Estes estudos são referentes aos flavonóides complexos, que estão relacionados ao sistema de defesa do vegetal.

Durante a revisão bibliográfica foram encontrados dados relacionados ao metabolismo das Leguminosae, DIXON e STEELE (1999) cita a ausência de 4'-metoxisoflavonas em feijão e soja e a ocorrência delas nas demais Leguminosae, já TAHARA e IBRAHIM (1995) cita que 60% das isoflavonas desta família são do tipo 5-desoxi. Não foram encontrados no gênero *Lupinus* 4'-metoxisoflavonas e 5-desoxi(iso)flavonóides, o que pode sugerir a ausência das enzimas isoflavona O-metiltransferase (IOMT) e chalcona isomerase II (CHII) ou chalconas oxigenadas na posição 6'.

Não foram encontradas estruturas do tipo flavonol em *Lupinus* americanos, o que corrobora com o estudo de WILLIAMS e colaboradores (1983).

O conhecimento do conteúdo de alcalóides e flavonóides no gênero se mostram uma ferramenta taxonômica muito útil, conforme se pode constatar na **Tabela 2**.

Tabela 2: Distribuição de flavonóides e alcalóides em representantes do Velho mundo, Norte-americano e Sul-americano, servindo como marcadores quimiotaxonômicos.

	Velho Mundo	Norte-americano	Sul-americano
Alcalóide	Lupinina	Lupinina	Ausente
	Multiflorina	Ausente	Multiflorina
Flavonóide	Flavonol	Ausente	Ausente
	Flavona	Flavona C-glicosídeo*	Flavona C-glicosídeo*

*Aparecem como compostos majoritários.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é o estudo químico dos compostos fenólicos presentes em *Lupinus lanatus* Bentham. De outra parte, é proposto o estudo do papel fisiológico dos compostos isolados na interação do vegetal com microrganismos, bem como avaliação de possível atividade antioxidante dos mesmos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solventes e reagentes

Utilizou-se para a realização deste trabalho os solventes: acetato de etila, diclorometano, clorofórmio, hexano, *n*-butanol, metanol de marca Merck[®], Nuclear[®], Quimex[®] e Synth[®] de grau p. a. e etanol comercial. Para CLAE os solventes utilizados foram ácido trifluoroacético, metanol grau CLAE de procedência Omnisolv[®] e água Milli-Q[®]. Substâncias referências de glicose, galactose e ramnose, de procedência Merck[®].

Para fracionamento em coluna cromatográfica utilizou-se gel de sílica 60 com tamanho de partícula entre 70-230 mesh-ATSM de procedência Merck[®] e para cromatografia de exclusão Sephadex[®] LH 20.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de vidro (20x20 e 5x5 cm), preparadas com auxílio de conjunto Desaga[®], tendo como fase fixa gel de sílica GF₂₅₄ de procedência Merck[®] com espessura de 0,25 mm e 0,5 mm. Utilizou-se também cromatoplasmas de gel de sílica GF₂₅₄ e HPTLC Merck[®] (60F₂₅₄). Os cromatogramas foram observados sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) e a determinação da presença dos compostos fenólicos foi efetuada nebulizando as placas com os reagentes cromogênicos cloreto férrico e cloreto de alumínio. Para visualização dos açúcares foi utilizado como reagente cromogênico anisaldeído sulfúrico.

Para cromatografia líquida a vácuo foi utilizado como fase fixa gel de sílica GF₂₅₄ de procedência Merck[®].

Para a atividade antioxidante utilizou-se a DPPH de procedência Flucka[®]. Para atividade antimicrobiana, foi empregado meio de cultura Grove-Randall n° 11 de procedência Merck[®] e Levedura-Manitol (**Anexo 1**)

4.2 Equipamentos

4.2.1 Espectroscopia no Ultravioleta

Utilizou-se espectrofotômetro HEWLETT PACKARD UV-VIS modelo HP 8452-A gerenciado por *software* Chemstation, com varredura de diodos em série entre 200 e 400 nm, para as substâncias LL1, LL10 e LL11. Para a substância LL8, utilizou-se o espectrofotômetro HEWLETT PACKARD UV-VIS modelo HP 8451-A com varredura de diodos em série entre 200 e 400 nm.

4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Empregou-se equipamento Alliance 2690 (Waters®) gerenciado por *software* Empower® Pro e detector Waters® 996 (UV-diodos em série), acumulados entre 200 e 600 nm, cada 4,8 nm com 1 espectro/segundo.

O cromatógrafo foi equipado com coluna Novapack® (Waters®) contendo fase reversa C₁₈ (5 µm), com dimensões de 3,9 x 150 mm, protegida por pré-coluna preenchida com fase reversa C₁₈. A programação utilizada encontra-se na **Tabela 3**.

Tabela 3: Gradiente utilizado para o desenvolvimento dos cromatogramas.

Tempo (minutos)	Fluxo (mL/min)	Eluente A* (%)	Eluente B** (%)
0	0,7	90	10
7	0,7	70	30
8	0,7	0	100
18	0,7	0	100

* Água: metanol: TFA (90:10:0,01)

** Metanol:TFA (100:0,01)

4.2.3 Espectrometria de Massas

As análises foram realizadas em equipamento VG Autospec por impacto de elétrons 70 eV de baixa resolução com inserção direta da amostra.

4.2.4 Espectroscopia de RMN ^1H e RMN ^{13}C

Todos os espectros foram desenvolvidos a temperatura ambiente, em solventes deuterados empregando como referência o tetrametil-silano (TMS). Na obtenção dos espectros de LL1, LL10 e LL11 foi utilizado espectrômetro BRUKER® (^1H - 400 MHz e ^{13}C - 100 MHz) e DMSO- d_6 como solvente. Para as substâncias LL7 e LL8 utilizou-se equipamento VARIAN® XL (^1H - 200 MHz e ^{13}C - 50 MHz) o solvente empregado foi o CDCl_3 .

4.3 Coleta do vegetal

O vegetal foi coletado na região dos Campos de Cima da Serra no estado do Rio Grande do Sul, região de maior concentração da espécie, no mês de novembro de 2002.

A identificação foi realizada pela botânica Doutoranda Mardiore Pinheiro dos Santos e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul ICN 117019 (STS MIOTO e M PINHEIRO 1806).

4.4 Extração dos compostos fenólicos

O material foi dividido em flores, raízes, legumes, nódulos e folhas, sendo que estas últimas foram lavadas previamente com diclorometano e o extrato resultante concentrado em evaporador rotatório até a secura.

Logo após e ainda frescas, cada uma das partes do vegetal, foi desintegrada através do triturador de facas e submetida à extração com etanol 96% em maceração a temperatura ambiente e homogeneizada com *Turrax*. O processo de maceração ocorreu por um período de 3 dias. Após esse período, o material foi filtrado e o remanescente colocado novamente em maceração e homogeneizado com *Turrax* em etanol pelo mesmo intervalo de tempo. Esse processo foi repetido ainda mais duas vezes. Os extratos alcoólicos foram

reunidos e o solvente eliminado em evaporador rotatório. Os extratos resultantes foram ressuspensos em água e a extração prosseguiu com diferentes solventes conforme o esquema apresentado na **Figura 12**.

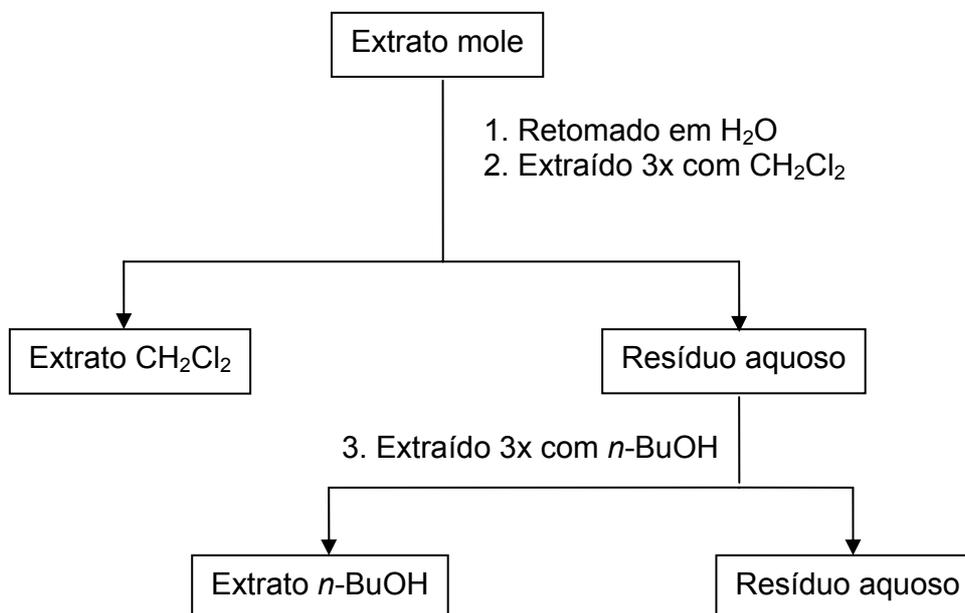


Figura 12: Esquema de obtenção dos extratos diclorometano e butanólico das partes de *Lupinus lanatus*.

Foram obtidos 11 extratos denominados conforme a **Tabela 4**.

Tabela 4: Denominação utilizada para designar os extratos obtidos conforme o solvente utilizado.

Parte do vegetal	Extrato butanólico	Extrato diclorometano
Folha	FB	FD
Raiz	RB	RD
Legume	LB	LD
Nódulo	NB	ND
Flor	FLB	FLD
Folha lavada com diclorometano		FL

Durante o processo de partição com *n*-butanol, ocorreu a formação de precipitados que foram separados por filtração e centrifugação de seus extratos. Estes precipitados ocorreram nos nódulos e folhas que foram denominados de LLNBP e LLFBP respectivamente.

4.5 Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos diclorometano e folha lavada

Os extratos diclorometano das partes do vegetal, folhas butanólica e folha lavada, foram analisados por CCD utilizando-se cromatoplaça de gel de sílica Merck® e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (99/1) como fase móvel. A placa foi revelada com luz ultravioleta 254 e 365 nm.

4.6. Isolamento dos compostos fenólicos

As substâncias foram isoladas a partir dos extratos butanólico e diclorometano das partes do vegetal, contudo não foram utilizados todos extratos. Foram empregadas Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV), Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia em Camada Delgada modo preparativo. Foram isoladas 8 substâncias fenólicas, sendo 3 flavonas (sendo uma em diferentes partes do vegetal), 1 isoflavonóide, 1 derivado do ácido cafeico e 2 substâncias sem suas estruturas determinadas.

4.6.1 Flores extrato butanólico

O extrato FLB foi submetido à CC (dimensões 9,6 x 4,0 cm) utilizando gel de sílica como fase estacionária e como eluentes diclorometano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 73 frações, sendo que na 22ª fração ocorreu a formação de um precipitado de coloração amarela denominado LL1.

4.6.2 Folha lavada

O extrato FL foi submetido à CLV (dimensões 6,3 x 4,5 cm) utilizando como fase fixa gel de sílica e como fase móvel hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, com volume gasto para cada eluente de 400 ml. As frações foram submetidas a CCD modo analítico e a fração eluída com diclorometano foi submetida a CC (dimensões 31,5 x 1,5 cm) utilizando como fase estacionária o mesmo adsorvente e como fase móvel hexano/ CHCl_3 (26/74) e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram

coletadas 42 frações que foram submetidas a CCD modo analítico que indicou que as manchas desejadas encontravam-se nas frações 1-7. Estas frações foram submetidas a CCD modo preparativo utilizando como fase fixa gel de sílica e sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (99,4/0,6). Após duas migrações foram isoladas duas substâncias de Rfs 0,52 e 0,58 denominadas respectivamente LL4 e LL5.

4.6.3 Raízes extrato diclorometano

Este extrato foi submetido à CC (dimensões 34 x 1,5 cm) com gel de sílica como fase fixa e como eluentes CHCl_3 e MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 73 frações que foram submetidas a CCD analítica e foram reunidas segundo sua semelhança de composição. Verificou-se que as frações 1-8 continham o produto majoritário, para tanto, foi submetida a CCD preparativa utilizando-se como fase estacionária gel de sílica e fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na proporção 99/1. Foi obtida uma substância com Rf 0,62 e denominada LL7.

4.6.4 Nódulos extrato diclorometano

O extrato ND foi submetido à CC (dimensões 43 x 1,5 cm) utilizando como fase estacionária gel de sílica e fase móvel CHCl_3 e MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 42 frações que foram submetidas a CCD modo analítico. A placa foi revelada sob luz UV e cloreto férrico sendo as frações com perfil semelhante reunidas. A fração 10-21 foi submetida a CCD modo preparativo tendo como fase fixa gel de sílica e sistema elutrópico $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na proporção 99,5/0,5, que após migrar 4 vezes resultou na substância denominada LL8.

4.6.5 Folhas extrato butanólico

O extrato FB foi submetido à CC (dimensões 12 x 2 cm) sendo como fase estacionária Sephadex[®] LH 20 e eluente MeOH (isocrático). Foram

coletadas 42 frações que foram submetidas a CCD modo analítico tendo as frações com composição semelhante reunidas. A fração 15-19 foi submetida à CC (dimensões 27 x 1,5 cm) utilizando como fase móvel CH_2Cl_2 e MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 57 frações, sendo que nas frações 27-31 ocorreu a formação de um precipitado que foi separado por centrifugação sendo este denominado LL9.

4.6.6 Precipitado LLFBP

O precipitado foi submetido a CLV (dimensões 6,3 x 4,5 cm) utilizando como fase fixa gel de sílica e fase móvel CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1/1) e MeOH utilizando um volume de 200 mL para cada uma das 3 frações obtidas. As 3 frações foram submetidas a CCD modo analítico tendo como fase fixa gel de sílica. Após revelar a placa com luz UV e cloreto de alumínio, as frações escolhidas para trabalho foram $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ e MeOH que foram tratadas separadamente porém, utilizando o mesmo processo. Ambas foram submetidas a CC (dimensões 12,5 x 4,5 cm) tendo como fase fixa gel de sílica e como eluentes CHCl_3 e MeOH em ordem crescente de polaridade. Da fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ foram coletadas 76 frações, já da fração MeOH 82 frações, sendo que da primeira a substância de interesse encontrava-se entre 19^a e 27^a e na segunda entre a 24^a e 40^a fração. Estas foram submetidas a CCD modo preparativo tendo como fase fixa gel de sílica e eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80/20) que após migrar 3 vezes resultou na substância LL10.

4.6.7 Folha extrato diclorometano

O extrato FD foi submetido à CC (dimensões 34 x 4,5 cm) com gel de sílica como fase estacionária e como eluentes CHCl_3 e MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 83 frações que foram submetidas a CCD modo analítico, sendo que as frações de 57-61 foram reunidas, pois após revelar com luz UV e cloreto de alumínio apresentavam a substância de interesse. A mesma foi submetida a CCD modo preparativo tendo como fase estacionária gel de sílica e fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85/15) que após migrar 3 vezes resultou na substância LL11.

4.7 Determinação dos açúcares por cromatografia em camada delgada

Com a finalidade de determinar a parte osídica dos isolados denominados LL10 e LL11, estes foram submetidos à hidrólise ácida utilizando HCl 10% sob refluxo de 1 hora. Logo após, os extratos aquosos obtidos foram concentrados em *SpeedVac* e retomados em metanol. Os hidrolisados foram submetidos a HPTLC juntamente com referências de glicose, galactose e ramnose, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na razão de 4/1 e revelados com anisaldeído sulfúrico.

4.8 Cromatografia em camada delgada de LL1, LL10 e extratos butanólicos

Os isolados LL1 e LL10 foram cromatografados com os extratos butanólicos das partes do vegetal e com o precipitado LLFBP. Foi utilizado cromatoplaça Merck® GF₂₅₄ e sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na proporção 83/17.

4.9 Cromatografia em camada delgada de LL11 e extratos diclorometano

A substância LL11 foi submetida a CCD analítica juntamente com os extratos diclorometano, utilizando como fase fixa cromatoplaça de gel de sílica Merck® GF₂₅₄ tendo como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85/15).

4.10 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das substâncias LL1, LL10 e LL11 foi determinada pelo método da bioautografia por sobreposição (ou imersão) em triplicata (HAMBURGER e CORDELL, 1987; RAHALISON, *et al.*, 1991). O método consiste na deposição das substâncias em cromatoplaças de gel de sílica. As cromatoplaças são submersas por ágar inoculado em placas de Petri. Não há necessidade de eluição da cromatoplaça, pois foram analisados produtos isolados.

4.10.1 Atividade antibacteriana

Foram realizados repiques de cepas de *Agrobacterium* sp., *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA 928) e *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA 938), para meio levedura-manitol em tubos inclinados e incubados a 35 °C, por 72 horas. A partir destas sementeiras, foram realizados novos repiques para 5 mL de meio levedura-manitol líquido a fim de obter a suspensão de bactérias para o preparo dos inóculos a 4 % (v/v) em meio levedura-manitol. Estes microrganismos foram escolhidos por exercerem interação com vegetais. *Agrobacterium* sp. foi isolado do tumor de crisântemo, *Bradyrhizobium* são simbiontes de *Lupinus* sp.

Para cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Escherichia coli* (ATCC 11775) os repiques de 72 horas incubados a 37 °C, foram transferidos para solução fisiológica para o preparo dos inóculos a 1% (v/v) em meio Grove-Randall n° 11.

As amostras testadas, branco e controle foram aplicadas em cromatoplaça. Água estéril foi utilizada como branco e tetraciclina (100 µg/mL) como controle. Foram utilizados 10 mL de meio inoculado para a cobertura das cromatoplaças dispostas nas placas de Petri.

As placas de *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* 928 e 938 foram incubadas por uma semana a 37 °C, as placas inoculadas com *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foram incubadas por 24 horas. Para visualização, as placas receberam solução (por nebulização) de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a 20 mg/mL em água estéril, seguido de incubação a 37 °C por 2 horas. Após este período observou-se a presença ou ausência do halo de inibição.

4.10.2 Atividade antifúngica

Foi utilizada cepa de *Candida albicans* a qual foi desenvolvida em tubo inclinado de ágar Sabouraud, por 48 horas a 25 °C. A partir desta sementeira, foram realizados novos repiques para 5 mL de caldo Sabouraud a fim de obter a suspensão de fungos para o preparo dos inóculos a 1% (v/v) em ágar Sabouraud.

As substâncias testadas, branco e controle foram aplicados em cromatoplaça. Água estéril foi utilizada como branco e nistatina (1,5 mg/mL) como controle. Foram utilizados 16 mL do meio inoculado para a cobertura das cromatoplaças dispostas em placas de Petri.

As placas foram incubadas por 72 horas a 35 °C. Para a visualização, as placas receberam (por nebulização) solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a 20 mg/mL em água estéril, seguido de incubação a 25 °C por 1 hora. Após este período observou-se a presença ou ausência de halo de inibição.

4.11 Determinação da atividade antioxidante

Os isolados LL1, LL10, LL11 e o extrato diclorometano nódulos foram analisados quanto à atividade antioxidante frente a 2,2 difenil-1 picrilhidrazil (DPPH).

A análise das amostras foi realizada aplicando-se 10 µL de uma solução 1 mg/mL para os isolados e 5 mg/mL para a fração diclorometano nódulos sobre cromatoplaça de gel de sílica Merk® GF₂₅₄ utilizando-se como eluente CHCl₃/MeOH (95/5).

A cromatoplaça foi revelada com solução metanólica de DPPH a 0,2 %. A atividade antioxidante evidencia-se com a presença de manchas amarelas contra a coloração púrpura de fundo (CAVIN *et al.*, 1998).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

A massa total das partes do vegetal empregadas neste trabalho encontra-se na **Tabela 5**.

Tabela 5: Massa das partes do vegetal.

Parte do vegetal	Massa (g)
Folha	2122,5
Raiz	103,3
Legume	579,39
Nódulo	42,13
Flor	279,77
Folha lavada	1,00*

*Massa do extrato obtido após a lavagem das folhas.

Na **Tabela 6** encontra-se a massa das substâncias obtidas.

Tabela 6: Massa obtida dos isolados

Substância	Massa (mg)
LL1	42,0
LL4	6,7
LL5	4,5
LL7	10,2
LL8	5,7
LL9	18,6
LL10	15,9*
LL11	7,1*

*Quantidades obtidas a partir de parte do extrato inicial (n-BuOH)

Devido ao baixo rendimento de LL4 e LL5, não foram submetidos a métodos espectroscópicos e espectrométricos.

5.1 Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos diclorometano e folha lavada

A análise em cromatoplaça dos extratos diclorometano e folha lavada utilizando o sistema eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na proporção 99/1 e revelada sob luz UV (254 nm) indica na fração folha lavada a presença de duas manchas com Rfs 0,85 e 0,90, que estão ausentes ou em pequenas concentrações nos demais extratos. Nota-se uma mancha com Rf 0,55 muito intensa na fração nódulo, presente na raiz e na folha, porém ausente ou em pequena concentração nos demais extratos. O extrato da raiz apresentou uma mancha com Rf 0,72 ausente ou em pequena concentração nos demais extratos. Destaca-se também, a ausência de manchas com Rfs superiores a 0,30 nas frações legumes e flores.

5.2. Identificação da substância LL1

A substância LL1 obtida do extrato butanólico das flores, se apresenta na forma de pó amarelo insolúvel em CHCl_3 , pouco solúvel em MeOH e solúvel em DMSO. Os espectros desta substância encontram-se no **Anexo 2**.

5.2.1 Espectroscopia na Região do Ultravioleta da substância LL1

O espectro medido em solução metanólica indica máximos de absorção em 270 e 328 nm, o que corresponde respectivamente às bandas II e I. Este dado indica ser a substância uma estrutura do tipo flavona (MABRY *et al.*, 1970). A adição de hidróxido de sódio provoca um deslocamento batocrômico de 54 nm, porém com uma pequena diminuição de intensidade sugerindo que a posição 4' possui uma hidroxila substituída. O deslocamento batocrômico de 56 nm da banda I observado pela adição de cloreto de alumínio e a permanência seguida da adição de ácido clorídrico sugere uma hidroxila livre na posição 5. A adição de acetato de sódio provoca um deslocamento batocrômico de 10 nm na banda II, sugerindo que a posição 7 possui uma hidroxila livre. Após a adição de ácido bórico, o espectro torna-se muito

semelhante ao metanólico, sugerindo que a estrutura não possui hidroxilas vicinais no anel B (**Figura 13**) (SANTOS, 1989).

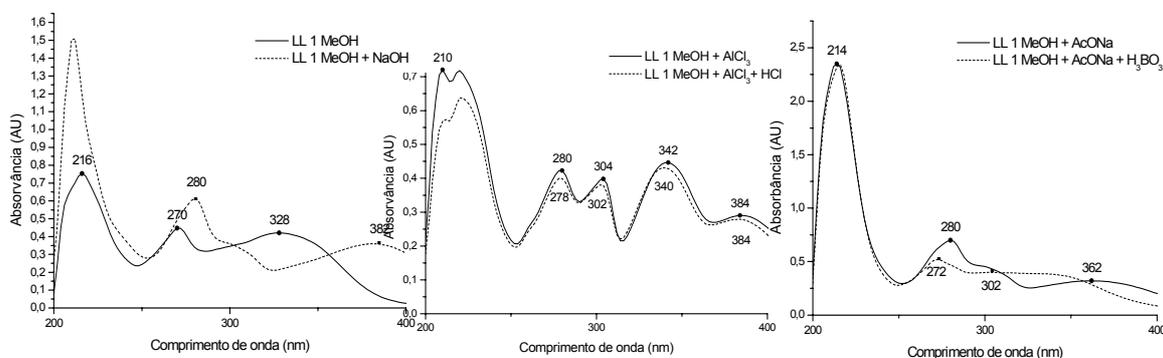


Figura 13: Deslocamentos na região do UV observados para a substância LL1.

5.2.2 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^1H da substância LL1

No espectro da substância LL1 (em DMSO-d_6) são observados os seguintes sinais (em ppm): δ 3,2 -3,9 (*m*, glicosídeo), 3,8 (3H, *s*, OCH_3), 4,7 (1H, *d*, $J = 9$ Hz, $\text{H1}''$), 6,2 (1H, *s*, H6), 6,8 (1H, *s*, H3), 7,0 (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz, $\text{H3}'$ e $\text{H5}'$), 8,1 (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz, $\text{H2}'$ e $\text{H6}'$) e 13,1 (1H, *s*, 5-OH).

A análise dos destes sinais sugere a presença de um açúcar (δ 3,2 – 3,7) ligado a aglicona em posição β ($J = 9$ Hz, MARKHAM, 1989), o anel B de um flavonóide *p*-substituído (δ 7,0 e 8,1 $J = 8,0$ Hz) e os singletos (δ 6,2, 6,8 e 13,1) um estrutura do tipo 5-hidroxiavona-8- β -C-glicosídeo.

5.2.3 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C da substância LL1

Os seguintes sinais em ppm são observados (em DMSO-d_6): δ 55,56 (OCH_3), 61,27 ($\text{C6}''$), 70,51 ($\text{C4}''$), 70,90 ($\text{C2}''$), 73,40 ($\text{C1}''$), 78,68 ($\text{C3}''$),

81,85 (C5''), 98,23 (C6), 103,14 (C3), 104,11 (C10), 104,65 (C8), 114,42 (C2'), 115,82 (C5'), 123,23 (C1'), 128,82 (C3'), 128,94 (C5'), 156,04 (C9), 160,41 (C5), 162,32 (C4'), 162,69 (C7), 163,52 (C2) e 182,10 (C4).

Comparando-se o subespectro DEPT 135° com o de RMN ¹³C, os carbonos podem ser discriminados em CH₃, CH₂, CH e Cq, onde os sinais voltados para cima (↑) correspondem a CH₃, que surgem em campo alto e CH que surgem em campo baixo, os carbonos CH₂ surgem com sinais voltados para baixo (↓) e os Cq não aparecem.

Estes sinais corroboram as atribuições dadas ao espectro RMN ¹³C, e são os seguintes (em ppm): δ 55,56 (CH₃, ↑), 61, 27 (CH₂, ↓), 70,52, 70,90 , 73,40, 78,68, 81,86 (CH, ↑ insaturados), 98,23, 103,14, 114,42, 115,82, 128,82 (CH, ↑ aromáticos).

A existência de seis sinais entre δ 60 – 81 ppm (sendo δ = 61,27 CH₂), podemos inferir a presença de uma glicose. O deslocamento de 10 ppm para campo mais baixo do C8, corrobora a existência de uma 8-C-glicose (MARKHAM, 1989).

5.2.4 Análise por Espectrometria de Massas da substância LL1

Pode-se observar o pico do íon molecular do composto em m/z 446 [M⁺] (1,46 %) e pico base m/z 65. Outras fragmentações importantes encontrados foram m/z (%): 284 (1,46), 256 (4,59), 236 (1,84), 213 (1,47), 193 (5,66), 165 (3,72), 149 (3,23), 135 (1,07) 129 (4,48), 111 (3,82), 84 (84,26), 65 (100).

A massa de m/z 284 pode ser atribuída à aglicona (perda de C-glicose). Os anéis A e B podem ser detectados por m/z 165 e 135, respectivamente, correspondentes à clivagem retro-Diels-Alder da flavona (MABRY e MARKHAM, 1975).

A fórmula molecular proposta para esta substância é C₂₂H₂₂O₁₀.

Comparando-se os resultados obtidos para a aglicona (**Tabela 7**) e para a parte osídica (**Tabela 8**) como os da literatura, podemos inferir que a substância LL1 trata-se da flavona 8- β -C-glicosilada citosósideo (**Figura 14**), isolada de *Lupinus arboreus* por NICHOLLS e BOHM (1979).

Tabela 7: Deslocamentos químicos do ^1H (em ppm) de LL1 comparados com a literatura.

Atribuição	LL1 (em DMSO- d_6)	SHARAF <i>et al.</i> , 1997 (em DMSO- d_6)
5-OH	13,1	-
H2' e H6'	8,1 $dJ = 8$ Hz	7,9 $dJ = 9$ Hz
H3' e H5'	7,0 $dJ = 8$ Hz	7,0 $dJ = 9$ Hz
H3	6,8	6,75
H6	6,2	6,44
H1''	4,7 $dJ = 9$ Hz	5,2 $dJ = 7$ Hz
OCH ₃	3,8	3,8
açúcar	3,2 – 3,9	-

Tabela 8: Deslocamentos químicos do ^{13}C (em ppm) de uma 8-C- β -glicose, comparados com LL1.

Atribuição	LL1 (em DMSO- d_6)	SHARAF <i>et al.</i> , 1997 (em DMSO- d_6)
C1''	73,40	73,9
C2''	70,90	71,4
C3''	78,68	78,8
C4''	70,51	70,4
C5''	81,85	81,4
C6''	61,27	61,5

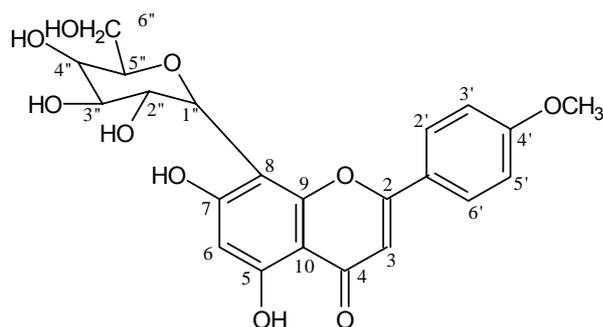


Figura 14: Substância LL1, flavona citosósideo,

5.3 Identificação da substância LL7

A substância LL7 isolada a partir do extrato diclorometano da raiz, apresenta-se como um pó escuro solúvel em clorofórmio. Os espectros da mesma encontram-se no **Anexo 3**.

5.3.1 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^1H da substância LL7

O espectro da substância LL7 (em CDCl_3) apresenta os seguintes sinais (em ppm): δ 0,8 (*m*), 1,1 (*s*), 3,8 (*s*, OCH_3), 4,1 (*t*), 5,7 (*d*, $J = 2$ Hz), 6,2 (*d*, $J = 15,9$ Hz), 6,8 (*d*, $J = 7,9$ Hz), 6,9 (*s*), 7,0 (*d*, $J = 7,8$ Hz), 7,5 (*d*, $J = 15,4$ Hz).

Observando o espectro da substância LL7, pode-se inferir a presença de uma metoxila (δ 3,8) e determinar uma constante de acoplamento característico de uma olefina em posição *trans* ($J = 15$ Hz). Comparando com dados da literatura (**Tabela 9**), pode-se sugerir que parte da estrutura é o ácido cafeico.

Tabela 9: Deslocamentos químicos de LL7 (em ppm) comparados com a literatura.

Atribuição	LL7 (em CDCl_3)	CHUDA <i>et al.</i> , 1996 (em Acetona- d_6)
2	7,0 <i>s</i>	7,1 <i>d</i> = 2,1 Hz
5	6,8 <i>d</i> $J = 7,9$ Hz	6,8 <i>d</i> $J = 8,2$ Hz
6	7,0 <i>d</i> $J = 7,8$ Hz	7,0 <i>d</i> $J = 8,2$ Hz
7	7,5 <i>d</i> $J = 15,4$ Hz	7,5 <i>d</i> $J = 16,0$ Hz
8	6,2 <i>d</i> $J = 15,9$ Hz	6,2 <i>d</i> $J = 16,0$ Hz

5.3.2 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C da substância LL7

Os seguintes sinais (em ppm) são observados no espectro de LL7 (em CDCl_3): δ 14,16, 22,73, 26,03, 28,80, 29,34, 31,95, 55,95 (OCH_3), 64,64,

109,26, 112,72, 113,80, 114,68 (C8), 115,67 (C2), 116,90 (C5), 123,04 (C6), 125,57, 127,04 (C1), 143,61 (C4), 144,61, 146,72 (C6), 147,86 (C7), 167,38 (C9).

Devido à ausência de um sinal acima de 180 ppm, descarta-se a possibilidade de tratar-se de um flavonóide. Os dados obtidos com os da literatura (**Tabela 10**) corroboram a existência do ácido cafeico (**Figura 15**).

Tabela 10: Comparativo dos deslocamentos químicos (em ppm) de LL7 com a literatura.

Atribuição	LL7 (em CDCl ₃)	RAVN <i>et al.</i> , 1990 (em CD ₃ OH)
1	127,04	127,5
2	115,67	115,2
3	146,72	146,6
4	143,61	149,5
5	116,90	116,4
6	123,04	123,0
7	147,86	147,8
8	114,68	114,6
9	167,38	168,2

Existem ainda, cinco sinais (sendo que um deles pode ter intensidade 2) em campo baixo (δ 109,26, 112,72, 113,80, 114,68, 125,57, 144,61) que sugerem a presença de um anel aromático.

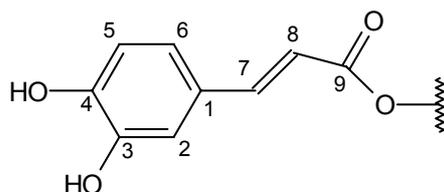


Figura 15: Cafeato, parte da estrutura proposta para LL7.

5.4 Identificação da substância LL8

Esta substância foi isolada a partir do extrato diclorometano dos nódulos e apresenta-se como pó de coloração escura solúvel em clorofórmio e metanol. Os espectros se encontram no **Anexo 4**.

5.4.1 Espectroscopia na Região do Ultravioleta da substância LL8

O espectro da substância LL8 medido em solução metanólica indica um máximo de absorção em 270 nm, característico para estruturas do tipo isoflavonóide (MABRY *et al.*, 1970).

5.4.2 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^1H da substância LL8

No espectro da substância LL8 (em CDCl_3) são observados os seguintes sinais (em ppm): δ 1,2 (6H, *d*, $J = 3,85$ Hz, H5'' e H5'''), 1,8 (6H, *s*, H4'' e H4'''), 3,5 (4H, *m*, H1'' e H1'''), 5,3 (2H, *m*, H2'' e H3''') 6,5 (2H, *m*, H5' e H8), 6,8 (1H, *d*, $J = 8$ Hz, H6'), 8,3 (1H, *s*, OH), 12,6 (1H, *s*, 5-OH).

Analisando estes sinais, pode-se perceber a existência de quatro metilas (dubleto a δ 1,7 e singleto a δ 1,8), duas insaturações (multiplete a δ 5,3) e duas saturações (multiplete a δ 3,4) sugerindo dois grupamentos prenila. Observam-se também sinais característicos como hidroxila livre na posição 5 (singleto a δ 12,6), o hidrogênio da posição 2 (singleto a δ 8,3) o que sugere uma estrutura do tipo 5-hidroxi-isoflavona.

5.4.3 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C da substância LL8

Os sinais em ppm da substância LL8 medidos em CDCl_3 são os seguintes: δ 20,31 (C5'''), 20,36 (C5''), 24,00 (C1''), 25,32 (C1'''), 28,21 (C4'''), 28,24 (C4''), 96,54 (C8), 107,59 (C10), 107,62 (C5'), 111,33 (C1'), 113,17 (C6), 115,60 (C3'), 119,40 (C3), 123,08 (C2'''), 124,22 (C2''), 130,30 (C6'), 137,16 (C3'''), 138,80 (C3''), 156,55 (C2), 156,90 (C4'), 158,18 (C9), 159,34 (C2'), 161,62 (C5), 164,25 (C7), 180,40 (C4).

Os quatro sinais em campo alto (δ 20,3, 20,3, 24,0, 28,2), juntamente com os sinais sugeridos no espectro na frequência do ^1H , e os

dados obtidos na literatura (HARBORNE e MABRY, 1982), corroboram a existência de dois grupamentos prenila. Comparando os dados obtidos com a literatura (**Tabela 11**) podemos inferir que a substância LL8 trata-se da isoflavona diprenilada angustona A (**Figura 16**), já isolada de *L. albus* por TAHARA e colaboradores (1984).

Tabela 11: Quadro comparativo dos deslocamentos químicos (em ppm) da substância LL8 e literatura. Na última linha, os máximos de absorção na região do UV medidos em solução metanólica.

Atribuição	LL8 (em CDCl ₃)	LANE e NEWMAN (1987) (em DMSO-d ₆)
5-OH	12,69 s	13,0 s
OH	8,31 s	8,18 s
H2	7,94 s	8,09 s
H6'	6,89 d J = 8,4 Hz	6,77 d J = 8 Hz
H8	6,50 m	6,47 s
H5'	6,50 m*	6,38 d J = 8 Hz
H2'' e H2'''	5,29 m	5,19 m
H1'' e H1'''	3,51 m	3,30 m
H4'' e H4'''	1,84 s	1,74 s
H5'' e H5'''	1,25 s	1,65 s
UV	270 nm	269 nm

* É possível encontrar uma constante de acoplamento de 8 Hz.

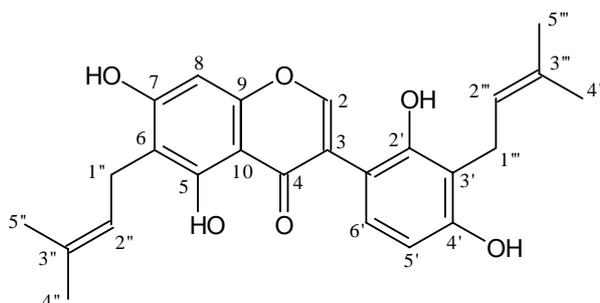


Figura 16: substância LL8 isolada do nódulo de *L. lanatus*. Trata-se da isoflavona angustona A (5, 7, 2', 4' – tetraidroxi – 6 – 3' – di(3, 3-dimetilalil) isoflavona).

5.5 Identificação da substância LL9

A substância LL9 obtida do extrato butanólico das folhas, apresenta-se como um pó amarelo insolúvel em clorofórmio e pouco solúvel em metanol. O mesmo foi submetido a CLAE para verificar sua pureza, o que

sugeriu que esta substância poderia ser LL1, portanto, estas foram coinjetadas. Por possuírem o mesmo tempo de retenção, podemos inferir que LL9 trata-se de LL1 (citisosídeo). No **Anexo 5** encontra-se o cromatograma da coinjeção, bem como os cromatogramas de LL1 e LL9 sobrepostos após 4 injeções.

5.6 Identificação da substância LL10

Esta substância foi obtida do precipitado do extrato butanólico das folhas e apresenta-se como um pó amarelo insolúvel em clorofórmio, relativamente solúvel em metanol e solúvel em DMSO. Os espectros encontram-se no **Anexo 6**.

5.6.1 Espectroscopia na Região do Ultravioleta da substância LL10

A análise do espectro da substância LL10 medido em solução metanólica indica dois máximos de absorção, um a 270 (banda II) e outro à 334 nm (banda I). Este perfil de absorção sugere tratar-se de uma estrutura do tipo flavona (MABRY *et al.*, 1970). Adicionando-se hidróxido de sódio a solução metanólica observa-se um deslocamento batocrômico de 52 nm sem perda na intensidade da absorção, sugerindo uma hidroxila livre na posição 4'. A adição de cloreto de alumínio provoca um deslocamento batocrômico de 50 nm com permanência seguido de adição ácido clorídrico, o que indica uma hidroxila livre na posição 5. A adição de acetato de sódio a solução metanólica provoca um deslocamento batocrômico de 10 nm na banda II, o que sugere uma hidroxila livre na posição 7. Após a adição de ácido bórico à solução, o espectro torna-se semelhante ao metanólico sugerindo ausência de grupamento orto-hidroxila no anel B (**Figura 17**) (SANTOS, 1989).

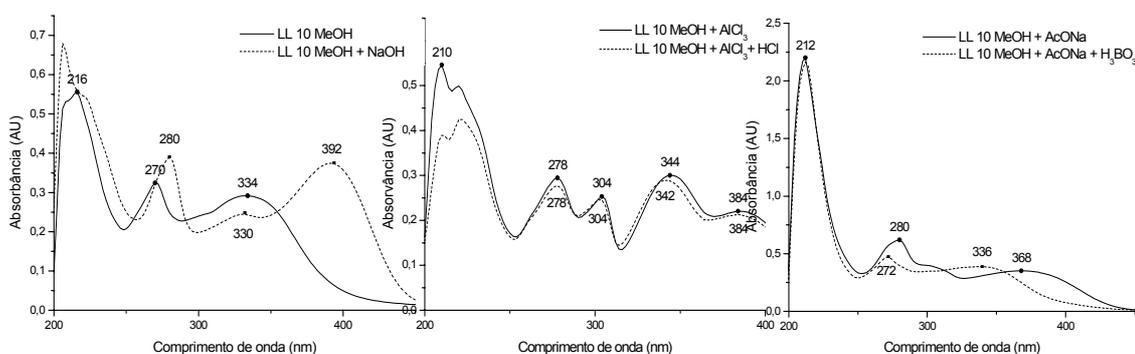


Figura 17: Deslocamentos observados na região do UV para a substância LL10.

5.6.2 *Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^1H da substância LL10*

No espectro da substância LL10 (em DMSO- d_6) podem ser observados os seguintes sinais (em ppm): δ 1,2 (sinal ocluso em região de vários sinais), 3,1 – 3,8 (*m*, glicosídeo), 4,6 (1H, *s*, H1''), 4,7 (1H, *s*, H1'''), 6,0 (1H, *s*, H6), 6,5 (1H, *s*, H3), 6,8 (2H, *d*, $J = 7,9$ Hz, H3' e H5'), 7,9 (2H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H2' e H6'), 13,0 (1H, *s*, 5-OH).

Na análise do espectro da substância LL10, nota-se uma grande semelhança com o espectro da substância LL1 porém, com ausência de um sinal forte em δ 3, 8 ppm, sugerindo que a estrutura não possui metoxila. Nota-se um sinal em campo alto (δ 1,2) sugerindo a presença de uma metila. A integração do sinal na região dos açúcares (δ 3,1 – 3,8), sugere tratar-se de um di-heterosídeo (soma da integração dos sinais correspondentes a dois monossacarídeos). Portanto, pode-se inferir que substância trata-se de uma flavona 8-C-diglicosídeo com uma hidroxila livre na posição 4'.

5.6.3 *Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C da substância LL10*

Os seguintes sinais (em ppm) podem ser observados no espectro da substância LL10 (em DMSO- d_6): δ 22,04 (C''6), 60,21 (C''6), 67,66 (C''5), 68,30 (C''2), 69,96 (C''3), 71,05 (C''4), 72,23 (C''4), 72,47 (C''2), 73,92 (C''1), 78,94 (C''3), 81,37 (C''5), 101,69 (C''1), 104,87 (C10), 104,90 (C8), 115,94 (C3' e 5'), 121,44 (C1'), 128,37 (C2' e 6'), 156,33 (C9), 160,30 (C5), 161,61 (C4'), 162,75 (C2), 180,83 (C4).

5.6.4 *Análise por Espectrometria de Massas da substância LL10*

Não é possível identificar o pico do íon molecular, entretanto os seguintes sinais podem ser observados m/z (%): 529 (< 1), 446 (1,39), 386 (1,43), 368 (1,75), 313 (3,50), 293 (6,17), 279 (14,02), 270 (4,11), 256 (5,75),

236 (3,50), 219 (5,29), 185 (3,64), 167 (26,33), 165 (3,67), 149 (97,38), 129 (10,72), 121 (8,57), 111 (15,27), 97(27,25), 84 (58,09), 69 (58,71), 57 (100).

A massa de m/z 270 pode ser atribuída a aglicona (perda de C-glicose), já o anés A e B podem ser detectado pelos sinais a m/z 165 e 121 respectivamente, correspondentes à clivagem retro-Diels-Alder da aglicona (MABRY e MARKHAM, 1975).

A partir destes resultados é proposta a estrutura para o LL10 do ramnosil-O-vitexina (**Figura 18**).

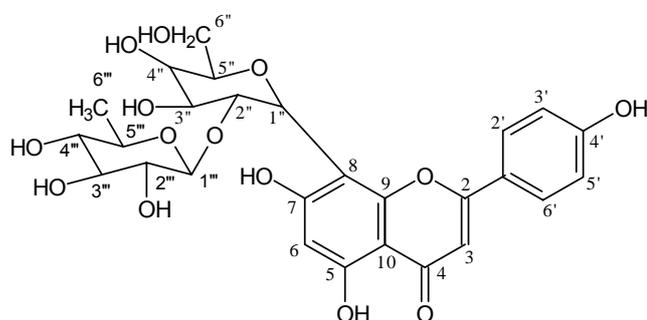


Figura 18: Estrutura proposta para LL10, ramnosil-O-vitexina.

5.7 Identificação da substância LL11

A substância LL11 obtida a partir do extrato diclorometano das folhas, apresenta-se na forma de pó amarelo insolúvel em CHCl_3 , pouco solúvel em MeOH e solúvel em DMSO. Os espectros desta substância encontram-se no **Anexo 7**.

5.7.1 Espectroscopia na Região do Ultravioleta da substância LL11

A análise do espectro da substância LL11 em solução metanólica indica dois máximos de absorção em 324 e 272 nm, correspondentes à banda I e II respectivamente sugerindo uma estrutura do tipo flavona (MABRY *et al.*, 1970). A adição de hidróxido de sódio a solução metanólica, provoca um deslocamento batocrômico de 26 nm na banda I com perda na intensidade da absorção, sugerindo que a hidroxila na posição 4' encontra-se substituída.

Adicionando-se cloreto de alumínio a solução metanólica ocorre deslocamento batocrômico de 58 nm na banda I com permanência após a adição de ácido clorídrico, indicando uma hidroxila na posição 5. A adição de acetato de sódio a solução metanólica provoca um deslocamento de 8 nm na banda II indicando que a posição 7 possui uma hidroxila livre. Após a adição de ácido bórico o espectro torna-se semelhante ao metanólico, sugerindo que a estrutura não possui hidroxilas vicinais (**Figura 19**) (SANTOS, 1989)

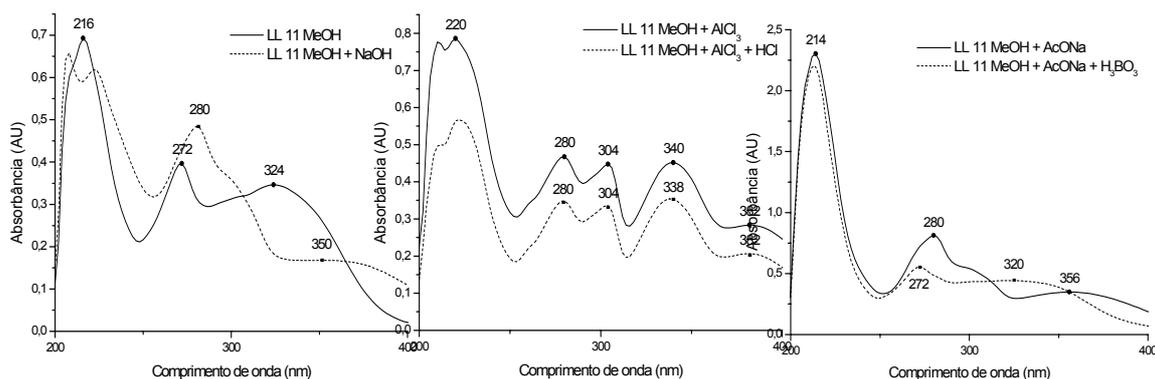


Figura 19: Deslocamentos químicos na região do UV encontrados para o isolado LL11.

5.7.2 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^1H da substância LL11

No espectro de RMN ^1H da substância LL11 em DMSO- d_6 , são observados os seguintes sinais (em ppm): δ 1,23 (sinal ocluído em região de vários sinais), 3,2-4,0 (*m*, glicosídeo), 3,84 (3H, *s*, OCH₃), 4,74 (1H, *d*, $J = 7,96$ Hz, H1''), 5,56 (1H, *d*, $J = 8,28$ Hz, H1'''), 5,83 (1H, *s*, H6), 6,56 (1H, *s*, H3), 7,05 (2H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H2' e H6'), 8,03 (2H, *d*, $J = 8,1$ Hz, H3' e H6'), 13,50 (1H, *s*, 5-OH).

A análise do espectro de RMN ^1H da substância LL11 é semelhante ao da LL1 porém, pode-se nota-se um sinal em campo alto (δ 1,23) sugerindo a presença de uma metila. A integração do sinal na região dos açúcares (δ 3,2 – 4,0) sugere a presença de duas unidades osídicas. Portanto,

pode-se inferir que o isolado LL11 trata-se de uma flavona 8-C-diglicosídeo substituída na posição 4'.

5.7.3 *Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C da substância LL11*

Os seguintes sinais em ppm são observados (em DMSO- d_6): δ 14,08 (C''6), 55,43 (OCH₃), 61,08 (C''6), 70,50 (C''4), 70,64 (C''2), 71,24 (C''4), 74,16 (C''2), 74,42 (C''3), 79,00 (C''3), 81,46 (C''5), 102,48 (C''1), 114,26 (C3' e 5'), 124,05 (C1'), 128,12 (C2' e 6'), 156,30 (C9), 160,03 (C5), 161,64 (C'4), 180,80 (C4).

5.7.4 *Análise por Espectrometria de Massas da substância LL11*

Como para a substância LL10, não é possível identificar o pico do íon molecular. Contudo, os seguintes sinais podem ser observados m/z (%): 550 (< 1), 536 (< 1), 508 (< 1), 480 (< 1), 463 (< 1), 446 (1,00), 420 (1,06), 386 (1,06), 368 (5,69), 284 (3,43), 256 (9,39), 236 (7,16), 213 (3,86), 185 (3,92), 149 (2,02), 165 (2,98), 135 (7,48), 129 (10,46), 111 (17,70), 97 (34,05), 84 (54,60), 69 (57,31), 57 (100).

Assim como para a substância LL1, podem ser atribuídos os sinais m/z 284 a aglicona (perda de C-glicose) bem como os sinais m/z 165 e 135 referentes aos anéis A e B, respectivamente, resultantes da clivagem retro-Diels-Alder da flavona (MABRY e MARHAM, *et al.*, 1975). Com base nos resultados, é proposta a estrutura do ramnosil-O-citiosídeo para o isolado LL11 (**Figura 20**).

Como a fragmentação inicial de C-glicosídeos refere-se a porção osídica, tendo o pico do íon molecular muitas vezes ausente ou um sinal muito fraco (CHOPIN e BOUILLANT, 1975), provavelmente o pico a m/z 446, comum aos espectros das três flavonas, seja uma interferência. Este sinal coincidentemente é o pico do íon molecular de LL1 e de um fragmento de LL11.

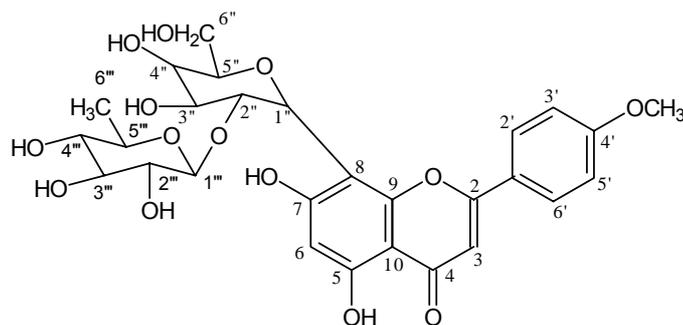


Figura 20: Estrutura proposta para a flavona LL11, ramossil-O-citiosídeo.

5.8 Determinação dos açúcares por cromatografia em camada delgada

A análise por HPTLC dos hidrolisados de LL10 e LL11 frente a referências de galactose, glicose e ramnose, indica a presença de ramnose (Rf 0,14) nestes hidrolisados. Desta forma, este resultado sugere que a glicose está ligada diretamente a aglicona, em ligação C-heterosídeo, não rompida por este método.

5.9 Cromatografia em camada delgada de LL1, LL10 e extratos butanólicos

A análise por CCD dos isolados LL1 e LL10 frente aos extratos butanólicos, indica a presença de LL1 nas folhas, precipitado das folhas, flores e legumes, estando ausente nos nódulos, precipitado dos nódulos e raízes. A substância codificada por LL10, está presente nas folhas, precipitado folhas, flores e raízes, estando ausente nos nódulos, precipitado dos nódulos e legumes. A **Tabela 12**, esquematiza o perfil dos extratos.

Tabela 12: Perfil dos extratos butanólicos e precipitados frente aos compostos isolados

	Folhas	PPT folhas	Flores	Nódulos	PPT nódulos	Raízes	Legume
LL1	+	+	+	-	-	-	+
LL10	+	+	+	-	-	+	-

5.10 Cromatografia em camada delgada de LL11 e extratos diclorometano

Analisando por CCD analítica a substância LL11 e extratos diclorometano, pode-se observar que o isolado está presente nos extratos folhas, flores e legumes, estando ausente nas raízes e nódulos.

5.11 Avaliação da atividade antimicrobiana de LL1, LL10 e LL11

O resultado desta avaliação encontra-se na **Tabela 13**. Nenhum dos isolados testados demonstrou atividade antimicrobiana pelo método da bioautografia frente a bactérias do solo. O resultado é caracterizado pela presença (+) ou ausência (-) de halo de inibição.

Tabela 13: Atividade antimicrobiana dos isolados.

	<i>B. SEMIA 928</i>	<i>B. SEMIA 938</i>	<i>Agrobacterium C5</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
LL1	-	-	-	-	-	-	-
LL10	-	-	-	+	+	+	-
LL11	-	-	-	-	-	-	-

5.12 Avaliação da atividade antioxidante de LL1, LL10, LL11 e fração diclorometano nódulos

Os isolados LL10 e LL11 não apresentaram atividade antioxidante frente a DPPH quando 10 µg (10 µL de uma solução metanólica 1 mg/mL) foram aplicados na cromatoplaça, entretanto o isolado LL1 apresentou atividade antioxidante quando aplicado na mesma concentração. Já o extrato

diclorometano nódulos apresenta diversos compostos com atividade antioxidante, quando eluído com este sistema (**Figura 21**).

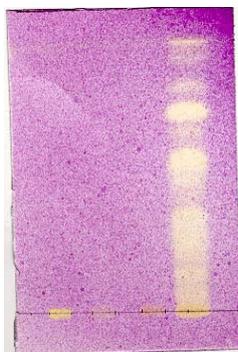


Figura 21: Cromatoplaça analítica utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95: 5) e revelada com DPPH. Da esquerda para direita LL1, LL10, LL11 (no ponto de aplicação) e extrato diclorometano nódulos com LL8 Rf 0,75. A coloração amarela indica atividade positiva.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O gênero *Lupinus* está representado no estado do Rio Grande do Sul por 13 espécies: *L. albescens*, *L. bracteolaris*, *L. gibertianus*, *L. guaraniticus*, *L. lanatus*, *L. linearis*, *L. magnistipulatus*, *L. multiflorus*, *L. paraguayensis*, *L. paranensis*, *L. rubriflorus*, *L. uleanus* e *Lupinus sp.* distribuídos em todas as regiões fisiográficas (PINHEIRO e MIOTTO, 2001). No entanto, somente de *L. albescens*, *L. gibertianus* e *L. linearis* são encontrados dados fitoquímicos referentes tão somente ao conteúdo alcaloídico (WINK *et al.*, 1995). As espécies *L. rubriflorus*, *L. uleanus* e *L. magnistipulatus* ocorrem em outras regiões do Brasil. É surpreendente que um gênero com tantas espécies e de distribuição relativamente farta em algumas regiões do estado do Rio Grande do Sul, não tenha sido estudada química e/ou biologicamente até o momento.

Compostos fenólicos presentes em vegetais têm sido relacionados como mediadores químicos entre plantas e microrganismos, com diversas funções como proteção, resistência a diferentes tipos de estresse, fixação de nitrogênio, entre outras. Dentre estes compostos, os flavonóides são aqueles de maior interesse. Isto se deve às suas atividades descritas, de mesma natureza que os demais polifenóis, mas provavelmente e sobretudo, devido à especificidade que apresentam entre o vegetal e o microrganismo, criando uma comunicação compreendida somente entre ambos.

Plantas da família das Leguminosas são de grande interesse comercial. Neste universo, o fenômeno da fixação de nitrogênio atmosférico, verificado em espécies da família, têm despertado a curiosidade de cientistas há mais de três séculos. Malpighi, em 1679, já estudava nódulos em raízes. Diversos trabalhos sucederam até que em 1886, Hellriegel sugeriu que as plantas poderiam assimilar nitrogênio atmosférico por intermédio de bactérias. Esta constatação é considerada uma das mais importantes descobertas das ciências biológicas do século XIX (QUISPEL, 1988; SCHILLING, 1988). A

implicação dos flavonóides na simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico em trabalhos mais recentes, sugerem a importância de estudos químicos em espécies da família Leguminosae, sobretudo as nativas de nosso País.

Foram isoladas da planta oito substâncias, em diferentes órgãos do vegetal. Destas, quatro (isoladas de flor, folha e nódulo, chamados LL1, LL8, LL10 e LL11) tiveram determinadas suas estruturas empregando-se técnicas espectroscópicas. Uma substância (LL7), encontrada nas raízes, não foi completamente elucidada, duas (presentes na superfície da folha, chamadas LL4 e LL5) não foram obtidas em quantidade suficiente para análises espectroscópicas e uma (LL9), isolada de folhas, verificou-se tratar de um dos flavonóides de estrutura determinada e presente na flor (LL1).

A substância codificada como LL1, isolada da fração butanólica por cromatografia, foi identificada como sendo a flavona C-glicosilada citosídeo (4'-metoxi-5,7-dihidroxi-flavona-8-C-glicosídeo). Este tipo de estrutura é característica em lupinos americanos onde aparece em grande quantidade, servindo como marcador taxonômico. A análise por cromatografia (CCD) desta flavona frente às frações butanólicas das partes do vegetal, indica a presença deste metabólito em partes aéreas, estando ausente em partes subterrâneas (raízes e nódulos). Esta distribuição talvez esteja relacionada com a proteção à radiação UV (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003), visto que este vegetal não tolera sombreamento, desenvolvendo-se em lugares abertos (GLADSTONE, 1998).

Apesar de não ter sido possível a determinação estrutural das substâncias LL4 e LL5, verificou-se que ambos encontram-se somente na superfície das folhas, analisadas por cromatografia (CCD).

O composto LL7, isolado a partir das raízes, teve sua estrutura parcialmente elucidada por RMN ^1H e RMN ^{13}C , e com base nestes dados e comparando com a literatura é possível inferir tratar-se de um derivado do ácido cafeico. Estes ácidos são relativamente comuns em quase todo o reino

vegetal, sendo descritos como fitoalexinas (TAIZ e ZEIGER, 1998). A análise em CCD revela que esta estrutura está em maior concentração nas raízes do vegetal do que nos nódulos, e ausente nas partes aéreas.

A substância codificada por LL8, isolada a partir da fração diclorometano dos nódulos, foi identificada como sendo a isoflavona angustona A, um conhecido isoflavonóide diprenilado, tendo descrita atividade antimicrobiana, de ocorrência no gênero *Lupinus* (TAHARA *et al.*; 1984). A angustona A foi primeiramente isolada por BARUAH e colaboradores (1984) nas partes aéreas de *Millettia pulchra* (Leguminosae). Esta substância, analisada por CCD, foi identificada somente nas folhas, raízes e nódulos, ausente nas flores e legumes. Esta isoflavona está descrita neste trabalho pela primeira vez em nódulos de Leguminosae.

O composto codificado como LL10, isolado de um precipitado do extrato butanólico das folhas, foi identificado por técnicas espectroscópicas como sendo ramnosil-O-vitexina.

A substância LL11 foi identificada como sendo ramnosil-O-citiosídeo. Foi observado que este flavonóide, embora apresentando duas hexoses, foi isolado de uma fração mais apolar (diclorometano), diferentemente do citiosídeo (LL1) com somente um açúcar que foi obtido a partir de fração butanólica.

Os flavonóides ramnosil-O-vitexina (LL10) e ramnosil-O-citiosídeo (LL11), de nosso conhecimento, são estruturas inéditas.

Os flavonóides citiosídeo, ramnosil-O-citiosídeo e ramnosil-O-vitexina pertencem a uma mesma rota metabólica. O núcleo fundamental para os três é o mesmo, ou seja uma flavona, possuindo diferenças na posição 4' e número de açúcares. Foi verificado por cromatografia (CCD) que citiosídeo e ramnosil-O-citiosídeo possuem o mesmo perfil de distribuição no vegetal, isto é, presentes nas folhas, flores e legumes e ausentes nas raízes. De outra parte, o ramnosil-O-vitexina também está presente nas folhas e flores, além de

raízes, mas ausente em legumes. Todos os três estão ausentes nos nódulos. As explicações para esta distribuição não são muito evidentes, necessitando estudos mais aprofundados para justificar esta distribuição na planta.

Os flavonóides isolados em *Lupinus lanatus* estão de acordo com estudos quimiotaxonômicos encontrados na literatura, uma vez que pertencem à sub-classe das flavonas (C-glicosídeos, característica de espécies de *Lupinus* americanos) e isoflavonas (WILLIAM *et al.*, 1983). Estes últimos são fortes marcadores quimiotaxonômicos da família Leguminosae. Da mesma forma, flavonas preniladas, são ubíquas em plantas do gênero *Lupinus*. Maiores discussões a cerca da importância destes metabólitos identificados neste vegetal, no contexto taxonômico das espécies de ocorrência no estado do Rio Grande do Sul, devem aguardar estudos posteriores em outras espécies do gênero.

Quanto ao ensaio do DPPH, a fração diclorometano dos nódulos apresentou diversos compostos com atividade antioxidante. Destes compostos, o único isolado neste trabalho é a angustona A, presente nesta fração diclorometano. Todas estas substâncias podem evitar o estresse oxidativo e conseqüentemente a senescência da estrutura nodular, tendo em vista que a quantidade de nódulos é proporcional ao nitrogênio fixado. Contudo, sendo o nódulo um órgão compartimentalizado, uma perspectiva interessante seria descobrir a localização destes compostos no interior do mesmo para podermos inferir sua participação como auxiliar da lego-hemoglobina, que tem como função manter baixos níveis de oxigênio onde é realizada a fixação biológica de nitrogênio. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro relato do flavonóide angustona A apresentando atividade como antioxidante.

As três flavonas C-glicosiladas no ensaio de atividade antimicrobiana pelo método da bioautografia apresentaram resultado negativo frente à levedura e bactérias gram-negativas do solo que exercem interação (tanto simbiótica como parasitária). Entretanto, em outros trabalhos, flavonas C-glicosiladas aparecem como componente de defesa (fitoalexina) em *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). Em seu estudo, MCNALLY e colaboradores (2004),

expuseram as folhas do vegetal frente ao fungo fitopatogénico *Podosphaera xanthii* e detectaram um aumento na concentração das flavonas C-glicosiladas em relação a folhas sadias.

Este é o primeiro relato da utilização do teste da bioautografia com bactérias do solo. Estes microrganismos têm como característica apresentar um tempo de geração muito lento e a formação de exopolímero. Tais características podem contribuir de forma negativa para o andamento do ensaio, favorecendo o aparecimento de contaminantes e a formação de núcleos de células durante a preparação dos inóculos. Portanto, é necessário uma otimização desta metodologia ou a escolha de uma outra, mais apropriada para a características destas bactérias, para um resultado mais conclusivo.

A flavona citisosídeo e ramnose-O-citososídeo foram testadas também frente a patógenos humanos, indicando resultado negativo tanto para bactérias gram-positivas, gram-negativas e levedura. Em seu estudo, BYLKA e colaboradores (2004) testaram a atividade de isocitososídeo (4'-metoxi-5, 7-dihidroxi-flavona-6-C-glicosídeo, isômero do citisosídeo) frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos pelo método turbidimétrico. Todos os microrganismos foram sensíveis a flavona, sendo os gram-positivos mais suscetíveis. *C. albicans* apresentou uma MIC de 125 µg/mL. Assim, o resultado negativo obtido para a flavona citisosídeo pode estar relacionado com o método adotado, ou em uma outra análise, à posição da glicose no heterosídeo que poderia interferir na atividade antimicrobiana. Desta forma, um estudo mais conclusivo sobre a relação estrutura-atividade deve ser feito, para melhor comprovar uma das hipóteses propostas.

Em outro ensaio de bioautografia, ramnose-O-vitexina exibiu atividade frente a patógenos humanos, sugerindo que a atividade se deve principalmente a presença da hidroxila na posição 4', e não com a natureza ou número de unidades de açúcar.

No ensaio do DPPH, citisosídeo apresentou atividade positiva e ramnose-O-citososídeo e ramnose-O-vitexina negativo, deste modo pode-se

inferir que a metoxila na posição 4' não está relacionada com esta atividade, e sim a presença de uma unidade glicídica (ramnose) ligada ao heterosídeo provavelmente inibe a atividade antioxidante.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

- * Foram isolados oito compostos fenólicos, sendo quatro com suas estruturas identificadas, em diferentes partes do vegetal; as flavonas: citisosídeo, das flores e folhas; ramnose-O-vitexina e ramnose-O-citososídeo das folhas; a isoflavona: angustona A, nos nódulos; um composto derivado do ácido cafeico, das raízes; e dois compostos não identificados a partir da superfície das folhas.
- * As flavonas ramnose-O-citososídeo e ramnose-O-vitexina até o momento são estruturas inéditas.
- * É o primeiro relato do isolamento da isoflavona angustona A em nódulos de Leguminosae.
- * A análise por cromatografia em camada delgada, sugere a presença de citisosídeo e ramnose-O -citososídeo, somente em partes aéreas e ramnose-O-vitexina ausente nos nódulos e legumes. O composto derivado do ácido cafeico encontra-se somente nas raízes, estando ausente nas demais partes do vegetal.
- * As flavonas C-glicosiladas aparecem como compostos característicos de *Lupinus lanatus*.
- * Na avaliação da atividade antioxidante pelo método da DPPH, ramnose-O-vitexina e ramnose-O-citososídeo apresentaram resultado negativo; citisosídeo e angustona A apresentaram resultado positivo.
- * No ensaio de bioautografia frente a bactérias do solo, nenhuma flavona C-glicosilada apresentou resultado positivo. Contudo, frente a patógenos humanos ramnose-O-vitexina apresentou resultado positivo e demais flavonas negativo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J. G. Toxins and Lupinosis. In: GLADSTONES, J. S., ATKINS, C. A., HAMBLIN, J. eds. **Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization**. Cambridge: CAB International, 1998. p. 411-435.

AUER, C. G.; SILVA, R. Fixação de nitrogênio em espécies arbóreas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. 360 p.

BACKES, A.; NARDINO, M. **Nomes Populares e Científicos das Plantas do Rio Grande do Sul**, São Leopoldo: Ed. Unisinos, 1999. 164 p.

BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v. 276, p 726-733, 1997.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. v. 2, 1991 , p. 15-100.

BARUAH, P.; BARUA, N. C.; SHARMA, R. P.; BARUAH, J.N; KULANTHAIVCEL, P.; HERZ, W. Flavonoids from *Millettia pulchra*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 443-447, 1984.

BOLAND, G. M.; DONNELLY, D. M. X. Isoflavonoids and related compounds. **Natural Products Reports**, v. 15, p. 241-260, 1998.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to Abiotic Stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Eds. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1158-1203.

BYLKA, W.; SZAUFER-HAJDRYCH, M.; MATLAWSKA, I.; GOSLINSKA, O. antimicrobial activity of isocytisoid and extracts of *Aquilegia vulgaris* L. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 93-97, 2004.

CASTILHOS, T. S. **Isoflavonas da Soja**. Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. Trabalho de Conclusão.

CAVIN, A.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W. Use of on-flow LC/ ¹H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1497-1501, 1998.

CHOPIN, J.; BOUILLANT, M. L. C-glycosylflavonoids. In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. eds. **The Flavonoids**. New York: Academic Press, 1975, v 2., p. 633-691.

CHUDA, Y.; ONO, H.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; NAGATA, T.; TSUSHIDA, T. Structural identification of two antioxidant quinic acid derivatives from garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 44, p. 2037-2039, 1996.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. Q.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 27, p. 833-840, 2003.

CONAB, 2004. (<http://www.conab.gov.br>) Data de acesso: 18/jun/2004.

COOPER, R. M.; RESENDE, M. L. V.; FLOOD, J.; ROWAN, M. G.; BEALE, M. H.; POTTER, U. Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. **Nature**, v. 379, p. 159-162, 1996.

DAKORA, F. D.; PHILLIPS, D. A. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 1-20, 1996.

DAZZO, F. B. Infection Processes in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In: Summerfield, R. T.; Bunding, A. H. eds. **Advances in Legume Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1980. p. 49-59.

DIXON, R. A.; STEELE, C. L. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 394-400, 1999.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205-211, 2002.

DOYLE, J. J. Phylogenetic perspectives on nodulation evolving views of plants and symbiotic bacteria. **Trends in Plant Science**, v. 3, n°12, p. 473-478, 1998.

FIRMIN, J. L.; WILSON, K. E.; ROSSEN, L.; JOHNSTON, A. W. B. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. **Nature**, v. 324, p. 90-92, 1986.

GIBSON, A. H. Host determinants in nodulation and nitrogen fixation. In: Summerfield, R. T.; Bunting, A. H. eds. **Advances in Legume Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1980. p. 69-75.

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, 1998. p. 1-39.

GRAYER, R. J.; HARBORNE, J. B. A Survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. **Phytochemistry**, v. 37, p 19-42, 1994.

HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 19-22, 1987.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to Plant Pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Eds. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1102-1156.

HARBORNE, J. B.; INGHAM, J. L.; KING, L. PAYNE, M. The isopentenyl isoflavone luteone as a pre-infectious antifungal agent in the genus *Lupinus*. **Phytochemistry**, v. 15, p 1485-1487, 1976.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982, 744 p.

HARTWIG, U. A.; MAXWELL, C. A.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. Chrysoeriol and luteolin released from alfafa seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v. 92, p. 116-122, 1990.

HARTWIG, U. A.; PHILLIPS, D. A. Release and modification of *nod*-gene-inducing flavonoids from alfafa seeds. **Plant Physiology**, v. 95, p. 804-807, 1991.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34, p. 3-16, 1993.

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

HIRSCH, A. M.; LUM, M. R.; DOWNIE, J. A. What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis so Special? **Plant Physiology**, v. 127, p. 1484-1492, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J. Bactérias economizam milhões de dólares no cultivo da soja e do feijoeiro. **Artigos Embrapa: Coletânea Rumos & Debates**. Disponível no endereço: www.embrapa.br/ (data do acesso 18/jan/2003).

HUNGRIA, M.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, v. 97, p. 751-758, 1991a.

HUNGRIA, M.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, v. 97. p. 759-764, 1991b.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 18, p. 339-364, 1994.

INGHAM, J. L. Phytoalexin induction and its taxonomic significance in the Leguminosae (Subfamily Papilionoideae). In: POLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. eds. **Advances in Legume Systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p 599-626.

KAMEL, M. S. Flavone *c*-glycosides from *Lupinus hartwegii*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 449-452, 2003.

KAPE, R.; PARNISKE, M.; BRANDT, S.; WERNER, D. Isoliquiritigenin, a strong *nod* gene – and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. **Applied Environment Microbiological**, v. 58, p. 1705-1710, 1992.

KOSSLAK, R. M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H. E.; APPELBAUM, E. R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavone isolated from *Glycine max*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 84, p. 7428-7432, 1987.

LAFLAMME, P.; KHOURI, H.; GULICK, P.; IBRAHIM, R. Enzymatic prenylation of isoflavones in white lupin. **Phytochemistry**, v. 34, p. 147-151, 1993.

LANE, G. F.; NEWMAN, R. Isoflavones from *Lupinus angustifolius* root. **Phytochemistry**, v. 26, p. 295-300, 1987.

LÉON, J. **Botánica de los Cultivos Tropicales**. 2ª ed. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1987, 445 p.

LONG, S. R. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Physiology**, v. 125, p. 69-72, 2001.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R. Mass spectrometry of flavonoids. In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. eds. **The Flavonoids**. New York: Academic Press, 1975, v. 1, p. 79-126.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MACIEL, H. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. First chromosome number determinations in south-eastern South American species of *Lupinus* L.

(Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p. 395-400, 2002.

MACHADO, A. L. **Flavonóides e Simbiose Leguminosa-rizóbios**. Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. Trabalho de Conclusão.

MALEK, W. Chemotaxis in *Rhizobium meliloti* strain L5.30. **Archives of Microbiology**, v. 152, p. 611-612, 1989.

MARKHAM, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. In. DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1989. v. 1, p. 197-235.

MAXWELL, C. A.; HATWIG, V. A.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. A Chalcone and two related flavonoids released from alfafa roots induce *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v. 91, p. 842-847, 1989.

MCNALLY, D. J.; WURMS, K. V.; LABBÉ, C.; BÉLANGER, R. R. Synthesis of c-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, p. 293-303, 2004.

MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Molecular basis of the establishment and functioning of a N₂-fixing root nodule. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 612-630, 1994.

MONTEIRO, R.; MONTEIRO, R. T. R. Notes on the economic aspects of *Lupinus* L. (Leguminosae) - call for studies with the Brazilian species. **Arquives Biology Technology**, v. 29, p. 685-694, 1986.

NICHOLLS, K. W.; BOHM, B. A. Flavonoids of *Lupinus arboreus*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1078, 1979.

OSBOURN, A. E. Antimicrobial phytoprosectans and fungal pathogens: a commentary. **Fungal Genetics and Biology**, v. 26, p. 163-168, 1999.

PETERS, N. K.; FROST, J. W.; LONG, S. R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation gene. **Science**, v. 233, p. 977-980, 1986.

PETTERSON, D. S. Composition and food uses of lupins. In: GLADSTONES, J. S., ATKINS, C. A., HAMBLIN, J. eds.. **Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization**. Cambridge: CAB International, 1998. p. 353-384.

PINHEIRO, M; MIOTTO, S. T. S.; Leguminosae – Faboideae gênero *Lupinus* L. **Boletim do Instituto de Biociências** [da] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, n. 60, 2001. (Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, 27)

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultiváveis**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.6, 1984.

PUEPPKE, S. G.; BOLAÑOS-VASQUEZ, M. C.; WERNER, D.; BEC-FERTÉ, M.-P.; PROMÉ, J.-C.; KRISHNAN, H. B. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. **Plant Physiology**, v. 117, p. 599-608, 1998.

QUISPEL, A. In: **Nitrogen Fixation: Hundred Years After**. BOTHE, H.; DE BRUIJIN, F. J.; NEWTON, W. E. eds. Stuttgart: Gustav Fischer, 1988. p. 3-12.

RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 199-203, 1991.

RAVAN, H.; NISHIBE, S.; SASAHARA, M.; XUEBO, L. Phenolic compounds from *Plantago asiatica*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3627-3631, 1990.

REDMOND, J. W.; BATLEY, M.; DJORDJEVIC, M. A.; INNES, R. W.; KUEMPEL, P. L.; ROLFE, B. G. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. **Nature**, v. 323, p. 632-635, 1986.

SAHGAL, M.; JOHRI, B. N. The changing face of rhizobial systematics. **Current Science**, v. 84, p. 43-48, 2003.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin - a Text Book of Pharmacognosy**. Stockholm: Swedish Pharmaceutical, 1992, 372 p.

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.

SCHILLING, G. In: **Nitrogen Fixation: Hundred Years After**, BOTHE, H., DE BRUIJIN, F. J., NEWTON, W. E. eds. Stuttgart: Gustav Fischer, 1988. p. 13-19.

SHARAF, M.; EL-ANSARI, M. A.; MATRLIN, S. A.; SALEH, N. A. M. Four flavonoid glycosides from *Peganum harmala*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 533-536, 1997.

SHIMADA, N.; AOKI, T.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; AYABE, S. A Cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5-deoxy(iso)flavonoids in *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 131, p 941- 951, 2003.

SOULELES, C. A new Isoflavone from *Lupinus hirsutus*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 1340-1341, 1990.

SPRENT, J. I. Nodulation as a taxonomic tool. In: HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A. eds. **Advances in Legume Systematics 9**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2000, p. 21-44.

STAFFORD, H. A. Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. **The Botanical Review**, v. 63, p. 27-39, 1997.

STOUGAARD, J. Regulators and regulation of legume root nodule development. **Plant Physiology**, v. 124, p. 531-540, 2000.

STOUGAARD, J. Genetics and genomics of root symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 328-335, 2001.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996. 1000 p.

TAHARA, S.; INGHARM, J. L.; NAKAHARA, S.; MIZUTANI, J.; HARBORNE, J. B. Fungitoxic dihydrofuranoisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1889-1900, 1984.

TAHARA, S.; ORIHARA, S.; INGHAM, J. L.; MIZUTANI, J. Seventeen isoflavonoids from *Lupinus albus* roots. **Phytochemistry**, v. 28, p. 901-911, 1989.

TAHARA, S.; KATAGIRI, Y.; INGHAM, J. L.; MIZUTANI, J. Prenylated flavonoids in the roots of yellow lupin. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1261-1271, 1994.

TAHARA, S.; IBRAHIM, R. K. Prenylated isoflavonoids – an update. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1073-1094, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer Associates Eds. 1998. 792 p.

TELLO, F. T.; NAGATA, A.; SPIEGEL, W. D. Metodos de eliminacion de alcaloides en la semilla de *Lupinus mutabilis*, Sweet. **Archivos Latinoamericanos de nutricion**, v. XXX, p. 200-209, 1980.

UNKOVICH, M. J.; PATE, J. S.; ARMSTRONG, E. L.; SANFORD, P. Nitrogen economy of annual crop and pasture legumes in southwest australia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p 585-588, 1995.

VANETTEN, H. D.; MANSFIELD, J. W.; BALLEY, J. A.; FARMER, E. E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins and “phytoanticipins”. **Plant Cell**, v. 6, p. 1191-1992, 1994.

WILLIAMS, C. A.; DEMISSIE, A.; HARBORNE, J. B. Flavonoids as taxonomic markers in old world *Lupinus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 11, p. 221-231, 1983.

WILLIAMS, J. S.; COOPER, R. M. Elemental sulphur is produced by diverse plant families as a component of defence against fungal and bacterial pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, p. 3-16, 2003.

WINK, M.; MEIBNER, C.; WITTE, L. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 139-153, 1995.

WISNIEWSKI, J. P.; DELMOTTE, F. M. Modulation of carbohydrate-binding capacities and attachment ability of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) to white lupin roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 234-242, 1996.

WOLDEMICHAEL, G. M.; WINK, M. Triterpene glycosides of *Lupinus angustifolius*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 323-327, 2002.

ZAAT, S. A.; WIJFFELMAN, C. A.; MULDER, I. H.; BRUSSER, A. A. N.; LUGTENGERG, B. J. J. Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes. **Plant Physiology**, v. 86, p. 1298-1303, 1988.

ZUANAZZI, J. A.S. **Etude Structure de Alcaloides de *Nitraria billardieri* et *Taberna emontana* et de Flavonoides de la Luzerne Impliqués dans la Symbiose avec *Rhizobium meliloti***. France: Université René Descartes de Paris, 1994. Tese de doutorado.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2003. p. 577-614.

ZUANAZZI, J. A. S.; CLERGEOT, P. H.; QUIRION, J.-C.; HUSSON, H.-P.; KONDORSI, A.; RATET, P. Production of *Sinorhizobium meliloti* nod gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 184-194, 1998.

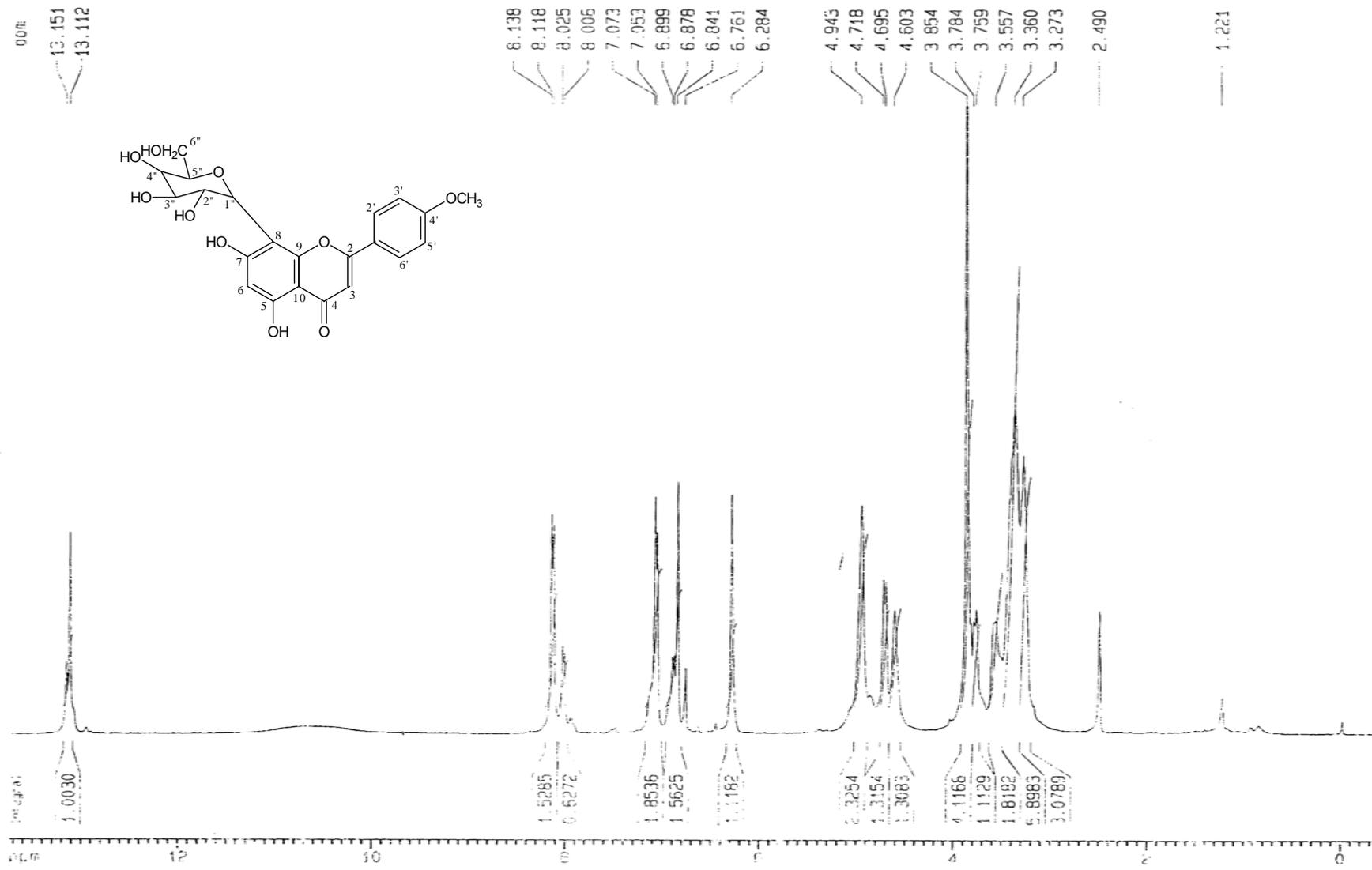
ANEXO 1

ANEXO 1

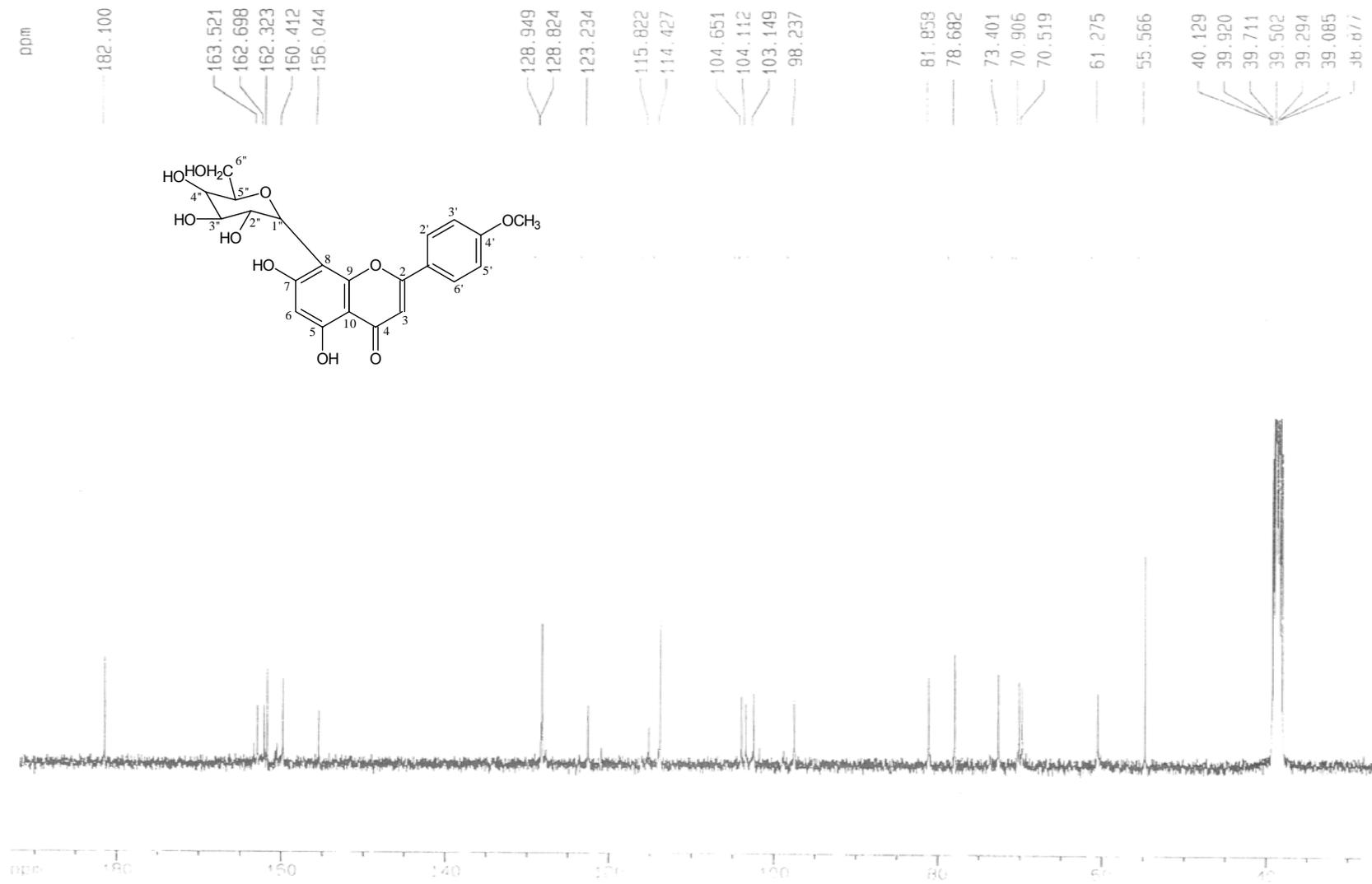
Meio Levedura-Manitol

Manitol. -----	10 g
K ₂ HPO ₄ -----	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O-----	0,2 g
NaCl-----	0,1 g
Extrato de Levedura -----	0,5 g
Ágar -----	15 g

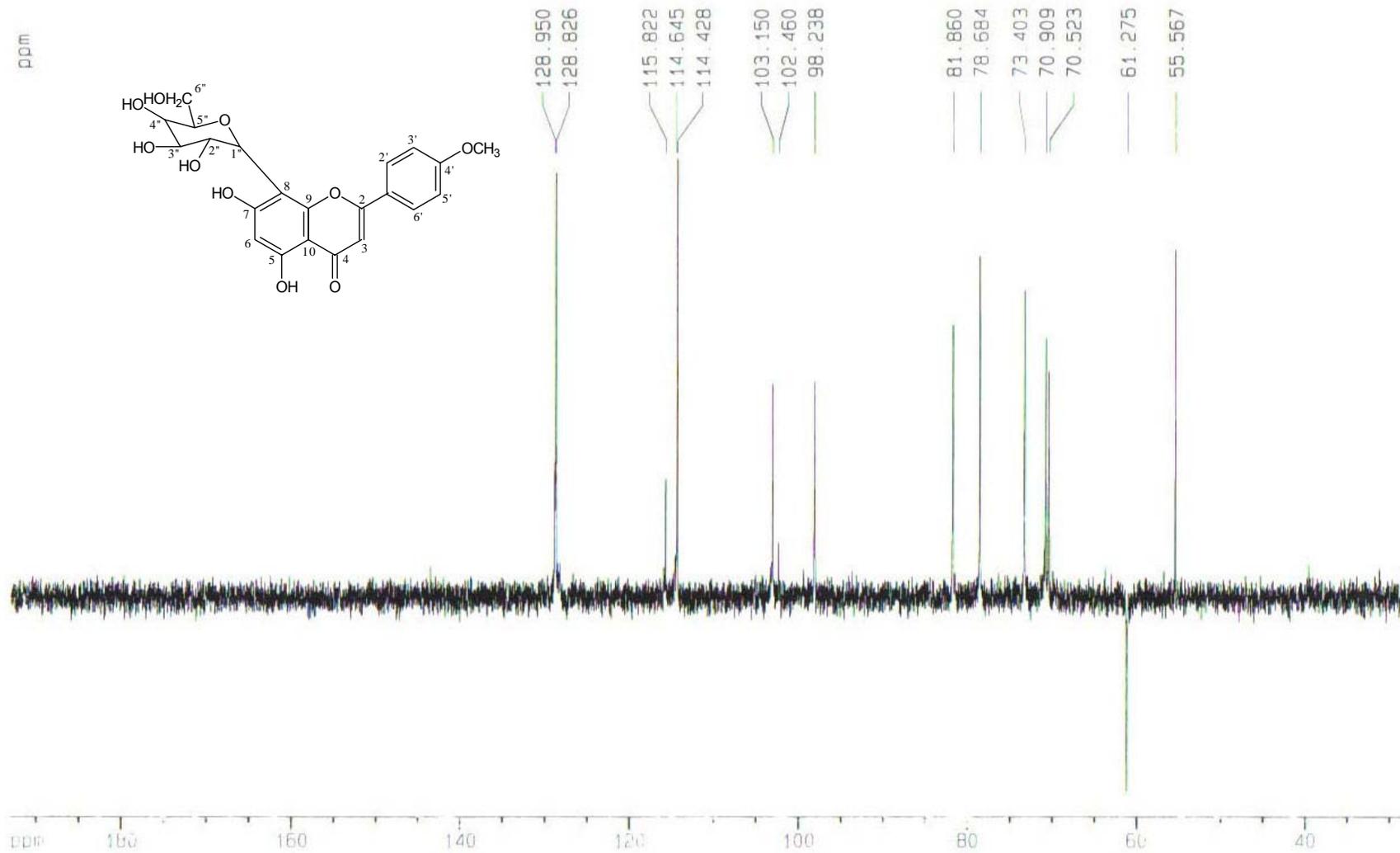
Para meio líquido não se utiliza agar.
Corrigir pH para 6,8 – 7,0 com HCl 0,1N.



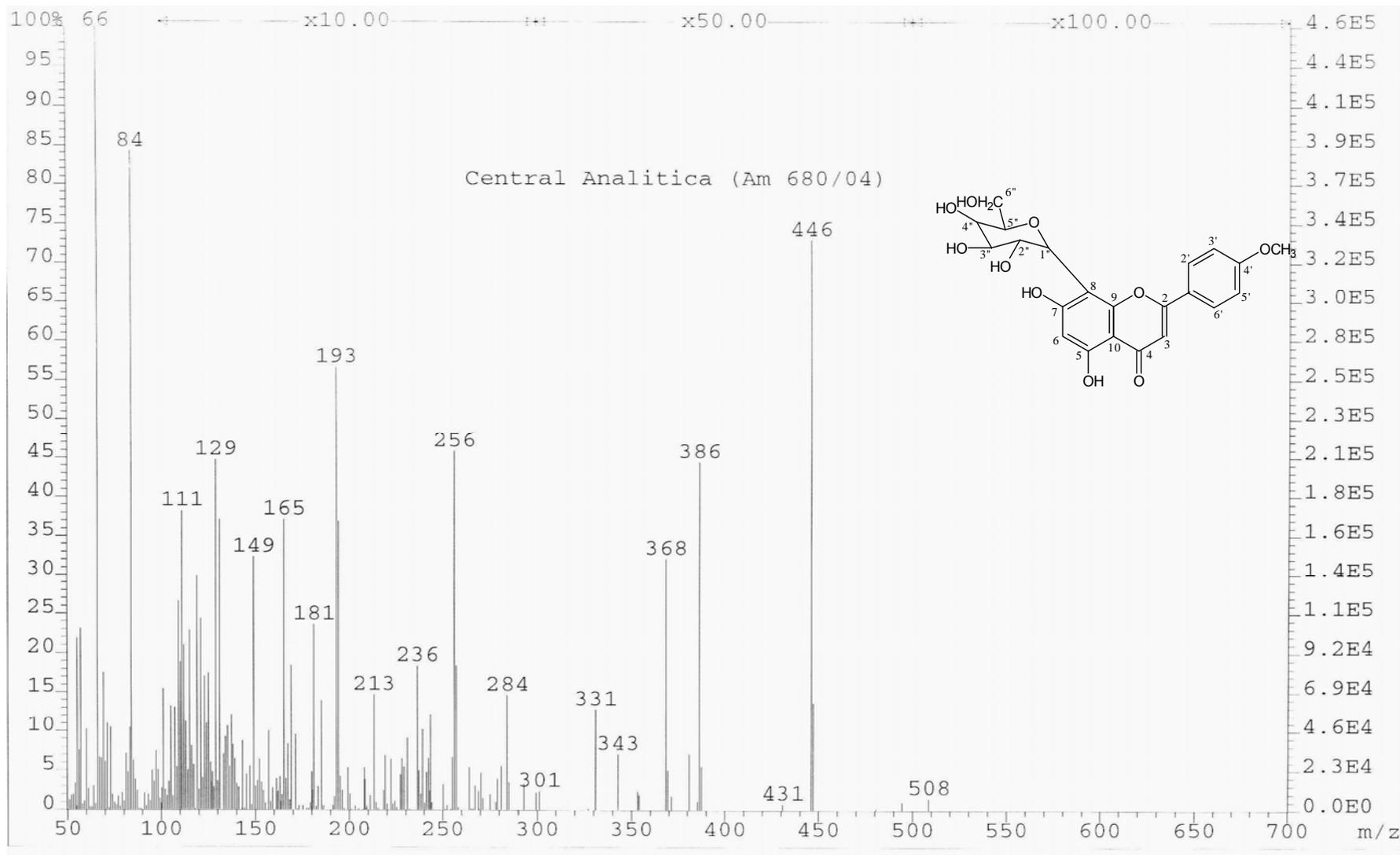
Espectro de RMN ^1H de LL1 em 400 MHz em DMSO- d_6 .



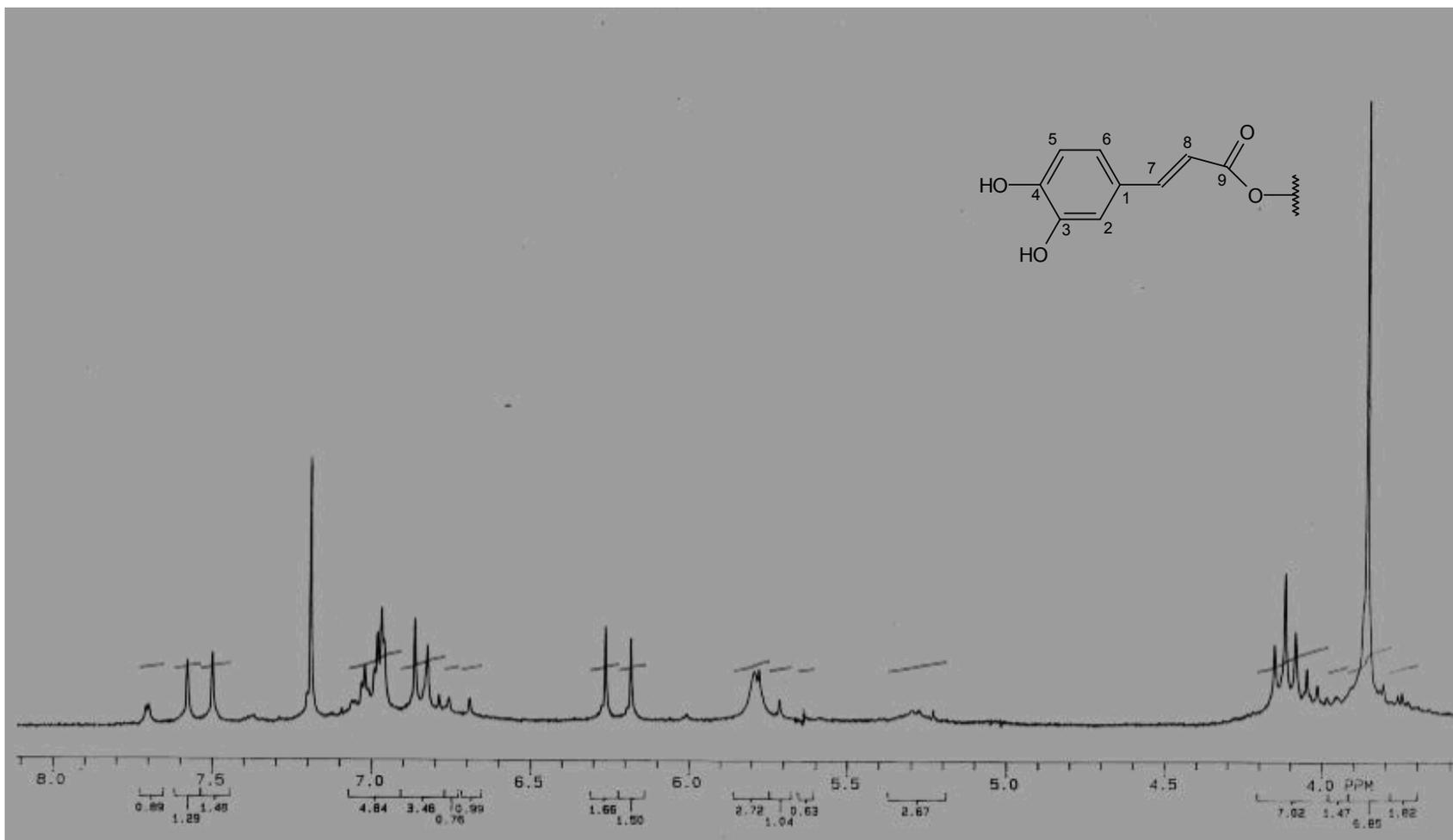
Espectro de ^{13}C de LL1 em 100 MHz em DMSO-d_6 .



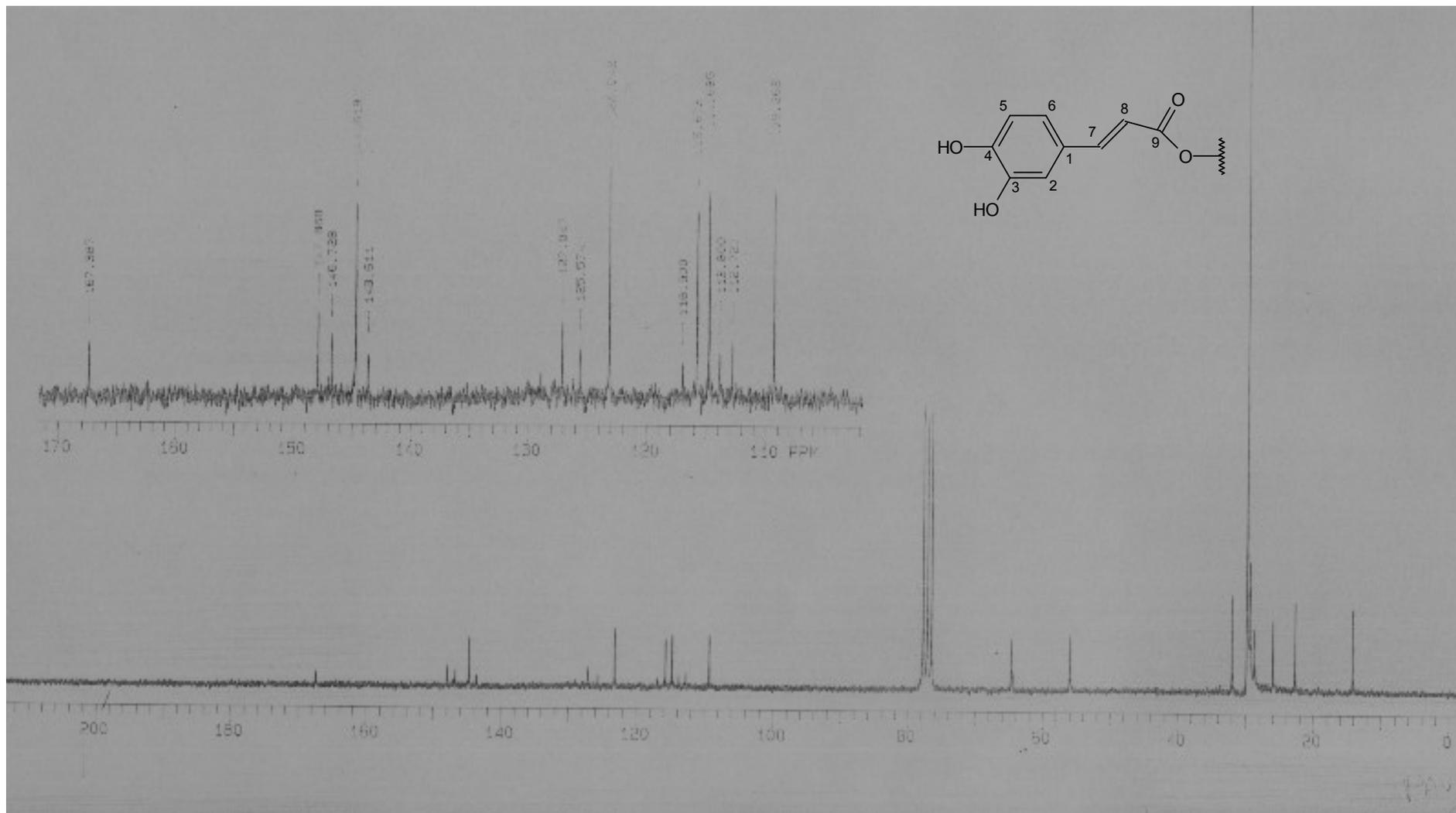
Espectro DEPT 135° de LL1 em DMSO-d₆.



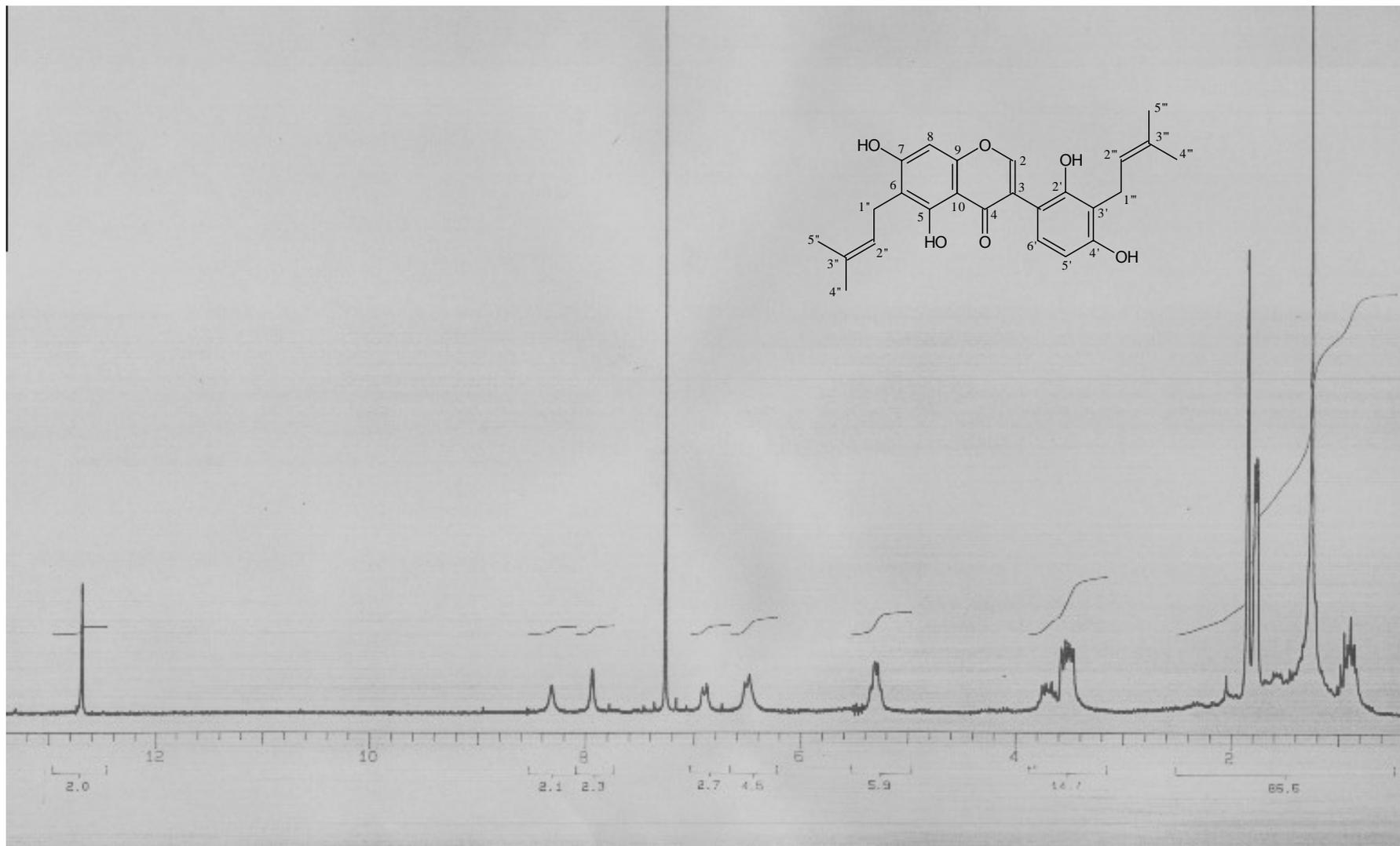
Espectro de Massas por impacto eletrônico de LL1.



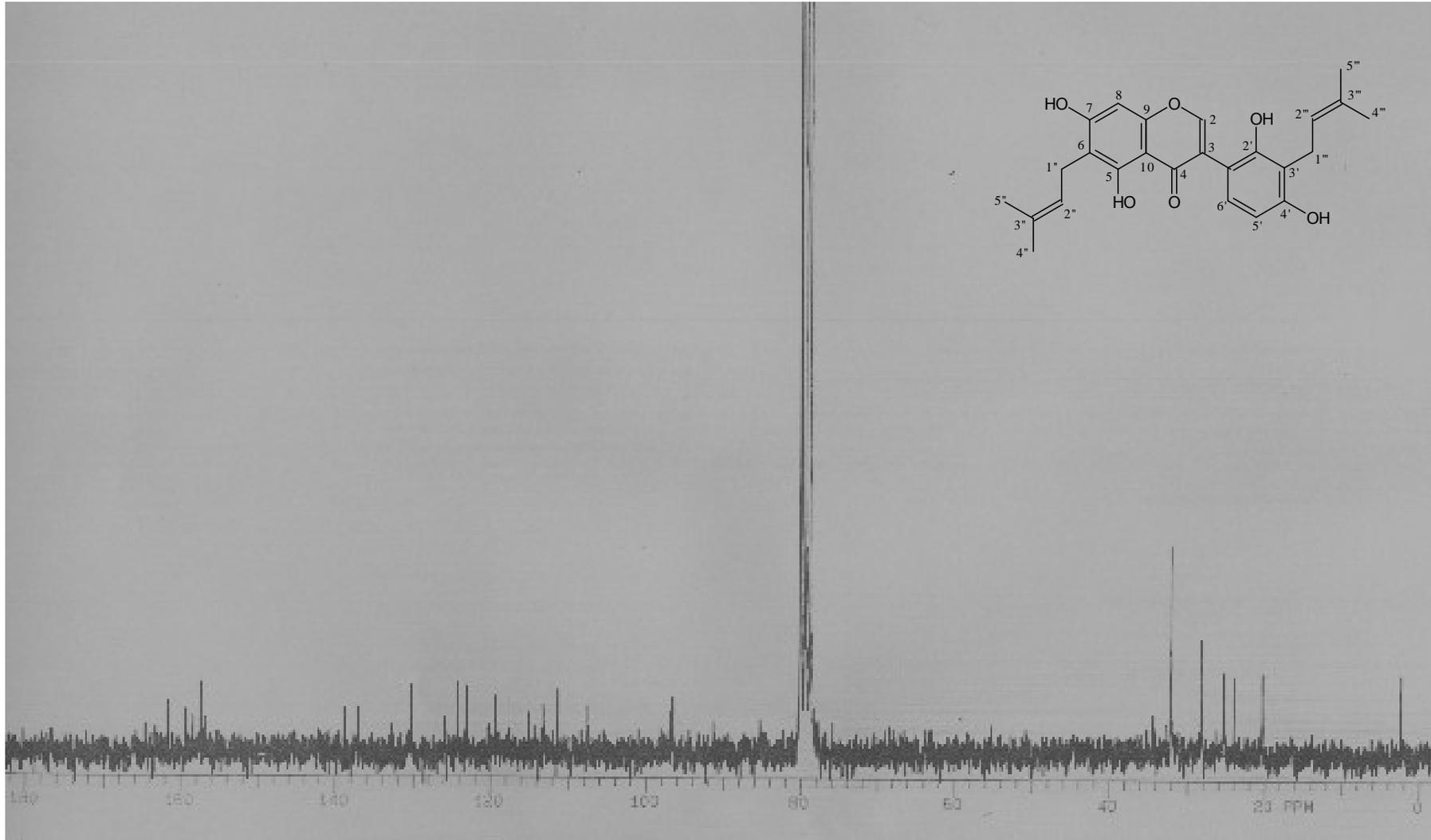
Espectro de RMN ¹H de LL7 em 200 MHz em CDCl₃.



Espectro de ^{13}C de LL7 em 50 MHz em CDCl_3 .



Espectro de RMN ^1H de LL8 em 200 MHz em CDCl_3 .



Espectro de ^{13}C de LL8 em 50 MHz em CDCl_3 .



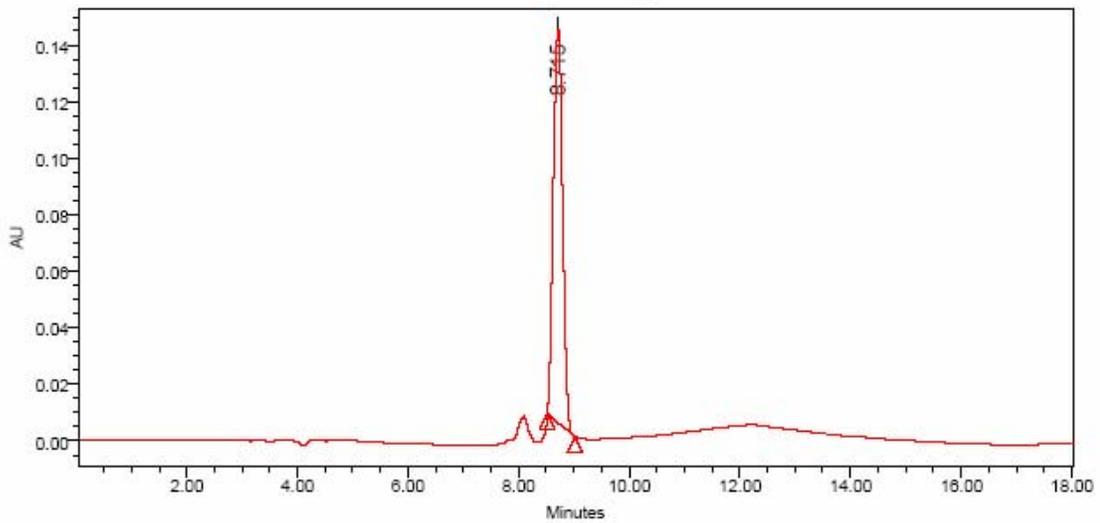
Reported by User: System

Project Name: Paulinho

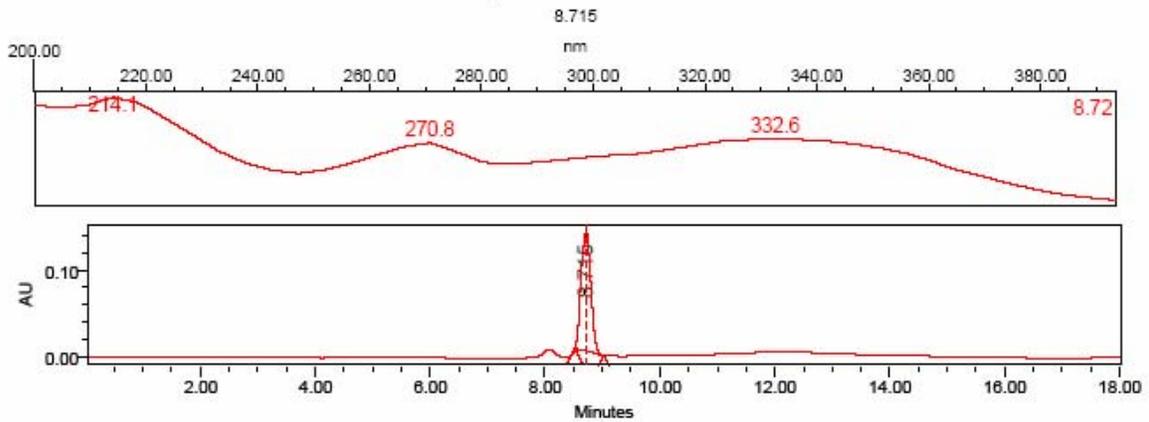
SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	LL 1 + LL 9	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	5/3/2004 2:09:26 PM
Vial:	3	Acq. Method Set:	LUPINUS1_MS
Injection #:	1	Date Processed:	5/4/2004 4:10:19 PM
Injection Volume:	15.00 ul	Processing Method:	LL 1 LL 9 coinj
Run Time:	18.0 Minutes	Channel Name:	WVln Ch1
Sample Set Name:	bem certinho	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 327.0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Spectrum Index Plot

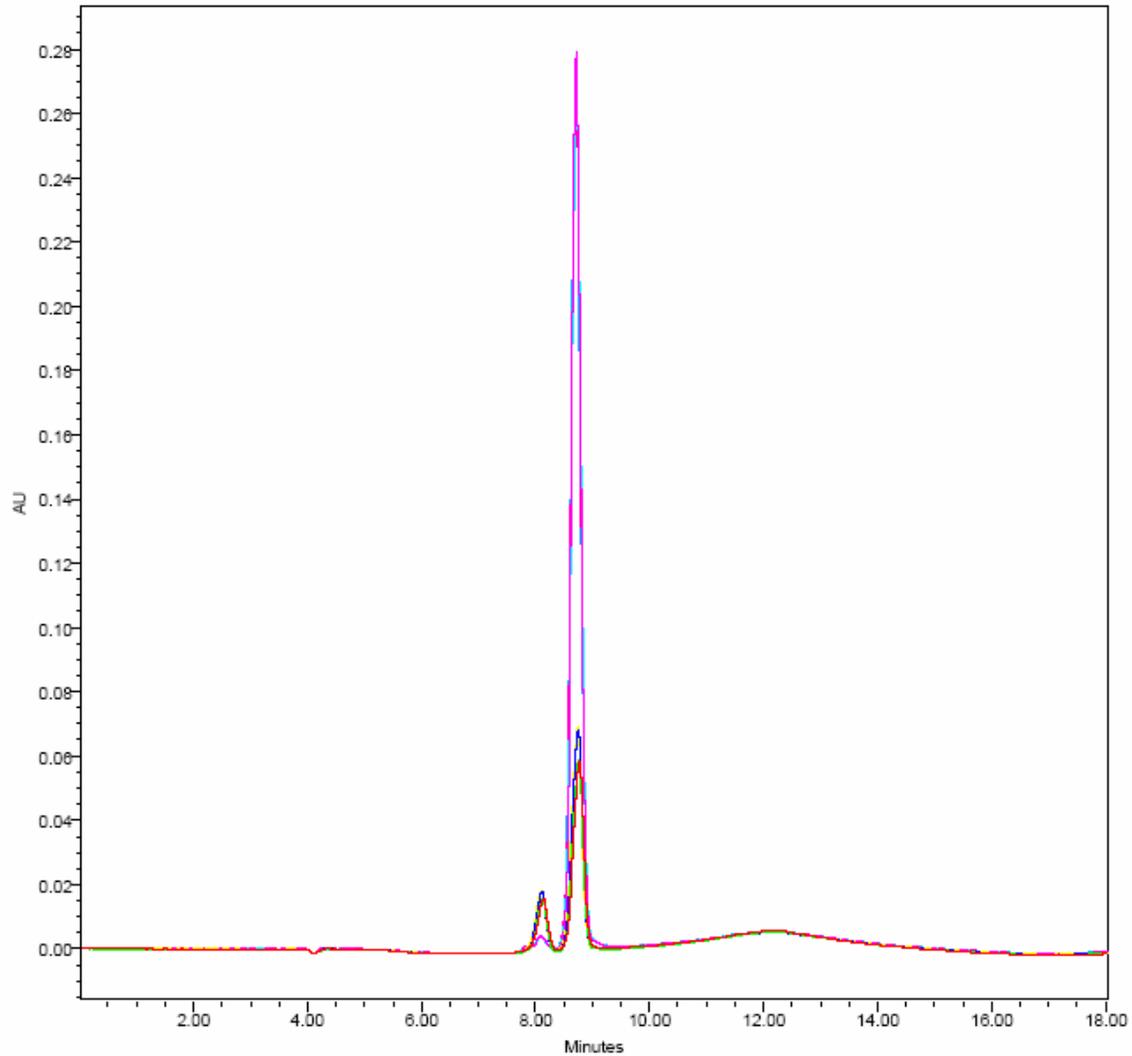




Overlay Report

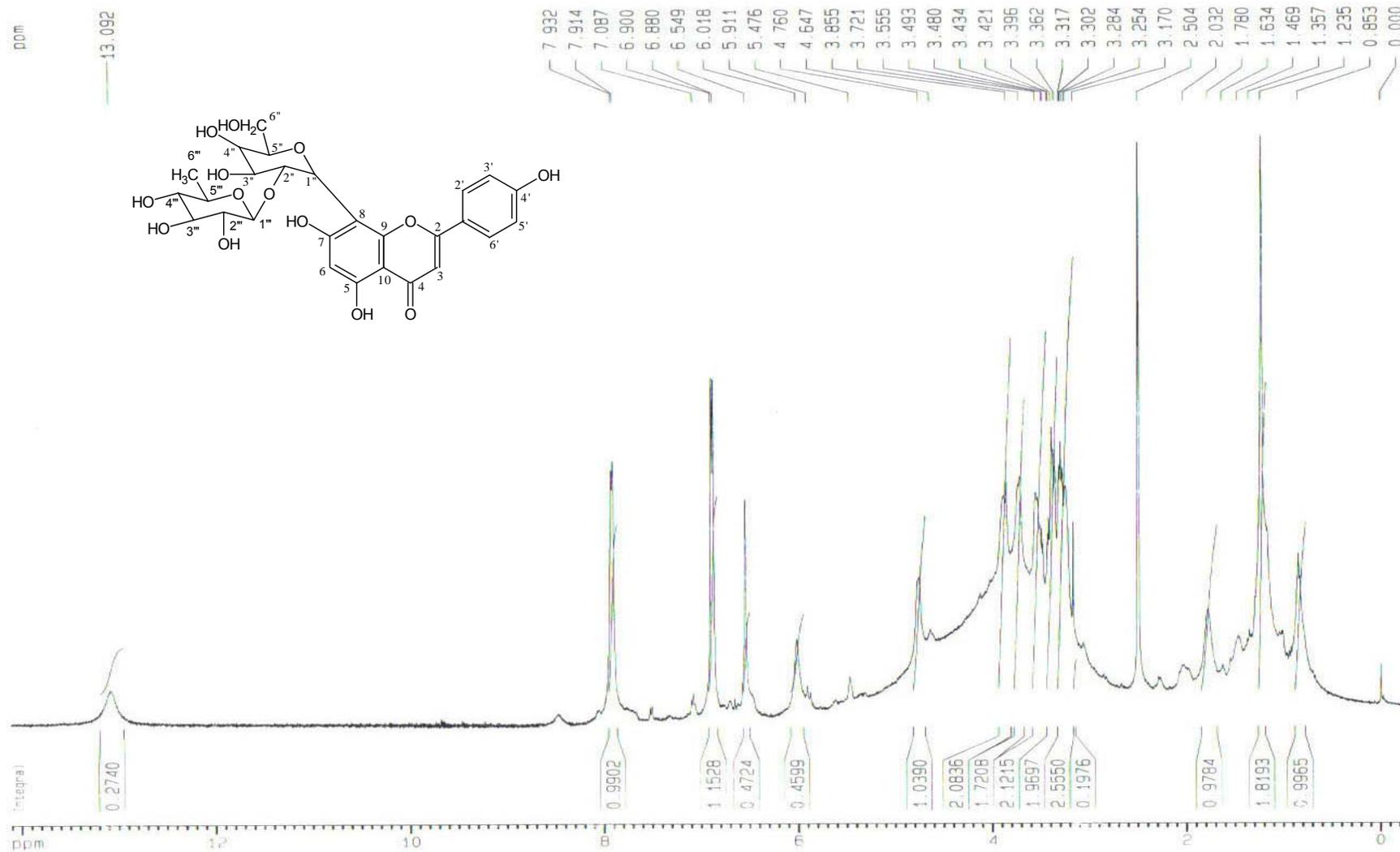
Reported by User: System

Project Name: Paulinho

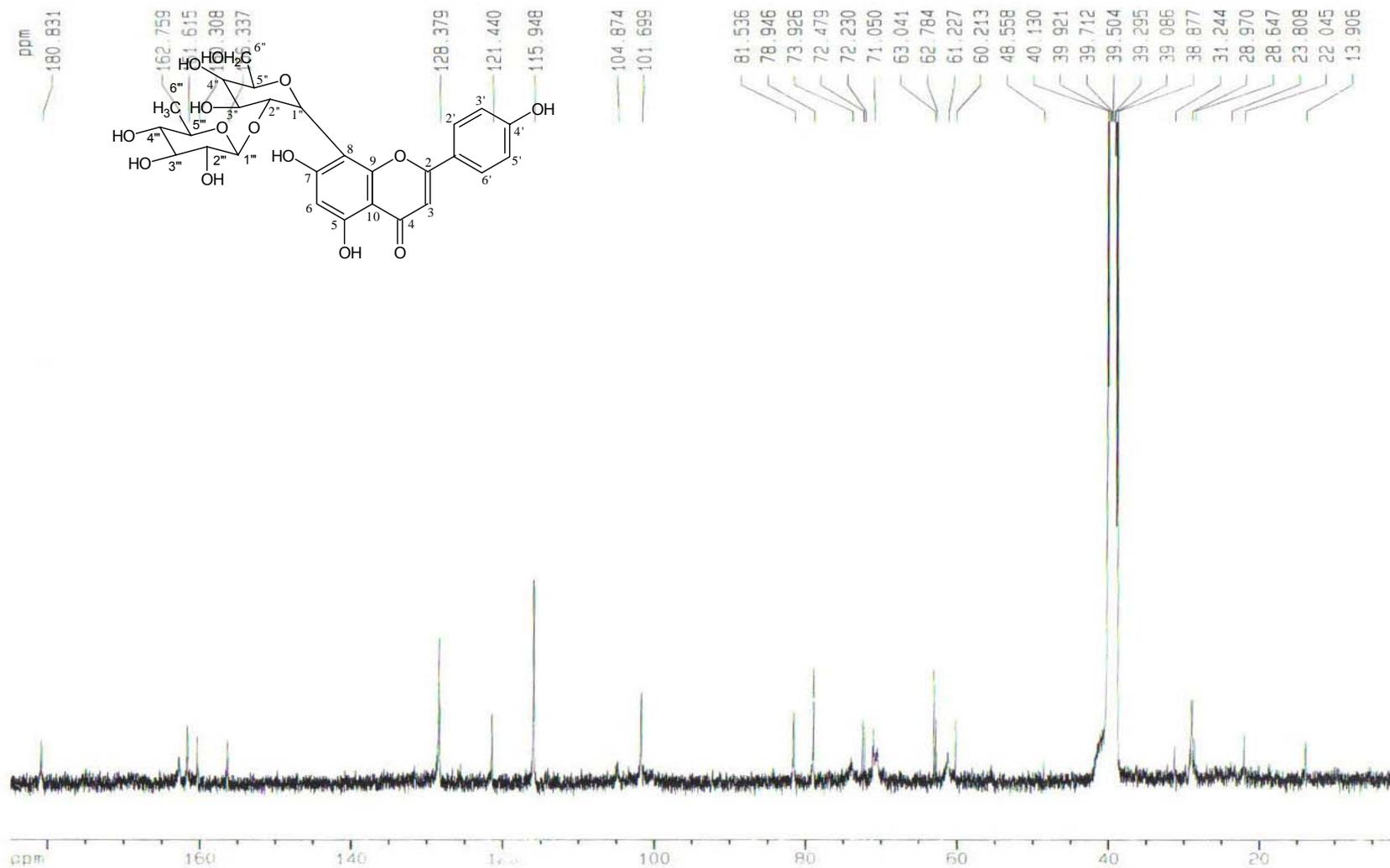


- LL 1; Date Acquired: 5/3/2004 10:31:07 AM; Vial: 1; Inj # 1; Channel: PDA 327.0 nm
- LL 1; Date Acquired: 5/3/2004 10:58:27 AM; Vial: 1; Inj # 1; Channel: PDA 327.0 nm
- LL 1; Date Acquired: 5/3/2004 11:25:43 AM; Vial: 1; Inj # 1; Channel: PDA 327.0 nm
- LL 1; Date Acquired: 5/3/2004 11:53:00 AM; Vial: 1; Inj # 1; Channel: PDA 327.0 nm
- LL 9; Date Acquired: 5/3/2004 12:20:19 PM; Vial: 2; Inj # 1; Channel: PDA 327.0 nm
- LL 9; Date Acquired: 5/3/2004 12:47:35 PM; Vial: 2; Inj # 1; Channel: PDA 327.0 nm
- LL 9; Date Acquired: 5/3/2004 1:14:52 PM; Vial: 2; Inj # 1; Channel: PDA 327.0 nm
- LL 9; Date Acquired: 5/3/2004 1:42:09 PM; Vial: 2; Inj # 1; Channel: PDA 327.0 nm

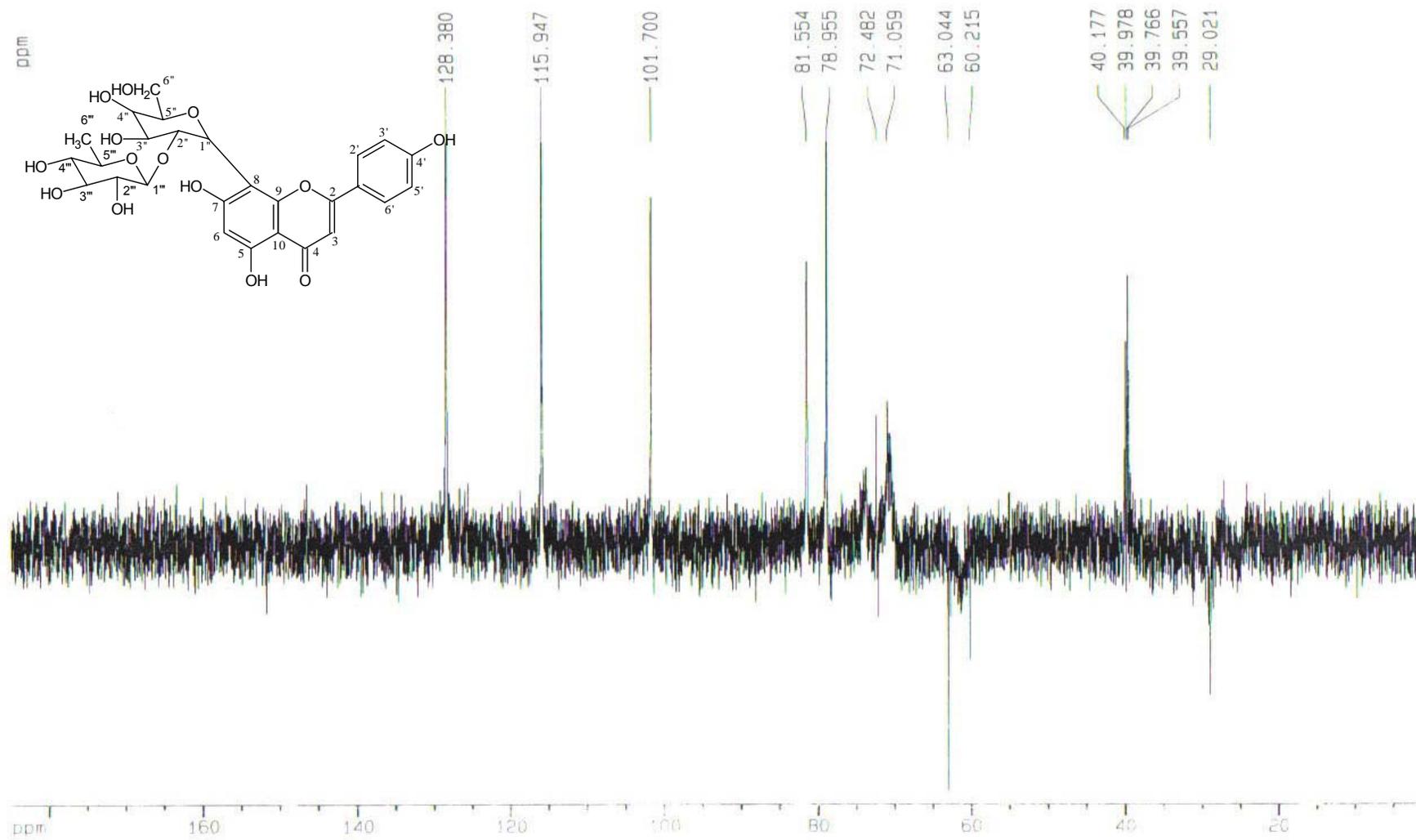
ANEXO 6



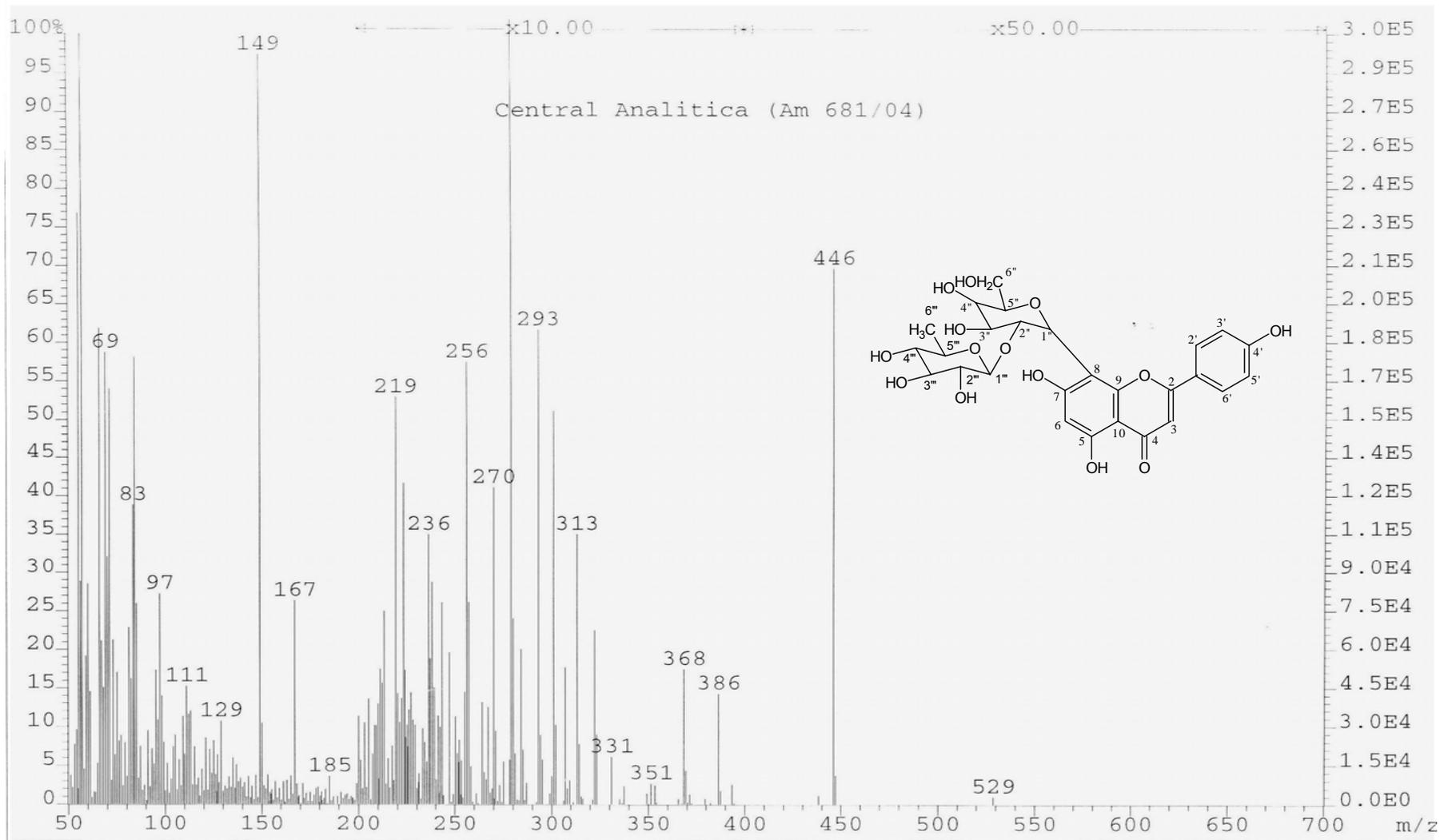
Espectro de RMN ¹H de LL10 em 400 MHz em DMSO-d₆.



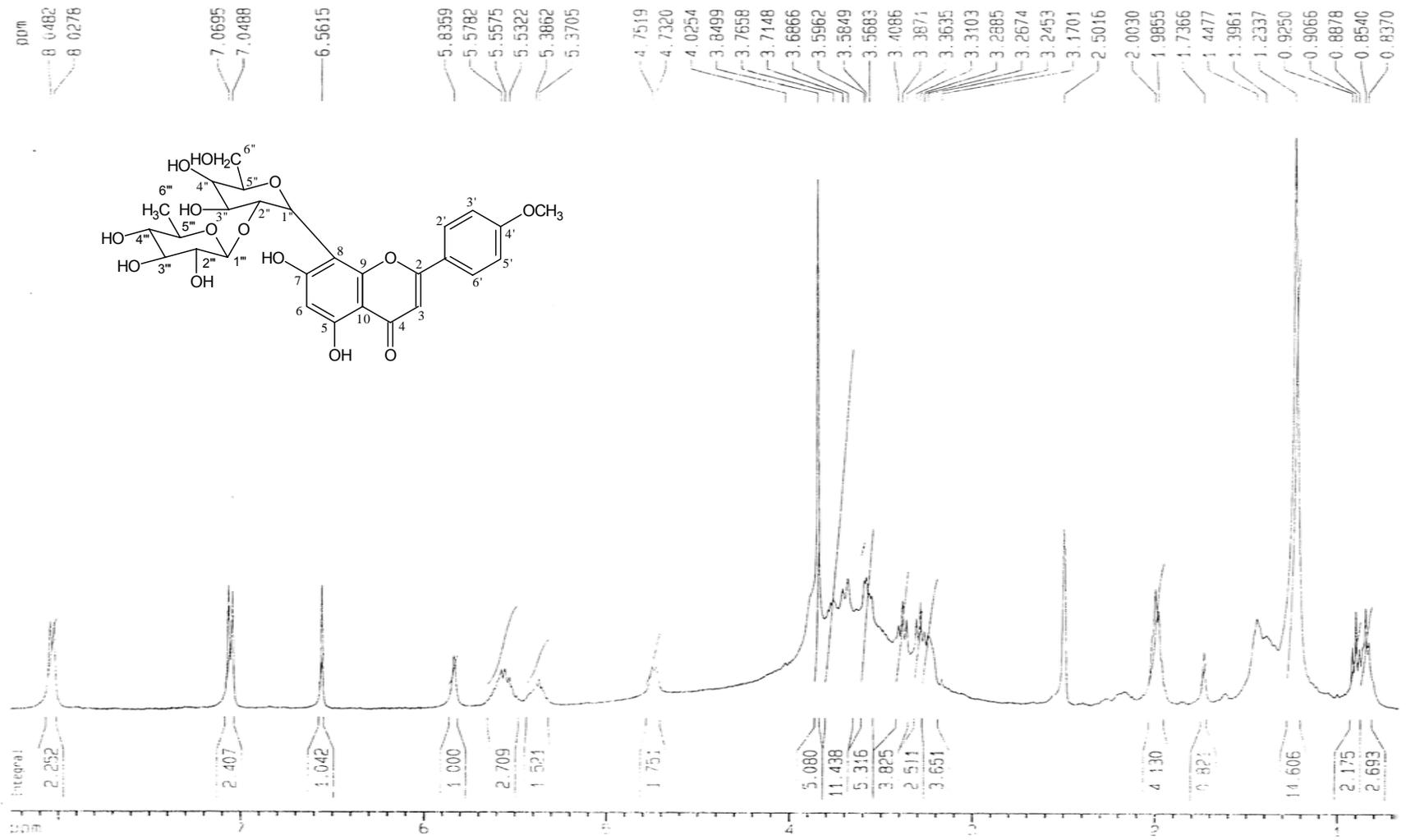
Espectro de ^{13}C de LL10 em 100 MH em DMSO-d_6 .



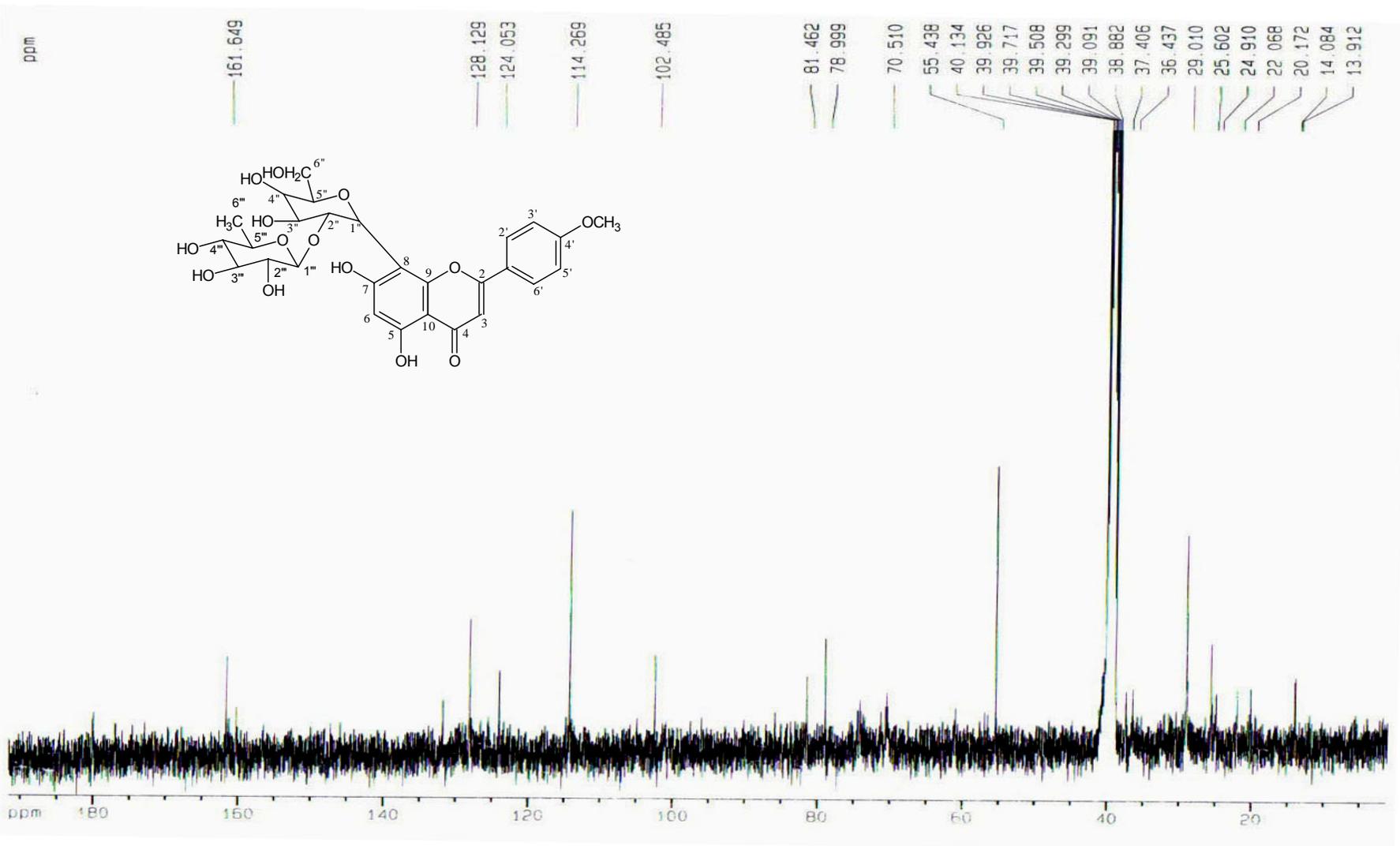
Espectro DEPT 135° ampliado de LL10 em DMSO-d₆.



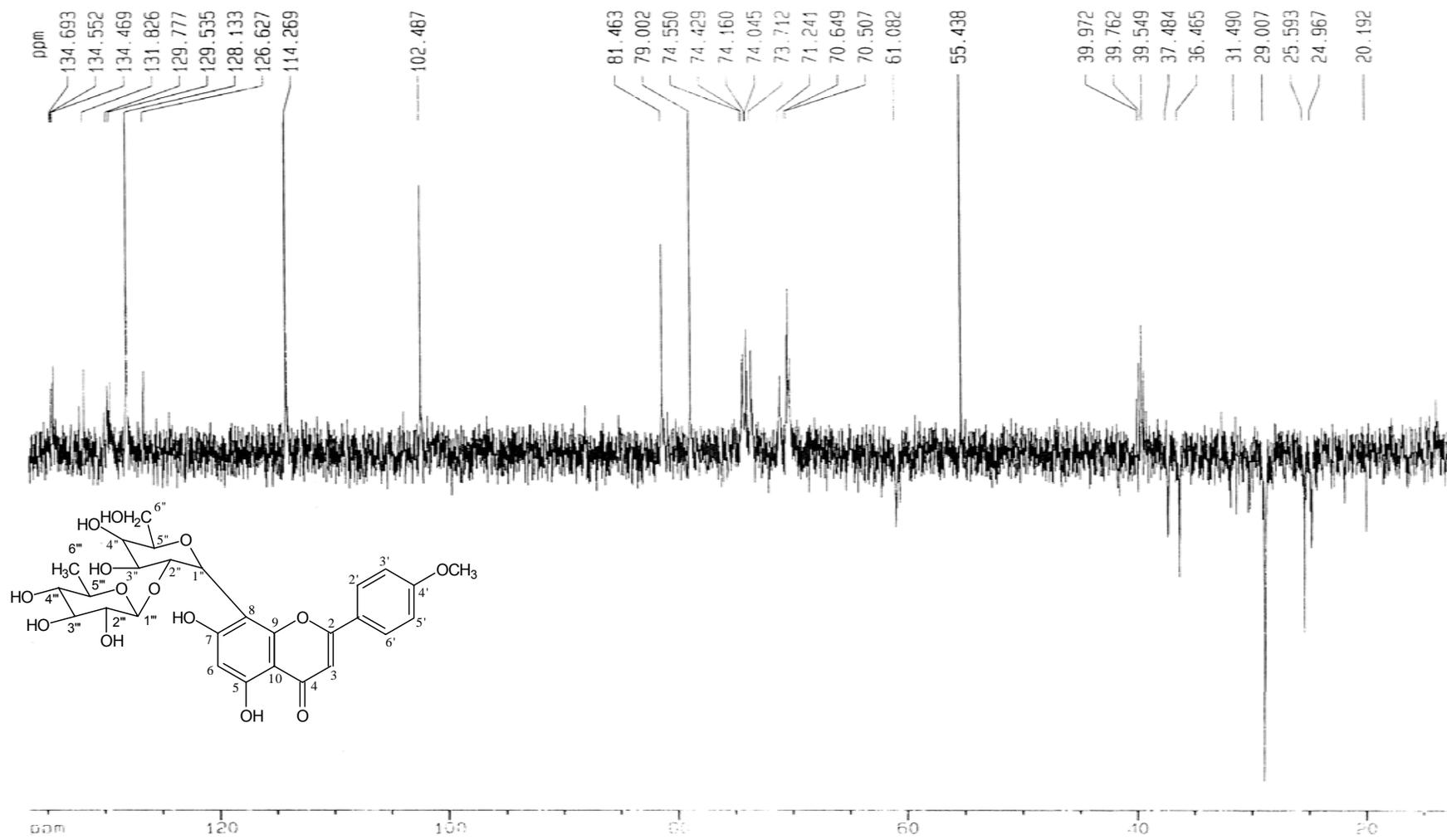
Espectro de Massas por impacto eletrônico de LL10.



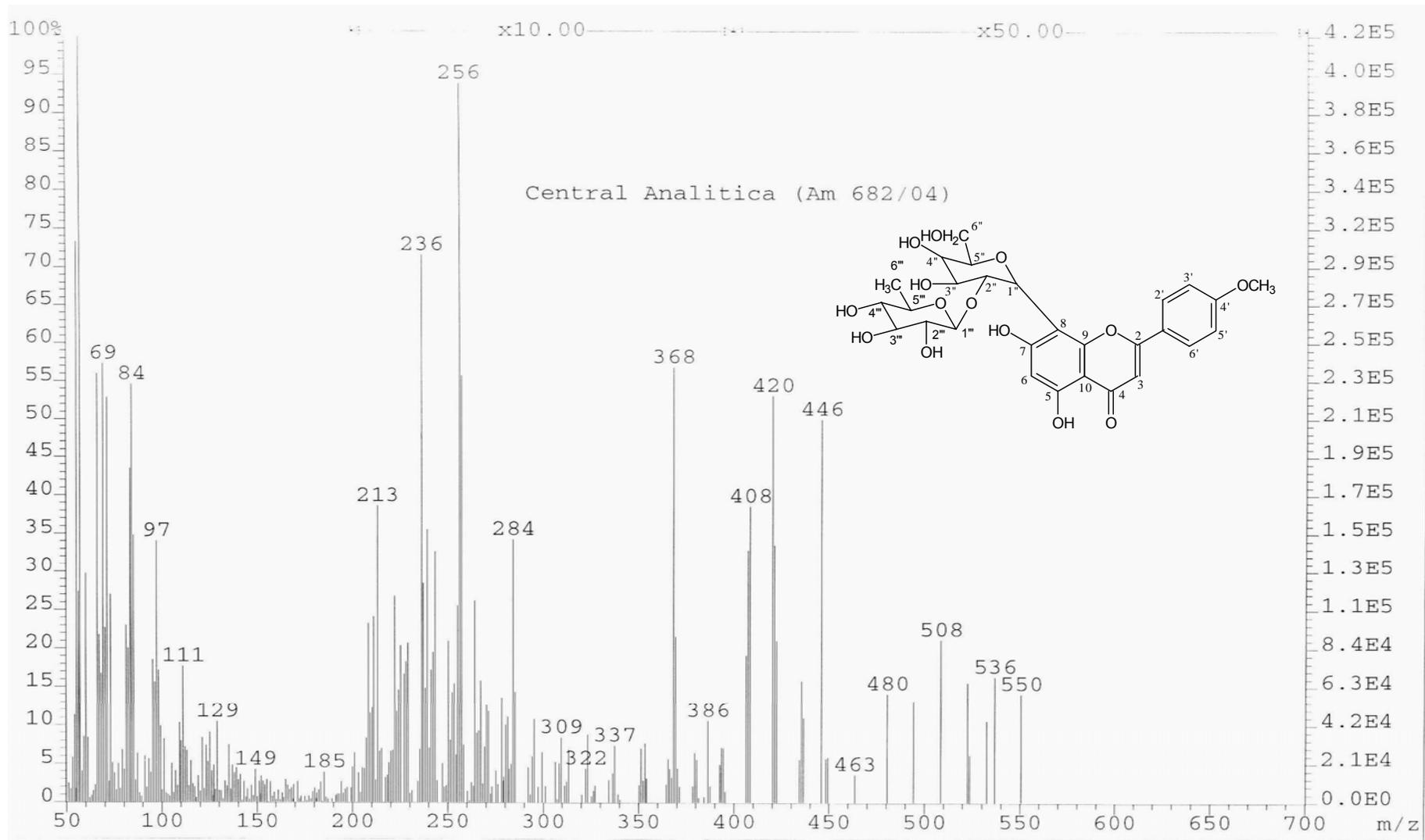
Espectro de RMN ¹H de LL11 em 400 MHz em DMSO-d₆.



Espectro de ^{13}C de LL11 em 100 MHz. em DMSO-d_6



Espectro DEPT 135° ampliado de LL11 em DMSO-d₆.



Espectro de Massas por impacto eletrônico de LL11.